



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

Alla c.a.
Ing. Mauro Pergetti
Dott.ssa Anna Salsi
IREN AMBIENTE SpA

INVIATOTRAMITE PEC

Oggetto: Esito del monitoraggio della mutagenicità delle matrici ambientali (suolo e particolato atmosferico – PM_{2,5}), prelevate nell'area circostante l'impianto di incenerimento di rifiuti di Parma, eseguito mediante test di reversione genica sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* e test della Cometa (Comet Assay) su leucociti umani.

Presso il Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità ambientale (Dip. SCVSA) dell'Università di Parma, sono stati effettuati il test di mutagenesi su *Salmonella typhimurium*, con i ceppi TA98 e TA100, e il test della Cometa (Comet assay) su leucociti umani su 6 campioni di particolato atmosferico – PM_{2,5} - e 6 campioni di terreno.

I siti di campionamento del PM e dei suoli non sono variati rispetto alla campagna precedente (2017) e sono indicati nella cartina allegata (Allegato 1). I campioni di particolato atmosferico sono stati prelevati dai tecnici dello Studio Alfa di Reggio Emilia, secondo modalità concordate con il Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dip. SCVSA dell'Università di Parma ed in accordo con le modalità utilizzate negli anni precedenti dal Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale di Arpa. Ogni campione di PM è costituito da 3 membrane (Tab.1) su cui è stato raccolto il particolato atmosferico, corrispondenti ai periodi di campionamento indicati nell'Allegato 2. I campioni di PM_{2,5} sono pervenuti al Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dip. SCVSA dell'Università di Parma al termine del periodo di campionamento.



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

I campioni di suolo sono stati prelevati, nelle aree in cui è stato campionato il PM_{2.5}, dai tecnici dello Studio Alfa di Reggio Emilia, il 13 marzo 2019, in presenza dei tecnici del Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dip. SCVSA dell'Università di Parma e con modalità concordate con il Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale di Arpa.

I siti di campionamento per i test di mutagenesi sono indicati dalle sigle: MUT1, MUT2, MUT3, MUT4, MUT5, MUT6 corrispondenti ai campioni di particolato atmosferico CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 e CA5_BIS (ex CA_B1) e ai terreni TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM5_BIS (ex TM_B1).

Si ricorda che:

- ✓ I siti MUT1, MUT2, MUT3 sono localizzati lungo un gradiente di ricaduta delle emissioni dell'impianto (MUT1 è il più distante e MUT3 è il più vicino all'impianto), e tutti egualmente distanti dall'autostrada;
- ✓ Il sito contraddistinto dalla sigla MUT4 è in una zona interessata da "confondenti" presenti nell'area oggetto dell'indagine, ma non derivanti dall'impianto;
- ✓ I siti MUT5 e MUT6 sono al di fuori dell'area di ricaduta dell'impianto, in zone non interessate da attività industriali, e considerati "bianchi" di riferimento.

I campioni di terreno sono stati prelevati in zone non coltivate, con minima crescita di vegetazione, quella eventualmente presente è stata eliminata manualmente e sono state evitate le zone protette da alberi. E' da segnalare che in questo campionamento è stata rilevata un'attività vegetativa anomala per il periodo in cui il campionamento è avvenuto. Concomitantemente è stata individuata la presenza di sostanze per il trattamento dei campi che nel campionamento precedente non era stata osservata.

Ogni campione di terreno è composto da sub-campioni prelevati in un'area di circa cinque – dieci metri quadrati intorno alle coordinate X e Y determinate con GPS (Tab.1). I campionamenti sono



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

stati effettuati raccogliendo il terreno in zone di circa 10 x 10 cm ad una profondità media di 3 cm fino ad una massimo di 5 cm.

Nella presente relazione si riportano i risultati della campagna di monitoraggio 2019.

Tabella 1 – Siti di campionamento e corrispondenti campioni di suolo e di particolato atmosferico

Sigla del sito	Sigla campioni suolo	Sigla campioni PM	Codici membrana PM _{2,5} (Studio Alfa)	Ubicazione del punto di indagine	Coordinate UTM
MUT1	TM1	CA1	M1267 M1238 M460	Strada Viazza di Beneceto	X: 610186; Y: 4964547
MUT2	TM2	CA2	M1273 M1250 M1251	Pedrignano – Strada Traversante	X: 608930; Y: 4965379
MUT3	TM3	CA3	M1271 M1239 M459	Paradigna- Via Burla	X: 607803; Y: 4965685
MUT4	TM4	CA4	M1243 M1278 M1279	Strada Veronica – incrocio canale Naviglio	X: 607409; Y: 4967436
MUT5	TM5	CA5	M1237 M1249 M1274	Strada Borghetto	X: 605575; Y: 4968903
MUT6	TM5_BIS	CA5_BIS	M1240 M1242 M1236	Vicomero – Chiesa San Rocco	X: 604870; Y: 4970772



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Trattamento dei campioni

Campioni di terreno

I suoli sono stati trattati secondo quanto previsto dalla linea guida dell'APAT: "Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati APAT, RTI_SSC 2/2002". I campioni di terreno sono stati sminuzzati e ripuliti da sassi, residui vegetali, insetti, ecc. e sono stati posti ad asciugare al buio in armadio termostato a +30°C come temperatura massima. Una volta asciutti, sono stati setacciati, con setaccio a maglie di 2 mm, e quindi sottoposti ad estrazione chimica nel Laboratorio di Chimica Bio-inorganica del Dip. SCVSA tramite apparato Soxhlet, con una miscela 1/1 di Acetone/Esano. Contemporaneamente all'estrazione di ogni campione di terreno è stata effettuata la determinazione del peso secco, dopo sosta di una aliquota in stufa a +105°C per 24 ore (Allegato 3). Prima dell'esecuzione dei test di mutagenesi, il residuo secco è stato risospeso in Dimetilsolfossido (DMSO RPE) in modo da ottenere una concentrazione di 10 grammi di terreno per ml di solvente per entrambi i test.

Campioni di particolato atmosferico

I campioni di particolato atmosferico, costituiti da 3 filtri per ciascun sito, prelevati in periodi differenti da Studio ALFA (Tab.2), sono stati sottoposti ad estrazione chimica nel Laboratorio di Chimica Bio-inorganica del Dip. SCVSA, tramite apparato Soxhlet, in acetone (Allegato 3). Prima dell'esecuzione dei test di mutagenesi il residuo secco è stato risospeso in DMSO in modo da ottenere un rapporto tra il volume dell'aria campionata e il volume del solvente di 50 m³/ml per il test su Salmonella e di 1000 m³/ml per il test della Cometa su leucociti. La determinazione del peso delle polveri è stata effettuata dal laboratorio di analisi che ha effettuato il campionamento (Studio Alfa).



Tabella 2 – Periodi di campionamento del particolato atmosferico PM_{2,5}

Sito campionamento	Periodo campionamento
CA1	dal 08/04 al 18/04/2019
CA2	dal 11/03 al 21/03/2019
CA3	dal 08/04 al 18/04/2019
CA4	dal 25/03 al 04/04/2019
CA5	dal 11/03 al 21/03/2019
CA5_BIS	dal 25/03 al 04/04/2019

Test su Salmonella

Gli estratti dei campioni sono stati sottoposti a test di mutagenesi con i 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 su *Salmonella typhimurium* (test di Ames) si utilizzano ceppi di batteri recanti differenti mutazioni nel gene codificante per la sintesi 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 di due ceppi di *Salmonella typhimurium* permette di evidenziare danni genetici, a livello di una o poche coppie di basi nel DNA (mutazioni puntiformi) di due diversi tipi, 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



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

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 di ratto "S9" ottenuta da ratti nei quali è stata stimolata l'attività degli enzimi epatici (ratti indotti con Aroclor1254).

Per ogni campione sono state saggiate tre concentrazioni:

- PM_{2,5}: 2, 4 e 8 m³ di aria equivalenti;
- Suoli: 0.4, 0.8 e 1.6 grammi di suolo (in peso secco) equivalenti.

Per ogni concentrazione sono state eseguite tre repliche indipendenti. Per ogni test (TA98 con, TA98 senza, TA100 con, TA100 senza attivazione metabolica) le colonie di revertenti sono state contate 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 pre-mutageno nelle singole cellule non ancora riparato, né fissato.

Il test viene eseguito in accordo con il metodo di Singh *et al.* (Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 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 estratto 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 e di coda, la cui lunghezza e intensità luminosa sono proporzionali alla quantità di DNA migrato nella corsa elettroforetica e quindi al danno subito dalle cellule.



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Per ogni campione sono state saggiate tre concentrazioni:

- PM_{2,5}: 2.5, 5 e 10 m³ di aria equivalenti;
- Suoli: 0.15, 0.3 e 0.6 grammi di suolo (in peso secco) equivalenti.

Per ogni concentrazione sono state eseguite due repliche indipendenti.

Valutazione e rappresentazione dei dati

Test su Salmonella

Per stabilire la positività (mutagenicità) dei campioni si applica il criterio del raddoppio (two-fold rule), 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, Tarore RE, Linhart MS, Dunkel VC. Evaluating statistical analysis and reproducibility of mutagenicity assay. Mutat Res 1981; 85: 119-132).

Per l'analisi quantitativa sono stati considerati sia i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) che quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.70$. Mediante le rette di regressione sono stati ricavati i valori dei revertenti/m³ di aria aspirata equivalenti (da cui si ricava il valore dei revertenti/ μg di particolato) e dei revertenti/g di terreno, rappresentati dai coefficienti angolari delle rispettive rette di regressione lineare. Al fine di eliminare l'interferenza dovuta all'eventuale presenza di effetto tossico o di altri effetti inibenti, è stato considerato solo il tratto lineare della curva dose/risposta.

Per le analisi di comparazione tra trattamenti, condizioni e campagne di campionamento si è proceduto mediante analisi parametrica con il test *t* di Student o con analisi non parametrica per campioni correlati che confronta automaticamente i dati osservati con i dati ipotizzati utilizzando il test di McNemar, il test Q di Cochran, il test dei ranghi con segno di coppie corrispondenti di Wilcoxon o ANOVA a 2 vie di Friedman per ranghi. Il test scelto varia in base ai dati.



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

Test della Cometa

Il danno al DNA viene misurato al microscopio sia mediante percezione visiva (visual score) al microscopio dei diversi gradi di danno alle cellule, suddividendole in classi a cui viene associato uno specifico valore detto SCORE (con valori da 0 a 400, indicando con 400 la classe più danneggiata), sia mediante sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Comet assay IV, Perceptive Instruments, UK). Fra i parametri utilizzati dal programma per descrivere le comete è stata scelta la percentuale di intensità di fluorescenza nella coda della cometa (Tail Intensity - TI%), parametro raccomandato in letteratura, che definisce l'effetto genotossico del campione misurando la quantità di DNA migrato rispetto al totale. Per ogni dose vengono misurate duecento cellule scelte a caso (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 Hoescht/Bromuro di Etidio: una dose viene definita "tossica" quando la mortalità cellulare supera il 30%.

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 non è possibile rilevare né la coda e né la testa della cometa.

I dati sono stati analizzati usando il pacchetto statistico IBM SPSS Statistics Ver.25: la positività di un campione viene definita mediante test ANOVA, *post hoc* di Bonferroni.

Per le analisi di comparazione tra campagne di campionamento si è proceduto mediante analisi parametrica con il test *t* di Student o con analisi non parametrica, analisi per campioni correlati che confronta automaticamente i dati osservati con i dati ipotizzati utilizzando il test di McNemar, il test Q di Cochran, il test dei ranghi con segno di coppie corrispondenti di Wilcoxon o ANOVA a 2 vie di Friedman per ranghi. Il test scelto varia in base ai dati.



Risultati

Campioni di particolato atmosferico (PM_{2.5})

Test su Salmonella

La maggior parte dei campioni di particolato atmosferico (PM) sono risultati positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) nel test con il ceppo TA98 di *Salmonella typhimurium* solo in assenza di attivazione metabolica esogena (-S9), unica eccezione il campione CA5_BIS che non ha presentato alcuna attività mutagenica. Tutti i campioni sono risultati negativi con il ceppo TA98 in presenza di attività metabolica (+S9). Il ceppo TA100 non ha rilevato alcuna attività mutagenica sia in assenza che in presenza di S9. Questi dati confermano i risultati ottenuti nelle campagne precedenti in cui si evidenziava una prevalenza di sostanze che inducono mutazioni nel DNA per inserzione e/o delezione di coppie di basi, rilevabili con il ceppo TA98 di Salmonella. In questa campagna si osserva solo la presenza di sostanze in grado di interagire direttamente con il DNA e che possono essere detossificate dagli enzimi metabolici (Fig.1 e Tab.3).

Tabella 3 - Revertenti indotti per m³ di aria nei ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*, in assenza e in presenza (+S9) di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0,70$.

Campione	Numero di revertenti indotti /m ³ di aria				Numero di revertenti indotti / μ g di PM _{2.5}			
	TA98	TA98 +S9	TA100	TA100 +S9	TA98	TA98 +S9	TA100	TA100 +S9
CA1	2	0	0	0	0.129	0.000	0.000	0.000
CA2	3	0	0	0	0.128	0.000	0.000	0.000
CA3	3	0	0	0	0.125	0.000	0.000	0.000
CA4	3	0	0	0	0.078	0.000	0.000	0.000
CA5	2	0	0	0	0.098	0.000	0.000	0.000
CA5BIS	0	0	0	0	0.000	0.000	0.000	0.000



L'analisi del numero di revertenti indotti per m³ di aria, che ci fornisce un'informazione sul potenziale genotossico del quantitativo di aria respirata, rivela l'induzione di un numero di revertenti comparabile in tutti i siti campionati, tranne che per il campione CA5_BIS in cui non si rileva mutagenicità (Fig. 1). Il numero di revertenti indotti per µg di PM_{2,5}, che definisce la potenza mutagena del particolato, risulta comparabile (Fig. 1).

La valutazione statistica condotta mediante test Anova (posthoc Bonferroni) non evidenzia differenze significative tra tutti i siti campionati.

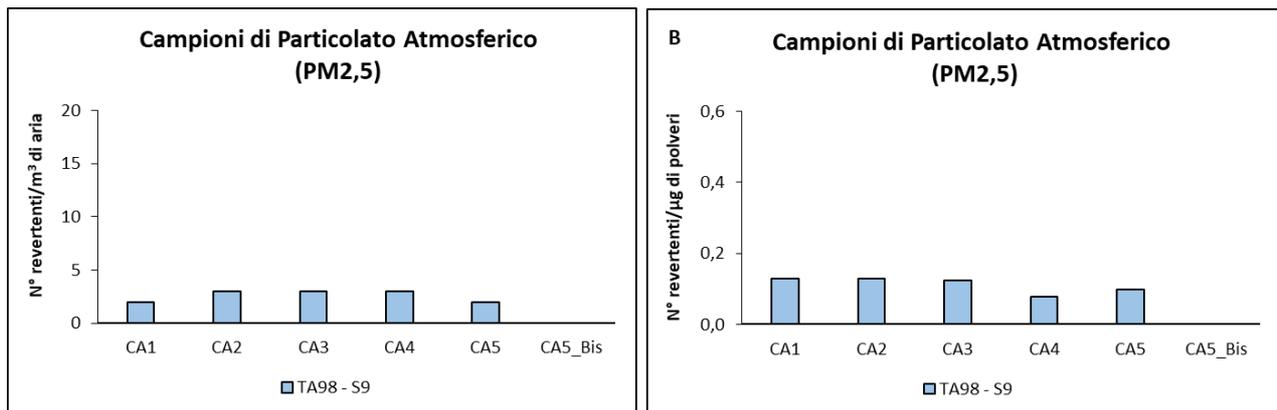


Figura 1 - Revertenti indotti per m³ di aria (A) e per µg di polveri (B) nel ceppo TA98 di *Salmonella typhimurium*, in assenza (-S9) di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con R² ≥ 0,70.



Comparando i dati con la precedente campagna di monitoraggio (2017), emerge che nell'anno 2019 la concentrazione di particolato atmosferico risulta in generale sensibilmente più bassa in tutti i punti di campionamento, tranne che per il sito CA5 in cui risulta comparabile con il valore rilevato nel 2017 (Fig. 2).

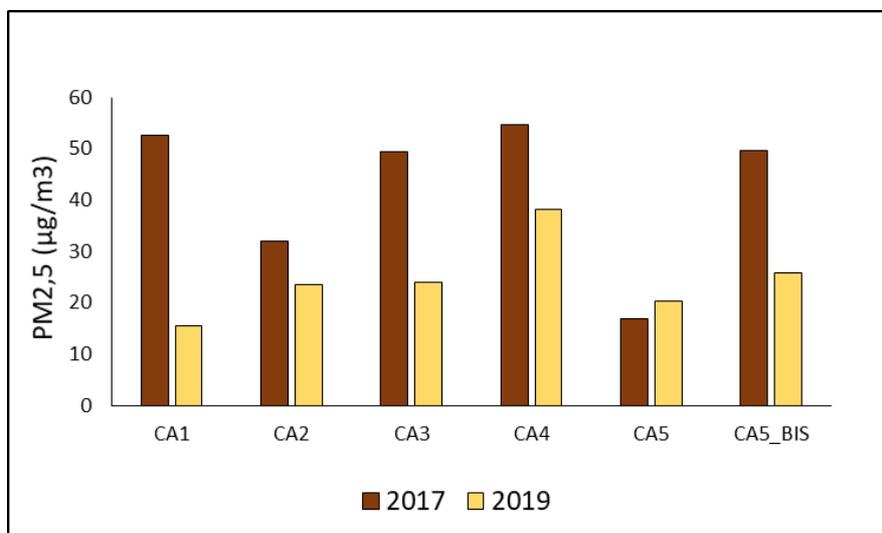


Figura.2 - Concentrazione di particolato atmosferico PM_{2,5} (µg/m³) nei vari siti di prelievo nelle campagne di monitoraggio 2017 e 2019.

Per quanto riguarda la mutagenicità del particolato nelle due campagne analizzate, si osserva una generale diminuzione del carico mutageno del particolato PM_{2,5}, sia prendendo in considerazione il dato espresso per m³ di aria sia quello per µg di polveri (Fig. 3). L'analisi comparativa svolta mediante test non parametrico per campioni correlati (test dei ranghi di Wilcoxon) evidenzia differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) per i test condotti con il ceppo TA98 con e senza attivazione metabolica, sia analizzando i valori espressi per m³ di aria sia quelli per µg di polveri.

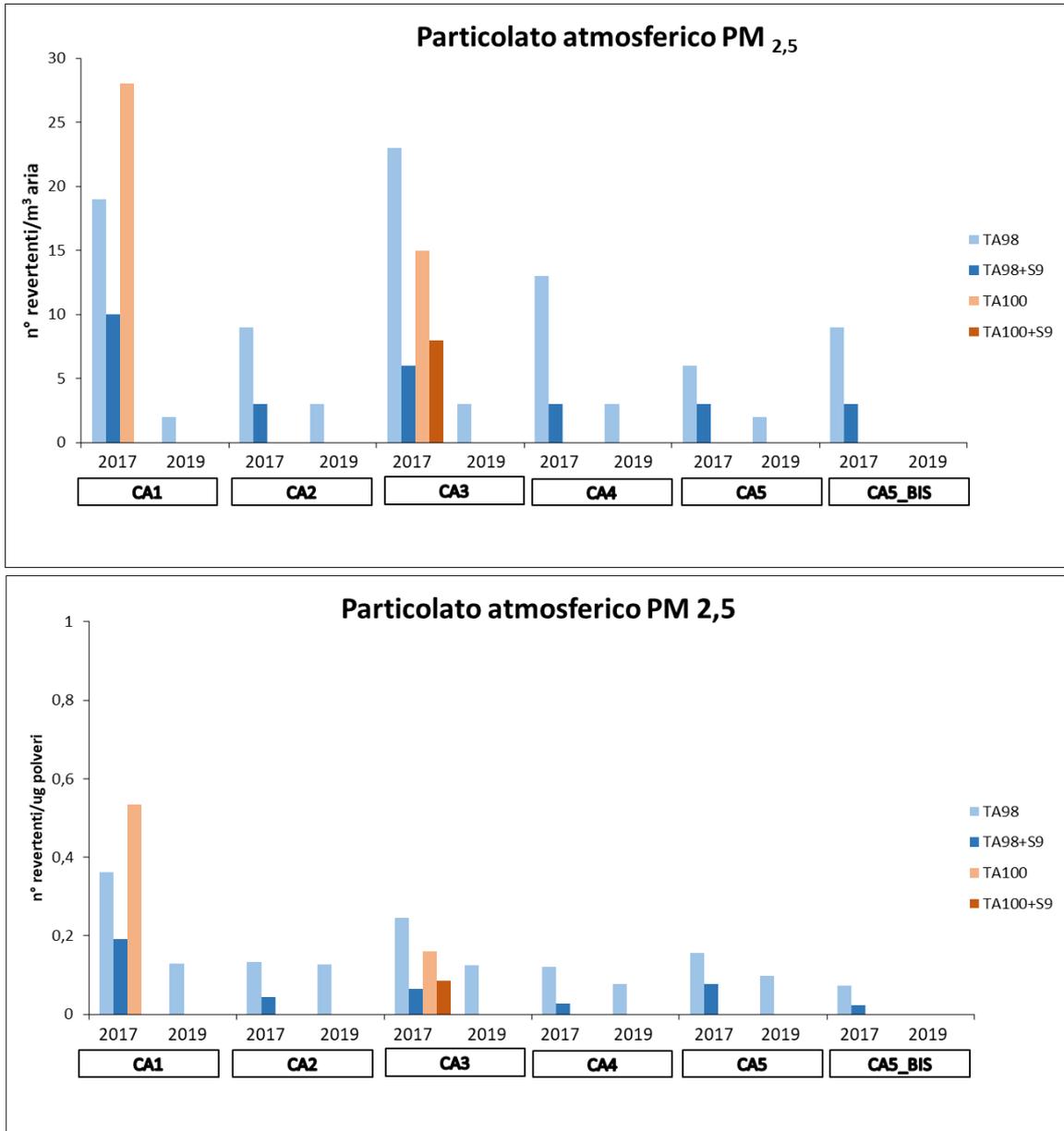


Figura 3 - Confronto relativo alla mutagenicità, espressa sia come numero di revertenti/m³ di aria (A) sia come numero di revertenti/μg di particolato PM_{2,5}, rilevata nelle campagne di monitoraggio 2017 e 2019. Vengono riportati i dati ottenuti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* senza e con (+S9) attivazione metabolica esogena.



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

Test della Cometa

In Figura 4 vengono riportati gli incrementi di danno al DNA, rilevato tramite l'analisi della percentuale di fluorescenza nella coda (TI%) della cometa, calcolato sia con sistema computerizzato di analisi dell'immagine (A,B) che con l'analisi visiva dell'operatore al microscopio – SCORE – (C,D) e l'incremento della percentuale di cellule “hedgehogs” (E).

Sebbene nessun campione abbia evidenziato effetti diretti sulla vitalità cellulare dopo il trattamento, è stata osservata induzione di effetti tossici durante la lettura del Comet assay, rilevabili dall'aumento di cellule “hedgehogs”, cellule con DNA completamente frammentato, per tutti i campioni ed in particolare per i campioni CA5 e CA5_BIS (Fig. 4E).

L'incremento di danni al DNA, rilevato sia misurando il danno mediante sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Fig.4 A,B) che mediante SCORE (Fig.4 C,D), indotto da tutti i campioni di PM_{2,5} prelevati sia in zona di ricaduta sia in zona di controllo non forniscono alcun riscontro statisticamente significativo nel test ANOVA con analisi *post hoc* di Bonferroni.

L'analisi comparata tra le campagne di monitoraggio 2017 e 2019 evidenzia una differenza statisticamente significativa solo quando viene analizzato l'incremento della percentuale di fluorescenza nella coda (test *t* di Student, $p < 0.05$; test dei ranghi con segno di Wilcoxon $p = 0.059$). I campioni di PM_{2,5} prelevati nella campagna 2019 risultano meno genotossici di quelli prelevati nella campagna 2017. E' comunque da rilevare che in ambedue le campagne gli incrementi di danno al DNA per metro cubo siano generalmente di piccolissima entità, al limite della significatività biologica (Fig. 5).

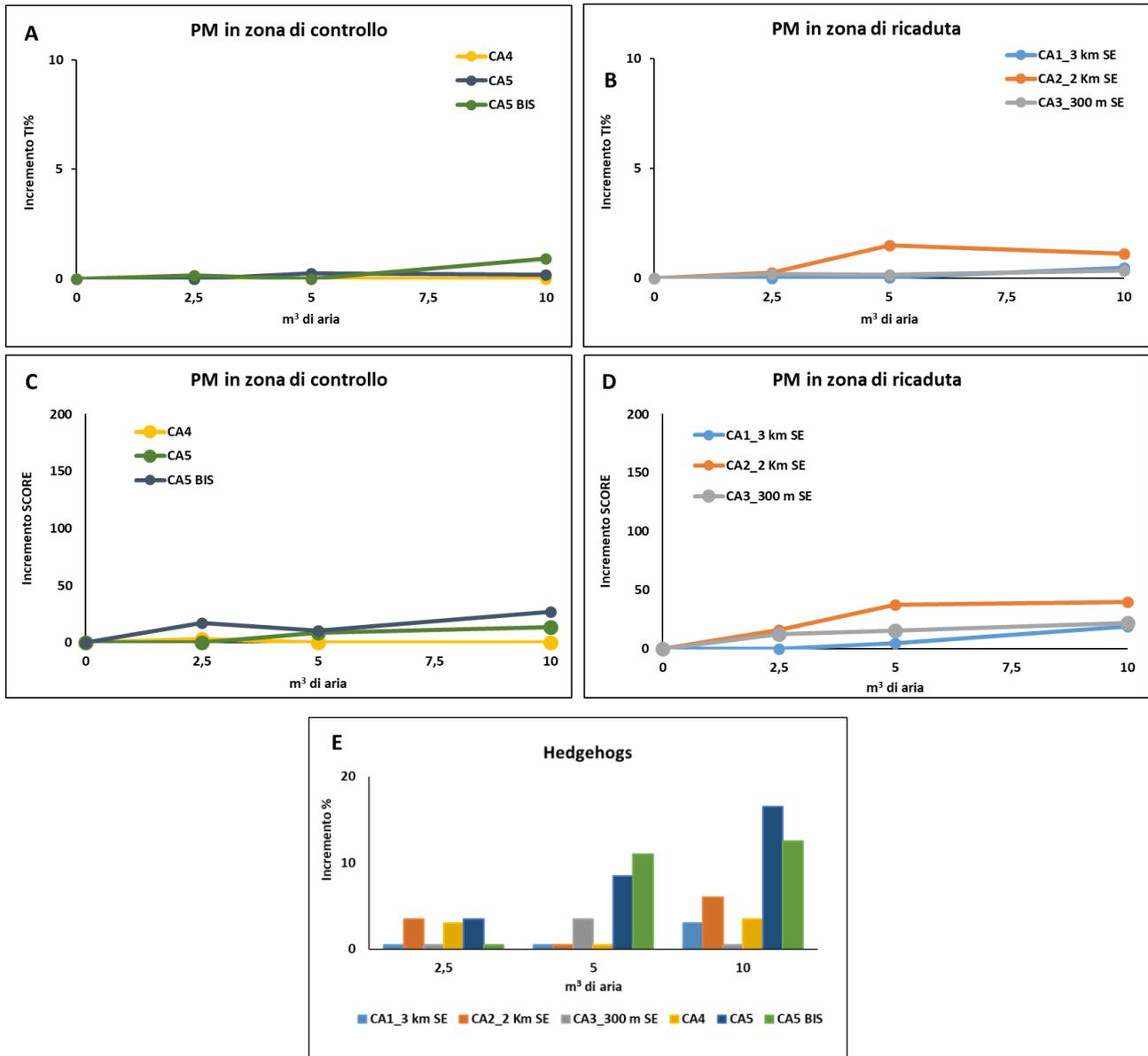


Figura 4 – Incremento di danno al DNA rilevato tramite la percentuale di fluorescenza nella coda (TI%) calcolata con sistema computerizzato di analisi dell’immagine (A,B) e analisi visuale dell’immagine – SCORE – (C,D) e incremento della percentuale di cellule “hedgehogs” (porcospino) (E), in leucociti umani trattati con estratti di particolato atmosferico prelevato nei siti indicati.



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

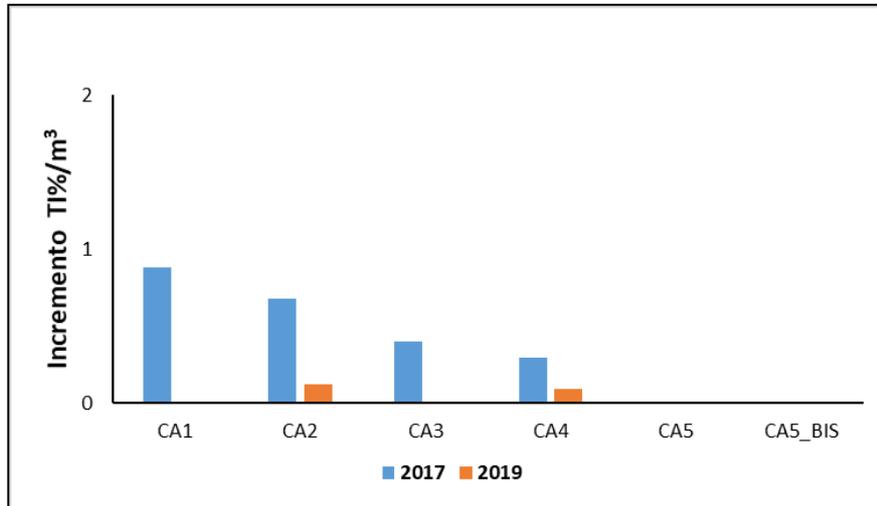


Figura 5 – Confronto relativo alla genotossicità, espressa come incremento della percentuale di fluorescenza nella coda (TI%) per metro cubo di aria aspirata, rilevata nelle campagne di monitoraggio 2017 e 2019.



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Campioni di terreno

Test su Salmonella

Tutti i campioni di suolo analizzati sono risultati positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) con il ceppo TA98 e con il ceppo TA100, con e senza attivazione metabolica. Dal confronto dei sei campioni (Tab.4, Fig.6), il campione TM5_BIS presenta l'attività mutagenica più elevata in tutte le condizioni saggiate e risulta l'unico campione significativamente diverso dagli altri. I campioni TM3 e TM5 risultano significativamente diversi dal campione TM5_BIS (TM3 $p < 0.05$ e TM5 $p = 0.057$; ANOVA, *post-hoc* Bonferroni). I campioni TM2 e TM4 risultano presentare un minor carico mutageno: questi campioni risultano significativamente diversi dal campione TM5_BIS con $p < 0.01$ (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni). Il campione TM1 che mostra la minor mutagenicità risulta significativamente differente dal campione TM5_BIS con $p < 0.001$ (ANOVA, *post-hoc* Bonferroni). L'analisi statistica rivela una significativa differenza tra i test condotti senza o con attivazione metabolica (Test *t* di Student, $p = 0.052$; test dei ranghi con segno di Wilcoxon $p < 0.05$). Anche in questo campionamento, si evidenzia un incremento di revertenti maggiore nei test condotti senza attivazione metabolica.



Tabella 4 - Revertenti indotti per grammo di terreno (in peso secco), nei ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*, in assenza e in presenza (+S9) di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0,70$.

Campione	Numero di revertenti indotti /g di terreno			
	TA98	TA98 + S9	TA100	TA100 + S9
TM1	151	156	149	114
TM2	251	167	200	159
TM3	163	173	318	251
TM4	139	122	232	206
TM5	312	110	266	370
TM5_BIS	468	241	685	568

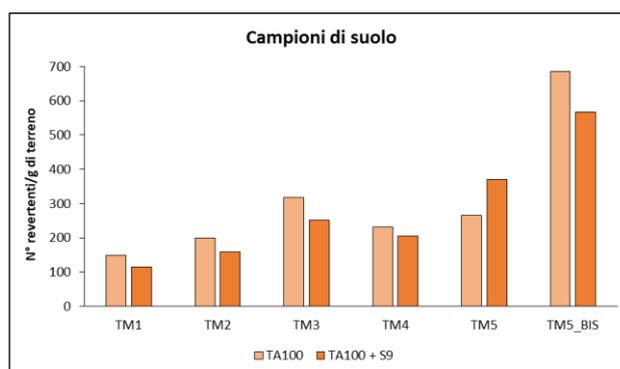
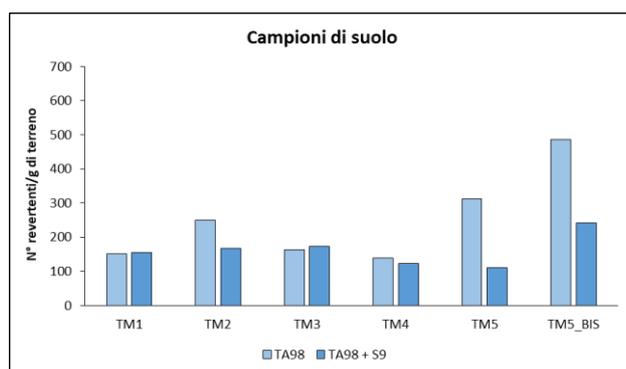


Figura 6 - Revertenti indotti per grammo di terreno (in peso secco), nei ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*, in assenza e in presenza (+S9) di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0,70$

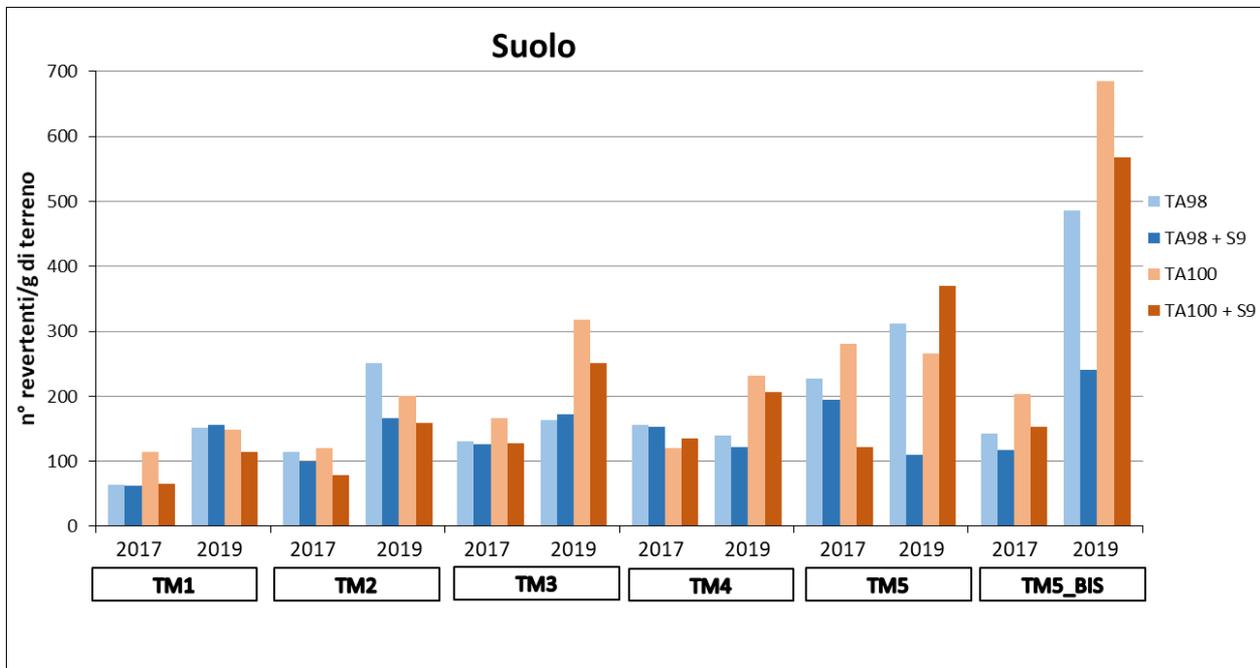


Figura 7 - Confronto relativo alla mutagenicità, espressa come numero di revertenti/g di terreno, rilevata nelle campagne di monitoraggio 2017 e 2019. Vengono riportati i dati ottenuti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* senza e con (+S9) attivazione metabolica esogena.

La valutazione comparativa della mutagenicità dei suoli prelevati nelle campagne di monitoraggio 2017 e 2019 (Fig. 7), evidenzia per tutti i siti campionati un blando aumento di mutagenicità nel campionamento condotto nel 2019, tranne per il campione TM5_BIS in cui si rileva un importante incremento in tutti i test condotti. L'analisi comparativa svolta mediante test non parametrico per campioni correlati (test dei ranghi di Wilcoxon) evidenzia differenze statisticamente significative tra le due campagne di campionamento quando vengono presi in considerazione tutti i test condotti, con entrambi i ceppi con e senza attivazione metabolica ($p < 0.05$).

In particolare, rispetto al 2017, nel 2019 si evince un generale aumento di sostanze in grado di produrre mutazioni per sostituzione di base, rilevabili con il ceppo TA100 ($p < 0.01$, test dei ranghi di Wilcoxon). Tale incremento è maggiormente rilevabile nei campioni TM3, in zona di ricaduta, e



nei campioni TM5 5 TM5_BIS entrambi in zona di controllo. Anche la presenza di molecole in grado di indurre scivolamento del codice (frameshift) risulta significativamente aumentata in tutti i campioni ($p < 0.05$, test dei ranghi di Wilcoxon).

Test della Cometa

Il trattamento delle cellule umane con i campioni di suolo ha dato origine a incrementi di migrazione del DNA (Tab. 5, Fig. 8), che sono risultati statisticamente significativi (test ANOVA, *post hoc* di Bonferroni) per tutti i campioni analizzati. Le significatività registrate per i campioni prelevati in zona di ricaduta sono le seguenti: TM1: SCORE $p < 0.05$; TM2: TI% $p < 0.01$, SCORE, $p < 0.01$; TM3: TI% $p < 0.01$, SCORE $p < 0.05$. Per i campioni prelevati in zona di controllo le significatività sono le seguenti: TM4: TI% $p < 0.01$, SCORE $p < 0.01$; TM5: TI% $p < 0.05$, SCORE $p < 0.05$; TM5_BIS: TI% $p < 0.001$, SCORE $p < 0.01$. Tutti i campioni, tranne TM1, hanno indotto effetti citotossici rilevabili dall'aumento di cellule con DNA completamente frammentato, "hedgehogs" (Fig. 8E). I campioni in zona di controllo evidenziano la presenza di effetti citotossici già alla concentrazione più bassa saggiata, equivalente a 0.15 g di terreno.

Tabella 5 – Danno al DNA, espresso sia come percentuale d'intensità di fluorescenza (TI%) che come SCORE, indotto per grammo di terreno (in peso secco), in leucociti umani, calcolato per i campioni positivi e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0,70$.

Sito di campionamento	TI%/g	score/g
TM1	5	92
TM2	24	228
TM3	6	108
TM4	37	294
TM5	26	238
TM5_BIS	26	240

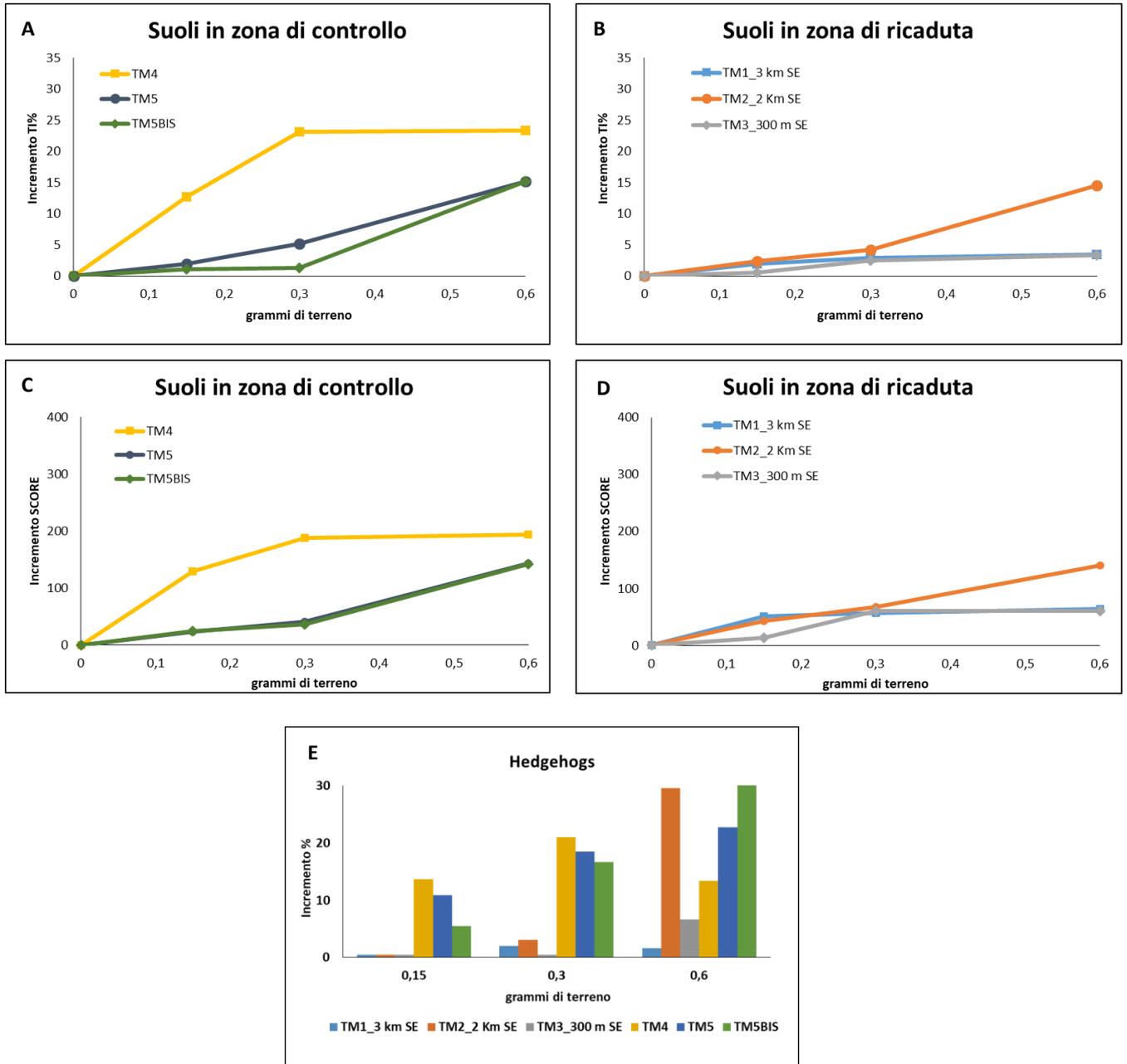


Figura 8 – Incremento di danno al DNA rilevato tramite la percentuale di fluorescenza nella coda della cometa (TI%) calcolata con sistema computerizzato di analisi dell’immagine (A,B) e analisi visiva dell’immagine – SCORE (C,D) e incremento della percentuale di cellule “hedgehogs” (porcospino) (E), in leucociti umani trattati con estratti di terreno prelevato nei siti indicati.



L'analisi statistica comparata delle 2 campagne di campionamento (2017 e 2019) mediante test *t* di Student e test dei ranghi di Wilcoxon per campioni correlati non ha restituito alcuna significatività.

Il campione TM4, in area di controllo ma soggetto a fonti potenzialmente confondenti, anche in questa campagna di prelievo mostra i livelli più alti di genotossicità ma leggermente più bassi della campagna di prelievi 2017 (Fig. 9). Nel 2019, si può rilevare un aumento di effetti genotossici nei campioni TM2 in zona di ricaduta, TM5 e TM5_BIS, ambedue in zone di controllo.

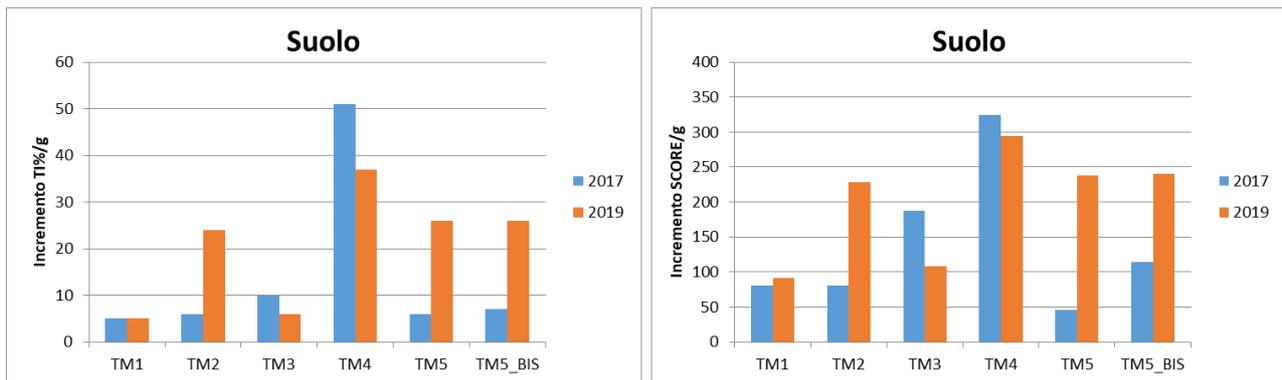


Figura 9 - Confronto relativo alla genotossicità, espressa come incremento di TI%/g di terreno (A) e incremento di SCORE/g di terreno, rilevata nelle campagne di monitoraggio 2017 e 2019.



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Conclusioni

L'analisi della mutagenicità/genotossicità delle matrici ambientali (suolo e particolato atmosferico – PM_{2,5}), prelevate nel 2019 nell'area circostante l'impianto di incenerimento di rifiuti di Parma, eseguita mediante test di reversione genica sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* e test della Cometa (Comet Assay) su leucociti umani, ha evidenziato, come nelle campagne precedenti, una contaminazione generalizzata da sostanze genotossiche, maggiormente evidente nei suoli.

Per quanto riguarda l'analisi della mutagenicità del particolato atmosferico si osserva una diminuzione, rispetto alla campagna prelievi 2017, del carico genotossico in tutti i campioni analizzati. Nelle analisi condotte mediante test di reversione batterica (test di Ames), come osservato anche nelle campagne precedenti, si rileva una maggiore presenza di molecole ad attività diretta sul DNA. Una diminuzione del carico mutageno dei campioni prelevati sia in siti di ricaduta sia in siti di controllo era già stata evidenziata nella relazione precedente in relazione alla campagna prelievi 2015 e nel 2019 diviene più evidente. Nessun campione ha indotto alterazioni alla struttura del DNA, evidenziabili mediante il test della Cometa su leucociti umani, mostrando anche in questo caso una riduzione del carico genotossico del particolato atmosferico (PM_{2,5}) rispetto al campionamento 2017.

Nei campioni di suolo si rileva la presenza sia di molecole ad azione diretta sul DNA sia di pro-mutageni. Nella campagna prelievi 2019, tutti i campioni di terreno prelevati in zona di ricaduta (TM1, TM2 e TM3) ed i campioni TM4 e TM5 prelevati in zone di "controllo", analizzati mediante test di Ames, hanno presentato un carico genotossico comparabile, mentre il campione TM5_BIS, prelevato in zona di "controllo", ha evidenziato una maggiore presenza di molecole attive sul DNA. Si evidenzia la presenza di molecole genotossiche rilevabili mediante test della cometa; in alcuni siti di campionamento si registra una blanda riduzione di queste molecole rispetto al



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

campionamento 2017 (TM3 e TM4), mentre nei siti TM2, TM5 e TM5_BIS un aumento. Il terreno TM1 non presenta variazioni nelle 2 campagne.

Nell'analisi dei suoli, occorre tenere in considerazione la probabile presenza di sostanze genotossiche usate in agricoltura o già presenti in natura, non di origine antropica, che si ritrovano in scarsa o nulla presenza in atmosfera. In particolare, durante il campionamento 2019 è stata evidenziata una attività vegetativa importante e la presenza nei campi coltivati di sostanze per il trattamento dei terreni. Il tipo di campionamento utilizzato dovrebbe evitare questo tipo di confondenti, ma non si può del tutto escludere una cross-contaminazione non rilevabile durante il campionamento che potrebbe aver avuto anche un ruolo nell'indurre la tossicità rilevata mediante conteggio delle cellule "hedgehog" nel test della Cometa.

L'immagine fornita dall'insieme dei dati raccolti in questa relazione mostra una generale diminuzione di sostanze mutageno/genotossiche veicolate dal particolato PM_{2,5}, sia per quanto riguarda i siti in cui è possibile prevedere una ricaduta dei fumi dell'impianto sia per i siti non interessati da questo tipo di ricaduta.

L'analisi dei suoli evidenzia un generale aumento di sostanze genotossiche in tutta l'area indagata. Prendendo in considerazione le analisi condotte tramite il test di Ames, nelle tre ultime campagne di prelievo (2015-2017-2019) si osserva un costante incremento dei revertenti totali per tutti i siti analizzati indipendentemente dalla loro localizzazione (Fig. 10), tranne che per i campioni di suolo prelevati nel sito in area di "controllo" MUT6 (TM5_BIS) in cui si osservano variazioni altalenanti biennali che potrebbero indicare la presenza nell'area di fonti di contaminazione spuria difficilmente definibili.



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

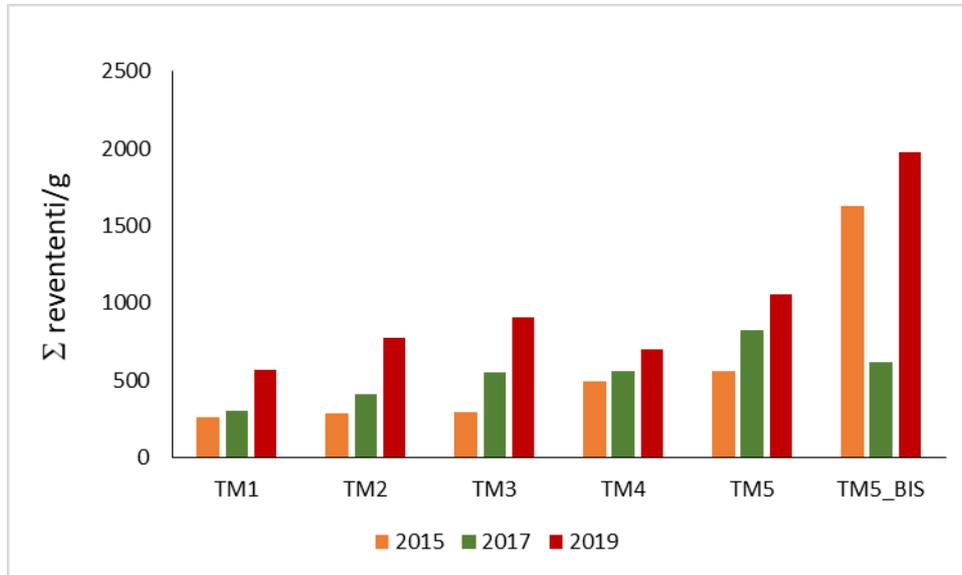


Figura 10 - Confronto relativo alla mutagenicità del suolo, espressa come sommatoria dei revertenti/g indotti nel test di Ames, nelle campagne di monitoraggio 2015, 2017 e 2019.

Come già ricordato nelle relazioni precedenti, la discrepanza tra i dati provenienti dal campionamento dell'aria e quelli del suolo non deve sorprendere. Mentre i dati relativi al particolato atmosferico forniscono una fotografia del periodo in cui il campionamento viene condotto, la matrice suolo rappresenta la "memoria storica" del periodo intercorso tra campionamenti.

La Responsabile del Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale

Prof.ssa Annamaria Buschini



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

- Allegati: 1: cartina dell'area indagata con indicati i punti di campionamento;
2: foglio di accompagnamento ai campioni di particolato atmosferico prodotto da Studio Alfa (Reggio Emilia);
3: relazione relativa all'estrazione dei campioni stilata dal responsabile del Laboratorio di Chimica Bio-inorganica del Dip. SCVSA;
4: 12 rapporti di prova con l'esito dei test di mutagenesi effettuati sui campioni sopra descritti con i ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*, in presenza e in assenza di attivazione esogena, e con il Comet assay.