

Parma, 22 giugno 2016

**MONITORAGGIO**

**DELLA MUTAGENICITÀ DEL**

**PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:**

**RETE REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA**

**ANNO 2015**

**A cura di:**

**Francesca Cassoni, Responsabile Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale  
e Clara Bocchi**

**Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale:**

*Francesca Cassoni, Cristina Bazzini, Clara Bocchi, Federica Fontana, Giancarlo  
Pinto.*

*Network Team Arpa Emilia-Romagna - PM<sub>2,5</sub>*

Callegari A, Lodigiani A (Piacenza); Cassoni F, Bocchi C, Fontana F, Pinto G, Bazzini C (Parma); Volta C, Trepiccione M (Bologna); Rubini G, Canossa E, Mingozi MR, Rinaldi P (Ferrara); Zamagni M, Bianchi D, Ricciolino G (ARPA-Rimini).

**Collaborazioni:**

Area Microinquinanti organici (polo analitico regionale nel settore dei microinquinanti organici), Arpa Emilia-Romagna, Sezione Provinciale di Ravenna: Ivan Scaroni, Alberto Santolini, Patrizia Casali per l'Analisi in gas-massa degli IPA e loro derivati.

**INDICE**

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	
<i>Campionamento ed estrazione del particolato atmosferico.....</i>	<i>2</i>
<i>Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e derivati.....</i>	<i>2</i>
<i>Test su Salmonella.....</i>	<i>3</i>
<i>Test della Cometa.....</i>	<i>4</i>
<i>Valutazione e rappresentazione dei dati.....</i>	<i>5</i>
<b>RISULTATI</b>	
<i>Test su Salmonella.....</i>	<i>7</i>
<i>Test della Cometa.....</i>	<i>21</i>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>25</b>

## INTRODUZIONE

L'attività della rete regionale di monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico urbano (Particulate Matter - PM), gestita da Arpa Emilia-Romagna, è iniziata nel 1997 con il monitoraggio delle Polveri Totali Sospese (PTS) ed è proseguita dal 2000 con il monitoraggio della frazione PM<sub>2,5</sub> (particelle con diametro aerodinamico  $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ). Da gennaio 2008 i nodi coinvolti nell'attività della rete sono: Piacenza, Parma, Bologna, Ferrara e Rimini e le centraline di campionamento del PM sono collocate in siti definiti di "fondo urbano parco". In Tabella 1 si riportano i siti e l'inizio dell'attività delle stazioni di prelievo della frazione PM<sub>2,5</sub> della rete regionale a partire dal 2008.

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.

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

In seguito alla decisione della Direzione Generale di Arpa di interrompere l'attività analitica del Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale, avvenuta in dicembre 2015, i test, a partire dai campioni di novembre 2015, sono stati effettuati presso il laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Bioscienze dell'Università di Parma, con cui è stato stipulato un Accordo di Collaborazione e Ricerca, effettivo a partire da gennaio 2016.

Per un problema tecnico dovuto a difetto strumentale, verificatosi durante la fase di estrazione dei campioni di dicembre 2015 (effettuata presso il LT), si è deciso di invalidare i risultati dei test di questo mese, in quanto, molto probabilmente, sottostimati.

Si riportano di seguito i risultati aggiornati a novembre 2015.

**Tabella 1** – Siti e periodo di campionamento del particolato atmosferico, della rete Regionale

<i>Città e data di inizio monitoraggio</i>	<i>Sito di Campionamento</i>	<i>Coordinate</i>	<i>Residenti per comune *</i>
<b>Piacenza Dicembre 2009</b>	<b>Montecucco</b>	<b>UTMX 552589 UTMY 4987424</b>	<b>102.623</b>
<b>Parma Febbraio 2008</b>	<b>Parco Cittadella</b>	<b>UTMX 605350 UTMY 4960980</b>	<b>189.996</b>
<b>Bologna Luglio 2008</b>	<b>Giardini Margherita</b>	<b>UTMX 686389 UTMY 4930344</b>	<b>386.181</b>
<b>Ferrara Gennaio 2009</b>	<b>Villa Fulvia</b>	<b>UTMX 709478 UTMY 4966936</b>	<b>134.063</b>
<b>Rimini Gennaio 2008</b>	<b>Parco Marecchia</b>	<b>UTMX 774209 UTMY 4879200</b>	<b>147.971</b>

\* Popolazione residente al 1° gennaio 2015 (<http://www.regione.emilia-romagna.it>)

## **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 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  $50 \text{ m}^3/\text{ml}$  per l'esecuzione del test su Salmonella e di  $1000 \text{ m}^3/\text{ml}$  per il test della Cometa.

Le attività di campionamento e di invio dei filtri mensili alla Sezione di Parma vengono effettuate dal personale dei singoli nodi della rete regionale.

### ***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 ( $\text{PM}_{2,5}$ ) 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 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 derivati 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 contate le colonie di revertenti dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

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

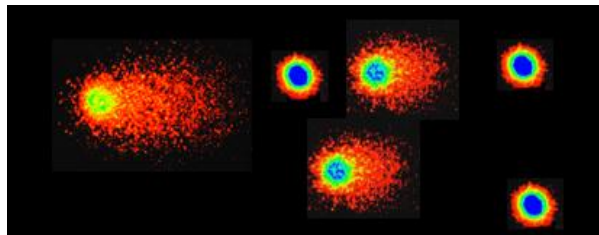
Il Test della Cometa, o Comet assay, evidenzia rotture del DNA a singolo e a doppio filamento, rilevando un danno primario nelle singole cellule non ancora riparato, né fissato.

Come 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°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo l'incubazione le cellule vengono lisate e il DNA viene sottoposto a corsa elettroforetica su vetrino in tampone fortemente alcalino (pH>13). I vetrini vengono, quindi, analizzati con

microscopio a fluorescenza mediante marcatura del DNA con sostanza visibile agli UV (Bromuro di Etidio). In questa fase il DNA delle singole cellule appare come una cometa dotata di testa (in cui il DNA non è danneggiato) e di coda (formata dai frammenti di DNA rotti e migrati), la cui lunghezza e intensità luminosa sono proporzionali alla quantità di DNA migrato nella corsa elettroforetica e quindi al danno subito dalle cellule. Vengono saggiate 3 dosi in doppia replica. Si fa presente che la dose massima saggiata corrisponde a 10 m<sup>3</sup> di aria.

**Figura 1** - DNA da singola cellula, integro e a diversi livelli di danno, visualizzato al termine del test (immagine elaborata con software Comet assay IV, Perceptive Instruments,UK) .



### ***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/ $\mu$ g di polveri dal coefficiente angolare della retta di regressione, ottenuta dal numero di revertenti riscontrati in ciascuna delle piastre per ogni dose (m<sup>3</sup> di aria aspirata equivalenti o  $\mu$ g di particolato), considerando solo il tratto lineare della curva dose/risposta al fine di eliminare l'interferenza dovuta all'eventuale presenza di effetto tossico o di altri effetti inibenti. Si considera, a tal fine, solo il coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano un  $R^2 \geq 0,60$ .

Per rappresentare l'effetto mutageno totale dei campioni si utilizza il Fattore di Genotossicità che si ottiene sommando gli effetti dei quattro test effettuati su Salmonella, più precisamente si utilizzano

i rapporti tra i valori dei trattati e dei loro rispettivi controlli (Rossi C, Poli P, Buschini A, Campanini N, Vettori MV, Cassoni F. Persistence of genotoxicity in the area surrounding an incineration plant. Toxicol Environ Chem 1992; 36: 75-87).

### Test della cometa

Il danno al DNA viene misurato mediante sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Comet assay IV). L'effetto genotossico del campione viene espresso come percentuale di intensità di fluorescenza del DNA nella coda della cometa (Tail Intensity - 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: 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.

### Analisi statistica

L'elaborazione dei dati è stata eseguita con il programma SPSS 14.

I confronti fra le città e le stagioni, per entrambi i test, sono stati effettuati mediante analisi della varianza univariata con test *post hoc* di Tukey.



## **RISULTATI**

Si riportano i risultati aggiornati all'anno 2015.

I mesi in cui il particolato atmosferico viene campionato per i test di mutagenesi sono: gennaio e febbraio, rappresentativi dell'inverno, luglio, come mese estivo e novembre e dicembre, come mesi autunnali. Su tutti i campioni viene eseguito il test di reversione batterica su Salmonella, mentre il test della Cometa viene effettuato sul particolato prelevato in gennaio, luglio e novembre.

Si ricorda che non tutti i nodi hanno iniziato l'attività di campionamento nella stazione di fondo urbano parco nello stesso periodo e che non è stato sottoposto ai test il campione di dicembre 2013.

Si ricorda anche che sono stati invalidati i dati relativi a dicembre 2015 (vedi Introduzione).

### ***Test su Salmonella***

In tutti i nodi della rete si conferma la stagionalità tipica dell'andamento della mutagenicità del particolato atmosferico rilevata con i test su Salmonella con valori elevati nel periodo autunnale-invernale e negativi nei campioni di luglio.

La Tabella 2 mostra gli andamenti temporali degli FG (vedi *Valutazione e rappresentazione dei dati*) dal 2008 al 2015. Nel 2015, a differenza del 2014, sono risultati “fortemente positivi” tutti gli FG di novembre. Nel 2015, il valore di FG più alto è quello riscontrato in novembre a Ferrara.

**Tabella 2** – Mutagenicità del particolato atmosferico urbano (PM<sub>2,5</sub>) rilevata come Fattore di Genotossicità - FG - in *Salmonella typhimurium* (nd: non determinato; inv: invalidato).

mese	PC	PR	BO	FE	RN
Gen08		nd	nd		36,3
Feb08		24,3	nd	nd	14,8
Lug08		0,5	0,1		0,6
Nov08	nd	11,8	9,9		14,8
Dic08		30,3	15,3		42,6
Gen 09		35,6	21,2	39,3	30,6
Feb09		44,2	23,9	56,1	75,1
Lug09		0,8	0,5	0,7	0,7
Nov09		8,1	18,1	29,1	23,0
Dic09	49,0	19,6	28,3	47,1	26,0
Gen10	44,0	32,7	31,7	44,8	52,8
Feb10	59,5	29,9	35,9	39,8	66,2
Lug10	0,6	0,5	0,5	0,4	0,7
Nov10	18,3	14,5	9,3	16,1	7,6
Dic10	58,8	39,3	31,0	33,3	50,5
Gen11	57,9	35,7	51,6	39,7	52,6
Feb11	45,5	28,2	31,2	54,0	75,6
Lug11	0,4	0,3	0,8	0,5	0,4
Nov11	64,7	48,1	nd	38,2	71,9
Dic11	103,5	83,8	42,4	108,4	87,1
Gen12	83,2	53,2	37,8	104,7	80,9
Feb12	108,9	60,9	58,9	53,2	79,9
Lug12	0,9	1,0	0,6	0,2	0,5
Nov12	28,0	33,7	28,1	45,4	52,3
Dic12	57,8	39,1	57,0	92,1	96,0
Gen13	121,2	93,0	28,8	103,7	96,1
Feb13	50,8	43,8	19,7	39,7	47,1
Lug13	0,5	0,7	1,1	0,3	0,3
Nov13	46,7	12,1	17,3	34,8	17,2
Dic13	nd	nd	nd	nd	nd
Gen14	61,3	49,3	33,6	42,4	92,4
Feb14	46,1	21,6	21,6	39,2	62,2
Lug14	0,8	0,5	1,0	0,3	0,6
Nov14	33,0	26,7	14,4	17,5	16,0
Dic14	23,9	15,7	21,4	19,4	37,5
Gen15	50,5	20,1	39,8	55,9	99,7
Feb15	51,1	45,4	18,3	31,2	39,6
Lug15	0,2	0,3	0,1	0,1	0,4
Nov15	50,3	35,3	24,4	104,6	44,0
Dic15	inv	inv	inv	inv	inv

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

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 conferma, per tutto il periodo e in tutti i nodi della rete, una maggiore sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica in entrambi i ceppi, sia considerando i revertenti per metro cubo che per microgrammo di aria aspirata (Anova, *post hoc* di Tukey,  $p < 0.05$ ), evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta (Fig. 2 A,B) cioè che possono agire sul DNA direttamente senza essere metabolizzate.

Dal punto di vista "quantitativo" osservando l'evoluzione temporale della mutagenicità, espressa come numero di revertenti indotti per metro cubo di aria (Tab.3, Fig.2A), e considerando solo i periodi autunnali e invernali si conferma, in generale, pur con diversità tra i nodi, un incremento di revertenti indotti per metro cubo di aria nel periodo autunno 2011 – inverno 2013, rispetto ai periodi autunnali precedenti. Mentre nei periodi successivi, dopo una diminuzione della mutagenicità nell'autunno 2014, si nota nel 2015 un nuovo incremento nel numero dei revertenti, soprattutto nei test condotti in assenza di attivazione metabolica esogena.

Nei grafici riportati in figura 2A,B, relativamente al 2015, sono particolarmente evidenti i "picchi" di Piacenza, Ferrara e Rimini, rispetto a Parma e Bologna.

Si ricorda che, per quanto riguarda l'autunno 2013 e l'autunno 2015, mancando il dato di dicembre, il numero dei revertenti potrebbe essere sotto o sovrastimato rispetto agli altri periodi autunnali.

Considerando l'intera serie storica, mettendo a confronto i diversi nodi della rete si conferma che l'attività mutagena, determinata sia per metro cubo che per microgrammo di aria equivalente, è maggiore nel PM<sub>2,5</sub> raccolto a Piacenza, Rimini e Ferrara rispetto a quello di Bologna e di Parma (Anova, *post hoc* Tukey  $p < 0.05$ ).

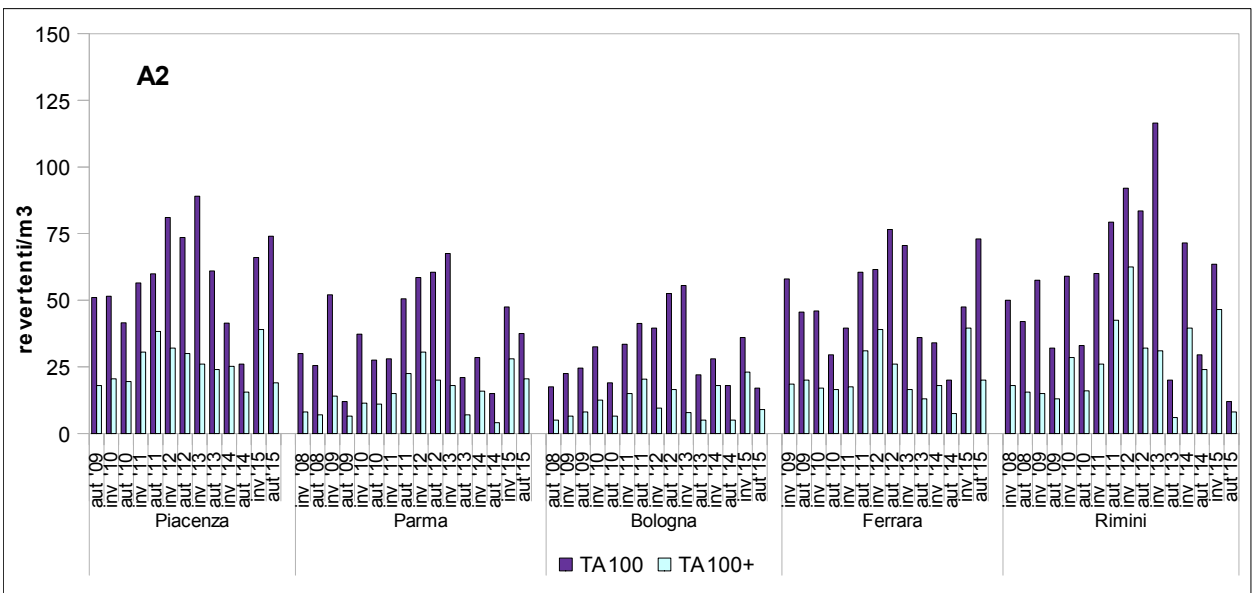
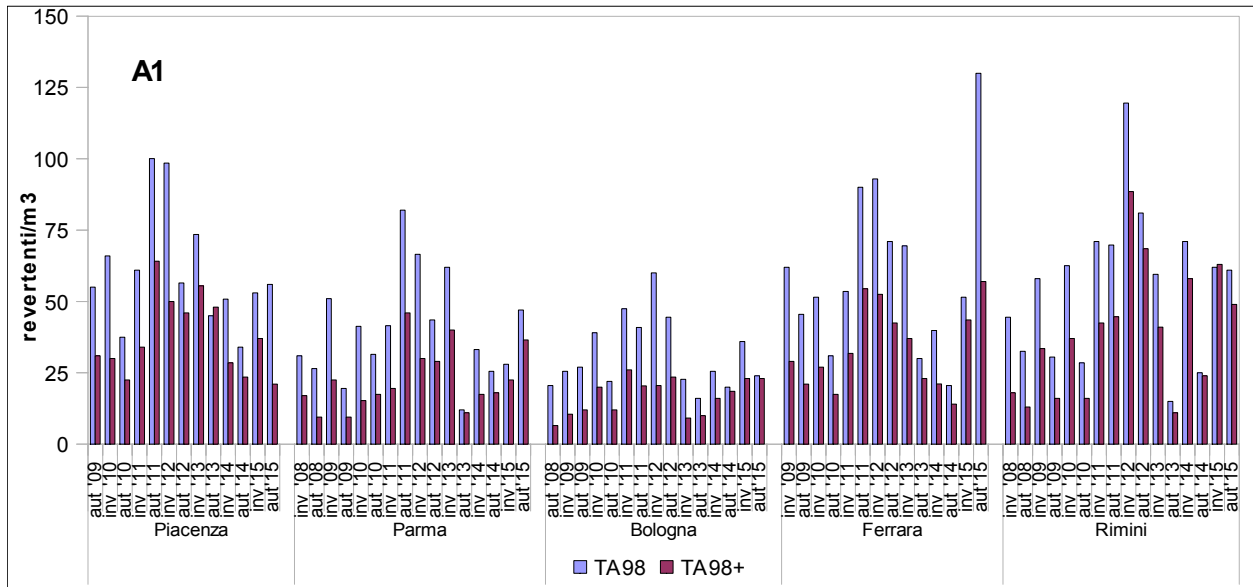
**Figura 2** - Genotossicità del PM<sub>2,5</sub> espressa come numero medio di revertenti per metro cubo d'aria (A<sub>1</sub>,A<sub>2</sub>) e per microgrammo di polveri (B<sub>1</sub>,B<sub>2</sub>), rilevata nelle stagioni e nei siti indicati, in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 (A<sub>1</sub>,B<sub>1</sub>) e TA100 (A<sub>2</sub>,B<sub>2</sub>) con (+) e senza attivazione metabolica esogena.

Inverno: media gennaio-febbraio; autunno: media novembre-dicembre.

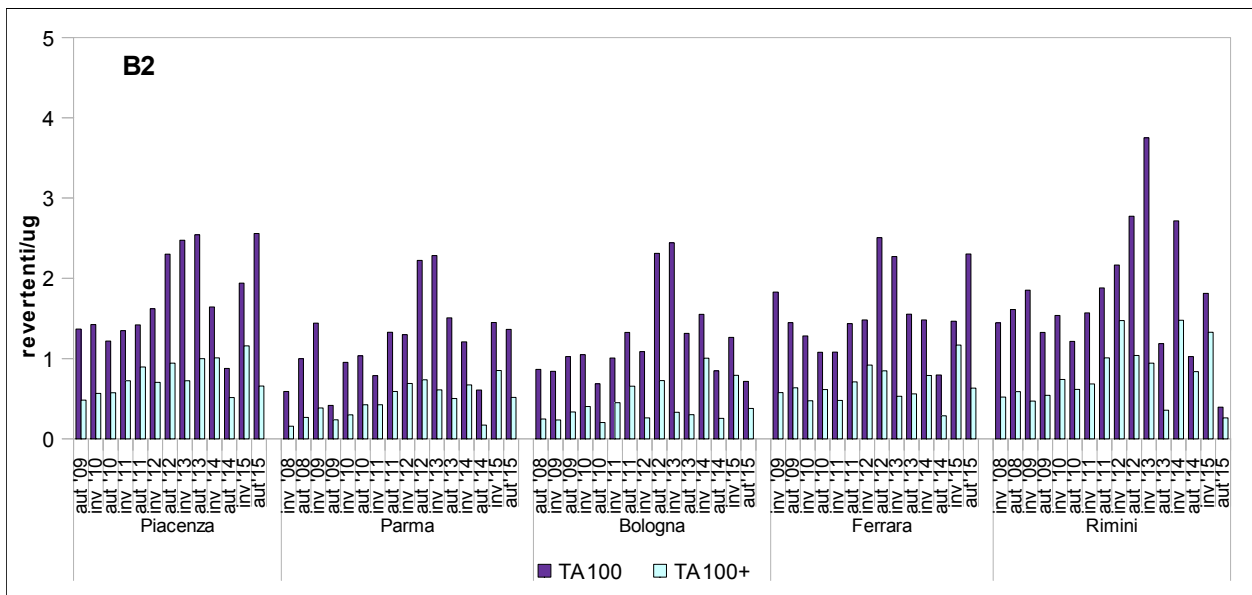
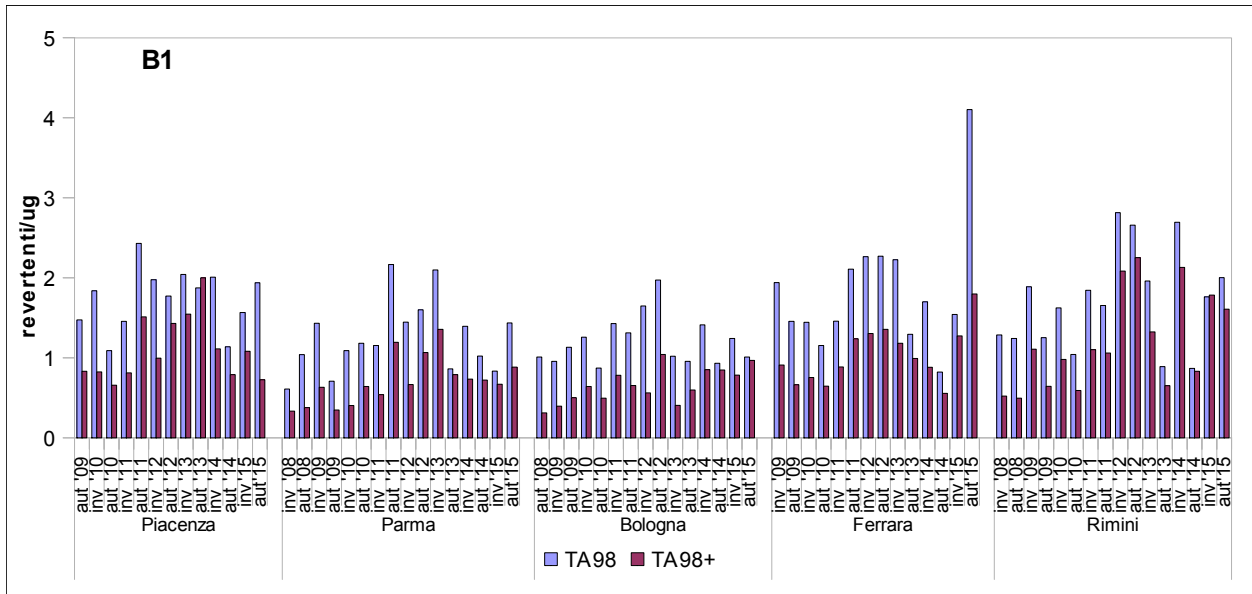
**nb: Parma inverno'08: solo febbraio; Piacenza autunno'09: solo dicembre;**

**Bologna autunno'11: solo dicembre; tutti i nodi: autunno 2013 e autunno 2015: solo novembre.**

**Figura 2A**



**Figura 2B**



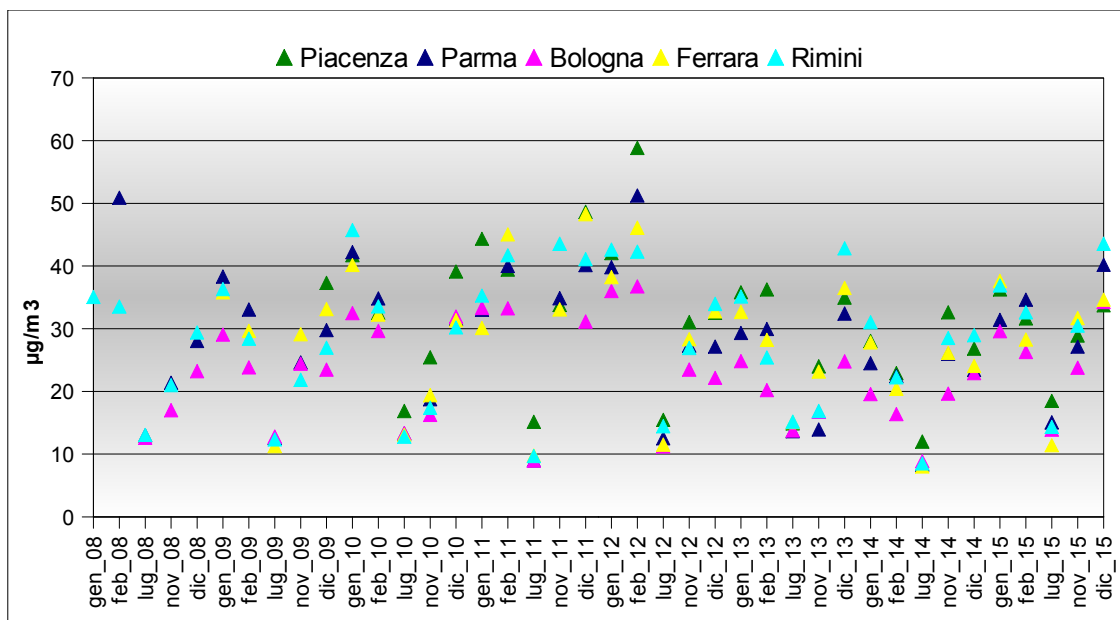
**Tabella 3** - Valori medi dei revertenti indotti per metro cubo di aria, calcolati dalle rette di regressione dose/effetto, nei quattro test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con e senza attivazione metabolica esogena, nei mesi e nei siti indicati.  
(nd: non determinato; inv: invalidato)

revertenti/m <sup>3</sup>					
mese	Piacenza	Parma	Bologna	Ferrara	Rimini
gen-08	nd	nd	nd	nd	47
feb-08	nd	22	nd	nd	19
lug-08	nd	1	0	nd	0
nov-08	nd	11	10	nd	16
dic-08	nd	24	15	nd	36
gen-09	nd	40	20	34	30
feb-09	nd	30	13	50	52
lug-09	nd	0	0	0	1
nov-09	nd	8	17	26	22
dic-09	39	16	19	40	24
gen-10	38	27	27	35	44
feb-10	46	25	25	36	50
lug-10	1	0	0	1	0
nov-10	16	12	7	12	8
dic-10	44	32	23	35	39
gen-11	50	29	38	34	48
feb-11	42	23	23	38	52
lug-11	0	0	0	0	0
nov-11	48	36	nd	32	53
dic-11	83	65	31	87	66
gen-12	63	43	30	71	92
feb-12	68	50	35	52	90
lug-12	0	1	0	0	0
nov-12	39	32	26	41	60
dic-12	64	45	43	68	73
gen-13	83	61	28	67	82
feb-13	39	33	20	30	42
lug-13	1	0	1	0	0
nov-13	45	13	13	26	13
dic-13	nd	nd	nd	nd	nd
gen-14	38	30	26	26	70
feb-14	35	18	18	31	51
lug-14	0	0	0	0	0
nov-14	28	18	14	18	20
dic-14	22	14	17	13	31
gen-15	46	28	39	56	74
feb-15	51	35	19	35	44
lug-15	0	0	0	0	0
nov-15	43	29	18	70	33
dic-15	inv	inv	inv	inv	inv

Come già evidenziato in precedenza, la diversità nei valori del numero dei revertenti indotti per metro cubo di aria che si riscontra all'interno di uno stesso nodo in diversi periodi, come pure tra nodi nello stesso periodo, può essere dovuta sia ad una diversa concentrazione del PM<sub>2,5</sub> (microgrammi per metro cubo di aria) (Fig.3, Tab.4,) che ad una diversa attività mutagenica specifica dello stesso, cioè un diverso numero di revertenti indotti per microgrammo di particolato (Tab.5, Fig. 2B), ma non sempre i due fattori incidono in egual misura.

Infatti, prendendo in considerazione le concentrazioni delle polveri solo Bologna ha una concentrazione di PM<sub>2,5</sub> inferiore alle altre quattro città che sono simili fra loro (Anova, *post hoc* di Tukey p<0.05).

**Figura 3** - Concentrazioni, medie mensili, di particolato atmosferico (PM<sub>2,5</sub> µg/m<sup>3</sup>)



**Tabella 4** - Concentrazioni, medie mensili, di particolato atmosferico (PM<sub>2,5</sub> µg/m<sup>3</sup>).

Concentrazione di PM <sub>2,5</sub> (µg/m <sup>3</sup> )					
me	Piacenza	Parma	Bologna	Ferrara	Rimini
gen-08	nd	nd	nd	nd	35,06
feb-08	nd	50,90	nd	nd	33,54
lug-08	nd	13,00	12,60	nd	13,07
nov-08	nd	21,39	17,00	nd	21,00
dic-08	nd	28,05	23,23	nd	29,41
gen-09	nd	38,31	29,07	35,81	36,32
feb-09	nd	33,07	23,83	29,66	28,41
lug-09	nd	12,61	12,79	11,29	12,35
nov-09	nd	24,62	24,43	29,12	21,84
dic-09	37,31	29,80	23,48	33,13	26,99
gen-10	41,75	42,22	32,49	40,16	45,74
feb-10	32,55	34,84	29,64	32,27	33,57
lug-10	16,88	13,28	13,35	13,09	12,80
nov-10	25,44	18,74	16,25	19,42	17,39
dic-10	39,14	31,55	31,93	31,38	30,20
gen-11	44,35	33,01	33,32	30,11	35,29
feb-11	39,42	40,03	33,25	45,04	41,71
lug-11	15,15	9,01	8,98	9,78	9,69
nov-11	33,79	34,87	nd	33,08	43,56
dic-11	48,64	40,15	31,16	48,27	41,10
gen-12	42,05	39,81	36,02	38,22	42,63
feb-12	58,85	51,25	36,75	46,10	42,30
lug-12	15,46	12,53	11,23	11,52	14,45
nov-12	31,05	27,30	23,50	28,33	26,93
dic-12	32,55	27,15	22,16	32,77	33,97
gen-13	35,82	29,32	24,83	32,68	35,15
feb-13	36,27	29,96	20,21	28,22	25,42
lug-13	14,91	13,66	13,76	15,10	15,17
nov-13	24,01	13,93	16,74	23,18	16,87
dic-13	34,99	32,43	24,80	36,50	42,83
gen-14	28,05	24,50	19,57	27,82	31,03
feb-14	22,92	22,45	16,38	20,43	22,26
lug-14	12,00	8,34	8,86	8,03	8,52
nov-14	32,61	26,01	19,66	26,14	28,53
dic-14	26,84	23,42	22,91	24,07	28,97
gen-15	36,28	31,42	29,60	37,61	36,90
feb-15	31,66	34,64	26,29	28,29	32,61
lug-15	18,48	15,06	13,90	11,42	14,35
nov-15	28,91	27,14	23,79	31,70	30,48
dic-15	33,74	40,19	34,26	34,64	43,55

Mettendo a confronto gli andamenti della mutagenicità del PM<sub>2,5</sub>, (media stagionale dei revertenti/m<sup>3</sup>) e la media delle concentrazioni stagionali delle polveri (Fig.4), si evidenzia che l'andamento dei due parametri è simile, come si può constatare anche dalla Tabella 6, dove si riportano i valori dei coefficienti di determinazione (R<sup>2</sup>) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero medio di revertenti/m<sup>3</sup> aria, rilevati nell'intero periodo di campionamento. Infatti, per la maggior parte dei nodi della rete, si evidenzia una discreta correlazione tra i due parametri con valori di R<sup>2</sup> intorno allo 0,7.

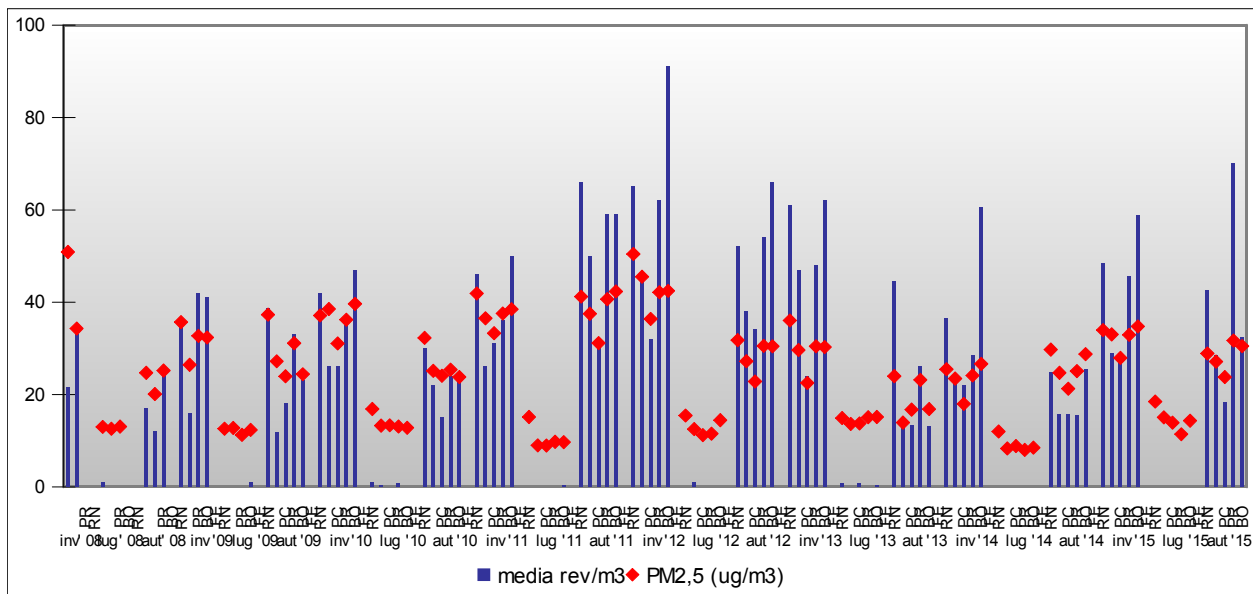


**Tabella 5** - Media dei revertenti indotti per microgrammo di polveri, ricavati dai valori dei revertenti per metro cubo di aria in base alla concentrazione del PM<sub>2,5</sub>.  
(nd: non determinato; inv: invalidato)

<b>revertenti/μg</b>					
<b>mese</b>	<b>Piacenza</b>	<b>Parma</b>	<b>Bologna</b>	<b>Ferrara</b>	<b>Rimini</b>
gen-08	nd	nd	nd	nd	1,326
feb-08	nd	0,422	nd	nd	0,559
lug-08	nd	0,077	0,000	nd	0,000
nov-08	nd	0,502	0,559	nd	0,762
dic-08	nd	0,838	0,656	nd	1,207
gen-09	nd	1,031	0,680	0,957	0,819
feb-09	nd	0,915	0,535	1,669	1,839
lug-09	nd	0,014	0,000	0,000	0,070
nov-09	nd	0,325	0,675	0,901	0,984
dic-09	1,038	0,528	0,820	1,200	0,899
gen-10	0,904	0,647	0,831	0,878	0,957
feb-10	1,421	0,725	0,843	1,100	1,482
lug-10	0,030	0,019	0,000	0,057	0,000
nov-10	0,639	0,627	0,400	0,631	0,431
dic-10	1,131	1,014	0,728	1,116	1,300
gen-11	1,116	0,879	1,148	1,118	1,353
feb-11	1,053	0,575	0,684	0,833	1,247
lug-11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,041
nov-11	1,414	1,032	nd	0,952	1,205
dic-11	1,713	1,606	0,987	1,792	1,597
gen-12	1,492	1,074	0,833	1,857	2,152
feb-12	1,155	0,976	0,946	1,128	2,116
lug-12	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000
nov-12	1,256	1,163	1,085	1,430	2,219
dic-12	1,966	1,648	1,940	2,060	2,142
gen-13	2,310	2,063	1,122	2,050	2,325
feb-13	1,082	1,110	0,977	1,054	1,662
lug-13	0,050	0,000	0,054	0,000	0,000
nov-13	1,853	0,915	0,792	1,100	0,771
dic-13	nd	nd	nd	nd	nd
gen-14	1,337	1,214	1,341	0,926	2,240
feb-14	1,548	0,792	1,068	1,502	2,268
lug-14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-14	0,859	0,673	0,687	0,689	0,701
dic-14	0,801	0,587	0,753	0,540	1,079
gen-15	1,254	0,891	1,318	1,496	1,992
feb-15	1,619	1,010	0,723	1,228	1,349
lug-15	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-15	1,470	1,050	0,767	2,208	1,066
dic-15	inv	inv	inv	inv	inv

Tuttavia, non sempre a una maggiore concentrazione di PM<sub>2,5</sub> corrisponde un numero maggiore di revertenti indotti per metro cubo di aria (Fig.4), confermando la rilevanza anche della tipologia e della quantità relativa delle sostanze mutagene associate al PM.

**Figura 4** - Andamenti comparati della mutagenicità del PM<sub>2,5</sub>, (media stagionale dei revertenti/m<sup>3</sup>) e delle concentrazioni (medie stagionali) delle polveri, nei siti indicati.  
Inverno: media gennaio-febbraio; autunno: media novembre-dicembre.



**Tabella 6** - Valori dei coefficienti di determinazione ( $R^2$ ) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero medio di revertenti/m<sup>3</sup> di aria rilevati nei siti indicati da inizio campionamento a novembre 2015.

	$R^2$
<b>Piacenza</b>	0,68
<b>Parma</b>	0,56
<b>Bologna</b>	0,69
<b>Ferrara</b>	0,69
<b>Rimini</b>	0,67

Anche dall'analisi statistica (Anova, *post hoc* di Tukey  $p < 0.05$ ) effettuata per confrontare in tutti i nodi della rete le differenze di concentrazioni di polveri e di revertenti/m<sup>3</sup>, negli anni, è emerso che non tutte le stagioni in cui vi è la più alta concentrazione di PM<sub>2,5</sub> (inverno 2008, 2010, 2011, 2012, autunno 2011) corrispondono ai periodi in cui si riscontrano un maggior numero di revertenti/m<sup>3</sup> (autunno 2011, 2012, inverno 2012, 2013 e 2015)

Considerando i dati come medie stagionali (Fig. 5a e 5b), dal confronto tra le concentrazioni di IPA 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 il numero dei

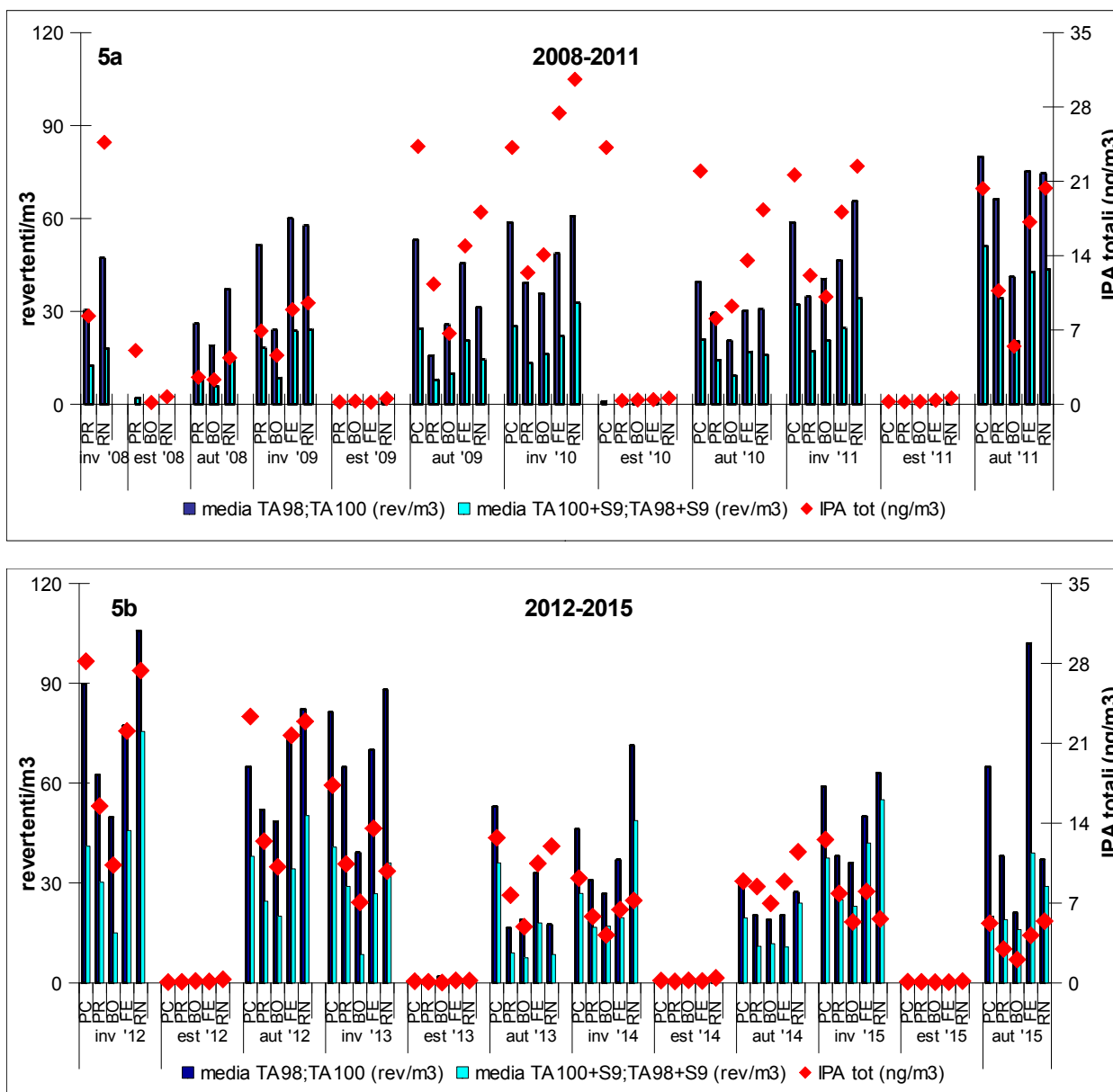
revertenti indotti in assenza di attivazione metabolica e con quello dei revertenti indotti in presenza di S9 (sensibili alla presenza di IPA) si conferma che, pur avendo lo stesso andamento stagionale, le concentrazioni più alte di IPA non sempre corrispondono all'attività mutagenica più alta del PM, confermando un forte contributo alla mutagenicità da parte anche di altre sostanze.

**Figura 5** - Confronto tra livelli medi stagionali degli IPA mutageni, riportati nel testo, e attività genotossica ottenuta con i test sui ceppi TA98 e TA100 con (+S9) e senza attivazione metabolica, nelle stagioni indicate: 5a dall'inverno 2008 all'autunno 2011, 5b dall'inverno 2012 all'autunno 2015.

Inverno: media gennaio-febbraio; autunno: media novembre-dicembre.

**nb: Parma inverno'08: solo febbraio; Piacenza autunno'09: solo dicembre;**

**Bologna autunno'11: solo dicembre; tutti i nodi: autunno 2013 e autunno 2015: solo novembre.**



Si precisa che a partire da questo report, i confronti tra le concentrazioni dei microinquinanti organici, rilevate negli stessi estratti di particolato sottoposto ai test, e l'attività genotossica del PM<sub>2,5</sub> vengono effettuati considerando questi parametri per metro cubo di aria e non più riferiti a microgrammo di particolato. Questo in quanto abbiamo constatato, in base ai dati ottenuti, che l'attività mutagena specifica delle polveri e cioè il numero dei revertenti indotti per microgrammo di PM, su cui finora si è incentrato lo studio, deriva da più fattori e quindi, non può essere spiegata solamente con l'una o l'altra delle classi di microinquinanti organici rilevate. Inoltre, esprimendo i dati per metro cubo di aria campionata, non solo si tiene in considerazione il contributo della concentrazione di polveri ma è anche un'informazione più facilmente rapportabile a quanto effettivamente respiriamo (in condizioni di riposo si respira circa mezzo metro cubo di aria all'ora). In tabella 7 si riportano i valori dei coefficienti di determinazione (R<sup>2</sup>) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di IPA e la media dei revertenti indotti in seguito ad attivazione metabolica esogena, cioè nei test sui ceppi TA98 e TA100 in presenza di S9, più sensibili alla presenza di IPA. Questi valori, che vanno da un minimo di 0,3 a un massimo di 0,5, confermano quanto sopra esposto.

**Tabella 7** - Valori dei coefficienti di determinazione (R<sup>2</sup>) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di IPA con il numero medio di revertenti/m<sup>3</sup> aria indotti in seguito ad attivazione metabolica esogena, rilevati nei siti indicati da inizio campionamento a novembre 2015.

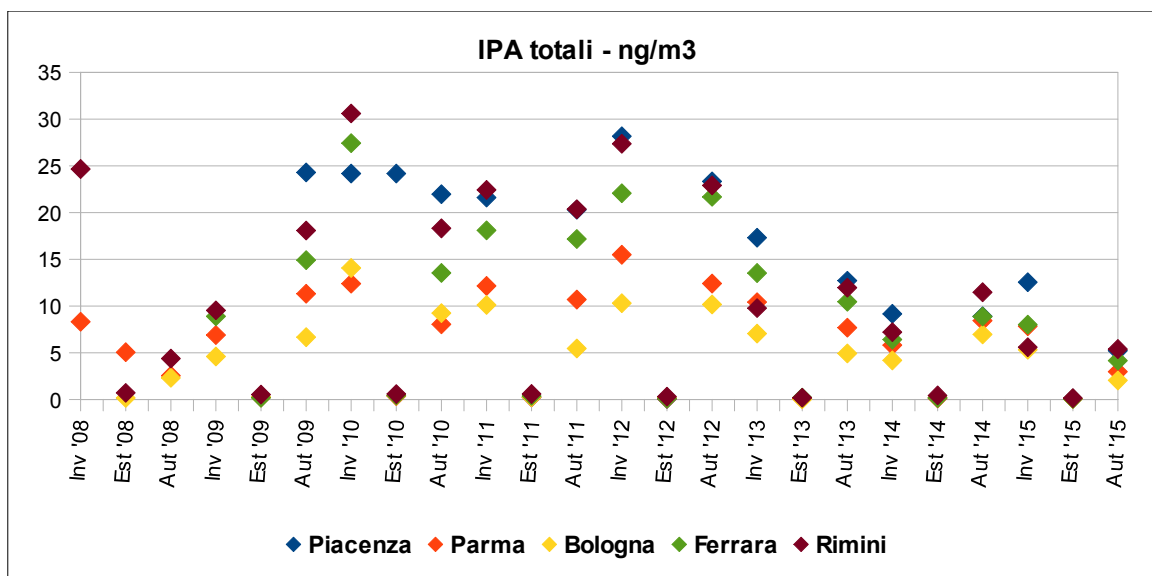
	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Piacenza</b>	0,54
<b>Parma</b>	0,47
<b>Bologna</b>	0,50
<b>Ferrara</b>	0,43
<b>Rimini</b>	0,29

Considerando le concentrazioni di IPA totali (ng/m<sup>3</sup> di aria equivalente) non c'è differenza fra quelle invernali ed autunnali, ma si evidenzia che sono maggiormente presenti nell'aria campionata a Rimini e Piacenza rispetto a quella di Bologna e Parma; la quantità di IPA nell'aria urbana di Ferrara è invece simile a quella di Parma, Piacenza e Rimini, ma maggiore di quella presente a Bologna (Anova, *post hoc* di Tukey p<0.05).

Si ricorda che a partire da novembre 2008 sono stati inseriti, nell'elenco degli IPA rilevati, anche il ciclopenta (c,d) pirene e il dibenzo (a,e) fluorantene e che, anziché il dibenzo (a,h) antracene, viene rilevata la concentrazione di dibenzo (a,h + a,c) antracene.

Nel grafico in Figura 6 si riportano le concentrazioni medie stagionali espresse in nanogrammi per metro cubo di aria, degli IPA dotati di attività biologica totali, riportati nel testo.

**Figura 6** - Concentrazioni, medie stagionali, di IPA totali (ng/m<sup>3</sup>), rilevate nei periodi e nelle città indicati.  
**nb: Parma inverno'08: solo febbraio; Piacenza autunno'09: solo dicembre;**  
**Bologna autunno'11: solo dicembre; tutti i nodi: autunno 2013 e autunno 2015: solo novembre.**



In Figura 7 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni medie stagionali di Nitro-IPA compreso l'unico Ossi-IPA rilevato, il 3-nitrobenzantrone, 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. I derivati degli IPA rilevati sono descritti al paragrafo "Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e derivati".

Dal momento che da novembre 2010 sono stati inseriti anche l'1,6-dinitropirene e l'1,8-dinitropirene nei NitroIPA rilevati e che i dati relativi al 2-nitrofluorene, a partire da novembre 2010, non sono stati inseriti in quanto il composto è risultato interferito, nel grafico in Figura 7 vengono riportati i dati a partire dall'autunno 2010.

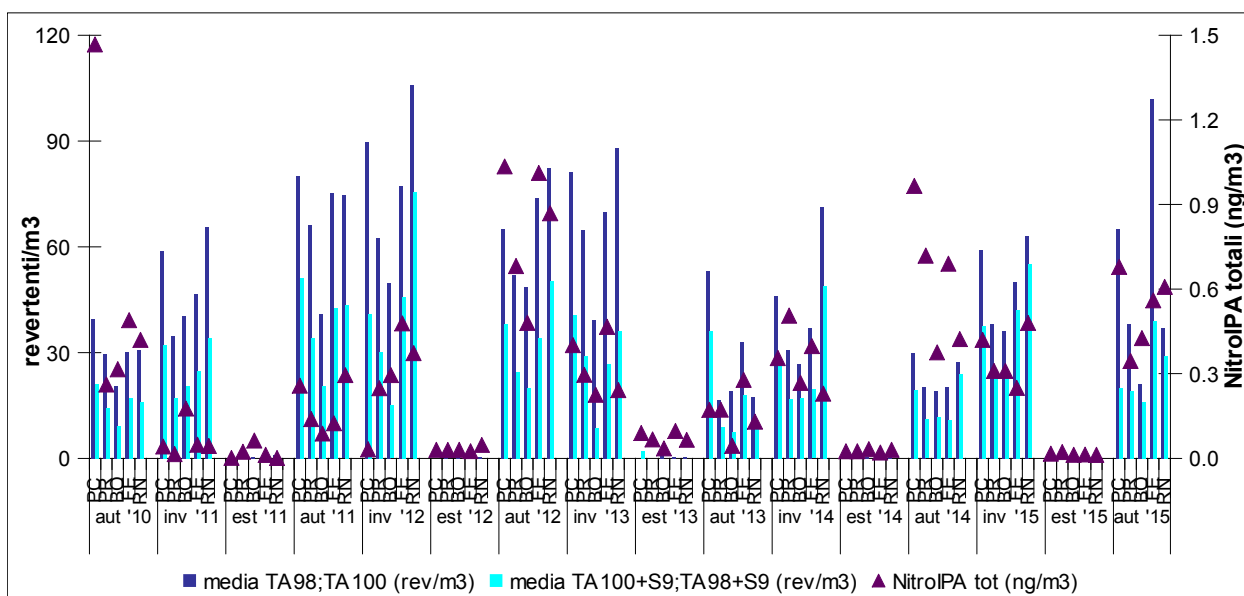
In generale, non si riscontra corrispondenza tra la maggiore attività mutagenica diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA, confermando anche in questo caso, il contributo di altre sostanze alla mutagenicità del PM. Questo è evidente, ad esempio, se si considerano i Nitro-IPA e i revertenti associati alle polveri campionate nell'autunno 2014: i primi risultano fra i più alti ed i secondi fra i più bassi del periodo considerato (Anova, *post hoc* di Tukey  $p < 0.05$ ).

Considerando le concentrazioni di Nitro-IPA ( $\text{ng}/\text{m}^3$  di aria equivalente) non c'è differenza statistica fra le concentrazioni rilevate nelle città qui considerate e nemmeno fra quelle autunnali ed invernali che risultano però, come nel caso degli IPA, entrambe maggiori delle concentrazioni estive (Anova, *post hoc* di Tukey  $p < 0.05$ ).

**Figura 7** - Confronto tra livelli medi mensili dei Nitro-IPA riportati nel testo, compreso il 3-nitrobenzantrone, e attività genotossica ottenuta con i test sui ceppi TA98 e TA100 con (+S9) e senza attivazione metabolica, nelle stagioni indicate.

**Inverno:** media gennaio-febbraio; **autunno:** media novembre-dicembre.

**nb:** Bologna autunno '11: solo dicembre; tutti i nodi: autunno 2013 e autunno 2015: solo novembre.



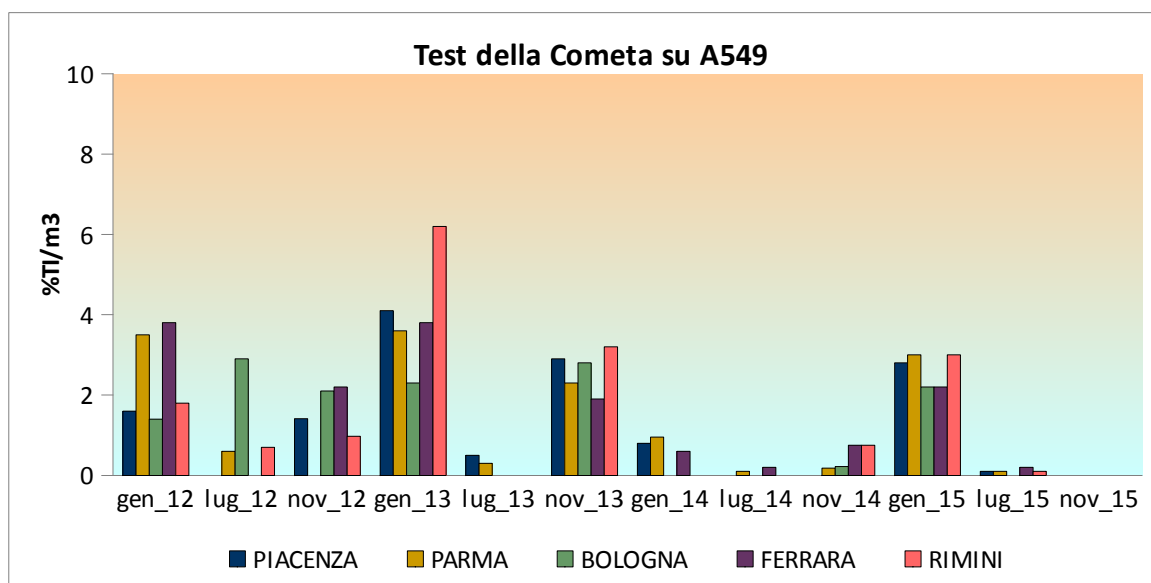
### Test della Cometa

In Figura 8 vengono riportati i valori del danno indotto espresso come percentuale di DNA nella coda per metro cubo di aria, ricavati dai coefficienti angolari delle rette di regressione dose/effetto dei campioni positivi o con  $R^2 \geq 0,60$ .

Nel 2015 sono risultati positivi i campioni di gennaio di tutti i nodi, mentre quelli di luglio e di novembre sono risultati negativi.

Per quanto riguarda il 2015 nessun campione ha indotto effetto tossico sulle cellule subito dopo il trattamento (misurato come mortalità cellulare superiore al 30%), mentre i campioni di gennaio di Parma e Ferrara hanno indotto un incremento della percentuale di hedgehogs (evidenziata durante la fase di lettura), cioè di quelle cellule fortemente danneggiate che presentano nuclei completamente dispersi.

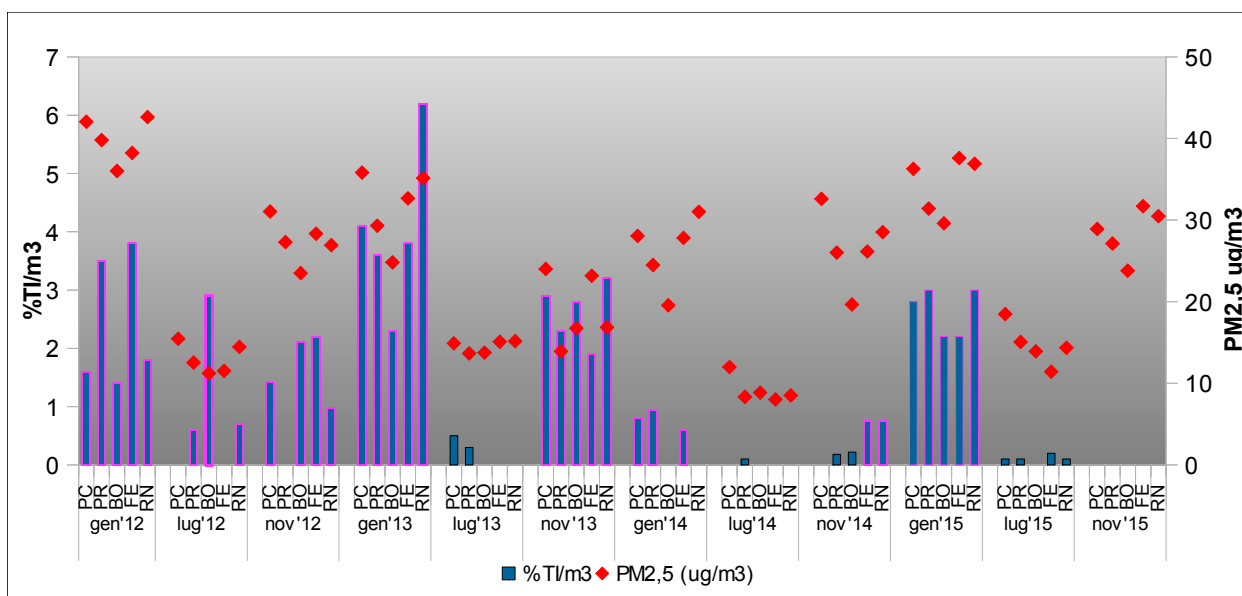
**Figura 8** – Andamento del danno indotto per metro cubo d'aria equivalente (espresso come percentuale di TI, vedi testo) ottenuto dai coefficienti angolari delle curve dose effetto.



Considerando tutto il periodo riportato si nota in gennaio 2015, dopo la riduzione del danno al DNA riscontrata nel 2014 da parte di quasi tutti i campioni, rispetto ai periodi precedenti, un aumento del TI% per metro cubo in tutti i nodi della rete statisticamente significativo rispetto al 2014. Mentre non si è riscontrata una differenza significativa fra le città nel 2015, come nell'intero periodo. Confrontando, invece, i dati per mese di campionamento, le sostanze in grado di causare rotture al DNA sono risultate maggiormente associate al PM raccolto in gennaio (Anova, *post hoc* di Tukey  $p < 0.05$ ).

Non si osserva corrispondenza tra la concentrazione di PM<sub>2,5</sub> e l'aumento della percentuale di intensità di fluorescenza nella coda - TI%- per metro cubo (Fig. 9, le barre contornate in rosa rappresentano i campioni positivi), il valore più alto del coefficiente di determinazione R<sup>2</sup> ottenuto è 0,51, riscontrato per Ferrara (Tab.8).

**Figura 9** – 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 e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri. Le barre contornate di rosa rappresentano i campioni positivi.



**Tabella 8** - Valori dei coefficienti di determinazione (R<sup>2</sup>) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il danno al DNA espresso come incremento percentuale di TI per metro cubo di aria, rilevati nei siti indicati da inizio campionamento a novembre 2015.

	R <sup>2</sup>
<b>Piacenza</b>	0,30
<b>Parma</b>	0,32
<b>Bologna</b>	0,06
<b>Ferrara</b>	0,51
<b>Rimini</b>	0,19

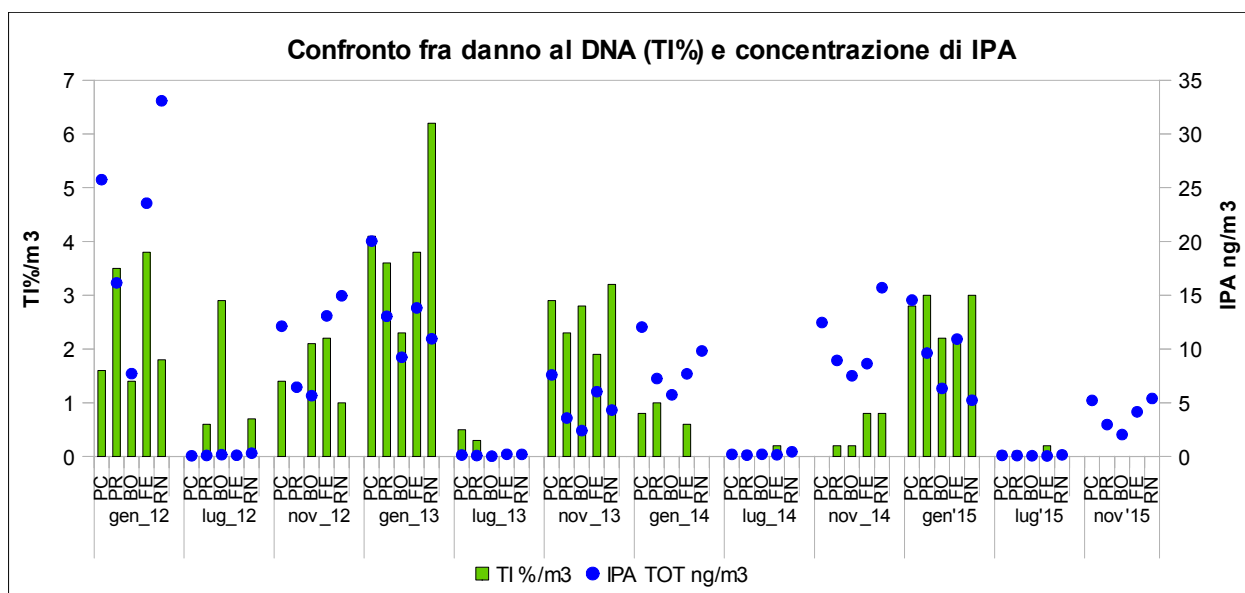
Come per i test su Salmonella, a partire dal 2015, i confronti tra le concentrazioni dei microinquinanti organici e l'attività genotossica del PM<sub>2,5</sub> rilevata con il test della Cometa, vengono effettuati considerando questi parametri per metro cubo di aria.



Dalla Figura 10, dove si confrontano le concentrazioni (nanogrammi per metro cubo di aria) di IPA totali (vedi paragrafi precedenti) con l'induzione di danno alle cellule A549 (%TI per metro cubo di aria), non sempre si nota corrispondenza fra i due parametri.

Mettendo in relazione la concentrazione di IPA con l'aumento della percentuale di intensità di fluorescenza nella coda per metro cubo, per Piacenza, Bologna e Rimini non si osserva corrispondenza tra i due parametri, mentre per Ferrara il valore del coefficiente di determinazione  $R^2$  ottenuto è 0,81, evidenziano una buona corrispondenza tra i due parametri. Per quanto riguarda Parma il valore del coefficiente di determinazione  $R^2$  ottenuto è 0,57 (Tab.9).

**Figura 10** – 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 con la concentrazione media mensile di IPA totali (vedi testo).

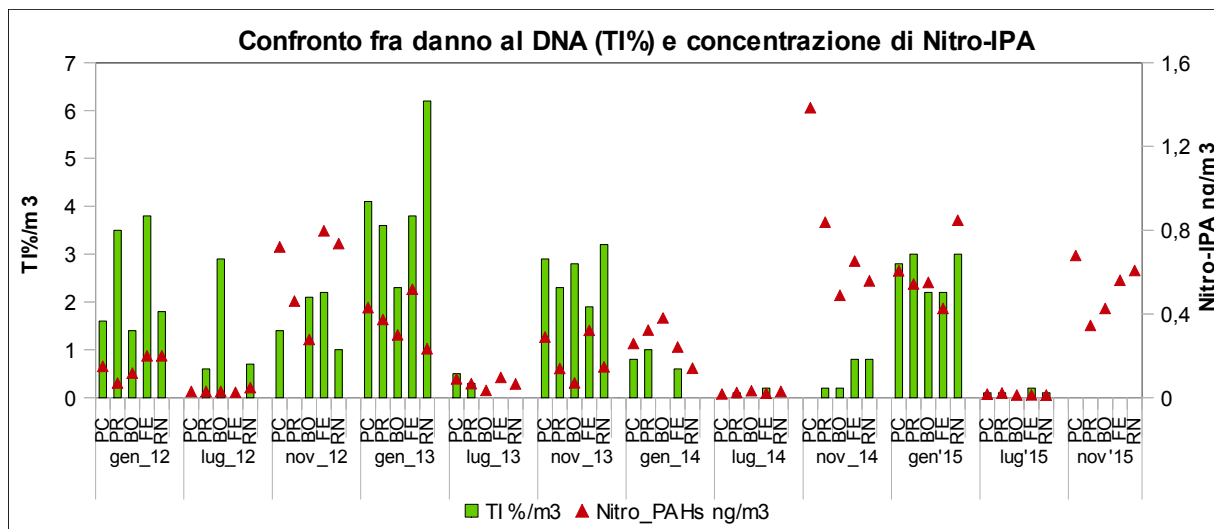


**Tabella 9** - Valori dei coefficienti di determinazione ( $R^2$ ) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di IPA con il danno al DNA espresso come incremento percentuale di TI per metro cubo di aria, rilevati nei siti indicati da inizio campionamento a novembre 2015.

	$R^2$
<b>Piacenza</b>	0,39
<b>Parma</b>	0,57
<b>Bologna</b>	0,07
<b>Ferrara</b>	0,81
<b>Rimini</b>	0,05

Nessuna corrispondenza si riscontra, per tutte le città, tra la concentrazione dei nitroderivati degli IPA e l'induzione di danno alle cellule A549 (TI%) (Fig.11).

**Figura 11** – 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 con la concentrazione media mensile di NitroIPA totali (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 e considerando tutti i nodi insieme si ottiene un indice di correlazione di 0,59, mentre valutando i due test città per città si ottengono dati piuttosto diversificati. Infatti, per le città di Piacenza, Parma e Ferrara, si sono ottenuti valori dell'indice di correlazione di Pearson intorno a 0,7 evidenziando, almeno in base ai dati al momento disponibili, che l'utilizzo di batteri e di cellule umane porta a risultati abbastanza comparabili, mentre per le città di Rimini e soprattutto di Bologna, non si riscontra correlazione tra i due tipi di danno indotto al DNA (Tab.10).

**Tabella 10** – Valori degli indici di correlazione di Pearson ottenuti mettendo in relazione il numero medio di revertenti rilevato con i test su Salmonella con la percentuale di TI rilevata sulle cellule A549, entrambi espressi per metro cubo d'aria

<b>Indice di correlazione</b>	
<b>Piacenza</b>	0,78
<b>Parma</b>	0,66
<b>Bologna</b>	0,32
<b>Ferrara</b>	0,72
<b>Rimini</b>	0,52

## **CONCLUSIONI**

Si conferma la stagionalità della mutagenicità, già riscontrata negli anni precedenti, rilevata dai test su Salmonella con valori più alti nei mesi più freddi e valori negativi nel periodo estivo.

Questa stagionalità è stata riscontrata con il test della Cometa sulle cellule A549 per tutte le città solo nell'anno 2013. Negli altri anni non c'è una completa sovrapposizione con la positività ottenuta nei test su Salmonella, in particolare, nel 2015, tutti i campioni di novembre sono risultati negativi con il test della Cometa, mentre sono risultati positivi nei test su Salmonella.

Escludendo il mese di luglio, in generale si osserva una tendenza a valori di mutagenicità, espressi per metro cubo di aria, più elevati nel periodo autunno 2011 – inverno 2013, rispetto ai periodi autunnali precedenti, sia nei test condotti su Salmonella che nei test della Cometa (nei mesi in cui è stato eseguito) e a valori più bassi in quasi tutti i campioni del 2014.

Nel 2015 si assiste ad un nuovo incremento della genotossicità del PM evidente in inverno in entrambi i test ed in autunno solo con i test su Salmonella, in particolar modo quelli condotti in assenza di attivazione metabolica.

Dal confronto fra le città è emerso che l'aria campionata a Piacenza, Rimini, Ferrara e Parma ha una quantità di PM<sub>2,5</sub> statisticamente maggiore di quella campionata a Bologna. Gli IPA totali (ng/m<sup>3</sup>) sono maggiormente rappresentati nell'aria campionata a Piacenza e Rimini rispetto a quella di Parma e Bologna, mentre gli IPA di Ferrara sono maggiori di quelli di Bologna, ma simili a quelli delle altre tre città. Infine, i dati ottenuti dal test della Cometa non hanno evidenziato nessuna differenza fra le città, mentre confrontando i revertenti, ottenuti in Salmonella sia per metro cubo che per microgrammo, ancora una volta i valori più alti si riscontrano a Piacenza e Rimini e Ferrara, che risultano statisticamente maggiori a Parma e Bologna.

Le differenze nel livello della mutagenicità (numero di revertenti indotti o percentuale di intensità di fluorescenza nella coda – TI% - per metro cubo di aria) che si riscontrano all'interno di uno stesso

nodo in diversi periodi e tra nodi nello stesso periodo, possono essere dovute sia ad una maggiore concentrazione del PM<sub>2,5</sub> (microgrammi per metro cubo di aria), che ad una maggiore attività mutagena specifica dello stesso, cioè al numero di revertenti indotti o all'aumento della percentuale di TI, per microgrammo di particolato, ma non sempre i due fattori incidono in egual misura nei diversi nodi e nei diversi periodi, sottolineando che, a volte, può avere maggior rilevanza la tipologia e la quantità relativa delle sostanze mutagene associate al PM rispetto alla sua concentrazione in atmosfera.

Si conferma che la discrepanza fra la concentrazione di PM<sub>2,5</sub> e l'aumento del danno al DNA è particolarmente evidente nel test della Cometa in cui non si osserva corrispondenza tra i due parametri, confermata dai valori dei coefficienti di determinazione R<sup>2</sup> ottenuti: il più alto è 0,51, riscontrato per Ferrara.

Dai dati relativi al confronto tra IPA e attività mutagena del particolato, rilevata con i test su Salmonella, si evidenzia la stessa stagionalità, ma si conferma la discrepanza tra le concentrazioni più alte di IPA e i valori più alti di revertenti indotti dimostrando che questa classe di composti incide solo in parte sulla mutagenicità del PM e il maggior contributo è dato da altre sostanze prevalentemente ad azione mutagena diretta, cioè sostanze che possono agire direttamente sul DNA, ma che non appartengono ai derivati degli IPA rilevati, come evidenziato dalla mancata corrispondenza tra la maggiore attività mutagena diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA che si rileva nel periodo considerato. Anche nel test della Cometa non si nota corrispondenza, per tutte le città, tra la concentrazione dei nitroderivati degli IPA (nanogrammi per metro cubo di aria) e l'induzione di danno alle cellule A549. Per quanto riguarda gli IPA l'unico nodo in cui c'è una buona corrispondenza fra concentrazione di IPA (ng/m<sup>3</sup>) e TI% per metro cubo di aria è Ferrara dove il valore del coefficiente di determinazione R<sup>2</sup> ottenuto è 0,81.

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. Le diverse specie chimiche che le compongono, difficilmente sono tutte caratterizzabili e/o quantificabili e inoltre possono interagire tra di loro con effetti additivi, sinergici e antagonisti.

Considerando i mesi monitorati con entrambi i test, per le città di Piacenza, Parma e Ferrara, si è evidenziata una discreta correlazione tra i due tipi di danno indotto al DNA dal particolato atmosferico, evidenziando, almeno in base ai dati al momento disponibili, che l'utilizzo di batteri e di cellule umane porta a risultati abbastanza comparabili, mentre per le città di Rimini e soprattutto di Bologna, non si riscontra correlazione tra i due tipi di danno indotto al DNA.

L'utilizzo di test con end point genetici diversi si conferma un utile strumento per verificare in modo più completo l'eventuale genotossicità del PM e quindi pericolosità per la popolazione esposta.

Dai dati finora disponibili, nonostante i siti di campionamento nei diversi nodi siano per definizione simili essendo tutti di "fondo urbano parco", la quantità e/o la tipologia delle sostanze mutagene associate al PM<sub>2,5</sub> ivi campionato, possono essere differenti, probabilmente anche in funzione delle sorgenti inquinanti circostanti la centralina. Per esempio il parco di Rimini è circondato da strade ad elevata intensità di traffico, mentre a Parma la centralina, essendo collocata sui bastioni della fortificazione in cui è situato il parco, risulta ad un'altezza rispetto al livello stradale, maggiore delle altre città.

Il proseguimento dell'attività della rete regionale della mutagenicità del PM nei nodi ritenuti rappresentativi dell'intero territorio dell'Emilia-Romagna, garantirà la valutazione continua nel tempo e su tutta la regione della genotossicità del particolato atmosferico urbano, fornendo, in ambito analitico/preventivo, importanti informazioni sia ai fini della prevenzione primaria con una migliore caratterizzazione del pericolo per la popolazione urbana cronicamente esposta, sia per la valutazione dell'efficacia delle azioni nazionali e locali tese al risanamento dell'aria in ambiente urbano.

Dott.ssa Francesca Cassoni

Responsabile Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale