



SEZIONE PROVINCIALE DI PARMA

Via Spalato, 4

43125 - Parma

E-mail: sezpr@arpa.emr.it

Laboratorio Tematico

Mutagenesi Ambientale

MONITORAGGIO
DELLA MUTAGENICITÀ DEL
PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:
RETE REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA
ANNO 2013

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.**

Parma, 02 luglio 2014

Network Team Arpa Emilia-Romagna - PM_{2,5}

Lodigiani A (Piacenza); Cassoni F, Bocchi C, Fontana F, Pinto G, Bazzini C (Parma); 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 →
Analisi in gas-massa degli IPA e loro derivati.

INDICE

INTRODUZIONE	1
---------------------------	----------

MATERIALI E METODI

<i>Campionamento ed estrazione del particolato atmosferico</i>	2
<i>Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e derivati</i>	2
<i>Test su Salmonella</i>	3
<i>Test della Cometa</i>	4
<i>Valutazione e rappresentazione dei dati</i>	5

RISULTATI

<i>Test su Salmonella</i>	6
<i>Test della Cometa</i>	15

CONCLUSIONI	16
--------------------------	-----------

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_{2,5} (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_{2,5} della rete regionale a partire dal 2008.

Sul PM campionato vengono utilizzati due test per determinarne l'attività mutagena, 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 tutti i nodi della rete, campionato a dicembre 2013 .

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>N° di residenti/comune *</i>
Piacenza Dicembre 2009	Montecucco	UTMX 552589 UTMY 4987424	103.610
Parma Febbraio 2008	Parco Cittadella	UTMX 605350 UTMY 4960980	190.522
Bologna Luglio 2008	Giardini Margherita	UTMX 686389 UTMY 4930344	385.329
Ferrara Gennaio 2009	Villa Fulvia	UTMX 709478 UTMY 4966936	134.983
Rimini Gennaio 2008	Parco Marecchia	UTMX 774209 UTMY 4879200	146.943

* Popolazione residente al 1° gennaio 2013 (<http://www.regione.emilia-romagna.it>)

MATERIALI E METODI

Campionamento ed estrazione del particolato atmosferico

I campionatori per il prelievo del particolato atmosferico con diametro aerodinamico $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) sono collocati nelle cabine della rete regionale di monitoraggio della qualità dell'aria. Il particolato è raccolto su filtri in fibra di vetro tramite campionatori sequenziali (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 derivati

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)⁺ e ai picchi isotopici ($\text{Mi}+1$)⁺.

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.

Da novembre 2010 sono stati inseriti anche l'1,6-dinitropirene e l'1,8-dinitropirene.

Ossi-IPA rilevato: 3-nitrobenzantrone.

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 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 (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. La dose massima saggiata corrisponde a 8 m³ di aria. Per ogni test (TA98 con, TA98 senza, TA100 con, TA100 senza attivazione metabolica) vengono contati i revertenti dopo circa 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C ± 1°C.

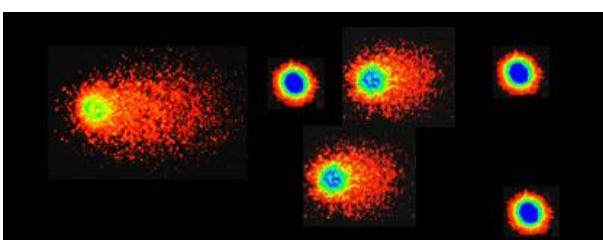
Test della Cometa

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 indicato 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 ± 1°C e 5% di CO₂. 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 saggate tre dosi in doppia replica. La dose massima saggiata corrisponde a 10 m³ 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 (intesa come 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 ≥ 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 la valutazione quantitativa dell'effetto mutageno si ricava il valore dei revertenti/m³ di aria e dei revertenti/μg di polveri dal coefficiente angolare della retta di regressione, ottenuta dal numero di revertenti riscontrati in ciascuna delle piastre per ogni dose (m³ di aria aspirata equivalenti o μg 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 dei campioni su Salmonella 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).

I confronti tra i dati ottenuti sono stati effettuati mediante pacchetto statistico SPSS 14, in specifico l'analisi statistica è stata condotta mediante Anova con test post hoc.

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 (TI%), parametro raccomandato in letteratura, che calcola la quantità di DNA migrato, rispetto al totale del 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.

Successivamente, 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.

L'estrazione dei filtri, l'esecuzione dei test di mutagenesi, l'elaborazione dei dati e la stesura del Report vengono effettuati presso la Sezione provinciale di Parma, nell'ambito delle attività del Laboratorio tematico Mutagenesi ambientale.

RISULTATI

Si riportano i risultati aggiornati al 2013.

Si ricorda che, per motivi tecnici, 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 PM di dicembre 2013.

Test su Salmonella

In tutti i nodi della rete si conferma la presenza di sostanze mutagene che seguono un andamento stagionale con valori di Fattore di Genotossicità – FG (vedi *Valutazione e rappresentazione dei dati*) più elevati, “positivi” e “fortemente positivi”, nei periodi più freddi e valori “negativi” in luglio (Tab. 2). In particolare, nel 2013, nei mesi invernali e in novembre si riscontrano valori “fortemente positivi” in tutti i nodi della rete eccetto a Parma dove in novembre, si riscontra un valore “positivo”.

Nel 2013 i valori più alti sono quelli rilevati a Piacenza.

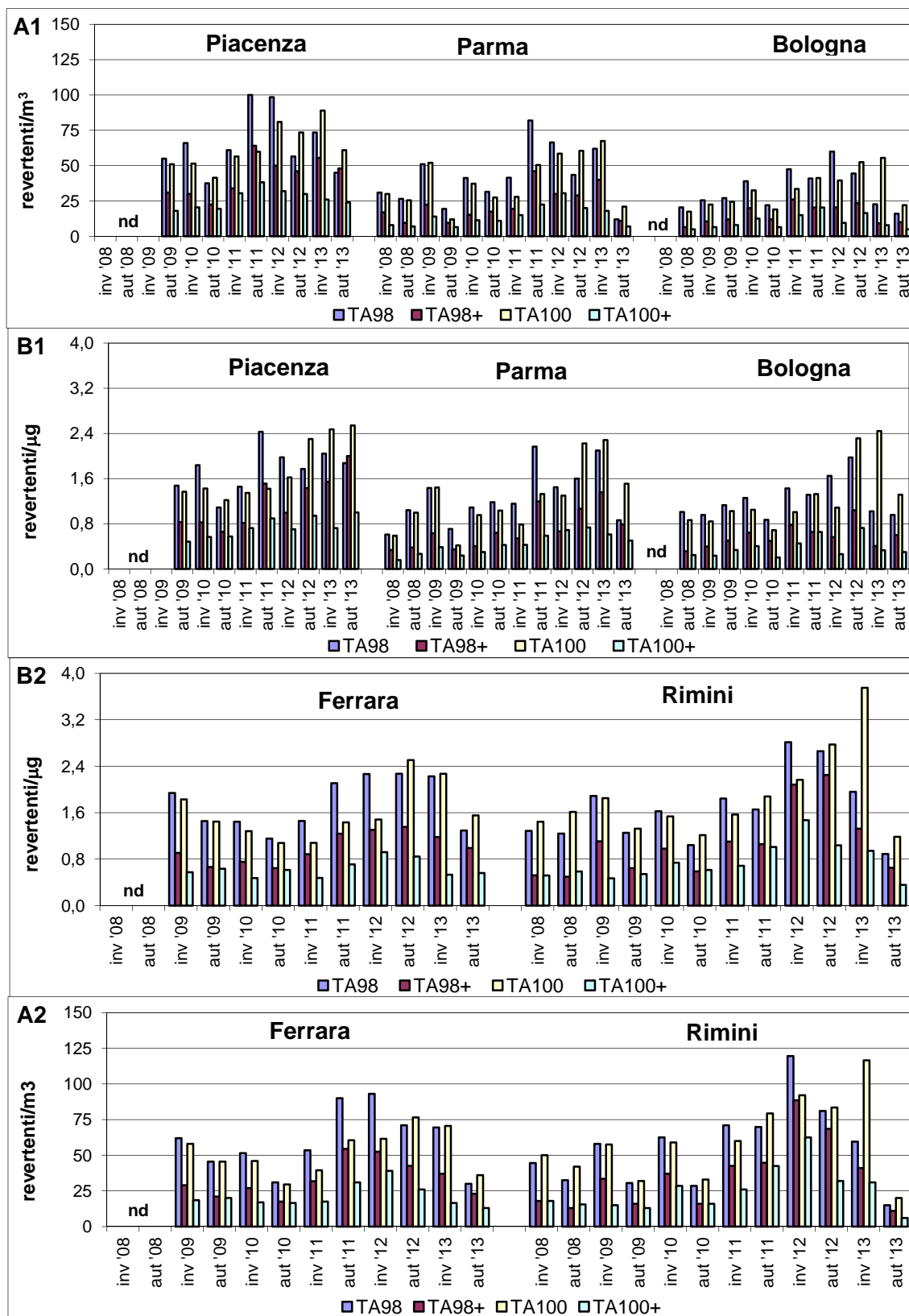
Tabella 2 – Mutagenicità del particolato atmosferico urbano (PM_{2,5}) rilevata come Fattore di Genotossicità - FG - in *Salmonella typhimurium*.

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

	PC	PR	BO	FE	RN
gen-08	nd	nd	nd	nd	36,3
feb-08	nd	24,3	nd	nd	14,8
lug-08	nd	0,5	0,1	nd	0,6
nov-08	nd	11,8	9,9	nd	14,8
dic-08	nd	30,3	15,3	nd	42,6
gen-09	nd	35,6	21,2	39,3	30,6
feb-09	nd	44,2	23,9	56,1	75,1
lug-09	nd	0,8	0,5	0,7	0,7
nov-09	nd	8,1	18,1	29,1	23,0
dic-09	49,0	19,6	28,3	47,1	26,0
gen-10	44,0	32,7	31,7	44,8	52,8
feb-10	59,5	29,9	35,9	39,8	66,2
lug-10	0,6	0,5	0,5	0,4	0,7
nov-10	18,3	14,5	9,3	16,1	7,6
dic-10	58,8	39,3	31,0	33,3	50,5
gen-11	57,9	35,7	51,6	39,7	52,6
feb-11	45,5	28,2	31,2	54,0	75,6
lug-11	0,4	0,3	0,8	0,5	0,4
nov-11	64,7	48,1	nd	38,2	71,9
dic-11	103,5	83,8	42,4	108,4	87,1
gen-12	83,2	53,2	37,8	104,7	80,9
feb-12	108,9	60,9	58,9	53,2	79,9
lug-12	0,9	1,0	0,6	0,2	0,5
nov-12	28,0	33,7	28,1	45,4	52,3
dic-12	57,8	39,1	57,0	92,1	96,0
gen-13	121,2	93,0	28,8	103,7	96,1
feb-13	50,8	43,8	19,7	39,7	47,1
lug-13	0,5	0,7	1,1	0,3	0,3
nov-13	46,7	12,1	17,3	34,8	17,2
dic-13	nd	nd	nd	nd	nd

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, 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 di aria che per microgrammo di PM (Anova, post hoc 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.

Figura 2 - Genotossicità del PM_{2.5} espressa come numero medio dei revertenti/m³ aria (A₁,A₂) e come numero medio di revertenti/μg di polveri (B₁,B₂), rilevata nelle stagioni e nei siti indicati, in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 e TA100 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: solo novembre.

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 nota, in generale, pur con diversità tra i nodi, un incremento di revertenti indotti per metro cubo di aria, a partire dall’autunno 2011 rispetto agli stessi periodi degli anni precedenti. Occorre tenere in considerazione che per quanto riguarda l’autunno 2013, mancando il dato di dicembre, il numero dei revertenti potrebbe essere sottostimato.

Inoltre confrontando le città fra loro risulta che il particolato raccolto a Bologna e a Parma tende ad essere il meno mutageno, mentre quello di Piacenza e Rimini risulta il più positivo, sia per metro cubo di aria che per microgrammo di PM (Anova, post hoc Tukey $p < 0.05$).

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.

revertenti/m ³					
	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

La maggiore mutagenicità 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 maggiore attività mutagena

specifica del PM_{2,5}, cioè il numero di revertenti indotti per microgrammo di particolato (Tab.4, Fig. 2B), che ad una maggiore concentrazione (microgrammi per metro cubo di aria) dello stesso (Tab.5, Fig.3) ma non sempre i due fattori incidono in egual misura.

Tabella 4 - Valori medi dei revertenti indotti per microgrammo di polveri (PM_{2,5}), ricavati dai valori dei revertenti per metro cubo di aria in base alla concentrazione del PM_{2,5}.

revertenti/µg					
	Piacenza	Parma	Bologna	Ferrara	Rimini
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

Dal grafico riportato in Figura 4 si evidenzia che l'andamento dei due parametri è confrontabile, come si può constatare anche dalla Tabella 6, dove si riportano i valori dei coefficienti di determinazione (R^2) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero medio di revertenti/m³ aria, rilevati nell'intero periodo di campionamento. Infatti si evidenzia, almeno per alcuni nodi della rete, una discreta correlazione tra concentrazioni di PM_{2,5} e numero medio dei revertenti indotti per metro cubo di aria, con valori di R^2 intorno allo 0,7. Tuttavia, non sempre a una maggiore concentrazione di PM_{2,5} corrisponde un numero maggiore di revertenti indotti per metro cubo di aria (Fig.3), sottolineando la rilevanza della tipologia e della quantità delle sostanze mutagene associate al PM. Infatti, a volte, sul numero di revertenti/m³ incide

maggiormente l'attività mutagena specifica del PM (Tab.4; Fig.2B) della concentrazione in atmosfera dello stesso.

Tabella 5 e Figura 3 - Concentrazioni, medie mensili, di particolato atmosferico (PM_{2,5} µg/m³).

Tabella 5

	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	29,1	21,84
dic-09	37,31	29,80	23,48	33,1	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

Figura 3

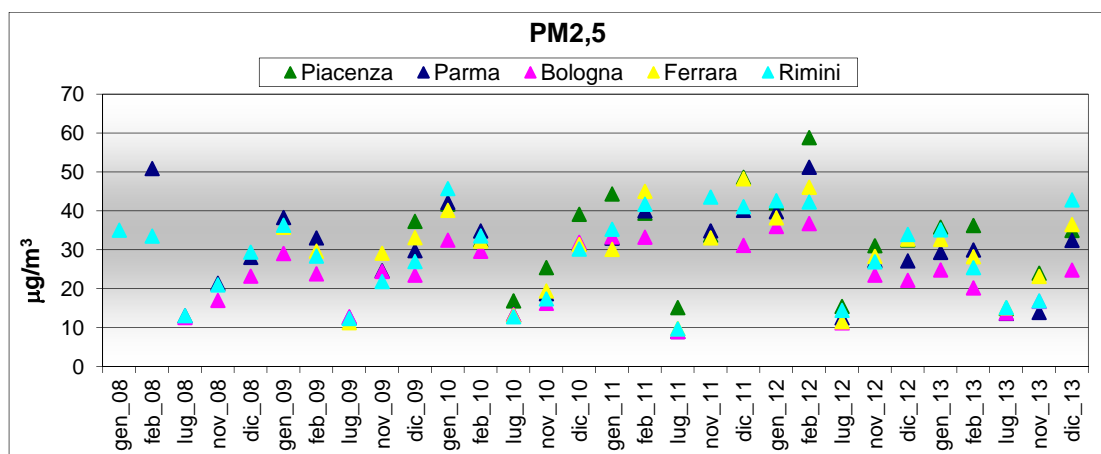
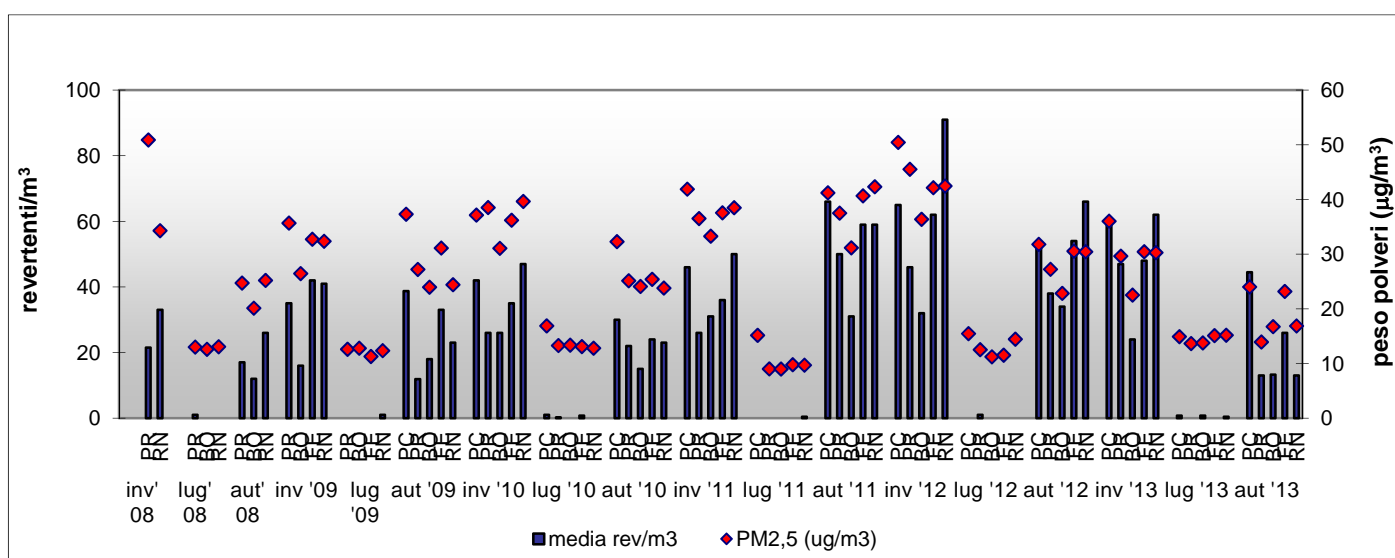


Tabella 6 - Valori dei coefficienti di determinazione (R^2) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero medio di revertenti/m³ aria rilevati nei siti indicati da inizio campionamento (vedi Tab.1) a novembre 2013.

R^2	
Piacenza	0,66
Parma	0,53
Bologna	0,70
Ferrara	0,69
Rimini	0,69

Figura 4 - Andamenti comparati della mutagenicità del PM_{2,5}, (media stagionale dei revertenti/m³) e delle concentrazioni (medie stagionali) delle polveri, nei siti indicati.
Inverno: media gennaio-febbraio; autunno: media novembre-dicembre.

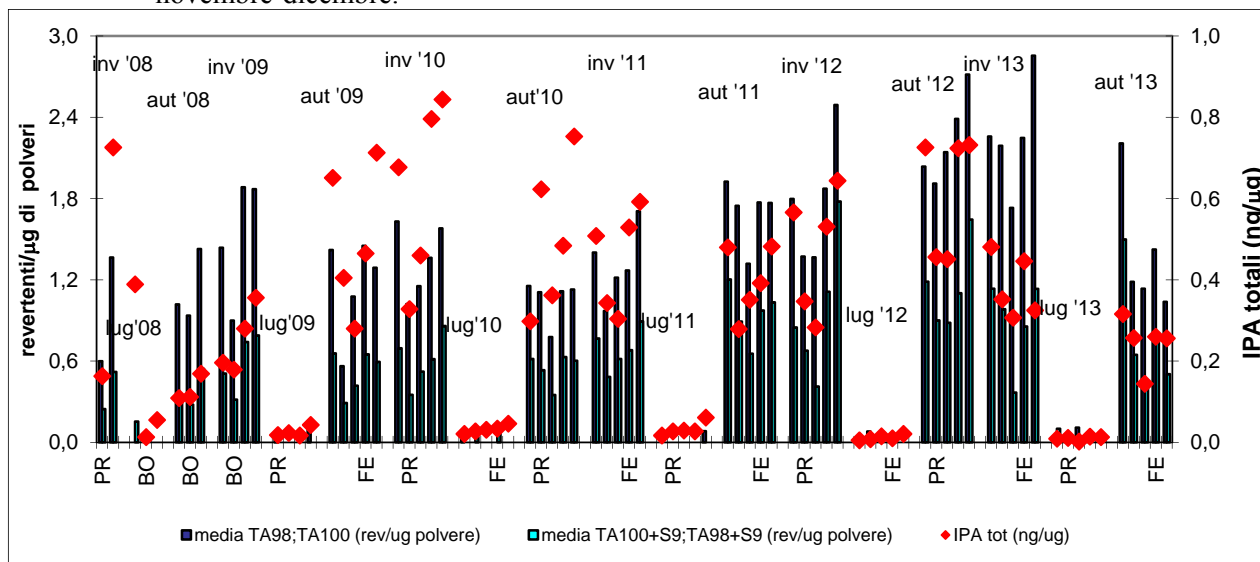


**nb: Parma inverno '08: solo febbraio; Piacenza autunno '09: solo dicembre;
Bologna autunno '11: solo dicembre; tutti i nodi: autunno 2013: solo novembre.**

Considerando i dati come medie stagionali (Fig. 5), dal confronto tra le concentrazioni di IPA dotati di attività biologica (Σ 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), pur avendo lo stesso andamento stagionale, si conferma che le concentrazioni più alte di IPA non sempre corrispondono all'attività mutagena più alta del PM, confermando un forte contributo alla mutagenicità da parte anche di altre sostanze.

Si fa presente 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.

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



**nb: non determinati: PR gennaio '08, BO gennaio, febbraio '08 e novembre '11, tutta la rete dicembre'13;
 inizio campionamento a FE: gennaio '09;
 inizio campionamento a PC: dicembre '09.**

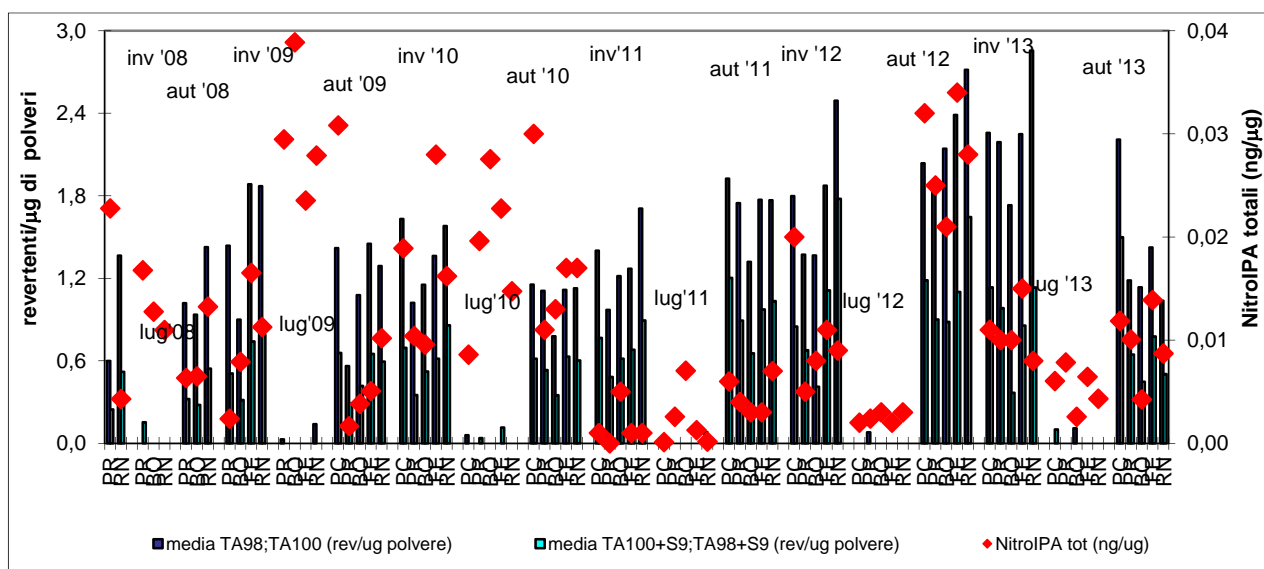
In Figura 6 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni medie stagionali di Nitro-IPA compreso l'unico Ossi-IPA rilevato, il 3-nitrobenzantrone, con l'attività mutagenica del particolato, riportata sia come media dei revertenti indotti in assenza di attivazione metabolica che come 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".

In generale, non si riscontra nemmeno corrispondenza tra la maggiore attività mutagenica diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA, confermando il contributo di altre sostanze alla mutagenicità del PM. Occorre tenere in considerazione nei confronti tra il numero dei revertenti indotti e le concentrazioni di Nitro-IPA che i valori in assoluto di queste ultime sono molto molto bassi, rispetto a quelli dei revertenti. Per quanto riguarda la concentrazione dei Nitro-IPA, non si osserva la stessa stagionalità evidenziata per gli IPA e, a questo proposito, si ricorda che questi

composti sono anche prodotti secondari degli IPA, che si formano in atmosfera in seguito a reazioni fotochimiche.

Si ricorda che, a partire da luglio 2009 è stato inserito nell'elenco dei Nitro-IPA rilevati, il 9-nitrofenantrene e, da novembre 2010 anche l'1,6-dinitropirene e l'1,8-dinitropirene. Si ricorda che i dati relativi al 2-nitrofluorene, a partire da novembre 2010, non sono stati elaborati in quanto il composto risulta interferito.

Figura 6 - Confronto tra livelli medi mensili dei Nitro-IPA riportati nel testo, compreso il 3-nitrobenzantrene, 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: non determinati: PR gennaio '08, BO gennaio, febbraio '08 e novembre '11, tutta la rete dicembre'13;
 inizio campionamento a FE: gennaio '09;
 inizio campionamento a PC: dicembre '09.
 non riportato il dato del 2-nitrofluorene a partire dall'autunno 2010**

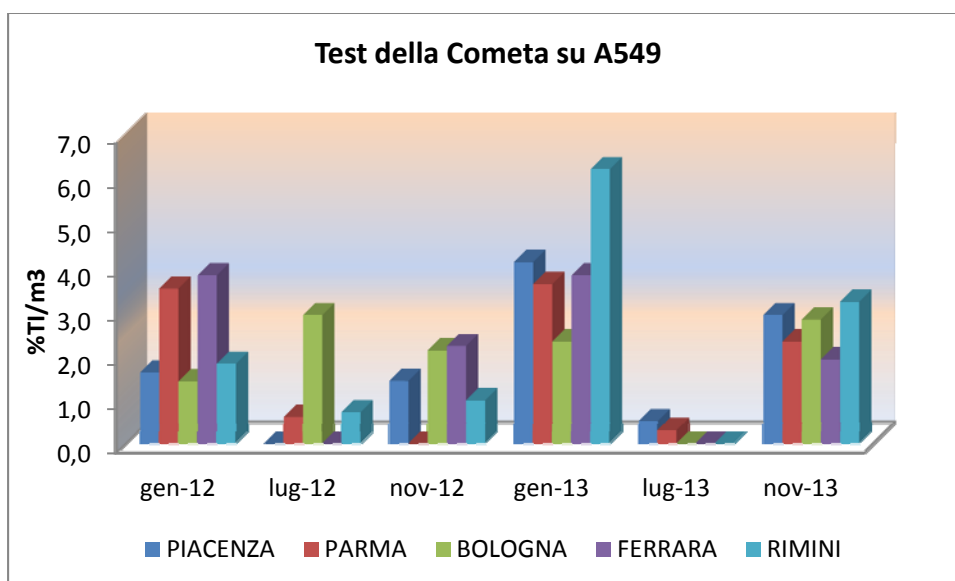
Test della Cometa

Si ricorda che essendo modificato, da gennaio 2012, “l’organismo” utilizzato ma, soprattutto, i tempi di incubazione (24 ore anziché 1 ora), i risultati ottenuti con le A549 non sono confrontabili con i precedenti ottenuti con i leucociti da sangue periferico di donatori sani. Di seguito si presentano i risultati aggiornati al 2013.

In Figura 7 vengono riportati i valori del danno indotto per metro cubo di aria, ricavati dai coefficienti angolari delle rette di regressione dose/effetto dei campioni positivi o con $R^2 > 0,6$. Considerando il periodo riportato hanno causato danno al DNA delle cellule A549 tutti i campioni di gennaio e quelli di novembre (sia 2012 che 2013), eccetto Parma novembre 2012 e i campioni di luglio 2012 di Parma, Bologna e Rimini; mentre tutti i campioni di luglio 2013 sono risultati negativi. Questo evidenzia la presenza, nel PM, di sostanze in grado di indurre rotture a singolo e a doppio filamento nel DNA e per alcuni siti anche nel mese di luglio 2012 quando, invece, sono negativi i test su Salmonella. Nel 2013, invece, la positività riscontrata con il test della Cometa è sovrapponibile a quella riscontrata con i test su Salmonella.

Per quanto riguarda il 2013, nessun campione ha indotto effetto tossico sulle cellule subito dopo il trattamento (mortalità cellulare $> 30\%$), mentre tutti i campioni di gennaio eccetto quello di Bologna e tutti i campioni di novembre, 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 7 – 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.



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, nel 2013, si riscontra, per tutti i siti di campionamento, anche nella genotossicità evidenziata con il test della Cometa sulle cellule A549.

Nei test condotti su Salmonella, escludendo il mese di luglio, si osserva in generale, una tendenza a valori di mutagenicità più elevati, nel periodo autunno 2011 – inverno 2013.

Le differenze nel livello della mutagenicità (numero di revertenti indotti 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 attività mutagena specifica del PM_{2,5}, cioè al numero di revertenti indotti per microgrammo di particolato, che ad una maggiore concentrazione (microgrammi per metro cubo di aria) dello stesso, ma non sempre i due fattori incidono in egual misura nei diversi nodi e nei diversi periodi, sottolineando che, a volte, ha maggior rilevanza la tipologia e la quantità delle sostanze mutagene associate al PM rispetto alla sua concentrazione in atmosfera.

Dai dati relativi al confronto tra IPA e attività mutagena del particolato, rilevata con i test su Salmonella, pur essendoci la stessa stagionalità, si evidenzia discrepanza tra le concentrazioni più alte di IPA e i valori più alti di revertenti indotti. Si conferma anche, che il maggior contributo alla mutagenicità del PM è dato da sostanze ad azione mutagena diretta, cioè sostanze che possono agire direttamente sul DNA, ma che per lo più non appartengono ai derivati degli IPA rilevati. Questo lo si evidenzia dalla mancata corrispondenza tra la maggiore attività mutagena diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA che si rileva nel periodo considerato.

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.

Per quanto riguarda il danno genotossico, rilevato con il test della Cometa, la positività in questo test nel 2013 risulta sovrapponibile a quella rilevata su Salmonella per tutti i nodi della rete. Si ricorda ancora che, 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 sangue periferico di donatori sani.

L'utilizzo di test con end point genetici diversi permette di ampliare le informazioni sui possibili danni al DNA provocati dal PM, risultando un utile strumento per verificarne in modo più completo l'eventuale genotossicità, e quindi pericolosità per la popolazione esposta.

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