

***MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITÀ DEL
PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO (PM_{2,5}) IN
FERRARA:
Report anno 2016***

INTRODUZIONE

Il monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico (Particulate Matter - PM) urbano, frazione PM_{2,5} (particelle con diametro aerodinamico $\leq 2,5 \mu\text{m}$), è iniziato a Ferrara nel marzo 2003. Il sito di campionamento, a partire dal 2009, è a Villa Fulvia, in zona denominata di fondo urbano parco e i mesi in cui si effettuano i test di mutagenesi, sono: Gennaio, Febbraio, Luglio, Novembre e Dicembre.

Per un problema tecnico non è stato sottoposto ai test il PM di dicembre 2013.

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 che, a partire dal 2012, viene effettuato sulla 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.

In seguito alla decisione della Direzione Generale di Arpa di interrompere, da dicembre 2015, l'attività analitica del Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale è stato stipulato un Accordo di Collaborazione e Ricerca con il laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Bioscienze dell'Università di Parma, ora Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, effettivo da gennaio 2016. Per questo motivo i test, a partire dal campione di novembre 2015, e il pretrattamento dei campioni a partire dal campione di gennaio 2016, vengono effettuati presso l'Università di Parma.

Per un problema tecnico dovuto a difetto strumentale, verificatosi durante la fase di estrazione dei campioni di dicembre 2015 (effettuata presso il LT), per tutti i nodi della rete, si è deciso di invalidare i risultati dei test di questo mese, in quanto, molto probabilmente, sottostimati.

Si riportano di seguito i risultati aggiornati a dicembre 2016.

MATERIALI E METODI

Campionamento ed estrazione particolato atmosferico

Il particolato con diametro aerodinamico $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) è raccolto su filtri in fibra di vetro tramite un campionatore sequenziale (*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 è 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 campionatore è collocato nella cabina di monitoraggio della qualità dell'aria situata nel parco Villa Fulvia.

Il campione mensile, formato dall'insieme dei filtri giornalieri, 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 $50 \text{ m}^3/\text{ml}$ 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 della Sezione di Ferrara.

Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e Nitro-IPA

La determinazione degli IPA e dei Nitro-IPA viene effettuata presso la Sezione di Ravenna, nell'ambito delle attività del Polo Analitico Regionale 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 (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, 3-nitrobenzantrone.

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

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 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 derivati 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. 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, 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 ricordato 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 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. Si fa presente che la dose massima saggiata corrisponde a 10 m³ di aria.

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/ μ g 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 μ g 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 totale dei campioni 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).

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 (Tail Intensity - TI%), parametro raccomandato in letteratura, che 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 la cui mortalità cellulare supera il 30% viene definita "tossica" e non ne viene quantificata la genotossicità. Inoltre, 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 del tratto lineare 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.

RISULTATI

Test su Salmonella

Nel 2016, analogamente agli anni precedenti, si riscontrano valori di mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come Fattore di Genotossicità totale (Tab.1), “fortemente positivi” in tutti i mesi più freddi e si conferma la negatività del PM di luglio. La negatività del campione di luglio rispecchia il tipico andamento stagionale della mutagenicità del PM rilevata con questo tipo di test. Rispetto all'anno precedente, nel 2016, nei mesi di febbraio e soprattutto di novembre, si riscontrano valori di FG più bassi.

Il valore del fattore di genotossicità di novembre 2015 si conferma tra quelli più alti riscontrati nel periodo riportato in tabella 1.

Tabella 1 - Genotossicità del particolato atmosferico urbano PM_{2,5} rilevata come Fattore di Genotossicità (FG) su tutti i test in *Salmonella typhimurium*.

	FG		FG		FG		FG
gen-09	39,3	gen-11	39,7	gen-13	103,7	gen-15	55,9
feb-09	56,1	feb-11	54,0	feb-13	39,7	feb-15	31,2
lug-09	0,7	lug-11	0,5	lug-13	0,3	lug-15	0,1
nov-09	29,1	nov-11	38,2	nov-13	34,8	nov-15	104,6
dic-09	47,1	dic-11	108,4	dic-13	nd	dic-15	inv
gen-10	44,8	gen-12	104,7	gen-14	42,4	gen-16	69,4
feb-10	39,8	feb-12	53,2	feb-14	39,2	feb-16	15,2
lug-10	0,4	lug-12	0,2	lug-14	0,3	lug-16	1,1
nov-10	16,1	nov-12	45,4	nov-14	17,5	nov-16	22,6
dic-10	33,3	dic-12	92,1	dic-14	19,4	dic-16	37,1

nd = non determinato; inv = invalidato

Range FG	Giudizio
FG ≤ 1,4	negativo
1,5 ≤ FG ≤ 2,9	debolmente positivo
3,0 ≤ FG ≤ 14,9	positivo
FG ≥ 15	fortemente positivo

Intervalli di positività del Fattore di Genotossicità calcolato in base a tutti i test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con e senza attivazione metabolica esogena.

Per quanto riguarda l'aspetto "qualitativo" della mutagenicità (induzione di mutazioni per sostituzione, per inserzione o delezione di basi, presenza di mutageni diretti o di promutageni), considerando l'intera serie storica, l'attività mutagena rilevata con i test condotti in assenza è risultata maggiore di quella rilevata in presenza di attivazione metabolica esogena, questo vale anche nel 2016 (t di Student per campioni appaiati, rev/m^3 e $\text{rev}/\mu\text{g}$, $p < 0,05$) a parte i risultati ottenuti con il ceppo TA98 per metro cubo di aria equivalente, evidenziando la prevalenza di sostanze mutagene associate al PM che possono agire sul DNA direttamente, anche senza essere state metabolizzate (Fig.1A,B; Tab.2). Nell'autunno 2016 si riscontrano, soprattutto nei test condotti sul ceppo TA98 e nel test condotto sul ceppo TA100 in assenza di attivazione metabolica esogena, un livello di mutagenicità più basso, sia come numero di revertenti indotti per metro cubo di aria, sia come numero di revertenti indotti per microgrammo di particolato, rispetto al 2015 (Fig.1A,B; Tab.2). Occorre tenere in considerazione, nel confronto con gli autunni precedenti, che l'autunno 2015 corrisponde al solo mese di novembre e non alla media di novembre e dicembre.

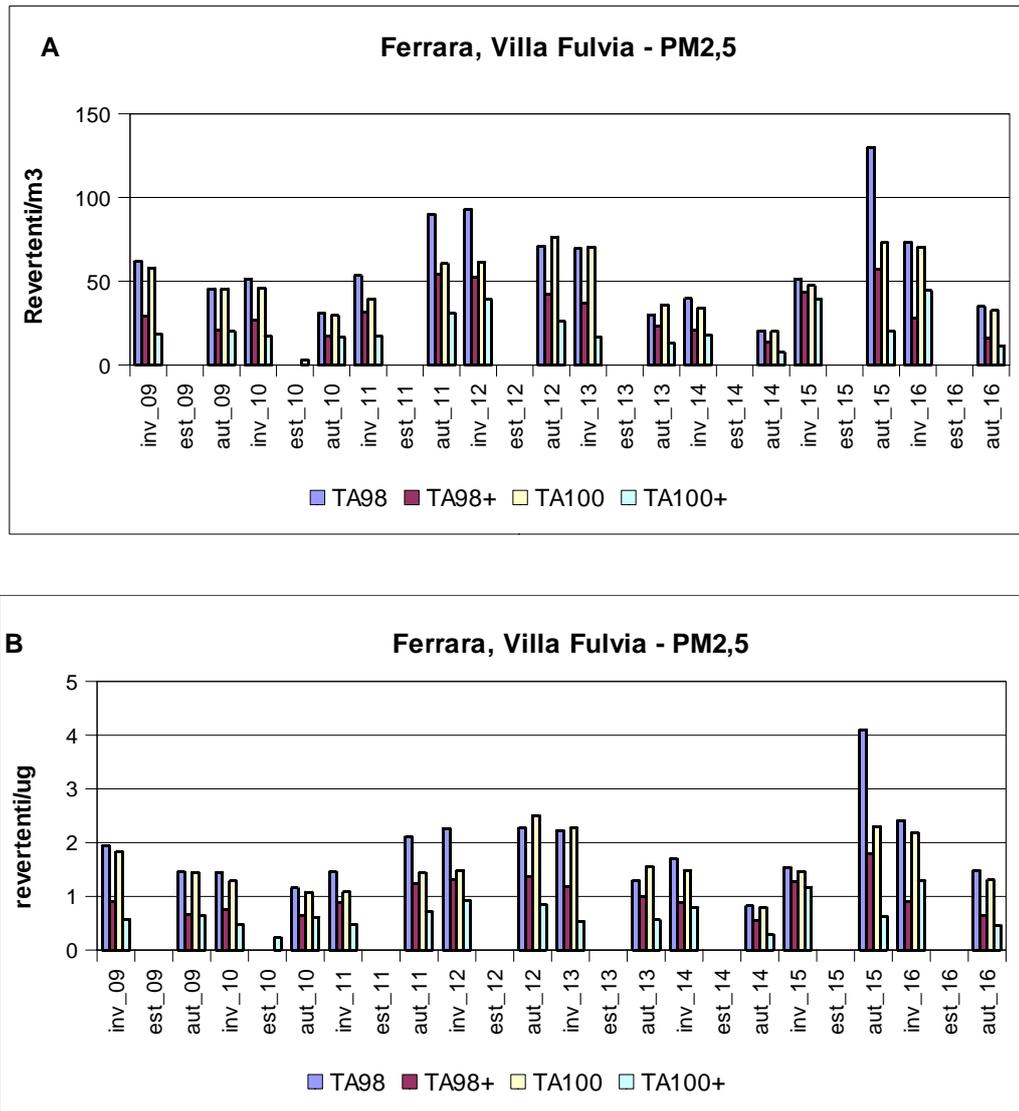
Nel grafico in Figura 2, dove si riportano il numero dei revertenti indotti per metro cubo di aria e la concentrazione di $\text{PM}_{2,5}$ (microgrammi per metro cubo di aria), si nota che gli andamenti dei due parametri sono simili (il valore del coefficiente di determinazione R^2 , ottenuto mettendo in relazione i due parametri rilevati da inizio campionamento, è 0,72), ma che comunque risulta rilevante nel determinare la mutagenicità del PM anche la tipologia e la quantità relativa delle sostanze mutagene ad esso associate. Infatti non sempre a concentrazioni comparabili di particolato corrispondono livelli comparabili di revertenti indotti per metro cubo di aria (Fig.2).

Tabella 2 - Valori dei revertenti/m³ e dei revertenti/μg di polveri calcolati dalla retta di regressione dose/effetto, nei test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+) e senza attivazione metabolica esogena, nei periodi indicati.

PM _{2,5}	revertenti/m ³				PM _{2,5}	revertenti/μg			
	TA98	TA98+	TA100	TA100+		TA98	TA98+	TA100	TA100+
gen-09	52	24	44	17	gen-09	1,452	0,670	1,229	0,475
feb-09	72	34	72	20	feb-09	2,428	1,146	2,428	0,674
lug-09	0	0	0	0	lug-09	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-09	40	15	35	15	nov-09	1,374	0,515	1,202	0,515
dic-09	51	27	56	25	dic-09	1,539	0,815	1,690	0,755
gen-10	50	27	47	17	gen-10	1,245	0,672	1,170	0,423
feb-10	53	27	45	17	feb-10	1,643	0,837	1,395	0,527
lug-10	0	0	0	3	lug-10	0,000	0,000	0,000	0,229
nov-10	17	9	14	9	nov-10	0,875	0,463	0,721	0,463
dic-10	45	26	45	24	dic-10	1,434	0,829	1,434	0,765
gen-11	49	33	37	16	gen-11	1,627	1,083	1,229	0,531
feb-11	58	31	42	19	feb-11	1,288	0,688	0,933	0,422
lug-11	0	0	0	0	lug-11	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-11	51	23	38	14	nov-11	1,542	0,695	1,149	0,423
dic-11	129	86	83	48	dic-11	2,673	1,782	1,720	0,994
gen-12	111	74	66	33	gen-12	2,904	1,936	1,727	0,863
feb-12	75	31	57	45	feb-12	1,627	0,672	1,236	0,976
lug-12	0	0	0	0	lug-12	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-12	43	25	72	22	nov-12	1,518	0,883	2,542	0,777
dic-12	99	60	81	30	dic-12	3,021	1,831	2,471	0,915
gen-13	98	54	94	22	gen-13	2,999	1,653	2,877	0,673
feb-13	41	20	47	11	feb-13	1,453	0,709	1,665	0,390
lug-13	0	0	0	0	lug-13	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-13	30	23	36	13	nov-13	1,294	0,992	1,553	0,561
dic-13	nd	nd	nd	nd	dic-13	nd	nd	nd	nd
gen-14	38	23	28	14	gen-14	1,366	0,827	1,006	0,503
feb-14	42	19	40	22	feb-14	2,035	0,936	1,958	1,077
lug-14	0	0	0	0	lug-14	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-14	19	16	22	15	nov-14	0,727	0,612	0,842	0,574
dic-14	22	12	18	0	dic-14	0,914	0,499	0,748	0,000
gen-15	64	60	49	52	gen-15	1,702	1,595	1,303	1,383
feb-15	39	27	46	27	feb-15	1,379	0,955	1,626	0,955
lug-15	0	0	0	0	lug-15	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-15	130	57	73	20	nov-15	4,101	1,798	2,303	0,631
dic-15	inv	inv	inv	inv	dic-15	inv	inv	inv	inv
gen-16	108	42	111	75	gen-16	2,523	0,981	2,593	1,752
feb-16	39	14	30	14	feb-16	2,303	0,827	1,772	0,827
lug-16	0	0	0	0	lug-16	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-16	28	10	19	7	nov-16	1,495	0,534	1,014	0,374
dic-16	42	22	46	16	dic-16	1,454	0,761	1,592	0,554

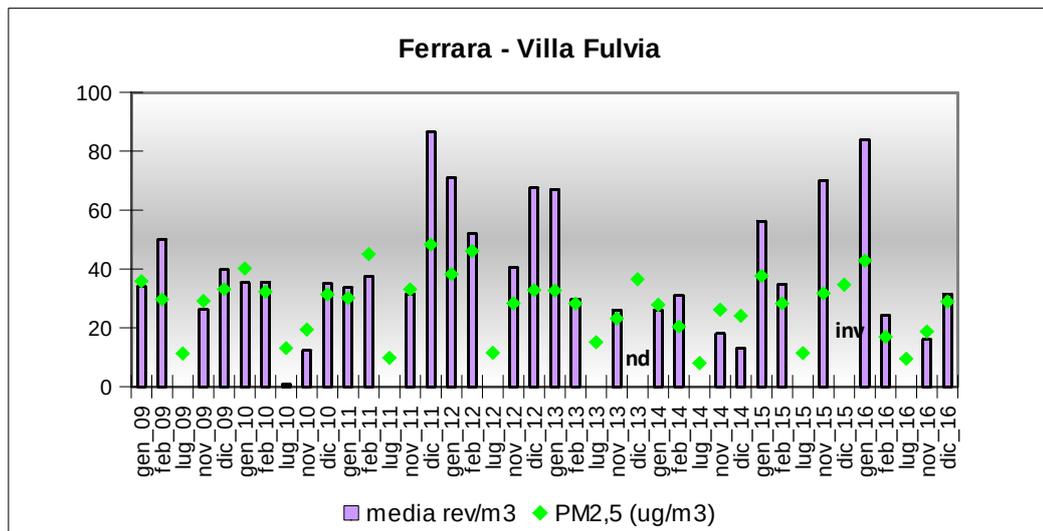
nd = non determinato; inv = invalidato

Figura 1 - Genotossicità del PM_{2,5} espressa come numero medio dei revertenti per metro cubo di aria e (A) e microgrammo di polveri (B), rilevata nelle stagioni indicate, in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 e TA100 con (+) e senza attivazione metabolica esogena. Inverno: media gennaio-febbraio; estate: luglio; autunno: media novembre-dicembre.



nb: autunno 2013 e autunno 2015: solo novembre.

Figura 2 - Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano PM_{2,5} (media dei revertenti/m³ indotti da estratti di campioni mensili) e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, nei periodi indicati.



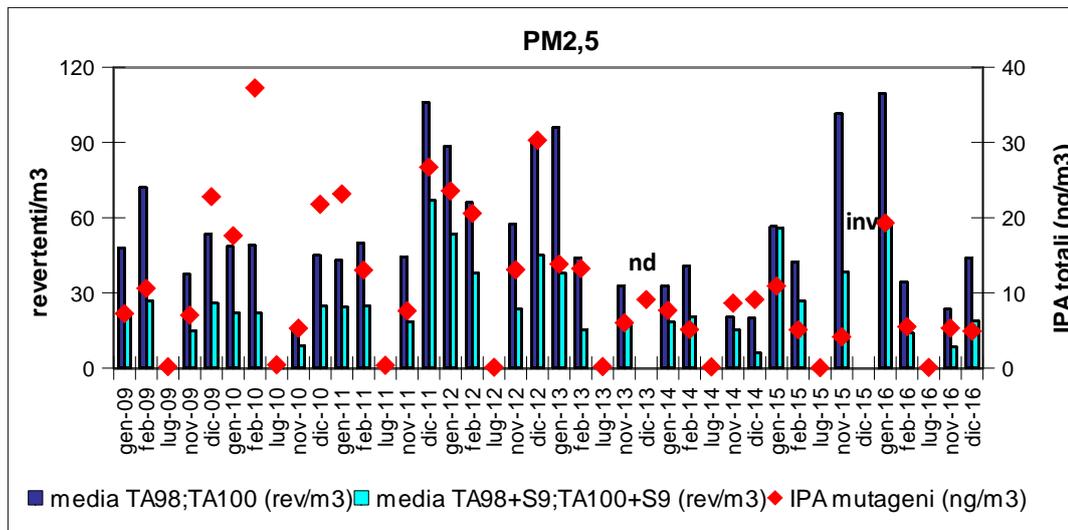
nd = non determinato; inv = invalidato

In Figura 3, si confrontano le concentrazioni mensili degli IPA totali, 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 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, sensibili alla presenza di IPA.

Pur confermandosi stagionalità nell'andamento delle concentrazioni (nei mesi autunnali e invernali le concentrazioni sono tra loro statisticamente comparabili e sono maggiori di quelle rilevate nei mesi di luglio - Anova, *post hoc* di Tukey, $p < 0.05$), non si evidenzia corrispondenza nell'andamento dei due parametri ed è evidente la discrepanza tra le concentrazioni più alte di IPA e i valori più alti di revertenti indotti (R^2 di 0,46 considerando

la media dei revertenti indotti in seguito ad attivazione metabolica esogena). Inoltre, si conferma un forte contributo alla mutagenicità del PM anche da parte di altre sostanze ad azione mutagena diretta.

Figura 3- Comparazione dei livelli di IPA dotati di attività biologica (vedi testo) e attività genotossica determinata con i test sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+S9) e senza attivazione metabolica.

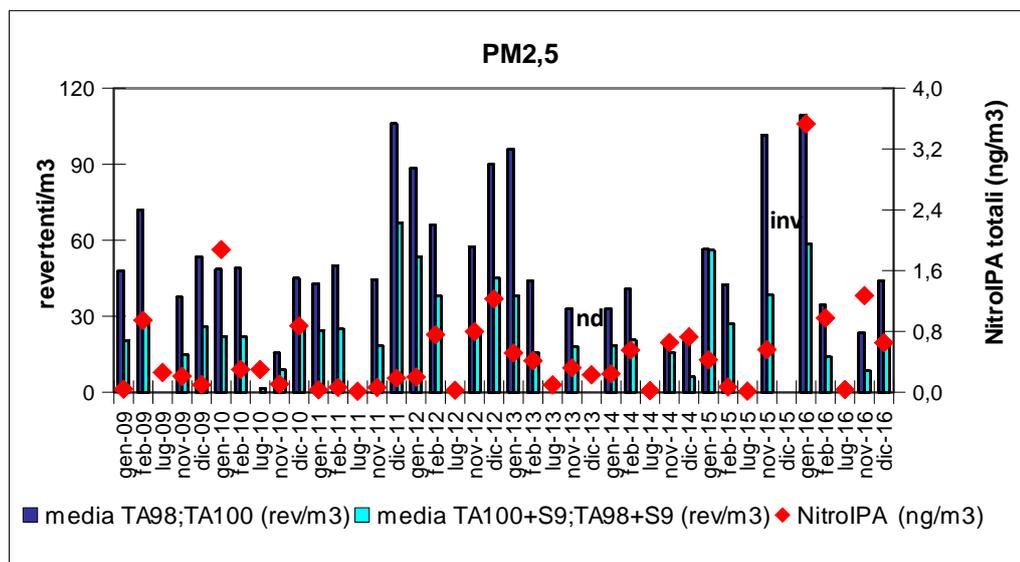


nd = non determinato; inv = invalidato

Per quanto riguarda l'andamento della concentrazione dei Nitro-IPA (Σ 1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 2-nitrofluorene (non più conteggiato da novembre 2010), 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene (da luglio 2009), 2-nitro+3-nitrofluorantene, 1-nitropirene, 7-nitrobenzo(a)antracene, 6-nitrocrisene, 3-nitrobenzantrone, 1,6-dinitropirene, 1,8-dinitropirene, 6-nitrobenzo(a)pirene), non si osserva la stessa stagionalità evidenziata per gli IPA infatti, nella serie storica, si conferma che le concentrazioni di questi inquinanti sono simili nelle tre stagioni (Anova, *post hoc* di Tukey) e questo si può spiegare con il fatto che i Nitro-IPA sono anche prodotti secondari degli IPA, che si formano in atmosfera in seguito a reazioni fotochimiche. Non si riscontra alcuna corrispondenza tra la maggiore attività mutagena diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA (Fig.4) (R^2 di 0,20) considerando

la media dei revertenti indotti in assenza di attivazione metabolica esogena, cioè l'attività mutagena diretta), evidenziando il contributo di altre sostanze alla mutagenicità del PM.

Figura 4- Comparazione dei livelli di Nitro-IPA (vedi testo. e attività genotossica determinata con i test sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+S9) e senza attivazione metabolica.

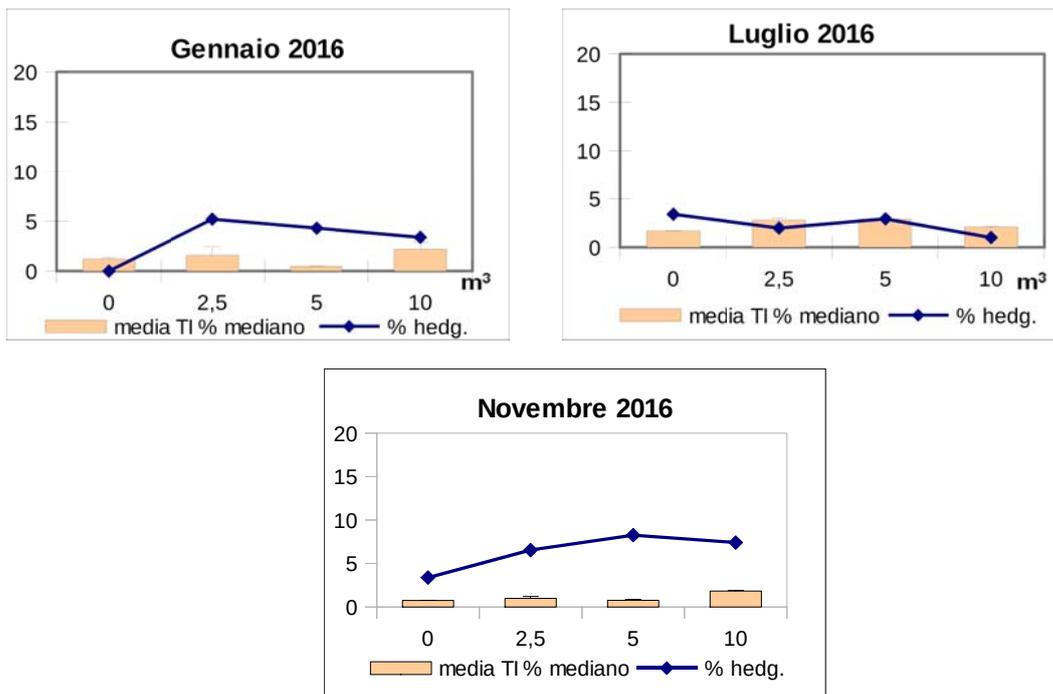


nd = non determinato; inv = invalidato

Test della cometa

In Figura 5 vengono illustrati i risultati ottenuti dai tre campioni analizzati nel 2016: per ogni dose saggiata sono riportati sia i valori della percentuale dell'intensità di fluorescenza del DNA nella coda della cometa (%TI – espressa come media delle mediane delle due repliche) che la percentuale delle cellule che, in quanto particolarmente danneggiate, hanno perso la configurazione a cometa e appaiono come nuvole di DNA e sono dette “hedgehogs” (porcospini).

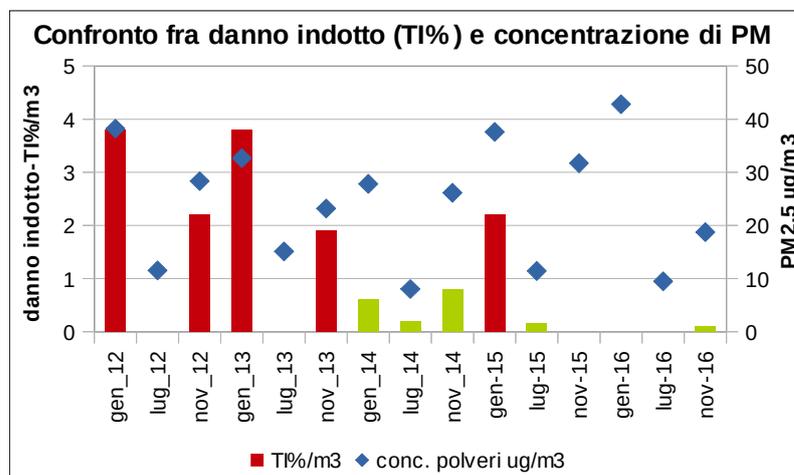
Figura 5 – Grafici dose-risposta dei campioni analizzati nel 2016. Vengono riportati, per ogni dose, la media dei valori del danno al DNA - espresso come percentuale di TI - e della tossicità indotta dal campione - espressa come hedgehogs % - (vedi testo).



A differenza dell'anno precedente tutti i campioni sono risultati negativi: nessun campione ha causato rotture al DNA, evidenziando così, nel mese di gennaio, una minore genotossicità del PM rispetto al 2015 (Fig.5).

In nessun caso si osserva la presenza di effetto tossico sulle cellule subito dopo il trattamento con il campione e nemmeno, nella fase di lettura, un aumento di cellule “hedgehogs”.

Figura 6 – 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 (le barre rosse indicano i campioni positivi) e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri.



Mettendo in relazione le concentrazioni di polveri, di IPA e di Nitro-IPA, con l'induzione di danno alle cellule A549 (%TI per metro cubo di aria), non si osserva corrispondenza fra questi parametri (Fig. 6,7,8) (R^2 rispettivamente = 0,30 = 0,48 = 0,02) .

Questo conferma che spesso le singole classi di contaminanti chimici, seppur importanti nel processo di mutagenesi come gli IPA e i Nitro-IPA, non sono utili per definire in toto la genotossicità del particolato atmosferico.

Figura 7 – Confronto del danno indotto (espresso come percentuale di TI, vedi testo) con la concentrazione medie mensili di IPA totali (vedi testo).

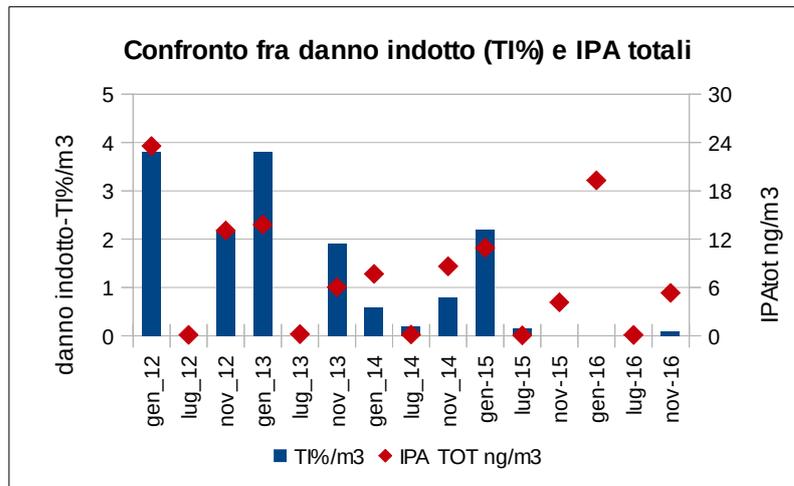
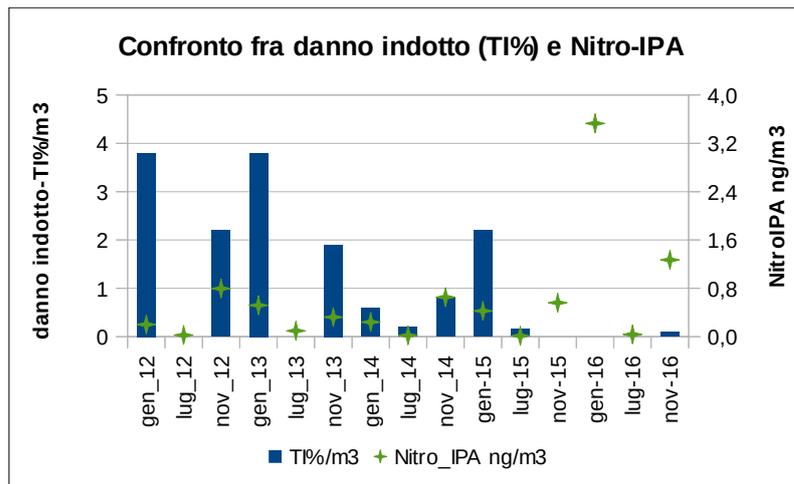


Figura 8 – Confronto del danno indotto (espresso come percentuale di TI, vedi testo) con la concentrazione di Nitro-IPA (vedi testo).



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, si ottiene una correlazione di 0,54, ciò indica, che non sempre, almeno in base ai dati al momento disponibili, l'utilizzo di batteri e di cellule umane porta a risultati sovrapponibili, evidenziando la complementarietà dei due test nel descrivere la genotossicità del PM.

CONCLUSIONI

Si conferma la stagionalità della mutagenicità rilevata dai test con Salmonella, già riscontrata negli anni precedenti, con valori più alti nei mesi più freddi e valori più bassi o negativi nel periodo estivo. Si confermano valori di mutagenicità, espressa come fattore di genotossicità totale, rientranti nel range di “fortemente positivo” per quanto riguarda i mesi autunnali e invernali. Nel 2016 i valori di FG di febbraio e soprattutto di novembre sono più bassi rispetto a quelli degli stessi mesi del 2015. Nell'autunno 2016 si riscontra anche, nella maggior parte dei test, un livello di mutagenicità più basso, sia come numero di revertenti indotti per metro cubo di aria, sia come numero di revertenti indotti per microgrammo di particolato, rispetto al 2015. Sul numero dei revertenti indotti per metro cubo di aria in Salmonella, incide sicuramente la concentrazione di PM_{2,5} (microgrammi per metro cubo di aria), infatti si nota che gli andamenti dei due parametri sono simili, ma risulta altresì rilevante nel determinare la mutagenicità del PM, la tipologia e la quantità relativa delle sostanze mutagene ad esso associate. Dalla serie storica dei dati infatti, si evidenzia che non sempre a concentrazioni comparabili di particolato corrispondono livelli comparabili di revertenti indotti per metro cubo di aria.

Si ricorda che, per problemi tecnici, non sono disponibili i dati di dicembre 2013 e di dicembre 2015 e questo potrebbe aver inciso sui valori medi di mutagenicità di quegli autunni (media dei mesi di novembre e dicembre).

Dai dati disponibili relativi al confronto tra IPA, Nitro-IPA e attività mutagena del particolato, rilevata con i test su Salmonella, non si evidenzia corrispondenza nell'andamento dei due parametri pur essendo, per gli IPA e i revertenti, evidente la stessa stagionalità. Si conferma 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.

Per quanto riguarda la genotossicità evidenziata con il test della Cometa sulla linea cellulare umana A549, nel 2016, a differenza degli anni precedenti, tutti i campioni sono risultati negativi evidenziando, per i mesi di gennaio e novembre, nessuna corrispondenza con la positività riscontrata con i test su Salmonella. Quindi nei campioni di PM prelevati a Villa Fulvia in gennaio e novembre, si evidenzia la presenza di sostanze ad esso associate in grado di indurre mutazioni di tipo puntiforme e non rotture a singolo e/o a doppio filamento nel DNA. Si ricorda che i dati ottenuti col test della Cometa sono relativi solo a tre mesi dell'anno (gennaio, luglio e novembre) ritenuti rappresentativi rispettivamente dell'inverno, dell'estate e dell'autunno.

Dal confronto delle concentrazioni di IPA, di Nitro-IPA totali e di PM con l'induzione di danno al DNA nelle cellule A549 (%TI) rilevato con il test della Cometa, non si osserva corrispondenza fra questi parametri.

Occorre comunque tenere in considerazione, nel confronto tra i risultati ottenuti con i test su Salmonella e quelli ottenuti con il test della Cometa, che i dati a disposizione sono numericamente diversi in quanto il test della Cometa sulle cellule A549, si effettua solo a partire dal 2012 mentre quelli ottenuti dai test su Salmonella sono disponibili, per questo sito, dal 2009.

Come già sottolineato più volte, 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.

La complementarità dei due tipi di test utilizzati, supportata anche dalla non completa sovrapposibilità nella risposta agli effetti genotossici del PM, evidenzia l'utilità dell'impiego

di entrambi nel monitoraggio della genotossicità del particolato atmosferico. L'utilizzo di test con end point genetici diversi infatti, 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.

Sotto si riporta l'indirizzo del sito web del Laboratorio Tematico "Mutagenesi Ambientale" dove sono pubblicati i dati relativi alla mutagenicità del particolato atmosferico urbano campionato a Ferrara e del particolato campionato negli altri nodi della rete regionale:

https://www.arpae.it/dettaglio_generale.asp?id=2871&idlivello=1610

Responsabile Laboratorio Tematico
Mutagenesi Ambientale
Dott.ssa Francesca Cassoni