



Ministero della Salute

***Studi di biomonitoraggio e
tossicità degli inquinanti
presenti nel territorio di
Taranto
CCM 2013***

***Studi di biomonitoraggio e tossicità degli inquinanti presenti nel
territorio di Taranto
CCM 2013***

RELAZIONE Finale

Data inizio 13 febbraio 2014

**Durata 24 mesi
(prorogato 6 mesi)**

CAPO PROGETTO: Dott.ssa Loredana Musmeci

Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari - Provincia Autonoma di
Trento
ASL Taranto
ARES Regione Puglia
ARPA Puglia
Istituto Superiore di Sanità
Regione Emilia-Romagna

INDICE

1. Attività di coordinamento	pag.	7
2. Obiettivo specifico 1	pag.	9
3. Obiettivo specifico 2	pag.	89
4. Obiettivo specifico 3	pag.	127
5. Obiettivo specifico 4	pag.	223
6. Conclusioni Generali	pag.	230

La relazione finale del progetto è organizzata seguendo gli obiettivi specifici, in quanto questi sono svolti in collaborazione tra le varie unità operative

OBIETTIVO GENERALE: Valutazione dell'esposizione di gruppi di popolazione residente in aree della città di Taranto prossime allo stabilimento ILVA, a confronto con aree non impattate dalle emissioni dell'ILVA stessa e del possibile impatto sulla salute riproduttiva femminile e su funzioni cognitive in popolazioni pediatriche. In considerazione della molteplicità di inquinanti rilevati a Taranto e del complesso profilo di esposizione della popolazione residente, ai fini della sorveglianza sanitaria si propone di affiancare al monitoraggio ambientale - eseguito da ARPA Puglia - e dell'esposizione - eseguita da ISS, ASL Taranto- l'impiego di saggi cellulari in grado di valutare l'attività biologica del particolato presente nell'area di Taranto. Tale approccio, oltre a fornire elementi utili alla valutazione del rischio, consentirà di identificare possibili markers biologici utili all'analisi della popolazione residente nell'area di Taranto e esposta a miscele complesse di inquinanti atmosferici.

OBIETTIVO SPECIFICO 1:

Costruzione di mappe geo-referenziate di contaminazione ambientale nell'area interessata allo studio sulla base dei dati resi disponibili dalle strutture presenti sul territorio.

Caratterizzazione del potenziale immunotossico, pro-infiammatorio e genotossico del materiale particolato aerodisperso della città di Taranto.

OBIETTIVO SPECIFICO 2:

Stima del ruolo svolto dall'interazione tra esposizione a inquinanti ambientali (diossine, PCB e IPA) e caratteristiche genetiche relative ad enzimi coinvolti nella biotrasformazione degli stessi inquinanti sulla salute riproduttiva femminile, specificamente nell'insorgenza di endometriosi.

OBIETTIVO SPECIFICO 3 :

Definizione dell'esposizione a metalli con proprietà neurotossiche (As, Cd, Hg, Mn e Pb) in fluidi e tessuti di soggetti in età evolutiva (6-12 anni) residenti nelle aree di Taranto in studio e in un gruppo di controllo al fine di individuare eventuali difformità di esposizione e valutare le possibili associazioni con deficienze nella sfera neuro-comportamentale e cognitiva.

OBIETTIVO SPECIFICO 4 :

Predisposizione e messa a punto di protocolli, questionari e materiale informativo per la popolazione inerente gli studi di biomonitoraggio umano. Definizione delle migliori strategie di comunicazione dei dati di biomonitoraggio umano, e del loro significato, a gruppi di popolazione residenti in aree ad elevato impatto ambientale da inquinanti persistenti tossici. Le esperienze condotte nel corso del Progetto saranno valutate e confrontate con quelle condotte in altre aree italiane.

ELENCO UNITA' OPERATIVE		
Unità Operativa 1	Referente	Compiti
Direzione Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria - ISS	Dott.ssa Loredana Musmeci	- Coordinamento e supervisione progettuale - Supporto metodologico alla progettazione e all'organizzazione della attività - Coordinamento e supervisione per la stesura dei documenti che verranno prodotti
Unità Operativa 2	Referente	Compiti
Reparto Igiene dell'Aria-ISS	Dott. Gaetano Settimo (sostituisce Dott. Giovanni Marsili)	-Prelievo di materiale particellare aerodisperso (PM ₁₀) in siti urbani, rurali ed industriali, e sua caratterizzazione chimico fisica e morfologica in collaborazione con la U.O.4 e la U.O.6.
Unità Operativa 3	Referente	Compiti
Reparto Chimica Tossicologica-ISS Reparto Meccanismi di Tossicità-ISS	Dott.ssa Elena De Felip	- Definizione del disegno dello studio di biomonitoraggio per la valutazione dell'esposizione a inquinanti ambientali (diossine e PCB nel siero, IPA nelle urine) in donne in età fertile (controlli e casi affetti da endometriosi) in collaborazione con la U.O.7 e la U.O.9 - Genotipizzazione relativa ad enzimi coinvolti nella biotrasformazione degli inquinanti stessi nella stessa popolazione -Valutazione della interazione gene-ambiente per l'insorgenza/progressione dell'endometriosi in uno studio caso controllo
Unità Operativa 4	Referente	Compiti
Reparto Tossicologia Genetica-ISS Reparto Epidemiologia Molecolare-ISS	Dott. Riccardo Crebelli	- Caratterizzazione del potenziale immunotossico, pro-infiammatorio e genotossico del materiale particellare aereo disperso della città

Reparto di Malattie Immunomediate - ISS		di Taranto in collaborazione con la U.O.2 e la U.O.6
Unità Operativa 5	Referente	Compiti
Reparto Bioelementi e Salute -ISS	Dott. Alessandro Alimonti	- Definizione del disegno dello studio di biomonitoraggio per la valutazione dell'esposizione a metalli con proprietà neurotossiche in collaborazione con la U.O.7 e la U.O.9 - Studio dell'eventuale associazione con le caratteristiche neuro-comportamentali e cognitive dei soggetti arruolati in collaborazione con la U.O.7
Unità Operativa 6	Referente	Compiti
ARPA Puglia	Prof. Giorgio Assennato	- Valutazione contaminazione ambientale, raccolta campioni particolato atmosferico e costruzione di mappe geo-referenziate di contaminazione ambientale in collaborazione con la U.O. 2 e con la U.O.4
Unità Operativa 7	Referente	Compiti
ASL di Taranto Dipartimento di Prevenzione	Dott. Michele Conversano	- Reclutamento delle donne partecipanti allo studio di biomonitoraggio per la valutazione dell'esposizione a inquinanti ambientali (diossine e PCB nel siero, IPA nelle urine) in donne in età fertile (controlli e casi – affetti da endometriosi) in collaborazione con la U.O.3 e la U.O.9 - Reclutamento dei bambini partecipanti allo studio di biomonitoraggio sui metalli con proprietà neurotossiche (As, Cd, Hg, Mn, Pb) in collaborazione con la U.O.5 e la U.O.9 - Esecuzione dei prelievi ematici, raccolta del consenso informato, somministrazione del questionario, invio dei campioni - Presentazione congiunta dei risultati del biomonitoraggio

Unità Operativa 8	Referente	Compiti
ISS ARPA Puglia ARES Regione Puglia ASL di Taranto Regione Emilia-Romagna Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari-Provincia Autonoma di Trento	Dott.ssa Marinella Natali	- Coordinamento e supporto progettuale per tutte le attività di comunicazione - Definizione di strategie di comunicazione in relazione al biomonitoraggio umano in collaborazione con tutte le U.O. - Messa a confronto di esperienze maturate in altri contesti territoriali
Unità Operativa 9	Referente	Compiti
Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari-Provincia Autonoma di Trento	Dott. Valter Carraro	- Definizione, messa a punto e validazione del materiale informativo, dei protocolli e dei questionari per la valutazione dell'esposizione nello studio di biomonitoraggio condotto a Taranto in collaborazione con la U.O.3, U.O.5 e la U.O.7 - Messa a confronto di esperienze maturate in altri contesti territoriali - Individuazione delle migliori modalità di comunicazione pubblica per la disseminazione dei risultati in collaborazione con tutte le U.O.

Attività di coordinamento

A cura di:

Loredana Musmeci¹, Antonella Piloizzi¹

¹ *Istituto Superiore di Sanità*

Il Responsabile scientifico e la segreteria scientifica hanno svolto attività di coordinamento e supervisione progettuale, occupandosi del supporto metodologico alla progettazione, all'organizzazione della attività e della stesura dei documenti prodotti. Hanno inoltre ideato e sviluppato con il supporto delle U.O. 8 e 9 il sito sul portale dell'Istituto Superiore di Sanità dedicato al progetto.

Nel corso delle attività sono state calendarizzate riunioni plenarie che vedevano la partecipazione dei responsabili e/o dei rappresentanti delle U.O. coinvolte nello studio e del Ministero della Salute. Questo ha permesso di individuare e di seguire una *roadmap* aggiornata periodicamente.

Il Kick-off Meeting si è tenuto 4 marzo 2014 presso l'Istituto Superiore. Dopo la presentazione del progetto da parte del Responsabile Scientifico, primo argomento di discussione sono stati gli aspetti amministrativi del progetto stesso. Il Ministero della Salute ha informato i presenti sull'aggiornamento delle attività nell'ambito del Decreto Legge del 10 dicembre 2013 n. 136 convertito nella Legge n.6 del 6 febbraio 2014; ha sottolineato, inoltre, che le attività scientifico/sanitarie e gli studi riguardanti la realtà territoriale di Taranto vengono coordinate dal Ministero della Salute, il quale già dal 2012 aveva istituito l'Osservatorio ILVA che vedeva l'integrazione fra le attività della Regione Puglia e l'ISS. Nell'ambito di tale osservatorio viene riferito costantemente dell'avanzamento dello studio CCM in oggetto.

L'ARES Regione Puglia ha descritto il Piano Ambiente e Salute per Taranto predisposto dalla Regione Puglia e il lavoro legato al Consorzio ILVA, entrambe le attività si intersecano con il progetto senza alcuna sovrapposizione.

Sono stati inoltre discussi i seguenti argomenti specifici dei vari obiettivi:

- Variazione dell'età della coorte dei bambini in 6-11 anni. Questa scelta è stata suggerita dalla possibilità di una valutazione sia dell'aspetto neurocomportamentale che neuromotorio.
- la documentazione necessaria per il rispetto della privacy dei soggetti che verranno arruolati e quella per i comitati etici,
- gli accordi sul campionamento e le analisi del particolato.
- le necessità legate agli studi di biomonitoraggio connessi all'insorgenza dell'endometriosi, sulla base di esperienze pregresse.
- un piano di comunicazione

- l'importanza di organizzare incontri informativi indirizzati a tutti gli *stakeholders*. A questo proposito si discute sull'organizzazione di giornate informative rivolte alla cittadinanza. Viene deciso di inserire nella valutazione delle coorti il paniere alimentare.

Al Kick-off Meeting sono seguite altre riunioni.

Il 9 ottobre 2014 si è discusso dei criteri di arruolamento dei soggetti nell'ambito dello studio di biomonitoraggio, sia dal punto di vista clinico che dal punto di vista dell'esposizione rispetto alle zone individuate a maggior impatto e non. E' stato discusso anche il coinvolgimento di diverse associazioni attive sul territorio, tra cui quella di Taranto LIDER per lo studio dell'endometriosi e quello dei dirigenti scolastici per lo studio sui bambini.

Si decide di organizzare incontri informativi con la popolazione preparando il relativo piano di comunicazione dividendo la parte riguardante la salute della donna rispetto a quella riguardante la salute dei bambini in età scolare.

Il 7 luglio 2015 la riunione ha avuto lo scopo di fornire l'aggiornamento delle attività condotte e il piano di comunicazione. A seguito della stessa riunione si è prodotto il documento sullo stato di avanzamento pubblicato sul sito del Ministero della Salute, il quale, seguendo l'ordine degli obiettivi specifici, descrive le attività scientifiche portate avanti dalle Unità Operative. E' stato pubblicato, inoltre il sito dedicato al progetto all'indirizzo: <http://www.iss.it/ccm2013taranto/> sul portale dell'Istituto Superiore di Sanità.

Sono seguite altre due riunioni: i) il 13 novembre 2015 in cui si è discusso sullo stato di avanzamento del progetto, con particolare interesse alle problematiche riguardanti la comunicazione e ii) il 24 maggio 2016 in cui oltre alla presentazione dello stato di avanzamento del progetto si è discusso della redazione della relazione finale.

Obiettivo specifico 1

Costruzione di mappe geo-referenziate di contaminazione ambientale nell'area interessata allo studio sulla base dei dati resi disponibili dalle strutture presenti sul territorio.

Caratterizzazione del potenziale immunotossico, pro-infiammatorio e genotossico del materiale particolato aerodisperso della città di Taranto.

A cura di:

Gaetano Settimo¹; Riccardo Crebelli¹; Eugenia Dogliotti¹, Cristina Andreoli¹, Sara Baccarini¹, Rachele Riganò¹; Brigitta Buttari¹; Elisabetta Profumo¹; Francesco Tancredi¹; Marco Inglessis¹; Barbara de Berardis¹; Elena Sebastianelli¹; Maria Eleonora Soggiu¹; Giorgio Assennato²; Roberto Giua²; Maria Tutino²; Alessandra Nocioni²; Maria Mantovan²; Gaetano Saracino²

¹ *Istituto Superiore di Sanità*

² *Arpa Puglia*

Lo studio è stato condotto dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con Arpa Puglia.

Premessa

La presente “relazione finale” integra, aggiorna e completa le attività già comunicate nelle precedenti “relazioni intermedie”.

Gli argomenti trattati nello studio sono stati, in particolare:

- rilevamento e caratterizzazione degli IPA nel PM₁₀ prelevato in aria ambiente nelle 4 postazioni utilizzate nello studio;
- rilevamento e valutazione dei dati relativi alla caratterizzazione fisico-chimica in microscopia elettronica del PM₁₀ prelevato in aria ambiente nelle 4 postazioni utilizzate nello studio;
- Caratterizzazione del potenziale immunotossico e pro-infiammatorio del PM₁₀ prelevato in aria ambiente, nelle 4 postazioni utilizzate nello studio.

Inoltre, lo stato di contaminazione ambientale del territorio tarantino è stato indagato tramite applicazione di modellistica per il PM₁₀, PM_{2.5}, i metalli (As, Cd, Ni, Pb e Hg), il BaP e le diossine. La valutazione è stata condotta relativamente all'anno 2013. Sebbene tale studio sia riferito ad una situazione emissiva non sovrapponibile al periodo di rilevamento del PM₁₀ condotto nelle 4 postazioni, può comunque fornire utili informazioni di carattere generale rispetto alla situazione di contaminazione del territorio di Taranto. In appendice all'obiettivo 1 è riportato il dettaglio del lavoro di valutazione condotto con la modellistica nell'area di Taranto.

1. Introduzione

Considerando quanto già effettuato a livello locale dalle varie istituzioni regionali e considerate le attività di rilevamento in corso, lo studio ha voluto approfondire alcuni aspetti relativi alla caratterizzazione morfologica e chimico-fisica in microscopia elettronica (SEM/EDX) e al potenziale immunotossico, pro-infiammatorio del materiale particolato sospeso PM₁₀.

In accordo con gli obiettivi dello studio sono state scelte tre postazioni in differenti aree urbane (Macchiavelli-Taranto, Statte-Taranto e ISS-Roma), in cui effettuare il rilevamento *ad hoc* del PM₁₀. Al fine di poter disporre di dati utili per le successive valutazioni è stata scelta una quarta postazione in un'area rurale lontana da sorgenti di emissioni industriali e/o urbane, nella tenuta di Roccarespanpani in provincia di Viterbo.

I dettagli delle operazioni sul campo sono stati concordati e messi a punto nelle prime riunioni organizzative che si sono svolte tra i responsabili della UO2 dell'ISS e i tecnici di Arpa Puglia. Le campagne sono state condotte dal Reparto Igiene dell'Aria dell'ISS e dall'ARPA Puglia.

2. Attività dello studio

La selezione delle postazioni in cui effettuare i rilevamenti *ad hoc* di PM₁₀ è stata effettuata seguendo come criterio la presenza di soli insediamenti civili, di contemporanea presenza di insediamenti civili e industriali, e di assenza di insediamenti civili e industriali.

Sono state selezionate 4 postazioni, di seguito riportate:

- ✓ **Postazione 1:** area urbana; posizionamento: centralina ISS;
- ✓ **Postazione 2:** area agricola di fondo; posizionamento: centralina ISS di Roccarespanpani (ISS Viterbo);
- ✓ **Postazione 3:** area urbana vicina all'area industriale; posizionamento: stazione di rilevamento dell'ARPA Puglia di via Macchiavelli-Taranto;

- ✓ **Postazione 4:** area urbana; posizionamento: stazione di rilevamento dell'ARPA Puglia di via Sorgente-Statte.

In tutte le postazioni sono state impiegate le seguenti metodologie e apparecchiature:

- ✓ Materiale particellare PM₁₀: prelievo mediante campionatori a basso volume operante a una portata di 2,3 m³/h, dotati di testa di prelievo PM₁₀ omnidirezionale, e filtri in policarbonato di 47 mm e con porosità di 0,8 µm. Su detti campioni si è proceduto alla determinazione ponderale del PM₁₀, e alla sua caratterizzazione chimico-fisica, mediante microscopia elettronica analitica SEM/EDX.
- ✓ Materiale particellare PM₁₀: prelievo mediante campionatori ad alto volume operante a una portata di 1,13 m³/min, dotati di testa di prelievo PM₁₀ omnidirezionale. In questo rilevamento sono stati impiegati filtri 20x24 cm in borosilicato rinforzati con fibra di vetro ricoperta di politetrafluoroetilene (PTFE). Su detti campioni si è proceduto alla determinazione ponderale del PM₁₀ ed alla preparazione di una serie di fustelle (diametro di 32 mm) da utilizzare per tutte le successive fasi dello studio:
 - ✓ analisi IPA;
 - ✓ valutazione del potenziale immunotossico e pro-infiammatorio mediante saggi colorimetrici, citofluorimetrici ed immunoenzimatici (ELISA);
 - ✓ caratterizzazione del potenziale genotossico.

I rilevamenti di PM₁₀ sono stati effettuati per una settimana nella stagione calda e per una settimana nella stagione fredda, con durate diversificate nel tempo: rilevamenti di 24 ore e rilevamenti di 8 ore, al fine di poter valutare eventuali variazioni legate alla variabilità dei cicli della lavorazione industriale e delle attività civili (flussi di traffico, riscaldamento, ecc.) o dovute alle diverse condizioni meteorologiche.

La tabella 1 riporta la configurazione dei campionamenti effettuati.

Tabella 1: Configurazione delle postazioni di rilevamento

Postazione	basso volume analisi morfologica (PM ₁₀)	alto volume potenziale immunotossico e pro-infiammatorio (PM ₁₀)
1: ISS Roma	X	X
2: ISS Roccarespanpani	X	X
3: Arpa Puglia Macchiavelli	X	X
4: Arpa Puglia Statte	X	X

3. Risultati dei rilevamenti

3.1 Materiale particellare sospeso PM₁₀

Il prelievo di materiale particellare PM₁₀ per la misura della concentrazione di massa, è stato effettuato mediante campionatori sia ad alto che a basso volume. Sono stati effettuati prelievi nell'arco di una settimana (nella stagione calda: 27/7-2/8/2015; stagione fredda: 7/3-12/3/2016) della durata di 8 h in diversi momenti della giornata, intervallati da prelievi della durata di 24 h.

La determinazione della concentrazione di massa del materiale particellare PM₁₀ raccolto è stata eseguita con metodo gravimetrico dopo condizionamento dei filtri

per almeno 48 h a 50 ± 5 RH%, 293 ± 1 K (in camera a T e RH% controllate), secondo le indicazioni della UNI EN 12341/2014.

Nelle **tabelle 2 e 3** si riportano le concentrazioni di PM₁₀.

Tabella 2: Concentrazioni di PM₁₀. Prelevatore ad alto volume e filtri 20x24 cm in borosilicato rinforzati con fibra di vetro ricoperta di politetrafluoroetilene (PTFE) per analisi IPA.

Rilevamento	Postazione	PM ₁₀ µg/m ³	Rilevamento	PM ₁₀ µg/m ³
Luglio 2015			Marzo 2016	
27/7: 8-16	1: ISS, Roma	31	7/3:8-16	12
	2: ISS, Roccarespampani	5,6		5,7
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	26		25
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	15		11
28/7:24-8	1: ISS, Roma	28	8/3:24-8	48
	2: ISS, Roccarespampani	7,9		12
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	51		20
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	15		13
29/7:8-8 del 30/7	1: ISS, Roma	23	9/3:8-8 del 10/3	23
	2: ISS, Roccarespampani	6,2		6,1
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	26		20
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	26		44
30/7: 8-8 del 31/7	1: ISS, Roma	21	10/3: 8-8 del 11/3	23
	2: ISS, Roccarespampani	7,3		11
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	30		17
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	31		16
31/7: 16-24	1: ISS, Roma	24	11/3: 16-24	24
	2: ISS Roccarespampani	7,4		6,5
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	46		17
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	--		12
1/8: 8-8 del 2/8	1: ISS, Roma	22	12/3: 8-8 del 13/3	19
	2: ISS, Roccarespampani	7,0		10
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	23		18*
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	17		13
2/8:8-16	1: ISS, Roma	26	12/3: 8-16	27
	2: ISS, Roccarespampani	8,2		16
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	--		--
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	--		11

*Durata: dalle ore 8 del 12/3 alle ore 13 del 13/3

Tabella 3: Concentrazioni di PM₁₀. Prelevatore basso volume. Campionamenti di 8 ore con filtri in policarbonato per analisi al SEM/EDX.

Rilevamento	Postazione	PM ₁₀ µg/m ³	Rilevamento	PM ₁₀ µg/m ³
Luglio 2015			Marzo 2016	
28/7:24-8	1: ISS, Roma	21	8/3:24-8	11
	2: ISS, Roccarespampani	23		4,0
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	44		52
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	21		12
30/7: 8-16	1: ISS, Roma	19	10/3: 8-16	12
	2: ISS, Roccarespampani	13		16
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	57		63
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	25		5,0
1/8: 16-24	1: ISS, Roma	16	12/3: 16-24	25
	2: ISS, Roccarespampani	12		12
	3: Arpa Puglia, via Macchiavelli	35		14
	4: Arpa Puglia, via Sorgente Statte	21		19

Nelle postazioni urbane di Taranto Macchiavelli e Statte, i dati di concentrazione di PM₁₀ misurati nella stagione fredda, con il campionatore ad alto volume, risultano inferiori a quelli misurati nella stagione calda (diminuzione delle concentrazioni dal 20 al 60 % a seconda della durata del prelievo), mentre per la postazione urbana di Roma ISS, non si evidenziano differenze di concentrazione di PM₁₀ tra le due stagioni. La postazione di fondo ISS Roccarespampani, presenta valori costantemente inferiori a quelli riscontrati nelle altre postazioni e in molti casi le concentrazioni di PM₁₀ sono circa tre-quattro volte inferiori alle concentrazioni misurate nei tre siti urbani; questo a conferma della rappresentatività della postazione come “fondo”.

In alcuni rilevamenti di 8 ore effettuati sia con il campionatore ad alto volume (1 solo valore nella stagione calda) che con il campionatore a basso volume (3 valori uno nella stagione calda e due nella stagione fredda) per caratterizzazione al SEM/EDX del PM₁₀, si sono registrati nella postazione Arpa Puglia Via Macchiavelli concentrazioni di PM₁₀ superiori ai valori riscontrati nei prelievi di 24 ore.

3.2. Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) nel materiale particellare PM₁₀

Una volta determinata la concentrazione di PM₁₀, i filtri sono stati ritagliati con apposita fustella di diametro di 32 mm, e sei fustelle sono state estratte con solvente organico mediante forno a microonde.

Gli isomeri degli IPA considerati ed analizzati rispondono ai requisiti di: maggiore rilevanza tossicologica, in quanto “probabilmente” o “possibilmente” cancerogeni per l'uomo, e la presenza in aria ambiente. In tabella 4 si riportano le concentrazioni (ng/m³) di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nei campioni di PM₁₀ relativi ai prelievi di 24 h.

Pur considerando il periodo limitato delle due campagne di rilevamento del PM₁₀ (una settimana nella stagione calda 2015 e una settimana nella stagione fredda 2016), i valori di concentrazione sono risultati per gli isomeri degli IPA ricercati compreso il B(a)P, inferiori ai valori limite di rivelabilità della metodica analitica utilizzata nella quantificazione (cromatografia ad alta prestazione HPLC, UNI EN 15549).

Con riferimento ai risultati ottenuti si precisa che un confronto diretto con il valore limite (espresso come media annuale presente nel DLgs 155/2010 smi) non è possibile vista la brevità della copertura temporale dei rilevamenti effettuati, questo perché la finalità dello studio era indirizzata allo studio sul potenziale immunotossico (vitalità, apoptosi e proliferazione cellulare) e genotossico del PM₁₀.

Tuttavia si rileva che le concentrazioni di B(a)P nel PM₁₀ sono risultati comparabili con i dati misurati nella stessa postazione di Macchiavelli dall'ARPA Puglia, sia come media mensile sia come valore annuale (vedi relazione rapporto sui livelli di benzo(a)pirene e metalli pesanti nel PM₁₀ in Puglia anno 2014).

In Italia, per rispondere a quanto previsto dal DLgs155/2010 smi, le varie Agenzie Regionali di Protezione dell'Ambiente (ARPA), hanno svolto rilevamenti presso le centraline di monitoraggio della qualità dell'aria ambiente, misurando mediante concentrazioni annuali di B(a)P nel PM₁₀ compresi nell'intervallo 0,12-1,30 ng/m³, nel sito industriale di Taranto Macchiavelli si è registrata una media annuale di B(a)P di 0,13 ng/m³ (dati Arpa Puglia), e nel sito suburbano industriale di Brindisi una concentrazione media di B(a)P di 0,15 ng/m³; nell'area urbana di Roma si è registrata una concentrazione media annuale di B(a)P nel PM₁₀ di 0,60 ng/m³. Anche le simulazioni modellistiche condotte da ARPA Puglia confermano per il B(a)P una situazione di rispetto del limite annuale normativo. Questi valori confermano come su scala nazionale si osservano andamenti generali decrescenti delle concentrazioni di BaP.

Tabella 4: Concentrazioni di IPA nel PM₁₀. Prelevatore alto volume e filtri 20x24 cm in borosilicato rinforzati con fibra di vetro ricoperta di politetrafluoroetilene (PTFE).

IPA	ISS, Roma Viale R. Elena		ISS, Roccarespampani		Arpa Puglia, via Macchiavelli		Arpa Puglia, via Sorgente Statte	
Isomeri ng/m ³	29/7:8-8 del 30/7	10/3: 8-8 del 11/3	29/7:8-8 del 30/7	10/3: 8-8 del 11/3	29/7:8-8 del 30/7	10/3: 8-8 del 11/3	29/7:8-8 del 30/7	10/3: 8-8 del 11/3
benzo(a)pirene	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
benz(a)antracene	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
benzo(b+k+i) fluorantene	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
indeno(1,2,3-cd)pirene	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
dibenzo(a,h)antracene	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
dibenzo(a,i)pirene	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
dibenzo(a,e)pirene	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
dibenzo(a,i)pirene	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
dibenzo(a,h)pirene	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4

3.3. Materiale particellare sospeso PM₁₀: analisi morfologica a raggi X con spettroscopia a dispersione di energia (SEM/EDX)

Sono state caratterizzate mediante microscopia elettronica analitica a scansione (SEM) e spettrometria a dispersione (EDX), le singole particelle costituenti il PM₁₀ campionato nelle due stagioni presso i quattro siti al fine di studiarne le differenti caratteristiche, dovute sia al sito che al periodo di campionamento.

L'analisi delle singole particelle è stata eseguita mediante microscopio elettronico a scansione con sorgente ed emissione di campo FE-SEM, munito di un sistema EDAX a finestra sottile per microanalisi a raggi X mediante spettrometria a dispersione di energia (*TEAMTM EDS Analysis System for SEM-X ray Microanalysis EDAX*).

Una porzione di ciascun filtro in policarbonato (diametro 47 mm e porosità 0,8 µm), utilizzato per il campionamento del PM₁₀ è stata montata sul portacampioni del SEM

e sottoposta ad un processo di carbonizzazione (ricopertura del campione con un sottile strato di molecole carboniose).

Opportunamente processati i campioni sono stati poi analizzati mediante ingrandimento di 4000 X, in modo da poter analizzare anche le particelle più grossolane presenti in un campo di osservazione, a distanza di lavoro di 10 mm e selezionando una tensione del fascio di elettroni di 30 kV.

Per ciascun campione di PM₁₀ è stata dapprima effettuata un'analisi morfologica delle singole particelle, mediante un sistema di analisi d'immagine (*Scandium, SEM Imaging Platform*), al fine di determinare le distribuzioni dimensionali del PM₁₀ nelle diverse postazioni.

Le particelle sono state rivelate automaticamente sulla base del superamento di una soglia per i segnali secondari (SE) e retrodiffusi (BSE), prefissati dall'operatore. E' stato utilizzato il segnale SE per rivelare le particelle di carbonio sul substrato del filtro, mentre è stato utilizzato il segnale BSE per rivelare le particelle minerali e metalliche per il loro più elevato contrasto compositivo.

Per ciascuna particella individuata sono stati determinati i seguenti parametri morfologici: diametro medio, diametro massimo, diametro di *Feret*, *aspect ratio* e fattore di forma.

Infine è stata determinata per ogni campione la composizione chimica, mediante microanalisi a raggi X, di almeno 200 particelle. I dati ottenuti dalla microanalisi delle singole particelle sono stati analizzati usando la *Hierarchical Cluster Analysis* al fine di classificare le particelle in gruppi con composizione chimica simile.

L'insieme dei dati ha permesso di individuare le principali caratteristiche degli inquinanti costituenti il PM₁₀ campionato nei 4 siti.

I risultati elaborati mediante *Hierarchical Cluster Analysis* suggeriscono che le diverse tipologie di particelle possono essere classificate in otto componenti principali o *clusters*:

- ✓ **cluster 1:** particelle ricche di carbonio C > 90%. Derivano prevalentemente da traffico veicolare o dai sistemi di riscaldamento. La superficie presenta spesso un *coating* contenente S o a volte S, K, Ca o S, K, Na;
- ✓ **cluster 2:** carbonati (Ca e Mg). Derivano dai processi di erosione del suolo e delle rocce;
- ✓ **cluster 3:** solfati (principalmente di Ca). Derivano da reazioni tra i materiali in carbonato di Ca e i composti solforati presenti nell'atmosfera, ma anche dal deterioramento delle vernici che rivestono gli edifici;
- ✓ **cluster 4:** particelle di silice (Si e O). Derivano da erosione del suolo;
- ✓ **cluster 5:** silicati naturali e artificiali (feldspati e feldspatoidi: Si, Al, Ca, o Si, Al, K), argille: Si, Al o Si, Al e Fe, silicati vetrosi: Si, Al, Ca, Fe, o Si, Ca, Fe, o Ca, Si, Al;
- ✓ **cluster 6:** particelle ricche di Fe > 50%: particelle costituite solo da Fe e O;
- ✓ **cluster 7:** particelle metalliche prevalentemente di Fe in associazione con Al, Cr, Ni, Ti, Zn, Cu. Mostra una diversa percentuale nei siti in studio. L'abbondanza dipende anche dal periodo di campionamento;
- ✓ **cluster 8:** cloruri.

Alcuni di questi *cluster* non risultano presenti in tutte e quattro le postazioni e quelli comuni mostrano abbondanze differenti (**tabelle 5 -7**).

L'errore relativo sulle abbondanze è stato stimato assumendo un modello di distribuzione binomiale, tenendo conto della presenza/assenza di una particella in un *cluster*.

Tabella 6: Abbondanza % dei cluster nel PM₁₀ campionato nelle 4 postazioni.

Abbondanza % postazioni	Particelle ricche di carbonio C> 90%		Carbonati (Ca e Mg)		Solfati (principalmente di Ca)		Cloruri	
	Stagione fredda	Stagione calda	Stagione fredda	Stagione calda	Stagione fredda	Stagione calda	Stagione fredda	Stagione calda
ISS, Roma	82,5±2,7	70,6±3,0	2,0±1,0	1,9±0,8	5,6±1,6	1,5±0,6	0,0	0,0
ISS, Roccarespampani	71,7±3,2	77,7±2,3	0,0	0,9±0,5	6,2±1,7	2,2±0,9	0,0	0,0
Arpa Puglia, via Macchiavelli	42,2±3,5	54±3,1	17,3±2,7	0,9±0,5	5,5±1,6	13,7±4,7	11,2±2,2	0,0
Arpa Puglia, Statte	74,9±3,1	27,3±2,7	1,4±0,8	4,3±1,2	6,0±1,7	19,2±2,4	7,6±1,9	0,0

Tabella 7: Abbondanza % dei cluster nel PM₁₀ campionato nelle 4 postazioni.

Abbondanza % postazioni	Particelle di silice (Si e O)		Silicati		Ossidi di Fe		Composti Metallici	
	Stagione fredda	Stagione calda	Stagione fredda	Stagione calda	Stagione fredda	Stagione calda	Stagione fredda	Stagione calda
ISS, Roma	0,0	0,7±0,3	5,6±1,6	15,2±2,2	0,0	3,0±1,3	3,6±1,3	12,4±2,0
ISS, Roccarespampani	0,4±0,4	0,9±0,5	16,4±2,6	9,8±2,6	0,0	0,0	5,3±1,6	3,1±1,3
Arpa Puglia, via Macchiavelli	0,0	0,0	18,9±2,8	23,7±2,6	1,0±0,7	0,0	5,3±1,6	7,0±1,6
Arpa Puglia, Statte	0,0	1,2±0,7	8,1±1,9	41,6±3,0	1,5±0,8	0,6±0,5	0,9±0,7	4,9±1,3

Di seguito si riassumono le principali caratteristiche del PM₁₀ prelevato nelle diverse postazioni, sia in termini di distribuzione dimensionale che in componenti principali. Detti risultati possono essere intesi come indagine preliminare tesa ad una valutazione morfologica e di composizione chimica utilizzando la microanalisi sulle singole particelle, in zone tra loro diversamente sottoposte alla influenza delle diverse emissioni.

Pur considerando il periodo molto limitato delle due campagne di rilevamento, questi dati possono rappresentare un utile elemento per una prima valutazione della situazione nell'area.

Postazione ISS, Roma

Le misure hanno evidenziato come il diametro medio delle particelle che costituiscono il PM₁₀ è nel *range* tra 51 nm e 16 µm nella stagione fredda, e tra 51 nm e 9,3 µm in quella calda.

Non si registrano differenze nell'abbondanza di nanoparticelle (<100 nm) tra la stagione fredda (26,5 %) e quella calda (27,1 %).

Nel PM₁₀ campionato nella **stagione fredda** sono stati individuati 6 *cluster*, dove:

- ✓ la componente principale è rappresentata dal *cluster* delle particelle di carbonio che rappresenta circa l'82%;
- ✓ la seconda componente è quella dei silicati (circa il 6%) e dei solfati (circa il 6%). Oltre ai silicati vetrosi costituiti prevalentemente da **1:** Si, Al, Ca e Fe; **2:** Si, Ca, Si e Al, sono stati rilevati feldspati (Si, Al e K; Si, Al e Ca) e rare le particelle di argilla (Si e Al, Si, Al e Fe);
- ✓ Il *cluster* delle particelle dei composti metallici presenta un'abbondanza del 3,6 %, e comprende particelle di **1:** Fe, Cu, Si, Mg; **2:** Fe, Si, Cu, Al; **3:** Fe e Cu; **4:** Fe, Si, Cu, Al, Ti; **5:** Fe e Al; **6:** Fe, Mg, Cu, Si, Al; **7:** Ti, Fe, Na, Al, Si, S;
- ✓ il *cluster* dei carbonati presenta un'abbondanza di circa il 2%;
- ✓ risulta assente il *cluster* dei cloruri e degli ossidi di ferro.

Nel PM₁₀ campionato nella **stagione calda** sono stati individuati 7 *cluster*, dove:

- ✓ la componente principale è rappresentata dal *cluster* delle particelle di carbonio che rappresenta circa il 71%, in diminuzione rispetto alla stagione fredda (80%);
- ✓ la seconda componente è quella dei cluster dei silicati che presenta un'abbondanza di circa il 15% (circa il 10% in più di quanto registrato per la stagione fredda);
- ✓ la terza componente è quella dei cluster delle particelle dei composti metallici che presenta un'abbondanza di circa il 12 % (circa 8% in più rispetto al valore registrato nella stagione fredda);
- ✓ il *cluster* delle particelle di ossidi di Fe è di circa il 3% (assente nella stagione fredda) e circa 2,4% in più rispetto valore registrato a Statte nella stessa stagione;
- ✓ il *cluster* dei carbonati è del 2% come nella stagione fredda;

- ✓ risulta assente il *cluster* dei cloruri.

Postazione ISS, Roccarespampani

Le misure hanno evidenziato come il diametro medio delle particelle che costituiscono il PM₁₀ è nel *range* tra 51 nm e 7,8 µm nella stagione fredda, e tra 51 nm e 6,4 µm in quella calda.

Si registrano differenze nell'abbondanza di nanoparticelle (<100 nm) tra la stagione fredda (45%) e quelle della stagione calda che diminuiscono al 34,2%.

Nel PM₁₀ campionato nella **stagione fredda** sono stati individuati 5 *cluster*, dove:

- ✓ la componente principale è rappresentata dal *cluster* delle particelle di carbonio che rappresenta circa il 70%, inferiore a quanto registrato a Roma (80%);
- ✓ la seconda componente è quella dei silicati (circa il 16%). I silicati sono prevalentemente vetrosi e costituiti da **1:** Si, Al, Fe, S; **2:** Si, Al, Fe, Ca, K, S; **3:** Si, Al, Fe, Mg, Ca, S, K. Sono state trovate particelle di argilla (Si e Al; Si, Al e Fe);
- ✓ il *cluster* delle particelle dei composti metallici, presenta un'abbondanza del 5 %, e comprende particelle di **1:** Cu; **2:** Fe e Cu; **3:** Fe, Cr, Al, S, Si; **4:** Fe, Cu, S, Al; **5:** Cu, Ca, S; **6:** Cu e S; **7:** Ti, Fe, S, Ca;
- ✓ sono state rilevate fibre costituite da solo C la cui lunghezza è nel *range* 9,4-142 µm, e con un diametro nel *range* 0,309-3,98 µm;
- ✓ risulta assente il *cluster* dei cloruri e degli ossidi di ferro.

Nel PM₁₀ prelevato nella **stagione calda** sono stati individuati 6 *cluster*, dove:

- ✓ la componente principale è rappresentata dal *cluster* delle particelle di carbonio che rappresenta circa il 78%, in aumento rispetto alla stagione fredda (71%);
- ✓ la seconda componente è quella dei *cluster* dei silicati (circa il 10%);
- ✓ Il *cluster* delle particelle dei composti metallici, presenta un'abbondanza del 3%.
- ✓ continua a risultare assente il *cluster* dei cloruri e degli ossidi di ferro.

A differenza di quanto misurato nella stagione fredda, il PM₁₀ della stagione calda non ha fatto rilevare la presenza di fibre.

Postazione Arpa Puglia, via Macchiavelli

Le misure hanno evidenziato come il diametro medio delle particelle che costituiscono il PM₁₀ è nel *range* tra 59 nm e 10,8 µm nella stagione fredda e tra 51 nm e 7,6 µm nella stagione calda.

A differenza del sito urbano ISS si registrano differenze nell'abbondanza di nanoparticelle (<100 nm) tra le particelle analizzate nella stagione fredda (38 %) e quelle della stagione calda che sale al 67 %.

Nel PM₁₀ campionato **nella stagione fredda** sono stati individuati 7 *cluster*, dove:

- ✓ la componente principale è rappresentata dal *cluster* delle **particelle di carbonio che rappresenta circa il 42%**;

- ✓ la seconda componente è quella dei silicati che rappresenta circa il 19%. Il *cluster* dei silicati è prevalentemente di tipo vetroso e costituito da **1:** Si, Al, Fe, Na, Ca, Mg, S, K; **2:** Si, Al, Na, Ca, Fe; **3:** Si, Al, Na, Fe, Mg, S, K;
- ✓ la terza componente è quella dei carbonati che è presente con una quota di circa il 17%;
- ✓ il cluster dei cloruri è circa 11%;
- ✓ il *cluster* dei solfati è di circa il 5%;
- ✓ Il *cluster* delle particelle dei composti metallici presenta un'abbondanza di circa il 5 % e comprende particelle costituite da **1:** Fe, Si, e Cu; **2:** Fe, Si e Ca; **3:** Fe, Cu, S, Al; **4:** Fe e Al; **5:** Cr, Si e Cl; **6:** Fe e Al; **7:** Al;
- ✓ risulta assente il *cluster* della silice;
- ✓ il *cluster* delle particelle di ossidi di Fe, presenta un'abbondanza di circa 1%.

Nel PM₁₀ prelevato nella **stagione calda** sono stati individuati 5 *cluster*, dove:

- ✓ la componente principale è rappresentata dal *cluster* delle particelle di carbonio che rappresenta circa il 54% (circa il 12% in più di quello della stagione fredda);
- ✓ aumenta la componente dei silicati (circa il 24% rispetto al 19% della stagione fredda) e dei solfati (circa il 14% rispetto al 5% della stagione fredda);
- ✓ aumenta anche la componente dei *cluster* delle particelle dei composti metallici che presenta un'abbondanza di circa il 7% (rispetto al 5% della stagione fredda);
- ✓ risultano assenti il *cluster* della silice (assente anche nella stagione fredda), quello dei cloruri (11% nella stagione fredda) e degli ossidi di Fe.

Postazione Arpa Puglia, Statte

Le misure hanno evidenziato che il PM₁₀ campionato presenta una distribuzione dimensionale con una coda molto lunga e tende ad una distribuzione log-normale; il diametro medio delle particelle che costituiscono il PM₁₀ è nel *range* tra 51 nm e 6,4 µm nella stagione fredda, e tra 51 nm e 11,8 µm nella stagione calda. Si registrano differenze nell'abbondanza di nanoparticelle (<100 nm) tra le particelle analizzate nella stagione fredda (circa il 56%) e quelle della stagione calda (circa il 36%).

Nel PM₁₀ prelevato nella **stagione fredda** sono stati individuati 7 *cluster*, dove:

- ✓ La componente principale è rappresentata dal *cluster* delle particelle di carbonio che rappresenta circa il 75% (nello stesso periodo nel sito Macchiavelli era del 42%);
- ✓ la seconda componente è quella dei silicati e cloruri (circa l'8%). Il *cluster* dei silicati è inferiore a quanto registrato nello stesso periodo a Macchiavelli con circa il 19%. Il *cluster* è prevalentemente di tipo vetroso e costituito da **1:** Si, Al, Fe, Na, Ca, Mg, S, K; **2:** Si, Al, Na, Ca, Fe; **3:** Si, Al, Na, Fe, S, K;
- ✓ il *cluster* dei cloruri è circa l'8%, inferiore a quanto registrato nello stesso periodo a Macchiavelli (11%).

- ✓ il *cluster* dei solfati rappresenta circa il 6% simile a quanto registrato nello stesso periodo a Macchiavelli;
- ✓ il *cluster* dei composti metallici presenta un'abbondanza di circa 1%, valore inferiore a quanto registrato nello stesso periodo a Macchiavelli (circa il 5%);
- ✓ il *cluster* delle particelle di ossidi di Fe presenta un'abbondanza di circa 1%, valore inferiore a quanto registrato nello stesso periodo a Macchiavelli (1,4%);
- ✓ risulta assente il *cluster* della silice come nel sito Macchiavelli.

Nel PM₁₀ prelevato nella **stagione calda** sono stati individuati 7 *cluster*, ma si registrano significative differenze. In particolare:

- ✓ La componente principale è rappresentata dal *cluster* dei silicati che rappresenta circa il 42%. Nello stesso periodo a Macchiavelli il *cluster* dei silicati rappresentava circa l'8%;
- ✓ Il *cluster* delle particelle di carbonio rappresenta circa il 27% (contro il 75% della stagione fredda), e la metà del valore fatto registrare nello stesso periodo a Macchiavelli (54%);
- ✓ La terza componente è il *cluster* dei solfati che rappresenta circa il 19 %, 3 volte il valore fatto registrare nello stesso sito nella stagione fredda (6%) e superiore rispetto al valore fatto registrare a Macchiavelli nello stesso periodo (14%);
- ✓ il *cluster* dei composti metallici presenta un'abbondanza di circa 1 %, valore inferiore a quanto registrato nello stesso periodo a Macchiavelli (circa il 5%);
- ✓ il *cluster* delle particelle di ossidi di Fe presenta un'abbondanza di circa 1 %. Nello stesso periodo a Macchiavelli il *cluster* risultava assente;
- ✓ il *cluster* delle particelle dei composti metallici presenta un'abbondanza di circa il 5%, inferiore al valore fatto registrare nello stesso periodo a Macchiavelli (7%), e comprende particelle costituite da **1**: Fe, Na, Ca, Al, Mg, e S; **2**: Fe e Cu.

Sono state rilevate diverse fibre presumibilmente artificiali. La lunghezza di queste fibre è nel *range* 133,6-271,7 µm, con un diametro nel *range* 0,288-6,25 µm. Alcune sono composte da Si, Na, Ca, Mg e Al e altre da Si, Na, K, Ca e S.

4. Caratterizzazione del potenziale immunotossico e pro-infiammatorio del materiale particellare aerodisperso PM₁₀

Precedenti studi sperimentali hanno messo in evidenza che il materiale particellare aerodisperso può avere numerosi effetti patologici sul sistema immunitario tra cui aumento del numero di linfociti ed anticorpi circolanti, aumento della sensibilizzazione allergica, ed induzione di morte cellulare per apoptosi in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC).

Per tali motivi è stato deciso di utilizzare campioni di PBMC ottenuti da donatori sani quale modello cellulare per la valutazione dei potenziali effetti immunotossici e pro-infiammatori del PM₁₀ raccolto. I campioni di PBMC, costituiti da linfociti e monociti circolanti, sono particolarmente adatti a valutare gli effetti degli inquinanti presenti nel PM₁₀ sul sistema immunitario in seguito al passaggio di tali inquinanti nel circolo sanguigno. I PBMC sono facilmente ottenibili in quantità sufficienti per effettuare diversi test di funzionalità cellulare e permettono di allestire colture cellulari in sospensione sui filtri precedentemente esposti al PM₁₀ come supporto per la semina cellulare.

Il potenziale immunotossico e pro-infiammatorio del PM₁₀ raccolto nei filtri sottoposti a determinazione ponderale e successivamente ritagliati con apposita fustellatrice per ottenere fustelle di filtro di dimensioni adatte per le colture è stato caratterizzato mediante i seguenti saggi *in vitro*:

1) test colorimetrico CCK-8 per valutare la vitalità cellulare, basato sulla riduzione del sale di tetrazolio catalizzata dalle deidrogenasi, enzimi cellulari attivi esclusivamente nelle cellule vitali;

2) test citofluorimetrico di marcatura delle cellule con Annessina V legata al fluorocromo fluoresceina-isotiocianato (FITC) e con il fluorocromo ioduro di propidio per determinare l'apoptosi (morte cellulare programmata). Il test è basato sul legame della molecola Annessina V con la fosfatidilserina presente sulla superficie esterna della membrana plasmatica nelle cellule apoptotiche e non nelle cellule vitali, e sulla capacità dello ioduro di propidio di passare attraverso la membrana delle cellule in apoptosi tardiva o in necrosi per legarsi al DNA presente nel nucleo. L'analisi dei campioni mediante il citofluorimetro, uno strumento che rileva segnali di fluorescenza, permette di discriminare le cellule in apoptosi (positive per Annessina V e ioduro di propidio) dalle cellule vitali (negative per i due marcatori fluorescenti);

3) test citofluorimetrico di marcatura delle cellule con il fluorocromo *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) per valutare la proliferazione cellulare. Il CFSE è una molecola fluorescente lipofila in grado di passare attraverso la membrana cellulare. All'interno della cellula tale molecola viene modificata dalle esterasi presenti nel citoplasma cellulare e perde la capacità di attraversare la membrana. Se le cellule così marcate vanno incontro a proliferazione, la quantità di CFSE presente nella cellula madre si ripartirà equamente tra le cellule figlie. Ognuna riceverà quindi una quantità dimezzata di CFSE. Ciò determina il dimezzamento della quantità di CFSE e quindi del segnale fluorescente ad ogni ciclo di proliferazione. La riduzione del segnale di fluorescenza

analizzato mediante citofluorimetro permette quindi di determinare l'eventuale proliferazione avvenuta nel campione cellulare;

4) saggi immunoenzimatici (ELISA) per valutare citochine pro- ed anti-infiammatorie, chemochine e fattori di crescita secreti dalle cellule nel terreno di coltura. Tali saggi si basano sull'uso di anticorpi specifici in grado di legare le varie molecole di interesse, e di un enzima che, catalizzando una reazione di ossido-riduzione in presenza del suo substrato specifico, determina la formazione di un prodotto colorato che può essere rilevato quantitativamente attraverso uno spettrofotometro.

In ogni campione la quantità di prodotto colorato sarà proporzionale alla concentrazione della molecola di interesse. Mediante tali saggi sono stati determinati i seguenti fattori: TNF-alfa, IL-6 ed IL-1 beta, citochine pro-infiammatorie prodotte da linfociti e monociti; IL-10 e TGF-beta, citochine anti-infiammatorie, importanti nel controllo delle reazioni immunitarie, generalmente prodotte da linfociti e monociti per spegnere la risposta infiammatoria che, se prolungata nel tempo, può danneggiare organi e tessuti; IL-12 ed IFN-gamma, citochine caratteristiche delle risposte T helper 1 (Th1), spesso associate a patologie autoimmuni ed importanti per contrastare le infezioni; IL-8, MIP-1 alfa ed MCP-1, chemochine coinvolte nel reclutamento delle cellule immunitarie nei siti di infiammazione; VEGF-A, fattore di crescita delle cellule endoteliali, importante nella promozione dell'angiogenesi (formazione di nuovi vasi).

Nel corso dello studio sono stati effettuati esperimenti preliminari per la messa a punto delle colture cellulari utilizzando il PM₁₀ prelevato nel solo sito urbano di Roma, presso l'ISS, nel mese di dicembre 2014. I saggi cellulari 1), 2), 3) sono stati effettuati su campioni di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ottenuti da donatori sani e coltivati *in vitro* in presenza di solo terreno di coltura (medium), di filtro non esposto al PM₁₀ e di filtro esposto per 6 e 24 ore.

Solo successivamente sono stati utilizzati i filtri dei prelievi effettuati a Roma e Taranto (29-30 luglio 2015 per la stagione calda, 10-11 marzo 2016 per la stagione fredda). La valutazione comparativa dei filtri campionati nei diversi siti per 24 ore e di quello non campionato (bianco/non esposto) è stata effettuata in colture di PBMC ottenuti da 6 donatori sani su cui sono stati effettuati i saggi cellulari 1), 2) e 3).

Nell'ultimo semestre dello studio sono stati effettuati tutti i saggi immunoenzimatici per valutare le citochine e chemochine secrete dalle cellule nei terreni di coltura raccolti in tutti gli esperimenti eseguiti e conservati a -80°C.

Per finire è stata effettuata l'analisi statistica di tutti i risultati ottenuti relativi ai campionamenti stagione calda e stagione fredda.

4.1. Effetto immunotossico del PM₁₀: Vitalità cellulare

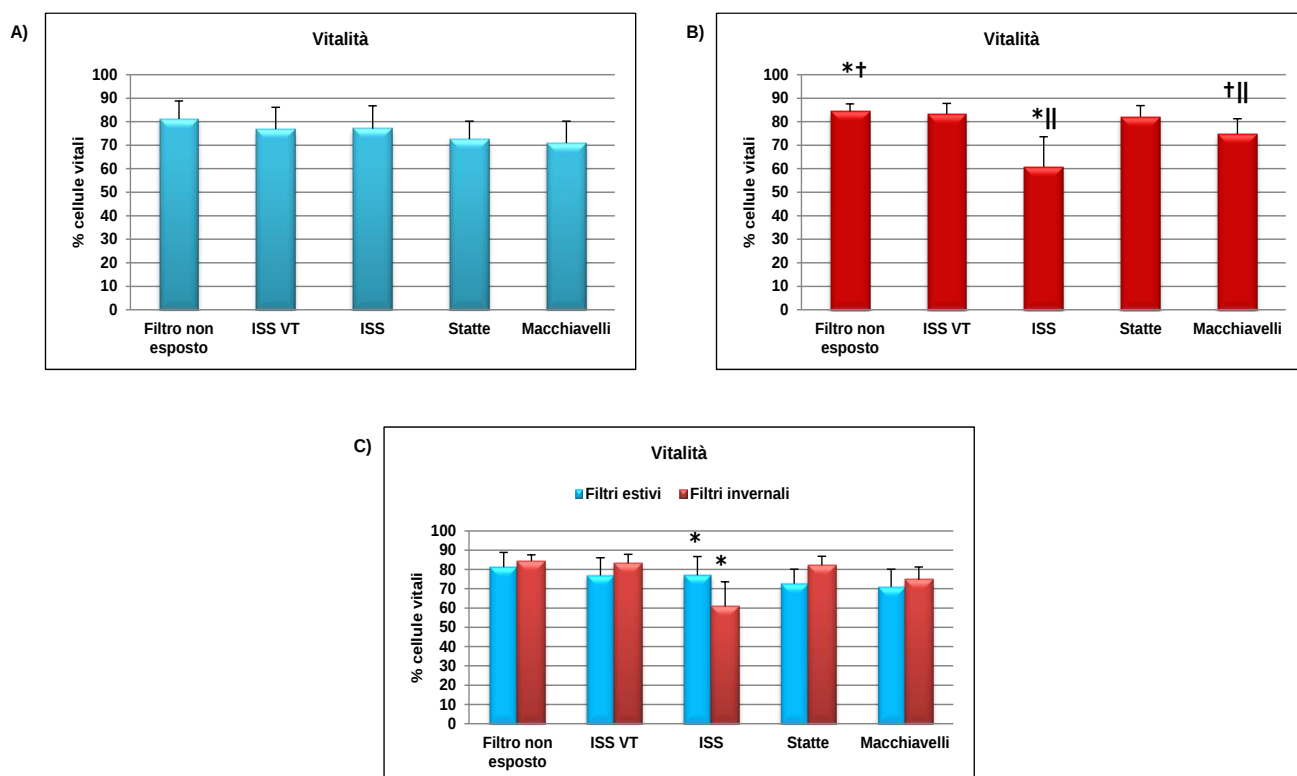
Campioni Stagione calda: la valutazione della vitalità cellulare, determinata mediante il test colorimetrico CCK-8, non ha messo in evidenza una riduzione significativa di tale parametro quando le cellule venivano coltivate per 24 ore in presenza dei filtri prelevati nei quattro siti nella stagione calda (figura 1A, media di 6 esperimenti). Pur considerando il limitato numero di campioni, i risultati ottenuti dai test di vitalità cellulare sembrano non risentire delle differenze registrate nelle analisi di caratterizzazione chimica e chimico-fisica del PM₁₀ campionato nei quattro siti.

Campioni Stagione Fredda: la vitalità cellulare è risultata invece significativamente ridotta quando le cellule venivano coltivate in presenza delle fustelle dei filtri stagione fredda campionati nei siti ISS Roma e Macchiavelli rispetto alle cellule coltivate con filtro non esposto (ISS Roma vs filtro non esposto, $P=0,001$; Macchiavelli vs filtro non esposto, $P=0,009$, mediante il test t di *Student*; figura 1B, media di 6 esperimenti).

La vitalità cellulare in presenza delle fustelle del filtro ISS Roma era significativamente più bassa di quella osservata in presenza delle fustelle del filtro Macchiavelli ($P=0,04$; figura 1B).

Il confronto tra i filtri campionati nelle due diverse stagioni ha messo in evidenza una vitalità significativamente ridotta nelle cellule coltivate in presenza delle fustelle del filtro ISS Roma stagione fredda rispetto a quelle coltivate in presenza delle fustelle filtro ISS Roma stagione calda ($P=0,03$, mediante il test t di *Student*; figura 1C).

Figura 1



Legenda – Percentuali di cellule vitali nei campioni di PBMC determinate mediante il test colorimetrico CCK-8. A) stagione calda; B) stagione fredda; *p=0,001, † p=0,009, || p=0,04, test t di Student; C) confronto tra le due stagioni; * p=0,03, test t di Student. Filtro non esposto: PBMC in coltura in presenza di filtro non esposto; ISS VT: Roccarespampani sito di fondo; ISS: Roma; Statte: sito di Arpa Puglia; Macchiavelli: sito di Arpa Puglia.

Apoptosi

Campioni Stagione Calda: La marcatura delle cellule con Annessina V e ioduro di propidio non ha evidenziato cambiamenti significativi del numero di cellule in apoptosi precoce (positive per annessina V) e tardiva (positive per annessina V e ioduro di propidio) nei campioni di PBMC coltivati in presenza dei filtri stagione calda prelevati nei quattro siti rispetto ai PBMC coltivati con filtro non esposto (Figure 2A e 2B, media di 6 esperimenti).

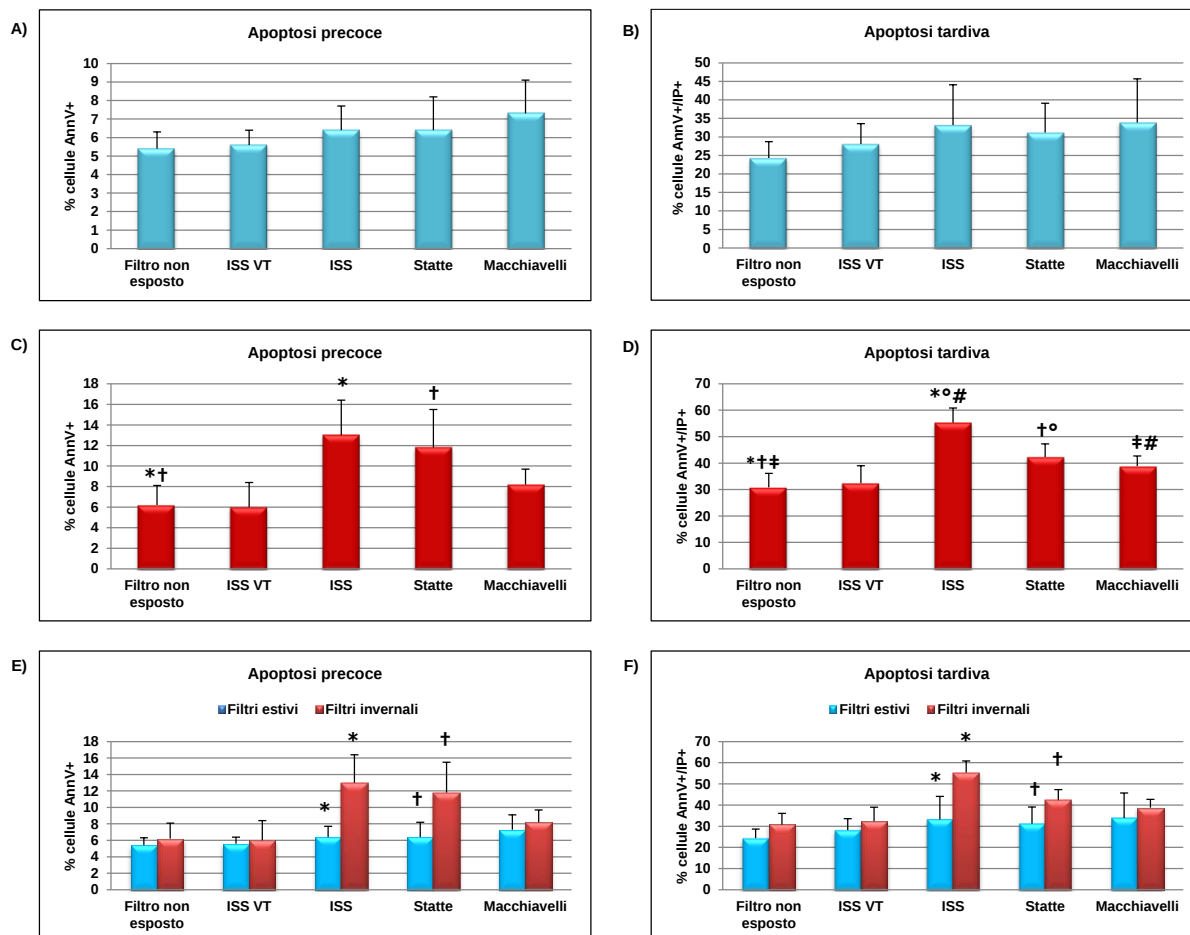
Campioni Stagione Fredda: L'analisi dei dati relativi al campionamento stagione fredda ha messo in evidenza un aumento significativo del numero di cellule in apoptosi precoce e tardiva nei campioni coltivati in presenza dei filtri ISS Roma, Statte e Macchiavelli rispetto a quelli in presenza di filtro non esposto (apoptosi precoce: ISS Roma vs filtro non esposto P=0,002, Statte vs filtro non esposto

$P=0,008$; apoptosi tardiva: ISS Roma e Statte vs filtro non esposto $P<0,0001$, Macchiavelli vs filtro non esposto $P=0,01$, mediante il test t di *Student*; figure 2C e 2D).

La maggiore percentuale di cellule apoptotiche è stata rilevata nei campioni esposti al filtro ISS Roma (apoptosi tardiva: ISS Roma vs Statte $P=0,002$, ISS Roma vs Macchiavelli $P=0,0001$).

Il confronto tra i filtri campionati nelle due diverse stagioni ha messo in evidenza una percentuale di cellule apoptotiche significativamente maggiore nelle cellule coltivate in presenza dei filtri ISS Roma e Statte stagione fredda rispetto a quelle in presenza dei filtri ISS Roma e Statte stagione calda (apoptosi precoce: ISS Roma $P=0,001$, Statte $P=0,009$; apoptosi tardiva ISS Roma $P=0,001$, Statte $P=0,01$, figure 2E e 2F).

Figura 2

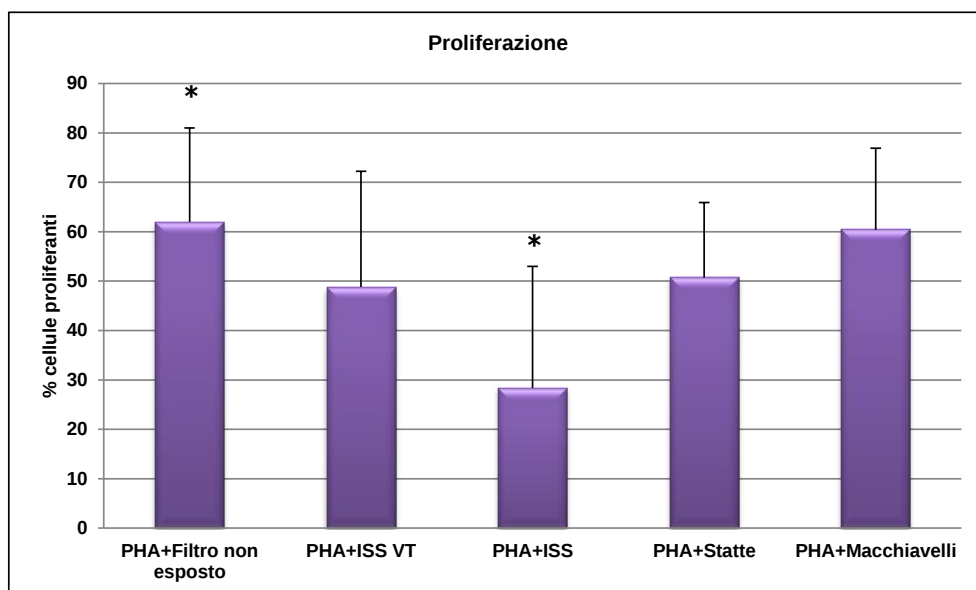


Legenda – Apoptosi precoce (percentuali di cellule positive per Annessina V) e apoptosi tardiva (percentuali di cellule positive per Annessina V e ioduro di propidio), valutate mediante analisi citofluorimetrica nei campioni di PBMC. A) apoptosi precoce stagione calda; B) apoptosi tardiva stagione calda; C) apoptosi precoce stagione fredda, * $p=0,002$, † $p=0,008$, test t di Student; D) apoptosi tardiva stagione fredda, * † $p<0,0001$, ‡ $p=0,01$, ° $p=0,002$, # $p=0,0001$, test t di Student; E) apoptosi precoce confronto tra le due stagioni, * $p=0,001$, † $p=0,009$, test t di Student; F) apoptosi tardiva confronto tra le due stagioni, * $p=0,001$, † $p=0,01$, test t di Student. Filtro non esposto: PBMC in coltura in presenza di filtro non esposto; ISS VT: Roccarespampani sito di fondo; ISS: Roma; Statte: sito di Arpa Puglia; Macchiavelli: sito di Arpa Puglia; AnnV: annessina V; IP: ioduro di propidio.

Proliferazione cellulare

Campioni Stagione Fredda: Per mettere in evidenza un ulteriore possibile effetto delle caratteristiche del PM₁₀ sul sistema immunitario sono stati condotti esperimenti di proliferazione cellulare in risposta ad un mitogeno (PHA), dopo esposizione o meno dei PBMC alle fustelle dei filtri. L'analisi della marcatura cellulare con CFSE ha mostrato una significativa riduzione della capacità proliferativa delle cellule coltivate con le fustelle del filtro ISS Roma stagione fredda rispetto alle cellule coltivate con filtro non esposto ($P=0,02$ mediante il test t di Student; figura 3, media di 6 esperimenti).

Figura 3



Legenda – Percentuali di cellule proliferanti nei campioni di PBMC esposti ai filtri stagione fredda e stimolati mediante il mitogeno fitoemoagglutina (PHA). * $p=0,002$, test t di Student. Filtro non esposto: PBMC in coltura in presenza di filtro non esposto; ISS VT: Roccarespamapani sito di fondo; ISS: Roma; Statte: sito Arpa Puglia; Macchiavelli: sito Arpa Puglia.

4.2. Effetto pro-infiammatorio

Nel IV e V semestre è stata effettuata la raccolta dei sopranatanti di coltura delle cellule per la valutazione mediante test immunoenzimatici di citochine (TNF-alfa, IL-

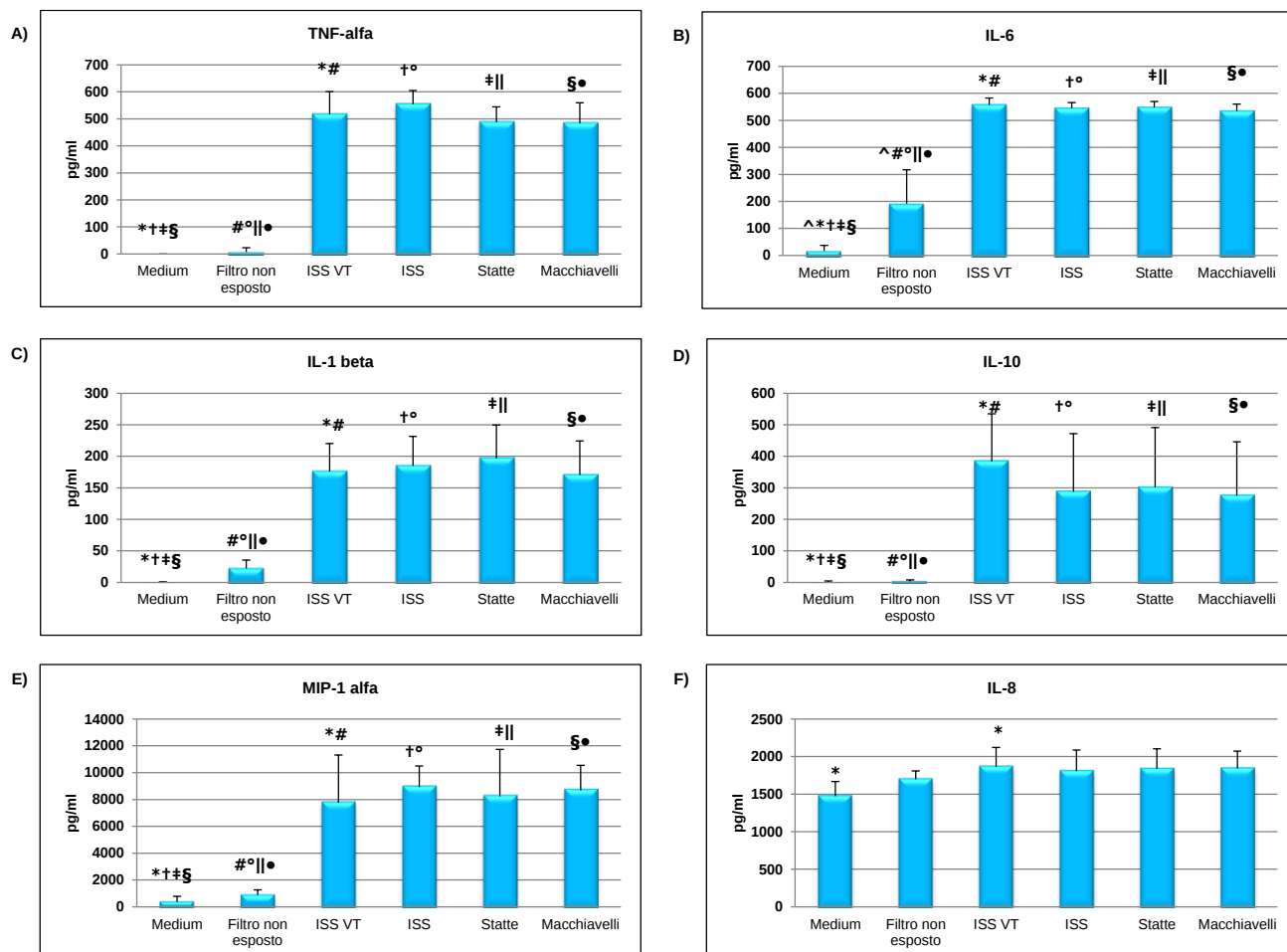
6, IL-10, IL-12, IL-1 beta, IFN-gamma, TGF-beta), chemochine (IL-8, MIP-1 alfa, MCP-1) e fattori di crescita (VEGF-A).

Campioni Stagione Calda: L'analisi dei dati relativi ai filtri stagione calda ha mostrato un aumento significativo della produzione delle citochine pro-infiammatorie TNF-alfa, IL-6 e IL-1 beta, della citochina anti-infiammatoria IL-10 e della chemochina MIP-1 alfa da parte dei PBMC coltivati in presenza delle fustelle dei filtri esposti al PM₁₀ in tutte le quattro aree in esame, rispetto ai PBMC coltivati con il solo mezzo di coltura o con le fustelle del filtro non esposto ($P < 0,001$, mediante il test Anova di analisi della varianza; figure 4A, 4B, 4C, 4E, media di 6 esperimenti).

L'esposizione alle fustelle del filtro ISS Roccarespamapni induceva anche un aumento significativo della chemochina IL-8 rispetto all'esposizione delle cellule al solo mezzo di coltura ($P < 0,05$, figura 4F, media di 6 esperimenti).

Non sono state osservate differenze significative per ciò che riguarda la produzione di MCP-1, IFN-gamma, IL-12, TGF-beta e VEGF-A.

Figura 4



Legenda – Produzione di citochine e chemochine da parte dei PBMC esposti ai filtri stagione calda. A) TNF-alfa, * † ‡ § # ° || • p<0,001, test Anova; B) IL-6, ^ * † ‡ § # ° || • p<0,001, test Anova; C) IL-1 beta, * † ‡ § # ° || • p<0,001, test Anova; D) IL-10, * † ‡ § # ° || • p<0,001, test Anova; E) MIP-1 alfa, * † ‡ § # ° || • p<0,001, test Anova; F) IL-8, * p<0,05, test Anova. Filtro non esposto: PBMC in coltura in presenza di filtro non esposto; ISS VT: Roccarespanpani sito di fondo; ISS: Roma; Statte: sito di Arpa Puglia; Macchiavelli: sito di Arpa Puglia; pg/ml: concentrazioni espresse in picogrammi/millilitro.

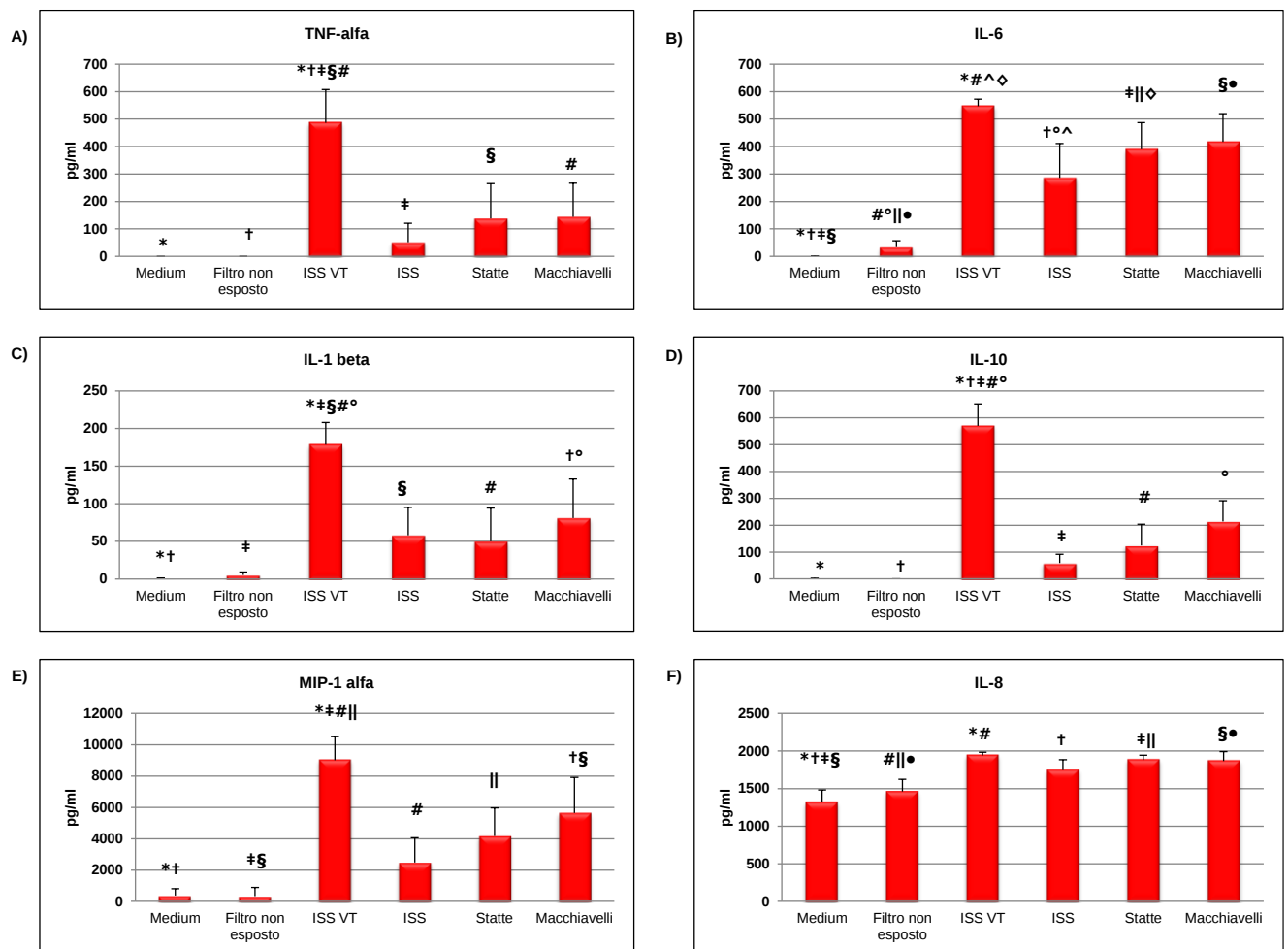
Campioni Stagione Fredda: L'analisi dei dati relativi ai filtri stagione fredda ha mostrato un aumento significativo della produzione di TNF-alfa, IL-6, IL-1 beta, IL-10, MIP-1 alfa ed IL-8 da parte dei PBMC coltivati sul filtro PM₁₀ della postazione ISS Roccarespanpani rispetto ai PBMC coltivati con il solo mezzo o con il filtro non esposto (P<0,001, figure 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F, media di 6 esperimenti, mediante ANOVA). Per ciò che riguarda le altre 3 aree ISS Roma, Statte e Macchiavelli, è stato osservato un aumento significativo solo della produzione di IL-6 e IL-8 (IL-6: P<0,001; IL-8: P<0,05, figure 5B, 5F), mentre per il filtro di Macchiavelli è stato

osservato un aumento anche della citochina IL-1 beta ($P<0,05$, figura 5C) e della chemochina MIP-1 alfa ($P<0,001$, figura 5E).

Va notato che la produzione di TNF-alfa, IL-6, IL-1 beta, IL-10, e MIP-1 alfa è significativamente più elevata nei campioni di PBMC esposti al filtro ISS Roccarespampani rispetto ai campioni esposti ai filtri campionati negli altri 3 siti (TNF-alfa ed IL-10: $P<0,001$; IL-6: $P<0,05$; IL-1 beta e MIP-1 alfa: $P<0,01$; figure 5A, 5B, 5C, 5D, 5E).

Per quanto riguarda la produzione di MCP-1, IFN-gamma, IL-12, TGF-beta e VEGF-A, non sono state osservate differenze significative nei campioni prelevati.

Figura 5



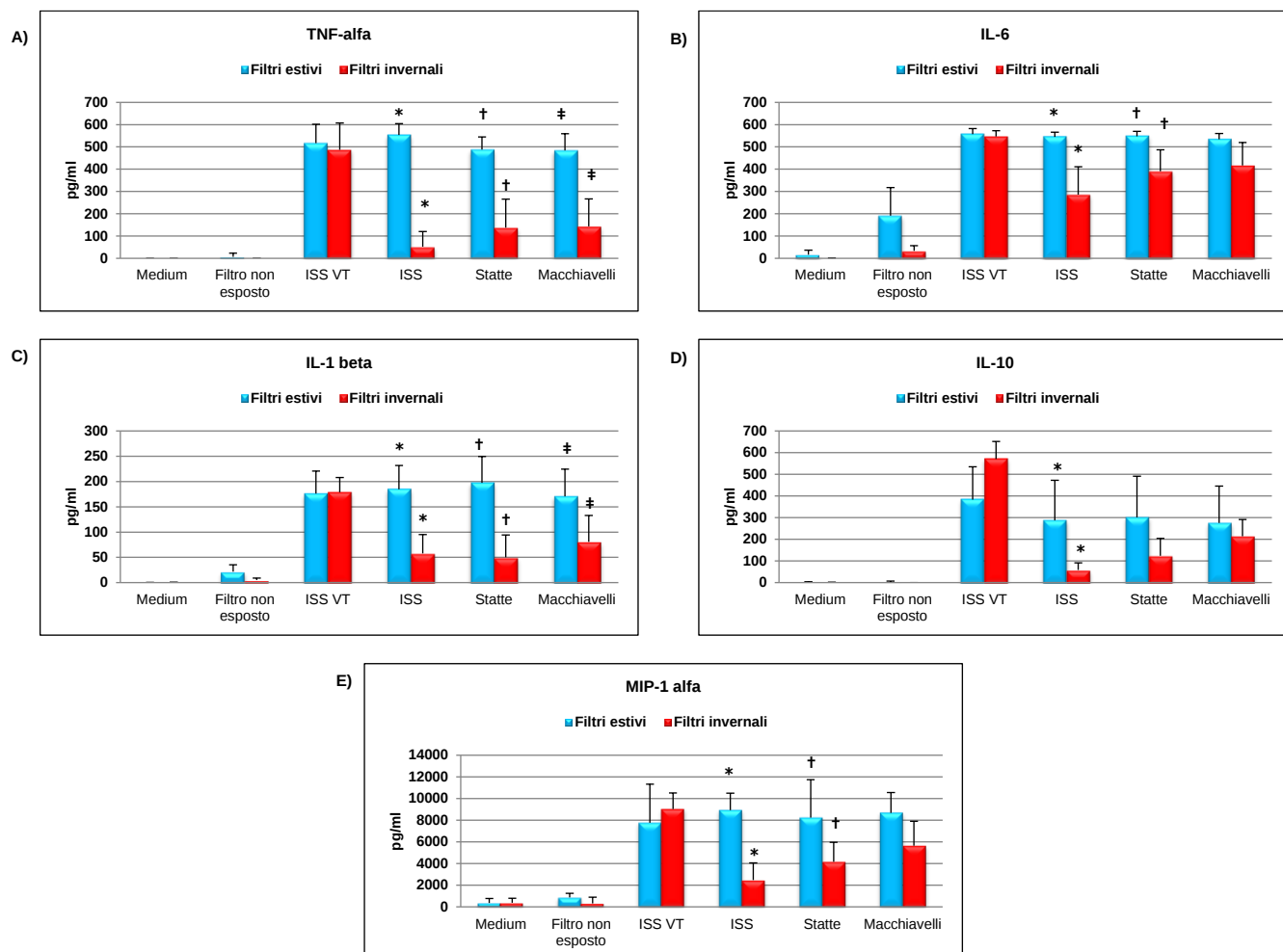
Legenda – Produzione di citochine e chemochine da parte dei PBMC esposti ai filtri stagione fredda.

A) TNF-alfa, * † ‡ § # $p<0,001$, test Anova; B) IL-6, * # † ° ‡ || § • $p<0,001$, ^ † ° $p<0,05$, test Anova; C) IL-1 beta, * ‡ $p<0,001$, † $p<0,05$, § # ° $p<0,01$, test Anova; D) IL-10, * † ‡ § # ° $p<0,001$, test Anova; E) MIP-1 alfa, * ‡ † § $p<0,001$, # || $p<0,01$, test Anova; F) IL-8, * # $p<0,001$, † ‡ # § • $p<0,05$, test

Anova. Filtro non esposto: PBMC in coltura in presenza di filtro non esposto; ISS VT: Roccarespampani sito di fondo; ISS: Roma; Statte: sito di Arpa Puglia (Taranto); Macchiavelli: sito Arpa Puglia (Taranto); pg/ml: concentrazioni espresse in picogrammi/millilitro.

Il confronto tra le due stagioni di rilevamento ha messo in evidenza una ridotta produzione delle citochine TNF-alfa, IL-6, IL-1 beta, IL-10 e della chemochina MIP-1 alfa, nelle cellule coltivate in presenza dei filtri ISS Roma, Statte e Macchiavelli stagione fredda rispetto ai filtri ISS Roma, Statte e Macchiavelli stagione calda (TNF-alfa e IL-1 beta: $P < 0,001$; IL-6, IL-10 e MIP-1 alfa: $P < 0,05$; mediante Test Anova; figure 6A, 6B, 6C, 6D, 6E). Nessuna differenza è stata rilevata con i filtri del sito ISS Roccarespampani.

Figura 6



Legenda – Produzione di citochine e chemochine da parte dei PBMC, confronto tra le due stagioni. A) TNF-alfa, * † ‡ $p < 0,001$, test Anova; B) IL-6, * † $p < 0,05$, test Anova; C) IL-1 beta, * † ‡ $p < 0,001$, test Anova; D) IL-10, * $p < 0,05$, test Anova; E) MIP-1 alfa, * † $p < 0,05$, test Anova. Filtro non esposto: PBMC in coltura in presenza di filtro non esposto; ISS VT: Roccarespampani sito di fondo; ISS: Roma; Statte: sito di Arpa Puglia; Macchiavelli: sito di Arpa Puglia; pg/ml: concentrazioni espresse in picogrammi/millilitro.

Allo scopo di valutare se la ridotta produzione di citochine e chemochine osservata nei campioni esposti alle fustelle dei filtri stagione fredda ISS Roma, Statte e Macchiavelli rispetto a quella osservata nei campioni esposti alle fustelle dei filtri campionati negli stessi siti nella stagione calda fosse imputabile alla ridotta vitalità cellulare, osservata in presenza delle fustelle del filtro stagione fredda, è stato effettuato il *test* di regressione lineare tra le concentrazioni delle citochine TNF-alfa, IL-6, IL-1 beta, IL-10 e della chemochina MIP-1 alfa, e le percentuali di cellule

apoptotiche in entrambe le stagioni. L'analisi statistica ha evidenziato una correlazione inversa tra le concentrazioni delle citochine esaminate e le percentuali di cellule in apoptosi precoce e tardiva (TNF-alfa: apoptosi precoce $r = -0,62$ $p < 0,0001$, apoptosi tardiva $r = -0,53$ $p = 0,0001$; IL-6: apoptosi precoce $r = -0,66$ $p < 0,0001$, apoptosi tardiva $r = -0,58$ $p < 0,0001$; IL-1 beta: apoptosi precoce $r = -0,73$ $p < 0,0001$, apoptosi tardiva $r = -0,43$ $p = 0,0012$; IL-10: apoptosi precoce $r = -0,51$ $p = 0,0002$, apoptosi tardiva $r = -0,53$ $p < 0,0001$; MIP-1 alfa: apoptosi precoce $r = -0,46$ $p = 0,0009$, apoptosi tardiva $r = -0,54$ $p < 0,0001$).

5. Caratterizzazione del potenziale citotossico e genotossico del materiale particellare aerodisperso PM₁₀

I lavori per la caratterizzazione del potenziale citotossico e genotossico del materiale aerodisperso della città di Taranto hanno previsto una prima fase di acquisizione ed analisi dei dati presenti in letteratura al fine di identificare il modello cellulare più idoneo per tale caratterizzazione e valutare le informazioni pregresse sugli effetti biologici.

Il modello cellulare scelto per la valutazione della citotossicità e genotossicità doveva essere pertinente con l'esposizione umana, tenere conto dell'assorbimento e della possibile distribuzione del materiale in studio o dei suoi metaboliti e delle modificazioni fisiologiche dovute all'interazione con il sito di contatto. Inoltre, il modello cellulare doveva fornire informazioni che consentissero di formulare ipotesi sull'eventuale meccanismo di interazione del materiale studiato con il DNA ed essere idoneo alle particolari condizioni sperimentali dei saggi di genotossicità utilizzati.

Per la valutazione del potenziale citotossico e genotossico del PM₁₀ sono stati utilizzati: il saggio della cometa, l'analisi al Citofluorimetro a Flusso (Fluorescence-activated cell sorting - FACS) della vitalità cellulare e della fosforilazione dell'istone H₂AX.

Il test della cometa si basa sull'applicazione di una tecnica elettroforetica che valuta la presenza di rotture a singolo e doppio filamento sul DNA, sia come rotture dirette che come conseguenza della presenza di siti labili agli alcali (siti abasici). La citotossicità del PM₁₀ è stata valutata utilizzando un colorante cellulare per analisi al FACS che lega le ammine libere e riesce a discriminare tra cellule vive e cellule morte poiché penetrando nelle cellule danneggiate interagisce non solo con i residui amminici dei fattori di membrana della cellula ma anche con le ammine citoplasmatiche marcando così le cellule morte con una intensità cinque volte superiore a quella delle cellule vive (*Live/Dead Fixable Violet Stain, Molecular Probe*). La fosforilazione dell'istone H₂AX (γ H₂AX) rappresenta un biomarcatore per il monitoraggio del danno al DNA, in particolare rotture del DNA doppio filamento, e dell'attivazione della risposta al danno stesso. Il γ H₂AX è stato

quantificato al FACS solo in cellule che risultavano vitali nel momento dell'acquisizione.

Il modello cellulare prescelto doveva quindi rispondere alle necessità dei saggi. Infatti i *test*, che sono stati effettuati mettendo le cellule a diretto contatto con fustelle di filtri contenenti PM₁₀, proveniente dal rilevamento già descritto al punto 2, prevedono la necessità di ottenere una sospensione di singole cellule su cui è stata effettuata la valutazione del danno al DNA.

Dall'analisi della letteratura è emerso che il materiale particellare può interagire con diverse cellule della mucosa polmonare, tra cui macrofagi e cellule epiteliali. In particolare, i monociti/macrofagi hanno un ruolo molto importante nella risposta infiammatoria sia locale che sistemica attraverso la fagocitosi delle particelle e la produzione delle citochine, mentre le cellule epiteliali bronchiali sono un bersaglio diretto del materiale aero disperso.

Da questa valutazione abbiamo selezionato alcuni modelli cellulari tenendo anche conto della coerenza con l'esposizione:

- 1) le cellule A549, una linea cellulare umana di adenocarcinoma dell'epitelio basale alveolare. Sono cellule squamose responsabili della diffusione delle sostanze, quali acqua ed elettroliti, attraverso gli alveoli polmonari. Crescono adese in monostrato *in vitro* e hanno un corredo cromosomico ipertriploide. Sono cellule ben caratterizzate e molto utilizzate negli studi tossicologici sul particolato aereo.
- 2) le cellule Beas 2B che sono cellule umane bronchiali non tumorali, ma trasformate con SV40. Si differenziano in cellule squamose in presenza di siero o a confluenza. Crescono adese in monostrato *in vitro* e hanno un corredo cromosomico pseudodiploide.
- 3) le cellule U937 una linea umana del sistema dei fagociti mononucleati, stabilizzata da un linfoma effusivo di miociti, progenitori dei monociti/macrofagi che presentano numerosi vantaggi sia in termini di specificità del bersaglio, sia perché, crescendo in sospensione, risultano particolarmente adatte alle peculiari necessità di esposizione (direttamente a contatto con il filtro in cui è raccolto il materiale in esame) e alle caratteristiche del test della cometa che necessita di una sospensione di singole cellule.
- 4) PBMC che sono linfociti e monociti primari umani ottenuti per separazione su gradiente di densità da una sacca di sangue proveniente da un donatore sano, non fumatore.

Nel corso dello studio si è provveduto all'acquisizione delle linee cellulari selezionate e dei materiali necessari per la loro coltura, e alla messa a punto delle condizioni di coltura per le linee cellulari.

Gli esperimenti preliminari sono stati condotti utilizzando PM₁₀ messo a disposizione dall'U.O.2 dell'ISS, campionato presso la stazione di rilevamento degli inquinanti atmosferici dell'ISS in Viale Regina Elena, Roma sulle diverse linee cellulari, selezionate nella prima fase del progetto, e sono state ottimizzate le condizioni

sperimentali per i saggi di citotossicità e genotossicità (numero di cellule per piastra, condizioni di coltura e recupero cellulare, condizioni di marcatura delle cellule).

Sono state valutate eventuali interferenze derivanti dalle caratteristiche del filtro utilizzato per il rilevamento del PM₁₀ nel terreno di coltura, in particolare sulla vitalità e integrità cellulare e sono stati condotti esperimenti preliminari per valutare quale, tra le linee cellulari selezionate in base alla coerenza con l'esposizione, era la più idonea per condurre lo studio.

I risultati del primo esperimento, utilizzando i quattro modelli cellulari, hanno evidenziato che le due linee cellulari A549 e Beas 2B, che crescono adese alle piastre, non erano adatte alle nostre condizioni di trattamento: la presenza del filtro ha determinato la morte del 90% delle cellule indipendentemente dalla presenza o meno del PM₁₀.

In seguito a questo risultato, sono stati effettuati ulteriori esperimenti utilizzando unicamente la linea cellulare U937 e i PBMC, su cui abbiamo eseguito delle prove di trattamento utilizzando filtri su cui era stato raccolto il PM₁₀ per 6 e 24 ore, lasciandoli a contatto con le cellule per 3 e 24 ore.

Sulla base dei risultati ottenuti sono state standardizzate le condizioni di trattamento. In particolare, è stato individuato nei PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) ottenuti da donatori sani, il modello cellulare più idoneo agli scopi del nostro studio sia in termini di sensibilità che di rappresentatività dell'esposizione, in quanto si è visto che le U937 non davano alcun tipo di risposta a nessuna delle condizioni di trattamento. Inoltre è stato stabilito che l'esposizione dei PBMC per la durata di 3 ore alle fustelle dei filtri di PM₁₀ prelevati per 24 ore in ciascun sito, era la condizione più idonea alle nostre condizioni di saggio.

5.1. Risultati del Test della Cometa su PBMC

Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti per valutare le proprietà genotossiche del PM₁₀ presente sui filtri prelevati in due diverse stagioni (estate e inverno).

I PBMC sono stati messi in coltura alla concentrazione di 1×10^6 /ml per 3 ore in presenza delle fustelle di PM₁₀ e di fustelle di filtri bianchi. Inoltre è stata allestita una coltura di controllo senza filtro e una coltura trattata con un agente noto per indurre rotture a singolo e doppio filamento, il metilmetansulfonato (MMS), utilizzato come controllo positivo alla concentrazione di 200 μ M.

Dopo 3 ore di esposizione, le fustelle di PM₁₀ sono state rimosse e raccolte le cellule. Il test della Cometa è stato eseguito in ambiente alcalino allo scopo di evidenziare rotture a singolo e doppio filamento del DNA.

Il protocollo del saggio della Cometa prevede l'inclusione, dopo trattamento del campione cellulare in esame, in uno strato di gel di agarosio su un vetrino da microscopio. Le cellule così preparate, vengono poi lisate mediante una soluzione ad alta concentrazione di sali, il DNA denaturato, e quindi sottoposto ad elettroforesi in ambiente alcalino (pH 13). Durante la corsa elettroforetica le rotture presenti sull'elica di DNA determinano la migrazione del DNA nel campo elettroforetico,

facendo assumere alla struttura la forma di una cometa, la cui lunghezza ed intensità è proporzionale al numero di rotture. La valutazione del danno presente sul DNA delle cellule viene effettuata mediante il programma dedicato IAS2000 (Delta Sistemi sas) che fornisce parametri quantitativi di danno tra i quali il *Tail Moment*, che rappresenta lunghezza della coda della cometa, x l'intensità della fluorescenza.

6. Risultati campionamento stagione calda

Saggio della Cometa

I risultati di tre esperimenti indipendenti della valutazione del danno al DNA su PBMC esposti per 3 ore alle fustelle di PM₁₀ raccolto a luglio 2015 per 24 ore hanno mostrato che:

- 1) la presenza delle fustelle di filtro nelle colture cellulari non aumenta la quantità basale del danno presente sul DNA delle cellule ($p=0,148$, *t-Student*)
- 2) vi è un aumento statisticamente significativo nel danno al DNA dopo trattamento con le fustelle dei filtri provenienti dai siti di raccolta di Machiavelli ($p=0,003$, *t-Student*) e Roma ISS ($p=0,001$, *t-Student*)
- 3) i valori di danno al DNA si mantengono molto bassi per tutti i siti in esame come si può facilmente evincere dai valori di *Tail moment* del controllo positivo MMS, che è un agente mutageno riconosciuto, ad una dose di trattamento standard di 200µM (Tabella 1)

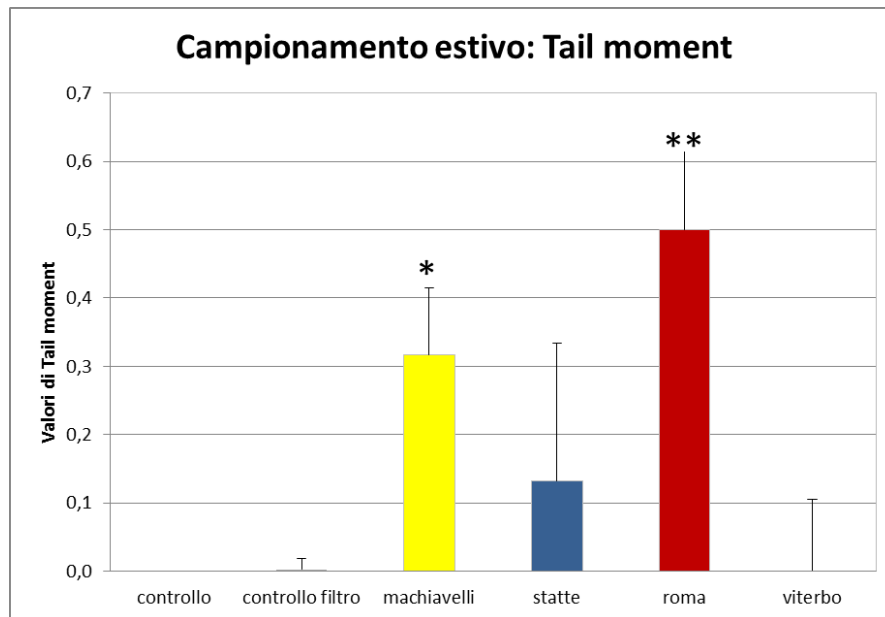
Nella Tabella 8 e nella Figura 8 sono riportate i valori delle medie dei tre esperimenti $\pm$ deviazioni standard, nonché il p di significatività, calcolato con il test del *t-Student*, per il parametro di danno al DNA espresso come *Tail moment*

Tabella 8

Tail-Moment	medie $\pm$ ds	p
controllo	0,000 $\pm$ 0,000	
controllo filtro	0,002 $\pm$ 0,016	0,148
machiavelli	0,316 $\pm$ 0,098	0,003
statte	0,133 $\pm$ 0,201	0,129
roma	0,500 $\pm$ 0,125	0,001
viterbo	0,000 $\pm$ 0,105	0,180
mms	17,162 $\pm$ 7,397	0,001

Legenda – Sono riportati i valori medi di Tail moment di tre esperimenti indipendenti $\pm$ la deviazione standard (ds) e la significatività calcolata con il t-Student (p) per ciascun punto sperimentale vs il controllo: controllo (PBMC di controllo in coltura senza filtro); controllo Filtro (colture in presenza di filtro non esposto); machiavelli (sito di Machiavelli, Taranto), Statte (sito di Statte, Taranto); Roma (sito di viale Regina Elena, Roma); Viterbo (sito rurale nella campagna laziale); MMS (metilmetansulfonato 200µM).

Figura 8



Legenda – controllo: PBMC di controllo in coltura senza filtro); controllo Filtro: colture in presenza di filtro non esposto; Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespampani VT (sito di fondo ISS). * $p < 0,005$; ** $p \leq 0,001$, t-Student.

Tabella 8

Tail-Moment	medie $\pm$ ds	p
controllo	0,000 $\pm$ 0,000	
controllo filtro	0,002 $\pm$ 0,016	0,148
machiavelli	0,316 $\pm$ 0,098	0,003
statte	0,133 $\pm$ 0,201	0,129
roma	0,500 $\pm$ 0,125	0,001
viterbo	0,000 $\pm$ 0,105	0,180
mms	17,162 $\pm$ 7,397	0,001

Legenda – Sono riportati i valori medi di *Tail moment* di tre esperimenti indipendenti $\pm$ la deviazione standard (ds) e la significatività calcolata con il *t-Student* (p) per ciascun punto sperimentale vs il controllo: controllo (PBMC di controllo in coltura senza filtro); controllo Filtro (colture in presenza di filtro non esposto); Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespampani VT (sito di fondo ISS); MMS (metilmetansufonato 200 μ M).

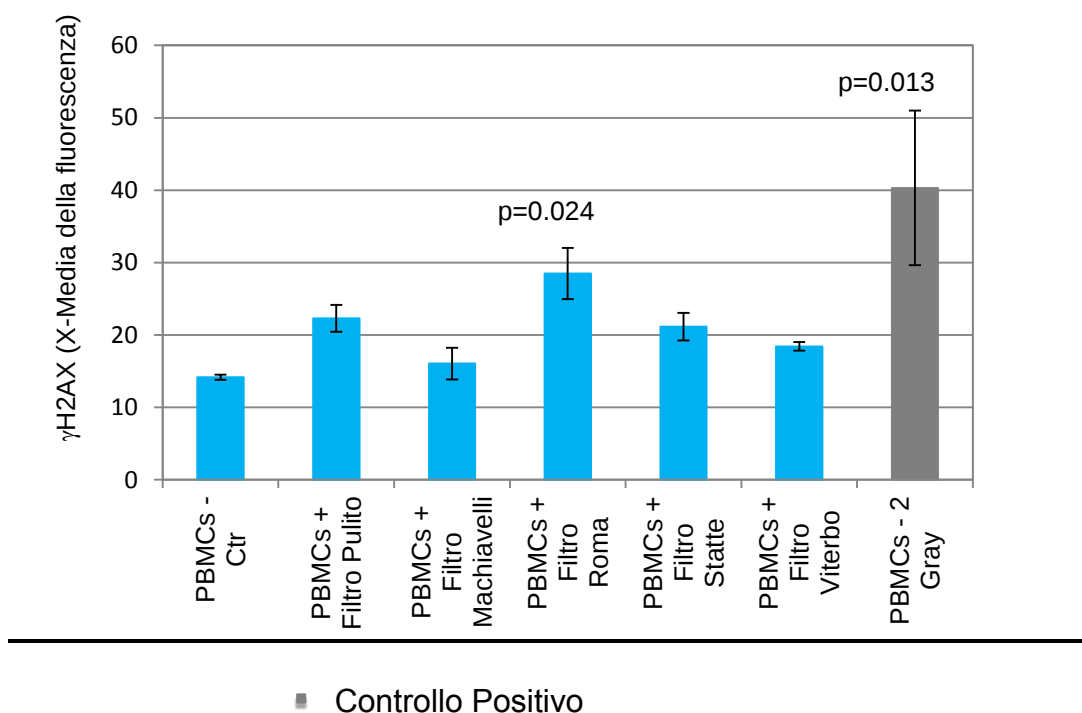
Risultati dell'attivazione dell'istone H2AX e della mortalità cellulare

Parallelamente al test della Cometa sono stati effettuati saggi di analisi al FACS per valutare contemporaneamente la citotossicità del PM₁₀, evidenziata come morte delle cellule, e la sua genotossicità, rilevata come fosforilazione dell'istone H2AX. Nell'allestimento dei saggi è stata inserita anche una coltura di cellule sottoposte a raggi X (2 Gray) utilizzata come controllo positivo della fosforilazione dell'istone. I test effettuati hanno rilevato:

1. la presenza del filtro nelle colture cellulari non aumenta i valori di fosforilazione di H2AX
2. si osserva un aumento lieve ma significativo ($p=0.024$) della fosforilazione di H2AX in colture cellulari incubate con i filtri provenienti dal sito di campionamento di Roma
3. è presente un effetto citotossico dovuto all'esposizione delle cellule al filtro che è però indipendente dalla presenza di particolato.

Nella Figura 9 e nella Tabella 9 sono riportati rispettivamente i valori relativi all'istone γ H2AX, come medie della x-Mean della fluorescenza rilevata al FACS, e i dati di citotossicità, indicati come percentuali di mortalità cellulare normalizzati per il campione di controllo non trattato.

Figura 9



Legenda - Sono riportati i valori relativi all'istone $\gamma\text{H}_2\text{AX}$, come medie della x-Mean della fluorescenza rilevata al FACS relativamente al campionamento estivo. Ctr: PBMC di controllo in coltura senza filtro; Filtro pulito: PBMC in presenza di filtro non esposto; Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespampani VT (sito di fondo ISS); 2 Gray: PMBC esposti a raggi X (2 Gray).

Tabella 9

	Cellule Morte (%)
	Media $\pm$ DS
PBMCs – Ctr	-
PBMCs + Filtro Pulito	20,68 $\pm$ 5,68
PBMCs + Filtro Machiavelli	25,86 $\pm$ 15,28
PBMCs + Filtro Roma	38,37 $\pm$ 20,18
PBMCs + Filtro Statte	-
PBMCs + Filtro Viterbo	36,93 $\pm$ 20,45
PBMCs – 2 Gray	37,70 $\pm$ 17,4

Legenda – Sono riportati i dati di citotossicità, relativamente al campionamento estivo, indicati come percentuali di mortalità cellulare normalizzati per il campione di controllo non trattato. Ctr: PBMC di controllo in coltura senza filtro; Filtro pulito: PBMC in presenza di filtro non esposto; Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespampani VT (sito di fondo ISS); 2 Gray: PMBC esposti a raggi X (2 Gray).

7. Risultati campionamento stagione fredda

Risultati del saggio della cometa

I risultati di tre esperimenti indipendenti della valutazione del danno al DNA su PBMC esposti per 3 ore alle fustelle di filtro con PM_{10} raccolto a marzo 2016 per 24 ore hanno mostrato che:

- 1) la presenza del filtro nelle colture cellulari non aumenta la quantità basale del danno presente sul DNA delle cellule ($p=0,139$, *t-Student*)
- 2) vi è un aumento lieve, ma statisticamente significativo nel danno al DNA dopo trattamento con i filtri provenienti dai siti di raccolta di Machiavelli ($p=0,026$, *t-Student*) e Roma ($p=0,013$, *t-Student*)
- 3) anche in questo campionamento sono stati osservati dei valori di danno al DNA molto bassi per tutti i siti in esame come si può facilmente evincere dai valori di *Tail moment* del controllo positivo MMS, alla dose di trattamento standard di $200\mu\text{M}$ (Tabella 3).

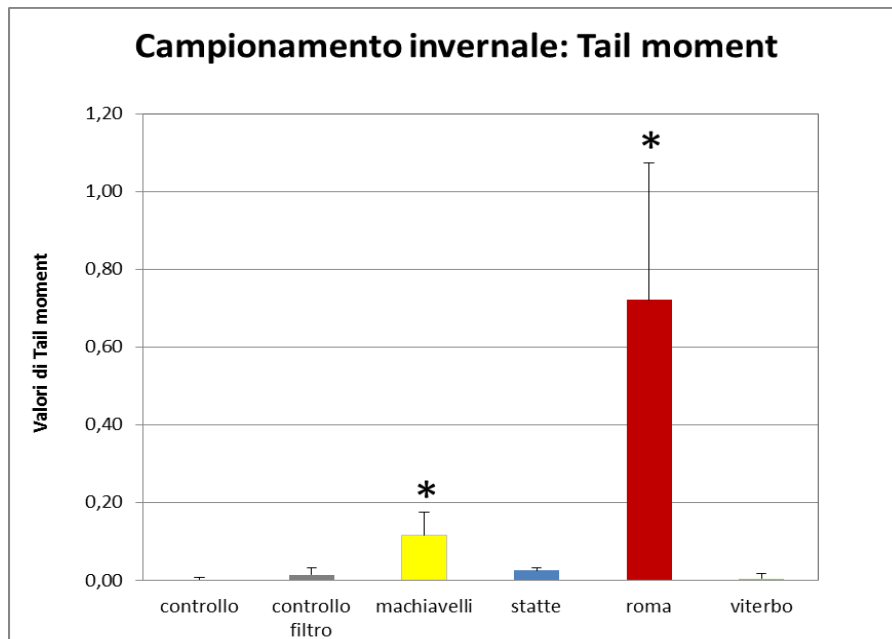
Nella Tabella 10 e nella Figura 10 sono riportate i valori delle medie dei tre esperimenti $\pm$ deviazioni standard, nonché il p di significatività, calcolato con il test del *t-Student*, per il parametro di *Tail moment*.

Tabella 10

Tail Moment	media $\pm$ dev st	p
controllo	0,000 $\pm$ 0,008	
controllo filtro	0,015 $\pm$ 0,019	0,139
machiavelli	0,116 $\pm$ 0,061	0,026
statte	0,026 $\pm$ 0,008	0,206
roma	0,721 $\pm$ 0,353	0,013
viterbo	0,005 $\pm$ 0,014	0,258
MMS	14,139 $\pm$ 4,195	0,002

Legenda – Sono riportati i valori medi di Tail moment di tre esperimenti indipendenti $\pm$ la deviazione standard (ds) e la significatività calcolata con il t-Student (p) per ciascun punto sperimentale vs il controllo: controllo (PBMC di controllo in coltura senza filtro); controllo Filtro (colture in presenza di filtro non esposto); Filtro Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespampani VT (sito di fondo ISS); MMS (metilmetansufonato 200 μ M).

Figura 10



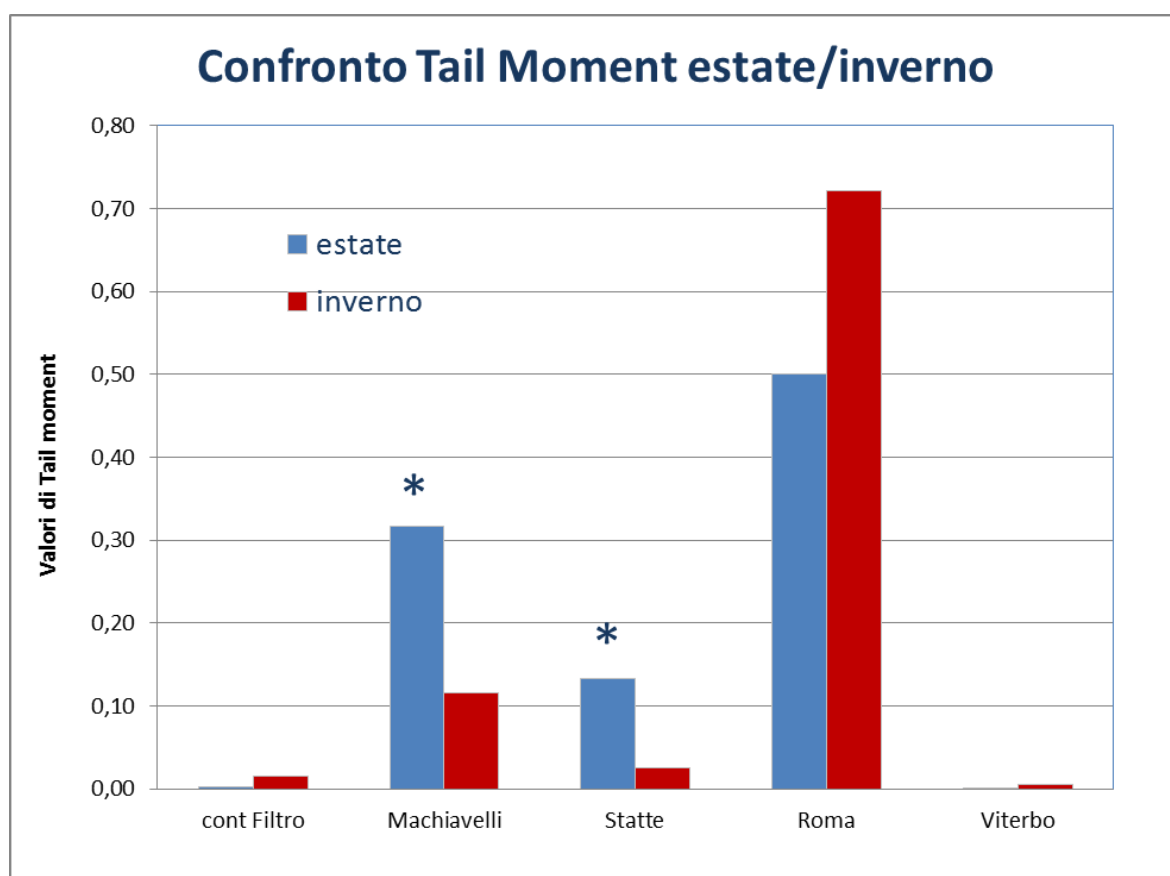
Legenda – controllo: PBMC di controllo in coltura senza filtro; controllo Filtro: colture in presenza di filtro non esposto; Filtro Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespanpani VT (sito di fondo ISS). * $p < 0,005$, t-Student.

Confrontando i risultati dei due campionamenti eseguiti osserviamo una differenza lieve, ma statisticamente significativa tra i valori di *Tail moment* misurati nelle due diverse stagioni per i siti di Taranto (Fig. 11) . Osserviamo che:

- 1) il PM_{10} raccolto nei siti di Taranto nella stagione calda 2015 mostrano valori di danno lievemente più elevati rispetto a quelli della stagione fredda 2016 ($p=0,035$ e $p=0,045$, t-Student, per Machiavelli e Statte rispettivamente)
- 2) al contrario nel sito di Roma il particolato induce un livello di danno al DNA maggiore nella stagione fredda rispetto alla stagione calda, ma tale differenza non raggiunge la significatività statistica.

Questa differenza potrebbe essere indicativa della differenza nei fattori ambientali e meteorologici in gioco nei diversi siti.

Figura 11



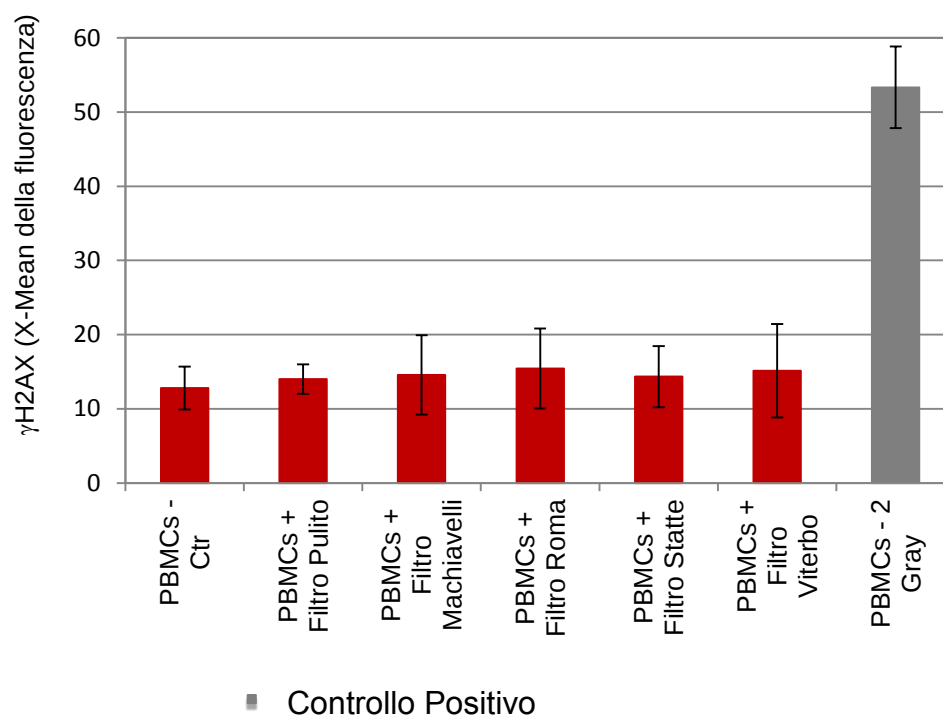
Legenda – confronto dei valori di Tail moment ottenuti dal particolato raccolto nei diversi siti in estate ed in inverno. cont Filtro: colture in presenza di filtro non esposto; Filtro Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespampani VT (sito di fondo ISS); * $p < 0,05$, t-Student.

Risultati dell'attivazione dell'istone H₂AX e della mortalità cellulare

I saggi al FACS condotti parallelamente ai test della Comet per valutare la cito- e la genotossicità del particolato raccolto per 24 ore nel mese di marzo 2016 non hanno evidenziato incrementi né della fosforilazione dell'istone H₂AX né della mortalità cellulare in nessuno dei campioni incubati con i filtri provenienti dai diversi siti di raccolta (Figura 12 e Tabella 11).

Nella Figura 12 e nella Tabella 11 sono riportate le x-Mean della fluorescenza dell'istone γ H2AX rilevate al FACS e le percentuali di mortalità cellulare normalizzate per il campione di controllo non trattato.

Figura 12



Legenda - Sono riportati i valori relativi all'istone γ H2AX, come medie della x-Mean della fluorescenza rilevata al FACS relativamente al campionamento invernale. Ctr: PBMC di controllo in coltura senza filtro; Filtro pulito: PBMC in presenza di filtro non esposto; Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespanpani VT (sito di fondo ISS); 2 Gray: PMBC esposti a raggi X (2 Gray).

Tabella 11

	Cellule Morte (%)
	Media $\pm$ DS
PBMCs – Ctr	-
PBMCs + Filtro Pulito	5,6 $\pm$ 1,3
PBMCs + Filtro Machiavelli	12,9 $\pm$ 1,4
PBMCs + Filtro Roma	13 $\pm$ 4,7
PBMCs + Filtro Statte	14,8 $\pm$ 2
PBMCs + Filtro Viterbo	15,9 $\pm$ 1,5
PBMCs – 2 Gray	31,8 $\pm$ 2,5

Legenda – Sono riportati i dati di citotossicità, relativamente al campionamento invernale, indicati come percentuali di mortalità cellulare normalizzati per il campione di controllo non trattato. Controllo: PBMC di controllo in coltura senza filtro; Ctr: PBMC di controllo in coltura senza filtro; Filtro pulito: PBMC in presenza di filtro non esposto; Machiavelli (sito Arpa Puglia), Statte (sito Arpa Puglia); Roma (sito ISS); Roccarespampani VT (sito di fondo ISS); 2 Gray: PMBC esposti a raggi X (2 Gray).

In conclusione, l'analisi in PBMC dell'induzione di γ H2AX e della citotossicità relativa ai due campionamenti stagionali indica che:

- 1) il particolato raccolto a Roma nell'estate 2015, ma non quello raccolto nel periodo invernale, induce un lieve incremento del danno al DNA rilevato come fosforilazione dell'istone H2AX
- 2) i particolati raccolti nei siti di Viterbo, Statte e Machiavelli sia nei mesi estivi che invernali non inducono alcun aumento del γ H2AX .
- 3) l'effetto citossico misurato è dovuto alla co-incubazione delle cellule con il filtro ed è pertanto indipendente dal particolato raccolto

Conclusioni

La metodologia applicata in questo studio, previa standardizzazione del modello *in vitro*, ha permesso di acquisire informazioni utili per evidenziare il possibile effetto immunotossico e pro-infiammatorio del materiale particellare PM₁₀ aerodisperso, evitando la possibile alterazione causata dai processi di estrazione dal filtro. Lo studio svolto ha permesso di avere una prima serie di indicazioni sul possibile effetto immunotossico (vitalità, apoptosi e proliferazione cellulare) e pro-infiammatorio del PM₁₀ su cellule immunitarie del sangue periferico di soggetti adulti sani.

In passato era stato effettuato uno studio con questo modello di esposizione cellulare diretta ai filtri PM₁₀, utilizzando una linea cellulare linfo-monocitaria umana (E. Bastonini *et al.* Environmental Research 111 (2011) 765-774). Nel lavoro veniva messa in evidenza l'induzione da parte del PM₁₀ di geni coinvolti nella risposta allo stress, nella riparazione del DNA e nell'apoptosi.

Lo studio da noi condotto sul potenziale immunotossico del PM₁₀ in due diversi periodi stagionali ha evidenziato che il PM₁₀ delle postazioni ISS Roma, Statte e Macchiavelli campionato nella stagione fredda, esercita un effetto citotossico su cellule mononucleate circolanti umane in quanto riduce in modo significativo il numero di cellule vitali e/o aumenta il numero di cellule in apoptosi rispetto al controllo non esposto. In particolare il PM₁₀ ISS Roma campionato nella stagione fredda risulta essere quello con la maggiore capacità di alterare la vitalità cellulare ed è anche il solo in grado di ridurre significativamente la risposta proliferativa al mitogeno. Non si osserva invece alcun effetto immunotossico del PM₁₀ campionato negli stessi siti urbani durante la stagione calda. L'assenza di effetto potrebbe verosimilmente essere dovuta a variazioni nella composizione chimico-fisica del PM₁₀ campionato nelle due stagioni, variazioni attribuibili alle diverse condizioni meteorologiche e comportamentali (es. traffico, riscaldamento domestico, ecc.).

Il PM₁₀ campionato nella postazione ISS Roccarespanpani stazione di fondo, in entrambi le stagioni non ha mostrato alcun effetto immunotossico nei sistemi di coltura *in vitro* utilizzati nello studio.

I risultati ottenuti nello studio sono in accordo con studi precedenti nei quali è stato osservato che l'esposizione *in vitro* a PM₁₀ estratto da filtri posizionati in aree urbane determinava un aumento significativo di cellule apoptotiche in campioni di macrofagi umani alveolari o derivati da monociti circolanti ed in campioni di PBMC (Soukup JM and Becker S Toxicol Appl Pharmacol 171 (2001) 20-26; Gilmour PS *et al.* Occup Environ Med 62 (2005) 164-171; Cimino F *et al.* Drug Chem Toxicol. 2014;37:32-9).

Per quanto riguarda il potenziale pro-infiammatorio del PM₁₀ i dati relativi alla produzione di citochine nel sopranatante di coltura delle cellule indicano che il PM₁₀ nelle quattro aree esaminate durante la stagione calda è in grado di indurre la produzione di citochine e chemochine coinvolte nelle risposte infiammatorie, suggerendo una capacità attivatoria del PM₁₀ nei confronti delle cellule mononucleate circolanti umane.

Le risultanze ottenute concordano con quanto dimostrato in precedenti lavori nei quali è stato osservato che l'esposizione al PM₁₀ induce la produzione di citochine

pro-infiammatorie quali il TNF-alfa e l'IL-8 nei macrofagi umani e nelle cellule epiteliali polmonari (Becker *et al.* Toxicol Appl Pharmacol 141 (1996) 637-648; Dong *et al.* Exp Lung Res 22 (1996) 577-592; Monn and Becker Toxicol Appl Pharmacol 155 (1999) 245-252; Gilmour PS *et al.* Occup Environ Med 62 (2005) 164-171; Benganelli R. *et al.* BioMed Research International 2013, Article ID 158093).

I risultati della stagione calda confermano tali osservazioni, dimostrando la capacità del PM₁₀ di promuovere la secrezione di diversi fattori chemiotattici e pro-infiammatori nei monociti e linfociti circolanti, e suggerendo che la composizione chimico-fisica del PM₁₀ nelle aree analizzate può indurre uno stato infiammatorio, non solo a livello polmonare, ma anche sistemico.

E' importante notare che il PM₁₀ prelevato nelle tre aree di ISS Roma, Statte e Macchiavelli durante la stagione fredda induce un ridotto effetto pro-infiammatorio soprattutto nelle postazioni ISS Roma e Statte, presumibilmente a causa dell'effetto immunotossico esercitato dal PM₁₀ stesso. Questa ipotesi è stata confermata dall'analisi statistica che ha messo in evidenza una correlazione lineare inversa tra vitalità cellulare e produzione di citochine in risposta al materiale particolato.

Il PM₁₀ della postazione ISS Roccarespanpani, essendo sprovvisto di effetto immunotossico, è quello che maggiormente sembra avere un effetto attivatorio sulla produzione di fattori solubili di tipo citochinico e chemochinico da parte delle cellule immunitarie circolanti.

La valutazione dei risultati ottenuti relativi al potenziale immunotossico e pro-infiammatorio del PM₁₀ suggerisce che le differenze osservate tra le 4 postazioni analizzate e, per ogni postazione, tra stagione calda e stagione fredda possono essere imputabili a differenze qualitative di composizione chimico-fisica del PM₁₀ e/o alle possibili diverse interazioni tra i suoi componenti. Inoltre il rilevamento di un significativo effetto immunotossico nella stagione fredda e di un maggiore effetto pro-infiammatorio nella stagione calda suggerisce che tali diversi effetti sul sistema immunitario sono verosimilmente imputabili a differenti composizioni di inquinanti presenti nel PM₁₀ prelevato.

I risultati della determinazione degli IPA suggeriscono che gli effetti biologici osservati verosimilmente non sono imputabili a questa classe di isomeri in quanto la loro concentrazione nei campioni di PM₁₀ analizzati risulta inferiore sempre al limite di rivelabilità.

Questa osservazione meriterebbe un ulteriore approfondimento su un numero maggiore di isomeri degli IPA attualmente non contemplati tra quelli con un possibile effetto sanitario avverso, e su un numero maggiore di specie inquinanti sia di natura organica che inorganica. Tale approfondimento andrebbe effettuato con un disegno sperimentale specifico e con adeguati mezzi finanziari.

Le analisi al SEM/EDX effettuate sulle singole particelle costituenti il PM₁₀ hanno invece evidenziato delle differenze nella composizione dei *cluster* del PM₁₀ nelle diverse postazioni e nei diversi periodi di campionamento.

L'identificazione dei componenti, singoli o in combinazione, responsabili degli effetti biologici osservati nei nostri sistemi cellulari *in vitro* necessita ulteriori approfondimenti in un numero maggiore di campioni e per un periodo più prolungato. Considerato i limiti intrinseci dello studio *in vitro*, la bassa numerosità campionaria analizzata ed il limite temporale dei rilevamenti ambientali, i risultati dello studio non possono ritenersi conclusivi e sono solo rappresentativi dei periodi in cui sono stati effettuati i campionamenti.

Nel corso di questa indagine è stato messo a punto un modello sperimentale che ha permesso di valutare l'effetto genotossico del particolato atmosferico inalabile (PM₁₀) in cellule bersaglio esposte direttamente al particolato raccolto su filtro. Questa procedura è innovativa rispetto agli approcci precedenti, basati sull'analisi della fase organica estratta chimicamente dal particolato, e permette una valutazione più rigorosa della genotossicità del particolato stesso, anche a fini comparativi, in quanto tiene conto della effettiva biodisponibilità delle componenti genotossiche su di esso adsorbite.

I risultati ottenuti con il sensibile saggio della cometa (comet assay), che misura prevalentemente l'induzione di rotture a singola elica nel DNA, hanno mostrato un effetto genotossico limitato ma statisticamente significativo con i campioni di PM del sito urbano di Roma (stazione di campionamento presso l'ISS) e di Taranto Machiavelli, prossimo all'area industriale della città. Non ha invece prodotto effetti genotossici rilevabili il particolato della postazione urbana di Taranto Statte e, come atteso, del sito extraurbano di Rocca Respampani (Viterbo). E' importante comunque sottolineare che il danno al DNA rilevato dal saggio della cometa testimonia un'interazione del materiale in studio con il DNA che non necessariamente evolve in un evento mutageno.

La risposta genotossica indotta nel comet assay dall'esposizione delle cellule al particolato è risultata più elevata con i campioni della postazione di Roma ISS rispetto a quelli di Taranto, in entrambe le campagne di campionamento. Tuttavia tale differenza raggiunge la significatività statistica solo nella stagione invernale ($p=0,04$ e $p=0,03$ per il sito di Machiavelli e Statte rispettivamente),

L'indicazione di una maggiore genotossicità per il particolato atmosferico di Roma è confermata dai risultati dell'analisi della fosforilazione dell'istone H2AX, un marcatore della rottura di entrambi i filamenti del DNA. E' questo un evento più raro rispetto alle rotture a singolo filamento misurate dal comet assay, ma potenzialmente più grave in quanto direttamente associato alla morte cellulare o a riarrangiamenti cromosomici.

Sulla base dei dati disponibili, relativi a campionamenti spot effettuati presso un numero limitato di postazioni e per un numero limitato di giorni, non è possibile stabilire se la maggiore attività genotossica mostrata dai campioni di particolato di Roma rispetto a quelli di Taranto rifletta una reale maggiore diffusione di inquinanti genotossici nell'aria di Roma. Va comunque sottolineato che l'entità dell'effetto genotossico osservato è risultata in ogni caso limitata, come mostra il confronto con un agente genotossico di riferimento

Il confronto tra pattern di attività dei campioni analizzati e parametri chimico-fisici,

sopradescritti, non mostra una ovvia associazione, in particolare per quanto riguarda i livelli totali di particolato, che sono confrontabili nei tre siti urbani esaminati. La diversa composizione elementare dei particolati indica tuttavia marcate differenze tra i siti e i periodi di campionamento, che possono riflettere il variabile contributo di diverse attività antropiche. L'evidenza di attività genotossica del PM10 non contrasta con i risultati analitici che mostrano l'assenza di IPA, perchè le specie genotossiche adsorbite sul particolato sono prevalentemente composti policiclici ossigenati o nitrati, e non IPA, che peraltro sarebbero stati inattivi nelle condizioni di saggio applicate (per le ridotte capacità metaboliche delle cellule del sangue). Ulteriori indagini basate sul sistema di saggio testé messo a punto, associate ad una estesa caratterizzazione chimica del PM10, potrebbero contribuire attraverso un processo di *source apportionment* alla identificazione dei maggiori fattori di rischio genotossico, contribuendo ad una mirata azione di prevenzione ambientale.

In conclusione, il quadro complessivo che emerge da questa indagine suggerisce per la città di Taranto un carico di inquinanti genotossici aerodispersi non superiore a quello di Roma, almeno relativamente alle aree coperte dalle stazioni di campionamento.

E' comunque opportuno sottolineare che i risultati ottenuti nel corso di questa indagine, e le relative implicazioni sui livelli di contaminazione atmosferica nei siti studiati, sono specificamente riferibili ai periodi in cui sono stati effettuati i campionamenti, e possono non essere rappresentativi per periodi precedenti, in cui varie attività antropiche possono avere avuto un impatto diverso.

E' da tener presente che gli effetti genotossici e immunotossici non sono necessariamente associati anche se ci sono composti che sono immunotossici attraverso il danno al DNA. Questo darebbe un razionale ai dati ottenuti in questo progetto che mostrano sovrapposizioni (vedi effetto del PM di Roma) ma anche effetti discordanti (vedi campionamento invernale verso estivo) tra i due tipi di saggi. In conclusione i risultati dei test in vitro di immunotossicità, potenziale pro-infiammatorio e genotossicità confermano la presenza di sostanze genotossiche, immunotossiche e con potenziale pro-infiammatorio nel particolato aerodisperso delle aree urbane ma non evidenziano specificità per la città di Taranto rispetto ad un altro sito urbano di riferimento.

Appendice Obiettivo 1



ARPA PUGLIA
Corso Trieste 27, 70126 Bari
Agenzia regionale per la prevenzione
080 5460150
e la protezione dell'ambiente

05830420724

Sede legale

Tel. 080 5460111 Fax
www.arpa.puglia.it
C.F. e P.IVA.

Bari

Direzione Scientifica

CENTRO REGIONALE ARIA

Corso Trieste 27, 70126
Tel. 080.5460202

VALUTAZIONE MODELLISTICA DELLA DISTRIBUZIONE SPAZIALE DELLE CONCENTRAZIONI DI PM10, PM2.5, BaP, As, Cd, Ni, Pb, Hg e PCDD/F SULL'AREA DI TARANTO

Centro Regionale Aria (CRA)

Relazione redatta da: Angela Morabito, Ilenia Schipa e Annalisa Tanzarella - Sub-Struttura Modellistica del Centro Regionale Aria – Direzione Scientifica (ARPA Puglia).

Relazione revisionata da: Roberto Giua - Direttore del Centro Regionale Aria di ARPA Puglia

Introduzione

Al fine di valutare lo stato di contaminazione ambientale del territorio tarantino si riportano di seguito i risultati della valutazione modellistica della qualità dell'aria condotta in provincia di Taranto per il PM10, PM2.5, i metalli (As, Cd, Ni, Pb e Hg), il BaP e le diossine. Tale valutazione è stata condotta relativamente all'anno 2013 con il modello euleriano di trasporto e chimica dell'atmosfera FARM ad una risoluzione spaziale pari a 1 km x 1km.

Sistema modellistico e definizione dei domini di calcolo

Il cuore del sistema modellistico utilizzato è il modello euleriano tridimensionale di trasporto e chimica dell'atmosfera FARM¹, in grado, a partire dalle emissioni di inquinanti delle varie sorgenti presenti sul territorio (naturali ed antropiche) e dallo stato fisico dell'atmosfera (campi di vento, di temperatura, di umidità, di turbolenza, ecc.), di fornire i campi tridimensionali orari di concentrazione per diversi inquinanti. Tale modello implementa meccanismi chimici di varia complessità per il trattamento della fotochimica e del particolato, trattando la chimica in fase acquosa ed eterogenea, oltre ai processi di deposizione secca ed umida.

Nella figura seguente viene riportato lo schema del sistema modellistico utilizzato.

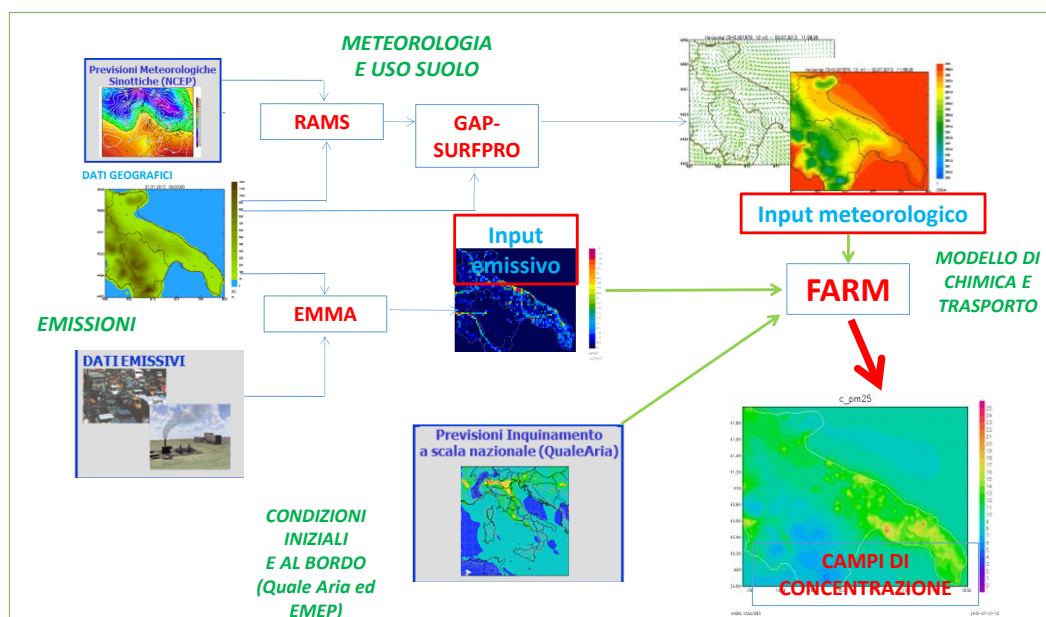


Figura 1 - Sistema modellistico utilizzato per la Valutazione annuale della Qualità dell'aria.

¹ Più precisamente è stata utilizzata la versione più recente del modello di trasporto e chimica dell'atmosfera FARM (versione 4.7), che implementa versioni aggiornate del meccanismo chimico SAPRC99 e del modulo di aerosol *aero3*. Tali versioni trattano la chimica dei quattro IPA: B[a]P, B[b]F, B[k]F, indeno[1,2,3-cd]pyrene (sia in fase gassosa che in fase particellare – modi di Aitken e accumulazione) e del mercurio (elementare – Hg - e ossidato – HgO - in fase gassosa e particellare – modi di Aitken e accumulazione).

Il sistema modellistico utilizza in ingresso molteplici dataset, che vengono elaborati in modo da produrre, sui domini di simulazione, tutti i dati in ingresso, necessari al modello chimico di qualità dell'aria. In particolare per lo svolgimento della simulazione FARM è stato alimentato con:

- i campi meteorologici previsionali, prodotti da ARIANET, mediante l'utilizzo del modello meteorologico prognostico RAMS;
- gli inventari delle emissioni, INEMAR per la regione Puglia ed ISPRA per le regioni limitrofe, opportunamente integrati ed aggiornati con le informazioni disponibili;
- le condizioni iniziali ed al contorno, derivate dai sistemi modellistici QualeAria (per gli inquinanti in fase omogenea, gassosa e particellare, su base temporale tri-oraria) ed EMEP-MSCE (per i metalli pesanti, le diossine e furani, di tipo climatologico).

I principali elementi che compongono il sistema sono:

- un modulo di interfaccia (codice GAP) per l'adattamento dei campi meteorologici prodotti da RAMS ai domini di calcolo;
- un processore micrometeorologico (codice SURFPRO) che, a partire dai campi meteorologici di ingresso ricostruisce i campi 2D e 3D della turbolenza e le velocità di deposizione, utilizzati dal modello chimico;
- un processore per il trattamento delle emissioni (codice EMMA) che, a partire dagli inventari delle emissioni disponibili sui domini di simulazione, costruisce i campi orari dei ratei di emissione per tutte le specie chimiche trattate dal modello di qualità dell'aria;
- il modulo per le condizioni iniziali e al contorno che, a partire dai campi tridimensionali di concentrazione, previsti dal modello di qualità dell'aria Quale Aria, prepara i campi di condizioni iniziali e al contorno sui domini di simulazione;
- il modello euleriano FARM per la dispersione e le reazioni chimiche degli inquinanti in atmosfera.

Il modello FARM è configurabile con diversi schemi chimici. Per la simulazione è stato utilizzato lo schema chimico SAPRC99 (Carter, 2000) per le trasformazioni delle specie chimiche in fase gassosa dei composti organici volatili e degli ossidi di azoto, e quindi dei processi fotochimici che portano alla formazione di ozono e di aerosol organici secondari nella bassa atmosfera. Al suddetto modulo è stato accoppiato il modulo chimico per gli aerosol, Aero3, messo a punto da EPA (Binkowski, 1999; Binkowski e Shankar, 1995) per la trattazione della chimica dell'aerosol (parte inorganica ed organica). Tale modulo in particolare tratta la dinamica delle particelle e la loro interazione con le specie in fase gas, considerando per gli aerosol tre classi dimensionali: "Aitken" (fino a 0,1 μm), "accumulazione" (0,1-2,5 μm) e "grossolane" (2,5-10 μm), nelle quali sono considerate diverse specie chimiche (nitrati, solfati, ammonio, acqua, carbonio, ecc.). Tale modulo considera, inoltre, i principali processi che governano la formazione e l'accrescimento del particolato:

- nucleazione: formazione di particelle per agglomerazione di molecole di vapore supersature;
- condensazione: conversione da gas a particella;

- diffusione di specie gassose verso la superficie delle particelle e successiva cattura;
- dissoluzione e reazioni chimiche eterogenee di solfati e nitrati: solitamente trascurate, ma significative in presenza di acqua liquida (per esempio in condizioni caratterizzate da alti valori di umidità relativa);
- equilibrio termodinamico tra le specie chimiche inorganiche (Nenes et al., 1998) e organiche (Schell et al., 2001) in fase gassosa, liquida e solida;
- coagulazione: collisione ed adesione di particelle (accrescimento).

Inoltre è stato utilizzato un modulo per il trattamento chimico del mercurio e dei PAH (B[a]P, B[b]F, B[k]F ed indeno(1,2,3,-cd)pirene). Per quanto riguarda la stima dei ratei di fotodissociazione è stata utilizzata la versione FAST del modello di trasferimento radiativo TUV (Madronich, 1989).

Il sistema modellistico così configurato è stato applicato simultaneamente su un dominio comprendente la regione Puglia con risoluzione spaziale pari a 4 km e su un dominio, innestato nel precedente, comprendente le provincie di Brindisi, Lecce e Taranto (vedi fig. 2) con risoluzione di 1km².

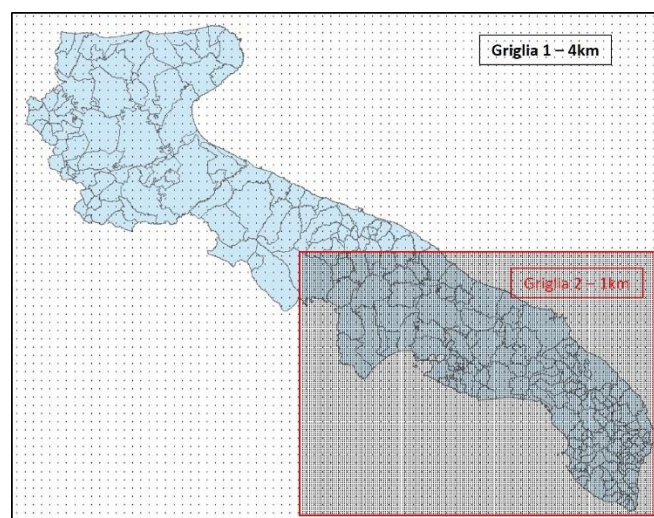


Figura 2 – Domini di calcolo del sistema modellistico

La discesa di scala è effettuata tramite la tecnica *two way nesting*, che consente di simulare le dinamiche di dispersione, trasporto e trasformazione degli inquinanti nel dominio a risoluzione migliore, tenendo conto sia degli effetti delle sorgenti emissive esterne e dei processi dominati dalle scale spaziali più grandi di quella urbana (come lo smog fotochimico), sia dei fenomeni locali di accumulo. Nella tabella successiva si riportano le caratteristiche spaziali dei due domini.

² La risoluzione di un modello equivale ad una discretizzazione dello spazio all'interno del quale calcolare i campi di concentrazione. Ciò significa che il modello è in grado di fornire i valori medi orari di concentrazione su celle di dimensioni pari alla risoluzione orizzontale scelta.

Tabella 1 – caratteristiche spaziali dei domini di simulazione

Dominio	Denominazione	Estensione	Risoluzione spaziale
Griglia 1	Regione Puglia	316 x 248 km ²	4km x 4km
Griglia 2	Salento	172 x 128 km ²	1km x 1km

L'estensione verticale dei due domini è pari a 5330 m, con i seguenti 14 livelli di calcolo espressi in metri sopra l'orografia:

10, 32.5, 62.5, 105, 180, 305, 505, 805, 1230, 1805, 2555, 3480, 4405, 5330

Campi meteorologici

Per ricostruire sui suddetti domini i campi meteorologica tridimensionali necessari al sistema modellistico, sono state utilizzate le previsioni operative a +24 h, prodotte da ARIANET S.r.l. per ARPA Puglia relativamente all'anno 2013. Tali campi sono il risultato di simulazioni modellistiche, condotte, dalla scala europea a quella nazionale e quindi regionale, mediante l'applicazione del modello meteorologico prognostico RAMS (Cotton et al., 2001). Questi campi comprendono sia le variabili tridimensionali di vento, temperatura, umidità e pressione atmosferica che le variabili bidimensionali di radiazione solare, copertura nuvolosa e temperatura superficiale del mare.

I suddetti campi meteorologici unitamente ai dati di uso del suolo (dati CORINE Land Cover) sono stati successivamente forniti al processore micrometeorologico SURFPro per il calcolo dei parametri associati allo strato limite atmosferico (lunghezza di Monin-Obukhov, friction velocity, altezza di mescolamento, ecc.), alle caratteristiche della turbolenza atmosferica (diffusività orizzontali e verticali) ed alle velocità di deposizione secca, relative alle specie chimiche considerate dal modello di dispersione.

Lo stesso SURFPro è utilizzato per stimare su base oraria:

- le emissioni biogeniche dalla vegetazione con l'attivazione del modulo MEGAN (Model of Emissions of Gases and Aerosols from Nature, Guenther et al., 2006; <http://acd.ucar.edu/~guenther/MEGAN/MEGAN.htm/>), che permette di stimare le emissioni di 20 composti/classi di composti (es. aromatici, olefine, ecc.), emessi da quattro differenti tipologie funzionali di piante (Plant Functional Types –PFT): latifoglie (broadleaf trees), conifere (needle leaf trees), arbusti (shrubs) e erbacee (herbaceous). Nella implementazione di MEGAN, effettuata in SURFPro, è stato considerato il meccanismo chimico SAPRC99 (Carter, 2000), utilizzato, come già detto, dal modello di trasporto e chimica dell'atmosfera FARM).
- le emissioni naturali di particolato e di metalli a seguito dell'azione del vento sui suoli. In particolare le emissioni di metalli pesanti da parte dei suoli sono state stimate moltiplicando le emissioni terrigene di particolato (calcolate utilizzando l'approccio proposto da Vautard et al., 2005) per i valori di concentrazione di metalli nei suoli. Tali valori sono stati ottenuti mediante l'utilizzo congiunto di tecniche geostatistiche (modulo ARpMEAS) e di informazioni sperimentali contenute nel Geochemical Atlas of Europe (<http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/>) relative al contenuto di metalli nello strato superficiale dei suoli (Topsoil);

- le emissioni degli aerosol e dei metalli dal mare. Specificatamente la stima delle emissioni di sali marini è stato effettuato utilizzando l'approccio proposto da Zhang et al. (2005), unitamente a fattori di emissione per As, Cd, Cr, Ni e Pb. Al fine di stimare l'emissione di mercurio dalle superfici acquatiche è stato utilizzato l'approccio proposto da Wanninkhof (1992), che considera le proprietà chimico-fisiche (solubilità, coefficienti di ripartizione aria-acqua, volatilità) del mercurio elementare e delle altre forme chimiche volatili di mercurio, disciolte nella colonna d'acqua, l'intensità del vento in prossimità della superficie del mare ed i valori di concentrazione di mercurio disciolto nel mare (18 ng m⁻³) ed in aria ambiente (1.6 ng m⁻³).

Emissioni antropogeniche

Poiché l'obiettivo della simulazione è ricostruire al 2013 lo stato della QA sull'intero territorio regionale e sul Salento, è stato necessario alimentare il modello con un database emissivo il più possibile aggiornato. Come punto di partenza sono state utilizzate le due basi dati emissive (Inventario INEMAR 2010 di ARPA Puglia e Inventario nazionale ISPRA 2010), che costituiscono ad oggi i riferimenti più aggiornati a livello regionale e nazionale.

a) Emissioni sulla Regione Puglia al 2010

L'inventario regionale più aggiornato, predisposto da ARPA Puglia, è basato sulla metodologia INEMAR e si riferisce all'anno 2010. In Tabella 2 e 3 sono mostrati i totali annuali regionali delle emissioni contenute nell'inventario, suddivisi per macrosettore, il cui peso relativo è mostrato in Figura 3 e Figura 4. Si osserva come per il monossido di carbonio (CO) il contributo maggiore (50%) provenga dalla combustione industriale, per gli ossidi di azoto (NO_x) dal trasporto (40%), per l'anidride solforosa (SO₂) dalla produzione di energia elettrica (50%) e per il particolato nella frazione PM₁₀ circa il 30% provenga dal riscaldamento. Per quasi tutti i microinquinanti la combustione industriale rappresenta la sorgente emissiva principale. Per il Nichel (Ni) la produzione di energia fornisce un contributo sul totale pari al 40%, mentre per gli IPA il contributo principale (65%) proviene dal riscaldamento.

Tabella – Totali emissivi per macrosettore – macroinquinanti (t/anno)

Macrosettore	CO	COVNM	NH3	NOX	PM10	SO2
Prod. energia	6503	517	152	15924	617	12610
Riscaldamento	45418	17392	85	2268	5508	333
Comb. industriale	244381	1569	47	15020	1138	7868
Processi produttivi	195	3850	725	524	1814	143
Prod. combustibili	0	1829	0	0	180	0
Uso di solventi	0	24726	0	0	39	10
Trasporto stradale	49601	10397	281	34470	2542	171
Altri trasporti	5557	1827	1	14310	1362	3724
Rifiuti	52096	1483	0	690	4607	123
Agricoltura	3429	26862	10280	491	429	66
Incendi	28572	2643	228	1005	1954	203

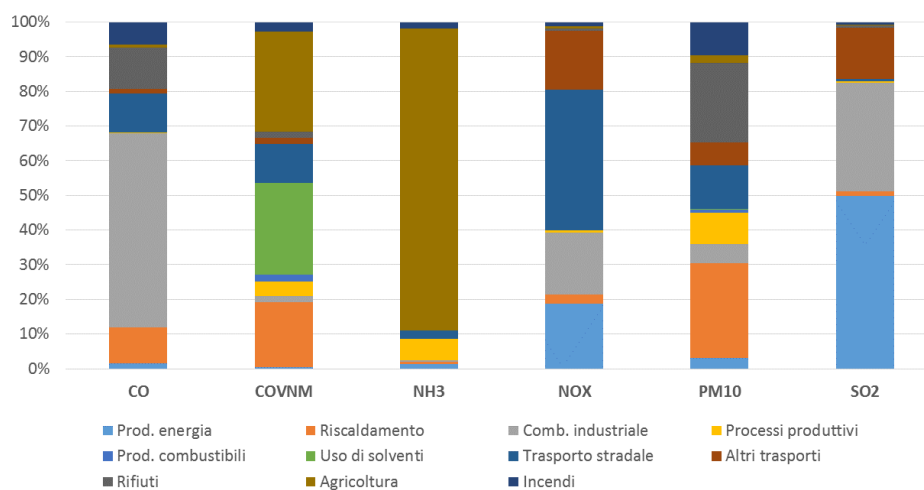


Figura 3 – Peso relativo dei macrosettori (macroinquinanti)

Tabella 3 – Totali emissivi per macrosettore – microinquinanti (kg/anno, salvo le diossine in mg/anno)

Macrosettore	Hg	As	Cd	Ni	Pb	IPA	Diossine
Prod. energia	46	149	84	1012	347	129	1043
Riscaldamento	9	3	80	3	51	3090	1373
Comb. industriale	503	1586	1248	653	34822	306	31866
Processi produttivi	71	190	309	679	6471	782	7574
Prod. combustibili	0	1	1	63	15	0	0
Uso di solventi	0	0	0	0	0	0	0
Trasporto stradale	0	0	17	120	808	126	0
Altri trasporti	0	0	2	12	5	0	0
Rifiuti	2	0	0	0	11	0	36
Agricoltura	0	0	0	0	0	0	0
Incendi	0	0	0	0	0	0	355

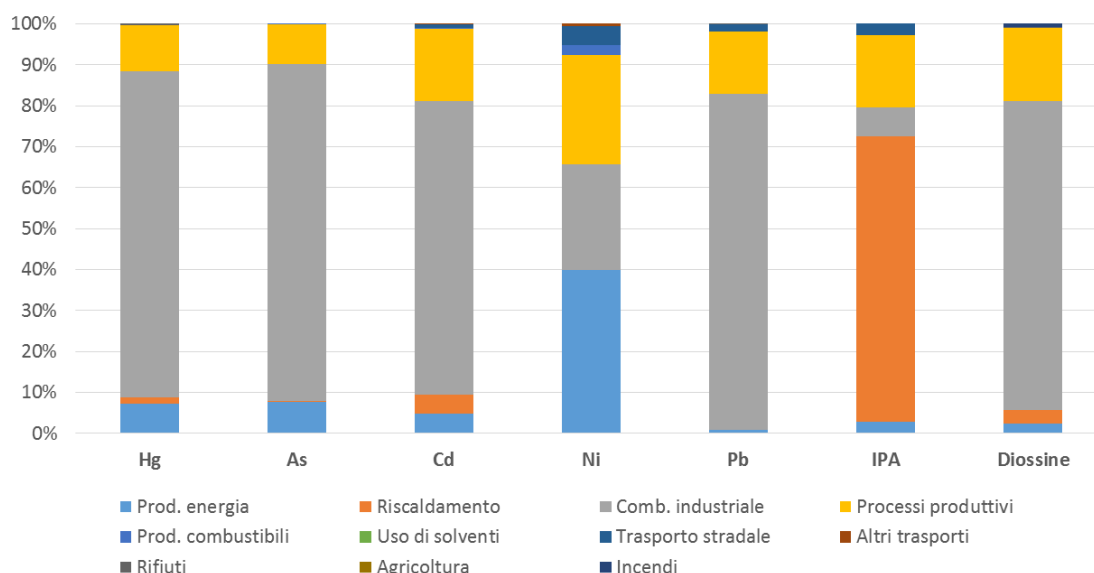


Figura 4 – Peso relativo dei macrosettori (microinquinanti)

Relativamente alle emissioni del macrosettore 11 (emissioni naturali e altre attività) stimate da INEMAR, si precisa che nelle simulazioni sono state considerate solo le emissioni relative agli incendi, in quanto, come già detto, le emissioni biogeniche, provenienti dalla vegetazione, sono state calcolate dinamicamente in funzione della meteorologia con il modulo MEGAN.

Per le simulazioni condotte con il FARM, i dati emissivi dell'inventario INEMAR sono stati integrati per le aree industriali di Brindisi e Taranto con le informazioni acquisite ed elaborate nell'ambito delle attività condotte nelle suddette aree per la Valutazione del Danno Sanitario (<http://www.arpa.puglia.it/web/guest/vds>), consentendo in questo modo di caratterizzare più precisamente le sorgenti industriali.

Inoltre rispetto al database INEMAR sono state stimate le emissioni di benzene (C_6H_6), prodotte dal riscaldamento domestico con biomassa, scalando opportunamente le corrispondenti emissioni di VOC (EPA AP 42).

Infine per alcuni settori si è proceduto ad effettuare un aggiornamento al 2013 delle emissioni dell'inventario con un approccio specifico per tipologia di sorgente, descritto nei paragrafi successivi.

b) Emissioni Macrosettore 2 e 7 – attualizzazione al 2013

Per quanto riguarda le emissioni da **combustione non industriale** (riscaldamento civile e commerciale-istituzionale, macrosettore 2) e da **trasporto su strada** (macrosettore 7) si è scelto di applicare ai totali emissivi 2010 alcuni fattori di variazione, dipendenti dall'attività emissiva, desunti dagli andamenti nazionali nel corso degli anni. Questi sono stati calcolati a partire dalle stime annuali ISPRA, attualmente disponibili per gli anni dal 1980 al 2012 (si veda <http://www.sinanet.isprambiente.it/it/sia-ispra/serie-storiche-emissioni>). Per ottenere una stima del dato nazionale al 2013, si sono estrapolati linearmente i dati dei tre anni precedenti (2010-2011-2012). I fattori da applicare alle emissioni Inemar 2010 sono poi stati calcolati, settore per settore,

come rapporto tra i valori nazionale 2013 e 2010. La Tabella 4 mostra i coefficienti ottenuti per ciascun settore emissivo e per ciascun inquinante.

Tabella 4 - Coefficienti di attualizzazione 2010-2013 – Emissioni da riscaldamento e trasporto su strada

Settore SNAP	Descrizione	CO	NOx	NM VOC	SOx	NH3	PM10	PM2.5	Hg	As	Cd	Ni	Pb	IPA	PCDD
0201	Terziario	0.975	0.974	0.825	0.724	1.284	0.838	0.855	0.808	0.759	0.774	0.397	0.812	0.82	0.3
0202	Residenziale	1.164	0.897	1.176	0.876	1.284	1.21	1.209	0.933	0.903	1.064	0.693	1.157	1.117	1.122
0203	Agricoltura	0	2.153	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.286	0	0
0701	Automobili	0.622	0.842	0.601	0.832	0.764	0.614	0.614	0	0	0.847	0.841	1	0.878	0.797
0702	Veic. leggeri	0.581	0.679	0.574	0.765	0.568	0.499	0.499	0	0	0.762	0.761	1	0.778	0.712
0703	Veic. pesanti	0.907	0.856	0.729	0.969	0.979	0.763	0.763	0	0	0.97	0.97	1	0.979	0.979
0704	Ciclomotori	0.635	0.962	0.684	0.76	0.835	0.611	0.611	0	0	0.76	0.76	1	0.734	0.835
0705	Motocicli	0.91	1.052	0.823	1.057	1.068	0.817	0.817	0	0	1.057	1.057	1	1.038	1.083
0706	Emissioni evaporative	0	0	1.073	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0707	Emissioni da abrasione	0	0	0	0	0	0.876	0.875	0	0	0.877	0.877	0.878	0	0

c) Emissioni industriali – attualizzazione al 2013

All'interno dell'inventario regionale 2010 sono presenti un numero di sorgenti industriali di tipo convogliato pari a 679. La localizzazione dei corrispondenti impianti industriali per provincia è mostrata nelle figure successive (Figure 5-8).

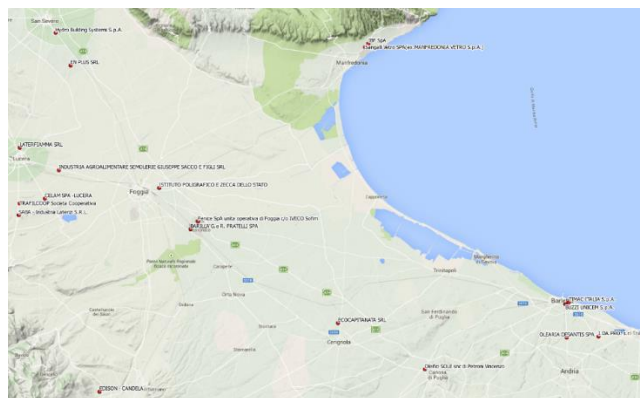


Figura 5 – Impianti industriali delle province di Foggia e Barletta-Andria-Trani.

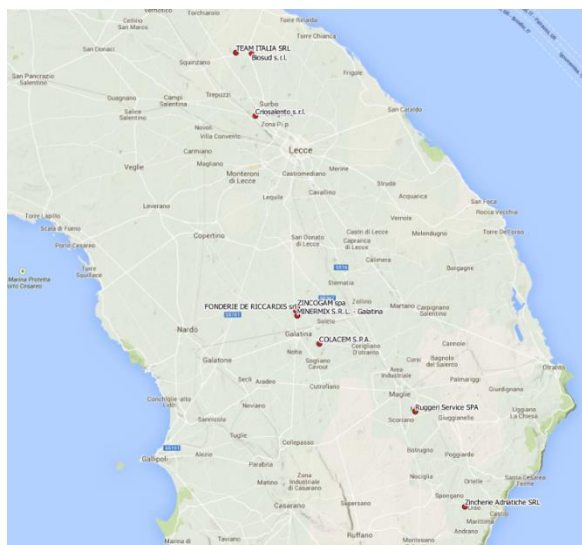


Figura 8 – Impianti industriali delle provincia di Lecce.

Per le emissioni di alcuni di questi impianti industriali è stato possibile procedere ad un'attualizzazione al 2013, laddove risultavano disponibili i relativi dati annuali di produzione (come ad esempio nel caso di ILVA). Segue una descrizione schematica degli aggiornamenti effettuati.

Area ILVA (Taranto)

- Acquisizione dei parametri fisici e strutturali dei camini ILVA dal database emissivo dello stesso stabilimento, predisposto nell'ambito delle attività della VDS condotte nell'area di Taranto (database VDS Taranto);
- attualizzazione al 2013 delle emissioni puntuali, diffuse e lineari considerate nel database VDS Taranto a partire dai dati di produzione di coke, acciaio e sinterizzazione relativi agli anni 2010 e 2013;
- azzeramento delle emissioni dei camini relativi agli impianti ILVA fermi al 2013;
- spazializzazione delle emissioni diffuse (parchi, altoforno, cokeria, agglomerato, acciaierie) sulle rispettive aree di pertinenza (analogamente al database VDS Taranto);
- trattamento esplicito delle emissioni di polveri e metalli dai 3 nastri: 2° sporgente, 4° sporgente e nastro perimetrale e relativa attualizzazione;
- spazializzazione delle emissioni da trasporto e movimentazione del materiale sull'area dell'impianto ILVA.

Per quanto riguarda l'impianto ILVA è opportuno precisare che l'attualizzazione al 2013 è stata condotta, scalando opportunamente le emissioni del database 2010, a partire dai dati di produttività di ILVA, riferiti al 2010 e al 2013. In tale stima emissiva, quindi, non sono state prese in considerazione né le variazioni delle modalità di gestione ed esercizio degli impianti, introdotte a seguito delle attività della magistratura e all'attuazione del Piano di Risanamento, né tanto meno si

è tenuto conto delle variazioni introdotte dal piano delle misure, previsto in attuazione ai decreti AIA³.

Area industriale di Taranto

- Attualizzazione al 2013 delle emissioni puntuali e diffuse relative alle sorgenti industriali Cementir, Taranto Energia e Raffineria ENI;
- relativamente al camino E5 di Cementir è stata attivata una modulazione annuale specifica, in considerazione del fatto che tale camino è stato attivo fino al mese di aprile 2013;
- relativamente alla Raffineria ENI per le emissioni di IPA sono stati considerati e attualizzati i dati dell'inventario.

Centrale ENEL "Federico II" (Brindisi)

- Implementazione dei dati emissivi orari al 2010, misurati da SME relativamente alle 4 sorgenti convogliate;
- spazializzazione sulle relative aree delle emissioni dovute allo stazionamento delle navi nel porto di Brindisi, alla relativa movimentazione dei gessi e del carbone, al relativo trasporto su strada ed alle operazioni nel parco carbonile.

Area industriale di Brindisi

- Rispetto all'inventario Inemar 2010 azzeramento delle emissioni della centrale Edipower (impianto attualmente fermo);
- Rispetto all'inventario Inemar 2010 sono state aggiunte le emissioni della centrale SFIR.

Per gli stabilimenti Enipower, Agusta, Basell, Discariche Autigno e Formica, CDR, Sanofi, Sfir e Versalis le emissioni presenti nell'inventario sono state sostituite con quelle usate nella VDS.

³ Si precisa che sono state solo azzerate le emissioni dei camini afferenti agli impianti, che ILVA ha comunicato essere fermi al 2013.

d) Emissioni portuali

Le emissioni dalle attività portuali, contenute nell'inventario INEMAR, sono state spazializzate opportunamente, per meglio caratterizzarne l'impatto. Le aree su cui sono state allocate sono illustrate in Figura 9.



Manfredonia



Barletta



Trani



Bisceglie



Molfetta



Giovinazzo



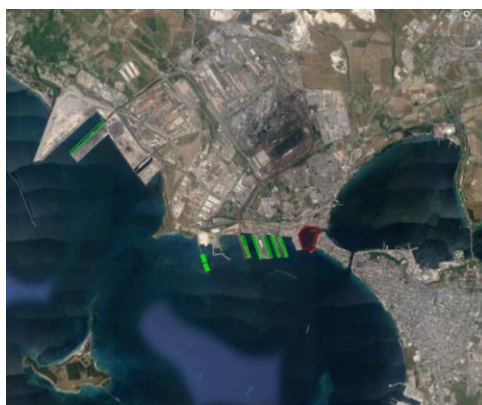
Bari



Brindisi



Gallipoli



Taranto

Figura 9 – Aree su cui sono state allocate le emissioni portuali

In particolare, relativamente al porto di Taranto, partendo dal database VDS Taranto, sono state esplicitate e trattate specificatamente le emissioni portuali associate ad ILVA e alla raffineria ENI (aree con il contorno in verde in figura); queste sono state attualizzate al 2013 mediante un fattore di scala, ottenuto come rapporto tra il numero di navi totali transitate nel porto di Taranto al 2013 e al 2010.

Le emissioni relative alle **attività marittime** sono state invece spazializzate opportunamente a seconda della tipologia. In particolare, nel caso del traffico di avvicinamento, della pesca e delle attività da diporto le relative emissioni sono state attribuite su una fascia compresa entro le 12 miglia dalla costa; nel caso del traffico di crociera le emissioni sono state spazializzate in corrispondenza delle principali rotte nei mari circostanti l'area di studio, come illustrato in Figura 10.

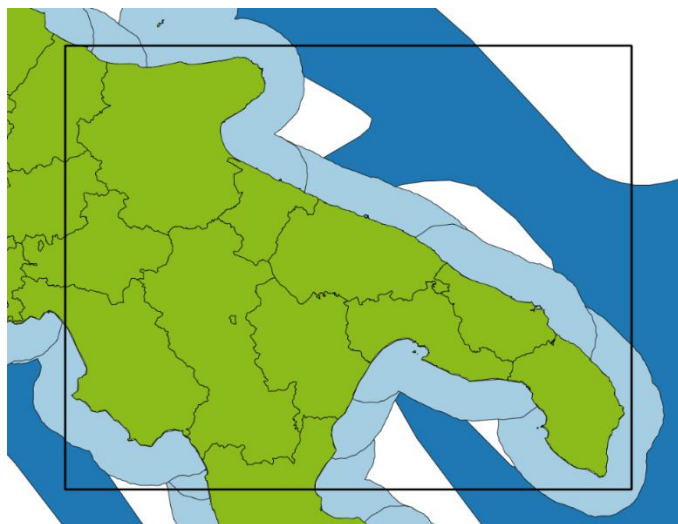


Figura 10 – Aree di spazializzazione delle emissioni navali. In azzurro: fascia entro le 12 miglia dalla costa; in blu: rotte di navigazione.

Mappe delle emissioni totali

Si riportano di seguito le mappe (Figure 11-18) relative alle emissioni totali annuali per comune, utilizzate nelle simulazioni, relative ai seguenti inquinanti⁴: NO_x, CO, SO₂, PM₁₀, As, Cd, Ni e Pb.

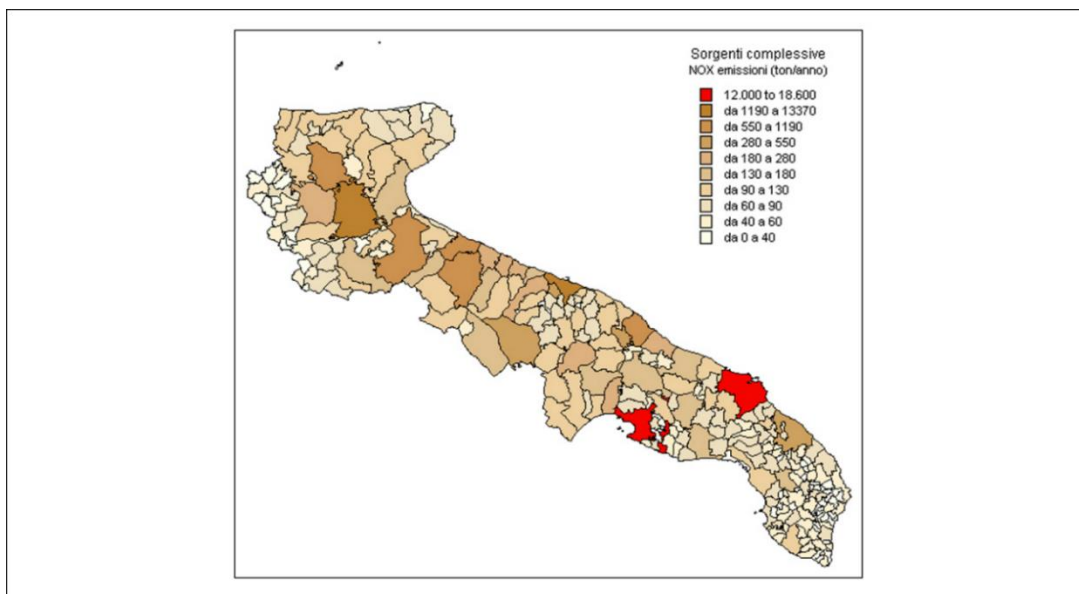


Figura 11 – Emissioni totali annuali di NO_x su base comunale

⁴ Non si riportano per il PM_{2.5}, BaP e Benzene le corrispondenti mappe delle emissioni su base comunale, poiché queste non corrispondono di fatto a quelle realmente utilizzate da FARM. Per alcune attività, infatti, il pre-processore emissivo interno (EMMA) al modello fotochimico può essere in grado di stimare per tali inquinanti le emissioni, utilizzando opportuni profili di disaggregazione granulometrica (PM_{2.5}) e/o opportuni profili di speciazione (BaP, benzene, altri IPA, ecc.).

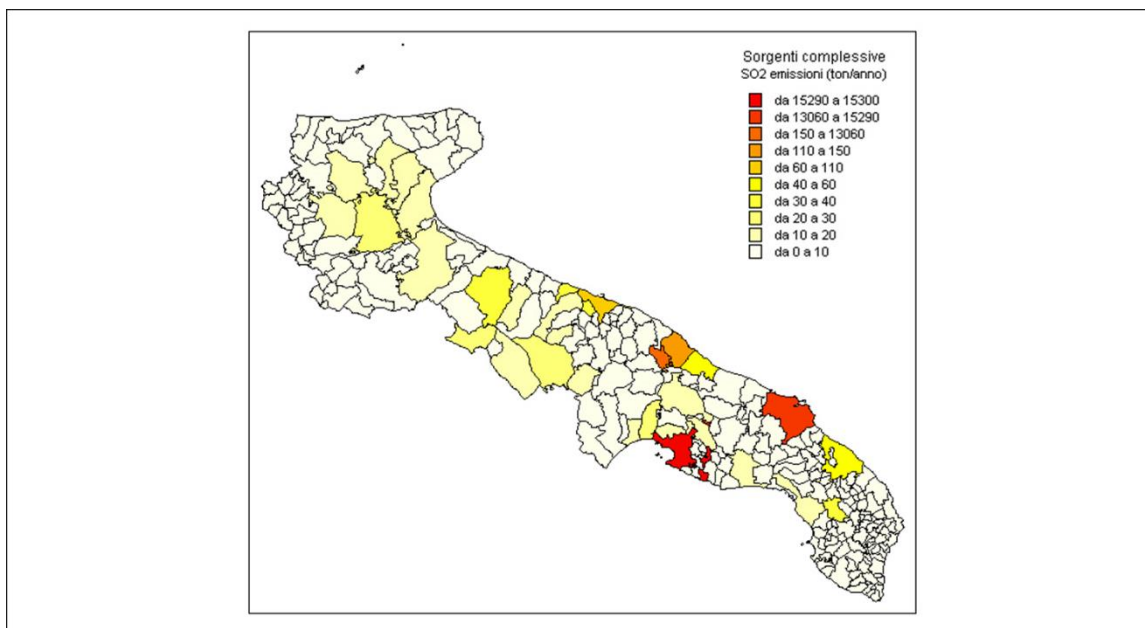


Figura 12 – Emissioni totali annuali di SO₂ su base comunale

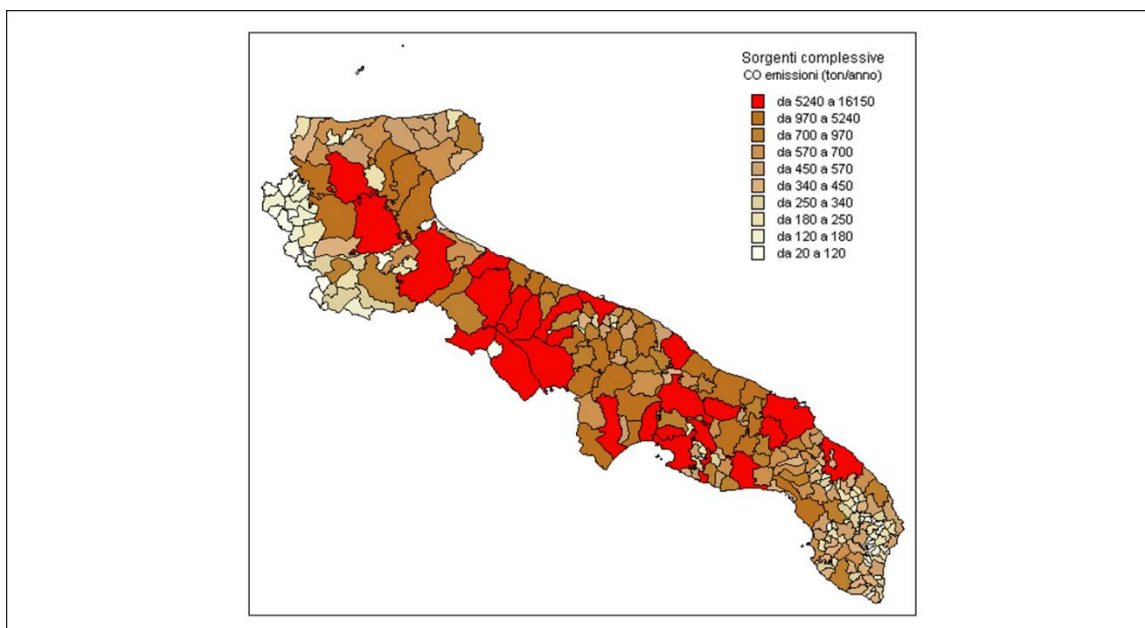


Figura 13 – Emissioni totali annuali di CO su base comunale

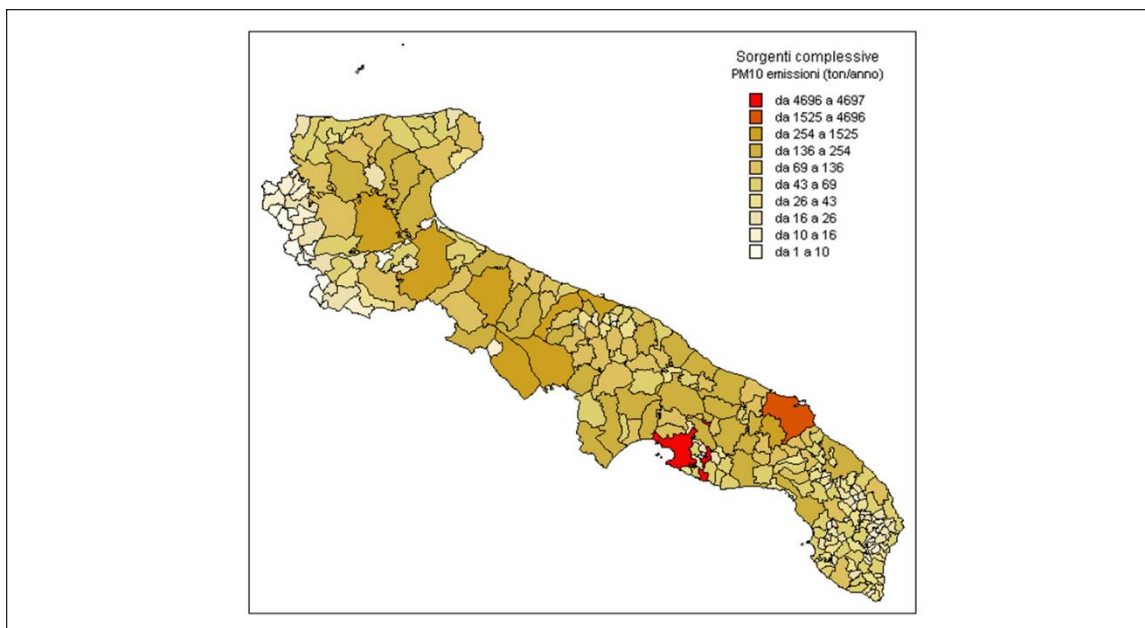


Figura 14 – Emissioni totali annuali di PM₁₀ su base comunale

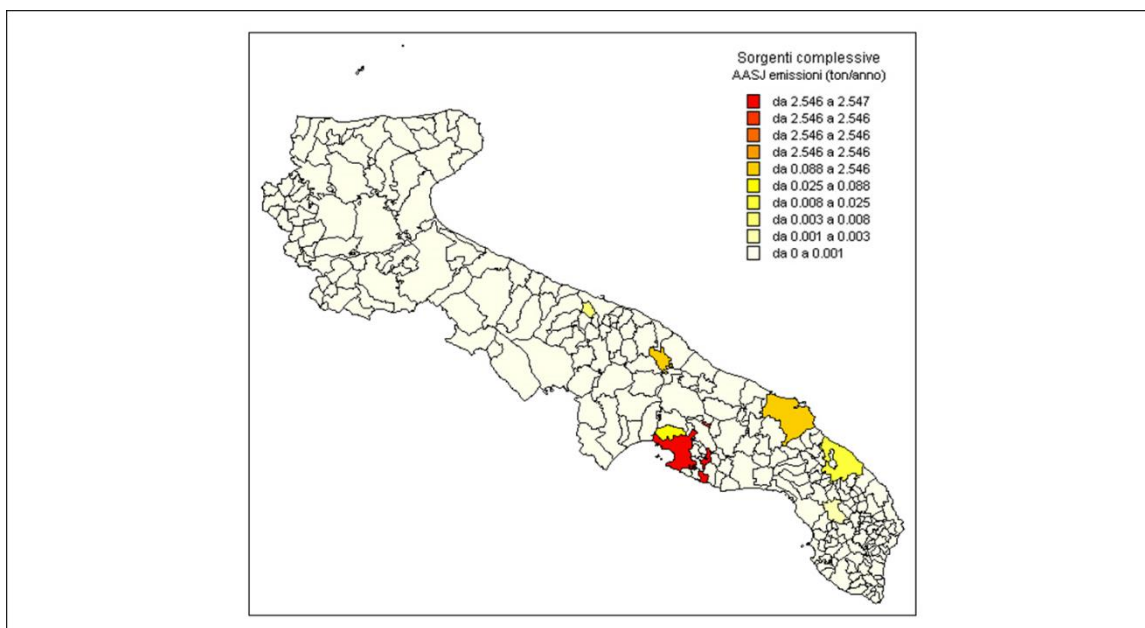


Figura 15 – Emissioni totali annuali di Arsenico su base comunale

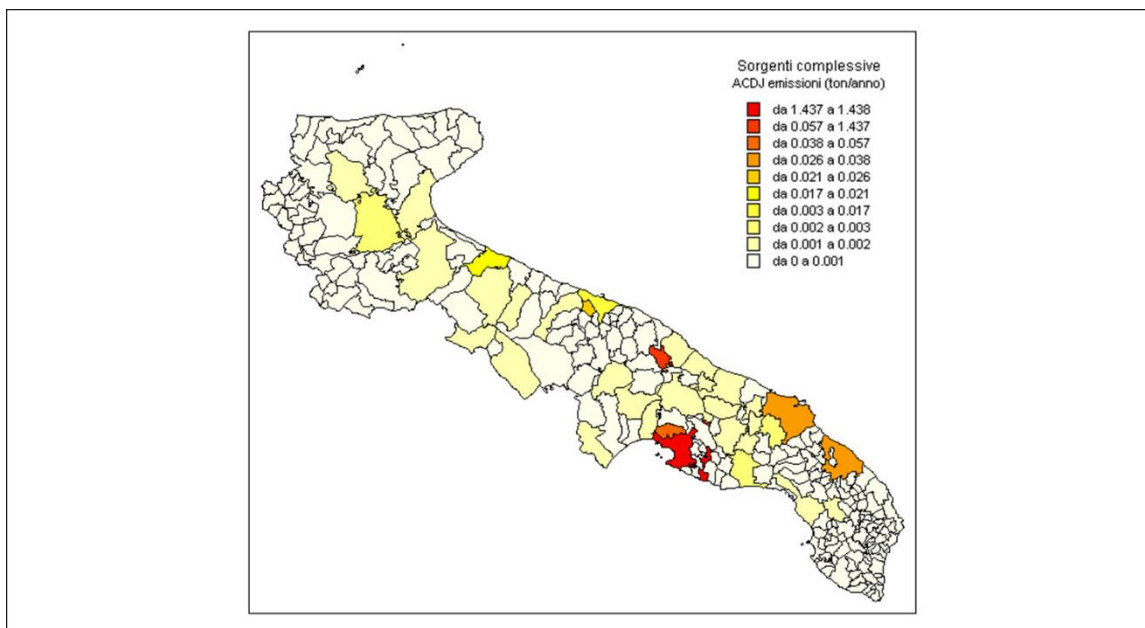


Figura 16 – Emissioni totali annuali di Cadmio su base comunale

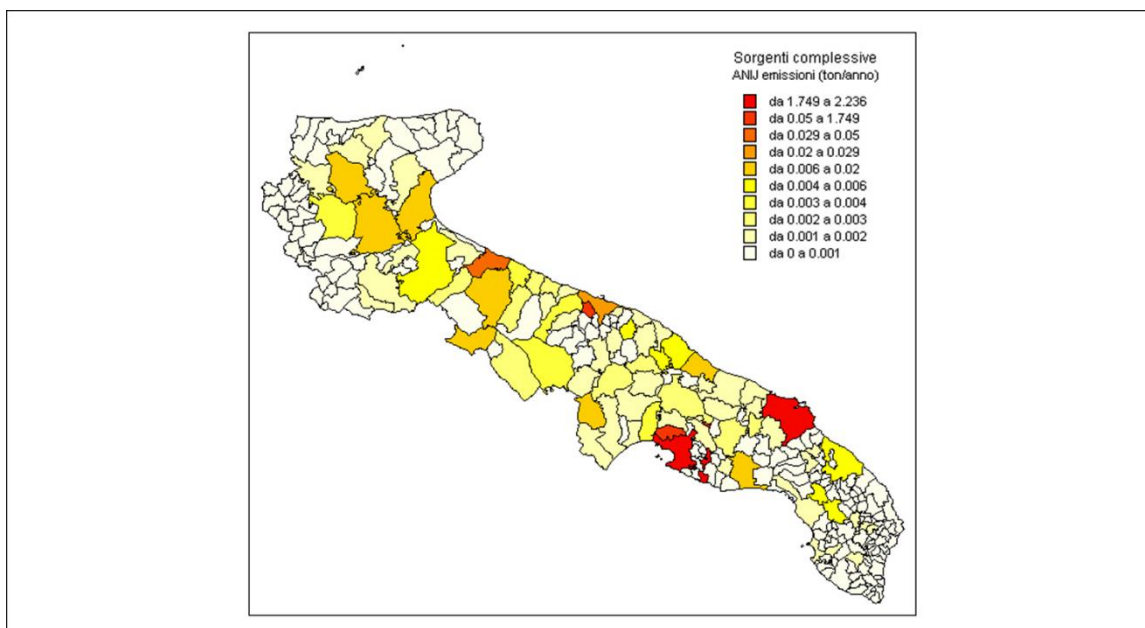


Figura 17 – Emissioni totali annuali di Nichel su base comunale

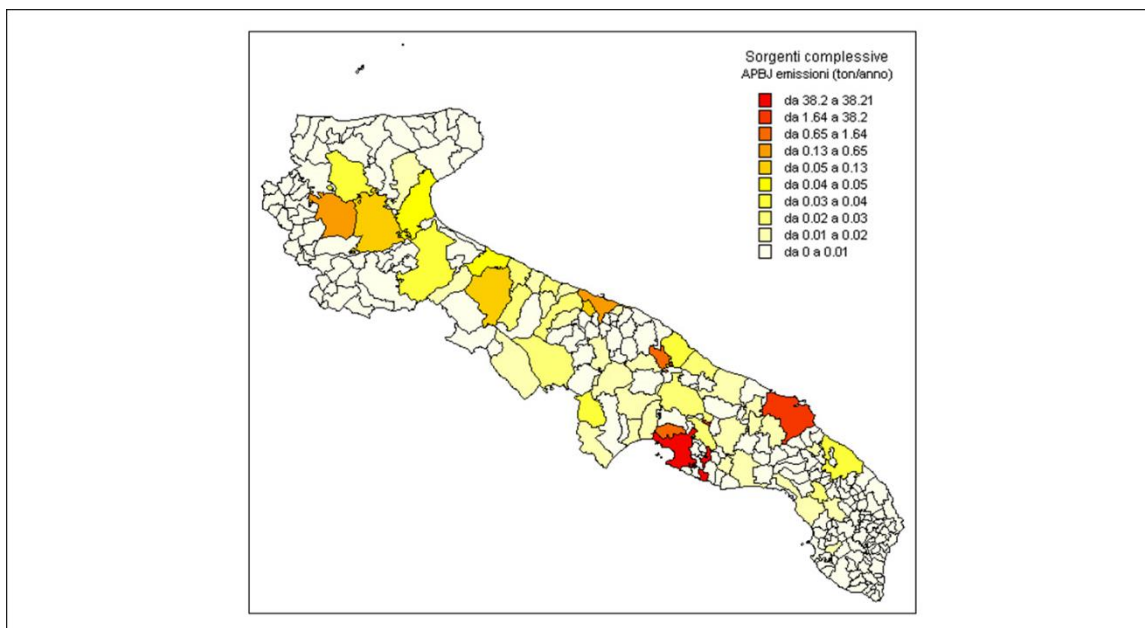


Figura 18 – Emissioni annuali totali di Piombo su base comunale

Dalle figure è evidente come i comuni con le emissioni maggiori siano quelli dove risiedono le principali sorgenti industriali, ovvero i comuni di Taranto e Brindisi.

Emissioni sulle regioni limitrofe

Per ricostruire lo stato della QA nel dominio di simulazione, che si estende (Figura 2) ben oltre i confini della regione Puglia, è stato opportuno alimentare il modello anche con le emissioni, espresse su base provinciale, dell'inventario nazionale ISPRA, riferito all'anno 2010. Relativamente al macrosettore 11 del suddetto database sono state considerate solo le emissioni degli incendi, in quanto le emissioni biogeniche di VOC e le emissioni naturali di aerosol e metalli, di origine terrigena e marina, sono state calcolate, come già detto, su base oraria nel corso della simulazione con specifici moduli (MEGAN e SURFPro). Dall'inventario nazionale ISPRA sono state inoltre acquisite sull'intero dominio di simulazione le emissioni di particolato di origine antropogenica dovute al risollevarimento da traffico stradale e da attività agricole. Nella tabella 5 sono mostrati i totali annuali delle emissioni afferenti alle regioni confinanti con la Puglia, suddivisi per macrosettore, il cui peso relativo è mostrato in Figura 19.

Tabella 5 – Totali emissivi per macrosettore – emissioni diffuse – macroinquinanti (t/anno)

Macrosettore	CO	NH3	NMVOC	NOX	SO2	PM10
Prod. energia	0	0	0	0	0	0
Riscaldamento	115791	123	16005	6264	676	8561
Comb. industriale	5605	169	197	9385	2503	537
Processi produttivi	660	0	4228	66	1462	1306
Prod. combustibili	0	0	3180	0	0	0
Uso di solventi	0	0	42335	0	0	1
Trasporto stradale	131288	1185	35639	54338	53	4016
Altri trasporti	9855	2	2186	9630	23	942
Rifiuti	5583	900	1526	280	22	252
Agricoltura	855	33365	113	27	0	1142
Incendi	12339	41	483	10	37	562

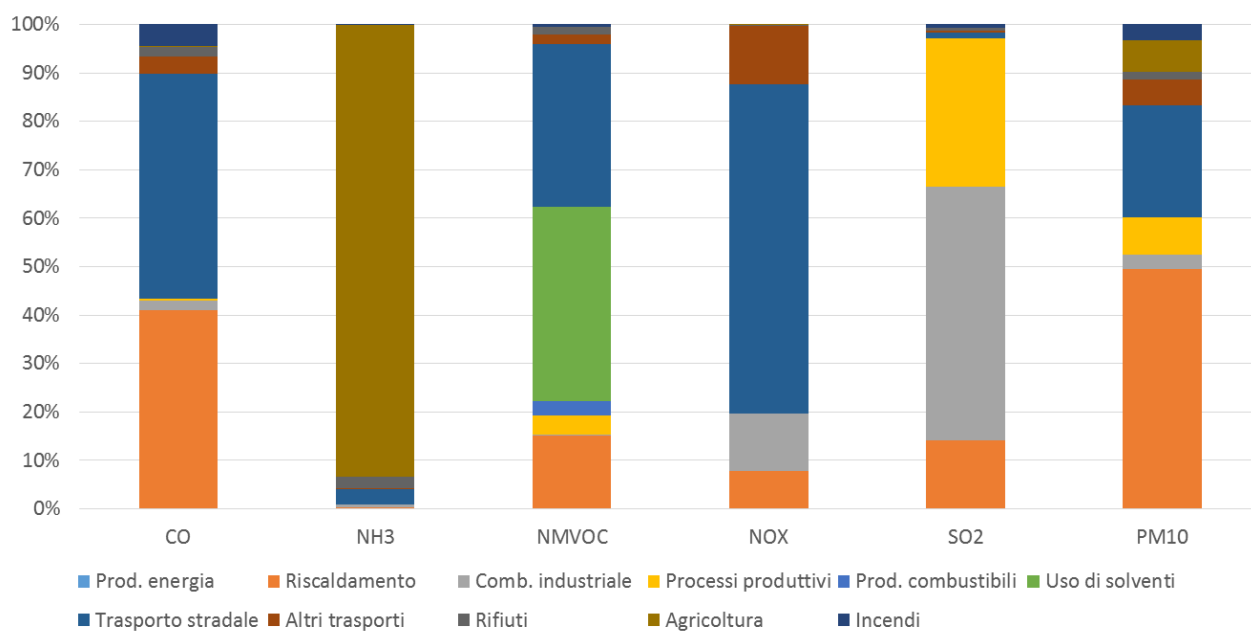


Figura 19 – Peso relativo dei macrosettori – emissioni diffuse – macroinquinanti

Condizioni iniziali ed al contorno

Per stimare il flusso di inquinanti che entra nel dominio a risoluzione 4km, ad ogni ora di simulazione, per tutti i livelli compreso il *top*, devono essere fornite al modello FARM le condizioni al contorno, generalmente costituite dall'output di un altro modello fotochimico che simula lo stesso periodo di *run* su una scala più vasta e con risoluzione più bassa. A tal fine sono stati utilizzati i campi tridimensionali prodotti dai sistemi modellistici QualeAria, relativamente agli inquinanti in fase omogenea gassosa e particellare (Figura 20), ed EMEP-MSCE, relativamente ai metalli pesanti, diossine e furani. I primi sono relativi all'anno 2013 e sono disponibili su base temporale trioraria⁵; i campi prodotti dal modello EMEP-MSCE sono invece di tipo climatologico (giorno tipo mensile su base temporale trioraria) e sono stati pertanto opportunamente interpolati nel tempo al fine di produrre campi giornalieri per ciascun giorno dell'anno in esame. I campi prodotti dai due sistemi modellistici sono stati quindi elaborati mediante l'utilizzo di una procedura (schematizzata nella Figura 21) al fine di estrarre le condizioni iniziali ed al contorno (lateralali ed al top).

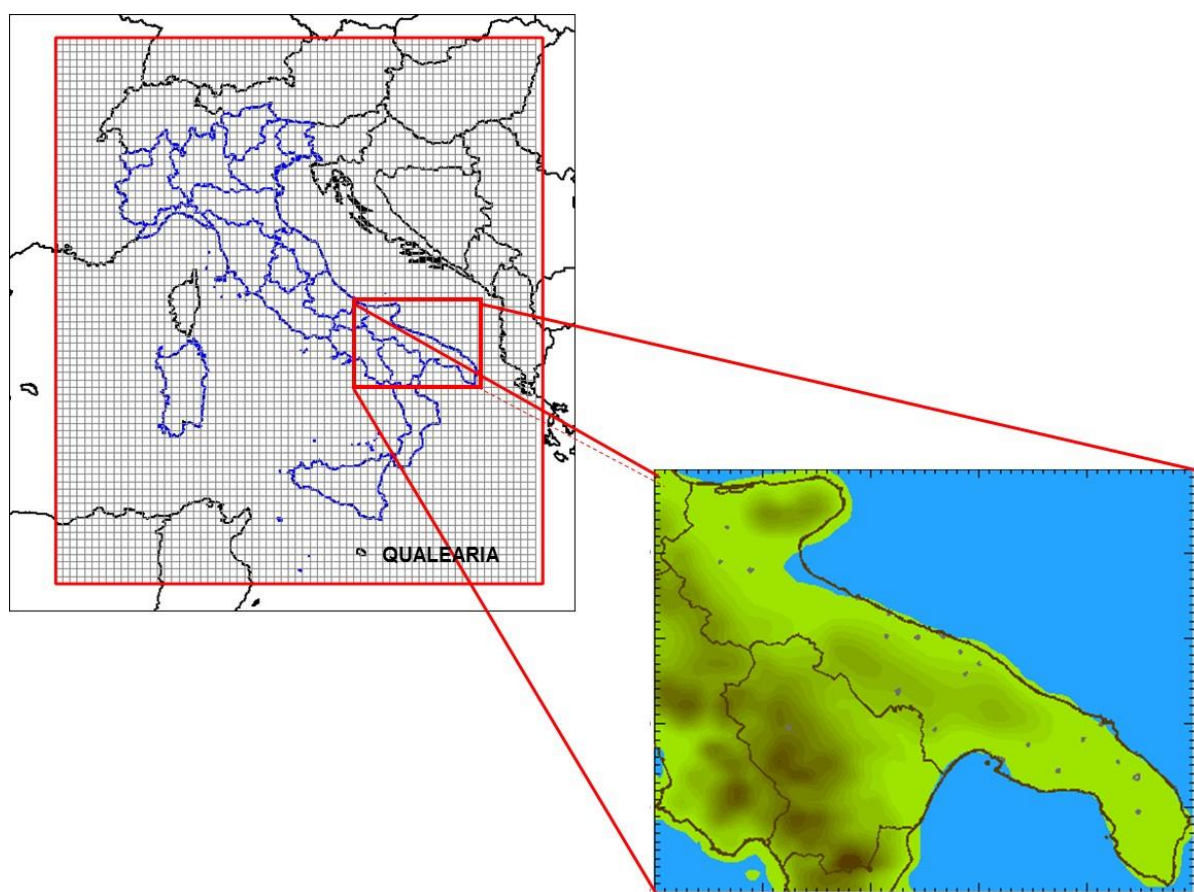


Figura 20 – Schematizzazione della griglia di calcolo utilizzata dal sistema modellistico Quale Aria e dalla griglia di FARM.

⁵ Tali campi sono successivamente interpolati su base oraria nel corso della simulazione.

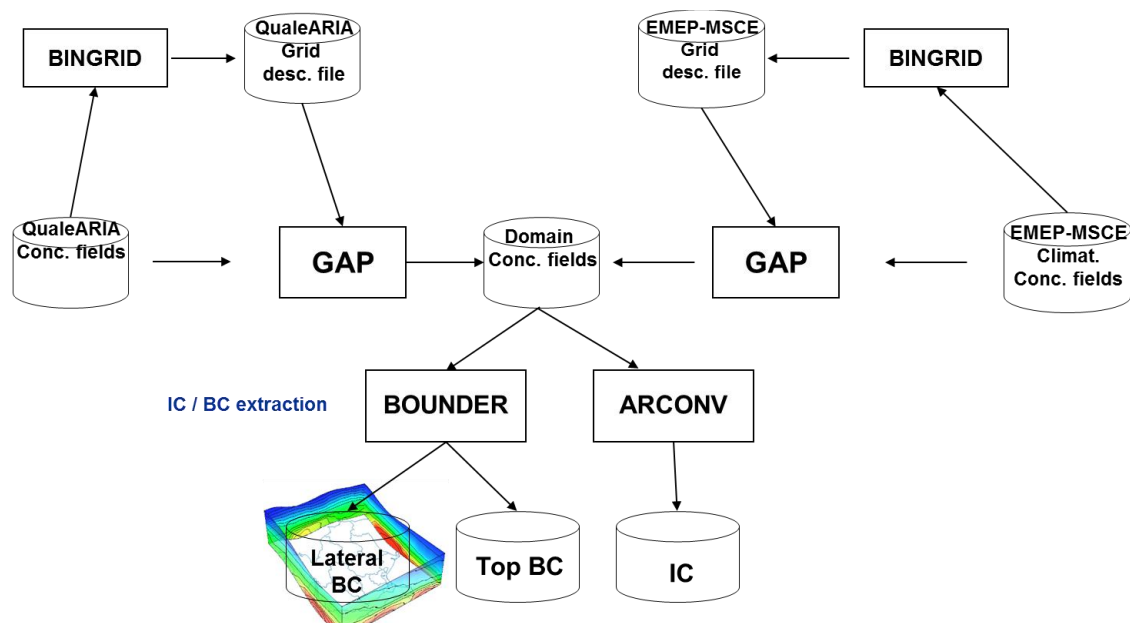


Figura 21– Procedura per la preparazione delle condizioni iniziali ed al contorno.

Risultati della simulazione

La simulazione è stata effettuata per l'intero anno 2013 su base temporale oraria. I campi di concentrazione al suolo, prodotti da FARM sul dominio innestato (risoluzione 1km), sono stati quindi opportunamente elaborati per PM10, PM2.5, BaP, As, Cd, Ni e Pb al fine di confrontare le mappe modellistiche dei relativi indicatori, prescritti dal D.lgs 155/2010, con i corrispondenti valori limite, previsti per la protezione della salute umana. Per PCDD/F e Hg sono state elaborate le mappe medie annuali delle concentrazioni.

Di seguito si mostrano le suddette mappe relative relative all'area di Taranto.

Tabella 6 - Valori limite per PM₁₀ e PM_{2.5}

Inquinante	Valore Limite	Periodo di mediazione	Legislazione
Particolato Fine	Valore limite protezione salute umana, da non superare più di 35 volte per anno civile,	24 ore	D.L. 155/2010
(PM₁₀)	50 µg/m ³		Allegato XI
	Valore limite protezione salute umana,	Anno civile	D.L. 155/2010
	40 µg/m ³		Allegato XI
Particolato Fine	Valore limite, da raggiungere entro il 1° gennaio 2015,	Anno civile	D.L. 155/2010
(PM_{2.5})	25 µg/m ³		Allegato XI
FASE I			

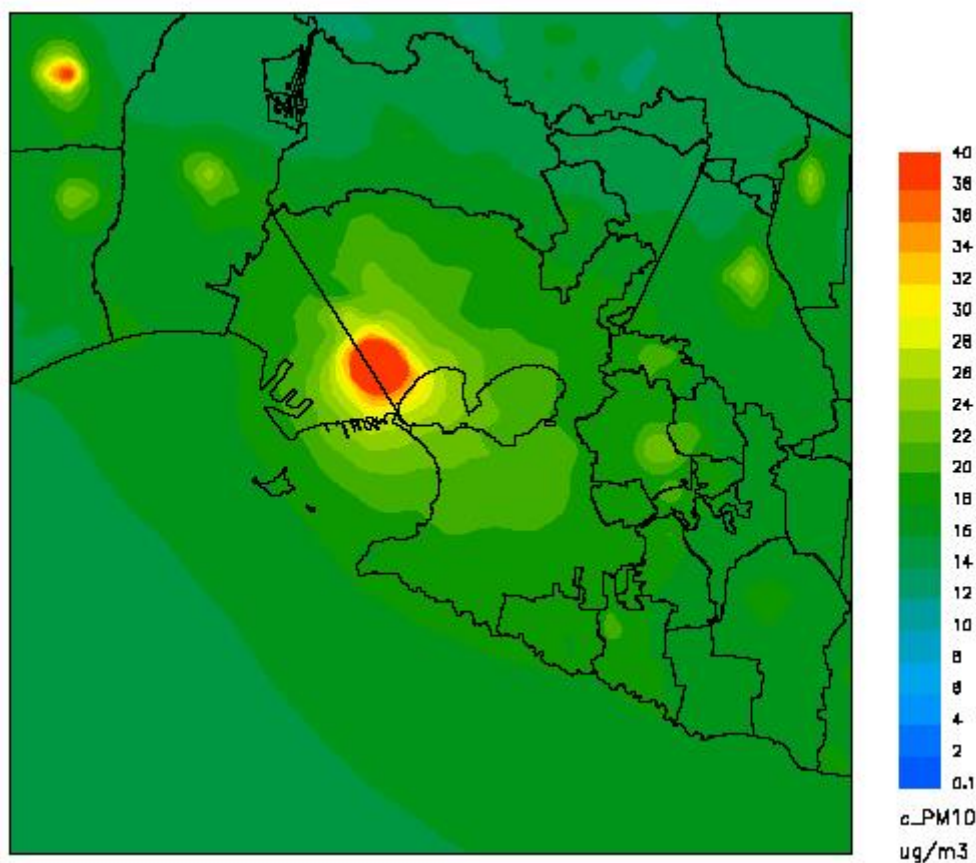


Figura 22 - Mappa della concentrazione media annuale di PM₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), modellata da FARM sull'area di Taranto.

Per il PM₁₀, come si desume dalla mappa, si stimano alcuni superamenti del valore limite annuale. Le concentrazioni medie annuali più elevate, simulate da FARM, vengono stimate in corrispondenza sia dell'area industriale di Taranto che nella parte del quartiere Tamburi ad essa più prossima. In corrispondenza delle centraline, site in Via Machiavelli e Via Archimede, il modello non prevede il superamento del valore limite, coerentemente con quanto misurato nel 2013.

Un altro superamento si rileva presso il comune di Mottola e risulta attribuibile presumibilmente a sorgenti locali (ad es. riscaldamento residenziale con biomassa legnosa).

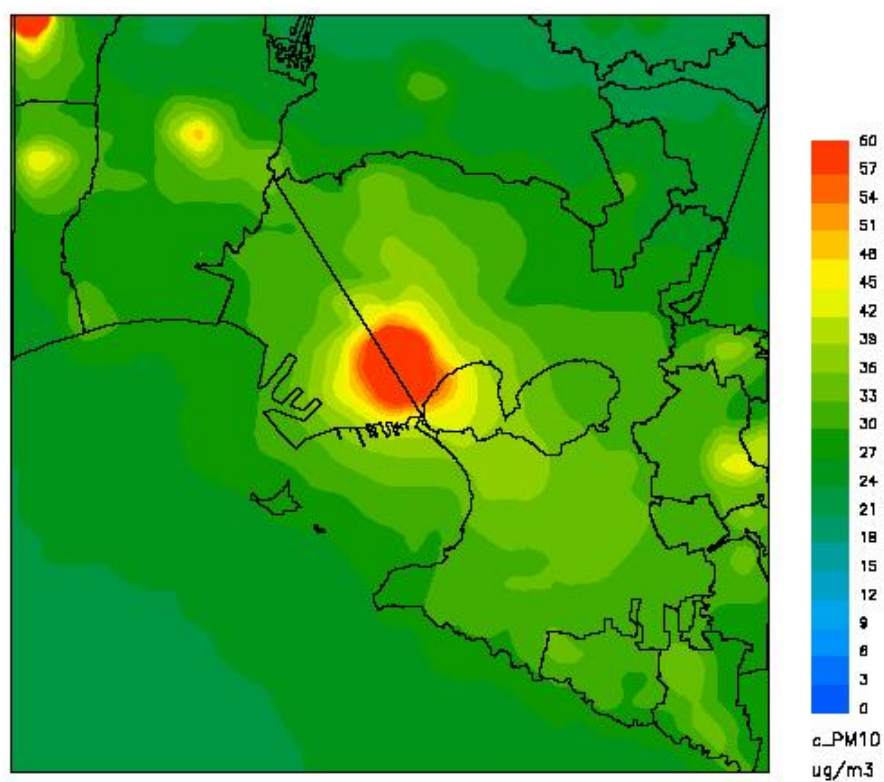


Figura 23 – Mappa del 90.4 percentile, calcolato sulla serie annuale delle concentrazioni giornaliere per il PM₁₀ (µg/m³), modellata da FARM sull'area di Taranto

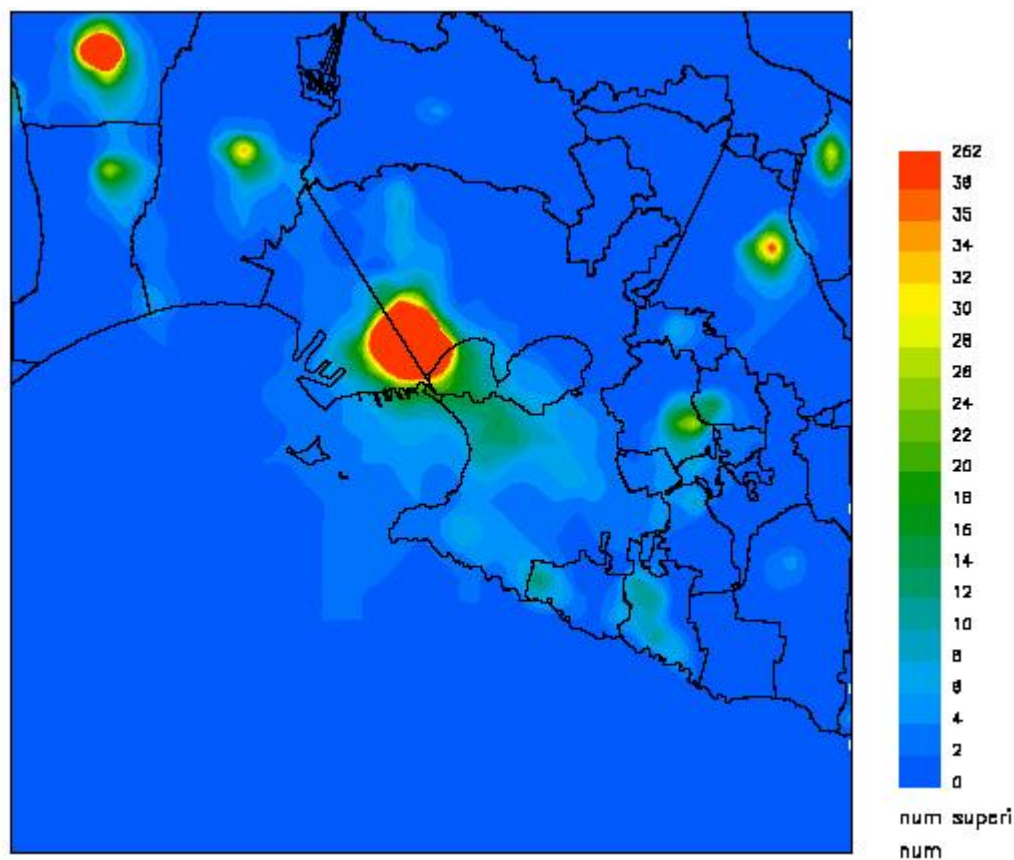


Figura 24 – Mappa del numero annuale di superamenti del valore limite giornaliero per il PM₁₀

Riguardo al valore limite giornaliero per il PM₁₀, da non superare per più di 35 volte all'anno il modello prevede nell'area di Taranto alcune non conformità in corrispondenza sia della stessa città che in provincia (nei comuni di Mottola, Castellaneta e Grottaglie).

Per quanto riguarda il comune di Taranto il modello prevede presso le centraline site in Via Machiavelli e Via Archimede un numero di superamenti superiore a 35, ma tali superamenti non sono confermati dalle misure. Tale sovrastima potrebbe essere dovuta alla metodologia utilizzata per aggiornare le emissioni ILVA al 2013. L'aggiornamento del database emissivo, utilizzato quale input nella simulazione, è stato condotto utilizzando i soli dati di produttività, senza tenere conto dei cambiamenti nei metodi di gestione e funzionamento degli impianti, che possono aver contribuito ad una ulteriore riduzione delle emissioni.

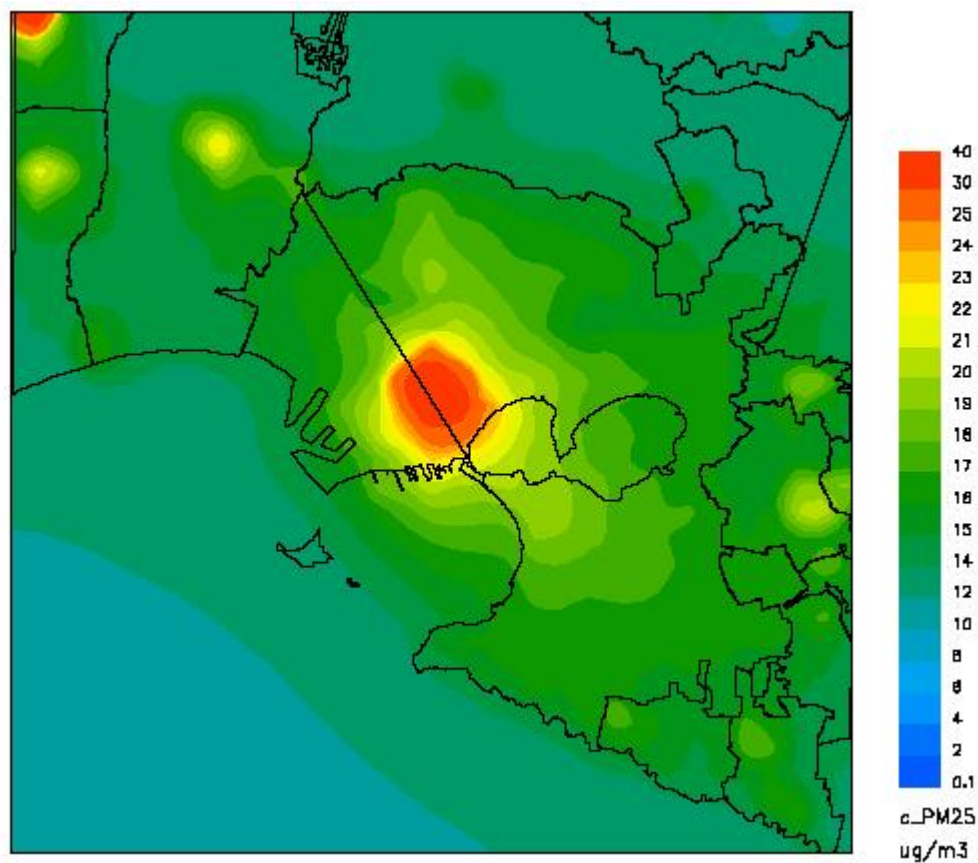


Figura 25– Mappa della concentrazione media annuale di PM_{2.5} (µg/m³), stimata da FARM

Anche relativamente alla media annuale per il PM_{2.5} il modello prevede sul dominio di simulazione per il 2013 alcuni superamenti del valore limite vigente. Tali superamenti sono stimati sia presso il quartiere Tamburi che nei comuni di Mottola e Castellaneta. Riguardo all'area di Taranto è opportuno precisare che il modello vede un superamento del valore limite anche in corrispondenza della centralina di Via Machiavelli (con un valore medio pari a 26 µg/m³), ma tale superamento non è confermato dalle misure, svolte presso la stessa centralina. Come già detto, ciò potrebbe essere imputabile alla emissione utilizzata per ILVA, che è stata scalata per il 2013 considerando solo i dati di produttività.

Tab 7 - BaP e metalli pesanti

Inquinante	Valore Limite	Periodo di mediazione	Legislazione
Benzene (C₆H₆)	Valore limite protezione salute umana, 5 µg/m ³	Anno civile	D.L. 155/2010 Allegato XI
Benzo(a)pirene (C₂₀H₁₂)	Valore obiettivo, 1 ng/m ³	Anno civile	D.L. 155/2010 Allegato XIII
Piombo (Pb)	Valore limite, 0,5 µg/m ³	Anno civile	D.L. 155/2010 Allegato XI
Arsenico (Ar)	Valore obiettivo, 6,0 ng/m ³	Anno civile	D.L. 155/2010 Allegato XIII
Cadmio (Cd)	Valore obiettivo, 5,0 ng/m ³	Anno civile	D.L. 155/2010 Allegato XIII
Nichel (Ni)	Valore obiettivo, 20,0 ng/m ³	Anno civile	D.L. 155/2010 Allegato XIII

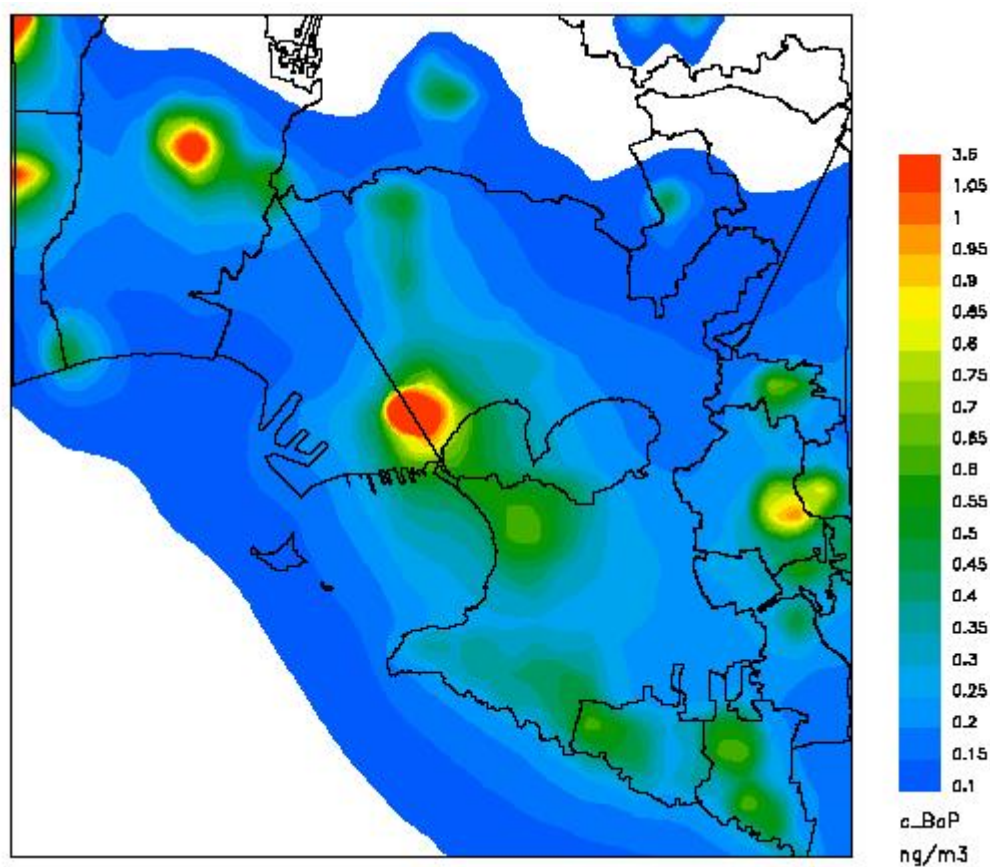


Figura 26 – Mappa della concentrazione media annuale di B(a)P (ng/m³), stimata da FARM sull'area di Taranto

Relativamente al BaP la simulazione evidenzia la presenza di numerosi superamenti sia a Taranto che in alcuni comuni della provincia (Mottola, Castellaneta, Massafra, Ginosa, Grottaglie, Palagiano e Ginosa)

Nel quartiere Tamburi di Taranto la simulazione rileva un superamento, ma non in corrispondenza della centralina sita in Via Machiavelli, coerentemente con quanto misurato nel 2013.

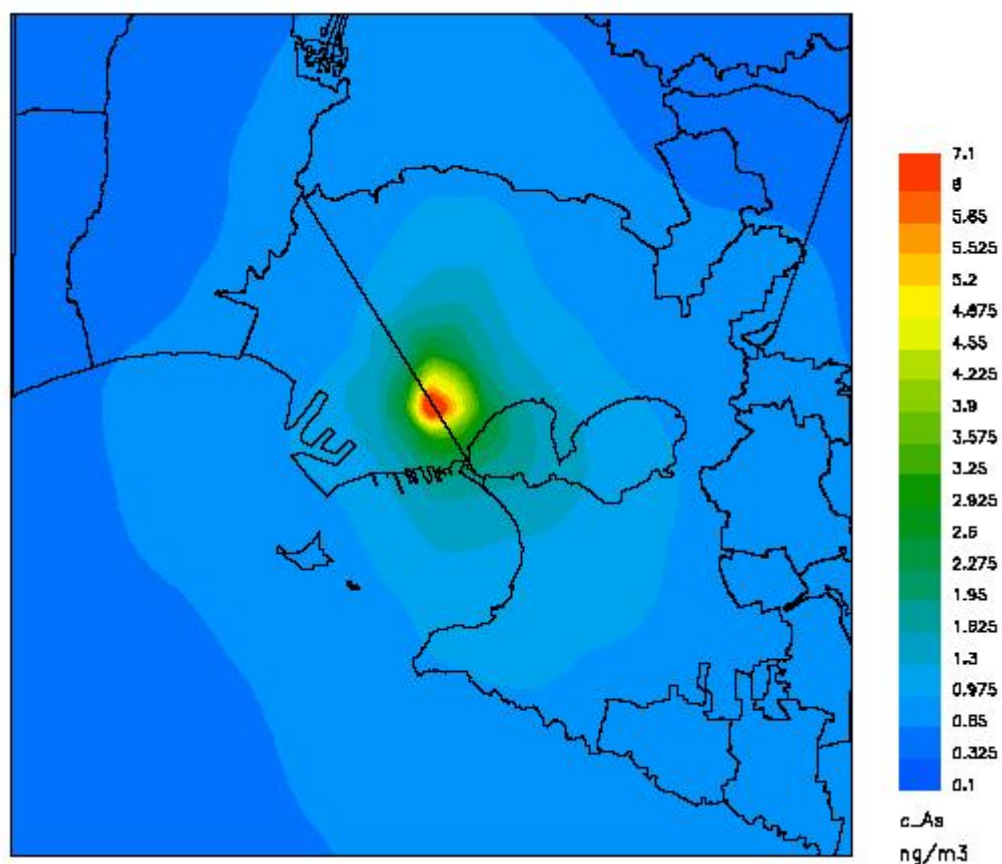


Figura 27 – Mappa della concentrazione media annuale di As (ng/m³), stimata da FARM

Relativamente all'arsenico la simulazione evidenzia la presenza di un superamento del valore limite in corrispondenza della zona industriale di Taranto.

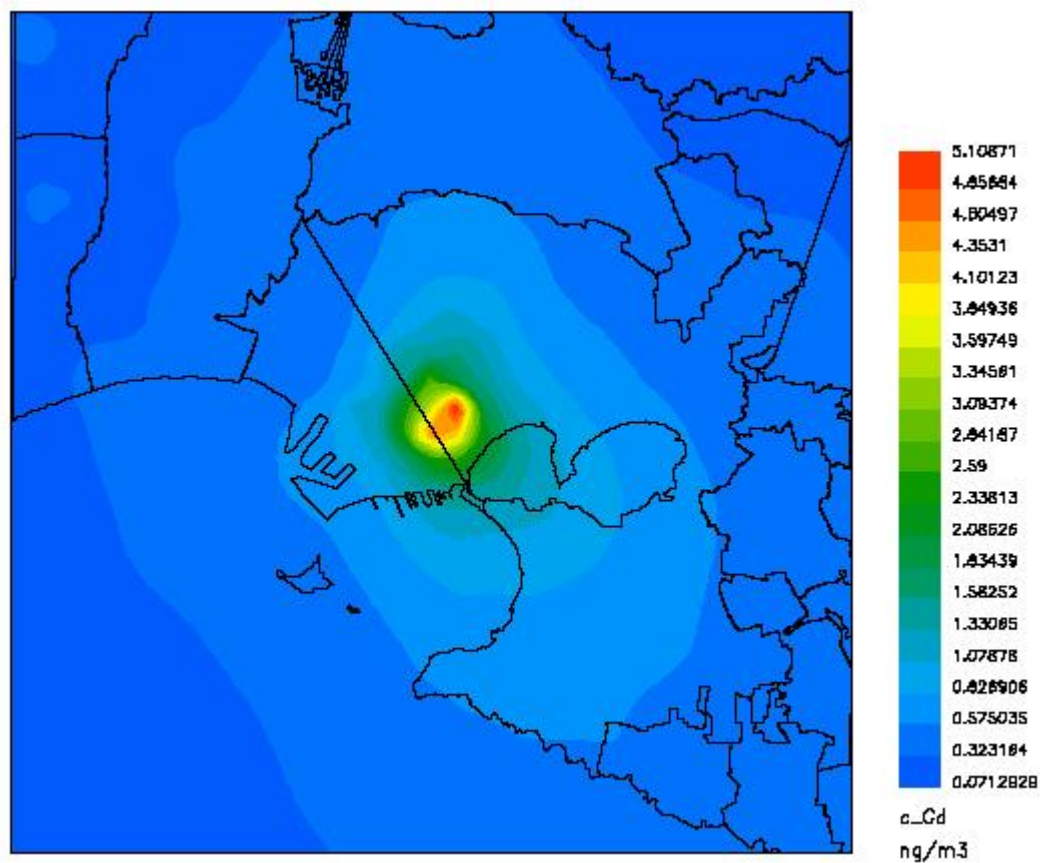


Figura 28 – Mappa della concentrazione media annuale di Cd (ng/m³), stimata da FARM

Relativamente al cadmio la simulazione evidenzia la presenza di un superamento del valore limite in corrispondenza della zona industriale di Taranto.

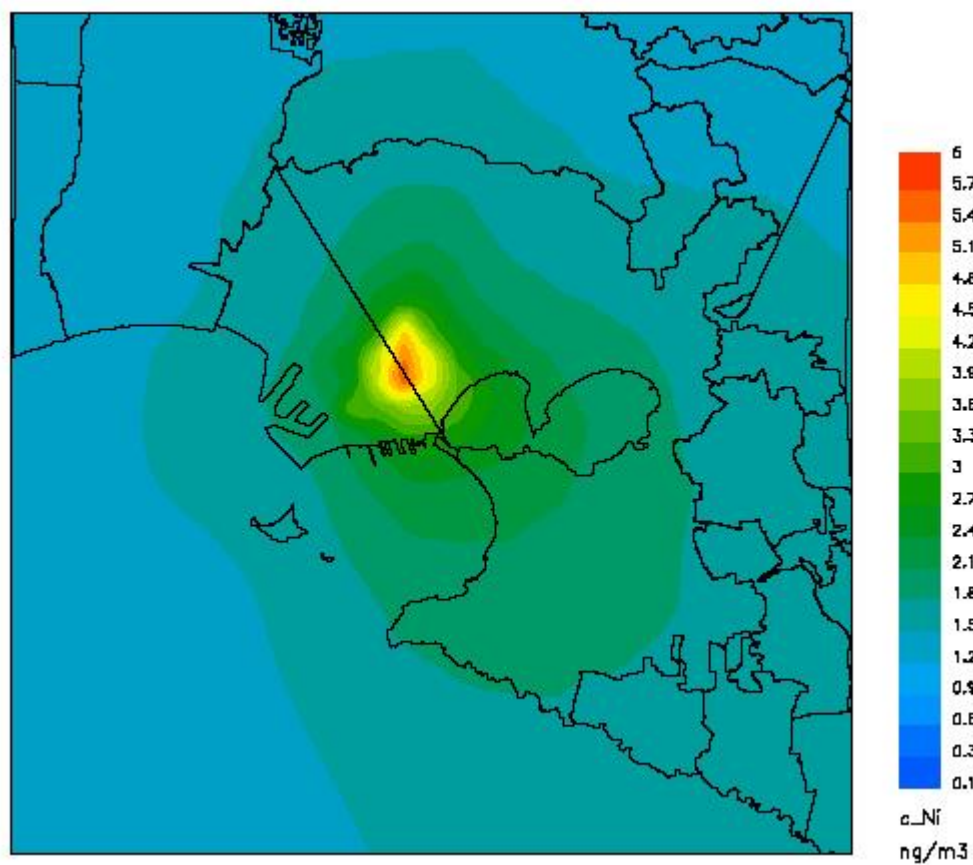


Figura 29 – Mappa della concentrazione media annuale di Ni (ng/m³), stimata da FARM
Relativamente al Ni la simulazione non evidenzia alcun superamento sull'area di Taranto.

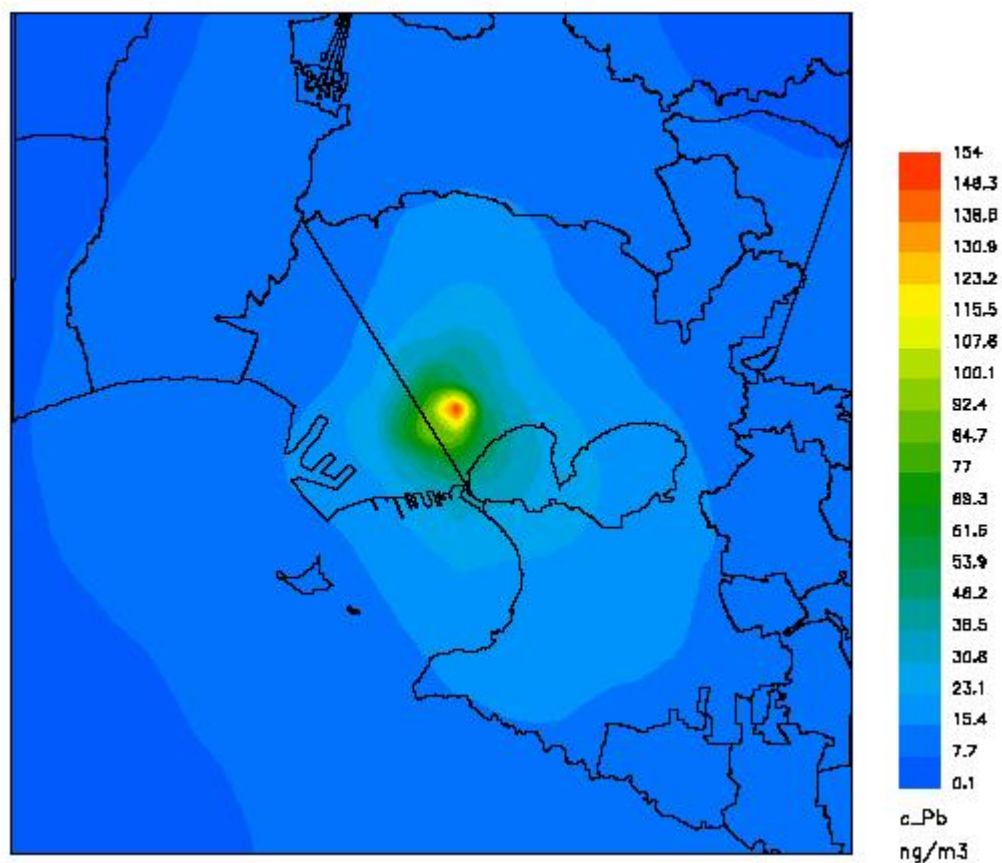


Figura 30– Mappa della concentrazione media annuale di Pb (ng/m³), stimata da FARM

Le concentrazioni annuali più elevate di Pb si osservano in corrispondenza dell'area industriale di Taranto. Non si riscontrano superamenti del corrispondente valore limite.

Di seguito si riportano le mappe della concentrazione media annuale di PCDD/F e mercurio sull'area di Taranto.

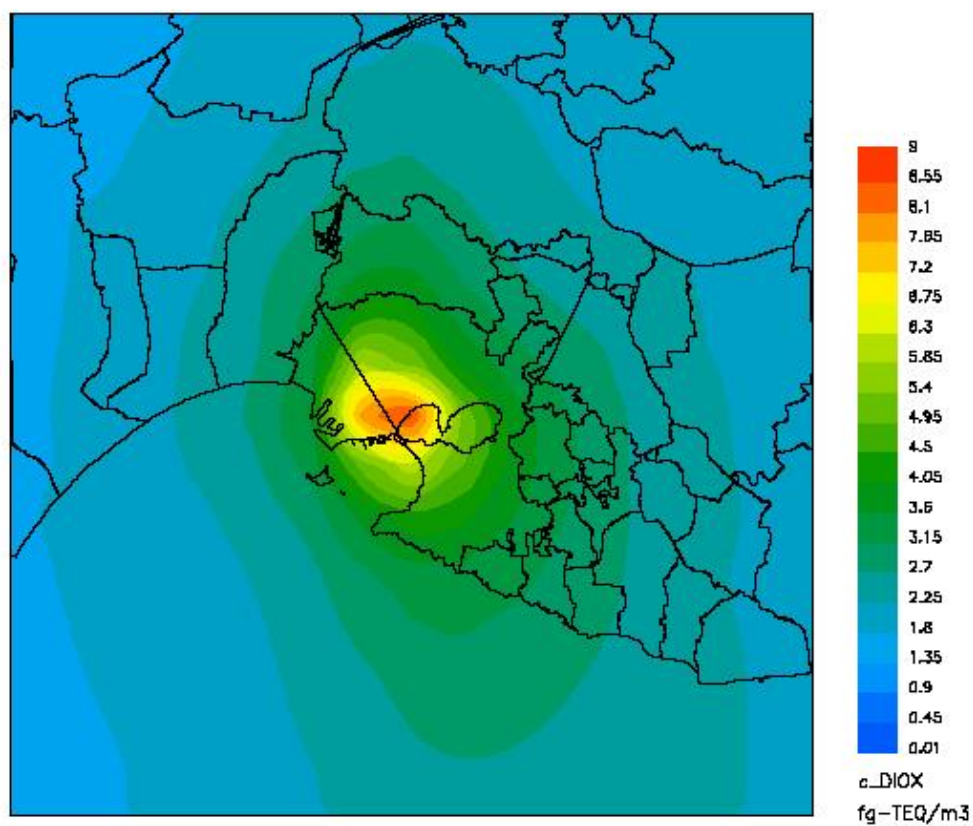


Figura 31 – Mappa della concentrazione media annuale per PCDD/F, stimata da FARM sull'area di Taranto

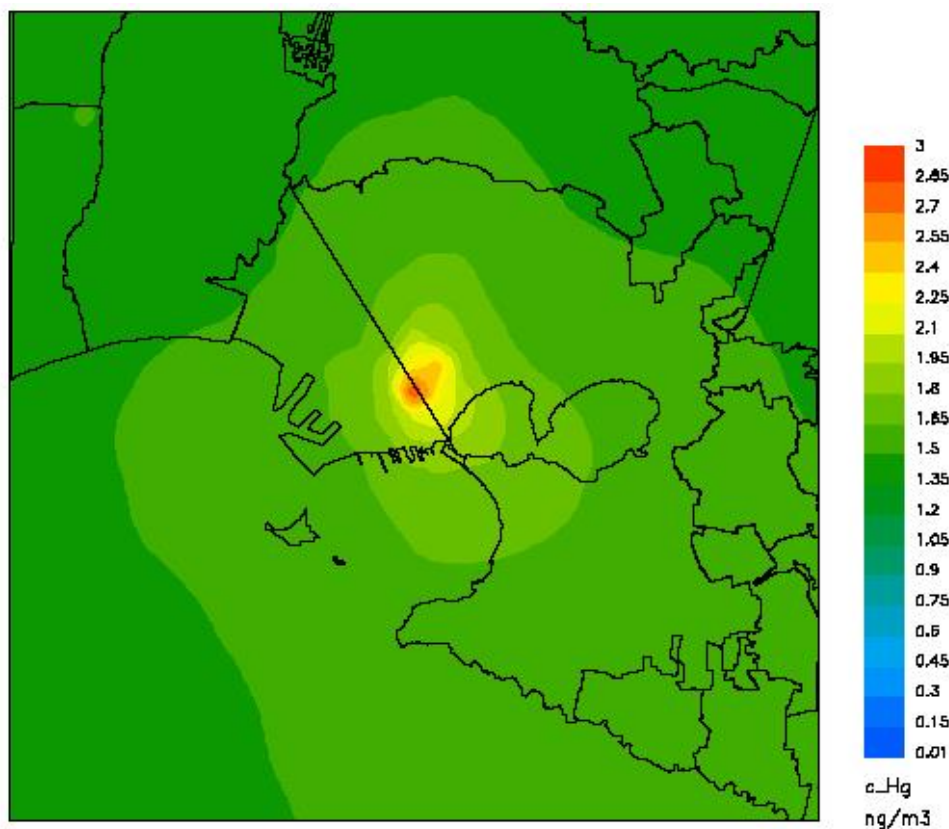


Figura 32 – Mappa della concentrazione media annuale per il mercurio, stimata da FARM sull'area di Taranto

Al fine di valutare l'accuratezza dei risultati modellizzati sull'area di Taranto di seguito vengono mostrati i risultati del confronto statistico per il PM₁₀ ed il PM_{2.5} tra i dati di concentrazione misurati dalle postazioni di monitoraggio di qualità dell'aria, installate in provincia di Taranto (figura XX) ed i dati simulati, estratti in corrispondenza della cella della griglia di calcolo, contenente la centralina di misura.

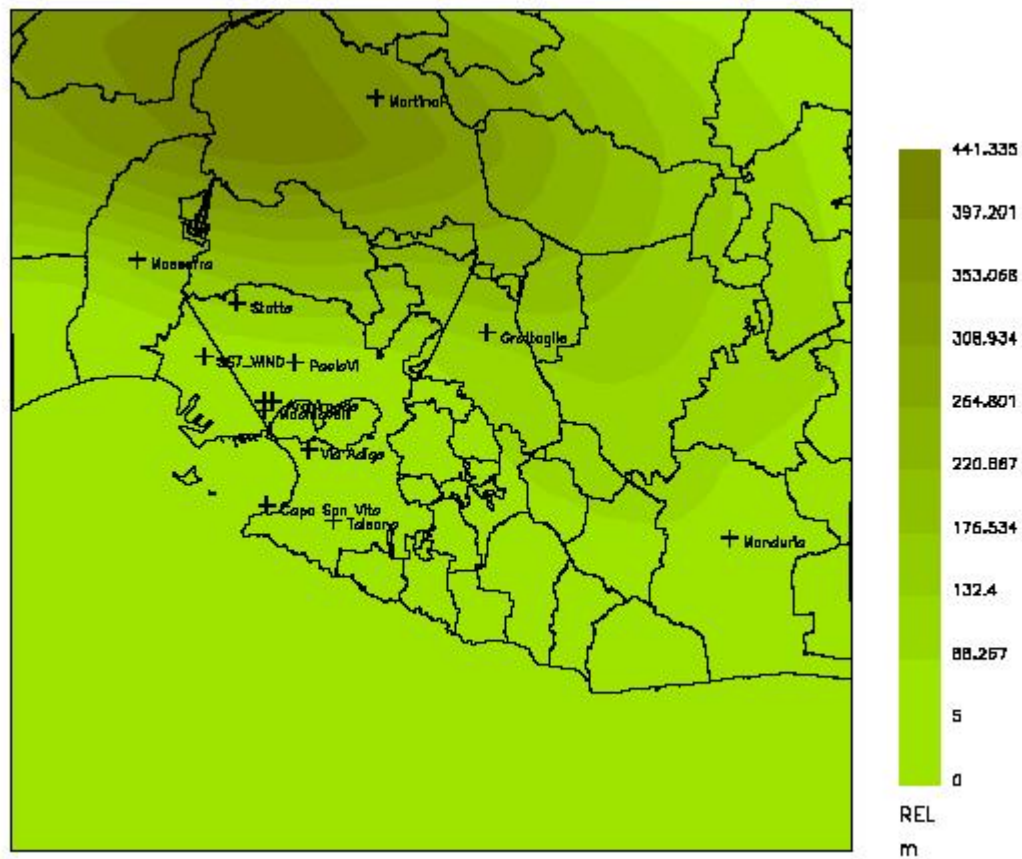


Figura 33 –Centraline di monitoraggio della QA sull’area di Taranto

Nelle formule successive O indica il dato osservato e M il dato modellato.

Tab.8 – Indicatori statistici

$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (M_i - O_i)^2}$	$R = \frac{\sum_{i=1}^N (M_i - \bar{M}) - (O_i - \bar{O})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (M_i - \bar{M})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N (O_i - \bar{O})^2}}$	$NMB = \frac{BIAS}{\bar{O}} = \frac{\bar{M} - \bar{O}}{\bar{O}}$
$NMSD = \frac{\sigma_M - \sigma_O}{\sigma_O}$	$CRMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(M_i - \bar{M}) - (O_i - \bar{O})]^2}$	$RMSE^2 = CRMSE^2 + BIAS^2$
$CRMSE^2 = (\sigma_M - \sigma_O)^2 - 2\sigma_M\sigma_O(1 - R)$	$IOA = 1 - N \cdot RMSE^2 / \sum_{i=1}^N (M_i - \bar{O} + O_i - \bar{O})^2$	FAC2 fraction of data satisfy $0.5 \leq M_i/O_i \leq 2$

Questi indicatori statistici sono confrontati in genere con criteri di performance che si trovano in letteratura (Derwent et al. 2010). Tali criteri si basano su un ampio database di valutazioni modellistiche effettuate su un esteso range di inquinanti e rappresentano il minimo livello di accettabilità che un modello deve raggiungere per “policy application”. Tra questi si ritengono

accettabili valori di FAC2≥50% e di NMB compresi tra -20% e +20%, definiti indipendentemente dall'inquinante e dal periodo di mediazione.

Per ogni postazione di monitoraggio è stato inoltre calcolato l'errore relativo come indicato nel D.lgs 155. Il Decreto stabilisce infatti gli obiettivi di qualità per i modelli, indicati nella Tabella 1 dell'Allegato 1. L'incertezza è calcolata nel seguente modo. Per ciascun punto in relazione al quale si confrontano dati ottenuti dalle stazioni di misura con quelli ottenuti dalla simulazioni, si definisce l'errore relativo (ER) come:

$$ER = \frac{|O_{vl} - M_{vl}|}{VL}$$

dove O_{vl} concentrazione misurata più vicina al valore limite (o obiettivo) e M_{vl} è la corrispondente concentrazione fornita dal modello nella distribuzione quantile-quantile.

Tabella 17: Indicatori statistici per il PM10 ed il PM2.5

PM10	<i>media osservato</i> (µg/m3)	<i>media modellato</i> (µg/m3)	<i>BIAS</i> (µg/m3)	<i>R</i>	<i>RMSE</i> (µg/m3)	<i>IOA</i>	<i>NMB</i> %	<i>NMSD</i> %	<i>FA2</i> %	<i>Errore relativo medie giornaliere (d.lgs 155/10)</i> %	<i>Errore relativo medie annuali (d.lgs 155/10)</i> %
Grottaglie	17.30	20.69	3.39	0.50	10.72	0.62	19.57	72.40	86	26%	8%
Manduria	<75%										
MartinaF	35.35	16.82	-18.53	0.26	23.68	0.46	-52.42	-40.30	44	57%	46%
Paolo_VI	16.23	22.36	6.13	0.40	10.53	0.51	37.74	56.69	81	9%	15%
SVitoCol	19.25	19.14	-0.11	0.51	8.28	0.70	-0.58	19.44	87	1%	0%
SS7_Wind	18.89	20.37	1.48	0.36	9.45	0.58	7.83	4.33	88	14%	4%
StatteSE	18.60	19.89	1.29	0.63	7.41	0.78	6.92	5.11	94	7%	3%
Macchiavelli	28.74	34.45	5.70	0.23	21.12	0.37	19.84	156.48	77	75%	14%
Archimede	25.02	38.59	13.58	0.18	24.83	0.29	54.27	147.65	71	67%	34%
Talsano	22.07	19.51	-2.57	0.49	9.51	0.69	-11.62	14.46	85	4%	6%
VA_Adige	22.13	22.36	0.23	0.42	11.32	0.59	1.05	75.72	85	19%	1%

PM2.5	<i>media osservato</i> (µg/m3)	<i>media modellato</i> (µg/m3)	<i>BIAS</i> (µg/m3)	<i>R</i>	<i>RMSE</i> (µg/m3)	<i>IOA</i>	<i>NMB</i> %	<i>NMSD</i> %	<i>FA2</i> %	<i>Errore relativo medie annuali (d.lgs 155/10)</i> %
Paolo_VI	10.22	18.83	8.61	0.59	11.29	0.47	84.29	118.82	57	34%
Macchiavelli	15.03	25.94	10.91	0.52	17.50	0.43	72.62	175.89	66	44%
VA_Adige	12.45	19.40	6.96	0.68	11.41	0.60	55.87	116.15	77	28%

Relativamente al PM10 gli indici statistici peggiori si riscontrano nelle centraline di via Archimede e via Machiavelli, poste in prossimità all'area industriale. Ciò potrebbe essere dovuto, come già detto precedentemente, ad una sovrastima delle emissioni industriali utilizzate in input.

Gli indicatori relativi al PM2.5 mostrano una soddisfacente performance del modello nel riprodurre questo inquinante.