



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, 24 aprile 2012

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

MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITA'
DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:
FERRARA anno 2011

INTRODUZIONE

Il monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico (Particulate Matter - PM) urbano, frazione PM_{2,5} (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_{2,5}, 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, in leucociti umani di donatori sani che evidenzia rotture a singolo o a doppio filamento del DNA. Questo test viene eseguito sui campioni prelevati nei mesi di gennaio, luglio e novembre.

Si ricorda che, dal momento che dal 2009 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 2011.

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 (Mi) e ai picchi isotopici (Mi+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 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°C.

Test della Cometa

Il Test della Cometa, o Comet assay, evidenzia rotture del DNA a singolo e doppio filamento, 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. (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): 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 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 ricorda che da luglio 2009 la dose massima saggiata corrisponde a 10 m³ di aria, mentre nei periodi precedenti corrispondeva a 5 m³.

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 ≥ 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 del DNA nella coda della cometa (TI%), parametro raccomandato in letteratura, che calcola la quantità di DNA migrato, rispetto a quello rimasto integro nella testa. Per ogni dose vengono misurate, da luglio 2009, 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 metodo Hoechst/bromuro di etidio: un campione viene definito tossico quando la mortalità cellulare supera il 30%; in questo caso la dose in oggetto viene definita "tossica" e non ne viene quantificata la genotossicità.

Inoltre, durante la fase di lettura, viene valutata la percentuale di cellule "hedgehogs" (letteralmente porcospino) ovvero cellule fortemente danneggiate che presentano nuclei

completamente dispersi, in cui la coda è separata dalla testa della cometa, fra queste possono essere presenti cellule che hanno attivato processi 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 2011 (Tab.1), presenta valori “fortemente positivi” in tutti i mesi invernali e autunnali. Nel periodo autunnale del 2011 si riscontra un aumento della mutagenicità rispetto al corrispondente periodo dei due anni precedenti e il valore di FG riscontrato nel dicembre 2011 è il più alto in assoluto nell'intero periodo 2009 - 2011. 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		FG
gen-09	39,3	gen-10	44,8	gen-11	39,7
feb-09	56,1	feb-10	39,8	feb-11	54
lug-09	0,7	lug-10	0,4	lug-11	0,5
nov-09	29,1	nov-10	16,1	nov-11	38,2
dic-09	47,1	dic-10	33,3	dic-11	108,4

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). 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).

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 corrispondenza tra i due parametri (R² = 0,8, regressione lineare).

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
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

Figura 1 - Genotossicità 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.

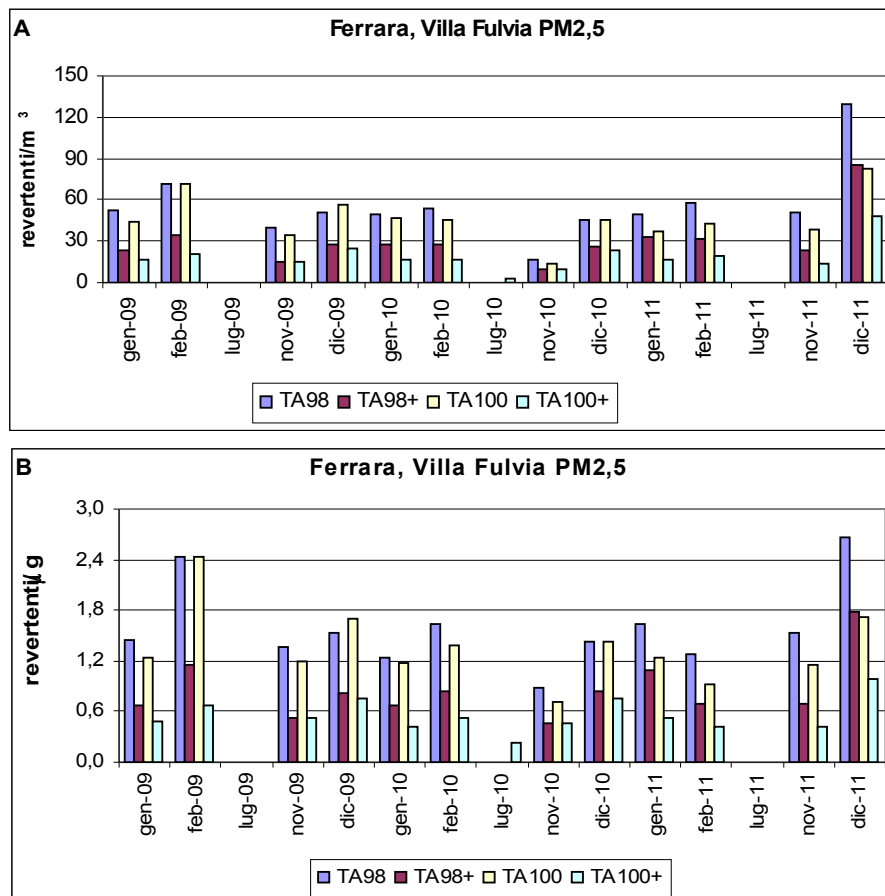
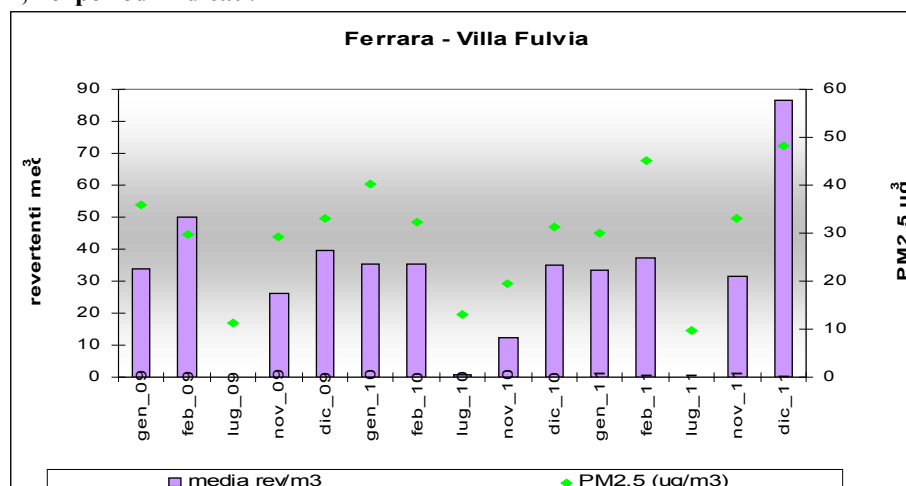
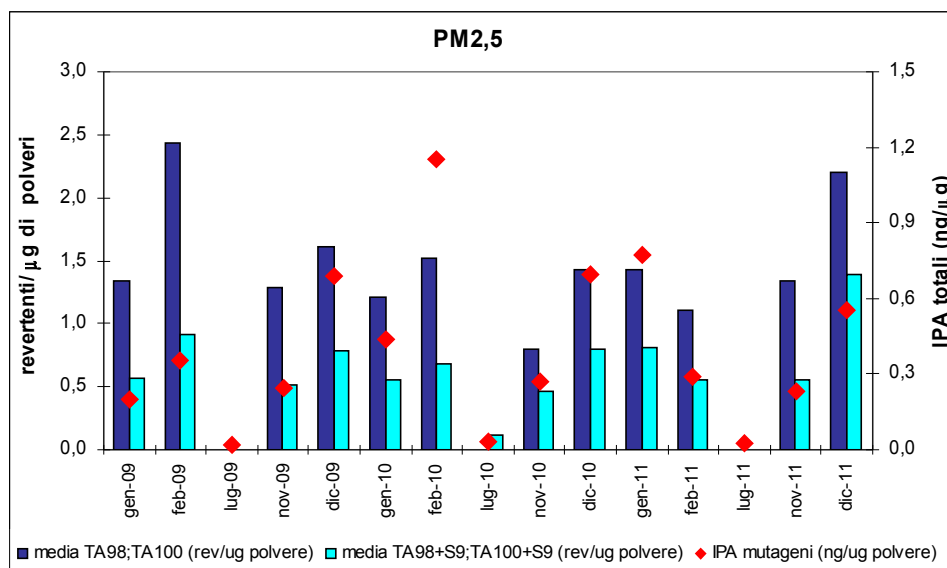


Figura 2 - Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, PM_{2,5}, espressa come media dei revertenti/m³ indotti da estratti di campioni mensili, e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, nei periodi indicati.



In Figura 3, si confrontano le concentrazioni mensili degli IPA totali, dotati di attività biologica (Σ fluorantene, pirene, benzo (a) antracene, ciclopenta (c,d) pirene, crisene, benzo (b) fluorantene, benzo (k) fluorantene, benzo (e) pirene, benzo (a) pirene, indeno (1,2,3-cd) pirene, dibenzo (a,h+a,c) antracene, benzo (g,h,i) perilene; dibenzo (a,l) pirene, dibenzo (a,e) fluorantene, dibenzo (a,e) pirene, dibenzo (a,i) pirene, dibenzo (a,h) pirene), 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. Si conferma che le concentrazioni di IPA possono in parte giustificare la maggiore attività mutagena del PM dei mesi più freddi, seguendone l'andamento stagionale, 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. Inoltre, emerge che un forte contributo alla mutagenicità del PM è dato anche da parte di 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.



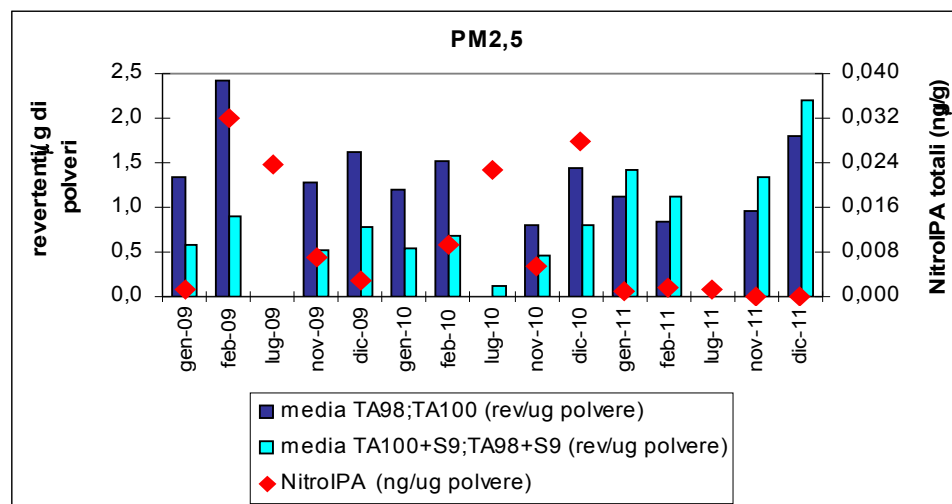
In Figura 4 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni mensili dei Nitro-IPA totali con l'attività mutagena del particolato, riportata sia come media dei revertenti indotti in

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 riscontrato anche per gli IPA, il contributo di altre sostanze alla mutagenicità del PM. Per quanto riguarda la concentrazione dei NitroIPA, non si osserva la stessa stagionalità evidenziata per gli IPA e questo si spiega con il 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 (Σ 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-nitrocisene, 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 3 campioni analizzati nel 2011: per ogni dose saggiata sono riportati sia i valori della percentuale dell'intensità di fluorescenza della 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, vedi *Valutazione e rappresentazione dei dati*).

I campioni di gennaio e di novembre 2011 hanno mostrato effetto genotossico sui leucociti, mentre il campione di luglio è risultato negativo. Non si osserva in nessun campione la presenza di effetto tossico né sulle cellule subito dopo il trattamento con il campione, né durante la lettura (hedgehogs).

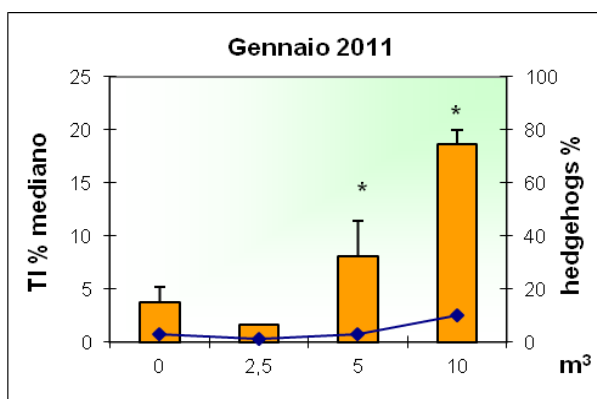
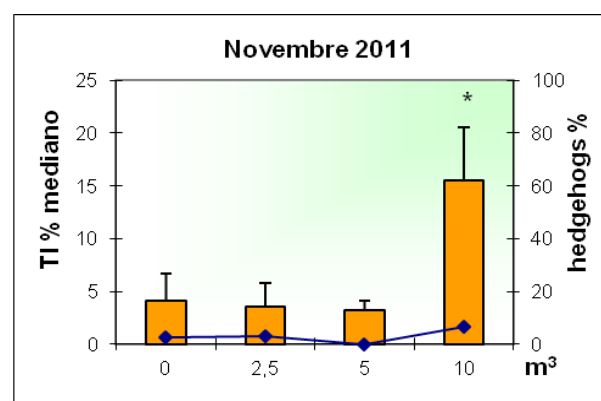
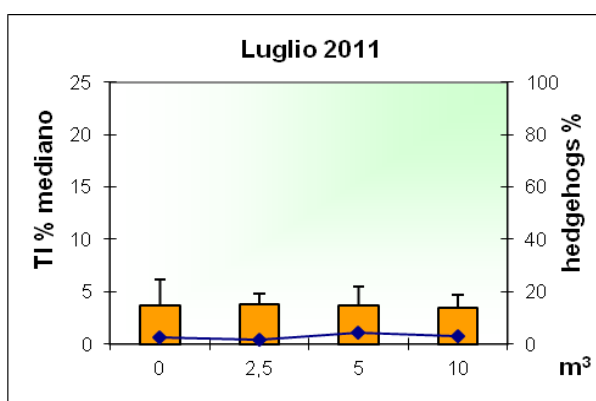


Figura 5 – Grafici dose-risposta dei campioni analizzati nel 2011. Vengono riportati, per ogni dose, i valori percentuali del danno al DNA nella coda della cometa - espresso come percentuale di TI - e della tossicità indotta dal campione - espressa come hedgehogs %- (vedi testo).



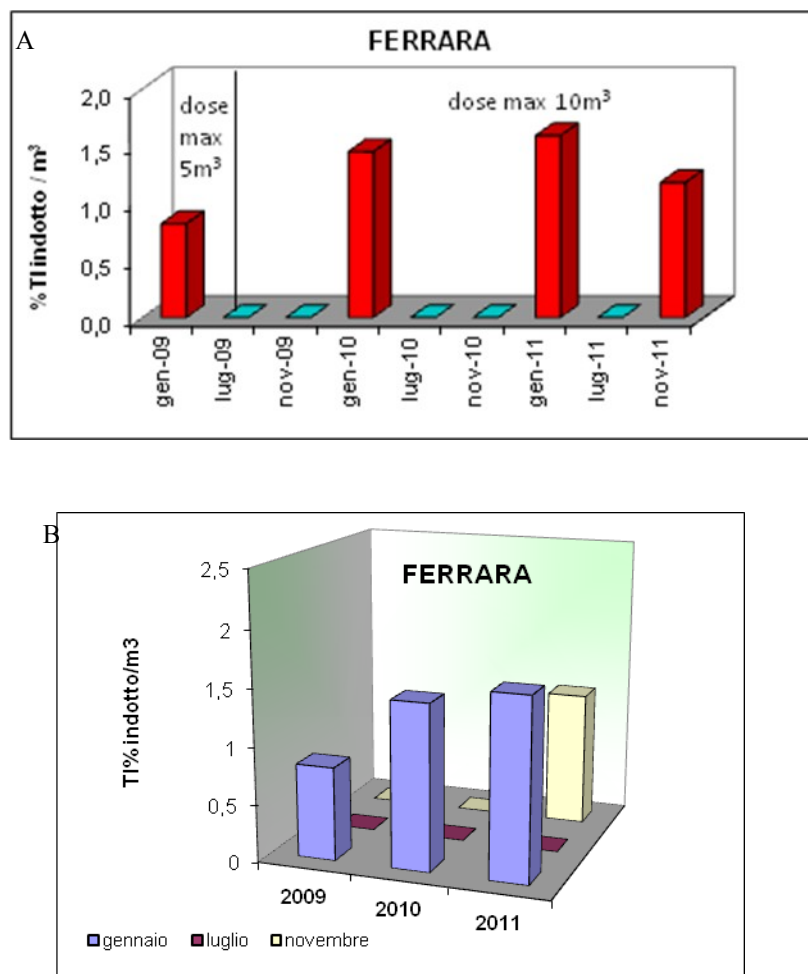
* positività ottenuta con test della mediana ($p < 0,001$)

I risultati ottenuti sui campioni nel periodo 2009 - 2011 sono stati riassunti in un unico grafico (Fig.6A) in cui sono stati riportati i valori dei coefficienti angolari ottenuti dalle curve dose effetto dei campioni positivi e/o con R^2 maggiore o uguale a 0,6. Nell'intero periodo i dati mostrano un

andamento stagionale della genotossicità del PM che compare solo nei periodi invernali, fatta eccezione per novembre 2011.

Considerando l'andamento dei singoli mesi, in gennaio e in parte in novembre (da confermare) si osserva una tendenza all'aumento nel tempo della genotossicità del PM rilevata con questo test (Fig.6B).

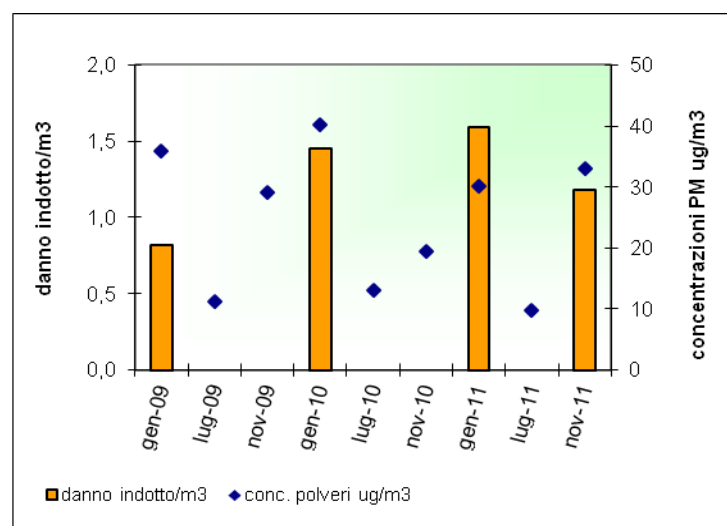
Figura 6 – Andamento del danno indotto per metro cubo d'aria equivalente (espresso come percentuale di TI, vedi testo) ottenuto dai coefficienti angolari delle curve dose effetto dei campioni positivi e/o con R² maggiore o uguale a 0.6. A: andamento in ordine cronologico (le barre rosse indicano i campioni positivi). B: andamento per singolo mese.



Si è valutata l'eventuale correlazione dei dati di genotossicità finora ottenuti con la concentrazione delle polveri, con quella di IPA e di Nitro IPA rilevati negli stessi estratti sottoposti al test della Cometa.

In Figura 7 si può notare che gli andamenti della concentrazione di particolato e del danno indotto per m³ di aria risultano comparabili ed esiste una discreta correlazione tra i due parametri ($R^2 = 0,62$), ma non sempre a una maggiore concentrazione di PM corrisponde una maggiore induzione di danno, sottolineando la rilevanza della tipologia delle sostanze legate al PM.

Figura 7 - Andamenti comparati della genotossicità del particolato atmosferico urbano PM_{2,5} (%TI/m³ indotto da estratti di campioni mensili) e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, nei periodi indicati.



In Figura 8 si confrontano le concentrazioni mensili degli IPA totali, dotati di attività biologica (vedi pag.11) con l'attività genotossica del particolato, riportata come induzione del danno al DNA per m³: si evidenzia una discreta corrispondenza negli andamenti dei due parametri ($R^2 = 0,76$).

Il confronto della genotossicità del PM con l'andamento della concentrazione mensile di NitroIPA (ng/m³) non mostra corrispondenza (Fig.9).

Figura 8 - Andamenti comparati dei livelli di IPA dotati di attività biologica (concentrazione mensile ng/m³_vedi testo) e attività genotossica (%TI/m³ indotto da estratti di campioni mensili) su leucociti umani.

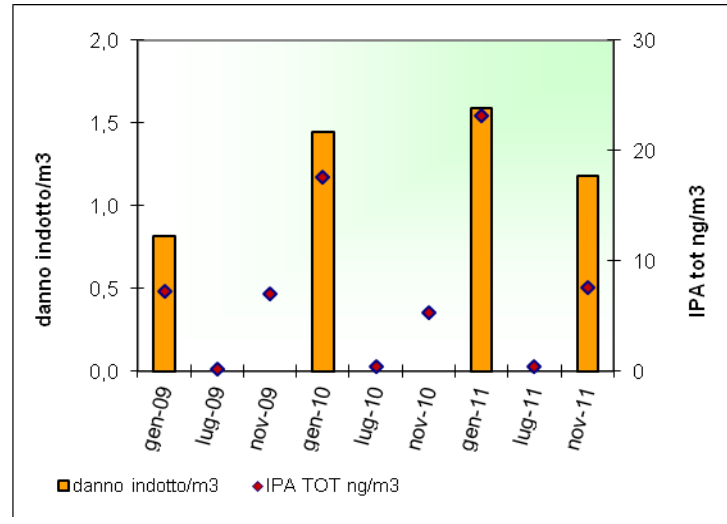
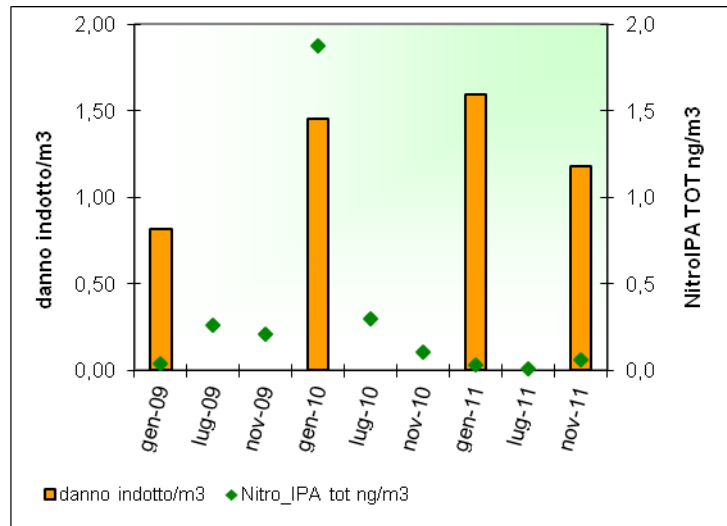


Figura 9 - Andamenti comparati dei livelli di NitroIPA (concentrazione mensile ng/m³_vedi testo) e attività genotossica (%TI/m³ indotto da estratti di campioni mensili) su leucociti umani.



Infine considerando l'andamento della risposta nei due test che hanno due end-point genetici diversi, su organismi molto differenti, si nota una buona corrispondenza, mostrando un coefficiente di correlazione di Pearson (r) pari a 0.82. Questo mostra, comunque, come la matrice

considerata necessari di studi approfonditi che utilizzino diversi sistemi cellulari in grado di dare il maggior numero di informazioni sui possibili danni al DNA.

CONCLUSIONI

Si ricorda che il campionamento del PM_{2,5} nel nuovo sito è stato avviato nel 2009 e 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. Questa stagionalità si riscontra anche nella genotossicità evidenziata con il test della Cometa su leucociti umani, senza, tuttavia, una corrispondenza completa tra la positività al test su Salmonella e la positività al test della Cometa. Infatti mentre con il primo test tutti i campioni prelevati nei mesi di novembre e gennaio sono risultati positivi, con il test della Cometa solo i campioni di gennaio dei diversi anni e di novembre 2011 sono risultati positivi. Questo evidenzia la complementarità dei due test. Occorre tenere in considerazione che il periodo di campionamento è comunque, ancora troppo breve e sono necessari ulteriori risultati 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 ed è evidente la discrepanza tra le concentrazioni più alte di IPA e i valori più alti di revertenti indotti. Inoltre, si conferma 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 che si rileva nel periodo considerato. Il danno genotossico rilevato con il test della Cometa, invece, sembra mostrare una discreta corrispondenza con la concentrazione di IPA.

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.

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**