



SEZIONE PROVINCIALE DI PARMA

Via Spalato, 4

43100 - Parma

E-mail: sez@pr.arpa.emr.it

Eccellenza

“Mutagenesi Ambientale”

MONITORAGGIO

DELLA MUTAGENICITÀ DEL

PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:

RETE REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA -

AGGIORNAMENTO ANNO 2005

A cura di:

Dr.ssa Francesca Cassoni

Responsabile Eccellenza “Mutagenesi Ambientale”

Dr.ssa Clara Bocchi

Eccellenza “Mutagenesi Ambientale”

Prot. Arpa: PG/PR/2006/5863

06 Luglio 2006

Si ringrazia per la collaborazione nella redazione e per il supporto tecnico-scientifico:

Dr.ssa Anna Martino - Dipartimento di Genetica Biologia dei Microrganismi
Antropologia Evoluzione, Università degli Studi di Parma

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

Dr. Gallinari G, Lodigiani A (Piacenza); Dr.ssa Cassoni F, Dr.ssa Bocchi C, Fontana F, Pinto G (Parma); Dr.ssa Guerra L (Modena); Dr.ssa Casali AM (Bologna); Dr.ssa Canossa E (Ferrara); Dr.ssa Lombardi F, Dr.ssa Nizzoli C (Forli-Cesena); Dr.ssa Lucialli P (Ravenna); Dr.ssa Anelli P, Dr. Zamagni M (ARPA-Rimini).

Collaborazioni:

Eccellenza "Microinquinanti organici", Arpa Emilia-Romagna, Sezione Provinciale di Ravenna: Dr. Ivan Scaroni → Analisi in gas-massa degli IPA.

INTRODUZIONE	1
Siti e periodi di campionamento del particolato atmosferico	2
MATERIALI E METODI	3
RISULTATI	
<u>Test su Salmonella</u>.....	6
<u>Test dei micronuclei</u>.....	20
CONCLUSIONI.....	22

INTRODUZIONE

L'attività della rete regionale di monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico (Particulate Matter - PM) urbano, iniziata nel 1997 con il monitoraggio delle Polveri Totali Sospese (PTS) e proseguita dal 2000 con il monitoraggio della frazione PM_{2,5} (particelle con diametro aerodinamico $\leq 2,5 \mu\text{m}$, gestita da Arpa Emilia-Romagna, è proseguita anche nell'anno 2005. Nel febbraio 2005 è iniziato il monitoraggio della mutagenicità del PM_{2,5} anche a Ravenna, interrompendo quello del PM₁₀ che era iniziato nel settembre 2000. Inoltre nell'ottobre 2005 è stato interrotto definitivamente il campionamento a Cesena.

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.

Dall'anno 2004 per ampliare la conoscenza dell'effetto genotossico globale del PM, oltre alla ricerca di sostanze in grado di indurre mutazioni puntiformi, eseguita con i test su Salmonella, su alcuni campioni viene effettuato anche il test dei Micronuclei (MN) su linfociti umani coltivati *in vitro*. Questo test è in grado di rilevare la presenza di sostanze che inducono rotture (sostanze clastogene) e/o che causano la perdita di interi cromosomi (sostanze aneuploidogene); è stata inoltre verificata l'eventuale relazione dei micronuclei con alcune classi di contaminanti fisico-chimici. Il test dei MN viene effettuato sul particolato campionato nelle città di Parma, Bologna, Ferrara, Ravenna e Rimini, nei mesi di febbraio, luglio e dicembre.

Siti e periodi di campionamento del particolato atmosferico

In tabella 1 si riportano i siti e l'inizio dell'attività delle stazioni di prelievo della frazione PM_{2,5} della rete regionale.

Tabella 1. –

PM_{2,5}				
<i>Città e data di inizio monitoraggio</i>	<i>Sito di Campionamento</i>	<i>Tipologia sito</i>	<i>Campionatore</i>	<i>N° di residenti/comune</i>
Piacenza da settembre 2000	Via Piatti (UTMX: 554369; UTMY: 4988119)	media intensità di traffico veicolare e alta densità abitativa.	Giornaliero (TECORA)	95594
Parma da settembre 1998	Via Spalato 2 (UTMX: 604020; UTMY: 4961955) fino a ott.03; da nov. 03, V.le Vittoria (UTMX: 603955; UTMY: 4961930)	Via Spalato: media intensità di traffico veicolare e alta densità abitativa; Viale Vittoria: alta intensità di traffico veicolare.	Giornaliero (TECORA)	163457
Modena da settembre 2000	Via Cimone, quartiere Terranova (UTMX: 651585; UTMY: 4946899)	media intensità di traffico veicolare e alta densità abitativa	Sequenziale RANCON mod. PARTISOL PLUS	175502
Bologna Lug '00-Dic-'01, da Ott '02	Zona Malpighi (UTMX: 686884; UTMY: 4930352)	media intensità di traffico veicolare e alta densità abitativa.	Giornaliero (TECORA)	371217
Ferrara Da marzo 2003 (con discontinuità)	Corso Isonzo – Viale Cavour UTMX: 705514; UTMY:967725)	alta densità abitativa e ad alto traffico veicolare	Sequenziale (TECORA)	130992
Forlì da novembre 2000 (con discontinuità)	V.le Salinatore 20 (UTMX: 742413; UTMY: 4900964)	elevata intensità di traffico veicolare	Giornaliero (TECORA)	108335
Cesena da novembre 2000 (con discontinuità)	Via Rio Marano 38 (UTMX: 761743; UTMY: 4891726)	elevata intensità di traffico veicolare	Giornaliero (TECORA)	90948
Rimini da agosto 2000	Via Abete (UTMX: 304490; UTMY: 4880230)	media intensità di traffico veicolare e alta densità abitativa.	Giornaliero (TECORA)	128656
Ravenna da febbraio 2005	Caorle (UTMX: 756779; UTMY: 923600)	stazione di fondo urbano residenziale	Sequenziale (TECORA)	134631

MATERIALI E METODI

Campionamento ed estrazione del particolato atmosferico

Il prelievo del particolato con diametro aerodinamico $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) viene effettuato ad un'altezza compresa tra 1,5 e 3 metri da terra. Il particolato è raccolto su filtri in fibra di quarzo o teflon; tramite campionatori giornalieri o sequenziali (Tab.1). Il campionamento è continuo per tutte le 24 ore e il flusso di aspirazione di circa 16,7 l/min.

Il peso delle polveri viene determinato con metodo gravimetrico.

Il campione mensile è dato dall'insieme dei filtri giornalieri, ogni campione 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 $50 \text{ Nm}^3/\text{ml}$ per i test su Salmonella e di $200 \text{ Nm}^3/\text{ml}$ per il test dei Micronuclei.

Il campionamento e l'estrazione chimica del campione vengono effettuati presso i singoli nodi della rete regionale.

Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

La determinazione degli IPA viene effettuata, dal novembre 2003, presso la Sezione provinciale di Ravenna, nell'ambito delle attività dell'Eccellenza "Microinquinanti organici", negli stessi estratti di particolato da sottoporre a test di mutagenesi.

L'aliquota degli estratti organici provenienti dall'estrazione del materiale particellare 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 ($\text{Mi}+1$)⁺.

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)perilene; dibenzo(a,e)pirene, dibenzo(a,i)pirene, dibenzo(a,h)pirene.

Il confronto con i risultati dei test di mutagenesi viene fatto solo con gli IPA con 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,h)antracene, 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 su Salmonella (test di Ames) si basa sulla retromutazione in quanto utilizza ceppi di batteri (*Salmonella typhimurium*) recanti ognuno un diverso tipo di mutazione nel gene deputato alla sintesi dell'istidina, che li rende incapaci di crescere in assenza di questo aminoacido. La positività (intesa come mutagenicità) viene valutata sul numero dei batteri che riacquistano la capacità di crescere in assenza di istidina in seguito ad una seconda mutazione (retromutazioni), dovuta all'esposizione a sostanze mutagene. I batteri che riacquistano tale capacità sono detti revertenti.

L'utilizzo di due ceppi di *Salmonella typhimurium* permette di evidenziare diversi tipi di danni 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 saggiano 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 del campione sui 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 tossica, inducendo un rallentamento delle divisioni cellulari, provoca un abbassamento dell'indice CBPI (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.

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, ovvero la 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 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 avere 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 anche mediante il valore dei MN/Nm³ di aria, rappresentato dal coefficiente angolare della retta di regressione dei dati considerando solo il 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 nei periodi indicati (Tab.2), si conferma una presenza costante di sostanze mutagene con valori più elevati nei periodi autunno-invernali e minimi nei periodi più caldi senza un trend evidente. I valori più bassi, nel 2005, si riscontrano a Rimini.

Tabella 2 – Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano, Arpa Emilia-Romagna.

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

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

	PC	PR	MO	BO	FE	FO	Cesena	RN	RA
Gen 01	49,2	9,3	23,2	22,1	nd	12,8	6,7	6,2	nd
Feb01	24,1	12	54,6	35,3	nd	6,3	6,3	2,5	nd
Apr01	1,7	3	2,1	1,8	nd	4,7	1,3	0,4	nd
Lug01	9	1	1,8	3,4	nd	1,9	2	0,5	nd
Nov01	26,6	27,6	22,1	19,9	nd	nd	nd	3,9	nd
Dic01	78,5	37,7	35,3	20,4	nd	40,1	nd	4,3	nd
Gen 02	43,6	47	14,4	nd	nd	89,4	32,8	8,1	nd
Feb02	35,8	32,8	15,2	nd	nd	30,8	23,4	2,2	nd
Apr02	3,4	5,9	0,6	nd	nd	13,1	4,9	0,6	nd
Lug02	0,8	0,3	1,2	nd	nd	1,3	1,4	0,5	nd
Nov02	25,4	8,9	33,5	17,2	nd	19,9	5,3	1,6	nd
Dic02	12,4	19,6	21,7	16,6	nd	24,2	12,3	9,7	nd
Gen03	35,5	21,7	16,8	nd	nd	27,4	23,5	7,1	nd
Feb03	25,9	24,7	41,9	16,4	nd	27,1	17,2	25,7	nd
Apr03	4,8	3,5	4,6	2,2	1,4	4,5	2,4	1,7	nd
Lug03	1,7	0,7	0,5	0,4	0,5	1,8	1,8	0,3	nd
Nov03	18,3	6,8	19,5	20,7	13,2	18,6	19,2	34	nd
Dic03	28,7	6,4	9	6,1	nd	34,5	28	46,9	nd
Gen04	13	31,8	19,5	14,5	13,9	32,3	17,3	42,1	nd
Feb04	16,5	12,2	16,4	16,7	20,8	14,5	nd	22,7	nd
Apr04	4,3	2,4	0,3	1,8	1,9	1,9	4,6	4,5	nd
Lug04	1,1	0,8	0,3	0,5	0,9	0,5	0,3	0,6	nd
Nov04	21,5	19,6	17,8	18,7	27,2	33	28,6	nd	nd
Dic04	54,4	14,7	13,5	25,5	49,5	36,4	nd	14,6	nd
Gen05	29,3	14,8	23,9	11,7	71,1	38,1	nd	5,2	nd
Feb05	20,2	11,7	4,3	21,7	45,4	37,2	nd	11,2	25,1
Apr05	3,5	1,7	1,8	4,6	6,8	8,3	3,6	2,6	nd
Lug05	0,7	0,9	0,6	0,7	0,5	1,5	2	3,0	0,2
Nov05	16,7	9,3	7,8	13,8	29,2	19,6	nd	2,5	3,0
Dic05	36,5	38,6	10,8	51,8	50,1	18,6	nd	12,9	16,2

Nelle Figure 1 e 2 si riportano rispettivamente le medie dei revertenti per Nm³ di aria e le medie dei revertenti per µg di particolato, rilevati con i quattro test utilizzati, nei nodi della rete, calcolate per i periodi autunnali e invernali in quanto ritenuti più significativi per quanto riguarda la mutagenicità del particolato atmosferico.

Figura 1. - Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano, Arpa Emilia-Romagna. Mutagenicità del particolato atmosferico urbano (PM_{2,5}) rilevata come numero medio (medie stagionali: autunnali e invernali) di revertenti/Nm³ di aria, rilevata nei periodi e nei siti indicati.

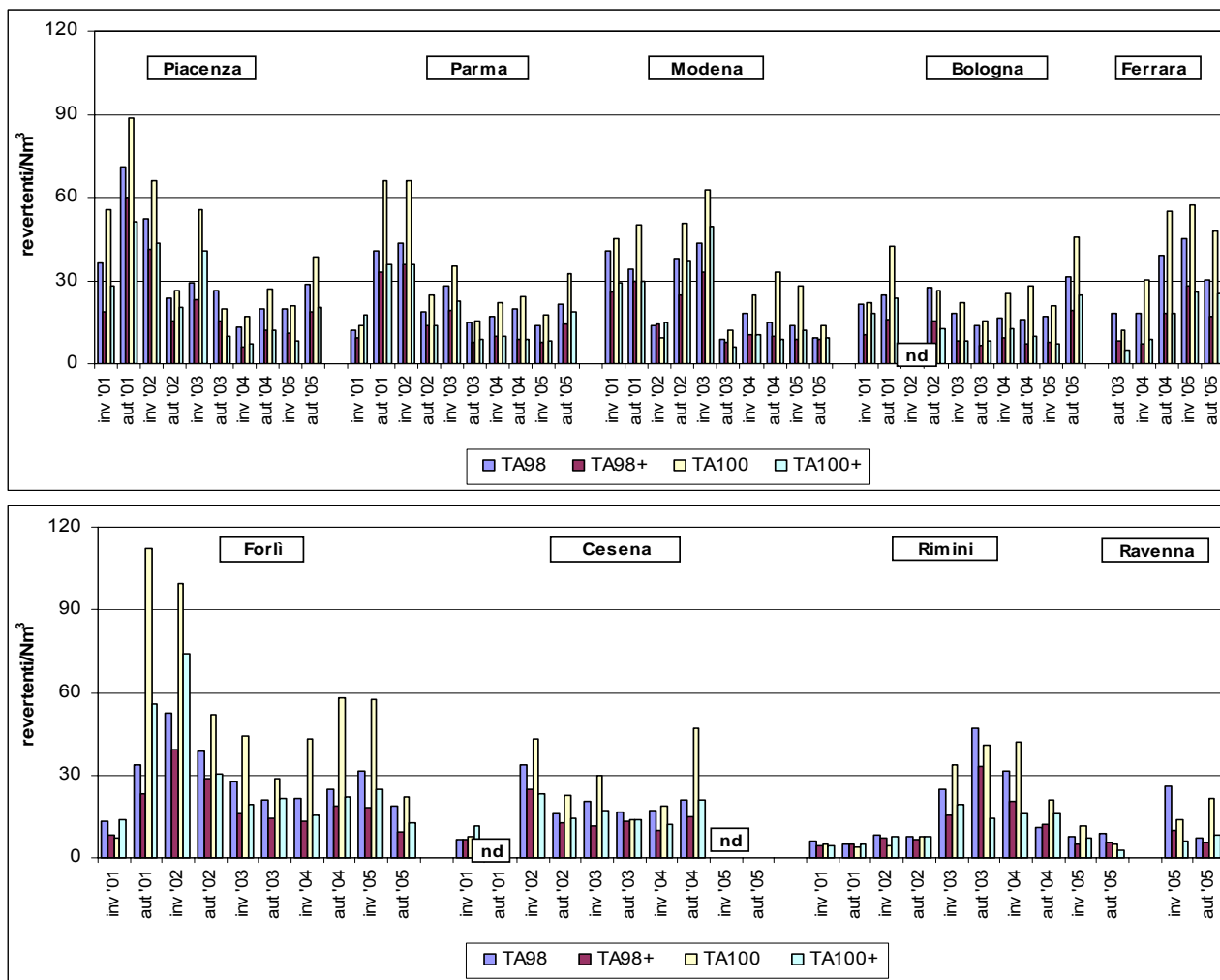
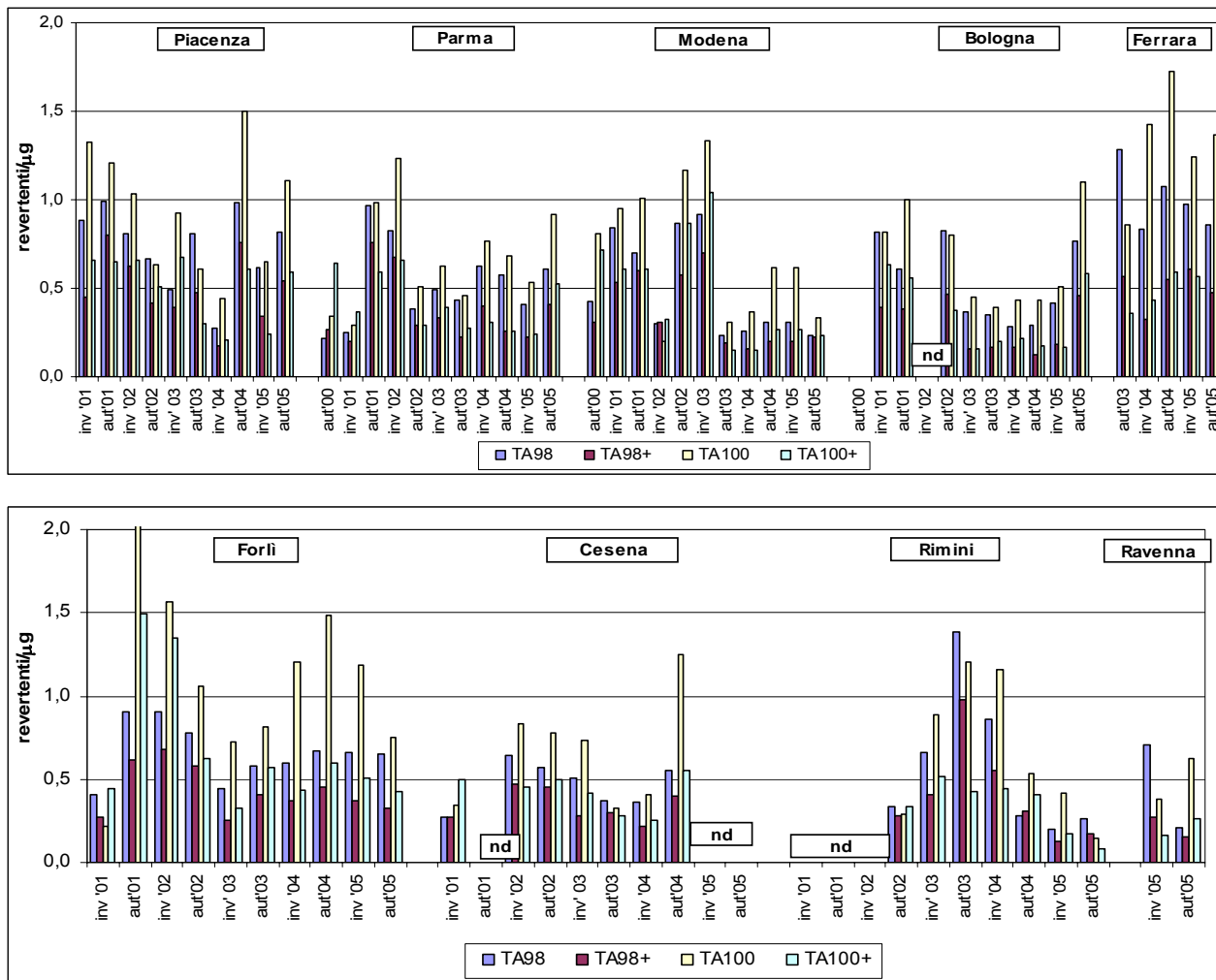


Figura 2. - Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano, Arpa Emilia-Romagna.

Mutagenicità del particolato atmosferico urbano (PM_{2,5}) rilevata come numero medio (medie stagionali: autunnali e invernali) di revertenti/μg di polveri, rilevata nei periodi e nei siti indicati.



Valutando l'aspetto "qualitativo" (es.: induzione di mutazioni per sostituzione piuttosto che per inserzione o delezione di basi, presenza di mutageni diretti o di promutageni) della mutagenicità del particolato, in tutti i nodi della rete, nell'intero periodo aggiornato al 2005, si conferma quanto riscontrato in precedenza e cioè che i valori più elevati di revertenti per Nm³ e per μg di polveri sono quelli rilevati con i test condotti in assenza di attivazione metabolica esogena per entrambi i ceppi di Salmonella (t di Student per dati appaiati, p<0,005), evidenziando nel PM una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta. Si ricorda che a Forlì e Parma la miscela complessa PM ha subito un cambiamento nel tempo, infatti, fino agli ultimi mesi del 2001 era prevalente la risposta del ceppo TA100 in presenza di attivazione metabolica, mentre nel periodo successivo si assiste ad una inversione di

tendenza, dimostrando un cambiamento nel rapporto fra mutageni diretti e indiretti che inducono sostituzione di base.

Dal punto di vista “quantitativo” (numero di revertenti per Nm³ di aria e numero di revertenti per µg di particolato) l’attività mutagena del PM, all’interno di ogni nodo, mostra continue variazioni negli anni, senza un trend evidente. Da notare come, in termini quantitativi, le differenze nel numero di revertenti indotti per Nm³ di aria non corrispondono sempre alle differenze nel numero di revertenti indotti per µg di particolato. Questo significa che il livello dell’attività specifica delle polveri, dovuto alla quantità di sostanze mutagene ad esse associate, varia sia tra le città che all’interno della stessa città nel tempo.

Confrontando i valori di mutagenicità fra i nodi della rete si riscontrano differenze quantitative anche fra città con siti di campionamento simili per quanto riguarda l’intensità del traffico veicolare e le concentrazioni dei tradizionali inquinanti chimici, come NO₂ e CO.

Gli andamenti della mutagenicità del PM (sommatoria dei revertenti/Nm³) e della concentrazione delle medie mensili delle polveri (Tab.3, Fig.3), in generale, sono simili, anche se la correlazione tra questi parametri non è sempre evidente. Infatti, i valori dei coefficienti di determinazione (R²) ottenuti dalle regressioni lineari tra concentrazioni di particolato (µg/Nm³) e numero totale di revertenti indotti per Nm³ di aria, differiscono a seconda dei siti di campionamento (Tab.4). Inoltre anche considerando siti comparabili per intensità di traffico veicolare e densità abitativa si riscontra che non sempre a parità di concentrazione di PM_{2,5} corrispondono livelli comparabili di mutagenicità (Fig.4). Questo conferma quanto già riscontrato in precedenza e cioè che la mutagenicità è determinata non solo dalla quantità del particolato atmosferico, ma, soprattutto, dalle sue caratteristiche chimiche.

Figura 3. – Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione $PM_{2,5}$), Arpa Emilia-Romagna. Concentrazioni (medie mensili) di particolato atmosferico ($PM_{2,5}$) ($\mu\text{g}/\text{Nm}^3$).

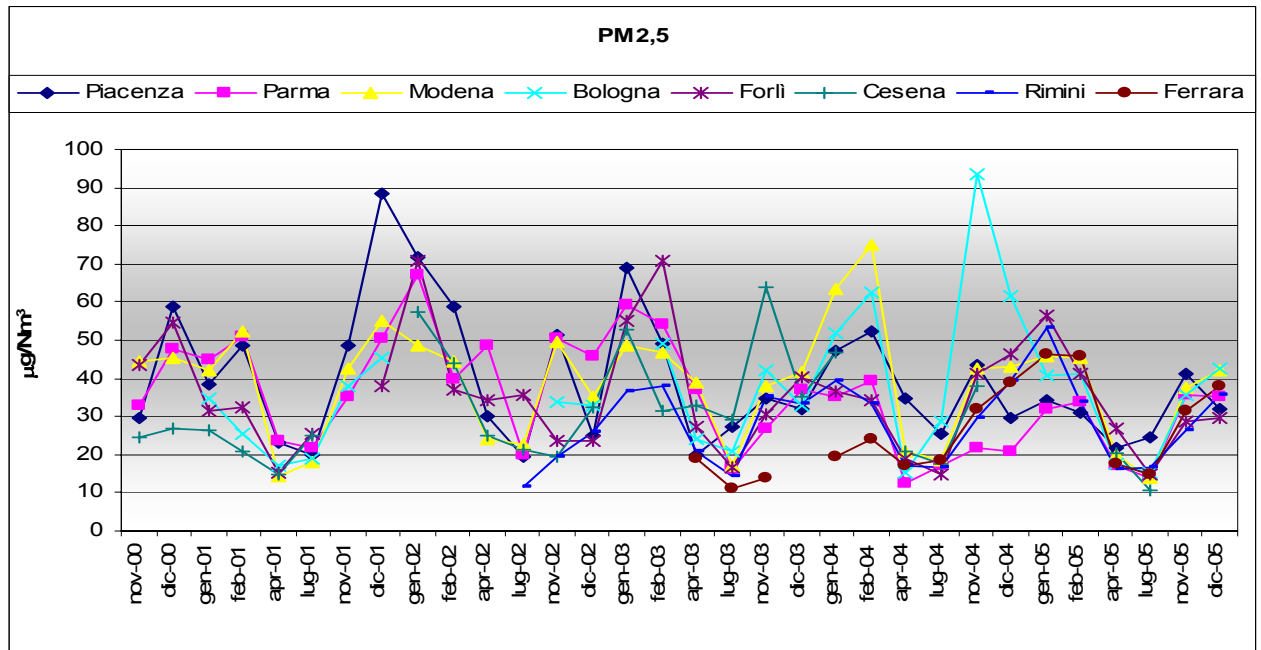


Figura 4. – Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione $PM_{2,5}$), Arpa Emilia-Romagna. Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, frazione $PM_{2,5}$, espressa come sommatoria dei revertenti/ Nm^3 indotti da estratti di campioni mensili e della concentrazione (medie mensili) delle polveri ($\mu\text{g}/\text{Nm}^3$), nelle città e nei periodi indicati.

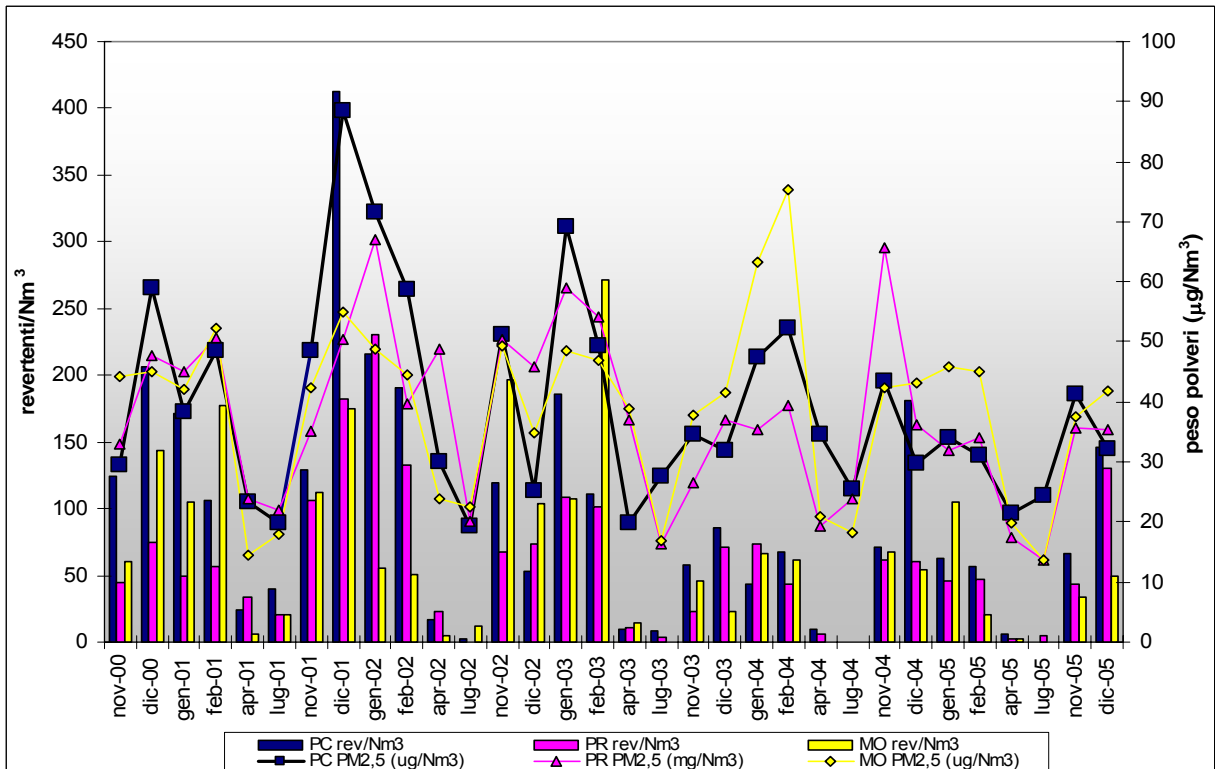


Tabella 3. – Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione PM_{2,5}), Arpa Emilia-Romagna.

Concentrazioni (medie mensili) di particolato atmosferico (PM_{2,5}) (µg/Nm³).

	Piacenza	Parma	Modena	Bologna	Ferrara	Forlì	Cesena	Rimini	Ravenna
Gen01	38,42	45,04	42,14	34,61	nd	31,43	26,47	nd	nd
Feb01	48,63	50,75	52,31	25,29	nd	32,39	20,86	nd	nd
Apr01	23,35	23,82	14,36	17,01	nd	15,42	14,84	nd	nd
Lug01	19,81	21,95	17,90	19,05	nd	25,27	24,90	nd	nd
Nov01	48,55	35,10	42,49	38,15	nd	nd	nd	nd	nd
Dic01	88,59	50,48	54,96	45,15	nd	38,00	nd	nd	nd
Gen02	71,64	67,11	48,73	nd	nd	70,91	57,42	nd	nd
Feb02	58,78	39,63	44,37	nd	nd	37,09	43,79	nd	nd
Apr02	30,09	48,84	23,85	nd	nd	34,04	25,01	nd	nd
Lug02	19,31	20,00	22,59	nd	nd	35,59	21,18	11,79	nd
Nov02	51,23	50,63	49,39	33,84	nd	23,42	19,36	19,35	nd
Dic02	25,07	45,75	34,97	32,65	nd	23,46	32,32	25,85	nd
Gen 03	69,16	59,06	48,44	nd	nd	54,97	52,57	36,61	nd
Feb03	49,23	54,26	46,88	49,29	nd	70,93	31,67	38,14	nd
Apr03	19,80	37,06	38,88	24,05	18,79	27,44	32,98	20,75	nd
Lug 03	27,49	16,41	16,99	20,71	11,28	16,78	29,24	14,44	nd
Nov03	34,60	26,64	37,93	42,10	14,03	30,45	63,66	35,13	nd
Dic03	31,81	36,99	41,60	32,67	nd	40,30	35,29	33,19	nd
Gen 04	47,33	35,29	63,22	51,91	19,25	36,59	46,54	39,34	nd
Feb04	52,32	39,31	75,23	62,67	24,3	34,31	nd	33,48	nd
Apr04	34,61	19,36	20,93	15,07	17,06	18,87	20,65	17,23	nd
Lug 04	25,41	23,77	18,33	28,61	18,70	14,93	17,77	16,75	nd
Nov04	43,47	65,68	42,48	93,53	31,91	41,33	37,74	29,65	nd
Dic04	29,84	36,19	43,22	61,59	38,78	46,41	nd	39,20	nd
Gen 05	34,10	31,85	45,75	40,77	46,11	56,57	nd	53,11	nd
Feb05	30,98	33,92	45,15	41,31	45,88	41,03	nd	33,99	36,83
Apr05	21,55	17,35	19,91	17,39	17,74	26,77	20,45	15,99	nd
Lug 05	24,35	13,73	13,79	15,11	15,02	14,72	10,64	16,79	21,65
Nov05	41,31	35,73	37,65	35,42	31,60	28,91	nd	26,26	23,98
Dic05	32,16	35,40	41,91	42,75	38,15	29,43	nd	35,54	37,48

Tabella 4. –

Confronto fra concentrazione (µg/Nm³) di polveri (PM_{2,5}) e numero di revertenti/Nm³ totali.

gen-01/dic-05	
Città	R²
Piacenza	0,7
Parma	0,5
Modena	0,3
Forlì	0,5

Sempre al fine di una migliore caratterizzazione dell'inquinamento di fondo del sito di campionamento, sono state registrate le concentrazioni medie mensili di NO₂ e CO (Fig.5), rilevate nello stesso sito di campionamento del particolato atmosferico da sottoporre a test di mutagenesi e sono state analizzate, aggiornandole con i dati del 2005, le correlazioni con il numero di revertenti/Nm³ di aria, ottenuti con i quattro test utilizzati. Infatti si ricorda che questi gas, pur non avendo un rapporto di causa-effetto con la mutagenicità del particolato, sono, in generale, dei buoni indicatori di inquinamento antropico e, a volte, possono essere anche dei buoni descrittori dell'andamento della mutagenicità del particolato atmosferico per un determinato sito.

I coefficienti di correlazione (r) ottenuti confrontando il numero di revertenti/Nm³ con le concentrazioni di CO e NO₂ (Tab.5) differiscono tra i nodi della rete, variando da valori di r di 0,4 fino a r di 0,9, evidenziando, anche in questo caso, la molteplicità dei fattori che intervengono nel determinare la mutagenicità del PM. Questo viene confermato anche dall'osservazione che a parità di concentrazione di questi inquinanti si possono avere valori molto diversi di "mutagenicità" tra nodi sia in diversi periodi, che nello stesso periodo (Fig.6).

Per le città di Piacenza, Ferrara e Parma si nota una buona correlazione soprattutto con la concentrazione di CO evidenziando un maggior contributo del traffico veicolare alla mutagenicità del particolato atmosferico campionato in questi siti.

Figura 5. - Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione PM_{2,5}), Arpa Emilia-Romagna. Evoluzione temporale delle concentrazioni (medie mensili) di NO₂ e di CO nei nodi della rete regionale (dati forniti dalla rete regionale di monitoraggio della qualità dell'aria – Arpa Emilia Romagna).

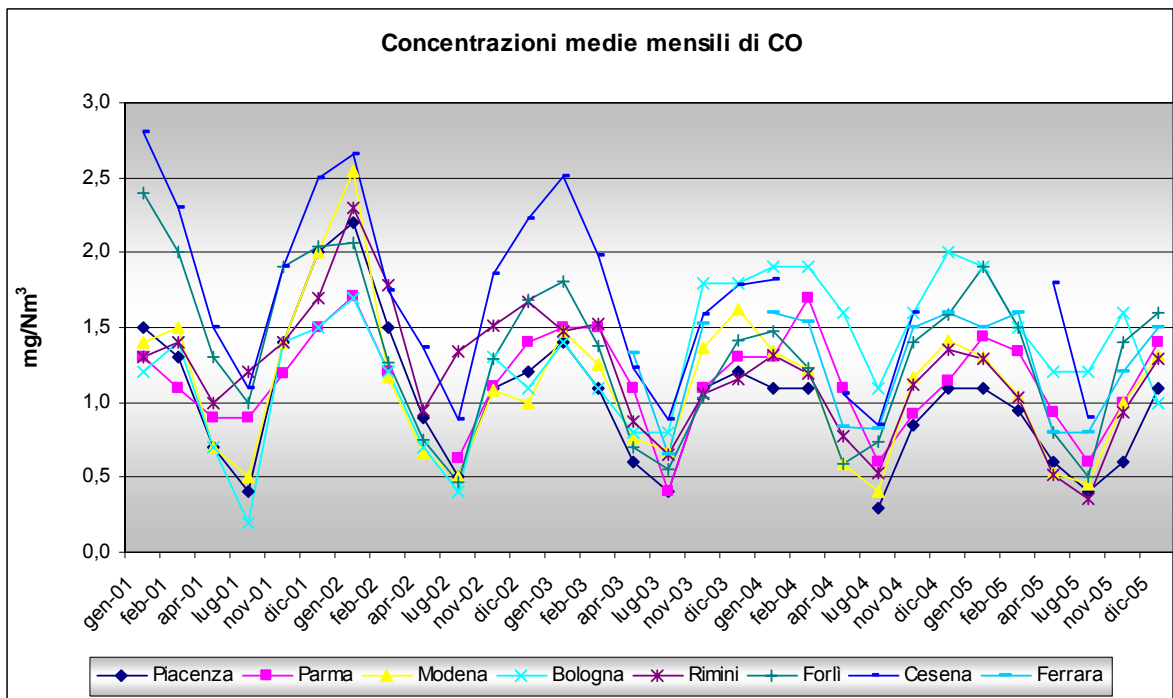
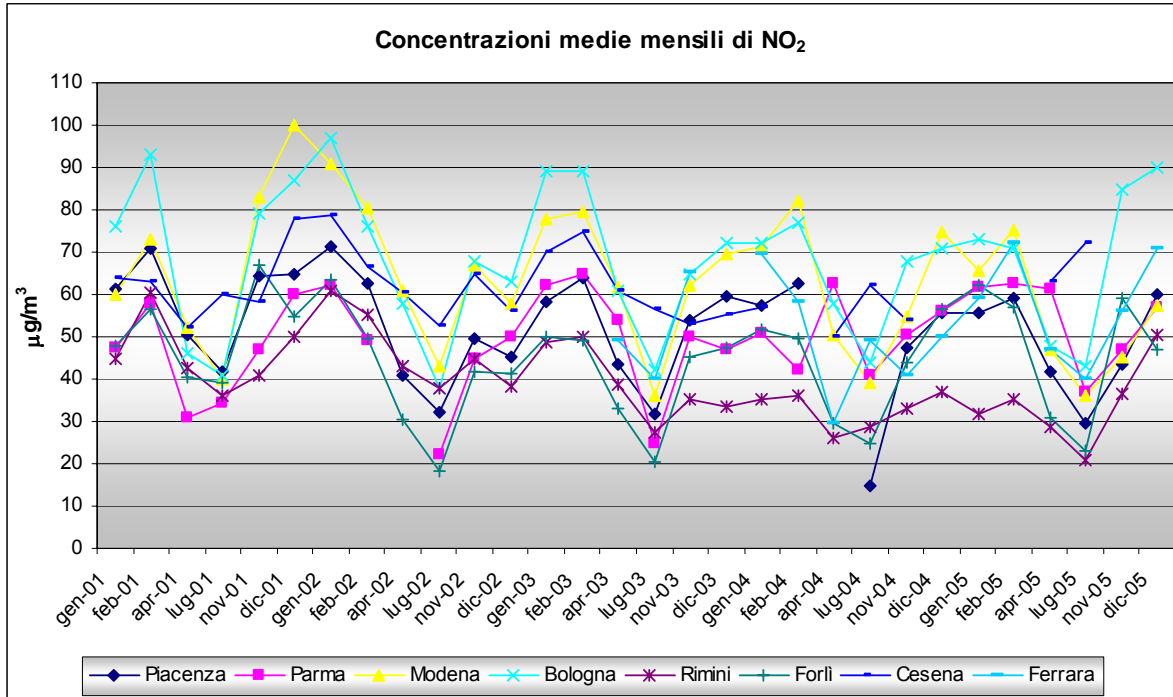


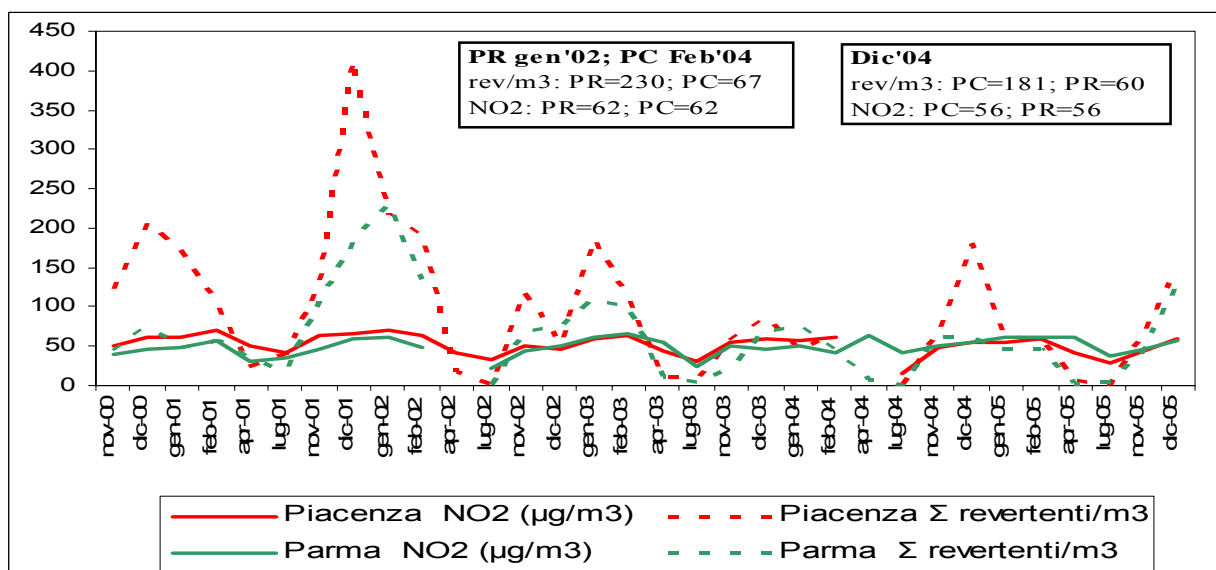
Tabella 5. – Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione PM_{2,5}), Arpa Emilia-Romagna.

Coefficienti r ottenuti dalle correlazioni fra rev/Nm³ (PM_{2,5} e PM₁₀) e concentrazione di CO e NO₂ da gennaio 2001 a dicembre 2005 nelle città indicate.

	PM _{2,5} rev/Nm ³	NO ₂ (µg/Nm ³)	CO (mg/Nm ³)
Parma	TA 98	0,5	0,7
	TA 98 +	0,5	0,7
	TA 100	0,5	0,7
	TA100+	0,4	0,7
Bologna (gen01- dic04)	TA 98	0,7	0,4
	TA 98 +	0,7	0,4
	TA 100	0,7	0,5
	TA100+	0,7	0,4
Piacenza	TA 98	0,7	0,9
	TA 98 +	0,6	0,8
	TA 100	0,7	0,8
	TA100+	0,6	0,8
Modena	TA 98	0,6	0,5
	TA 98 +	0,7	0,6
	TA 100	0,5	0,5
	TA100+	0,6	0,5
Rimini	TA 98	0,6	0,5
	TA 98 +	0,7	0,6
	TA 100	0,5	0,5
	TA100+	0,6	0,5
Ferrara (apr03- dic05)	TA 98	0,6	0,8
	TA 98 +	0,6	0,7
	TA 100	0,5	0,8
	TA100+	0,6	0,7
Forlì	TA 98	0,7	0,7
	TA 98 +	0,6	0,6
	TA 100	0,6	0,6
	TA100+	0,6	0,6
Cesena (gen01- dic04)	TA 98	0,5	0,7
	TA 98 +	0,5	0,7
	TA 100	0,5	0,6
	TA100+	0,5	0,7

Figura 6. - Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione PM_{2,5}), Arpa Emilia-Romagna.

Confronto dell'andamento delle concentrazioni (medie mensili) di NO₂ e di CO e del numero di revertenti totali indotti per Nm³ di aria rilevati nei nodi di Parma e Piacenza



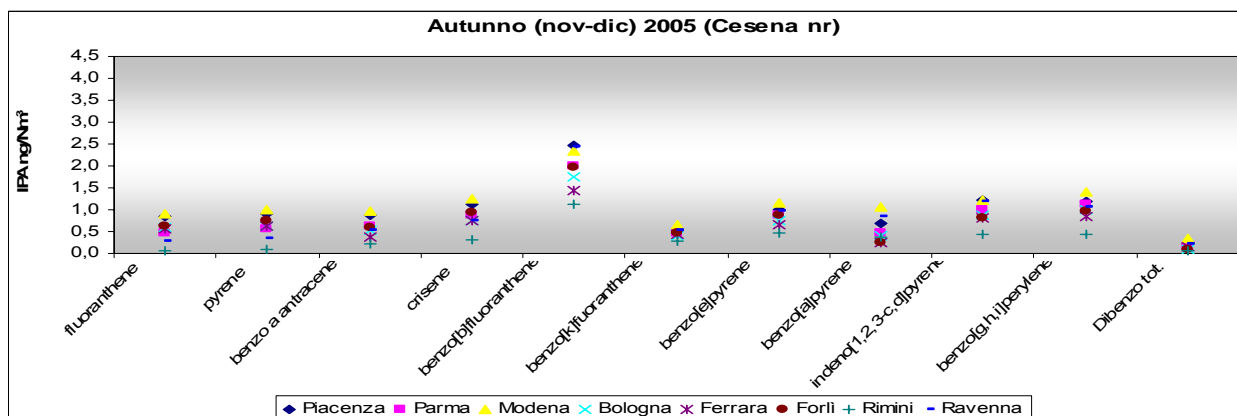
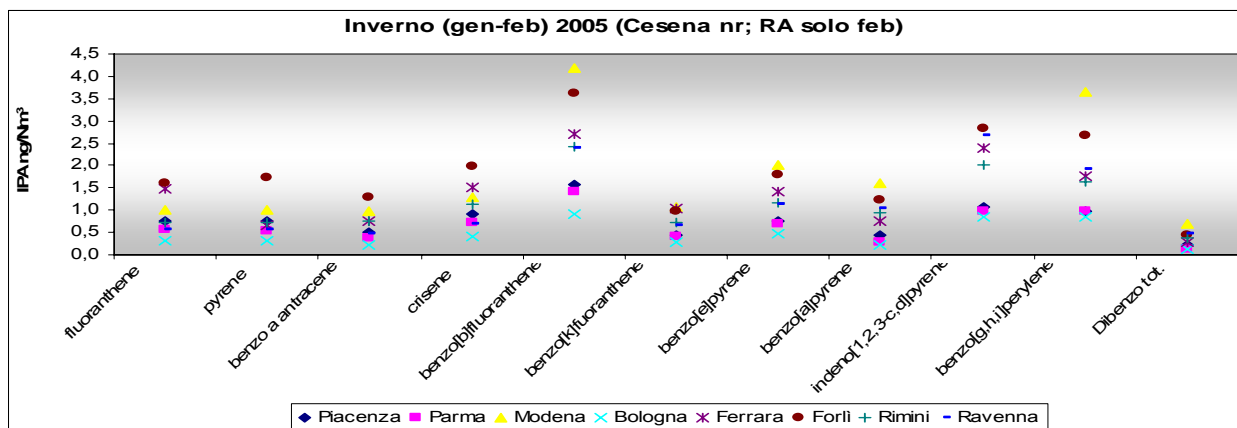
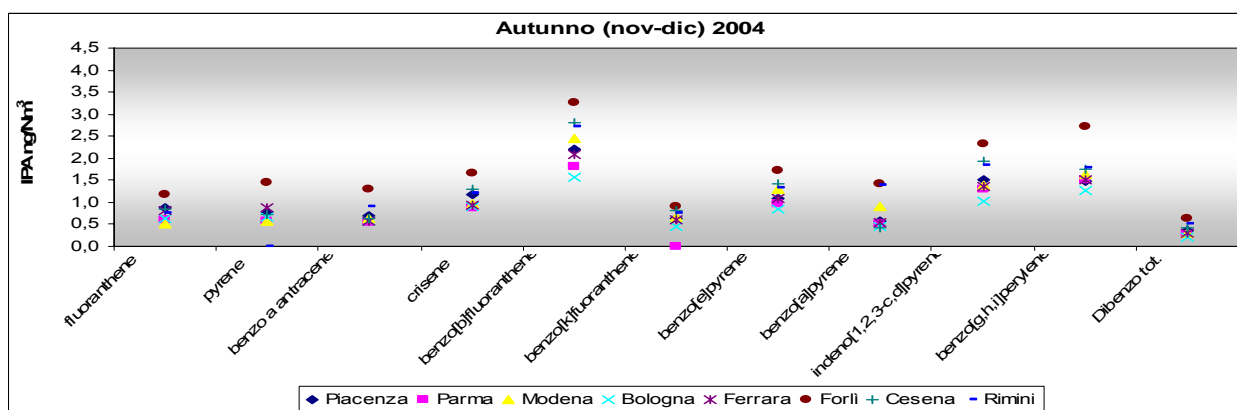
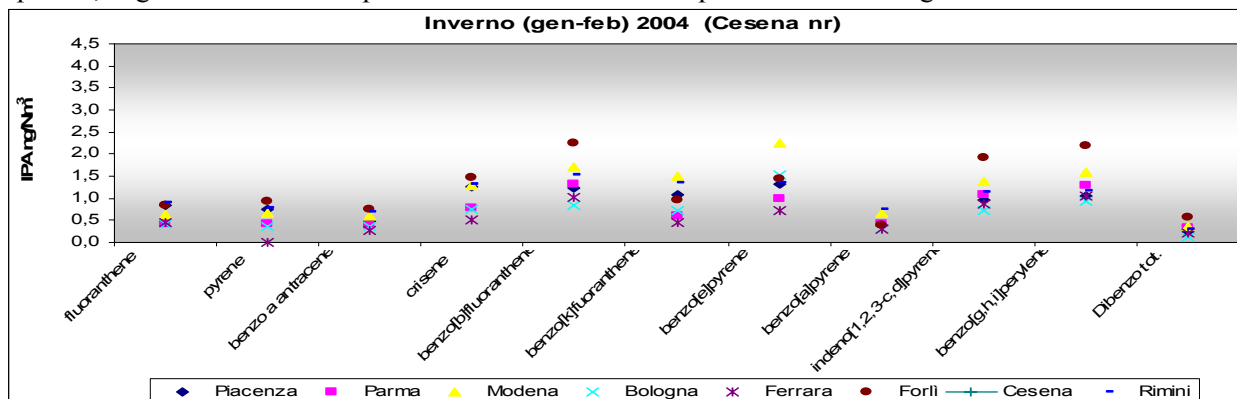
Nei grafici (Fig.7) si riportano le medie stagionali delle concentrazioni dei singoli IPA con attività biologica (Vedi "[Materiali e Metodi](#)" a pagina 3), rilevati nei periodi invernali ed autunnali.

Le concentrazioni degli IPA seguono lo stesso andamento in tutti i nodi della rete, evidenziando come il "tipo" di inquinamento sia il medesimo in tutta la regione; si nota inoltre che, anche se a livelli diversi a seconda del sito, si conferma una costante prevalenza di benzo(b)fluorantene, di indeno(1,2,3-cd)pirene e di benzo(ghi)perilene, rispetto agli altri IPA monitorati.

Dal momento che, in letteratura (EPA, 1998), questi IPA vengono considerati indicatori di traffico veicolare, la loro presenza costante sottolinea il contributo del traffico veicolare all'inquinamento nelle città della nostra regione.

Figura: 7 - Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione PM_{2,5}), Arpa Emilia-Romagna.

Concentrazioni medie stagionali, espresse come ng/Nm³ di aria, degli IPA indicati, rilevate nei periodi riportati, negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi.



Per verificare il contributo degli IPA nel determinare la mutagenicità del PM sono state costruite delle rette di regressione tra le concentrazioni di IPA mutageni (ng/μg) e il numero di revertenti/μg rilevati con i quattro singoli test. I coefficienti di determinazione R² (Tab.6) ottenuti sono risultati piuttosto differenti tra un sito di campionamento e l'altro.

Tabella: 6 – Coefficienti di determinazione “R²” ottenuti dal confronto fra concentrazioni (ng/μg) di IPA totali (riportati nel testo) e numero di revertenti/μg rilevati nel periodo gennaio 2003 – dicembre 2005.

	PC*	PR	MO*	BO*	FE	FO	RN
TA 98	0,8	0,5	0,2	0,5	0,8	0,7	0,2
TA 98 +	0,7	0,6	0,2	0,4	0,7	0,8	0,2
TA 100	0,6	0,7	0,3	0,4	0,5	0,6	0,3
TA100+	0,8	0,5	0,2	0,3	0,5	0,8	0,5
(TA98+)+(TA100+)	0,8	0,6	0,2	0,4	0,6	0,8	0,4
TA98+TA100	0,7	0,6	0,2	0,5	0,6	0,7	0,3

*: PC, da novembre 2003; BO, da febbraio 2003; FE, da luglio 2003; Cesena, non riportata

Si conferma una buona correlazione tra IPA e numero di revertenti indotti, per Piacenza e per Forlì. Tuttavia la correlazione risulta indipendente dal tipo di test utilizzato e si rileva non solo nei test più sensibili alla presenza di promutageni (quali sono gli IPA), ma anche nei test condotti in assenza di attivazione metabolica, suggerendo che gli IPA non sono le sole molecole responsabili della mutagenicità del particolato atmosferico e che un forte contributo sia dato anche da sostanze ad azione mutagena diretta.

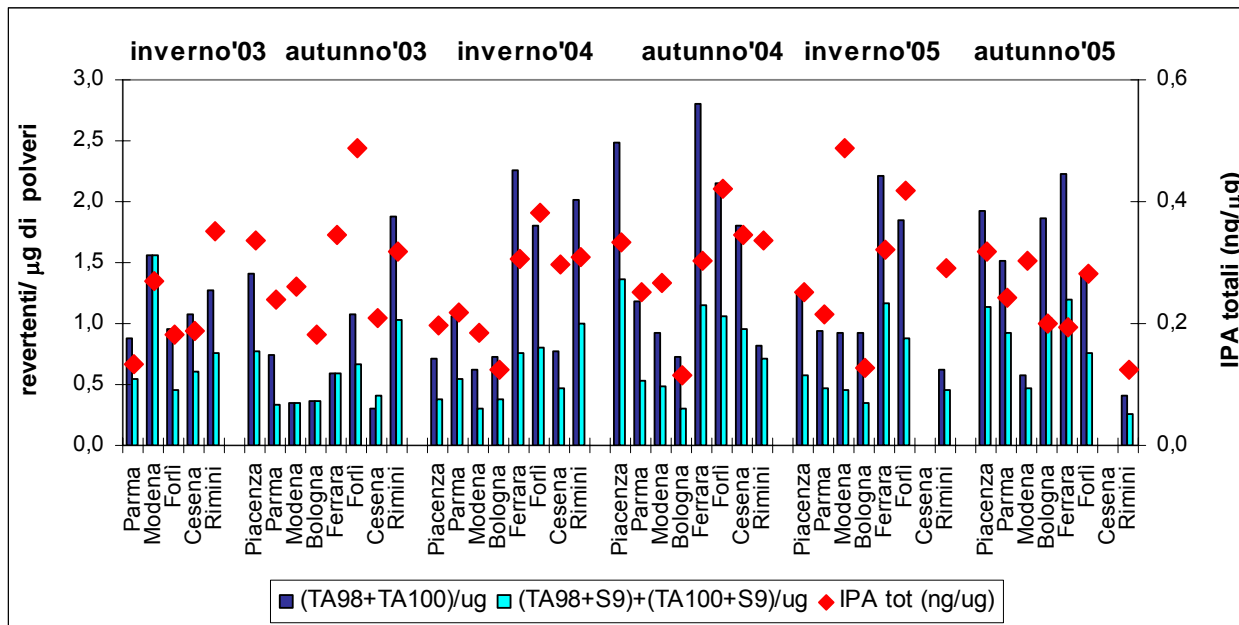
Questo lo si evidenzia bene dal confronto tra le concentrazioni di IPA (ng/μg di polveri) e il numero dei revertenti/μg ottenuti sia in presenza (test più sensibili all'azione degli IPA) che in assenza di attivazione metabolica esogena (Fig.8). I confronti sono stati effettuati solo nei periodi autunnali e invernali, ritenuti più significativi sia per la presenza di IPA che per l'attività mutagena del PM.

Inoltre, dalla figura 8 si nota un'evidente variabilità tra i livelli di IPA e la mutagenicità del PM sia fra i diversi nodi della rete che nell'ambito di uno stesso nodo in periodi differenti. Infatti, come riscontrato per la concentrazione di polveri, a livelli comparabili di IPA si possono riscontrare valori piuttosto differenti di revertenti.

Figura: 8 - Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione PM_{2,5}), Arpa Emilia-Romagna

Stazioni di rilevamento: Piacenza, Parma, Modena, Bologna, Ferrara, Forlì, Cesena e Rimini.

Comparazione dei livelli medi mensili degli IPA mutageni riportati nel testo e di attività genotossica con i test sui ceppi TA98 e TA100 con e senza attivazione metabolica (S9) nelle stagioni indicate



Test dei micronuclei

Il test ha mostrato una tendenza generale all'aumento dell'attività clastogena/aneugena del PM in relazione alla dose, anche se sono risultati positivi solo i campioni di Bologna dei mesi di febbraio 2004 e febbraio 2005 e quello di Ferrara di gennaio 2004 (chi quadrato, $p < 0,05$) (Fig.9).

Per una migliore valutazione del dato sono stati fatti i confronti fra MN, IPA e peso del particolato (Fig.10) e fra MN e revertenti totali (Fig.11). Da tali confronti 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 (R^2) pressoché nulli, confermando quanto riscontrato in precedenza. La correlazione con i revertenti totali ottenuti dai quattro test su Salmonella ha dato un coefficiente di correlazione di Pearson (r) molto basso per le città di Bologna, Ferrara e Parma, mentre a Rimini il valore dell' r è di 0,81. Nonostante il numero dei dati sia ancora esiguo sembra di poter evidenziare che non ci sia una netta corrispondenza tra il numero dei revertenti totali ottenuti in Salmonella e il numero di micronuclei indotti dal medesimo campione.

Figura: 9 - Rete Regionale di Monitoraggio della Genotossicità del particolato atmosferico urbano (frazione $PM_{2,5}$), Arpa Emilia-Romagna
Micronuclei (MN) indotti (su duemila linfociti binucleati-BN) da dosi crescenti di estratti di $PM_{2,5}$ nel periodo e nelle città indicate (*: chi quadrato, $p < 0,05$).

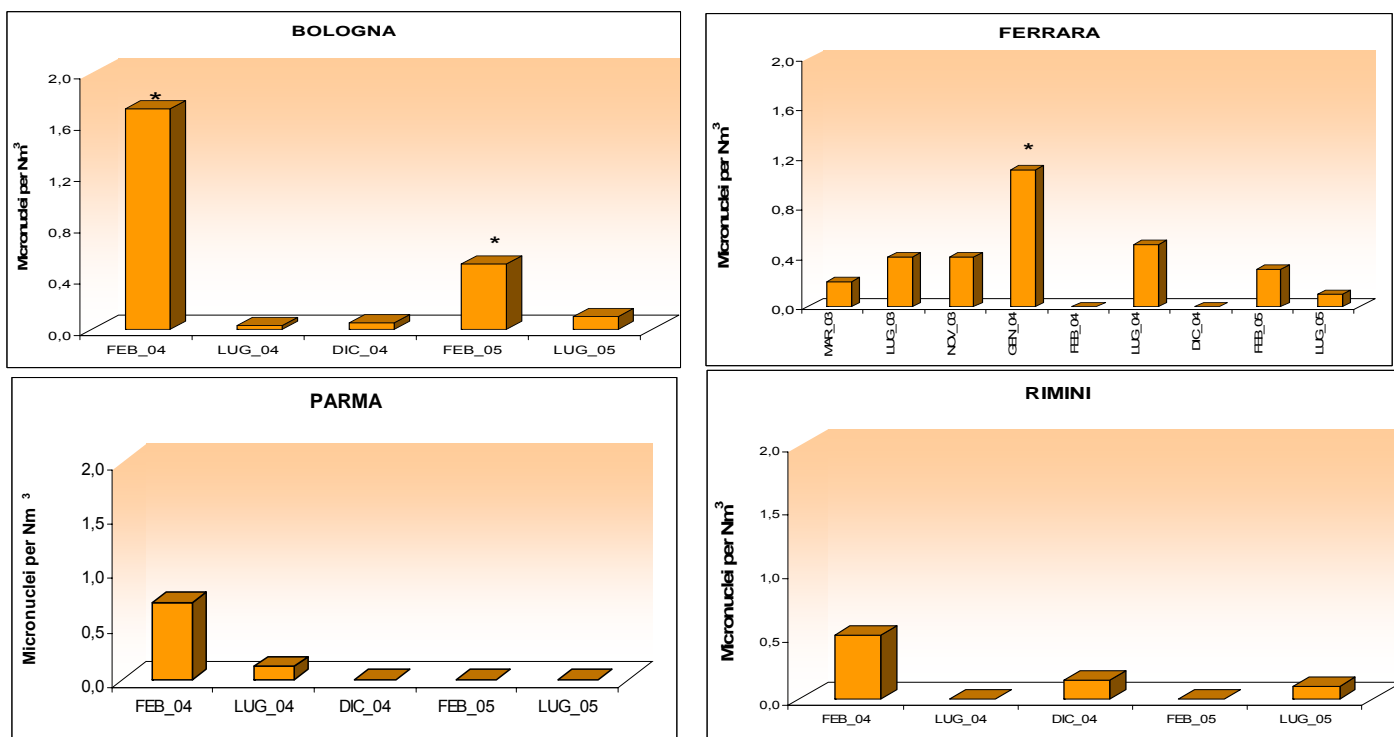


Figura: 10 - Confronto tra la concentrazione media di polveri ($\mu\text{g}/\text{Nm}^3$), di IPA totali (ng/Nm^3) e MN indotti per Nm^3 nelle città e nei mesi indicati..

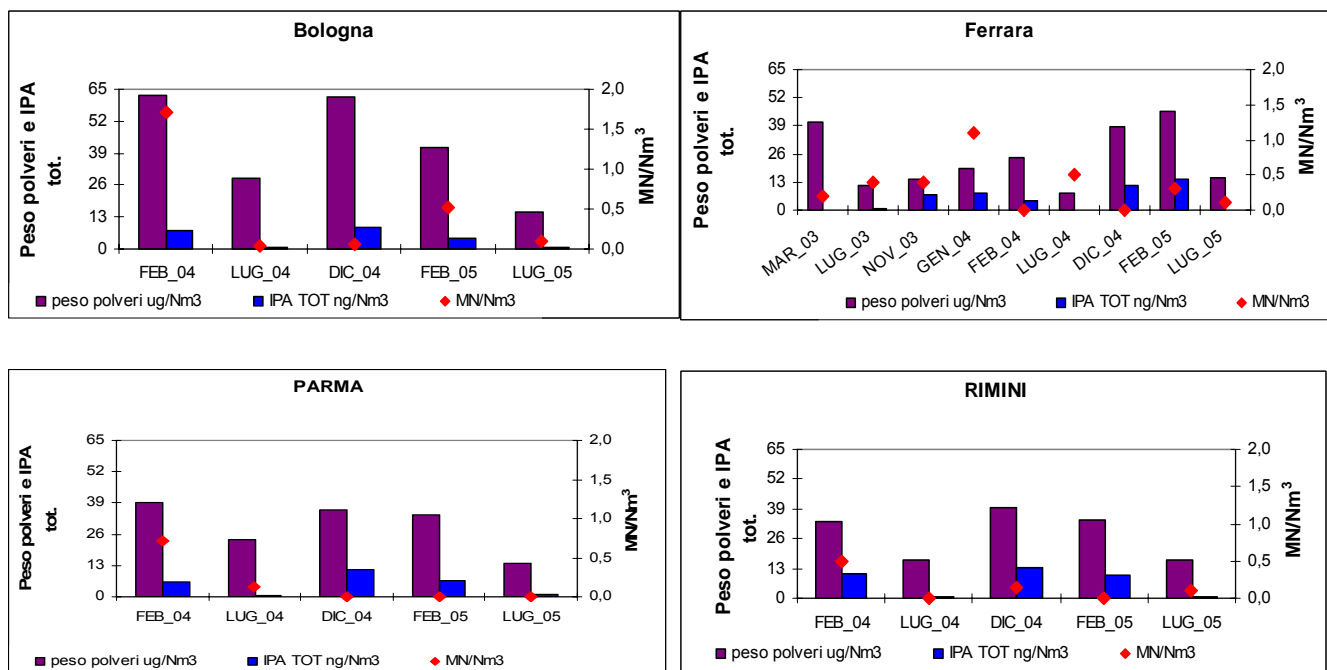
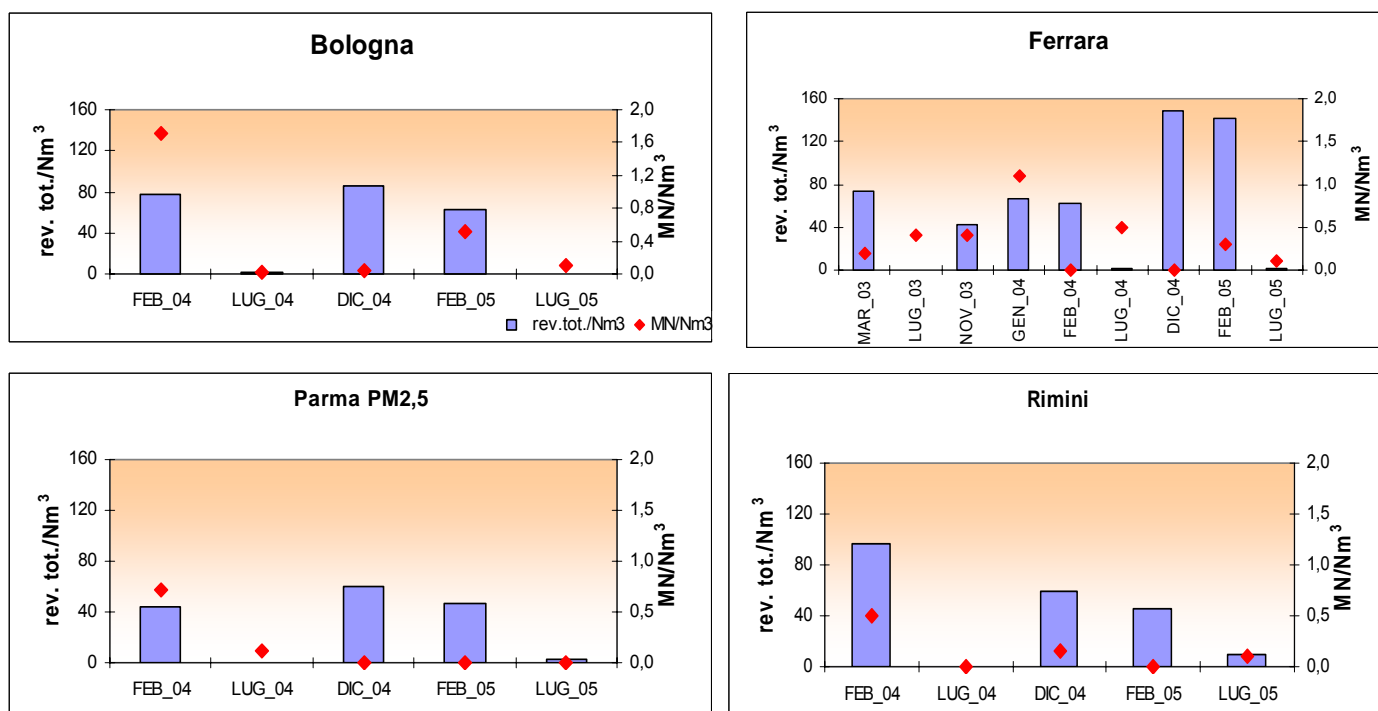


Figura: 11 - Confronto fra MN e revertenti totali indotti per Nm^3 di aria nelle città e nei mesi indicati.



CONCLUSIONI

Concludendo si può constatare, confermando quanto già rilevato in precedenza, che i valori di mutagenicità rilevati con i test su Salmonella rientrano, per quanto riguarda i periodi più freddi, nei range “positivo” o “fortemente positivo” e che le differenze quali-quantitative della mutagenicità dei campioni prelevati nei diversi nodi della rete evidenziano come il particolato atmosferico urbano sia una miscela complessa di sostanze mutagene in grado di subire notevoli variazioni nel tempo. Inoltre, dal confronto dei dati di “mutagenicità” del PM con i parametri chimico-fisici analizzati (concentrazioni di IPA, di NO₂, di CO e di particolato), si conferma l'impossibilità di utilizzare una sola classe di contaminanti o un parametro fisico per caratterizzare l'attività genotossica delle polveri, che risulta essere dipendente soprattutto dall'insieme, dalla tipologia di molecole ad esso associate e come queste interagiscono tra di loro.

Infine, l'applicazione del test dei micronuclei, in concomitanza col test su Salmonella, ha dimostrato che l'utilizzo di test biologici con *end-points* genetici diversi permette di evidenziare la presenza di sostanze genotossiche in grado di agire con differenti meccanismi di azione.

La presenza di particelle ultrafini e la loro attività biologica rappresenta un importante fattore di rischio per la salute dei cittadini: risulta quindi necessario impegnare risorse nella prevenzione primaria dei rischi sanitari connessi con questi inquinanti ambientali.

La rete di monitoraggio della mutagenicità del PM garantisce la valutazione continua nel tempo e su tutto il territorio dell'Emilia-Romagna della genotossicità del particolato atmosferico urbano, fornendo, in ambito analitico/preventivo, importanti informazioni per una migliore caratterizzazione del pericolo per la popolazione urbana cronicamente esposta e per la valutazione dell'efficacia delle azioni nazionali e locali tese al risanamento dell'aria in ambiente urbano.

Dott.ssa Francesca Cassoni

Responsabile Eccellenza “Mutagenesi Ambientale”