
Eccellenza "Mutagenesi Ambientale"

Tel. 0521/381216-200

Fax 0521/381239

Dipartimento Tecnico

Parma, 09 aprile 2008

Prot.: PG/08/4196

***RETE REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA DI
MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITA' DEL
PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:
FERRARA (2004 - 2007)***

INTRODUZIONE

Il monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, frazione PM_{2,5} (particelle con diametro aerodinamico $\leq 2,5 \mu\text{m}$), iniziato a Ferrara nel marzo del 2003 è proseguito e per quel che riguarda la centralina di Corso Isonzo si è concluso nel dicembre 2007. La stazione di campionamento del particolato è situata in Corso Isonzo – Viale Cavour (zona ad alta densità abitativa e ad alto traffico veicolare). Si ricorda che dal 2004 i test di mutagenesi vengono effettuati solo sul particolato campionato nei mesi più significativi nell'ambito di ogni stagione, valutati in base alla serie storica dei dati e più precisamente:

- gennaio e febbraio come mesi rappresentativi dell'inverno;
- aprile come mese rappresentativo della primavera;
- luglio come mese rappresentativo dell'estate;
- novembre e dicembre come mesi rappresentativi dell'autunno.

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

MATERIALI E METODI

Campionamento ed estrazione particolato atmosferico

Il prelievo viene effettuato ad una altezza di circa 3 metri da terra, utilizzando un campionatore sequenziale dotato di testa di prelievo costruita secondo norme europee. Il particolato è raccolto su filtri in teflon con flusso di aspirazione di circa 16,7 l/min, continuo per tutte le 24 ore. Il peso delle polveri viene determinato con metodo gravimetrico.

Il campione mensile, costituito 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 Nm³/ml per l'esecuzione del test su Salmonella e di 200 Nm³/ml per il test dei micronuclei.

Il campionamento e l'estrazione chimica del campione vengono effettuati presso la Sezione Provinciale di Ferrara.

Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Negli stessi estratti, sottoposti a test di mutagenesi, viene effettuata dal luglio 2003 anche la determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici.

La determinazione degli IPA viene effettuata presso la Sezione provinciale di Ravenna, nell'ambito delle attività dell'Eccellenza "Microinquinanti organici".

L'aliquota degli estratti organici provenienti dall'estrazione del materiale particolato viene sottoposta a purificazione per cromatografia su colonna impaccata con gel di silice secondo le modalità riportate nel metodo EPA 3630C.

La determinazione analitica finale viene effettuata per gascromatografia ad alta risoluzione interfacciata ad uno spettrometro di massa a bassa risoluzione (HRGC/LRMS), attraverso la registrazione e la misura delle correnti ioniche relative ai picchi molecolari (Mi)⁺ e ai picchi isotopici (Mi+1)⁺.

IPA rilevati: naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo (a) antracene, crisene, benzo (b) fluorantene, benzo (k) fluorantene, benzo (e) pirene, benzo (a) pirene, indeno (1,2,3-cd) pirene, dibenzo (a,h) antracene, benzo (ghi) terilene, dibenzo (a,e) pirene, dibenzo (a,i) pirene, dibenzo (a,h) pirene.

Test su Salmonella

Gli estratti di particolato atmosferico vengono sottoposti a test di mutagenesi sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* (metodo di incorporazione in piastra) in accordo con i metodi standard (Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173-215). Il principio del test di Ames si basa sulla retromutazione, in quanto utilizza ceppi di batteri (*Salmonella typhimurium*) recanti ognuno un diverso tipo di mutazione nel gene che codifica per la biosintesi dell'istidina, quindi incapaci di crescere in assenza di questo aminoacido e la positività viene valutata sul numero dei batteri che riacquistano la capacità di crescere in assenza di istidina in seguito ad

una seconda mutazione dovuta all'esposizione a sostanze mutagene (retromutazioni). I batteri che riacquistano tale capacità sono detti revertenti.

L'utilizzo di due ceppi di *Salmonella typhimurium* permette di evidenziare diversi tipi di danni genetici a livello di una o poche coppie di basi nel DNA (mutazioni puntiformi); in particolare il ceppo TA98 rileva mutazioni per inserzione o delezione di basi mentre il ceppo TA100 rileva mutazioni per sostituzione di basi.

Per distinguere le sostanze che per esercitare la loro azione mutagena devono essere metabolizzate (promutageni), come ad esempio gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), da quelle che possono agire sul DNA direttamente (mutageni diretti), come ad esempio i nitroderivati degli IPA, tutti i test su *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. I revertenti vengono contati dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

Test dei micronuclei

Il test, definito come "cytokinesis-block micronucleus assay" - test CBMN (Fenech, Mutat. Res., 455, 81-95, 2000), ha l'obiettivo di verificare la presenza di sostanze in grado di indurre rotture dei cromosomi (sostanze clastogene) o perdita dei medesimi (sostanze aneugeniche) portando alla formazione di micronuclei. I micronuclei (MN), ritenuti indicatori indiretti di aberrazioni cromosomiche strutturali e/o numeriche, sono corpi extranucleari, di dimensioni inferiori rispetto al nucleo, che si formano al termine di una divisione cellulare dalla condensazione di frammenti di cromosomi o di cromosomi interi esclusi dal nucleo principale originando così corpuscoli citoplasmatici liberi di forma rotondeggiante o ovale chiaramente distinti dal nucleo principale.

Il test è effettuato, in vitro, su linfociti di sangue periferico prelevato da donatori sani non fumatori. Per valutare la presenza di effetto citotossico in linfociti in coltura si calcola l'indice CBPI (*Cytokinesis Block Proliferation Index*), che misura la cinetica di proliferazione cellulare, ovvero il numero medio di cicli cellulari effettuati dalle cellule in

coltura, in quanto una sostanza con effetto tossico inducendo un rallentamento delle divisioni cellulari (Surrallés et al., Mutat. Res., 341, 169-184, 1995).

Per ogni campione vengono saggiate tre concentrazioni di estratto e per ogni concentrazione si eseguono due repliche indipendenti, fino a luglio 2004 i micronuclei venivano valutati su 1000 cellule totali, mentre da dicembre 2004 si considera la media dei micronuclei su 2000 cellule.

I test di mutagenesi, l'elaborazione dei dati e la stesura del report vengono effettuati presso la Sezione Provinciale di Parma, nell'ambito delle attività dell'Eccellenza "Mutagenesi Ambientale".

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 e il numero dei revertenti spontanei (controllo negativo) è ≥ 2 (Chu KL, Patel KM, Lin AH, Tarone RE, Linhart MS, Dunkel VC. Evaluating statistical analysis and reproducibility of mutagenicity assay. Mutat Res 1981; 85: 119-132).

Per l'analisi quantitativa si ricava il valore dei revertenti/ Nm^3 di aria e dei revertenti/ μg di polveri, dato dal coefficiente angolare della retta di regressione ottenuta dal numero di revertenti riscontrati in ciascuna delle piastre per ogni dose (Nm^3 di aria aspirata equivalenti o μg di particolato), 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.

Per rappresentare l'effetto mutageno totale dei diversi campioni si utilizza il Fattore di Genotossicità che si ottiene sommando gli effetti dei test considerati. Per calcolare questo parametro vengono utilizzati i rapporti tra i valori dei trattati (con dosi crescenti di Nm^3 campionati equivalenti) 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 dei micronuclei

Per valutare la positività di un campione, intesa come capacità di rompere o far perdere interi cromosomi (effetto clastogeno/aneugenico), si effettua il test del chi quadrato fra le dosi saggiate e il controllo (Serrano-Garcia e Montero-Montoya, Environ. Mol. Mutagen., 38, 38-45, 2001).

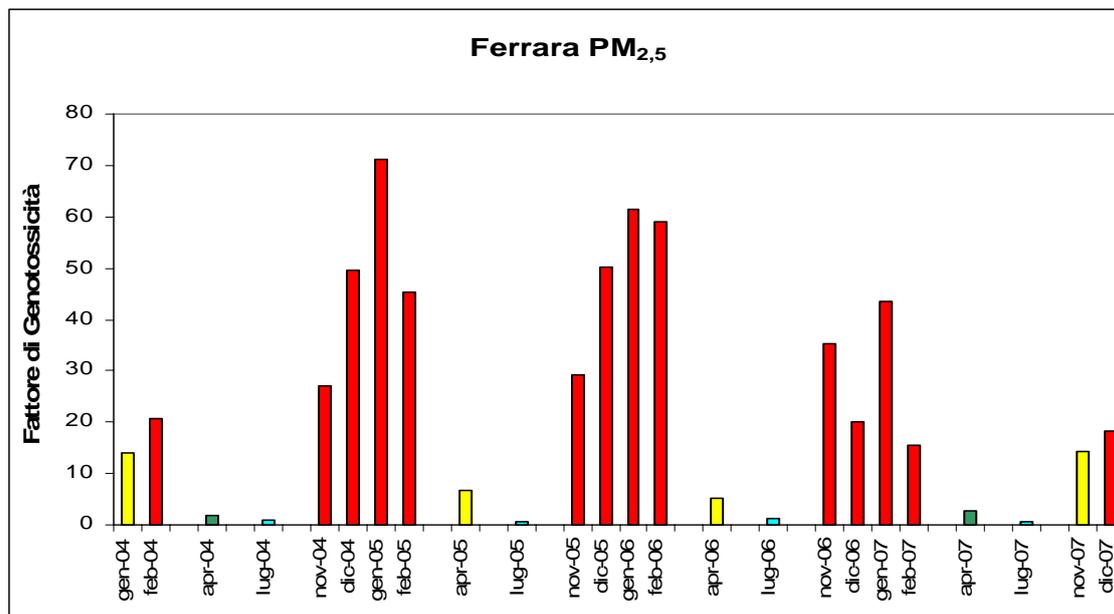
Come per il test su Salmonella, la genotossicità dei campioni è rappresentata quantitativamente mediante il valore dei MN/Nm³ di aria, rappresentato dal coefficiente angolare della retta di regressione dei dati considerando il solo tratto lineare delle curve dose/risposta.

RISULTATI

Test su Salmonella

Osservando l'evoluzione temporale della mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come fattore di genotossicità totale (*Fig1*), si riscontrano, nei mesi autunnali del 2007 valori più bassi rispetto agli stessi mesi degli anni precedenti considerati nel presente report. I valori del fattore di genotossicità del periodo invernale 2007, in particolar modo quello di febbraio, risultano più bassi di quelli degli stessi mesi del 2005 e del 2006 e comparabili o più alti di quelli del 2004. Il valore di fattore di genotossicità più alto, nel periodo considerato, è quello di gennaio 2005.

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



Range FG	Giudizio
$FG \leq 1,4$	negativo
$1,5 \leq FG \leq 2,9$	debolmente positivo
$3,0 \leq FG \leq 14,9$	positivo
$FG \geq 15$	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.

La maggiore mutagenicità riscontrata in determinati periodi rispetto ad altri (*Fig3*) sembra essere dovuta non solo ad una maggiore concentrazione di $PM_{2,5}$ ($\mu g/Nm^3$), ma anche ad una maggiore attività mutagena specifica del particolato intesa come numero di revertenti indotti per μg di particolato (*Fig2B,Tab1*). Infatti, osservando la Figura 3, dove si riportano gli andamenti nel periodo gennaio 2004 – dicembre 2007 della media dei revertenti/ Nm^3 e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, si può constatare che i due andamenti sono simili. Mettendo in relazione i due andamenti si riscontrano, tuttavia, livelli di mutagenicità differenti a concentrazioni di PM simili con un coefficiente di determinazione (R^2) pari a 0,6.

La mutagenicità espressa come revertenti/ Nm^3 e come revertenti/ μg di particolato (*Fig2,Tab1*) conferma, anche nel 2007, una maggiore sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica esogena, evidenziando una presenza prevalente di molecole ad azione mutagena diretta (quali sono ad es. i nitroderivati degli IPA). Questo è particolarmente evidente nel ceppo TA100 indicando una prevalenza di sostanze che agiscono sul DNA tramite sostituzione di basi.

Tab.1 - Valori dei revertenti/Nm³ e dei revertenti/μg di polveri (calcolati in base alla retta di regressione della curva dose/effetto) relativi a tutti i test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+) e senza attivazione metabolica esogena, nei periodi indicati.

PM2,5	revertenti/Nm ³				revertenti/μg			
	TA98	TA98+	TA100	TA100+	TA98	TA98+	TA100	TA100+
gen-04	17	7	31	11	0,883	0,364	1,611	0,572
feb-04	19	7	30	7	0,782	0,288	1,235	0,288
apr-04	1	0	0	0	0,059	0,000	0,000	0,000
lug-04	1	0	0	0	0,053	0,000	0,000	0,000
nov-04	39	18	55	18	1,222	0,564	1,723	0,564
dic-04	36	21	67	24	0,928	0,542	1,728	0,619
gen-05	49	29	63	29	1,063	0,629	1,366	0,629
feb-05	41	27	51	23	0,894	0,589	1,112	0,501
apr-05	8	3	9	0	0,451	0,169	0,507	0,000
lug-05	0	0	0	0	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-05	23	12	39	18	0,728	0,380	1,234	0,570
dic-05	38	22	57	33	0,996	0,577	1,494	0,865
gen-06	54	38	83	43	1,056	0,743	1,623	0,841
feb-06	55	33	80	42	1,228	0,737	1,786	0,938
apr-06	3	4	6	3	0,134	0,178	0,268	0,134
lug-06	1	0	0	0	0,055	0,000	0,000	0,000
nov-06	33	24	40	20	0,588	0,428	0,713	0,357
dic-06	22	11	19	5	0,558	0,279	0,482	0,127
gen-07	32	30	63	31	0,718	0,673	1,413	0,695
feb-07	14	7	22	8	0,279	0,139	0,438	0,159
apr-07	3	1	0	1	0,111	0,037	0,000	0,037
lug-07	1	0	0	0	0,064	0,000	0,000	0,000
nov-07	18	6	28	8	0,474	0,158	0,737	0,211
dic-07	20	10	28	16	0,426	0,213	0,596	0,341

Fig.2 - Evoluzione temporale della genotossicità del particolato atmosferico urbano (PM_{2,5}) rilevata attraverso l'induzione di revertenti/Nm³aria (A) e revertenti/μg polveri (B) in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 e TA100 con (+) e senza attivazione metabolica esogena.

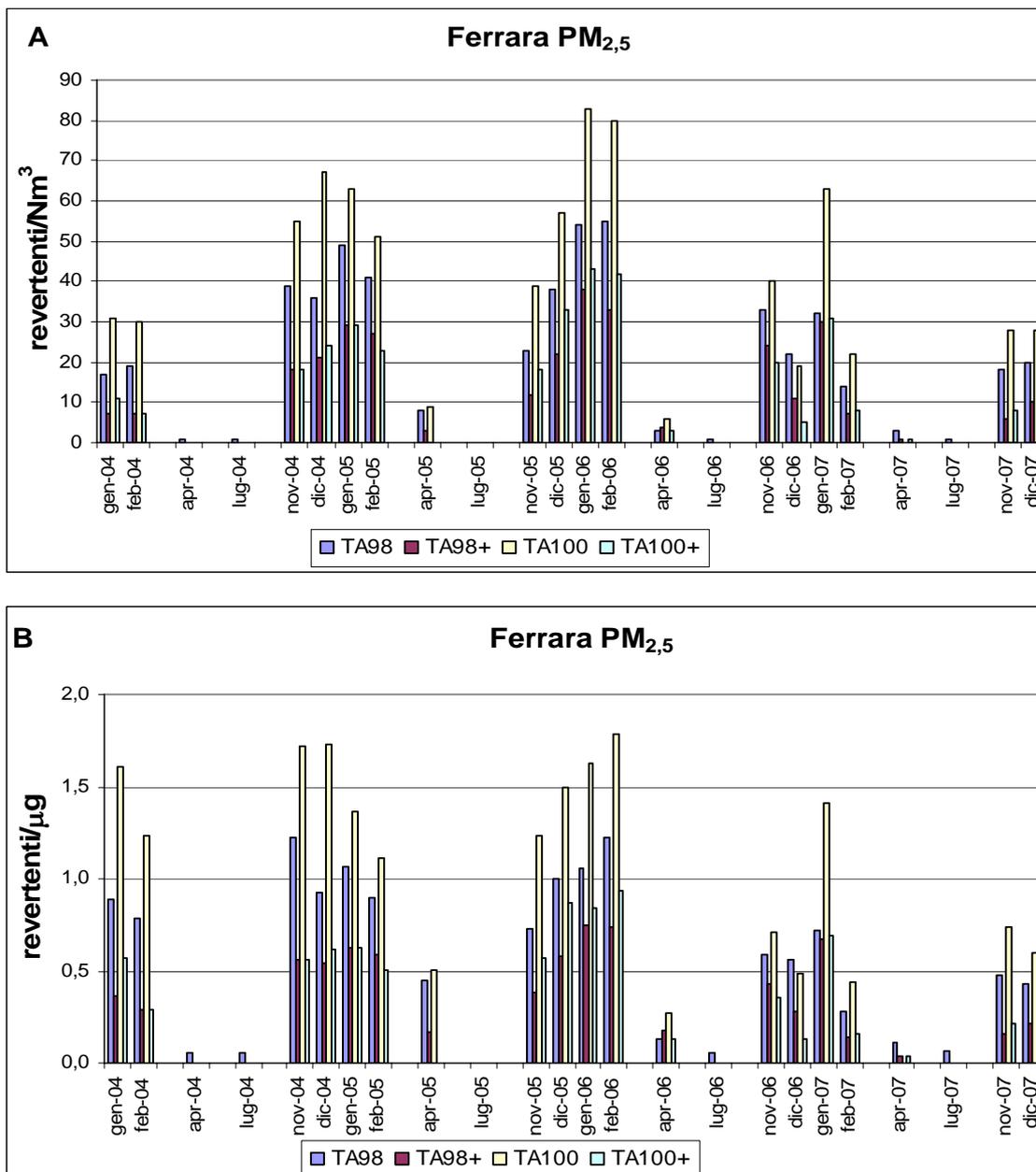
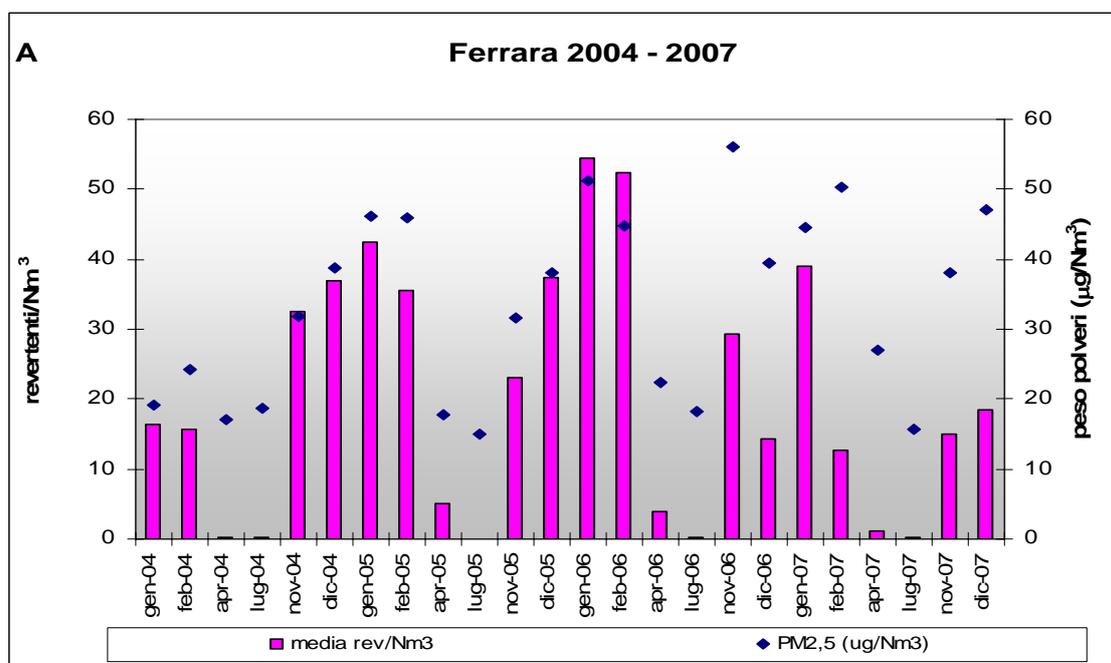


Fig.3 - Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano (PM_{2,5}) espressa come media di revertenti/Nm³ indotti da estratti di campioni mensili e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri.



In figura 4 si riportano le concentrazioni medie di IPA dotati di attività biologica (fluorantene, pirene, benzo (a) antracene, crisene, benzo (b) fluorantene, benzo (k) fluorantene, benzo (e) pirene, benzo (a) pirene, indeno (1,2,3-cd) pirene, dibenzo (a,h) antracene, benzo (ghi) perilene, dibenzo (a,l) pirene, dibenzo (a,e) pirene, dibenzo (a,i) pirene, dibenzo (a,h) pirene), rilevate negli stessi estratti di PM sottoposti a test di mutagenesi, aggiornate con i dati del 2007. Si conferma che, in accordo con l'andamento stagionale della mutagenicità del PM, i valori più elevati corrispondono ai periodi più freddi (Fig4). Il confronto tra le concentrazioni medie di IPA e attività mutagena sia diretta che indiretta (con attivazione metabolica esterna) (Fig5) evidenzia ancora come a concentrazioni simili di IPA corrispondano valori di mutagenicità piuttosto differenti e che il livello di genotossicità rilevato con i test sensibili alla presenza di IPA (+S9) è generalmente più basso di quello rilevato con gli altri test, evidenziando un forte contributo alla mutagenicità del PM da parte di sostanze ad azione mutagena diretta. Infatti si confermano valori piuttosto bassi dei coefficienti di determinazione (R²) ottenuti mettendo in relazione la

concentrazione (ng/μg) degli IPA dotati di attività biologica con il numero di revertenti indotti per μg di particolato (Tab2).

Fig.4 - Concentrazioni di IPA con attività biologica (vedi testo) determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A) e ng/Nm³ (B), nei periodi indicati.

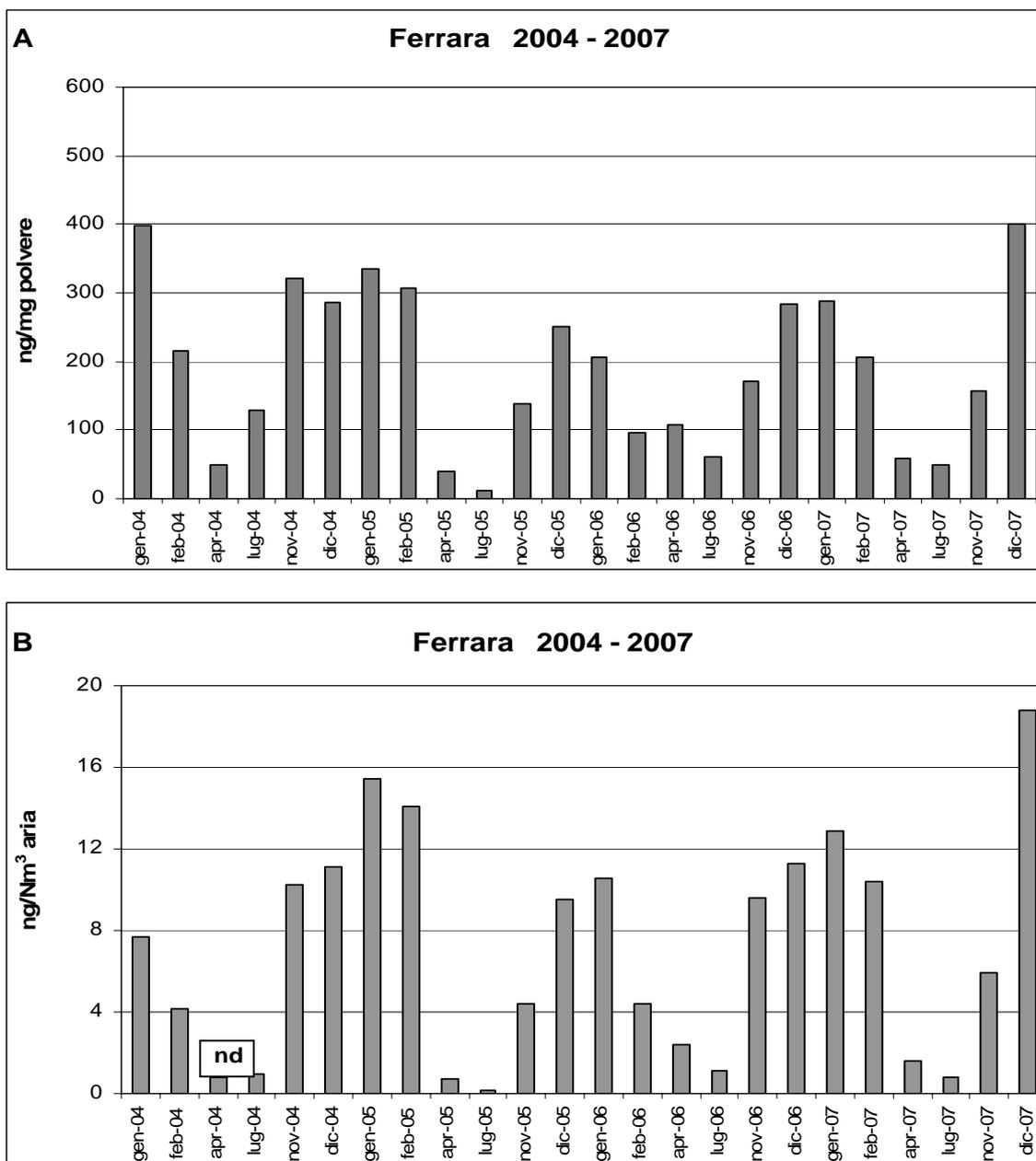
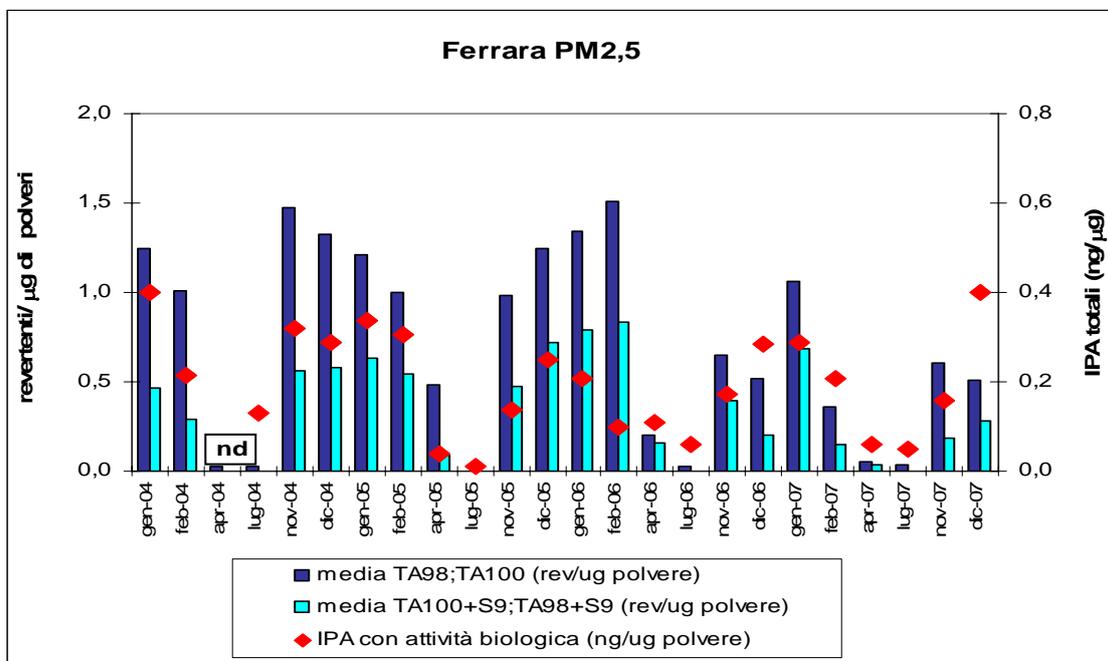


Fig.5 - Comparazione dei livelli di IPA con attività biologica (vedi testo) e attività genotossica determinata con i test sui ceppi TA98 e TA100 con (+S9) e senza attivazione metabolica.



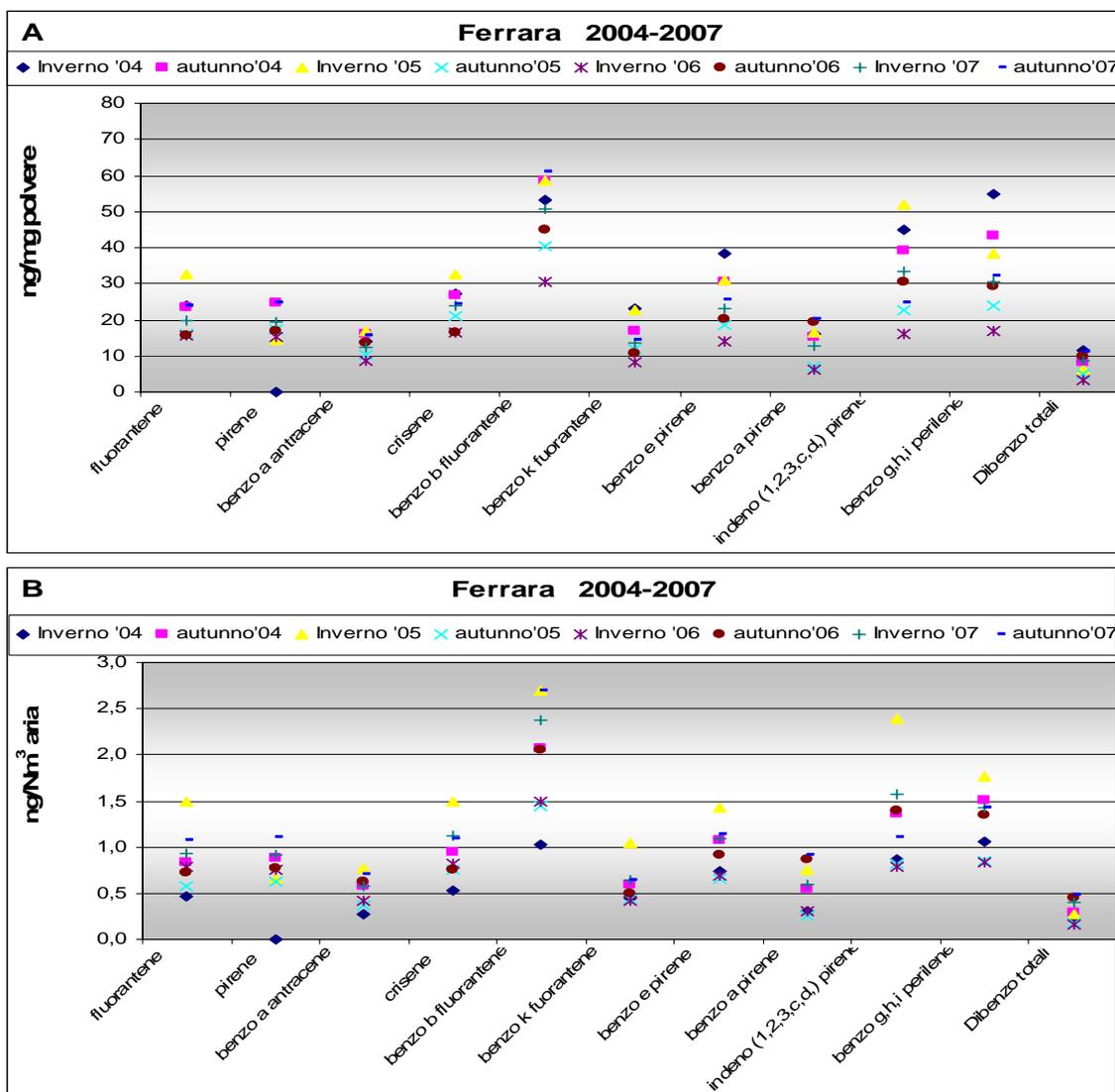
Tab.2 - Coefficienti di determinazione (R^2) ottenuti dalle regressioni tra concentrazioni di IPA dotati di attività biologica (vedi testo) e revertenti indotti, per μg di particolato rilevati nel periodo gennaio 2004 – dicembre 2007.

R^2 fra revertenti/ μg e IPA ng/ μg	
TA 98	0,4
TA 98 +	0,3
TA 100	0,4
TA100+	0,3

In figura 6 si riportano le concentrazioni medie stagionali dei singoli IPA, espresse sia come ng/mg che come ng/Nm³, rappresentando solo i dati relativi ai periodi autunnali (media di novembre e dicembre) e invernali (media di gennaio e febbraio), in quanto più significativi per quanto riguarda la concentrazione di IPA associati alle polveri. Si evidenzia, in tutto il periodo considerato, una costante prevalenza, rispetto agli altri IPA monitorati, a livelli diversi a seconda del periodo, di benzo(b)fluorantene, di indeno(1,2,3-cd)pirene e di benzo(ghi)perilene. Dal momento che questi IPA vengono considerati dall'EPA indicatori di

traffico veicolare, la loro presenza costante sottolinea il contributo del traffico veicolare all'inquinamento e questo è in linea con quanto si riscontra anche negli altri nodi della rete regionale.

Fig.6 - Medie invernali (gennaio e febbraio) e autunnali (novembre e dicembre) delle concentrazioni di IPA con attività biologica determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A) e ng/Nm³ (B), nei periodi indicati. Dibenzo totali = S dibenzo(a,h)antracene, dibenzo(a,l)pirene, dibenzo(a,e)pirene, dibenzo(a,i)pirene, dibenzo(a,h)pirene.



Il contributo delle attività antropiche, in particolare del traffico veicolare, alla mutagenicità del particolato si riscontra dagli elevati coefficienti di correlazione ricavati dal confronto fra

il numero di revertenti/Nm³ di aria, ottenuti con i quattro test utilizzati, e le concentrazioni di CO e di NO₂, rilevate fra gennaio 2004 e dicembre 2007, nello stesso sito di campionamento del particolato atmosferico (*Tab3*).

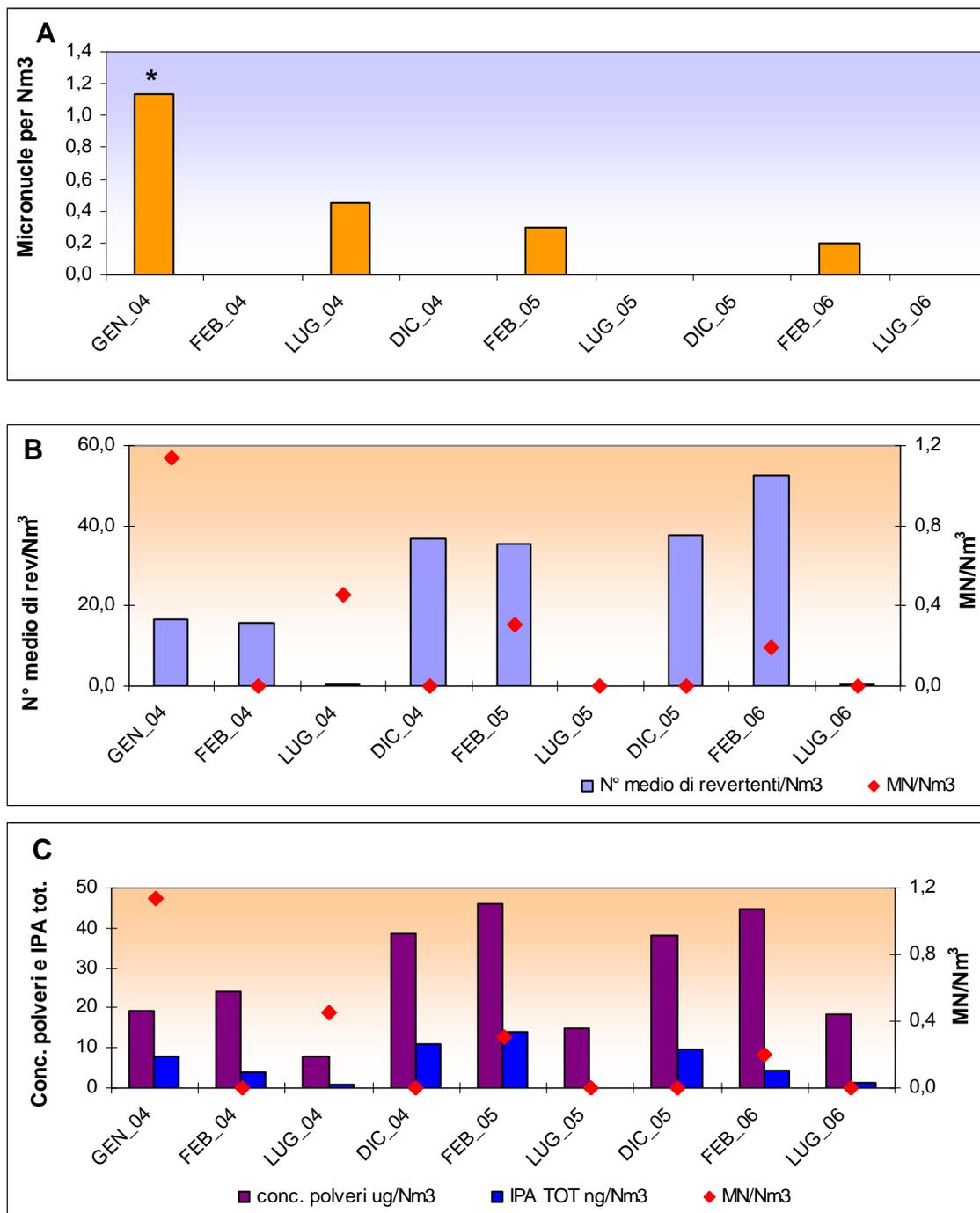
Tab. 3 - Valori dei coefficienti di correlazione "r" ottenuti dal confronto tra le concentrazioni di CO (mg/Nm³) e di NO₂ (µg/Nm³) e i revertenti/Nm³ di aria, rilevati, in ogni test, nel periodo gennaio 2004 – dicembre 2007.

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

Test dei micronuclei

Il test è stato effettuato nel 2004 sui campioni di gennaio, febbraio, luglio e dicembre e dal 2005 sui campioni di febbraio, luglio e dicembre come per gli altri nodi della rete regionale. L'unico test risultato positivo (chi quadrato, p<0,05) resta quello relativo all'estratto di Gennaio 2004 (*Fig7A*). Dai confronti fra MN, IPA e peso del particolato (*Fig7C*) e fra MN e media dei revertenti (*Fig7B*), appare evidente come i micronuclei non correlino con gli altri parametri. Infatti dalle rette di regressione ottenute confrontando i MN con le concentrazioni di IPA e di polveri si sono ottenuti dei coefficienti di determinazione (R²) pressoché nulli; confermando quanto riscontrato in precedenza. Anche la correlazione con la media dei revertenti ottenuti dai quattro test su Salmonella ha dato un coefficiente di correlazione di Pearson (r) pressoché nullo, sottolineando la complementarità dei due test.

Fig.7 - A: Numero di micronuclei indotti per Nm³ equivalenti (*: positività con p < 0,05).
 B: Confronto tra numero di micronuclei e numero medio di revertenti indotti in Salmonella per Nm³ di aria campionata.
 C: Confronto tra numero di micronuclei indotti per Nm³, livelli di IPA con attività biologica (vedi testo) e concentrazione di polveri.



Concludendo, per quanto riguarda l'attività mutagenica del particolato atmosferico campionato a Ferrara, nel periodo 2004 – 2007, si confermano, nei mesi più freddi, valori “positivi” e “fortemente positivi” senza un trend evidente con, tuttavia, nell'autunno 2007 valori di mutagenicità più bassi rispetto a quelli riscontrati negli anni precedenti. Anche nel 2007, come riscontrato negli anni precedenti, risulta prevalente nel PM la presenza di sostanze che provocano danni al DNA direttamente e tramite sostituzione di basi (quali sono ad esempio epossidi, aldeidi, nitrosammine, nitroderivati degli IPA).

Si conferma l'impossibilità di attribuire ad una sola classe di contaminanti la mutagenicità del PM_{2,5} che risulta essere dipendente, nel periodo considerato, non solo dalla “quantità” ma anche dalla “qualità” del particolato stesso.

Dal confronto dei risultati ottenuti dai test condotti su Salmonella e quelli ottenuti dal test dei Micronuclei si evidenzia la complementarità dei due test utilizzati, evidenziando, nel PM_{2,5}, la presenza di sostanze che agiscono sul materiale genetico con meccanismi d'azione differenti.

Si ricorda l'indirizzo del sito web dell'Eccellenza “Mutagenesi Ambientale” dove sono pubblicati i dati relativi alla mutagenicità del particolato atmosferico urbano campionato a Ferrara e del particolato campionato negli altri nodi della rete regionale:

<http://www.arpa.emr.it/mutagenesi>

LA RESPONSABILE DELL'ECCELLENZA

IL RESPONSABILE DEL DIPARTIMENTO TECNICO

Dott.ssa Francesca Cassoni

Dr. Giuseppe Dallara