

Eccellenza "Mutagenesi Ambientale"

Dipartimento Tecnico

Tel. 0521/381216-111

Fax 0521/381239

Parma, 16 marzo 2005

Prot.: 3583/05

***RETE REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA DI
MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITA' DEL
PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:
RIMINI (2003-2004)***

INTRODUZIONE

Il monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, frazione PM_{2,5}, iniziato a Rimini nell'agosto 2000, è proseguito nel 2004 con alcune modifiche, infatti, dal gennaio 2004 i test di mutagenesi vengono effettuati sul particolato campionato nei mesi ritenuti più significativi, valutati in base alla serie storica dei dati, nell'ambito di ogni stagione:

- 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.

Occorre tenere in considerazione, quindi, che tutti i dati e i confronti riportati nel presente report sono stati effettuati considerando, anche per il 2003, solo i mesi sopra citati.

Dal 2003 viene effettuata sugli stessi estratti di PM sottoposti a test di mutagenesi, l'analisi degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA).

MATERIALI E METODI

Campionamento ed estrazione particolato atmosferico

La stazione di campionamento è situata in via Abete (zona a media intensità di traffico veicolare).

Per il campionamento del particolato con diametro aerodinamico inferiore a 2,5 µm (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 prelievo viene effettuato ad una altezza di circa 3 metri da terra. Il particolato viene raccolto su filtri in quarzo senza leganti organici, il campionamento è continuo per tutte le 24 ore, con flusso di aspirazione di circa 15 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, Carlo Erba Milano).

Il solvente viene evaporato mediante rotavapor ed il residuo secco è risospeso in dimetilsolfossido (DMSO RPE-ACS, Carlo Erba Milano) per ottenere un rapporto costante (50 m³/ml) tra il volume dell'aria e il volume dell'estratto nel periodo in esame.

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, sottoposti a test di mutagenesi, è stata effettuata anche la determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici.

La determinazione degli IPA è stata effettuata presso la Sezione Provinciale di Ravenna, nell'ambito delle attività dell'Eccellenza "Microinquinanti organici", con il metodo sotto riportato. L'aliquota degli estratti organici provenienti dalla estrazione del materiale particellare viene sottoposta a purificazione per cromatografia su colonna impaccata con gel di silice secondo le modalità riportate nel Manuale Unichim 825. 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 di mutagenesi

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 *Salmonella typhimurium* recanti ognuno un diverso tipo di mutazione nell'operone che codifica per la biosintesi dell'istidina e la

positività viene valutata sul numero dei revertenti, cioè sul numero dei batteri che riacquistano il fenotipo del ceppo originale.

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

Per ogni campione si saggiavano 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.

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

La mutagenicità dei campioni di particolato atmosferico viene determinata considerando solo il tratto lineare delle curve dose/risposta al fine di eliminare l'interferenza dovuta all'eventuale presenza di effetto tossico o altri effetti inibenti l'attività mutagenica dei campioni. 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 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/Nm³ di aria e dei revertenti/μg di polveri, rappresentato dal coefficiente angolare della retta di regressione dei valori relativi al

numero di revertenti riscontrati in ciascuna delle piastre, all'aumentare della dose (Nm^3 di aria aspirata equivalenti o μg di particolato).

Per rappresentare l'effetto mutageno totale dei diversi campioni si utilizza il Fattore di Genotossicità ottenuto 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).

RISULTATI

Osservando l'evoluzione temporale della mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come fattore di genotossicità totale, nel periodo 2003 - 2004 (*Fig1*), si riscontrano valori "positivi" e "fortemente positivi" in tutti i mesi autunnali e invernali, con un incremento nel gennaio 2004 rispetto al corrispondente periodo del 2003, mentre il contrario si osserva per il mese di dicembre. Nel 2004 il fattore di genotossicità è positivo anche nel mese di aprile. Non sono stati riportati i dati relativi ai test di mutagenesi del mese di novembre, in quanto i valori riscontrati, discostandosi eccessivamente dai precedenti e dai successivi, necessitano di un approfondimento su eventuali fattori di confondimento (es.: una particolare situazione momentanea limitata al sito di campionamento, fattori intralaboratoriali, ecc.), prima di essere resi pubblici.

Considerando l'evoluzione della mutagenicità espressa come numero di revertenti/ Nm^3 e come numero di revertenti/ μg di polveri (*Fig2, Tab1*), non si riscontrano differenze significative 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). Anche per quanto riguarda l'aspetto "quantitativo" (numero di revertenti per Nm^3 di aria aspirata e numero di revertenti per μg di particolato), non si riscontrano

differenze consistenti eccetto i valori relativi a dicembre 2004 che risultano più bassi rispetto a quelli del dicembre 2003.

Confrontando gli andamenti nel tempo della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, espressa come sommatoria dei revertenti/Nm³ e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri (*Fig3A*), si può constatare che sono abbastanza simili; tuttavia è presente (*Fig3B*) una certa dispersione dei punti intorno alla retta di regressione ottenuta mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero di revertenti/Nm³ totali ($R^2=0,6$). Infatti si nota che non sempre a valori simili di concentrazione di polveri corrispondono valori simili di mutagenicità (*Fig3 A*), questo evidenzia ancora una volta la molteplicità dei fattori che determinano la mutagenicità del particolato atmosferico urbano.

Per meglio interpretare i dati di mutagenicità sono state analizzate le correlazioni tra il numero di revertenti/Nm³ di aria, ottenuti con i quattro test utilizzati, e le concentrazioni di CO e di NO₂, rilevate nello stesso sito di campionamento del particolato atmosferico. Infatti questi gas, pur non essendo una causa diretta della mutagenicità del particolato, sono, in generale, 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. Come si può constatare dalla tabella sottostante, dove si riportano i valori dei coefficienti di correlazione "r" ottenuti, si osserva correlazione soprattutto tra il numero di revertenti indotti nel ceppo TA100 e la concentrazione di CO, mentre per quanto riguarda la concentrazione di NO₂, si osserva una certa correlazione ("r" = 0,6) solo con il numero di revertenti indotti nel ceppo TA100 in presenza di attivazione metabolica esogena.

Revertenti/Nm ³	NO ₂ (µg/Nm ³)	CO (mg/Nm ³)
	r	r
TA98	0,1	0,6
TA98+	0,2	0,6
TA100	0,3	0,7
TA100+	0,6	0,9

Nei grafici di *Fig4*, 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 (*Fig4A*) che come ng/Nm³ di aria (*Fig4B*). 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 siano 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 si riporta il grafico (*Fig5*) relativo ai confronti, per i mesi monitorati, tra i livelli medi di IPA mutageni e i livelli medi di attività genotossica determinata sia con i test condotti sui due ceppi di Salmonella in assenza di attivazione metabolica esogena, che con i test sensibili alla loro presenza: ovvero condotti in presenza di attivazione metabolica esogena (+S9). Infatti, non solo il livello di genotossicità rilevato con i test condotti in assenza di attivazione metabolica è generalmente più alto di quello rilevato con i test condotti in presenza di attivazione metabolica, ma è anche 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 aggiornamento Report regionale – 2003 all'indirizzo web sotto riportato), che il numero di revertenti riscontrato non è dovuto solo agli IPA associati alle polveri, ma anche alla presenza di altre sostanze ad azione mutagena, e che, per l'effetto mutageno, non è determinante la “quantità” ma soprattutto la “qualità” del particolato aerodisperso.

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. Gianmarco Curti