

Cap. 5 MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITÀ DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO

Il monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, frazione PM_{2,5} (particelle con diametro aerodinamico $\leq 2,5\mu\text{m}$), iniziato a Rimini nell'agosto 2000, si è concluso, per quanto riguarda la centralina di via Abete, nel dicembre 2007. 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.

Per determinare l'attività mutagena del PM vengono utilizzati due test che evidenziano differenti tipi di danno al DNA: mutazioni puntiformi (test su Salmonella) eseguito su tutti i campioni e rottura e/o perdita di cromosomi (test dei Micronuclei) eseguito su alcuni dei campioni prelevati.

5.1 MATERIALI E METODI

5.1.1 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 viene 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 e il peso delle polveri viene determinato con metodo gravimetrico.

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 per l'esecuzione del test su Salmonella e di 200 Nm³/mL per il test dei Micronuclei.

Il campionamento e l'estrazione chimica del campione sono stati effettuati presso la Sezione Provinciale di Rimini fino a luglio 2007, mentre da novembre 2007 l'estrazione viene effettuata presso la Sezione Provinciale di Parma.

5.1.2 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.

5.1.3 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. La positività, intesa come mutagenicità, 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 due 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 Salmonella 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 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.

5.1.4 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 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 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 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, inducendo un rallentamento delle divisioni cellulari, provoca un abbassamento 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; fino a luglio 2004 i micronuclei venivano valutati su 1000 cellule totali, mentre da dicembre 2004 si considera la media dei micronuclei su 2000 cellule.

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".

5.2 Valutazione e rappresentazione dei dati

5.2.1 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).

5.2.2 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/ Nm^3 di aria, rappresentato dal coefficiente angolare della retta di regressione dei dati considerando solo il tratto lineare delle curve dose/risposta.

5.3 RISULTATI

5.3.1 Test su Salmonella

Osservando l'evoluzione temporale della mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come Fattore di Genotossicità totale, si confermano anche nel periodo 2004 - 2007 (Fig. 5.3.1.1) valori "positivi" e "fortemente positivi" in tutti i mesi autunnali e invernali con l'eccezione di novembre 2005. Dopo i valori "fortemente positivi" di inizio 2004, da dicembre 2004 si assiste a una diminuzione della mutagenicità e quindi a un successivo aumento a partire da novembre 2006. Tuttavia, data una certa discontinuità dei dati risulta difficile effettuare confronti più precisi tra i diversi livelli di mutagenicità riscontrati nel periodo riportato. Il valore di Fattore di Genotossicità più alto nel periodo considerato è quello di gennaio 2004.

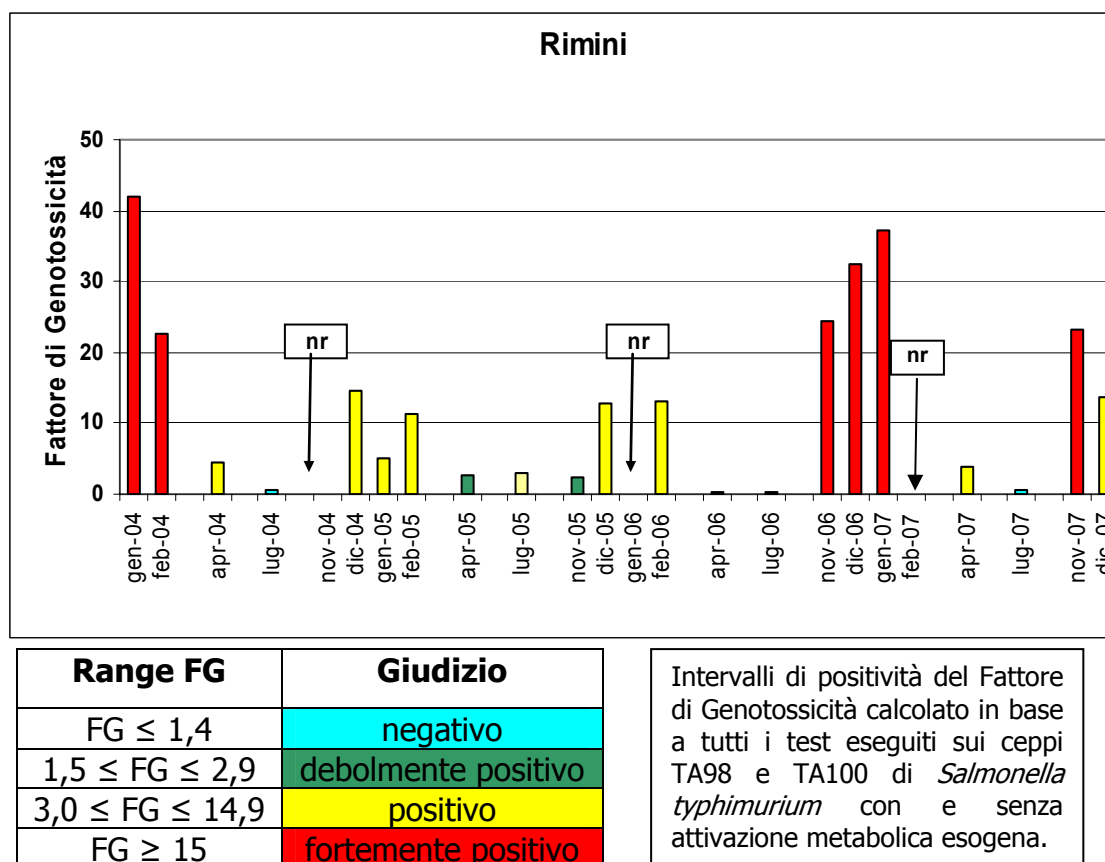


Fig. 5.3.1.1 Evoluzione temporale del Fattore di Genotossicità del PM_{2,5} campionato a Rimini nel periodo 2004-2007, calcolato su tutti i test in *Salmonella typhimurium*.

In quasi tutto il periodo considerato, si conferma 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) (Fig. 2). La maggiore mutagenicità, riscontrata in certi periodi rispetto ad altri, sembra essere dovuta più che ad una maggiore concentrazione di PM (Fig. 3) ad una maggiore attività mutagena specifica dello stesso (numero di revertenti per µg di polveri - Fig. 2B).

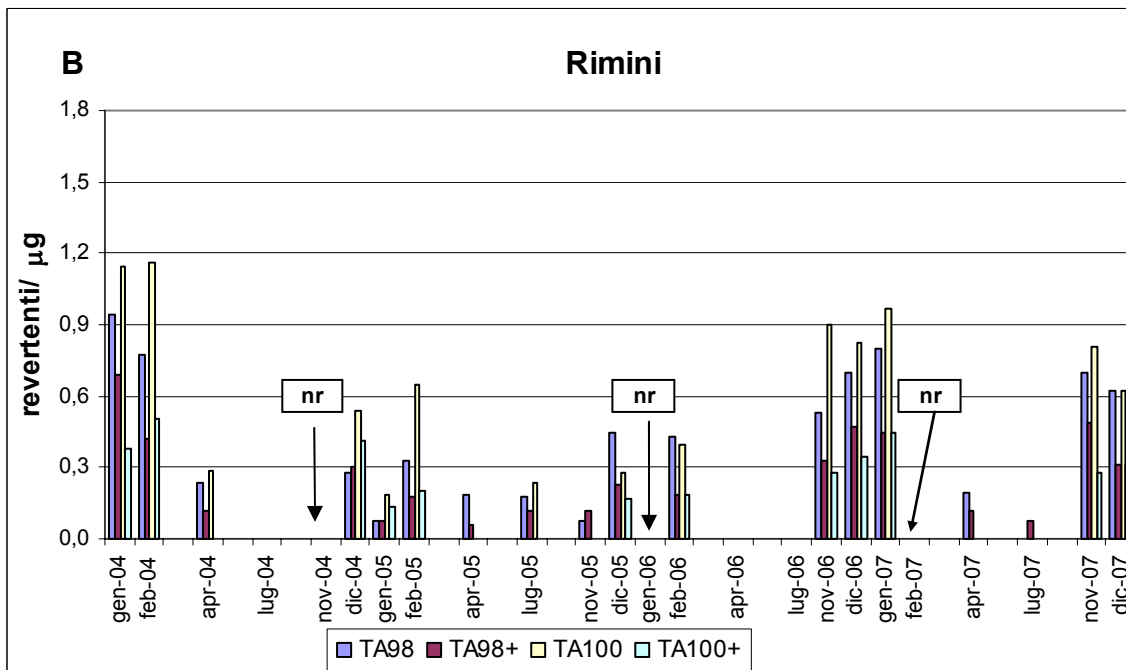
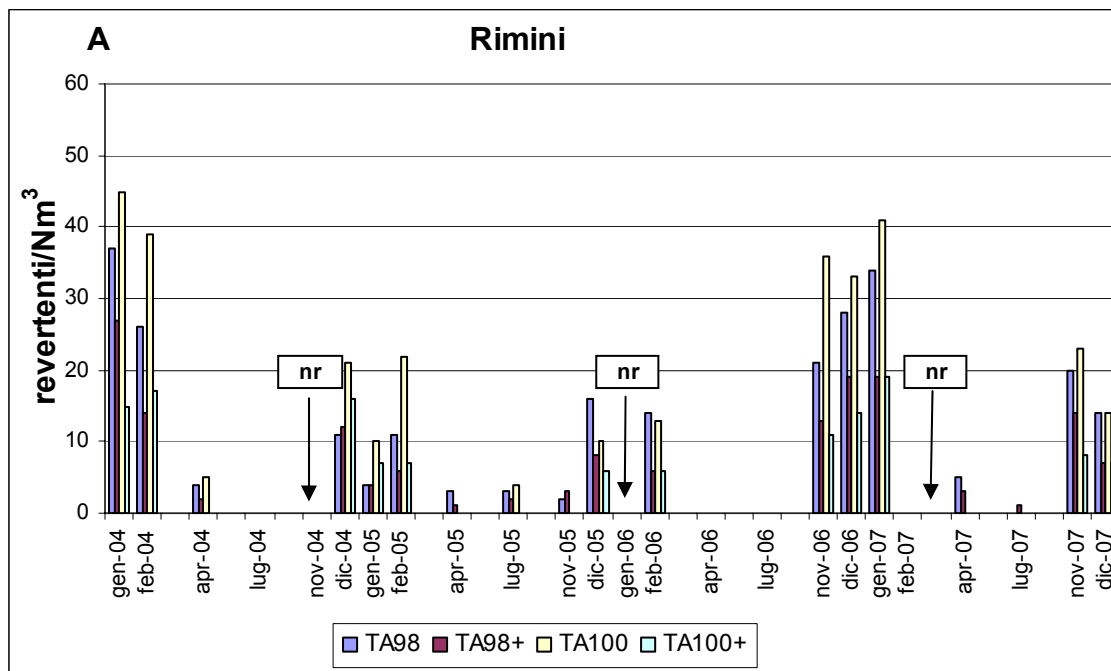


Fig.5.3.1.2 - Evoluzione temporale della genotossicità del particolato atmosferico urbano (PM_{2,5}) rilevata attraverso l'induzione di revertenti/Nm³ aria (A) e revertenti/µg polveri (B) in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 e TA100 con (+) e senza attivazione metabolica esogena.

In Fig. 5.3.1.2 si riportano gli andamenti nel tempo della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, espressa come media dei revertenti/Nm³ e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, aggiornati con i dati del 2007. Si osserva ancora una volta che, pur essendo l'andamento dei due parametri abbastanza simile (coefficiente di determinazione ottenuto mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero medio di revertenti/Nm³ = 0.5), a parità di concentrazione di polveri possono corrispondere livelli molto diversi di mutagenicità.

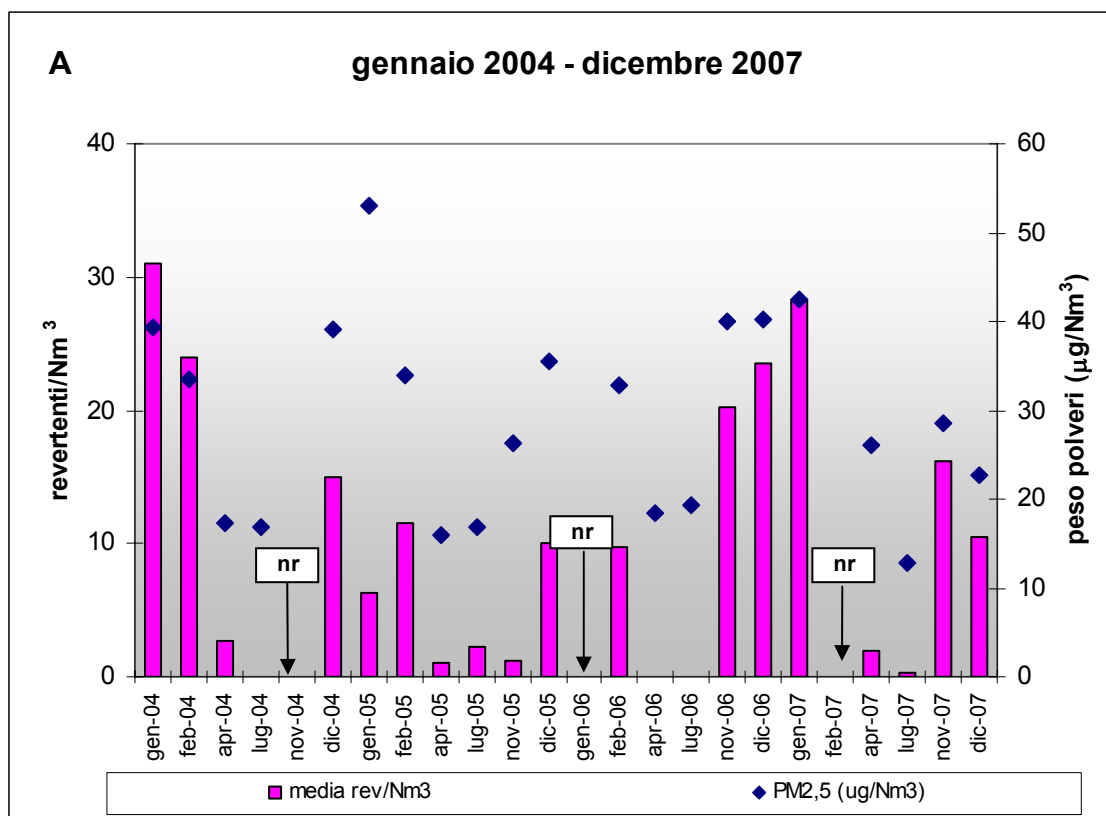


Fig.5.3.1.3 - Andamenti comparati della mutagenicità del PM_{2,5} espressa come media dei revertenti/Nm³ indotti da estratti di campioni mensili e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri.

L'evoluzione temporale delle concentrazioni degli IPA dotati di attività biologica, (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,l) pirene, dibenzo (a,e) pirene, dibenzo (a,i) pirene, dibenzo (a,h) pirene) rilevate negli stessi estratti che sono stati sottoposti a test di mutagenesi, evidenzia i valori più alti nei mesi più freddi in accordo con l'andamento della mutagenicità.

Tuttavia si ribadisce quanto già espresso in precedenza e cioè che confrontando le concentrazioni medie di IPA e l'attività mutagena del particolato non si evidenzia una corrispondenza univoca tra questi parametri, infatti a concentrazioni simili di IPA possono corrispondere valori di mutagenicità piuttosto differenti (Fig. 5.3.1.3).

Inoltre, anche nel 2007, si evidenzia un forte contributo alla mutagenicità del PM da parte di sostanze ad azione mutagena diretta (es. nitroderivati degli IPA). Infatti, come si può osservare dal grafico di Figura 5, 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.

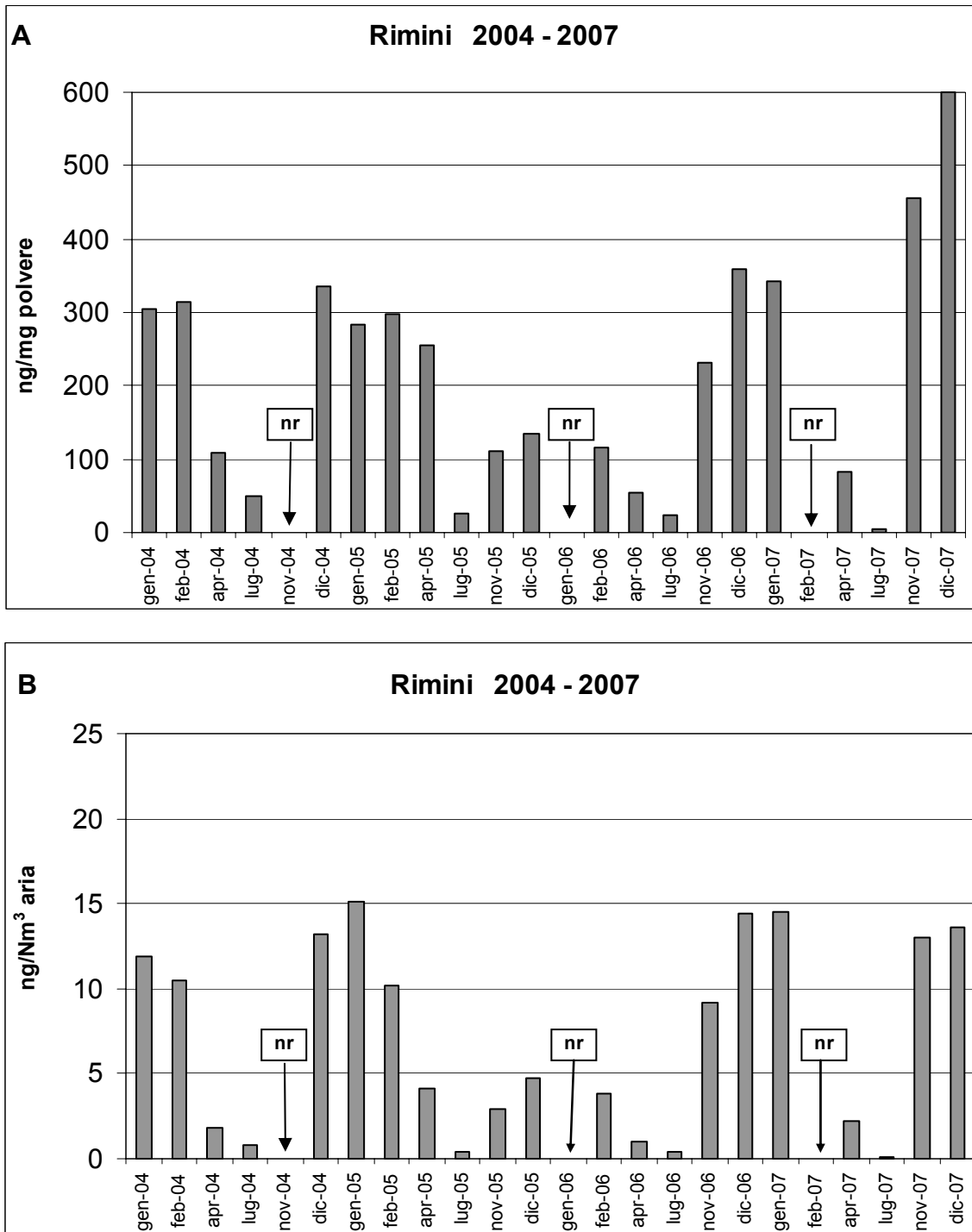


Fig. 5.3.1.4 - Concentrazioni di IPA mutageni (vedi testo) determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A) e come ng/Nm³ di aria (B), nei periodi indicati.

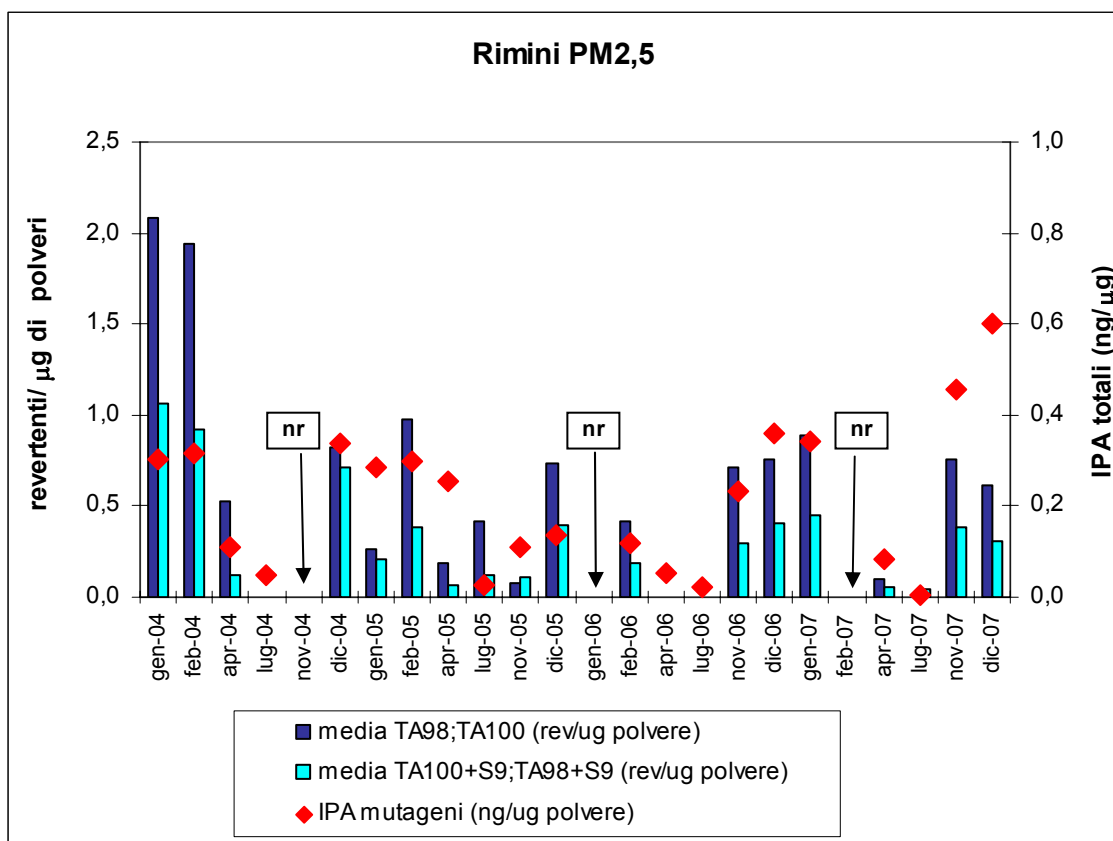


Fig. 5.1.3.5 - Comparazione dei livelli di IPA mutageni e attività genotossica determinata con i test sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+S9) e senza e attivazione metabolica nei periodi indicati.

I valori dei coefficienti di correlazione "r" ottenuti mettendo in relazione il numero di revertenti/Nm³ di aria, rilevati con i quattro test utilizzati, e le concentrazioni di CO e di NO₂, rilevate, nel periodo gennaio 2004 – dicembre 2007, nello stesso sito di campionamento del particolato (Tab. 5.3.1.1), evidenziano una discreta correlazione soprattutto con la concentrazione di CO. Questo sottolinea il contributo del traffico veicolare, alla mutagenicità del particolato atmosferico.

Revertenti/Nm ³	NO ₂ (µg/Nm ³)	CO (mg/Nm ³)
	r	r
TA98	0,5	0,7
TA98+	0,5	0,7
TA100	0,4	0,7
TA100+	0,6	0,8

Tab. 5.3.1.1 - Valori dei coefficienti di correlazione "r" ottenuti dal confronto tra le concentrazioni di CO (mg/Nm³) e di NO₂ (µg/Nm³) e i revertenti/Nm³ di aria, rilevati, in ogni test, nel periodo gennaio 2004 – dicembre 2007.

5.3.2 Test dei Micronuclei

Tutti i campioni fino ad ora sottoposti al test dei micronuclei sono risultati negativi, (Fig. 6 A) senza un evidente corrispondenza con la risposta ai test su Salmonella (Fig. 6 B). Si ricorda che, comunque, 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.

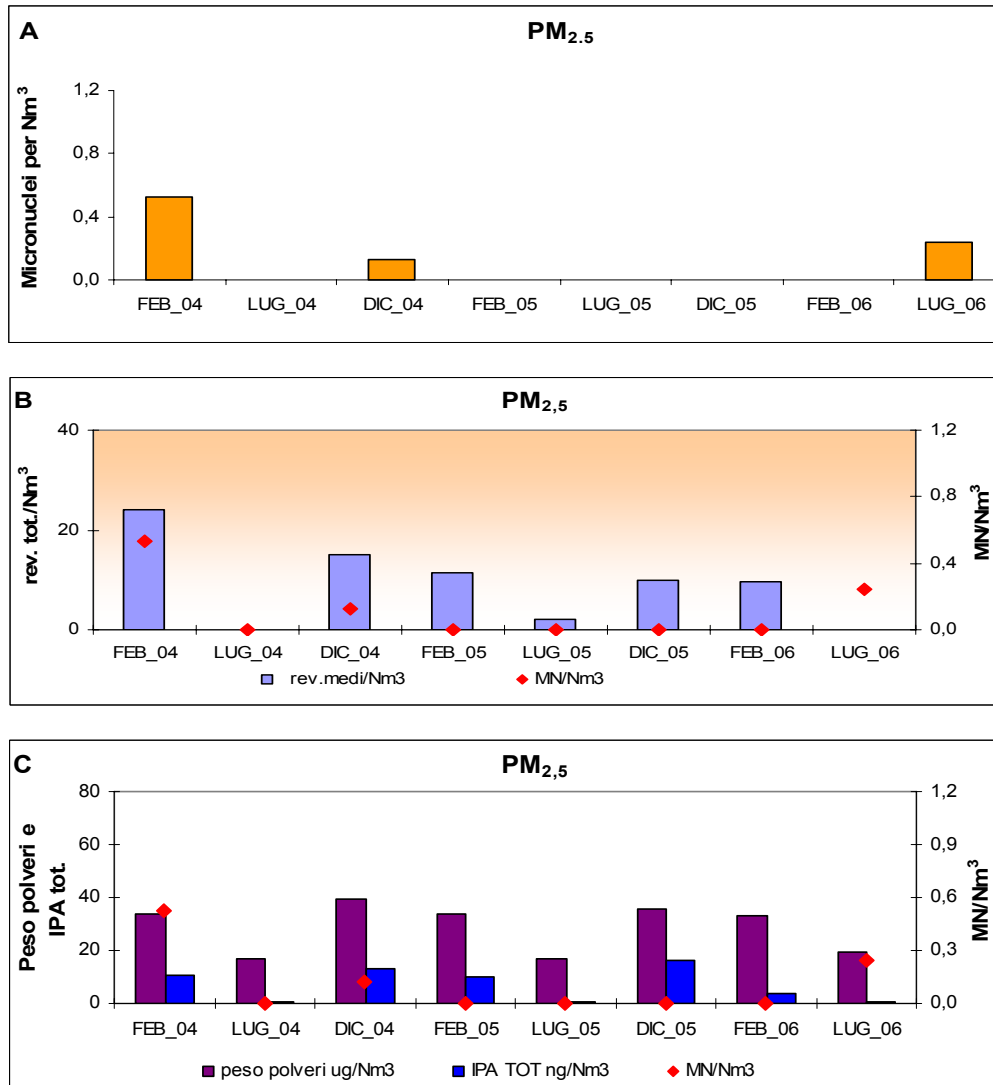


Fig. 5.3.2.1 – A: Micronuclei indotti per Nm³ di aria campionata. B: Confronto tra micronuclei indotti e revertenti totali in Salmonella per Nm³ di aria. C: Comparazione tra induzione di micronuclei, livelli di IPA totali con attività.

Come constatato nei precedenti report dai confronti fra MN, IPA e peso del particolato appare evidente come non sia facilmente imputabile ad una di queste classi di contaminanti l'aumento dei micronuclei con la dose.

Riassumendo si può riaffermare l'assenza di un trend nell'evoluzione temporale della mutagenicità associata al $PM_{2,5}$ che è dovuta al contributo di più fattori concomitanti e che risulta essere dipendente non tanto dalla concentrazione di particolato ma soprattutto dal tipo di sostanze ad esso associate. Da rimarcare è la costante presenza nei mesi più freddi, anche se a livelli diversi a seconda dei periodi e in accordo con quanto si riscontra negli altri nodi della rete regionale, di valori di mutagenicità "positivi" e "fortemente positivi" in Salmonella.

I dati derivanti dall'applicazione del test dei Micronuclei al PM confermano la complementarità dei due test utilizzati e quindi l'utilità di applicare al monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico test di mutagenesi che evidenziano la presenza di sostanze con bersagli genetici differenti.

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/mutagenesi>