

***MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITA' DEL
PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO (PM_{2,5}) IN
PIACENZA:
Report anno 2015***

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 Piacenza nel settembre 2000. Il sito di campionamento, da dicembre 2009, è Parco Montecucco e i mesi in cui si effettua il campionamento per i test di mutagenesi sono: Gennaio, Febbraio, Luglio, Novembre e Dicembre.

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 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.

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

In seguito alla decisione della Direzione Generale di Arpa di interrompere l'attività analitica del Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale, avvenuta in dicembre 2015, i test, a partire dai campioni di novembre 2015, sono stati effettuati presso il laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Bioscienze dell'Università di Parma, con cui è stato stipulato un Accordo di Collaborazione e Ricerca, effettivo a partire da gennaio 2016.

Per tutti i nodi della rete regionale non sono stati riportati i dati relativi a dicembre 2015 in quanto, avendo notato, successivamente all'estrazione chimica dei campioni (effettuata presso il LT), un'anomalia nella strumentazione dedicata, ci si riserva di invalidarli o pubblicarli dopo un riesame degli stessi e un confronto con i periodi successivi.

Si riportano di seguito i risultati aggiornati a novembre 2015.

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 campionatore è collocato nella cabina della rete di monitoraggio della qualità dell'aria situata in Montecucco. 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 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 Piacenza.

Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e Nitro-IPA

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 (M_i)⁺ e ai picchi isotopici (M_{i+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 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/μg di polveri dal coefficiente angolare della retta di regressione, ottenuta dal numero di revertenti riscontrati in ciascuna delle piastre per ogni dose (m³ di aria aspirata equivalenti o μg di particolato), considerando solo il tratto lineare della curva dose/risposta al fine di eliminare l'interferenza dovuta all'eventuale presenza di effetto tossico o di altri effetti inibenti. Si considera, a tal fine, solo il coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano un $R^2 \geq 0,60$.

Per rappresentare l'effetto mutageno 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: un campione viene definito tossico quando la mortalità cellulare supera il 30%; in questo caso la dose in oggetto viene definita "tossica" e non ne viene quantificata la genotossicità. 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 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 2015, 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 risultano più alti i valori di FG dei mesi di febbraio e soprattutto di novembre, mentre nel mese di gennaio 2015 si riscontra un valore di FG più basso.

Il valore di FG più alto nel periodo riportato resta quello riscontrato in gennaio 2013.

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	nd	gen-11	57,9	gen-13	121,2	gen-15	50,5
feb-09	nd	feb-11	45,5	feb-13	50,8	feb-15	51,1
lug-09	nd	lug-11	0,4	lug-13	0,5	lug-15	0,2
nov-09	nd	nov-11	64,7	nov-13	46,7	nov-15	50,3
dic-09	49,0	dic-11	103,5	dic-13	nd	dic-15	nr
gen-10	44,0	gen-12	83,2	gen-14	61,3		
feb-10	59,5	feb-12	108,9	feb-14	46,1		
lug-10	0,6	lug-12	0,9	lug-14	0,8		
nov-10	18,3	nov-12	28,0	nov-14	33,0		
dic-10	58,8	dic-12	57,8	dic-14	23,9		

nd = non determinato; nr = non riportato

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.

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

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), nel 2015 le risposte in assenza ed in presenza di attivazione metabolica

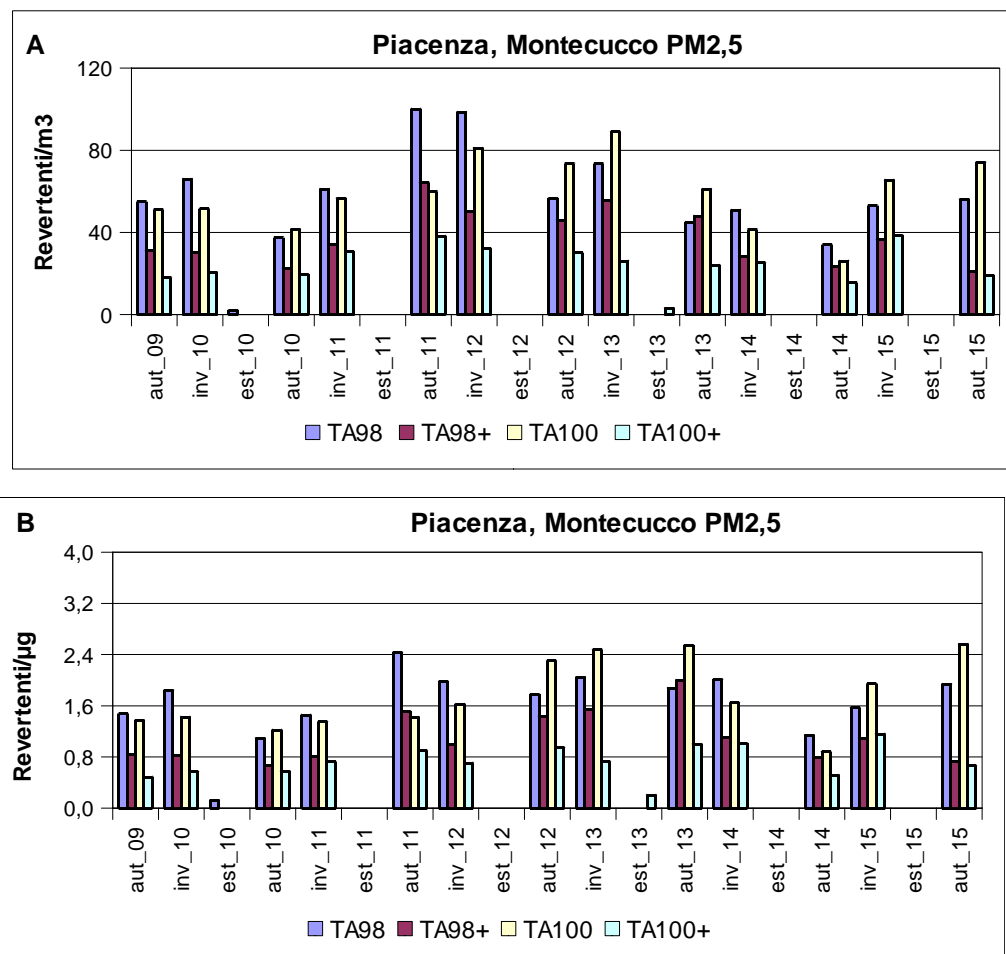
sono simili. Mentre, considerando l'intera serie storica, vi è una maggiore sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica (t di Student, $p < 0,05$, revertenti/m³ di aria e revertenti / μg di polvere) evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena (Fig.1A,B; Tab.2) cioè che possono agire sul DNA direttamente senza essere metabolizzate.

Tabella 2 - Valori dei revertenti per metro cubo di aria e dei revertenti per microgrammo di polveri (PM_{2,5}) calcolati dalla retta di regressione dose/effetto, in tutti i test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+) e senza attivazione metabolica esogena, nei periodi indicati.

PM2,5	revertenti/m ³				PM2,5	revertenti/ μg			
	TA98	TA98+	TA100	TA100+		TA98	TA98+	TA100	TA100+
dic-09	55	31	51	18	dic-09	1,474	0,831	1,367	0,482
gen-10	56	29	47	19	gen-10	1,341	0,695	1,126	0,455
feb-10	76	31	56	22	feb-10	2,335	0,952	1,720	0,676
lug-10	2	0	0	0	lug-10	0,118	0,000	0,000	0,000
nov-10	19	12	23	11	nov-10	0,747	0,472	0,904	0,432
dic-10	56	33	60	28	dic-10	1,431	0,843	1,533	0,715
gen-11	65	36	61	36	gen-11	1,465	0,81	1,375	0,812
feb-11	57	32	52	25	feb-11	1,446	0,812	1,32	0,634
lug-11	0	0	0	0	lug-11	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-11	83	43	42	24	nov-11	2,441	1,267	1,240	0,710
dic-11	118	85	78	52	dic-11	2,418	1,757	1,600	1,079
gen-12	89	43	72	47	gen-12	2,117	1,023	1,712	1,118
feb-12	108	57	90	17	feb-12	1,835	0,969	1,529	0,289
lug-12	0	0	0	0	lug-12	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-12	48	23	58	27	nov-12	1,546	0,741	1,868	0,870
dic-12	65	69	89	33	dic-12	1,997	2,120	2,734	1,014
gen-13	96	86	110	39	gen-13	2,680	2,401	3,071	1,089
feb-13	51	25	68	13	feb-13	1,406	0,689	1,875	0,358
lug-13	0	0	0	3	lug-13	0,000	0,000	0,000	0,201
nov-13	45	48	61	24	nov-13	1,874	1,999	2,541	1,000
dic-13	nd	nd	nd	nd	dic-13	nd	nd	nd	nd
gen-14	53	33	41	23	gen-14	1,890	1,177	1,462	0,820
feb-14	49	24	42	27	feb-14	2,125	1,047	1,824	1,196
lug-14	0	0	0	0	lug-14	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-14	39	26	28	19	nov-14	1,196	0,797	0,859	0,583
dic-14	29	21	24	12	dic-14	1,081	0,782	0,894	0,447
gen-15	54	35	64	29	gen-15	1,488	0,965	1,764	0,799
feb-15	52	38	67	48	feb-15	1,643	1,200	2,116	1,516
lug-15	0	0	0	0	lug-15	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-15	56	21	74	19	nov-15	1,937	0,726	2,559	0,657

nd = non determinato

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.

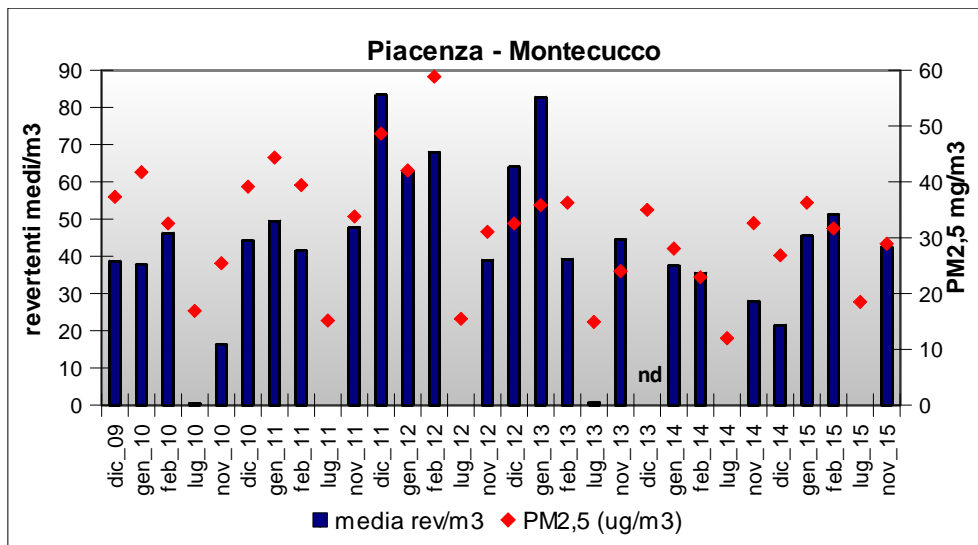


nb:autunno 2009 solo dicembre; autunno 2013 e autunno 2015: solo novembre.

Nell'autunno 2015, nei test condotti in assenza di attivazione metabolica esogena, si riscontrano livelli di mutagenicità più alti rispetto allo stesso periodo dell'anno precedente, (Fig.1A,B; Tab.2). Osservando l'andamento dei revertenti indotti per microgrammo di particolato e cioè l'attività mutagenica specifica del PM (Fig.1B; Tab.2) si nota che in alcuni

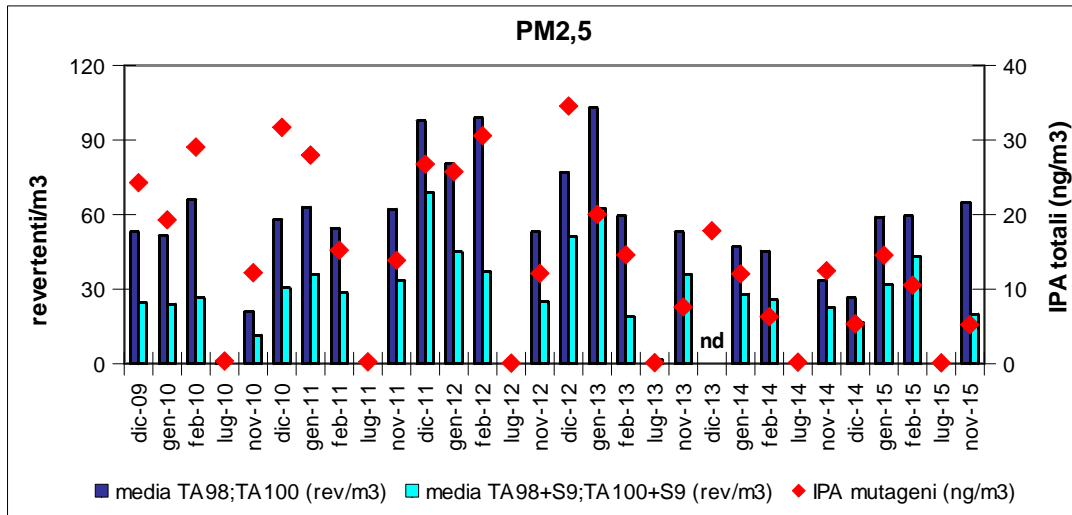
mesi, la maggiore attività mutagena specifica del PM incide di più della concentrazione dello stesso (microgrammo per metro cubo di aria) (Fig.2) sul numero di revertenti per metro cubo di aria. Dal grafico riportato in Figura 2, infatti, si evince che non sempre a una maggiore concentrazione di PM_{2,5} corrisponde un numero maggiore di revertenti indotti per metro cubo di aria, sottolineando e confermando la rilevanza della tipologia e della quantità relativa delle sostanze mutagene associate al PM. Comunque, mettendo in relazione la concentrazione di polveri con il numero medio di revertenti/m³ di aria rilevati da inizio campionamento, si nota una discreta correlazione tra i due parametri, infatti il valore del coefficiente di determinazione R² ottenuto si conferma essere 0,68.

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

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

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 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, sensibili alla presenza di IPA.

Pur evidenziandosi 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, $p < 0.05$) e si conferma una certa discrepanza tra le concentrazioni più alte di IPA e i valori più alti di revertenti indotti (R^2 di 0,54 considerando la media dei revertenti indotti in seguito ad attivazione metabolica esogena). Si conferma anche un forte contributo alla mutagenicità del PM da parte di altre sostanze ad azione mutagena diretta.

Agenzia regionale per la prevenzione, l'ambiente e l'energia dell'Emilia-Romagna

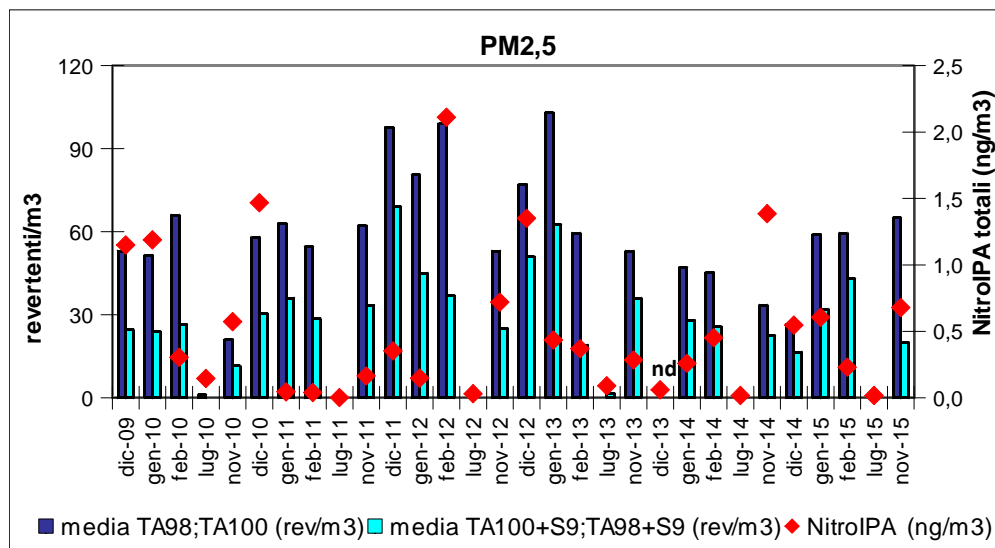
Sede legale Via Po, 5 | 40139 Bologna | P.Iva e C.F. 04290860370 | www.arpae.it | pec_dirigen@cert.arpae.emr.it

Sezione di Parma Viale Bottego, 9 | 43121 Parma | tel 0521/976111 | fax 0521/976112 | pec_aoopr@cert.arpae.emr.it

Per quanto riguarda, invece, l'andamento della concentrazione dei Nitro-IPA, non si osserva la stessa stagionalità evidenziata per gli IPA, infatti, nella serie storica, le concentrazioni di questi inquinanti sono più alte negli autunni rispetto alle estati, mentre le concentrazioni invernali sono simili a quelle delle altre due stagioni (Anova, *post hoc* di Tukey, $p < 0.05$). 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 nemmeno corrispondenza tra la maggiore attività mutagenica diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA (Fig.4), evidenziando il contributo di altre sostanze alla mutagenicità del PM. Occorre tenere in considerazione che nei confronti tra il numero dei revertenti indotti e le concentrazioni di Nitro-IPA, i valori in assoluto di queste ultime sono molto molto bassi, rispetto a quelli dei revertenti.

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



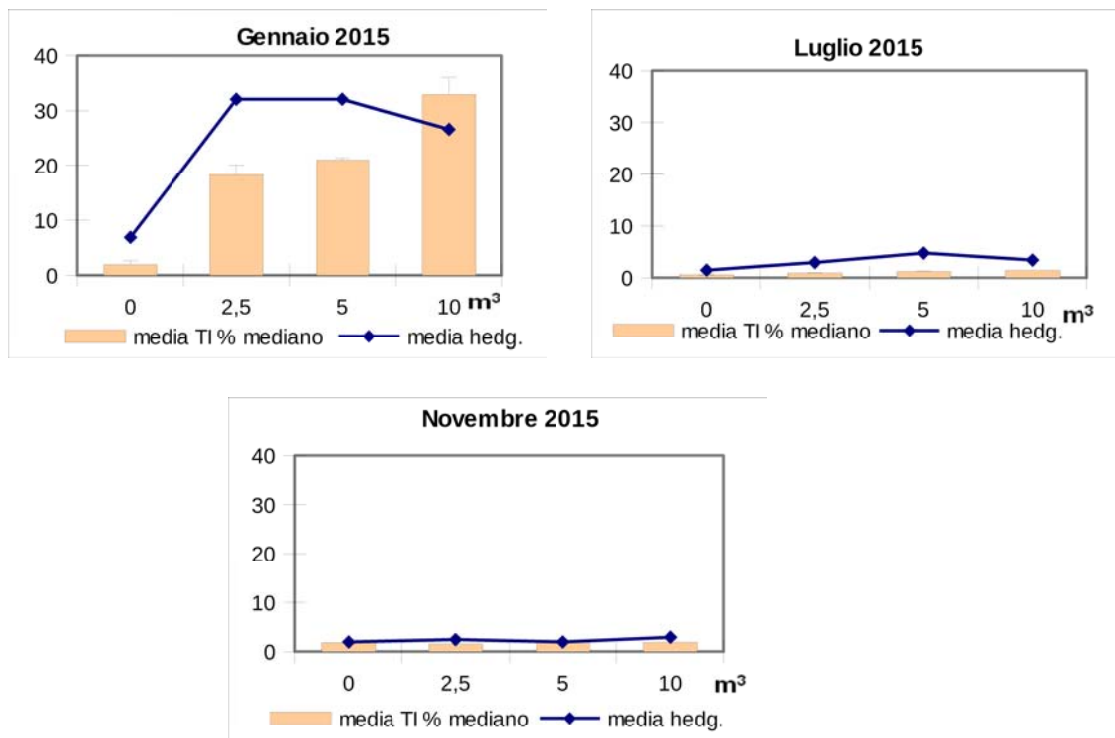
nd = non determinato

Test della cometa

In Figura 5 vengono illustrati i risultati ottenuti dai tre campioni analizzati nel 2015: 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).

Come nel 2014, nel 2015 solo il campione di gennaio ha causato rotture al DNA, in modo statisticamente significativo a tutte le dosi saggiate (test della mediana, $p < 0,05$), mentre i campioni di luglio e di novembre sono risultati negativi e si evidenzia una minore genotossicità del PM rispetto agli anni precedenti.

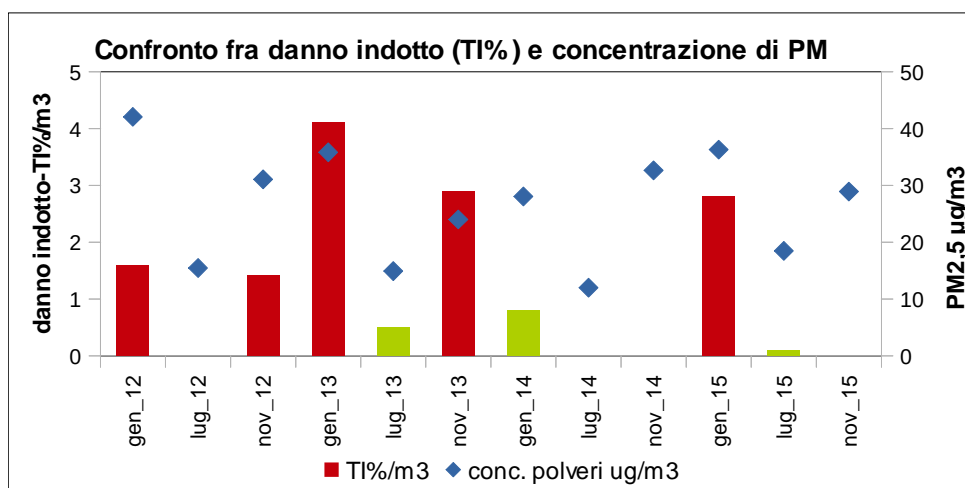
Figura 5 – Grafici dose-risposta dei campioni analizzati nel 2015. Vengono riportati, per ogni dose, la media dei valori del danno al DNA - espresso come percentuale di TI - e della tossicità indotta dal campione - espressa come hedgehogs % - (vedi testo)



In nessun caso si osserva la presenza di effetto tossico sulle cellule subito dopo il trattamento con il campione, mentre il campione di gennaio, nella fase di lettura, ha mostrato un aumento di cellule “hedgehogs” a partire dalla dose più bassa, che tuttavia, non aumenta all'aumentare della dose.

Mettendo in relazione la concentrazione di polveri con l'aumento della percentuale di intensità di fluorescenza nella coda per metro cubo non si osserva una corrispondenza fra la maggiore attività genotossica e la più alta concentrazione di PM (Fig. 6), infatti il valore del coefficiente di determinazione R^2 ottenuto è solo di 0,30.

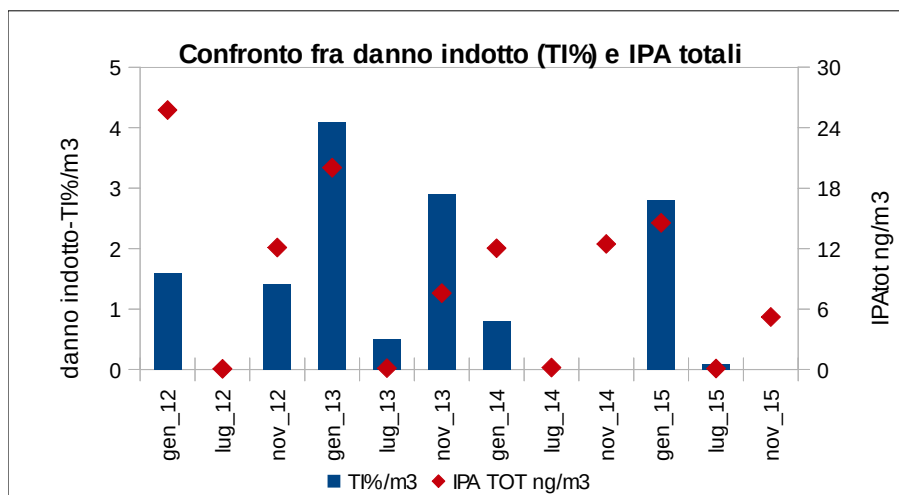
Figura 6 – Andamenti comparati del danno indotto per metro cubo d’aria equivalente (espresso come percentuale di TI, vedi testo) ottenuto dai coefficienti angolari delle curve dose effetto (le barre rosse indicano i campioni positivi) e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri



Come si può constatare dalla Figura 7, non si nota nemmeno corrispondenza, nella maggior parte dei mesi, fra le concentrazioni (nanogrammi per metro cubo di aria) di IPA totali (vedi paragrafi precedenti) con l'induzione di danno alle cellule A549 (%TI per metro cubo di aria), confermata da un R^2 di 0,39.

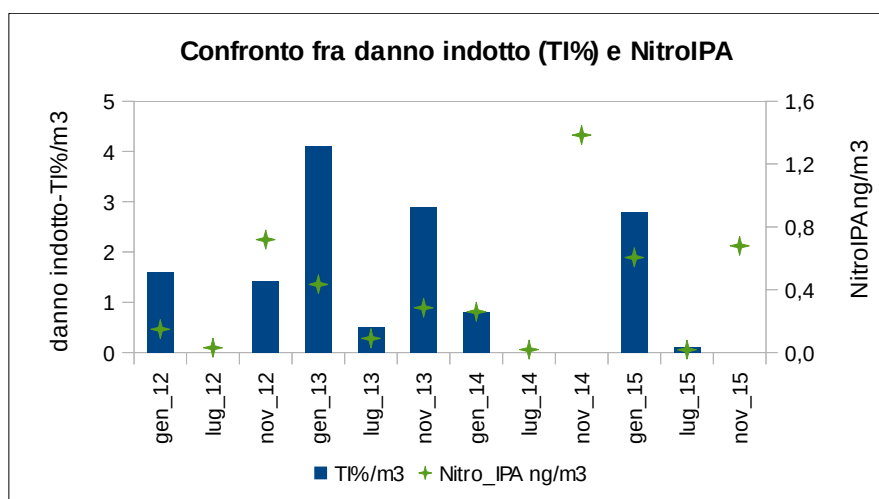
L'andamento dei TI% e dei nitroderivati degli IPA non è assolutamente confrontabile (Fig.8) il valore del coefficiente di determinazione R^2 ottenuto, infatti, è 0,00.

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



Si conferma ciò che è stato riscontrato in Salmonella, ovvero che spesso le singole classi di contaminanti chimici, seppur importanti nel processo di mutagenesi come ad esempio i Nitro-IPA, non sono utili per definire in toto la mutagenicità del particolato atmosferico.

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 0,78, ciò indica, almeno in base ai dati al momento disponibili, che l'utilizzo di batteri e di cellule umane porta a risultati non completamente sovrapponibili, ma abbastanza comparabili.

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. Come nel 2014, anche nel 2015 si osservano valori di mutagenicità, intesa come revertenti indotti per metro cubo di aria, più bassi rispetto al periodo autunno 2011 - inverno 2013, nella maggior parte dei test.

Si ricorda che, per un problema tecnico, non è stato sottoposto ai test il particolato di dicembre 2013 e questo potrebbe aver inciso sui valori medi di mutagenicità di quella stagione autunnale (media dei mesi di novembre e dicembre). Si ricorda anche che ci si riserva di invalidare o pubblicare i dati relativi a dicembre 2015 dopo un riesame degli stessi e un confronto con i periodi successivi.

Per quanto riguarda la genotossicità evidenziata con il test della Cometa sulla linea cellulare umana A549, nel 2015, si evidenzia per i mesi di gennaio e di luglio corrispondenza con la positività del mese di gennaio e con la negatività del mese di luglio rilevate con i test su Salmonella. Quindi per quanto riguarda il campione di PM prelevato a Montecucco in gennaio, essendo risultato positivo in entrambi i test, evidenzia la presenza di sostanze ad esso associate in grado di indurre sia mutazioni di tipo puntiforme che rotture a singolo e/o a doppio filamento nel DNA. Per quanto riguarda il campione di novembre, invece, risultato positivo in Salmonella, nel test della Cometa, è risultato negativo. 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.

Dai dati disponibili relativi al confronto tra IPA e attività mutagena del particolato, rilevata con i test su Salmonella, pur essendo evidente la stessa stagionalità, si evidenzia una certa discrepanza tra le concentrazioni più alte di IPA e i valori più alti di revertenti indotti. Si conferma anche che il maggior contributo alla mutagenicità del PM è dato da sostanze ad

azione mutagena diretta, cioè sostanze che possono agire direttamente sul DNA, ma che per lo più sembrano non appartenere ai derivati degli IPA rilevati. Questo lo si evidenzia dalla mancata corrispondenza tra la maggiore attività mutagena diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA rilevati nel periodo considerato. Si riscontra invece, sempre per quanto riguarda i test su Salmonella, una discreta correlazione tra la concentrazione di polveri e il numero medio di revertenti/m³ di aria rilevati da inizio campionamento.

Dal confronto delle concentrazioni di IPA, di NitroIPA totali e di PM con l'induzione di danno al DNA nelle cellule A549 (%TI) rilevato con il test della Cometa, non si evidenzia alcuna corrispondenza fra questi parametri. Occorre 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 dal 2008.

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.

L'utilizzo di test con end point genetici diversi permette di ampliare le informazioni sui possibili danni al DNA provocati dal PM, risultando un utile strumento per verificarne in modo più completo l'eventuale genotossicità e quindi pericolosità per la popolazione esposta. 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 Piacenza e del particolato campionato negli altri nodi della rete regionale:

http://www.arpa.emr.it/dettaglio_generale.asp?id=2871&idlivello=1610

Responsabile Laboratorio Tematico
Mutagenesi Ambientale
Dott.ssa Francesca Cassoni