

***MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITA' DEL PARTICOLATO  
ATMOSFERICO URBANO (PM<sub>2,5</sub>) IN FERRARA  
Report anno 2014***

## 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 2003. Il sito di campionamento a Ferrara, dal 2009, è Villa Fulvia e i mesi in cui si effettua il campionamento per i test di mutagenesi, sono: Gennaio, Febbraio, Luglio, Novembre e Dicembre.

Per un problema tecnico non è stato sottoposto ai test il PM di dicembre 2013.

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 2014.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento ed estrazione particolato atmosferico*

Il particolato con diametro aerodinamico  $\leq 2,5 \mu\text{m}$  (PM<sub>2,5</sub>) 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 è di circa 2,3 m<sup>3</sup>/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. Il solvente viene evaporato mediante rotavapor ed il residuo secco è risospeso in dimetilsolfossido (DMSO) ad una concentrazione finale di 50 m<sup>3</sup>/ml per l'esecuzione del test su Salmonella e di 1000 m<sup>3</sup>/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 dell'Area Microinquinanti organici (polo analitico regionale nel settore dei 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-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 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 nel gene codificante per la biosintesi dell'istidina, che li rendono incapaci di crescere sul 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 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. 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  $+37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## ***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 ricordato 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  $+37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 5% di  $\text{CO}_2$ . Dopo l'incubazione le cellule vengono lisate e il DNA viene sottoposto a corsa elettroforetica su vetrino in tampone fortemente alcalino ( $\text{pH} > 13$ ). 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  $10 \text{ m}^3$  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) è  $\geq 2$  (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/μg 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 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. Si considera, a tal fine, solo il coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano un  $\geq 0,60$ .

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 in ciascuna replica).

Il potenziale effetto tossico degli estratti è valutato subito dopo il trattamento come riduzione della vitalità cellulare (mortalità), utilizzando il Trypan blue: quando la mortalità cellulare supera il 30%; 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 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.

## RISULTATI

### Test su *Salmonella*

Nel 2014, si confermano valori di mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come Fattore di Genotossicità totale (Tab.1), “fortemente positivi” nei mesi di gennaio, febbraio, novembre e dicembre. In linea con il tipico andamento stagionale della mutagenicità del PM rilevata con questo tipo di test è la negatività del campione di luglio.

I valori più alti di fattore di genotossicità nel periodo riportato in tabella 1, sono quelli di dicembre 2011, gennaio 2012 e gennaio 2013.

**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
gen-09	39,3	gen-11	39,7	gen-13	103,7
feb-09	56,1	feb-11	54	feb-13	39,7
lug-09	0,7	lug-11	0,5	lug-13	0,3
nov-09	29,1	nov-11	38,2	nov-13	34,8
dic-09	47,1	dic-11	108,4	dic-13	nd
gen-10	44,8	gen-12	104,7	gen-14	42,4
feb-10	39,8	feb-12	53,2	feb-14	39,2
lug-10	0,4	lug-12	0,2	lug-14	0,3
nov-10	16,1	nov-12	45,4	nov-14	17,5
dic-10	33,3	dic-12	92,1	dic-14	19,4

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

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.

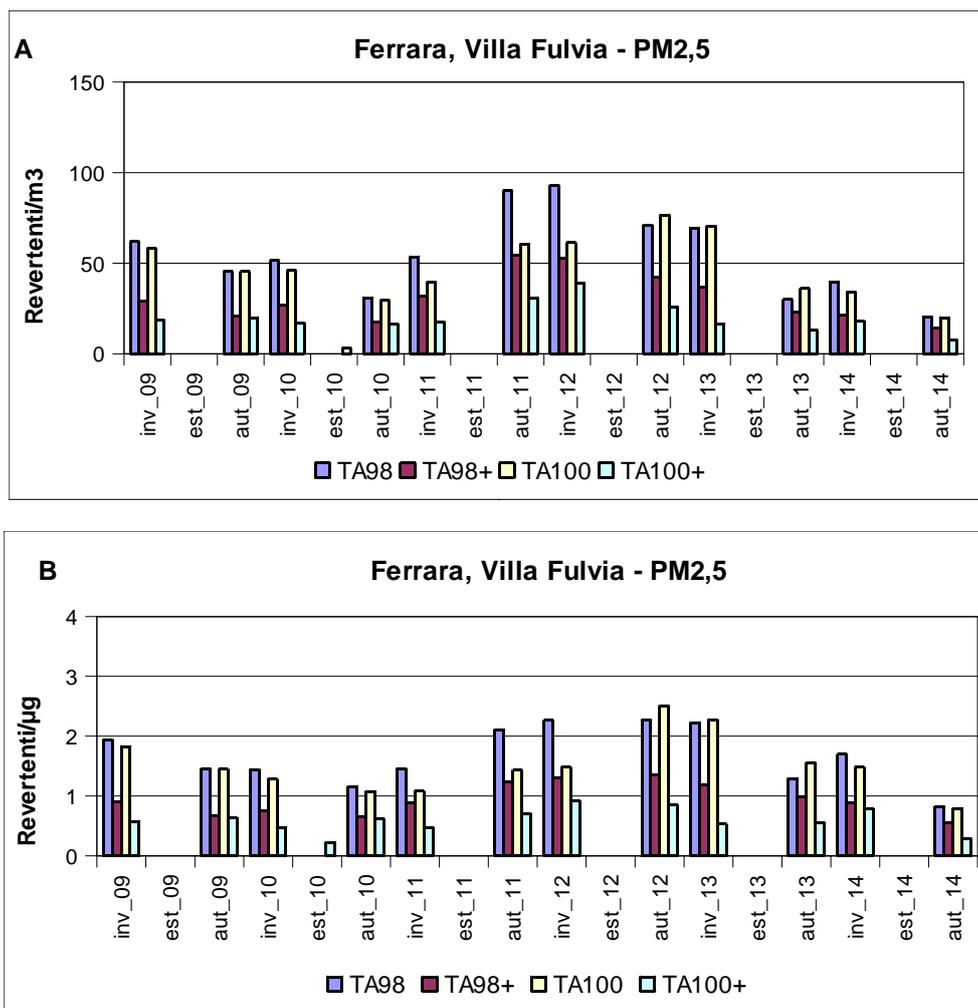
Per quanto riguarda l’aspetto “qualitativo” della mutagenicità (es.: induzione di mutazioni per sostituzione, per inserzione o delezione di basi, presenza di mutageni diretti o di promutageni),

anche nel 2014 si osserva una maggiore sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica in entrambi i ceppi (t di Student,  $p < 0,05$ , sia per metro cubo di aria equivalente che per microgrammo di polvere), evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta (Fig.1A,B; Tab.2) cioè che possono agire sul DNA direttamente senza essere metabolizzate.

**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, nei 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
gen-13	98	54	94	22	gen-13	2,999	1,653	2,877	0,673
feb-13	41	20	47	11	feb-13	1,453	0,709	1,665	0,390
lug-13	0	0	0	0	lug-13	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-13	30	23	36	30	nov-13	1,294	0,992	1,553	0,561
dic-13	nd	nd	nd	nd	dic-13	nd	nd	nd	nd
gen-14	38	23	28	14	gen-14	1,366	0,827	1,006	0,503
feb-14	42	19	40	22	feb-14	2,035	0,936	1,958	1,077
lug-14	0	0	0	0	lug-14	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-14	19	16	22	15	nov-14	0,727	0,612	0,842	0,574
dic-14	22	12	18	0	dic-14	0,914	0,499	0,748	0,000

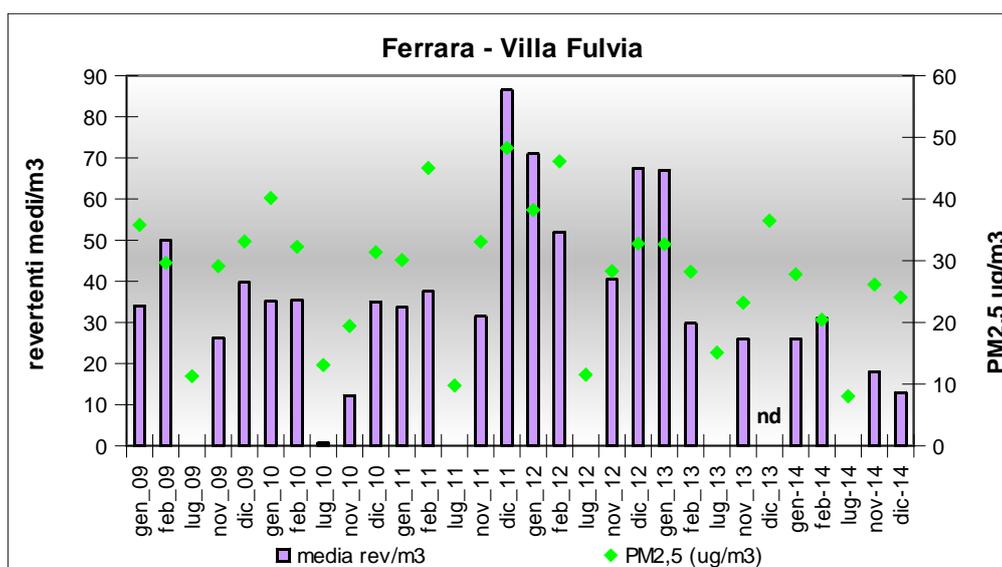
**Figura 1 - Genotossicità del PM<sub>2,5</sub> espressa come numero medio dei revertenti/m<sup>3</sup> aria (A) e come numero medio di revertenti/μg di polveri (B), rilevata nelle stagioni indicate, in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 e TA100 con (+) e senza attivazione metabolica esogena. Inverno: media gennaio-febbraio; estate: luglio; autunno: media novembre-dicembre.**



Nel 2014 si riscontra, nella maggior parte dei test, una tendenza a più bassi livelli di mutagenicità soprattutto quando espressa come numero di revertenti per metro cubo di aria, rispetto al periodo autunno 2011 – inverno 2013 (Fig.1A,B; Tab.2). Se si osserva l'andamento dei revertenti indotti per microgrammo di particolato e cioè l'attività mutagena specifica del PM (Fig.1B; Tab.2), questa differenza nel livello di mutagenicità è meno evidente e quindi, si conferma che, a volte, la maggiore attività mutagena specifica del PM incide di più della concentrazione dello stesso ( $\mu\text{g}$  per metro cubo di aria) (Fig.2) sul numero di revertenti per metro cubo di aria.

Nel grafico riportato in Figura 2, infatti, si nota che l'andamento del numero dei revertenti indotti per metro cubo di aria e l'andamento della concentrazione di particolato (microgrammi per metro cubo di aria) sono abbastanza simili (il valore del coefficiente di determinazione  $R^2$ , ottenuto mettendo in relazione i due parametri rilevati da inizio campionamento, è 0,70), ma che non sempre a una maggiore concentrazione di  $\text{PM}_{2,5}$  corrisponde un numero maggiore di revertenti indotti per metro cubo di aria, sottolineando la rilevanza della tipologia e della quantità relativa delle sostanze mutagene associate al PM.

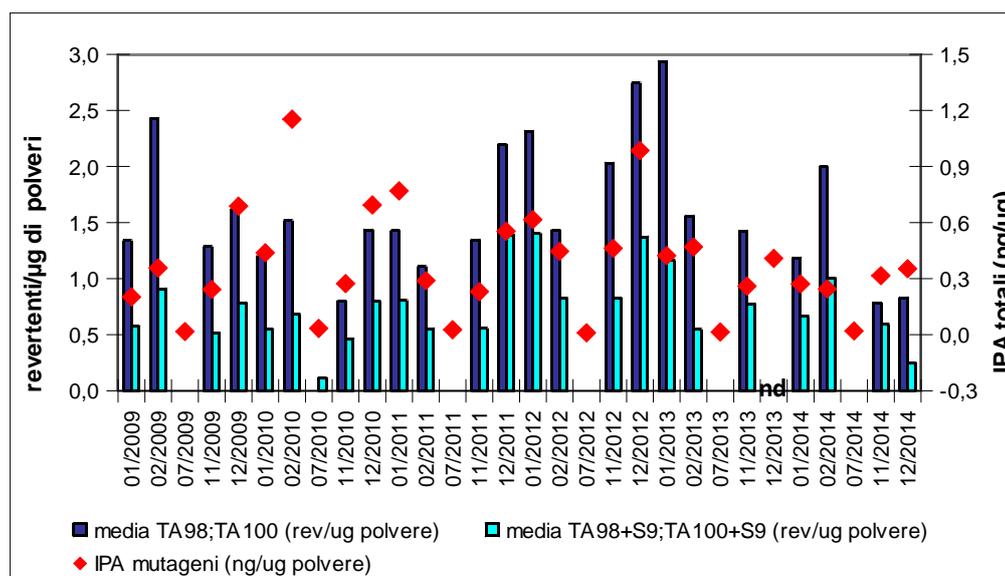
**Figura 2 - Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano  $\text{PM}_{2,5}$  (media dei revertenti/ $\text{m}^3$  indotti da estratti di campioni mensili) e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, nei periodi indicati.**



In Figura 3, si confrontano 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 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.

Pur evidenziandosi stagionalità nell'andamento delle concentrazioni (nei mesi autunnali e invernali le concentrazioni sono tra loro statisticamente comparabili e sono maggiori di quelle rilevate nei mesi di luglio - Anova, *post hoc* di Tukey,  $p < 0.05$ ), non si evidenzia corrispondenza nell'andamento dei due parametri ed è evidente la discrepanza tra le concentrazioni più alte di IPA e i valori più alti di revertenti indotti ( $R^2$  di 0,48 considerando la media dei revertenti indotti in seguito ad attivazione metabolica esogena). Inoltre, si conferma un forte contributo alla mutagenicità del PM anche da parte di altre sostanze ad azione mutagena diretta.

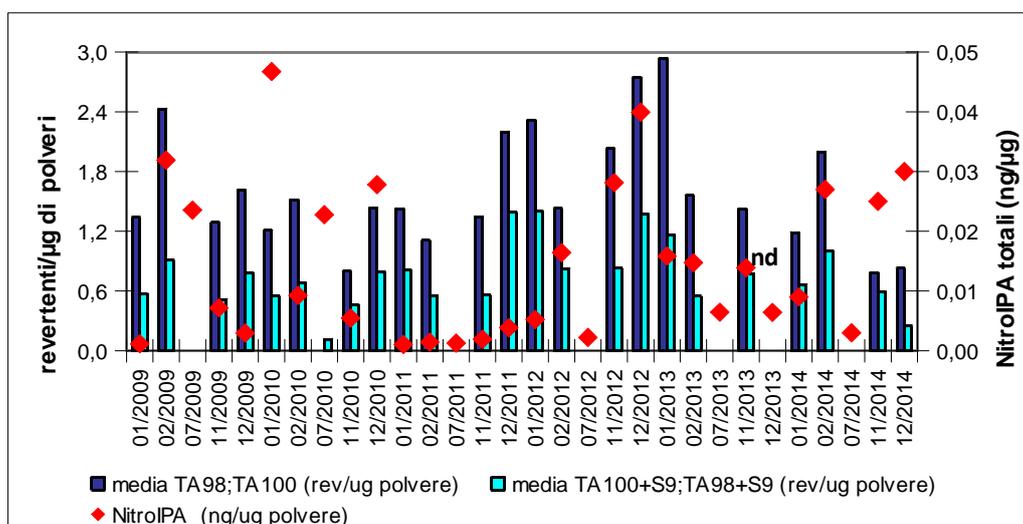
**Figura 3- Comparazione dei livelli di IPA dotati di attività biologica (vedi testo) e attività genotossica determinata con i test sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+S9) e senza attivazione metabolica.**



In generale, non si riscontra nemmeno corrispondenza tra la maggiore attività mutagenica diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA (Fig.4), evidenziando il contributo di altre sostanze alla mutagenicità del PM. Occorre tenere in considerazione che nei confronti tra il numero dei revertenti indotti e le concentrazioni di Nitro-IPA, i valori in assoluto di queste ultime sono molto molto bassi, rispetto a quelli dei revertenti.

Per quanto riguarda, invece, l'andamento della concentrazione dei Nitro-IPA, non si osserva la stessa stagionalità evidenziata per gli IPA. Questo si può spiegare con il fatto che i Nitro-IPA sono anche prodotti secondari degli IPA, che si formano in atmosfera in seguito a reazioni fotochimiche.

**Figura 4- Comparazione dei livelli di Nitro-IPA ( $\Sigma$  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, 1,6-dinitropirene, 1,8-dinitropirene, 6-nitrobenzo(a)pirene) e attività genotossica determinata con i test sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+S9) e senza attivazione metabolica.**



**n.b.: non conteggiato 2-nitrofluorene da novembre 2010.**

### Test della cometa

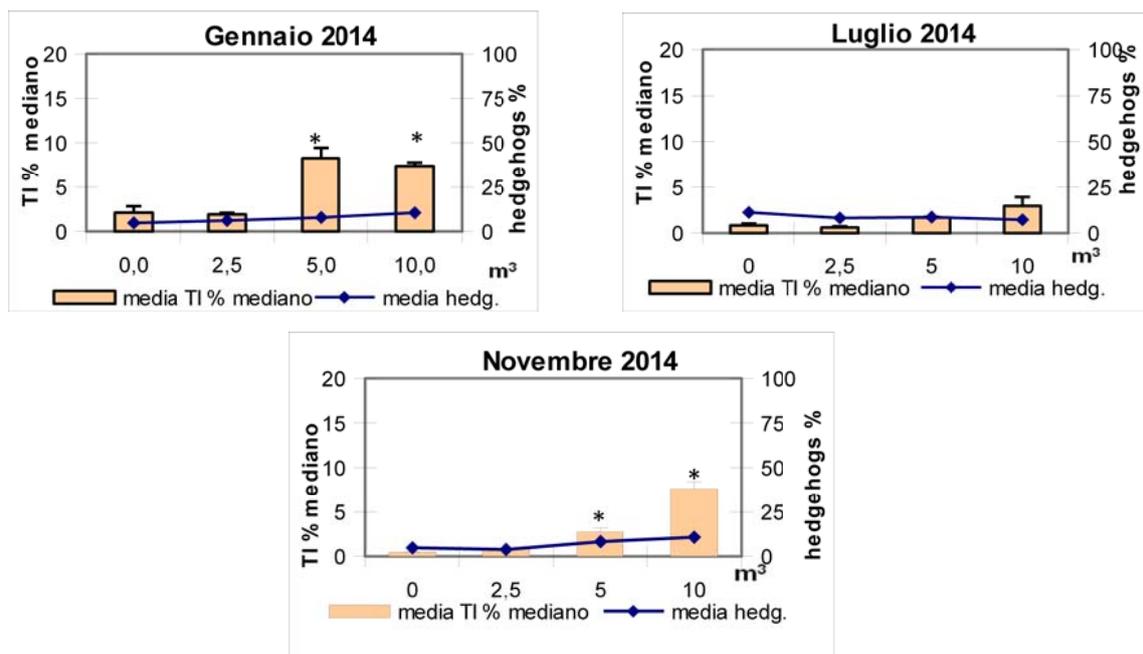
In Figura 5 vengono illustrati i risultati ottenuti dai tre campioni analizzati nel 2014: per ogni dose saggiata sono riportati i valori della percentuale dell'intensità di fluorescenza del DNA nella coda della cometa (%TI – espressa come media delle mediane delle due repliche) la percentuale delle cellule che, in quanto particolarmente danneggiate, hanno perso la configurazione a cometa e appaiono come “hedgehogs” (porcospini).

Anche con il test della Cometa nel 2014 si evidenzia una minore mutagenicità del PM rispetto agli anni precedenti.

Hanno mostrato effetto genotossico sulle cellule A549, alle dosi di 5 e di 10 metri cubi equivalenti, i campioni di gennaio e di novembre, mentre il campione di luglio è risultato negativo.

In nessun campione si osserva la presenza di effetto tossico (aumento della mortalità) sulle cellule subito dopo il trattamento con il campione, mentre i campioni di gennaio e di novembre, nella fase di lettura, hanno mostrato una tendenza all'aumento di cellule “hedgehogs”, alla dose più alta (Fig.5).

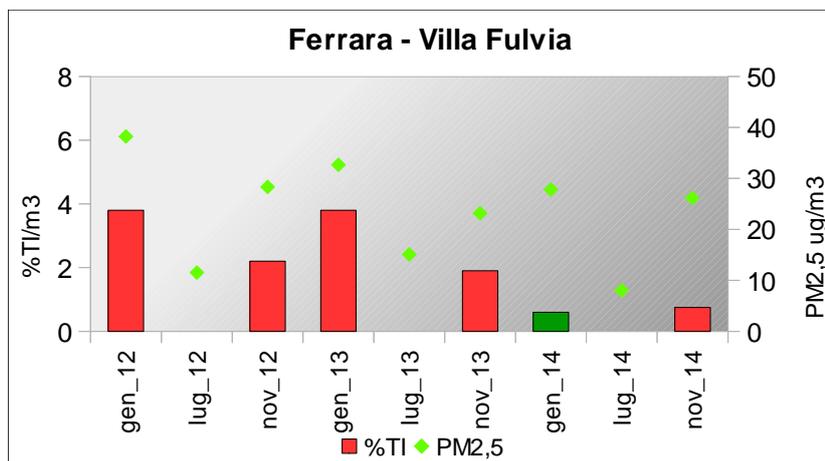
**Figura 5 – Grafici dose-risposta dei campioni analizzati nel 2014. Vengono riportati, per ogni dose, la media dei valori del danno al DNA - espresso come percentuale di TI - e della tossicità indotta dal campione - espressa come hedgehogs % - (vedi testo).**



- positività ottenuta con test della mediana (p<0.01)

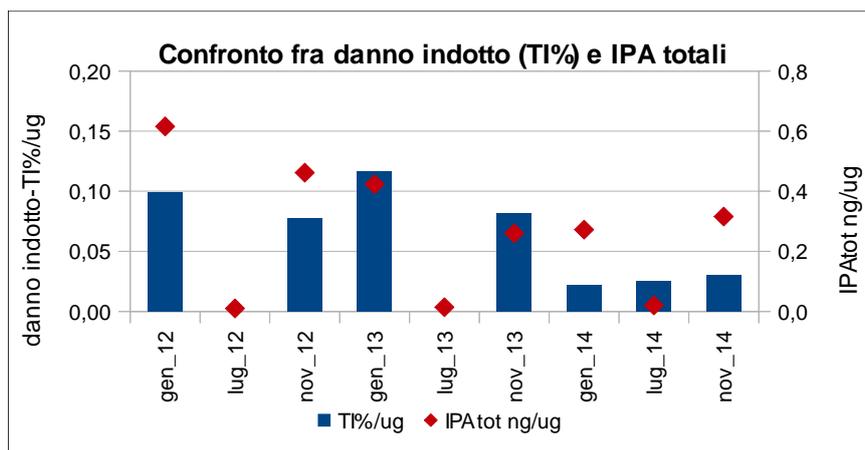
Mettendo in relazione la concentrazione di polveri con l'aumento della percentuale di intensità di fluorescenza nella coda - TI%- per metro cubo, si osserva una buona correlazione essendo il valore del coefficiente di determinazione  $R^2$  ottenuto di 0,71, anche se non si osserva una corrispondenza assoluta fra attività genotossica e concentrazione di PM (Fig. 6).

**Figura 6 – Andamenti comparati 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) e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri.**



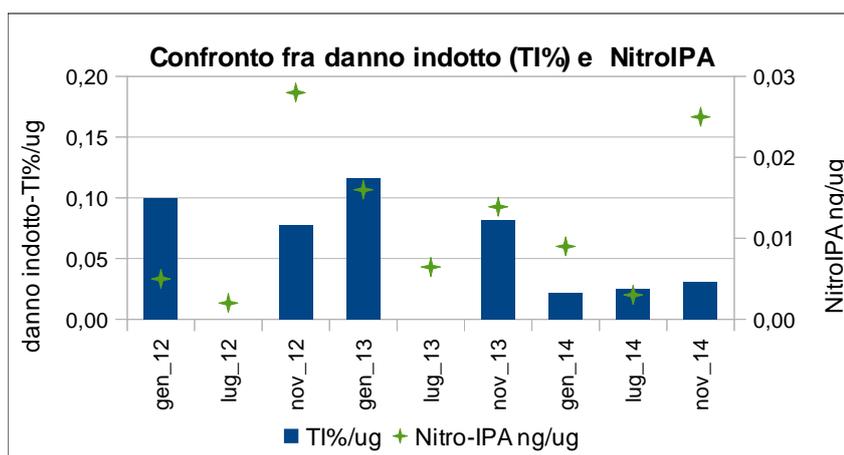
Dalla Figura 7, dove si confrontano i dati di IPA totali (vedi paragrafi precedenti) con l'induzione di danno alle cellule A549 (TI%), si nota una certa corrispondenza tra i due parametri (il valore del coefficiente di determinazione  $R^2$ , ottenuto mettendo in relazione i valori rilevati da inizio campionamento, è di 0,69) pur non riscontrandosi, anche in questo caso, una corrispondenza assoluta fra la concentrazioni di IPA e il danno al DNA.

**Figura 7 – Confronto del danno indotto (espresso come percentuale di TI, vedi testo) con la concentrazione medie mensili di IPA totali (vedi testo).**



Nessuna corrispondenza invece, si riscontra tra la concentrazione dei nitroderivati degli IPA e l'induzione di danno alle cellule A549 (TI%) (Fig.8).

**Figura 8 – Confronto del danno indotto (espresso come percentuale di TI, vedi testo) con la concentrazione di Nitro-IPA (vedi testo).**



Infine, mettendo a confronto i dati ottenuti dai test con Salmonella con quelli ottenuti con il test della Cometa, considerando solo i mesi in cui si eseguono entrambi i test, si ottiene una correlazione di 0,97, ciò indica, almeno in base ai dati al momento disponibili, che l'utilizzo di batteri e di cellule umane porta a risultati comparabili.

## 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. Nel 2014 si osserva una tendenza a più bassi valori di mutagenicità rispetto al periodo autunno 2011 - inverno 2013, soprattutto in alcuni test condotti in assenza di attivazione metabolica esogena, cioè nei test che evidenziano la presenza di sostanze che possono agire direttamente sul DNA.

Si ricorda che, per un problema tecnico, non è stato sottoposto ai test il PM di dicembre 2013 e questo potrebbe aver inciso sui valori medi di mutagenicità di quella stagione autunnale (media dei mesi di novembre e dicembre).

Per quanto riguarda la genotossicità evidenziata con il test della Cometa sulla linea cellulare umana A549, anche nel 2014, si evidenzia corrispondenza con la positività rilevata con i test su Salmonella. Infatti, il campione di luglio 2014 è risultato negativo sia nel test della Cometa che nei test su Salmonella e quelli di novembre e di gennaio positivi in entrambi i test, evidenziando in questi mesi la presenza di sostanze associate al PM<sub>2,5</sub> in grado di indurre sia mutazioni di tipo puntiforme che rotture a singolo e/o a doppio filamento nel DNA. Si ricorda che i dati ottenuti col test della Cometa sono relativi solo a tre mesi dell'anno (gennaio, luglio e novembre) ritenuti rappresentativi rispettivamente dell'autunno dell'inverno e dell'estate. 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 maggiore concentrazione di Nitro-IPA rilevati nel periodo considerato.

Dal confronto delle concentrazioni di IPA totali con l'induzione di danno alle cellule A549 (TI%), si nota una corrispondenza tra i due parametri ( $R^2 = 0,69$ ) leggermente superiore a quella riscontrata con il numero dei revertenti indotti nel test su Salmonella, ma non si nota una corrispondenza assoluta fra le concentrazioni di IPA e il danno al DNA.

Non si riscontra invece, analogamente a quanto riscontrato per i test su Salmonella, alcuna corrispondenza tra la concentrazione dei nitroderivati degli IPA e l'induzione di danno alle cellule A549. Una buona correlazione si osserva mettendo in relazione la concentrazione di polveri con l'aumento della percentuale di intensità di fluorescenza nella coda - TI%- per metro cubo, pur non osservandosi, anche in questo caso, una corrispondenza assoluta fra i due parametri. Occorre tenere in considerazione, nel confronto tra questi due test che il test della cometa sulle cellule A549, si effettua solo a partire dal 2012 e quindi i dati disponibili sono numericamente inferiori a quelli ottenuti dai test su Salmonella (dati dal 2008).

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.

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.

Sotto 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 a Ferrara e del particolato campionato negli altri nodi della rete regionale:

**[http://www.arpa.emr.it/dettaglio\\_generale.asp?id=2871&idlivello=1610](http://www.arpa.emr.it/dettaglio_generale.asp?id=2871&idlivello=1610)**

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