



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 2014

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, 05 giugno 2015

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, Mingozzi 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>	17
CONCLUSIONI	20

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.

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.

Si riportano di seguito i risultati aggiornati al 2014.

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>
Piacenza Dicembre 2009	Montecucco	UTMX 552589 UTMY 4987424	102,651
Parma Febbraio 2008	Parco Cittadella	UTMX 605350 UTMY 4960980	188,792
Bologna Luglio 2008	Giardini Margherita	UTMX 686389 UTMY 4930344	384,202
Ferrara Gennaio 2009	Villa Fulvia	UTMX 709478 UTMY 4966936	133,384
Rimini Gennaio 2008	Parco Marecchia	UTMX 774209 UTMY 4879200	147,215

* Popolazione residente al 1° gennaio 2014 (<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 a livello di una o poche coppie di basi nel DNA (mutazioni puntiformi) di due diversi tipi; 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. 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 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

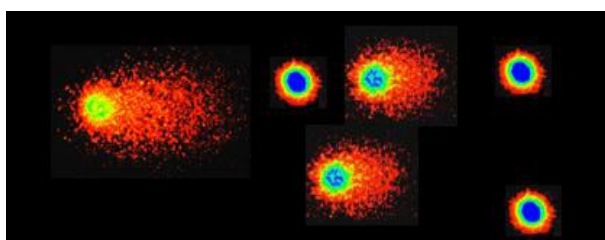
Test della Cometa

Il Test della Cometa 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 questo test 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 i precedenti, consultabili all'indirizzo internet: http://www.arpa.emr.it/dettaglio_generale.asp?id=3020&idlivello=1680

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, in termostato a +37°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 saggiate 3 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 (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 l'analisi quantitativa 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 riassumere l'effetto mutageno dei test effettuati su Salmonella si utilizza il Fattore di Genotossicità che si ottiene sommando i risultati dei quattro test, 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 (TI%), questo parametro è ampiamente usato in letteratura e 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: una dose viene definita "tossica" e non viene quantificata la genotossicità quando la mortalità cellulare supera il 30%. Inoltre, durante la fase di valutazione del danno, viene quantificata 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, mentre la differenza fra i revertenti, ottenuti nei test su Salmonella con e senza attivazione metabolica, è stata verificata con t di Student appaiato.

RISULTATI

Si riportano i risultati aggiornati all'anno 2014.

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, come mesi autunnali, novembre e dicembre. Su tutti i campioni viene eseguito il test di reversione batterica su Salmonella, mentre il test della Cometa, su linee cellulari umane, 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.

Test su Salmonella

Nel 2014 nei mesi invernali e autunnali di tutti i nodi della rete si riscontrano valori “fortemente positivi” eccetto a Bologna dove in novembre si riscontra un valore “positivo”. Ciò 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).

Nel 2014 il valore più alto è quello relativo al particolato campionato a Rimini in gennaio.

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

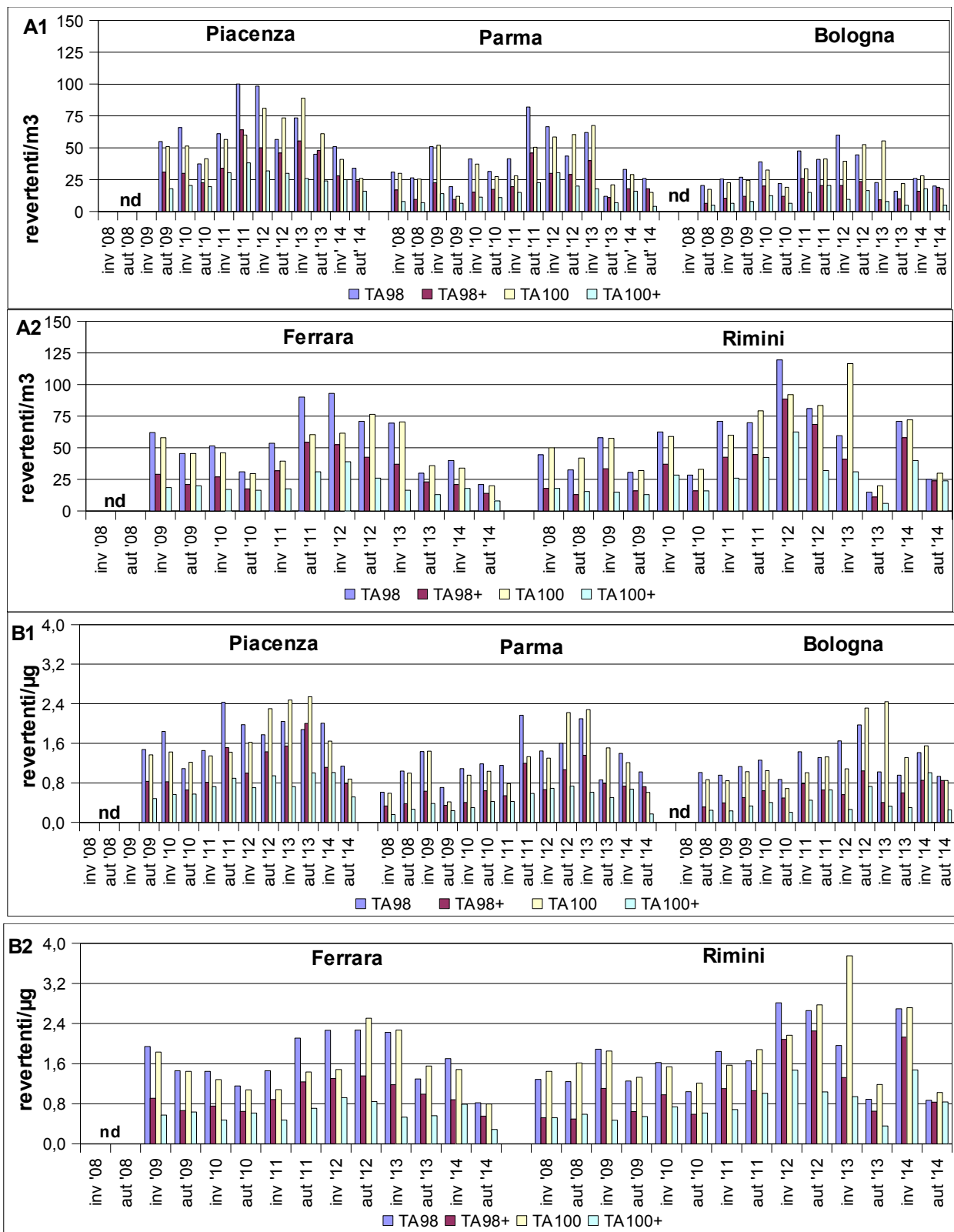
nei test condotti in assenza di attivazione metabolica in entrambi i ceppi, sia considerando i revertenti per metro cubo che per microgrammo di aria aspirata (t di Student, $p < 0,001$), evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta (Fig. 2 A,B) cioè che possono agire sul DNA direttamente senza essere metabolizzate.

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

Intervalli di positività	Giudizio
$FG \leq 1,4$	negativo
$1,5 \leq FG \leq 2,9$	debolmente positivo
$3,0 \leq FG \leq 14,9$	positivo
$FG \geq 15,0$	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
gen-14	61,3	49,3	33,6	42,4	92,4
feb-14	46,1	21,6	21,6	39,2	62,2
lug-14	0,8	0,5	1,0	0,3	0,6
nov-14	33,0	26,7	14,4	17,5	16,0
dic-14	23,9	15,7	21,4	19,4	37,5

Figura 2 - Genotossicità del PM_{2,5} espressa come numero medio di revertenti per metro cubo d'aria (A₁,A₂) e per microgrammo 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 nel periodo autunno 2011– inverno 2013, rispetto ai periodi autunnali precedenti e successivi (Anova, *post hoc* di Tukey $p < 0.05$). Si ricorda che, per quanto riguarda l’autunno 2013, mancando il dato di dicembre, il numero dei revertenti potrebbe essere sottostimato.

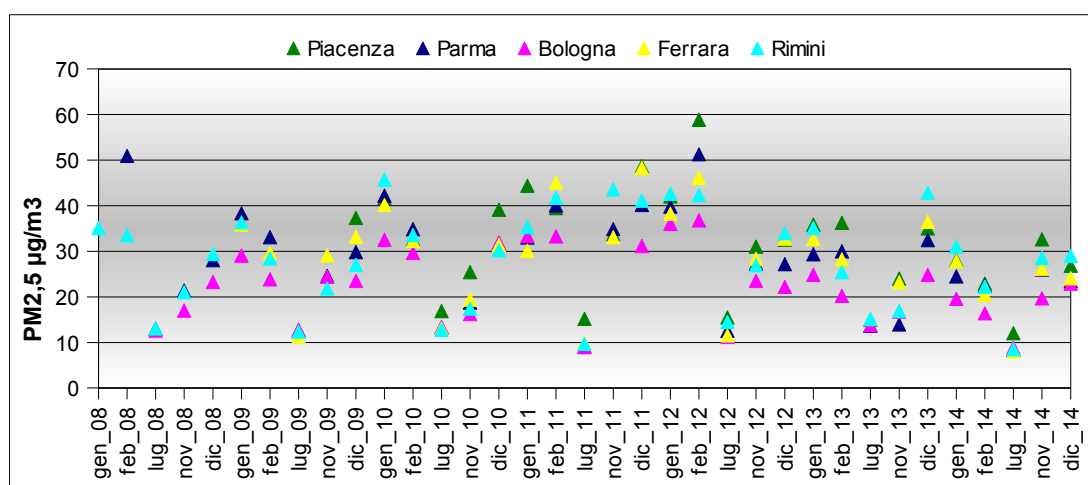
Tabella 3 - Valori medi dei revertenti indotti per metro cubo di aria, calcolati dalle rette di regressione dose/effetto, nei quattro test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con e senza attivazione metabolica esogena, nei mesi e nei siti indicati.

	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
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	24	17	13	31

Mettendo a confronto i diversi nodi della rete anche quest'anno si conferma che l'attività mutagena, determinata sia per metro cubo che per microgrammo di aria equivalente, è maggiore nel PM_{2,5} raccolto a Piacenza e Rimini rispetto a quello di Bologna e di Parma (Anova, *post hoc* Tukey $p < 0.05$).

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_{2,5} (microgrammi per metro cubo di aria) (Fig.3, Tab.4,) che ad una diversa attività mutagena 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.

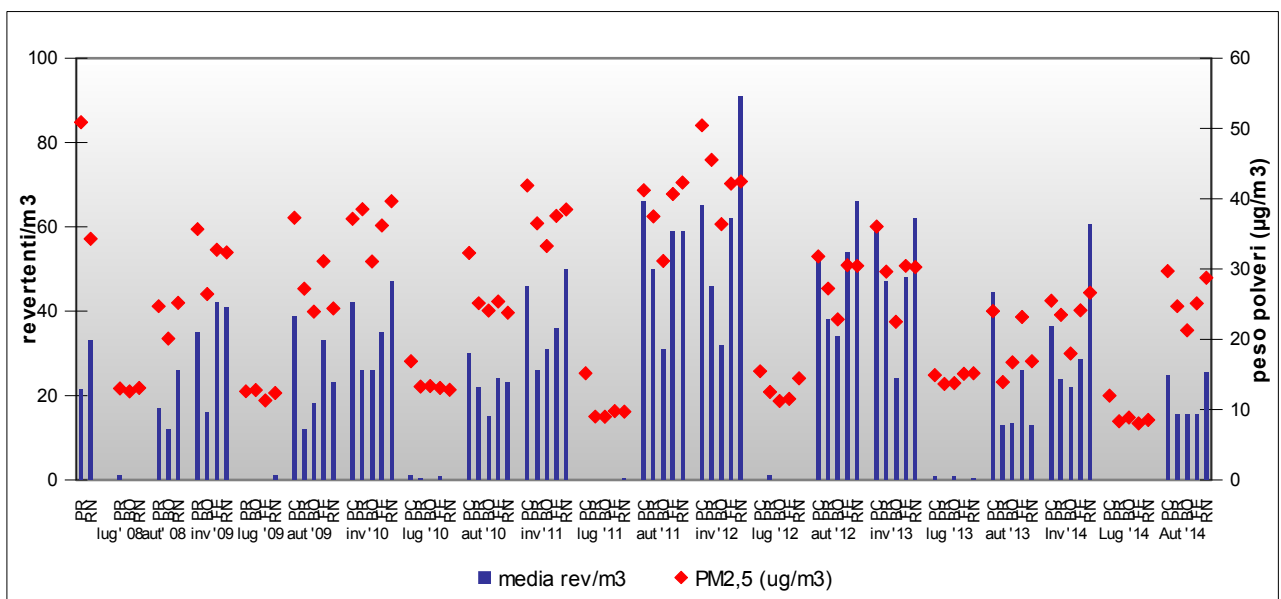
Figura 3 - Concentrazioni, medie mensili, di particolato atmosferico (PM_{2,5} µg/m³)



Dal grafico in Figura 4 dove sono riportati gli andamenti comparati della mutagenicità del PM_{2,5}, (media stagionale dei revertenti/m³) e delle concentrazioni (medie stagionali) delle polveri, 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 (R²) 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 i due parametri con valori di R² 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.4), sottolineando la rilevanza anche della tipologia e della quantità relativa delle sostanze mutagene associate al PM. Infatti, a volte, sul numero di revertenti/m³ può incidere

maggiormente l'attività mutagenica specifica del particolato (Tab.5; Fig.2B) rispetto alla sua concentrazione in atmosfera. 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/m³, negli anni, è emerso che non tutte le stagioni in cui vi è la più alta concentrazione di PM_{2,5} (inverno 2008, 2010, 2011, 2012, autunno 2011) corrispondono ai periodi in cui si riscontrano un maggior numero di revertenti/m³ (autunno 2011, 2012, inverno 2012, 2013).

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.**

Per quanto riguarda il confronto tra le concentrazioni di PM_{2,5} (Fig.3, Tab.4), rilevate nei diversi nodi della rete nel periodo riportato, quelle rilevate a Piacenza, Ferrara e Rimini sono simili fra loro e maggiori di quelle riscontrate a Bologna, mentre Parma si colloca fra tutte le città.

Tabella 4 - Concentrazioni, medie mensili, di particolato atmosferico (PM_{2,5} µg/m³).

	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
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

Tabella 5 - 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	md	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

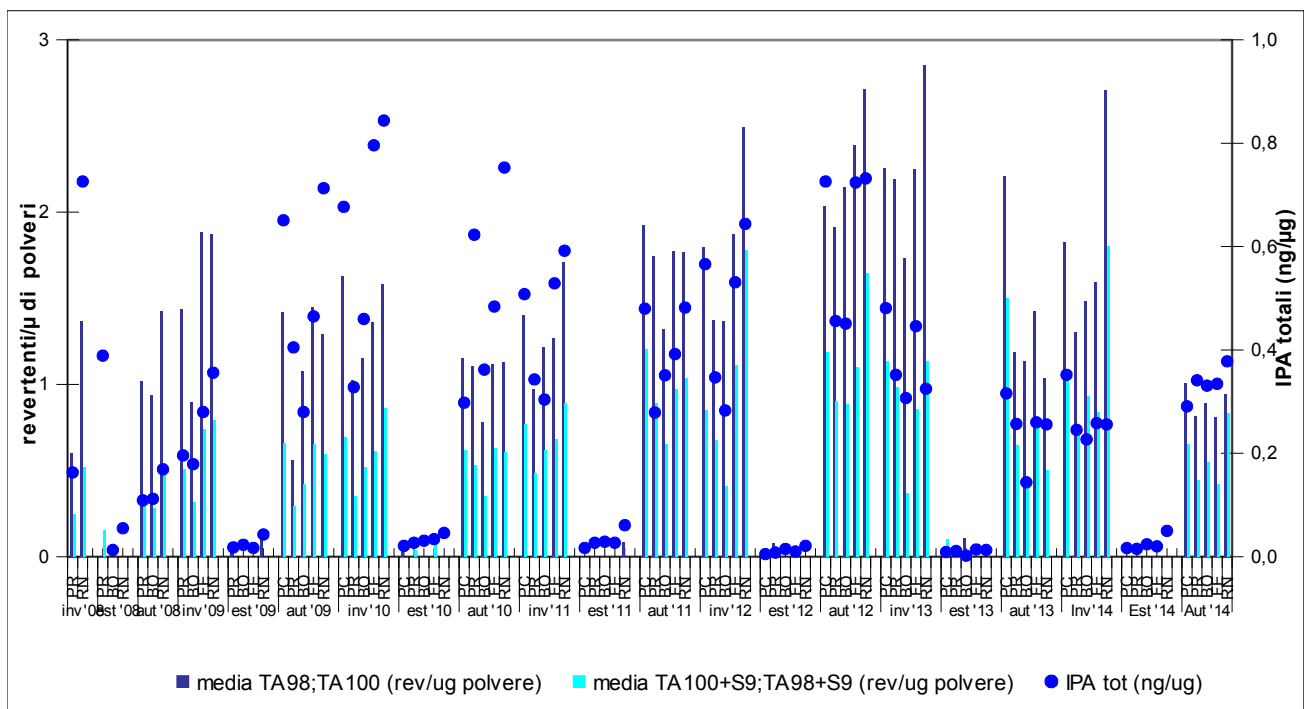
Tabella 6 - Valori dei coefficienti di determinazione (R^2) ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero medio di revertenti/m³ aria rilevati nei siti indicati da inizio campionamento a dicembre 2014.

R^2	
Piacenza	0,68
Parma	0,55
Bologna	0,68
Ferrara	0,70
Rimini	0,66

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 mutagenica più alta del PM, confermando un forte contributo alla mutagenicità da parte anche di altre sostanze.

Considerando gli IPA totali non c'è differenza fra le loro concentrazioni (ng/μg di polveri campionate) invernali ed autunnali, ma si evidenzia che sono maggiormente associati al particolato raccolto a Rimini e Piacenza rispetto a quello di Bologna.

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.

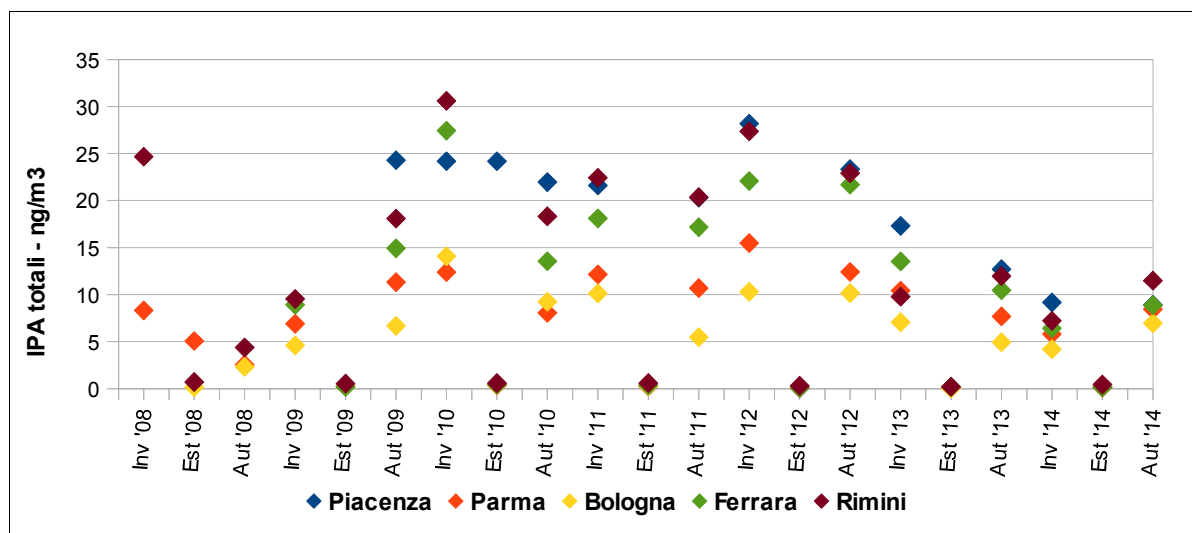


**nb: non determinati: PR gennaio '08, BO gennaio, febbraio '08 e novembre '11, tutta la rete dicembre'13;
 inizio campionamento a FE: gennaio '09;
 inizio campionamento a PC: dicembre '09.**

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.

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/m³), rilevate nei periodi e nelle città indicati.



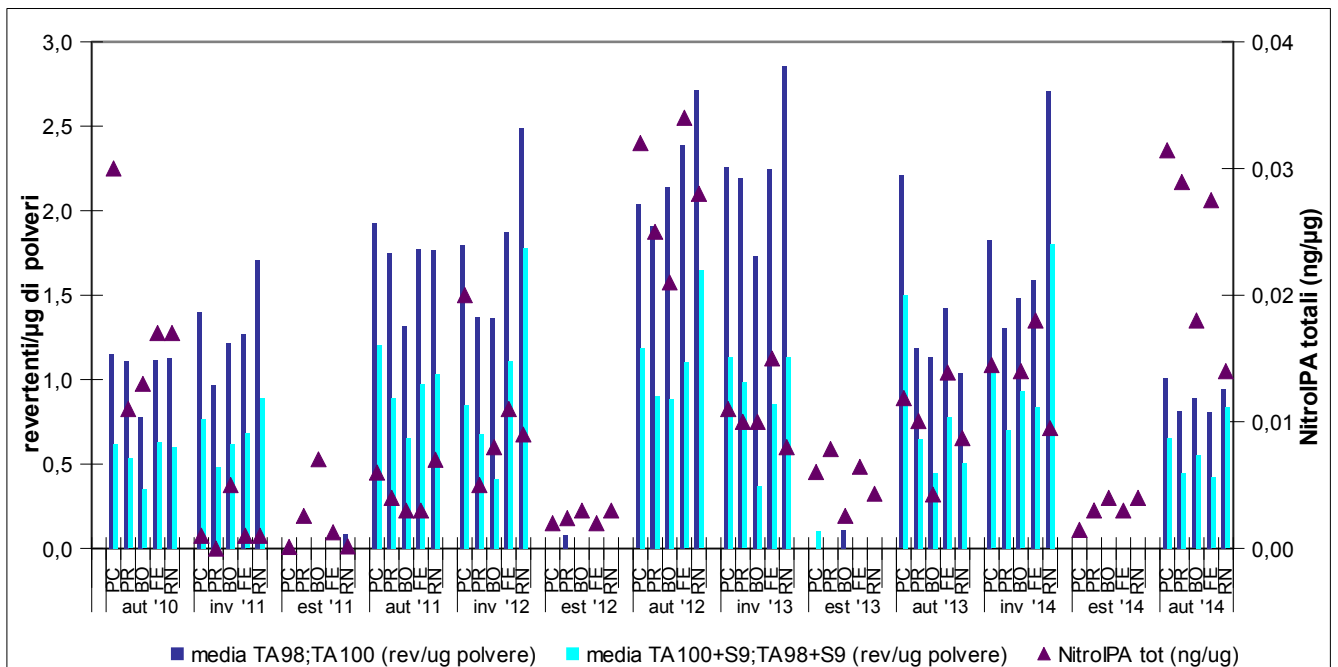
In Figura 7 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni medie stagionali di Nitro-IPA compreso l'unico Ossi-IPA rilevato, il 3-nitrobenzantrone, con l'attività mutagena del particolato, riportata sia come media dei revertenti indotti in assenza di attivazione metabolica che come 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 6 vengono riportati i dati a partire dall'autunno 2010.

In generale, non si riscontra corrispondenza tra la maggiore attività mutagena 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 $p < 0.05$).

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.

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: non determinati: BO novembre '11, tutta la rete dicembre'13.

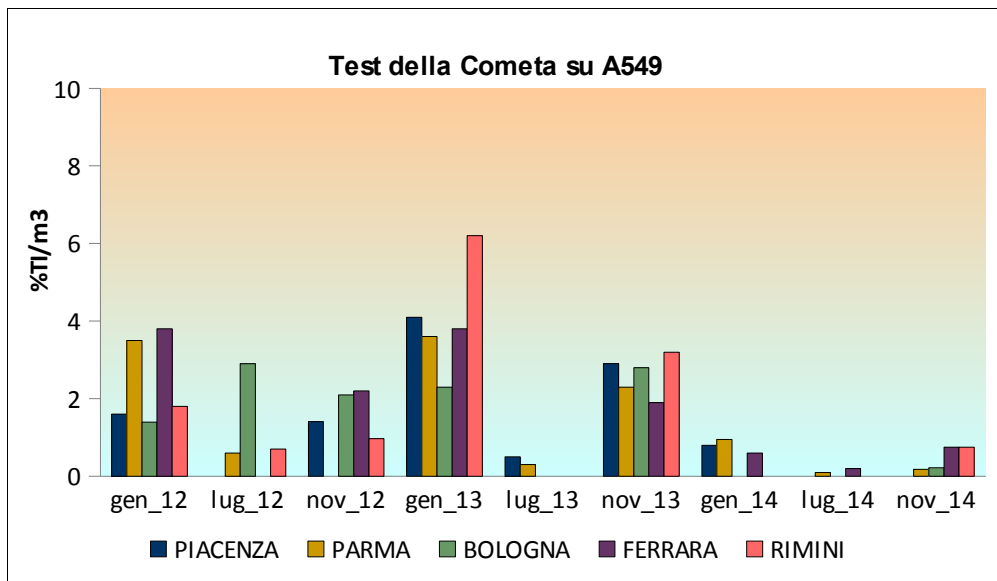
Test della Cometa

In Figura 8 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 $R^2 > 0,6$.

Nel 2014 sono risultati positivi i campioni di gennaio di Piacenza, di Parma e di Ferrara e quelli di novembre di Ferrara e di Rimini, mentre tutti i campioni di luglio sono risultati negativi.

Per quanto riguarda il 2014 nessun campione ha indotto effetto tossico sulle cellule subito dopo il trattamento (mortalità cellulare $> 30\%$), mentre i campioni di novembre di Parma, Bologna e Ferrara e per Parma e Ferrara anche quello di gennaio, 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.

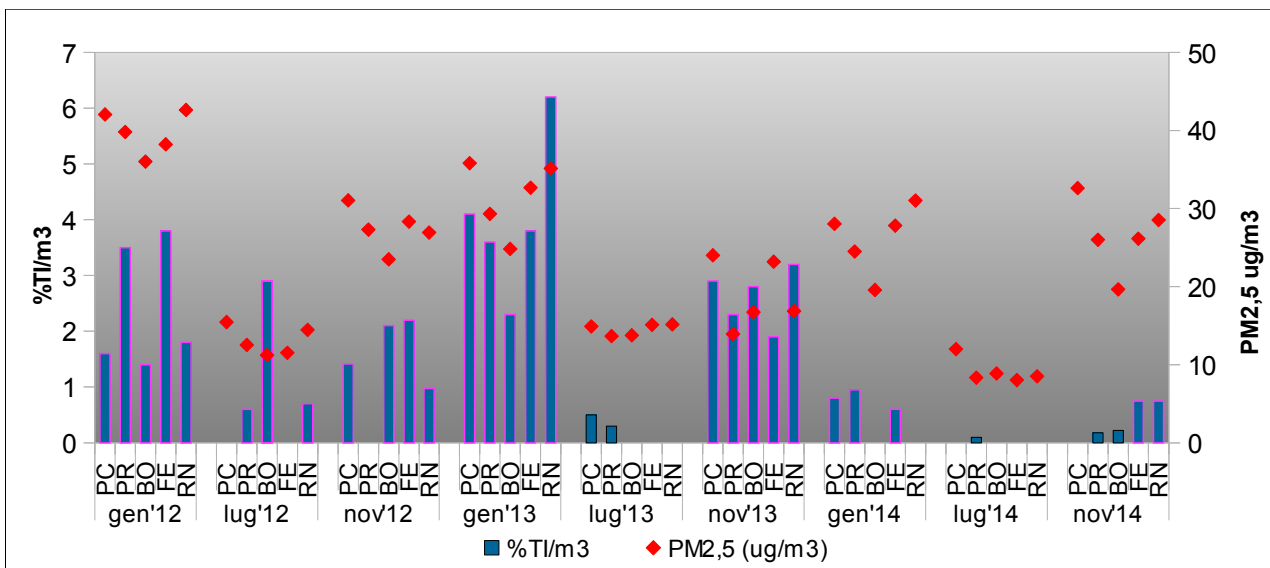


Considerando tutto il periodo riportato si nota, nel 2014, una riduzione del danno al DNA delle cellule A549, espresso come TI% per metro cubo di aria, da parte di quasi tutti i campioni rispetto ai periodi precedenti, come già riscontrato anche per la mutagenicità espressa come numero di revertenti indotti per metro cubo di aria, rilevata con i test su Salmonella.

In particolare considerando il TI% per metro cubo di aria rilevato nei diversi mesi non si è riscontrata una differenza significativa fra le città, mentre è evidente, e statisticamente significativo, il maggior danno indotto nei mesi gennaio 2012 e 2013 e novembre 2013 rispetto a luglio 2013 e a tutti i campioni del 2014.

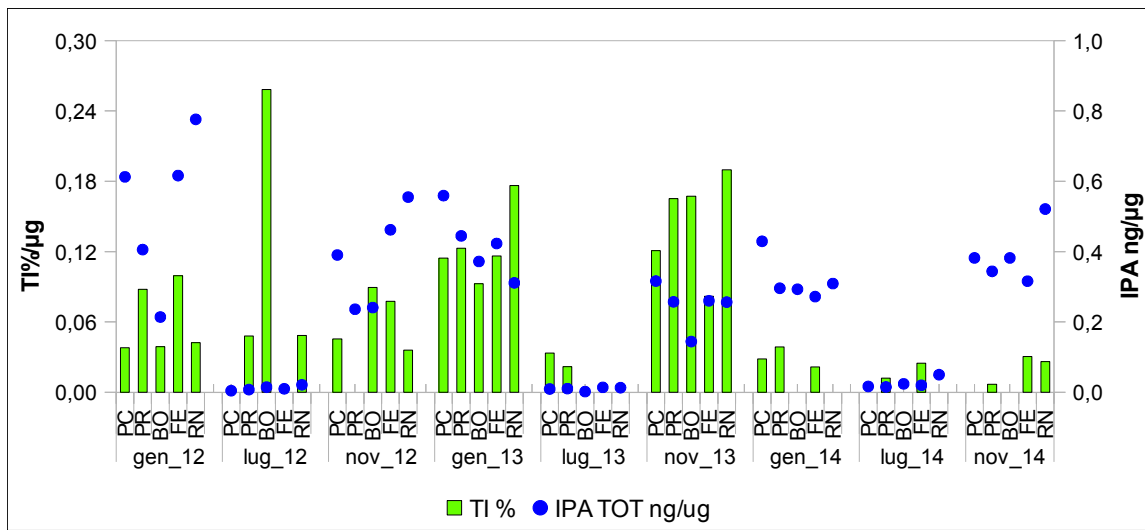
Mettendo in relazione la concentrazione di $PM_{2,5}$ con l'aumento della percentuale di intensità di fluorescenza nella coda - TI%- per metro cubo (Fig. 9, le barre contornate in rosa rappresentano i campioni positivi), non si osserva corrispondenza tra i due parametri con l'eccezione di Ferrara dove si osserva una discreta correlazione essendo il valore del coefficiente di determinazione R^2 ottenuto di 0,71, mentre per le altre città il valore di R^2 più alto è 0,32.

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 rappresentano i campioni positivi.



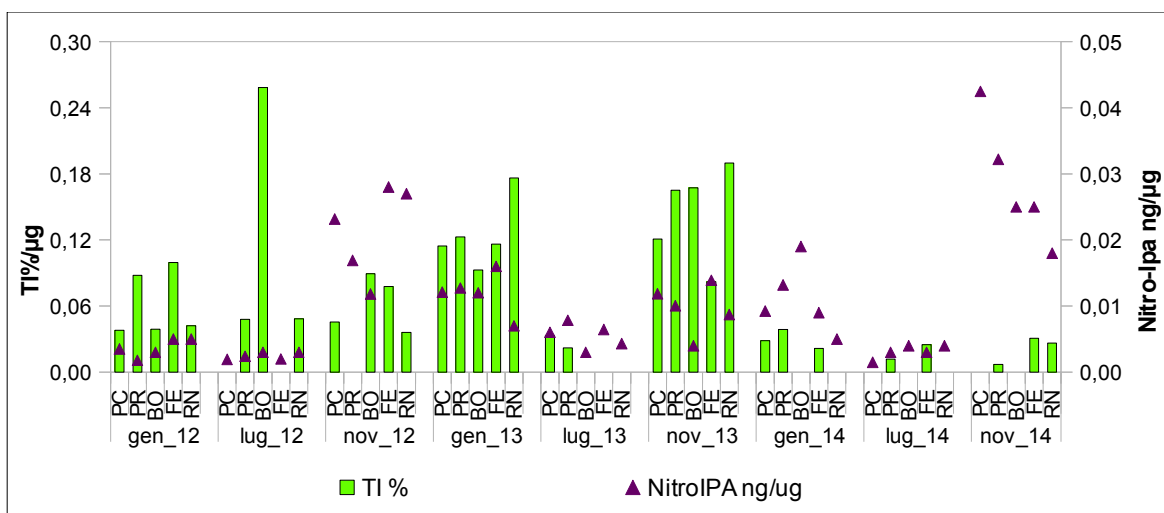
Dalla Figura 10, dove si confrontano le concentrazioni (nanogrammi per microgrammo di particolato) di IPA totali (vedi paragrafi precedenti) con l'induzione di danno alle cellule A549 (%TI per microgrammo di particolato), non si nota corrispondenza fra i due parametri. Unica eccezione, anche in questo caso, è Ferrara dove il valore del coefficiente di determinazione, ottenuto mettendo in relazione i valori rilevati da inizio campionamento, è di 0,69, mentre nelle altre città l' R^2 non supera lo 0,22.

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).



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 0,62, 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 $> 0,7$ evidenziando, almeno in base ai dati al momento disponibili, che l'utilizzo di batteri e di cellule umane porta a risultati 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.7).

Tabella 7 – 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

Indice di correlazione	
Piacenza	0,85
Parma	0,72
Bologna	0,17
Ferrara	0,97
Rimini	0,45

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 solo nell'anno 2013, infatti nel 2014, eccetto la negatività riscontrata per i campioni di luglio, nei mesi di gennaio e di novembre una completa sovrapposizione con la positività riscontrata nei test su Salmonella, la si evidenzia solo per il PM campionato a Ferrara.

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 – 2013, 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.

Dal confronto fra le città è emerso che Piacenza e Rimini sono statisticamente maggiori a Bologna e a Parma per quanto riguarda gli IPA totali e il numero di revertenti ottenuti nei test su Salmonella, per entrambi i parametri sia per metro cubo che per microgrammo di polvere, Ferrara, invece, si pone nel mezzo. Mentre per quel che riguarda la concentrazione delle polveri Ferrara è simile a Piacenza e Rimini, Bologna resta la più bassa e Parma è simile a tutti i nodi. Non si è evidenziata nessuna differenza per quel che riguarda il danno indotto nelle cellule A549.

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_{2,5}, (microgrammi per metro cubo di aria) che ad una maggiore attività mutagena specifica dello stesso, cioè al numero di revertenti indotti, o 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.

In particolar modo la discrepanza fra la concentrazione di PM_{2,5} e l'aumento del danno al DNA è evidente nel test della Cometa in cui non si osserva corrispondenza tra i due parametri, con R² inferiori a 0,35 in tutti i nodi, a parte Ferrara dove si osserva invece una discreta correlazione (R² = 0,71).

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 e 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, 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 microgrammo di particolato) e l'induzione di danno alle cellule A549 (TI%/µg). Per quel che riguarda, invece, gli IPA l'unico nodo in cui c'è relazione fra concentrazione di IPA (ng/µg) e TI% per microgrammo di particolato è Ferrara.

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 tutti i mesi monitorati sia con i test su Salmonella che con il test della Cometa e cioè, a partire dal 2012, gennaio, luglio e novembre per le città di Piacenza, Parma e Ferrara, si riscontra una buona correlazione (soprattutto per Ferrara), tra i due tipi di danno indotto al DNA dal particolato atmosferico, rilevato con i due differenti test. Questo, almeno in base ai dati al momento

disponibili, non lo si riscontra affatto per Bologna e nemmeno per Rimini anche se per quest'ultima la correlazione è maggiore rispetto a Bologna.

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 definiti di "fondo urbano parco", la quantità e/o la tipologia delle sostanze mutagene associate al PM_{2,5} ivi campionato, possono essere differenti, probabilmente anche in funzione delle sorgenti inquinanti circostanti il parco dove è collocata la centralina, come ad esempio, a Rimini, strade ad elevata intensità di traffico o a Parma in cui la centralina, essendo collocata sui bastioni del parco, risulta ad un'altezza maggiore dal livello stradale, rispetto alle 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