
Eccellenza "Mutagenesi Ambientale"

Tel. 0521/381216-111

Fax 0521/381239

Dipartimento Tecnico

Parma, 22 marzo 2006

Prot.: PG/06/1142

***RETE REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA DI
MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITÀ DEL
PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:
RIMINI 2003-2005***

INTRODUZIONE

Il monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, frazione PM_{2,5} (particelle con diametro aerodinamico <2,5 µm), iniziato a Rimini nell'agosto 2000, è proseguito anche nel 2005. Dal 2004 i test di mutagenesi vengono effettuati solo sul particolato campionato nei mesi più significativi nell'ambito di ogni stagione, valutati in base alla serie storica dei dati e più precisamente:

- gennaio e febbraio come mesi rappresentativi dell'inverno;
- aprile come mese rappresentativo della primavera;
- luglio come mese rappresentativo dell'estate;
- novembre e dicembre come mesi rappresentativi dell'autunno.

Dal 2004, per ampliare la conoscenza dell'effetto genotossico globale del PM, oltre alla ricerca di sostanze in grado di indurre mutazioni puntiformi, eseguita con test su Salmonella, alcuni campioni (PM di febbraio, di luglio e di dicembre) vengono sottoposti al test dei Micronuclei (MN) su linfociti umani coltivati *in vitro*. Questo test è in grado di rilevare la presenza di sostanze che inducono rotture (sostanze clastogene) e/o che causano la perdita di interi cromosomi (sostanze aneuploidogene).

Nel presente report vengono riportati i dati relativi agli ultimi tre anni di monitoraggio (2003/2005), considerando, per omogeneità di rappresentazione, i sei mesi monitorati a partire dal 2004.

MATERIALI E METODI

Campionamento ed estrazione particolato atmosferico

La stazione di campionamento è situata in via Abete (zona ad alta densità abitativa e media intensità di traffico veicolare).

Per il campionamento del PM_{2,5} si utilizza un campionatore giornaliero dotato di testa di prelievo per PM₁₀ e impattore per PM_{2,5} costruiti secondo norme EPA.

Il particolato utilizzato per i test di mutagenesi è raccolto su filtri in fibra di quarzo senza leganti organici; con campionamento continuo per tutte le 24 ore e flusso di aspirazione di

circa 15-16 l/min. Il campione mensile è dato dall'insieme dei filtri giornalieri, ogni campione 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 Nm³/ml.

Il peso delle polveri viene determinato con metodo gravimetrico.

Il campionamento e l'estrazione chimica del campione vengono effettuati presso la Sezione Provinciale di Rimini.

Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Negli stessi estratti di particolato da sottoporre a test di mutagenesi viene effettuata, dal novembre 2003, presso la Sezione provinciale di Ravenna, nell'ambito delle attività dell'Eccellenza "Microinquinanti organici", la determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA).

L'aliquota degli estratti organici provenienti dall'estrazione del materiale particellare viene sottoposta a purificazione per cromatografia su colonna impaccata con gel di silice secondo le modalità riportate nel metodo EPA 3630C.

La determinazione analitica finale viene effettuata per gascromatografia ad alta risoluzione interfacciata ad uno spettrometro di massa a bassa risoluzione (HRGC/LRMS), attraverso la registrazione e la misura delle correnti ioniche relative ai picchi molecolari (Mi)⁺ e ai picchi isotopici (Mi+1)⁺.

IPA rilevati: naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo(a)antracene, crisene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(e)pirene, benzo(a)pirene, indeno(1,2,3-cd)pirene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(ghi)perilene; dibenzo(a,e)pirene, dibenzo(a,i)pirene, dibenzo(a,h)pirene.

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). Il principio del test di Ames si basa sulla retromutazione in quanto utilizza ceppi di batteri (*Salmonella typhimurium*) recanti ognuno

un diverso tipo di mutazione nel gene che codifica per la biosintesi dell'istidina, quindi incapaci di crescere in assenza di questo aminoacido e la positività 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 mutagene (retromutazioni). I batteri che riacquistano tale capacità sono detti revertenti.

L'utilizzo di due ceppi di *Salmonella typhimurium* permette di evidenziare diversi tipi di danni genetici 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. I revertenti vengono contati dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

Test dei micronuclei

Il test, definito come "cytokinesis-block micronucleus assay" - test CBMN (Fenech, Mutat. Res., 455, 81-95, 2000), ha l'obiettivo di verificare la presenza di sostanze in grado di indurre rotture dei cromosomi (sostanze clastogene) o perdita dei medesimi (sostanze aneugeniche) portando alla formazione di micronuclei. I micronuclei (MN), ritenuti indicatori indiretti di aberrazioni cromosomiche strutturali e/o numeriche, sono piccoli corpi extranucleari, di dimensioni inferiori rispetto al nucleo, che si formano al termine di una divisione cellulare dalla condensazione di frammenti di cromosomi o di cromosomi interi esclusi dal nucleo principale originando così, nelle cellule, dopo la divisione cellulare, corpuscoli citoplasmatici liberi di forma rotondeggiante o ovale chiaramente distinti dal nucleo principale. Il test è effettuato, in vitro, su linfociti di sangue periferico prelevato da donatori sani non fumatori. Per valutare la presenza di effetto citotossico in linfociti in

coltura si calcola l'indice CBPI (*Cytokinesis Block Proliferation Index*), che misura la cinetica di proliferazione cellulare, ovvero il numero medio di cicli cellulari effettuati dalle cellule in coltura, in quanto una sostanza con effetto tossico induce un rallentamento delle divisioni cellulari con una relativa diminuzione dell'indice CBPI (Surrallés et al., *Mutat. Res.*, 341, 169-184, 1995).

Per ogni campione vengono saggiate tre concentrazioni di estratto e per ogni concentrazione si eseguono due repliche indipendenti.

I test di mutagenesi, l'elaborazione dei dati e la stesura del report vengono effettuati presso la Sezione Provinciale di Parma, nell'ambito delle attività dell'Eccellenza "Mutagenesi Ambientale".

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 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/ Nm^3 di aria e dei revertenti/ μg di polveri, dato dal coefficiente angolare della retta di regressione ottenuta dal numero di revertenti riscontrati in ciascuna delle piastre per ogni dose (Nm^3 di aria aspirata equivalenti o μg di particolato). In questo caso si considera 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 diversi campioni si utilizza il Fattore di Genotossicità che si ottiene sommando gli effetti dei test considerati. Per calcolare questo parametro vengono utilizzati 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 dei micronuclei

Per valutare la positività di un campione, intesa come capacità di avere effetto clastogeno/aneugenico, si effettua il test del chi quadrato fra le dosi saggiate e il controllo (Serrano-Garcia e Montero-Montoya, *Environ. Mol. Mutagen.*, 38, 38-45, 2001).

Come per il test su Salmonella, la genotossicità dei campioni è rappresentata anche mediante il valore dei MN/Nm³ di aria, rappresentato dal coefficiente angolare della retta di regressione dei dati considerando solo il tratto lineare delle curve dose/risposta.

RISULTATI

Test su Salmonella

Osservando l'evoluzione temporale della mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come fattore di genotossicità totale, nel periodo 2003 - 2005 (*Fig.1*), si riscontrano valori "fortemente positivi" in tutti i mesi autunnali e invernali a partire da febbraio 2003, mentre già da dicembre 2004 si assiste a una diminuzione della mutagenicità a valori comparabili a quelli riscontrati prima del febbraio 2003 (vedi l'aggiornamento per l'anno 2004 del report regionale, all'indirizzo web sotto riportato). Questa "impennata" della mutagenicità del PM_{2,5} nei mesi di febbraio, novembre, dicembre 2003 e gennaio, febbraio 2004, merita un approfondimento (analisi delle condizioni meteo-climatiche del periodo, eventuali lavori nei pressi del sito di campionamento del PM, variazioni del traffico veicolare, eventuali fattori intralaboratoriali, ecc.) in quanto si discosta notevolmente da quanto riscontrato, sempre a Rimini, nel periodo precedente e in quello successivo, ed è comparabile se non, a volte, superiore alla mutagenicità rilevata negli altri nodi della rete regionale, compresi quelli dove i fenomeni di inversione termica che si verificano nei mesi più freddi, sono più consistenti. Considerando l'evoluzione della mutagenicità espressa come numero di revertenti/Nm³ e come numero di revertenti/μg di polveri (*Fig2,Tab1*), non si riscontrano differenze significative, nel tempo, sotto l'aspetto "qualitativo" (es.: induzione di mutazioni per sostituzione piuttosto che per inserzione o delezione di basi, presenza di mutageni diretti o

di promutageni) infatti, in quasi tutto il periodo considerato, si nota una maggior sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica esogena evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta associate al particolato (quali sono ad es. i nitroderivati degli IPA). Per quanto riguarda l'aspetto "quantitativo" (numero di revertenti per Nm³ di aria aspirata e numero di revertenti per µg di particolato), si riscontrano a partire da dicembre 2004 valori più bassi, soprattutto nei mesi invernali e autunnali rispetto a quelli riscontrati negli stessi periodi del 2003 e del 2004.

Confrontando gli andamenti nel tempo della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, espressa come sommatoria dei revertenti/Nm³ e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri (*Fig.3A*), si può constatare che, per entrambi i parametri, i valori più alti si riscontrano nei mesi più freddi, ma che a parità di concentrazione di polveri possono corrispondere livelli molto diversi di mutagenicità. Anche dalla retta di regressione ottenuta mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero di revertenti/Nm³ totali (*Fig.3B*) si evidenzia una notevole dispersione dei punti intorno alla retta stessa ($R^2 = 0,3$). Tutto questo evidenzia, confermando quanto già riscontrato in precedenza, la molteplicità dei fattori che determinano la mutagenicità del particolato atmosferico urbano.

Mettendo in relazione il numero di revertenti/Nm³ di aria, ottenuti con i quattro test utilizzati, e le concentrazioni di CO e di NO₂, rilevate, nel periodo gennaio 2003 – dicembre 2005, nello stesso sito di campionamento del particolato, si osservano discrete correlazioni soprattutto con la concentrazione di CO (vedi tabella sottostante), evidenziando il contributo del traffico veicolare alla mutagenicità del PM_{2,5} campionato nel sito oggetto dell'indagine. Per quanto riguarda la concentrazione di NO₂, invece, si osserva una certa correlazione ($r = 0,6$) solo con il numero di revertenti indotti nel ceppo TA100 in presenza di attivazione metabolica esogena. Si rammenta che questi gas, non sono una causa diretta della mutagenicità del particolato, ma che, in generale, sono dei buoni indicatori di inquinamento antropico e per questo motivo in alcuni casi possono essere considerati buoni descrittori dell'andamento della mutagenicità del particolato atmosferico per un determinato sito.

Nella tabella sottostante si riportano i valori dei coefficienti di correlazione “r” ottenuti dalle correlazioni fra le concentrazioni di CO (mg/Nm³) e NO₂ (µg/Nm³) e i revertenti/Nm³ rilevati nel periodo 2003-2005.

Revertenti/Nm ³	NO ₂ (µg/Nm ³)	CO (mg/Nm ³)
	r	r
TA98	0,3	0,5
TA98+	0,3	0,5
TA100	0,3	0,7
TA100+	0,6	0,8

Nei grafici di *Fig.4*, si riportano le concentrazioni degli IPA dotati di attività biologica, rilevate negli stessi estratti che sono stati sottoposti a test di mutagenesi, espresse sia come ng/mg di particolato (*Fig.4A*) che come ng/Nm³ di aria (*Fig.4B*). Dall’osservazione dell’andamento risulta evidente che i valori più elevati sono quelli riscontrati nei mesi più freddi e il più alto, è quello riscontrato nel gennaio 2003.

Per quanto riguarda il confronto tra concentrazione di IPA e attività mutagena del particolato, si può ipotizzare che gli IPA non sono le sole molecole responsabili della mutagenicità associata alle polveri, ma che un forte contributo sia dato anche da sostanze ad azione mutagena diretta. A questo proposito in Figura 5 si riporta il grafico, aggiornato al 2005, del confronto tra i livelli medi di IPA mutageni con i livelli medi di attività genotossica, determinata sia con i test condotti su Salmonella in assenza di attivazione metabolica esogena, che con i test sensibili alla loro presenza: ovvero condotti in presenza di attivazione metabolica esogena (+S9). Si nota che il livello di genotossicità rilevato con i test sensibili alla presenza di IPA (+S9) è generalmente più basso di quello rilevato con gli altri test, inoltre è evidente come a concentrazioni simili di IPA corrispondano valori di mutagenicità piuttosto differenti.

Si può concludere con la considerazione che a partire dal 2003 si sono riscontrati valori “fortemente positivi” nell’attività mutagena del particolato atmosferico campionato a Rimini, contrariamente a quanto si è riscontrato negli anni precedenti (vedi l’aggiornamento per l’anno 2004 del report regionale, all’indirizzo web sotto riportato), che ritornano a livelli più bassi nel 2005. Risulta, pertanto, difficile evidenziare un trend nell’evoluzione temporale della mutagenicità associata al PM. Inoltre si conferma l’impossibilità di

attribuire ad una sola classe di contaminanti la mutagenicità del PM_{2,5} che risulta essere dipendente non tanto dalla “quantità” ma soprattutto dalla “qualità” del particolato stesso.

Test dei micronuclei

Per ottenere informazioni aggiuntive sul particolato atmosferico e per rilevare la presenza di sostanze che agiscono sul materiale genetico con meccanismi d'azione differenti rispetto alle mutazioni puntiformi, evidenziate con il test su Salmonella, su alcuni campioni viene effettuato il test dei “micronuclei” (MN) su linfociti umani coltivati *in vitro*. In questo Report sono riportati i dati da febbraio 2004 a febbraio 2005, risultati tutti negativi (*Fig.6A*) senza un evidente corrispondenza con la risposta ai test su Salmonella (*Fig.6B*) che sottolinea la complementarietà dei due test. Si può notare che nel campione di Febbraio 2004 è presente un aumento, seppur non statisticamente significativo, in relazione alla dose, del numero di micronuclei, con un concomitante aumento dell'effetto tossico che potrebbe aver portato ad una sottostima dell'effetto mutageno dell'estratto.

Con i dati a disposizione non sono state riscontrate relazioni tra il numero di micronuclei e concentrazione di PM e/o di IPA (*Fig.6C*); occorre, tuttavia, ragionare su un numero maggiore di dati per poter fare considerazioni più precise.

Si ricorda l'indirizzo del sito web dell'Eccellenza “Mutagenesi Ambientale” dove sono pubblicati i dati relativi alla mutagenicità del particolato atmosferico urbano campionato a Rimini e del particolato campionato negli altri nodi della rete regionale:

http://www.arpa.emr.it/parma/ecc_mutag.htm

LA RESPONSABILE DELL'ECCELLENZA

IL RESPONSABILE DEL DIPARTIMENTO TECNICO

Dott.ssa Francesca Cassoni

Dr. Sandro Sbaragli