



Università
Ca' Foscari
Venezia

**Scuola Dottorale di Ateneo
Graduate School**

**Dottorato di ricerca
in Scienze ambientali
Ciclo XXVI
Anno di discussione 2013**

**CARATTERIZZAZIONE DELLA COMPONENTE
BATTERICA NEL PARTICOLATO ATMOSFERICO E
STUDIO DELLE RELAZIONI CON I PARAMETRI
AMBIENTALI**

**SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA: GEO/08
Tesi di Dottorato di Elena Innocente, matricola 955847**

**Coordinatore del Dottorato
Prof. Gabriele Capodaglio**

**Tutore del Dottorando
Prof. Giancarlo Rampazzo**

INDICE

SCOPO DELLA TESI	4
1 INTRODUZIONE	6
1.1 Il bioaerosol	6
1.2 Il particolato atmosferico.	9
1.3 Problematiche dovute alla presenza del materiale aerodisperso	11
1.3.1 la componente batterica	11
1.3.2 il particolato atmosferico	12
1.3.3 gli elementi citotossici.	13
1.3.4 i metalli di interesse sanitario	15
2 APPROCCIO NORMATIVO	18
2.1 Scala regionale - Veneto	22
2.2 Scala regionale - Lombardia	23
3 INQUADRAMENTO DELL'AREA DI STUDIO	25
3.1 Le condizioni meteo dell'area in esame	25
3.1.1 La Pianura Padana	25
3.1.2 L'area veneziana	25
3.1.2.1 Le condizioni atmosferiche nell'area veneziana	26
durante il periodo di campionamento	
3.1.3 L'area milanese	31
3.1.3.1 Le condizioni atmosferiche nell'area della milanese	32
durante il periodo di campionamento	
3.2 Le condizioni dell'inquinamento atmosferico	37
3.2.1 La Pianura Padana	37
3.2.2 L'area Veneziana	38
3.2.3 L'area milanese	39
4 STRATEGIE E SITI DI CAMPIONAMENTO	41
4.1 Siti di campionamento	41
4.2 Strategia di campionamento per la determinazione gravimetrica	42
4.3 Strategia di campionamento per la determinazione delle	44
popolazioni batteriche e per l'analisi delle specie chimiche.	
5 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	46
5.1 Preparazione dei campioni per le determinazioni microbiologiche	46
5.1.2 Il gene 16S rRNA.	46

5.2 Preparazione dei campioni per le determinazioni chimiche	49
5.2.1 Trattamento per IEC	49
5.2.2 Trattamento per ICP-MS e ICP-OES	49
5.2.3 Limiti di rilevabilità	51
5.3 Materiale di riferimento certificato	57
6 STRUMENTAZIONE ANALITICA	58
6.1 Ion-Exchange Chromatography (IEC)	58
6.2 ICP-MS	59
6.2.1 Interferenze in ICP-MS	62
6.3 ICP-OES	64
7 STUDI PRECEDENTI	67
8 METODOLOGIE DI ANALISI STATISTICA DEL DATO	69
8.1 Indice di Shannon	69
8.2 L'analisi della ridondanza	70
8.3 L'analisi fattoriale	71
8.4 Analisi discriminante	71
9 RISULTATI E DISCUSSIONE	73
9.1 Determinazioni microbiologiche	73
9.1.1 Ordini di batteri presenti nel sito di Via Lissa	74
9.1.2 Ordini di batteri presenti nel sito di Malcontenta	76
9.1.3 Ordini di batteri presenti nel sito di Milano	78
9.1.4 Ordini di batteri presenti nel sito di Venezia	79
9.1.4.1 Gli <i>Halobacteriales</i> a Venezia	70
9.1.5 Andamento stagionale dei batteri	81
9.2 Indice di Shannon	83
9.3 Determinazioni chimiche	86
9.3.1 il Particolato atmosferico	86
9.3.2 Analisi elementare	88
9.3.3 Analisi dei principali ioni inorganici solubili in acqua	90
9.3.4 Andamento stagionale delle specie chimiche analizzate	91
9.3.4.1 Sito di Via Lissa	91
9.3.4.2 Sito di Malcontenta	97
9.3.4.3 Sito di Milano	103
9.3.4.4 Sito di Venezia	108
9.4 L'analisi discriminante	114

9.4.1 L'analisi discriminante sugli Ordini dei Batteri	115
9.4.1 L'analisi discriminante sulle specie chimiche	119
9.5 Analisi RDA	123
9.5.1 Analisi RDA complessiva	124
9.5.2 Analisi RDA del sito di Via Lissa	125
9.5.3 Analisi RDA del sito di Malcontenta	130
9.5.4 Analisi RDA del sito di Milano	137
9.5.5 Analisi RDA nel sito di Venezia	142
9.5.6 Discussione dei risultati dell'analisi RDA.	145
9.6 Analisi fattoriale	151
9.6.1 Analisi RDA	155
9.6.1.1 Analisi RDA del sito di Via Lissa	155
9.6.1.2 Analisi RDA del sito di Malcontenta	156
9.6.1.3 Analisi RDA del sito di Venezia	157
9.6.1.3 Discussione dei risultati dell'analisi RDA.	158
9.7 Relazione con i parametri ambientali	161
10 CONCLUSIONI	162
BIBLIOGRAFIA	167
ALLEGATI	184

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni a scala globale, a causa di una tendenza generalizzata al peggioramento della qualità dell'aria, sono incrementati gli studi e si è diffusa la consapevolezza della relazione fra l'inquinamento atmosferico e un impatto negativo sulla salute umana, sugli ecosistemi, sui cambiamenti climatici e l'aumento della velocità di deterioramento di monumenti e dei materiali da costruzione (Lazaridis et al., 1999, Van Digenen et al., 2004, Meyer et al., 2009). In particolare sono state messe in evidenza, attraverso studi di svariati autori (Pope e Dockery, 2006, Heinrich et al., 2013) le conseguenze avverse che il particolato atmosferico avrebbe sulla salute umana, evidenziando le relazioni esistenti fra morbidità e mortalità da malattie respiratorie e cardiovascolari con diversi inquinanti atmosferici ed il particolato.

Sono tuttavia ancora poco conosciuti e studiati gli effetti della componente biogenica del particolato e in particolare le sue relazioni con la composizione chimica dello stesso.

A questo scopo è stato realizzato questo progetto di ricerca in collaborazione con l'Università Bicocca di Milano al fine di stabilire se esiste una relazione fra la composizione chimica del particolato atmosferico e la componente batterica presente in esso.

È stata di conseguenza avviata una campagna di campionamento e di analisi di PM_{10} e di TSP nell'area veneziana e nel Milanese, avvalendosi, nell'area veneta, della collaborazione di ARPAV .

Sono stati quindi individuati quattro punti di campionamento, tre nell'area veneziana e uno nell'area milanese in cui sono stati effettuati quattro cicli di campionamento.

1 INTRODUZIONE

1.1 IL BIOAEROSOL

I batteri, che costituiscono la maggior parte della biomassa terrestre, sono stati ritrovati in qualunque ambiente, anche il più estremo, in quanto possono sopravvivere al calore, al freddo, a radiazioni, a pressioni e salinità estreme e resistere in ambienti estremamente acidi e privi di luce (Polymanakou, 2012).

La frazione microbica presente in atmosfera, chiamata comunemente "bioaerosol", è una miscela costituita da microorganismi (alghe, batteri, funghi, lieviti) e da altri tipi di biomassa come antigeni, residui vegetali, tossine microbiche e virus (Peccia e Hernandez, 2006).

La composizione tassonomica delle comunità microbiche presenti in atmosfera non è ancora del tutto definita, in quanto gli studi della diversità dei batteri a livello di popolazione nell'aria ambiente è un argomento di nuovo interesse, mentre le conoscenze sulla funzionalità potenziale dei microorganismi in aria è scarsa.

È noto però che il bioaerosol sia una componente ubiquitaria dell'atmosfera (Polymenakou, 2012) e che sia prevalentemente composto da virus, batteri, funghi e le loro spore, frammenti di licheni, protisti (protozoi, alghe e diatomee) spore, frammenti di piante, pollini, piccoli semi, piccoli invertebrati o loro frammenti e materiale fecale (Lacey e West, 2006). Questo materiale biologico deriva principalmente da sorgenti naturali come il suolo, la vegetazione, i corpi idrici e da attività antropiche come l'allevamento, l'agricoltura e i processi industriali di fermentazione.

Una volta dispersi in atmosfera i microorganismi possono essere trasportati attraverso e fra i continenti dalle alte correnti atmosferiche e possono essere rinvenuti associati alle particelle ambientali e/o incorporate alle goccioline d'acqua di nuvole, nebbia e precipitazioni (Kuske 2006; Polymenakou, 2012; Fuzzi et al., 1997).

Popolazione attive di batteri, funghi e lieviti sono state infatti trovate all'interno della gocce d'acqua presenti nella nebbia; nelle nuvole super-fredde e all'interno dei fiocchi di neve (Fuzzi et al., 1997; Sattler et al., 2001).

Infatti le gocce di acqua delle nuvole non sono altro che una soluzione liquida contenete composti che possono fornire carbonio e azoto, e quindi rappresenta

un terreno ideale per l'attività microbiologica nell'atmosfera (Polymenakou, 2012).

Il trasporto atmosferico rappresenta, come già detto, il principale metodo di dispersione per microorganismi.

Questo permette loro una rapida e larga diffusione permettendo a molte specie di superare barriere geografiche altrimenti invalicabili. L'efficienza e la dispersione casuale è un importante fattore da considerare quando si cerca di ricostruire, nel campo della biogeografia, la storia evolutiva e di diffusione dei taxa (Finlay, 2002; Burrows et al, 2009).

I batteri aerodispersi, una volta che sono stati nuovamente depositati sulla superficie terrestre, attraverso i noti processi di deposizione secca ed umida (wet e dry deposition), possono generare impatti significativi sugli ecosistemi, sulla produttività agricola e sulla salute umana (Shinn et al., 2000).

È infatti noto come alcuni organismi associati al particolato atmosferico siano responsabili di patologie umane, in particolare per individui carenti di difese immunitarie o sensibili ad un ampio spettro di sostanze biologiche ad azione allergenica o tossica (Peccia, 2008 e Polymanakou, 2012).

Per le cellule microbiche l'atmosfera è un ambiente estremamente stressogeno. Le basse temperature sono considerate un fattore limitante per le attività microbiche in aria, sebbene sia stato dimostrato da alcuni studi che ci può essere attività microbica anche a temperature al di sotto dello zero.

I microorganismi sono in grado di adottare numerosi meccanismi di sopravvivenza, per esempio a temperature molto basse possono ridurre le dimensioni cellulari e lo spessore del capsido polisaccaridico semplicemente variando la composizione della componente fosfolipidica.

Oltre alla temperatura, un altro fattore limitante per la sopravvivenza dei batteri in atmosfera sono la presenza di agenti ossidanti e la radiazione solare, anche se le cellule microbiche possono ridurre l'impatto negativo sulle loro normali funzioni, grazie all'attività di specifici enzimi (superossidasi o perossidasi).

Per quanto riguarda invece gli effetti dannosi dati dall'irraggiamento solare, l'adattamento li ha portati ad essere in grado di produrre di un'ampia gamma di pigmenti che possono assorbire le frequenze luminose dal dall'UV-B al rosso, evitando così danni al DNA batterico.

Oltre alle già citate capacità di sopravvivenza in situazioni particolarmente ostili come il freddo, la presenza di agenti ossidanti, l'irraggiamento solare, e la disidratazione, la presenza di microorganismi nell'atmosfera ha anche notevoli implicazioni di ordine meteorologico e climatico per l'impatto che questi possono avere sulla chimica e sulla fisica dell'atmosfera (Polymenakou, 2012).

È stato dimostrato come la presenza di batteri in aria possa favorire la formazione di nuvole, essi infatti possono fungere da nuclei di condensazione, diventando così un fattore rilevante nella distribuzione globale delle nubi e delle precipitazioni (Schnell e Vali, 1972, 1973; Yankofsky et al., 1981a,b; Levin e Yankofsky, 1988; Morris et al., 2005; Sun e Ariya, 2006; Mohler et al., 2007; Christner et al., 2008; Junge e Swanson, 2008; Pratt et al., 2009).

Alcuni autori, dopo aver dimostrato che i batteri sono vitali nelle gocce di pioggia, hanno proposto che essi possano avere un impatto sulla chimica delle nubi e dell'aria (Amato et al., 2007a; Deguillaume et al., 2008).

E' stata ampiamente dimostrata la presenza di molteplici specie di batteri vegetali (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans* e *Xanthomonas campestris*), ma anche di funghi (*Fusarium avenaceum*) in aerosol associati a nuclei ghiacciati (Polymenakou 2012).

Alcuni studi riportano risultati secondo i quali si può sospettare che i microorganismi presenti nell'aria giochino un ruolo chiave nei vari processi della chimica dell'atmosfera contribuendo alla degradazione di molti composti organici (Ariya et al., 2002; Amato et al., 2007b).

Le prime evidenze in merito alla capacità di degradazione dei microorganismi dell'atmosfera è rappresentato dalla degradazione dell'acido formico e dell'acido acetico per opera di batteri isolati dall'acqua piovana. Si è infatti ipotizzato che la diminuzione di acido carbossilico osservata nell'acqua piovana durante la conservazione dei campioni per gli esperimenti fosse dovuta ai processi di degradazione messi in atto dei microorganismi (Polymenakou, 2012). Nel 2002 con i loro studi Ariya, et al., hanno inequivocabilmente scoperto che un importante componente dell'aerosol organico, l'acido dicarbossilico, può essere efficacemente trasformato dai microorganismi in sospensione nell'aria presenti nello strato limite atmosferico.

1.2 IL PARTICOLATO ATMOSFERICO.

Il particolato atmosferico è una miscela complessa di particelle fini, solide o liquide, quali composti carboniosi, ioni, particelle minerali, elementi in tracce ed acqua, immersi in un gas caratterizzato da un ampio range di proprietà termodinamiche, morfologiche, chimiche e fisiche (Gilli et al., 2006).

Gli inquinanti atmosferici possono essere distinti in primari e secondari: se sono emessi direttamente nell'atmosfera sono definiti inquinanti primari, se si formano nella stessa da precursori sono detti secondari (Aldabe et al., 2011; Pandis et al., 1995).

La composizione del particolato atmosferico, sia esso organico od inorganico, e le sue proprietà chimico fisiche e fisiopatologiche possono variare molto a seconda dell'origine e della fonte da cui gli inquinanti vengono emessi.

Solitamente le sorgenti di emissione vengono distinte in naturali ed antropiche: le sorgenti di particolato naturale comprendono polveri cristalline, spray marino, ceneri vulcaniche, materiale biogenico; mentre il particolato antropogenico viene originato da svariate attività umane, quali la combustione in tutte le sue forme o le sorgenti industriali.

La composizione chimica e la dimensione del particolato, che può andare da pochi nanometri a qualche decina di micrometri, sono fortemente collegati al processo di formazione dello stesso (Alastuey et al., 2004). Una volta in atmosfera le particelle evolvono in dimensioni e composizione attraverso la condensazione di specie gassose, per evaporazione, per coagulazione con altre particelle o attraverso reazioni chimiche (Raes et al., 2000).

Il materiale aerodisperso può assumere una grande varietà di dimensioni, che possono variare da qualche decina di angstrom (\AA) a diverse centinaia di micrometri (μm). Generalmente la classificazione granulometrica è in tre classi, caratterizzate da tre mode differenti.

La frazione *coarse* caratterizzata da granulometrie superiori a $2,5 \mu\text{m}$, la frazione *fine* che presenta diametri inferiori ai $2,5 \mu\text{m}$, e la frazione *ultrafine*, con diametri che vanno dai $0,01$ ai $0,1 \mu\text{m}$ (Boreson et al., 2003; Gilli et al., 2006).

Le particelle ultrafini (*ultrafine*) sono solitamente caratterizzate da una larga percentuale di massa carboniosa, anche se è riportata presenza di nitrati e solfati (Cabada et al., 2004).

Le particelle fini (*fine*) sono caratterizzate da una mistura di aerosol primario e secondario la cui origine è sia di natura antropogenica sia naturale, sia che originata dal vapore attraverso processi di nucleazione/condensazione (Manoli et al., 2003).

La frazione *coarse* è invece caratterizzata da materiale crostale, road dust e aerosol marino (Manoli et al., 2003).

Infine va ricordato come le condizioni climatiche influenzino profondamente le concentrazioni, i processi di formazione, la composizione, la deposizione e la dispersione degli inquinanti in aria.

1.3 PROBLEMATICHE DOVUTE ALLA PRESENZA DEL MATERIALE AERODISPERSO

1.3.1 LA COMPONENTE BATTERICA

L'interesse verso la frazione biogenica dell'aerosol è aumentata negli ultimi anni poiché l'esposizione ad esso è sempre più spesso associata a reazioni allergiche e malattie respiratorie. È infatti noto che il bioaerosol possa causare un'ampia gamma di effetti nocivi per la salute umana che possono portare fino alla morte degli individui particolarmente debilitati (Kim e Kim, 2006; Burger, 1990; Peccia, et al., 2008).

Fra le conseguenze dell'esposizione al bioaerosol si annoverano le malattie infettive, quali, ad esempio, la semplice influenza, la polmonite, la tubercolosi o la legionellosi.

Altro effetto indotto dalla frazione biogenica del particolato sono tutte quelle malattie, allergiche o non allergiche, a carico dell'apparto respiratorio che possono variare da riniti, asma, bronchiti croniche e alveoliti.

Infine va ricordata la capacità di questa frazione di causare cancro (Douwes et al., 2003; Peccia et al., 2008).

Nonostante i batteri in atmosfera siano spesso meno abbondanti rispetto ad altro materiale biogenico, quale spore fungine e pollini, e che raramente possano causare gravi malattie all'essere umano, essi possono presentare antigeni delle membrane cellulari, come endotossine e peptidoglicani che possono danneggiare i tessuti polmonari e indurre dei seri problemi respiratori (Wu et al., 2011) come allergie e asma. Nei paesi sviluppati si stima che queste ultime siano la prima causa di malattia e che nelle zone urbane stiano crescendo i pazienti affetti da questi disturbi (Peccia et al., 2008).

1.3.2 IL PARTICOLATO ATMOSFERICO

Sono ormai numerosi le pubblicazioni che riportano studi e casistiche sulla relazione negativa esistente fra la salute umana e la concentrazione di particolato atmosferico (Pope e Dockery, 2006, Heinrich et al., 2013).

La sua tossicità varia in funzione del diametro aerodinamico delle particelle e dalla loro sorgente di emissione. È infatti noto che particelle di dimensioni fini od ultrafini sono maggiormente associate alla mortalità rispetto alle particelle della frazione grossolana. Gli studi effettuati hanno infatti decretato che le particelle fini sono maggiormente tossiche a causa della loro maggior area superficiale che permette una maggior interazione con le cellule esposte. Si è inoltre supposto che le particelle fini siano più tossiche a causa della loro sorgenti di emissione prettamente antropiche (Perrone et al., 2010).

Gli effetti che il particolato atmosferico può avere sulla salute umana sono molteplici. Sono noti gli effetti al sistema respiratorio per il quale si possono osservare lievi effetti come irritazioni delle mucose nasali e della gola fino a infiammazioni polmonari.

L'inquinamento atmosferico danneggia anche l'apparato cardiovascolare: studi dimostrano come il particolato possa indurre processi infiammatori sistemici e agire sulla capacità di coagulazione del sangue (Kampa e Castanas, 2007). Inoltre, sono noti casi di angina ed infarto correlati ad alte esposizioni alle polveri atmosferiche (Peters et al., 2001; Vermeylen et al., 2005).

Nel caso di inquinamento molto forte da metalli pesanti (nickel, mercurio, arsenico) sono stati osservati casi di tachicardia, alta pressione del sangue, anemia dovute ad effetti inibitori sull'emopoiesi (Kampa e Castanas, 2007).

Studi hanno dimostrato come l'effetto ad alte esposizioni di monossido di carbonio, riduca la capacità di trasporto di ossigeno dell'emoglobina legandosi ad essa (Badman e Jaffe, 1996).

Questo deficit di ossigeno può successivamente andare ad impattare sul funzionamento di altri organi che per il loro efficiente funzionamento richiedono alti tenori di ossigenazione (cuore e cervello).

Altri effetti indotti dall'esposizione all'inquinamento atmosferico possono essere disturbi del sistema nervoso come: perdite di memoria, disordini nel ritmo sonno veglia, affaticamento e tremori, dovuti soprattutto a metalli quali piombo mercurio ed arsenico; effetti a carico del sistema urinario e digestivo (Kampa e

Castanas, 2007), di citotossicità, potenziale mutagenicità e carcinogenesi (de Kok et al., 2006).

1.3.3 GLI ELEMENTI CITOTOSSICI

Gli elementi metallici, nei sistemi biologici, possono essere sia co-fattori essenziali ad un ampio numero di reazioni biochimiche vitali, sia essere estremamente tossici e dannosi per le cellule.

Questi metalli inducono un forte stress alle cellule eucariote che, per difendersi, hanno sviluppato delle proteine sensibili alla tossicità dei metalli, capaci di rispondere ad una concentrazione elevata di questi stimolando una risposta cellulare che attiva i meccanismi di detossificazione ed omeostasi.

È inoltre da ricordare che non solo i "metalli estranei" al sistema possono risultare tossici, ma anche quelli essenziali, se presenti a concentrazioni estremamente elevate (Geldmacher-v. Mallinckrodt e Schaller, 2006).

I processi di trasporto di membrana non solo controllano l'accesso dei metalli pesanti tossici ai siti intracellulari sensibili, ma determinano anche il loro eventuale assorbimento, la distribuzione, e l'escrezione dal corpo. Il ruolo critico delle membrane nella tossicologia dei metalli è stato oggetto di svariati studi, soprattutto sul meccanismo di trasporto.

La regolazione dei meccanismi biologici per il mantenimento dell'omeostasi sono in grado di aggiustare i piccoli cambiamenti nelle concentrazioni dei metalli per brevi periodi di tempo, mentre per cambiamenti di concentrazione e periodi di esposizioni lunghi si può assistere a processi di adattamento e selezione.

Tuttavia, spesso, significativi cambi di concentrazione intracellulare, dovuti ad un'esposizione acuta non possono essere contrastati e possono portare a conseguenze fatali per l'organismo. I sintomi di avvelenamento si riconoscono da svariati cambiamenti nella struttura cellulare come cambiamenti della struttura delle proteine, rottura dei ponti ad idrogeno, inibizione degli enzimi.

Se si considera la posizione nella tavola periodica la tossicità dei metalli diminuisce all'aumentare della stabilità della configurazione elettronica. Gli ioni metallici del sottogruppo IA e IIA sono altamente elettropositivi, e questi ioni metallici compaiono nell'ambiente biologico essenzialmente come ioni liberi. La tossicità di questi due sottogruppi incrementa con l'aumento del numero atomico (Geldmacher-v. Mallinckrodt e Schaller, 2006; Squizzato, 2011):

IA : Na < K < Rb < Cs

IIA : Mg < Ca < Sr < Ba

Anche nei gruppi IB IIB IIIA aumenta la tossicità all'aumentare dell'elettropositività (Geldmacher-v. Mallinckrodt e Schaller, 2006; Squizzato 2011):

IB : Cu < Ag < Au

IIB : Zn < Cd < Hg

IIIA : Al < Ga < In < Tl

L'aumento della tossicità viene spiegato con l'incremento di affinità di questi elementi con i gruppi amminici, iminici, e solfidrilici che formano il centro di attivazione di numerosi enzimi.

I metalli del sesto periodo ed i loro composti, sono potenzialmente i più tossici, anche se i loro sali sono generalmente poco solubili in acqua.

Infine i metalli del quarto periodo spesso formano legami covalenti e complessi leganti biologici e idrossiacidi in cui il metallo assume la parte dell'anione.

Altro fattore da tenere in considerazione, oltre alle caratteristiche elettrochimiche e alla solubilità del metallo e dei suoi composti, che influenzano la capacità di assimilazione da parte di un organismo, è lo stato di ossidazione dello stesso: è noto che i composti del manganese (VII) sono molto più tossici di quelli con manganese (II), stesso dicasi per gli ossidi di arsenico (III) più tossici degli ossidi di arsenico (V) (Geldmacher-v. Mallinckrodt e Schaller, 2006; Squizzato, 2011).

In Nies (2004) vengono definiti dei parametri atti a individuare l'impatto biologico degli elementi chimici. In questo lavoro viene definita una regola di tossicità secondo la quale tutti gli ioni divalenti dei metalli pesanti sono tossici. In questo lavoro si afferma che se le cellule volessero impiegare per i propri scopi metabolici uno di questi elementi dovrebbero essere in grado di mantenere un bilancio perfetto fra la totale essenza dell'elemento e la quantità tossica del medesimo.

Questo, secondo l'autrice, risulta molto difficile o impossibile a causa di due condizioni: (I) se il metabolismo dell'elemento in tracce interferisce fortemente con il metabolismo dei bioelementi maggiori e (II) se l'affinità del catione metallico ai composti tiolici è troppo alta.

L'alta affinità del mercurio, del piombo e dell'argento allo zolfo esclude questi metalli dal poter essere considerati elementi in tracce: essi possono essere considerati solo tossici, assieme al cadmio che molto spesso assume delle forme nocive (Nies 2004).

1.3.4 I METALLI DI INTERESSE SANITARIO

Nella letteratura internazionale i metalli pesanti sono considerati capaci di produrre effetti deleteri sull'uomo, sugli animali e sugli ecosistemi a causa della loro biodisponibilità e tossicità in svariati comparti ambientali. Negli ultimi decenni sono state implementate svariate strategie di contenimento della dispersione di questi pericolosi elementi a causa della loro pericolosità e capacità di essere trasportati a lunga distanza (Strincone et al., 2013)

Nella normativa italiana con Dlgs n. 155 del 13 agosto 2010, in attuazione della Direttiva Europea 2008/50/CE "relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa" si definiscono metalli di interesse sanitario quei metalli con provati effetti a breve e medio termine sulla salute umana. La normativa individua piombo, arsenico, cadmio, nickel, mercurio, come metalli estremamente pericolosi per l'uomo e per l'ambiente.

Il piombo è un elemento altamente tossico. Gli effetti di un avvelenamento acuto da piombo sono emicranie, irritabilità, dolori addominali e svariati sintomi riferibili al sistema nervoso, che nell'età pediatrica possono sfociare in disturbi comportamentali e dell'apprendimento (Järup, 2003). Le sorgenti naturali sono individuate nei vulcani, nello spray marino, negli incendi boschivi, mentre le sorgenti antropiche di questo elemento sono principalmente dovute all'estrazione dei metalli, attività industriali, fonderie, raffinerie di petrolio o metalli (Strincone et al., 2013).

Il cadmio può causare, per esposizioni croniche, danni renali e danni allo scheletro, inoltre è stato classificato dall'agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro come cancerogeno (Järup, 2003). Le sorgenti principale del cadmio antropogenico sono associate all'attività mineraria, l'industria metallurgica, industrie di vernici, di laminazione e galvaniche (Strincone et al., 2013).

Il nickel, classificato anch'esso come cancerogeno per esposizione cronica ai suoi composti ha effetti irritanti (irritazioni alle prime vie aeree, tracheobronchiti) e

cancerogena (polmone e seni paranasali) sull'apparato respiratorio (Campurra, 2009). In Europa la sorgente principale di nickel sono le raffinerie di petrolio, la fusione dei metalli e la combustione. Le sorgenti naturali invece sono la risospensione di suolo e i vulcani (Strincone et al., 2013).

L'arsenico inorganico può causare svariati effetti sulla salute umana, come l'irritazione degli apparati digerente e respiratorio, severi disturbi all'apparato cardiovascolare e al sistema nervoso centrale (Järup, 2003).

È stato stimato che, negli anni novanta del secolo scorso, le emissioni d'arsenico totale in Europa erano emesse per l'86% da ciminiere industriali.

Solitamente le emissioni antropiche superano le emissioni naturali, che principalmente derivano da vulcani, anche se a livello locale a causa del dilavamento ed erosione delle rocce e dei terreni la risospensione di questo elemento può raggiungere il 60% (Commissione Europea, 2003).

Tab. 1.1. Medie stagionali dei metalli di interesse sanitario rilevati nei siti di campionamento.

Estate ng/m ³	Via Lissa	Malcontenta	Milano	Venezia
As	2,06	1,47	0,75	-
Cd	0,71	0,39	0,71	-
Ni	3,50	3,12	3,69	-
Pb	11,3	26	14,9	-
Autunno ng/m ³				
As	1,96	1,88	1,48	8,16
Cd	1,34	1,16	0,71	8,23
Ni	5,11	4,13	8,14	3,13
Pb	19,2	32,2	56,5	32
Inverno ng/m ³				
As	1,86	1,50	3,46	5,61
Cd	0,71	0,77	1,58	0,43
Ni	7,17	5,22	8,11	1,19
Pb	85,3	34,1	109	13,5
Primavera ng/m ³				
As	2,03	1,67	0,99	4,12
Cd	1,54	0,96	0,21	2,37
Ni	3,60	2,84	3,51	3,64
Pb	10,4	15,3	35,3	13,6

2 APPROCCIO NORMATIVO

Il primo approccio normativo Italiano al tema della qualità dell'aria risale 1966 con la Legge del 13 giugno 1966 n. 615 "Provvedimenti contro l'inquinamento atmosferico" in cui veniva istituita presso il Ministero della Sanità una commissione centrale contro l'inquinamento atmosferico e in cui si regolamentava *"l'esercizio di impianti termici, alimentati con combustibili minerali solidi o liquidi, a ciclo continuo o occasionale, l'esercizio di impianti industriali e di mezzi motorizzati, che diano luogo ad emissione in atmosfera di fumi, polveri, gas e odori di qualsiasi tipo atti ad alterare le normali condizioni di salubrità dell'aria e di costituire pertanto pregiudizio diretto o indiretto alla salute dei cittadini e danno ai beni pubblici o privati"*, da cui sono poi derivati regolamenti, leggi specifiche e disposizioni.

Negli anni '70 ed '80 del secolo scorso la legislazione sulla qualità dell'aria diventa più complessa ed articolata, soprattutto negli anni '80, quando l'attenzione del legislatore si sposta dal contenimento delle emissioni in atmosfera in generale alle immissioni di composti nocivi, fissando dei limiti massimi di esposizione agli inquinanti atmosferici, si stabilendo nuove metodologie di campionamento e di analisi dei campioni per la determinazione della qualità dell'aria e per la tutela dei cittadini.

Nel 1992 lo Stato Italiano recepisce la direttiva 1999/30/CE del 1999 "concernente i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, gli ossidi di azoto, le particelle e il piombo ... relativa ai valori limite di qualità dell'aria ambiente per il benzene ed il monossido di carbonio".

Nel 2005 è entrata in vigore nel territorio nazionale la norma EN 14907:2005 concernente la metodica normalizzata per i metodi di campionamento e di misurazione gravimetrica della concentrazione PM_{2.5}.

Nel 2006 vengono promulgati il Decreto Legislativo 3 aprile 2006 n. 152 (parte V^a) la norma quadro in materia di prevenzione e limitazione delle emissioni in atmosfera che si applica a tutti gli impianti ed alle attività che producono emissioni in atmosfera e stabilisce i valori di emissione, le prescrizioni, i metodi di campionamento e di analisi delle emissioni ed i criteri per la valutazione della

conformità dei valori misurati ai limiti di legge (ARPAV). Viene inoltre promulgato Il Decreto legislativo n. 216 del 04 aprile 2006 *“attuazione delle Direttive 2003/87 e 2004/101/CE in materia di scambio di quote di emissioni dei gas a effetto serra nella Comunità, con riferimento ai meccanismi di progetto del Protocollo di Kyoto”*. Tale decreto viene modificato ed integrato nel 2008 dai decreti legislativi 51 del 07 marzo 2008 e n. 257 del 30 dicembre 2010 per poter permettere alle attività di trasporto aereo di entrare nel sistema comunitario di scambio di quote di emissione.

Nel 2010 è stato promulgato il Decreto Legislativo del 13 agosto 2010 n. 155, in attuazione della Direttiva Europea 2008/50/CE *“relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa”*. Questo decreto, configurato come un vero e proprio Testo Unico contiene le definizioni di valore limite, valore obiettivo, soglia di informazione e di allarme, livelli critici, obiettivi a lungo termine e valori obiettivo.

Il decreto, inoltre, provvede ad individuare un elenco di inquinanti per i quali è obbligatorio il monitoraggio, (NO₂, NO_x, SO₂, CO, O₃, PM₁₀, PM_{2,5}, Benzene, Benzo(a)pirene, Piombo, Arsenico, Cadmio, Nichel, Mercurio, precursori dell'ozono). Vengono in più stabilite le modalità di trasmissione e i contenuti delle informazioni, sullo stato della qualità dell'aria, da inviare al Ministero dell'Ambiente.

In quest'ultimo provvedimento vengono individuate le regioni come autorità competenti per effettuare la valutazione della qualità dell'aria e per la redazione dei Piani di Risanamento della qualità dell'aria nelle aree nelle quali sono stati superati i valori limite. Sono sempre le Regioni che, ai sensi dell'art. 10 del decreto, devono predisporre anche i Piani di Azione per la riduzione del rischio di superamento dei valori limite, valori obiettivo e soglie di allarme. Vengono inoltre stabilite le modalità per la realizzazione o l'adeguamento delle reti di monitoraggio della qualità dell'aria (Allegato V e IX).

L'allegato VI del decreto contiene i metodi di riferimento per la determinazione degli inquinanti. Gli allegati VII e XI, XII, XIII e XIV riportano i valori limite, i livelli critici, gli obiettivi a lungo termine e i valori obiettivo rispetto ai quali effettuare la valutazione dello stato della qualità dell'aria.

Tab. 2.1. Valori limite per la protezione della salute umana, degli ecosistemi, della vegetazione e valori obiettivo secondo la normativa vigente (D.Lgs. 155/2010). (ARPAV, 2012).

Inquinante	Nome limite	Indicatore statistico	Valore
SO₂	limite per la protezione degli ecosistemi	media annuale e media invernale	20 µg/m ³
	Soglia di allarme*	superamento per 3 ore consecutive del valore soglia	500 µg/m ³
	limite orario per la protezione della salute umana	media 1 ora	350 µg/m ³ da non superare più di <u>24 volte</u> per anno civile
	limite di 24 ore per la protezione della salute umana	media 24 ore	125 µg/m ³ da non superare più di <u>3 volte</u> per anno civile
NO_x	limite per la protezione della vegetazione	superamento per 3 ore consecutive del valore soglia	30 µg/m ³
NO₂	soglia di allarme*	superamento per 3 ore consecutive del valore soglia	400 µg/m ³
	limite orario per la protezione della salute umana	media 1 ora	200 µg/m ³ da non superare più di <u>18 volte</u> per anno civile
	limite annuale per la protezione della salute umana	media annuale	40 µg/m ³
PM₁₀	limite di 24 ore per la protezione della salute umana	media 24 ore	50 µg/m ³ da non superare più di <u>35 volte</u> per anno civile
	limite di 24 ore per la protezione della salute umana	media annuale	40 µg/m ³
PM_{2,5}	valore obiettivo per la protezione della salute umana	media annuale	25 µg/m ³
CO	limite per la protezione della salute umana	max giornaliero della media mobile 8 ore	10 µg/m ³
Pb	limite annuale per la protezione della salute umana	media annuale	0.5 µg/m ³
BaP	valore obiettivo	media annuale	1.0 ng/m ³
C₆H₆	limite annuale per la protezione della salute umana	media annuale	5.0 µg/m ³

Tab. 2.2. Valori limite per la protezione della salute umana, degli ecosistemi, della vegetazione e valori obiettivo secondo la normativa vigente (D.Lgs. 155/2010). (ARPAV, 2012).

O₃	soglia di informazione	superamento del valore orario	180 µg/m ³
	Soglia di allarme	superamento del valore orario	240 µg/m ³
	obiettivo a lungo termine per la protezione della salute umana	max giornaliero della media mobile 8 ore	120 µg/m ³
	valore obiettivo per la protezione della salute umana	max giornaliero della media mobile 8 ore	120 µg/m ³ da non superare per più di <u>25 giorni</u> all'anno come media su 3 anni
	valore obiettivo per la protezione della salute umana	AOT40, calcolato sulla base dei valori orari da maggio a giugno**	18000 µg/m ³ da calcolare come media su 5 anni
	obiettivo a lungo termine per la protezione della vegetazione	AOT40, calcolato sulla base dei valori orari da maggio a giugno**	6000 µg/m ³ per ora
Ni	valore obiettivo	media annuale	20.0 ng/m ³
As	valore obiettivo	media annuale	6.0 ng/m ³
Cd	valore obiettivo	media annuale	5.0 ng/m ³

Il superamento della soglia deve essere misurato per 3 ore consecutive in un sito rappresentativo della qualità dell'aria in un'area di almeno 100 Km², oppure in un'intera zona o agglomerato nel caso siano meno estesi.

**Per AOT40 (espresso in µg/m³ per ora) e 80 µg/m³ in un dato periodo di tempo, utilizzando solo i valori orari rilevati ogni giorno tra le 8:00 e le 20:00, ora dell'Europa centrale.

2.1 SCALA REGIONALE - VENETO

Anche nella Regione Veneto l'attenzione di istituzioni ed opinione pubblica al tema di tutela e controllo della qualità dell'aria è molto sviluppata.

Negli ultimi anni la regione Veneto ha avuto cura di far evolvere un settore autonomo preposto al controllo delle fonti di inquinamento, alla regolamentazione degli obiettivi di qualità, alle rilevazioni e ai controlli da attuare.

Il traffico veicolare nei centri urbani, in particolare, ha raggiunto un tal rilievo ed attualità nell'attenzione dell'opinione pubblica, tanto da divenire assolutamente rilevante in sede locale.

Attorno a questi temi si è raccolta l'attenzione dell'amministrazione regionale del Veneto, che, consapevole della sempre maggiore rilevanza di questi, ha istituito delle specifiche regole d'ambito regionale, nella pianificazione, controllo e coordinamento.

Con delibera n. 902 del 4 aprile 2003 la Giunta Regionale ha adottato il Piano Regionale di Tutela e Risanamento dell'Atmosfera, Tale piano è stato infine approvato in via definitiva dal Consiglio Regionale con deliberazione n. 57 dell'11 novembre 2004 e pubblicato nel BURV n. 130 del 21/12/2004.

Nella strategia di sintesi di tale piano, viene delineato come il risanamento e la tutela della qualità dell'aria siano un obiettivo irrinunciabile ed inderogabile di tutte le politiche della Regione, a causa delle implicazioni che la qualità dell'aria può avere sulla salute dei cittadini e sulle sull'ambiente.

Secondo il Piano Regionale di Tutela e Risanamento dell'Atmosfera infatti lo sviluppo industriale e artigianale della regione ha portato ad un aumento della produzione di emissione di inquinanti. Per quanto riguarda le attività industriali, tuttavia, grazie ad una serie di misure di controllo attuate dagli anni 90 del secolo scorso, ad uso di materie prime meno inquinanti, tecniche di produzione e di combustione più pulite e l'adozione di sistemi di abbattimento, sono stati raggiunti dei buoni risultati di abbattimento degli inquinanti, nonostante esistano ancora zone o settori in cui sono necessari interventi e azioni di mitigazione più incisivi.

Sempre secondo il Piano, ad oggi il traffico è una fonte di emissione in crescita. L'adozione di questo Piano da parte della regione Veneto ha l'obiettivo di mettere a disposizione di Province, comuni, enti pubblici e privati cittadini un quadro aggiornato e completo della situazione attuale e di presentare una stima sull'evoluzione dell'inquinamento dell'aria nei prossimi anni (valutazione preliminare).

Con questo provvedimento, inoltre, la regione Veneto fissa delle linee guida da percorrere per raggiungere elevati livelli di protezione ambientale. Il Piano Regionale di Tutela e Risanamento dell'Atmosfera (PRTRA), rappresenta uno strumento di lavoro dinamico che delinea, tra l'altro, il quadro degli interventi che possono concorrere al raggiungimento di elevati livelli di protezione ambientale e del successivo nelle zone critiche.

Questo piano risulta quindi uno strumento dotato di dinamismo, configurando delle azioni di intervento atte a ridurre emissioni inquinanti per prevenire e contenere i superamenti dei valori limite e degli obiettivi di qualità fissati per taluni inquinanti, sia a breve che a medio e lungo termine (ARPAV e Regione Veneto, 2006).

2.2 SCALA REGIONALE – LOMBARDIA

Nel 1998 la regione Lombardia in collaborazione con la Fondazione Lombardia per l'Ambiente ha redatto il Piano Regionale per la qualità dell'aria, uno strumento che offriva una sintesi delle conoscenze sulle differenti tipologie di inquinanti atmosferici e sulle caratteristiche meteo-climatiche che ne condizionano la diffusione, necessari a supportare la futura politica di regolamentazione delle emissioni.

Questo Piano ha permesso di: ottenere una maggiore conoscenza del territorio in termini di emissioni permettendo così zonizzazione della regione, la conoscenza delle fonti di inquinanti, costruire una rete di monitoraggio, contestualizzare i riferimenti normativi, identificare gli indicatori necessari per impostare ed attuare piani e programmi per il miglioramento della qualità dell'aria e di definire le priorità di intervento nei principali settori responsabili dell'inquinamento.

Il 4 agosto 2005 la Giunta Regionale della Lombardia, con DGR n. 580, ha approvato il documento "Misure Strutturali per la Qualità dell'Aria in Regione

Lombardia - 2005-2010", con gli obiettivi di agire sulle diverse sorgenti di inquinamento atmosferico, individuare obiettivi di riduzione ed azioni da compiere, ed infine ordinarli in una sequenza di priorità in base al rapporto costo/efficacia.

Le azioni da compiere sono state poi suddivise in azioni a breve e medio periodo ed azioni a lungo periodo.

Le misure proposte per il breve e medio periodo riguardano:

- Emissioni da traffico veicolare;
- Emissioni da sorgenti stazionarie ed "off road";
- Risparmio energetico e uso razionale dell'energia (edilizia civile ed industriale, attività e cicli produttivi);
- Settori dell'agricoltura e dell'allevamento.

Le misure di lungo periodo sono invece rivolte a:

- Ricerca e sviluppo del "vettore energetico" idrogeno e delle infrastrutture per la produzione, il trasporto, lo stoccaggio;
- Sviluppo e diffusione delle "celle a combustibile".

L'11 dicembre 2006 è stata approvata la Legge n. 24/2006 "Norme per la prevenzione e la riduzione delle emissioni in atmosfera a tutela della salute e dell'ambiente" che si è inserita nel percorso di attuazione della normativa comunitaria e nazionale in materia di qualità dell'aria, andando a rafforzare l'impegno della regione Lombardia nell'attivazione di un quadro di programmazione e coordinamento per il raggiungimento dei livelli di qualità dell'aria fissati dalla CE a tutela della salute e dell'ambiente, tramite la riduzione dell'inquinamento con azioni integrate su tutte le sorgenti (breve-lungo periodo).

3 INQUADRAMENTO DELL'AREA DI STUDIO

3.1 LE CONDIZIONI METEO DELL'AREA IN ESAME

3.1.1 LA PIANURA PADANA

La situazione della Pianura Padana, protetta dai venti sinottici dalle Alpi al nord/nord ovest e dagli Appennini a sud, determina delle caratteristiche uniche di questa pianura.

Gli inverni sono caratterizzati da periodi prolungati di basse temperature, da regimi di vento a basse velocità (<0,2 m/s) e da inversioni di temperatura delle masse d'aria vicino al suolo. Queste condizioni ostacolano la dispersione degli inquinanti atmosferici e rendono la stagione invernale il periodo più inquinato dell'anno (Larsen et al., 2012).

3.1.2 L'AREA VENEZIANA

L'area veneziana, inserita in un contesto storico ed ambientale praticamente unico nel suo genere, si colloca all'estremità est della Pianura Padana nella costa del Mar Adriatico, ai margini di un'area estremamente industrializzata.

Il clima caratteristico dell'area veneziana presenta dei pattern stagionali, caratterizzati da inverni freddi (-5-7 °C) ed estati calde (25-31 °C). Le precipitazioni variano annualmente, ma i picchi vengono registrati in primavera ed autunno. I venti prevalenti sono da NNE o da SE dovuti alla brezze marine in estate, con venti che per la maggior parte spirano con una velocità che va dai 2 ai 4 m/s (Rampazzo et al., 2008a, Pecorari et al., 2013).

Durante le stagioni più fredde la tipica stabilità atmosferica e l'inversione termica causano la formazione di masse d'aria fredda al livello del terreno. La presenza di valori di umidità molto alti, permette la formazione di nebbie invernali ed autunnali, che impediscono la dispersione degli inquinanti.

Le temperature più alte durante il periodo estivo, al contrario, causano un innalzamento del Planetary Boundary Layer permettendo un maggior mescolamento e dispersione degli inquinanti.

Numerosi studi hanno permesso di appurare che la topografia locale, le condizioni meteorologiche, le emissioni naturali ed antropiche e i processi di

trasporto regionale hanno reso quest'area una delle maggiormente inquinate a livello europeo (Benassi et al., 2011; Carnevale et al., 2010; Lonati et al., 2010; Putaud et al., 2010; Marcazzan et al., 2003; Pecorari et al., 2013).

3.1.2.1 Le condizioni atmosferiche nell'area veneziana durante il periodo di campionamento

Il primo periodo di campionamento, nell'estate del 2011 (6 luglio - 28 luglio) inizia con un tempo buono e relativamente caldo, fino al giorno 3 quando le temperature si abbassano e fra il 4 ed il 5 si verificano episodi temporaleschi sparsi.

Dal 6 al 13 luglio ritornano le condizioni di tempo estivo, caldo e soleggiato, talvolta afoso nella pianura.

Tra il 13 ed il 14 vi è una temporanea interruzione di questa situazione a causa di un transito di una saccatura. In seguito il clima ritorna estivo, fino al giorno 17 luglio quando la circolazione generale tende a cambiare a causa di una bassa pressione sul mare del nord. In questa fase il tempo rimane caldo, nonostante sia presente una certa variabilità.

Con il passare dei giorni la saccatura si avvicina, fino ad interessare direttamente il Nord Italia tra il 23 ed il 24 luglio, quando la goccia fredda transita verso Sud, apportando un repentino calo termico accompagnato da un episodio pluvio-temporalesco, e da un ritorno della neve in montagna fino a 1800 m.

Tuttavia già dal 25 luglio la situazione tende al generale miglioramento che, alternata a qualche fenomeno di instabilità si protrarrà fino alla fine del periodo di campionamento (ARPAV 2012).

In figura 3.1 è riportata la sintesi dell'andamento delle condizioni meteo nel periodo estivo.

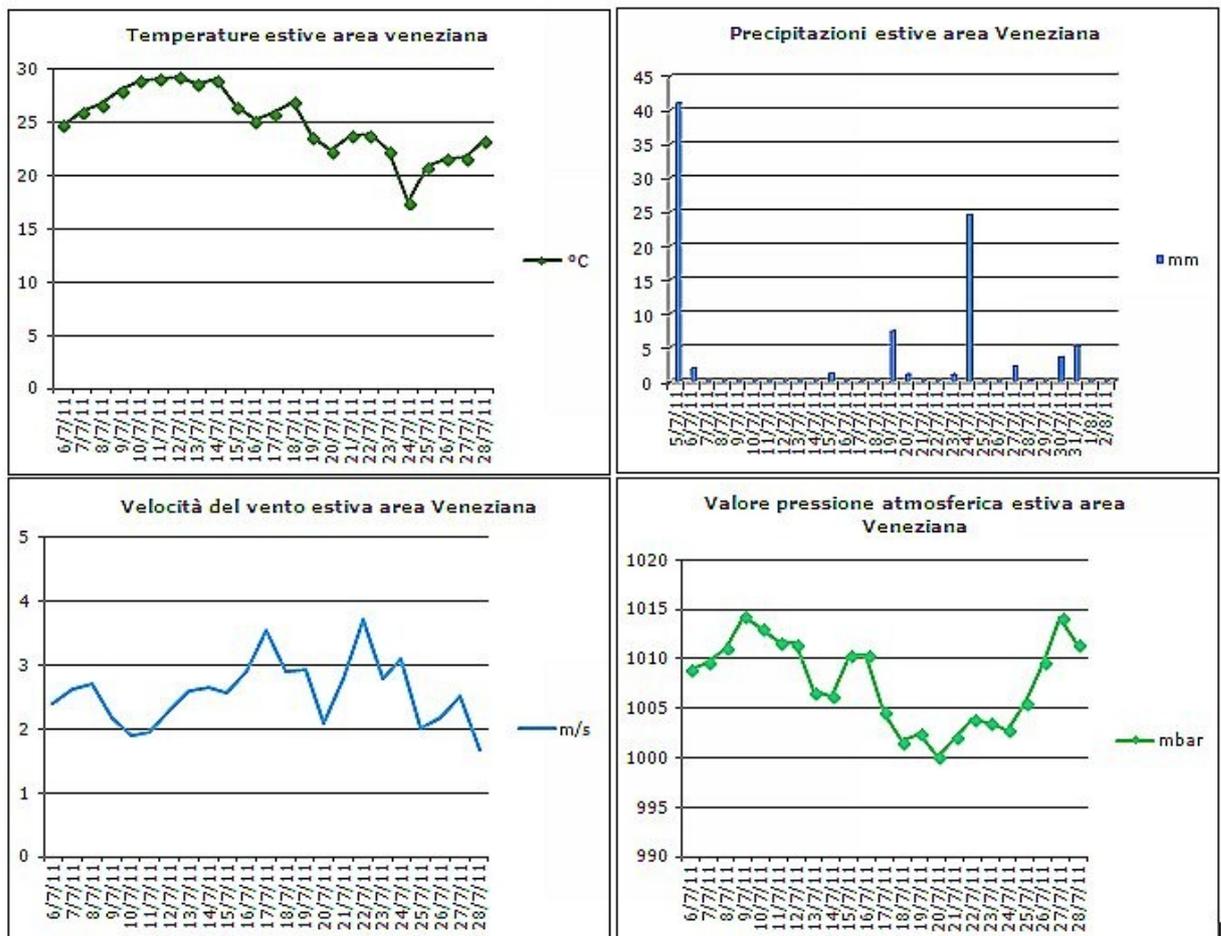


Fig. 3.1. Grafici che sintetizzano l'andamento delle condizioni meteo nel periodo estivo.

Il secondo periodo di campionamento, nell'autunno 2011 (5 ottobre - 27 ottobre) inizia con condizioni meteo molto soleggiate e piuttosto calde, fino al 7 di ottobre quando una saccatura atlantica provoca un breve episodio di maltempo che causa un calo termico di 10/12°C in 24 ore.

Successivamente fra il 10 e l'11 ottobre si ripresentano delle condizioni climatiche miti, anche caratterizzate da temperature atipiche per la stagione.

Tale situazione si mantiene fino al 18 ottobre quando si apre una breve parentesi di maltempo, con un conseguente calo termico.

In seguito il tempo migliora rapidamente, anche se rimane più fresco. Tra il 25 ed il 26 ottobre si presenta un episodio di forte maltempo con piogge diffuse. Dal 27 il meteo si ristabilisce fino alla fine del mese per l'affermarsi di un'alta pressione (ARPAV 2012).

In figura 3.2 è riportata la sintesi dell'andamento delle condizioni meteo nel periodo autunnale.

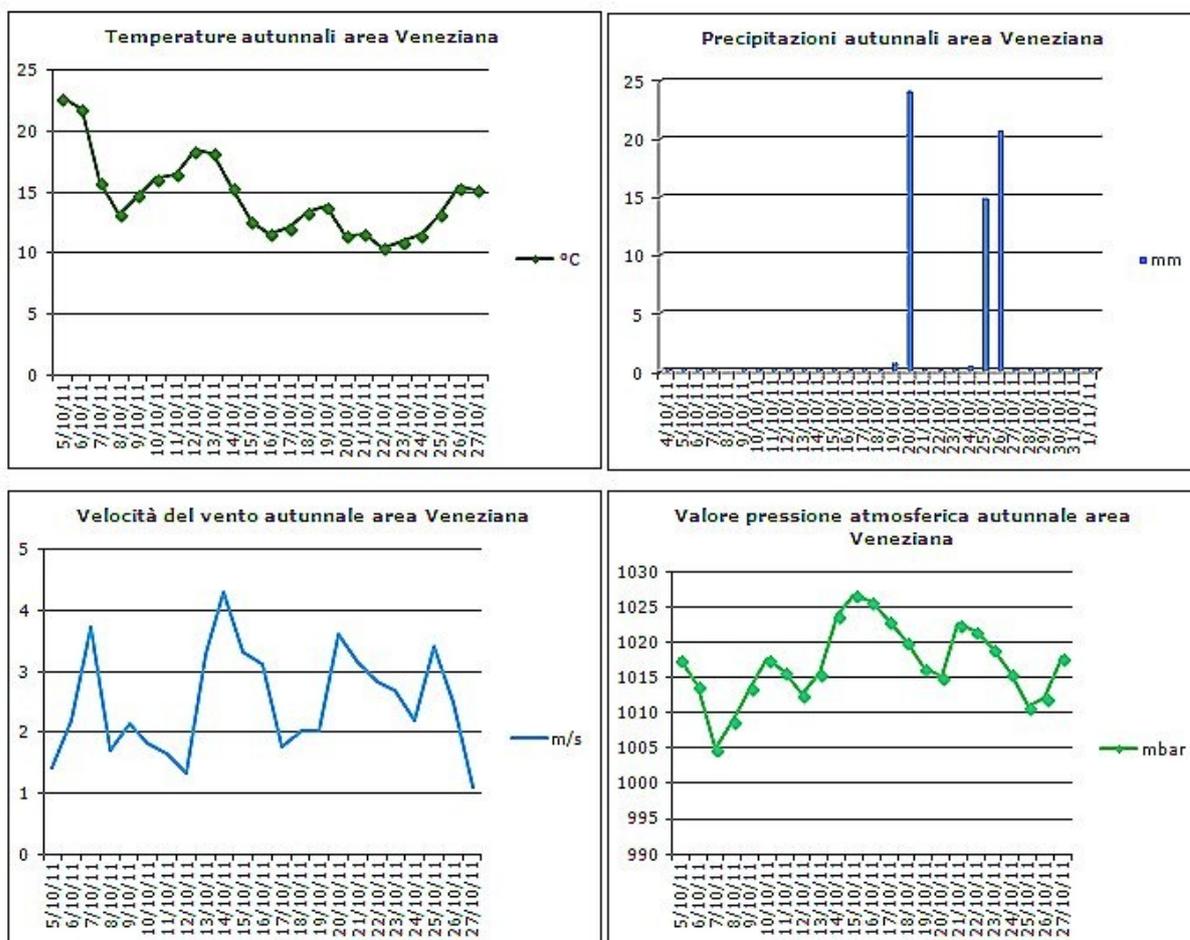


Fig. 3.2. Grafici che sintetizzano l'andamento delle condizioni meteo nel periodo autunnale.

Il terzo periodo di campionamento, nell'inverno 2012 (11 gennaio - 2 febbraio) si apre con un giornata soleggiata, caratterizzata da venti di Foehn che rendono la pianura sgombra dalla nebbia. Il tempo dall'11 al 13 diventa poi stabile senza vento e caratterizzato da una forte inversione. Il 14 vi è un breve momento di instabilità dovuto ad una saccatura sui Balcani. Tra il 15 ed il 19 il tempo si ristabilisce con giornate fredde caratterizzate da gelate notturne. Dal 18 si assiste ad un rialzo termico moderato provocato da correnti più miti. Fino al 27 il tempo si mantiene stabile grazie alla presenza di un'alta pressione.

Dal 25 al 26 si assiste all'arrivo di venti provenienti da est.

Dal 28 l'arrivo di una goccia fredda determina una variabilità che si mantiene fino alla fine del mese. I primi due giorni di febbraio sono caratterizzati dal freddo intenso e da venti molto forti (ARPAV 2013).

In figura 3.3 è riportata la sintesi dell'andamento delle condizioni meteo nel periodo invernale.

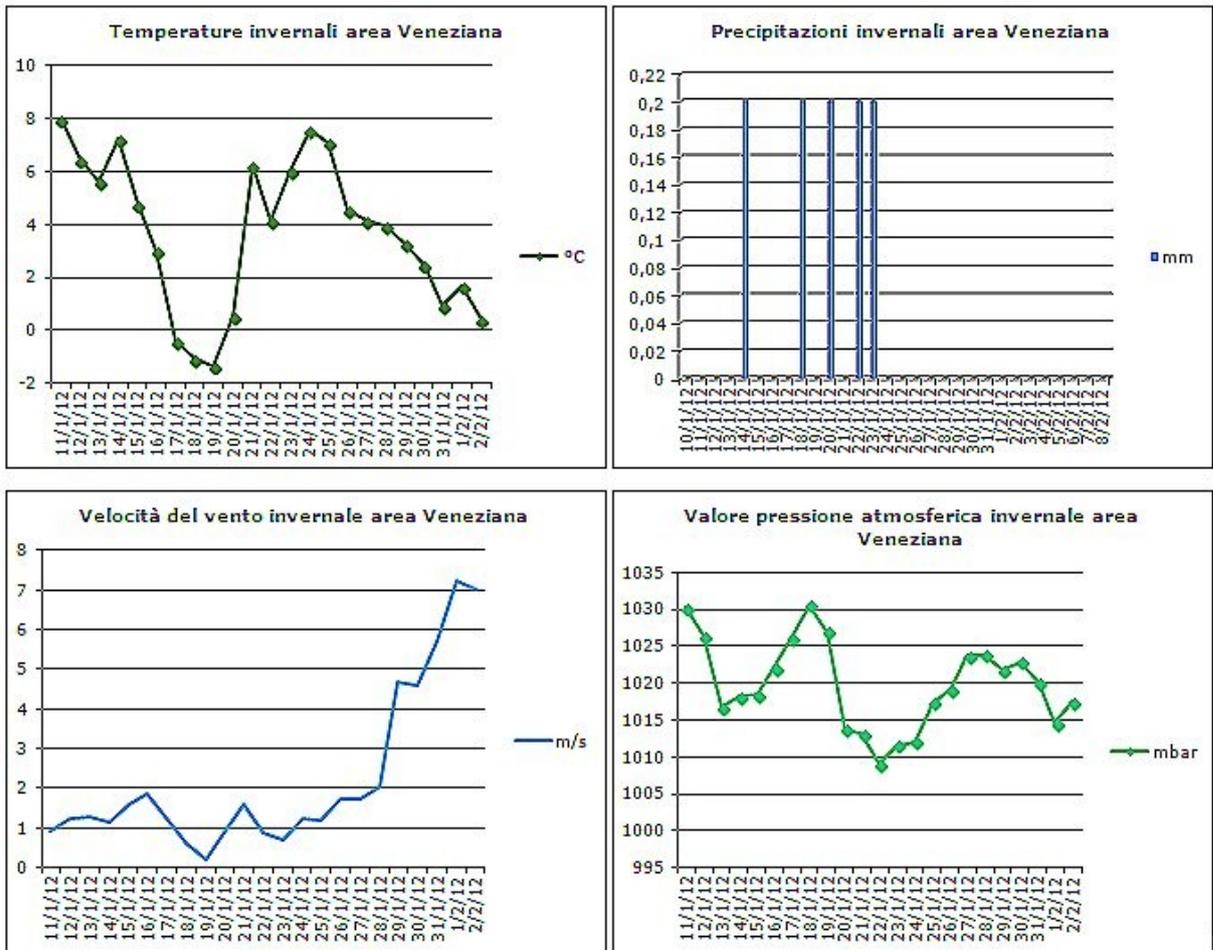


Fig. 3.3. Grafici che sintetizzano l'andamento delle condizioni meteo nel periodo invernale.

In questo periodo sono state rilevate le velocità del vento maggiori. Su queste, tramite l'impiego di WRPLOT sono state costruite le rose dei venti per avere una maggiore comprensione del fenomeno.

Come si può notare la direzione prevalente dei venti in quei due giorni è est-nord est tipico del vento di Bora.

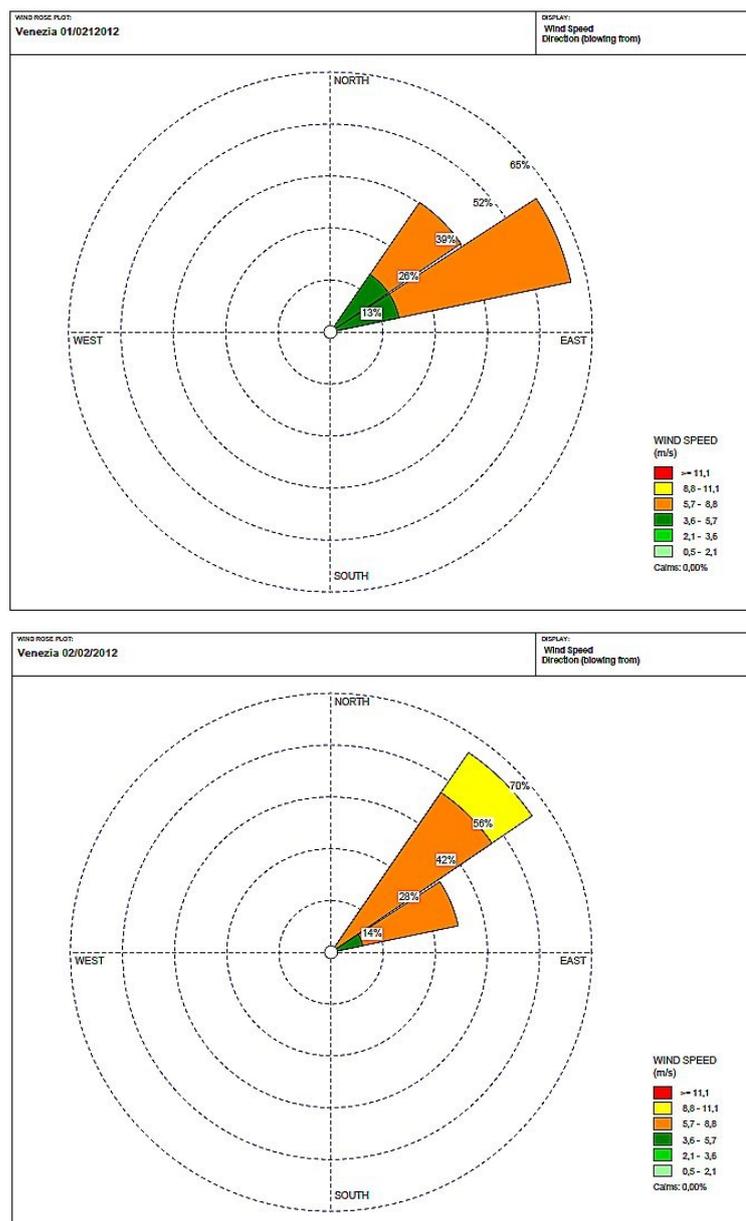


Fig. 3.4. Grafici della velocità e della direzione del vento nell'area veneziana del 1 febbraio 2012 e del 2 febbraio 2012.

Il quarto periodo di campionamento, nella primavera 2012 (28 marzo - 19 aprile) inizia con un tempo moderatamente stabile e bello fino al 2 aprile, quando si hanno i primi fenomeni nuvolosi, seguiti dalle prime perturbazioni dal 5 al 6 di aprile.

Il 7 si ha il passaggio di un nuovo fronte di perturbazione. Il 9, dopo una notte di cielo sereno si assiste ad un forte calo termico.

Il tempo tende a peggiorare fra il 10 e l'11 seguita da una fase di tempo variabile e freddo, il 24 si assiste ad una nuova fase di maltempo (ARPAV 2013).

In figura 3.5 è riportata la sintesi dell'andamento delle condizioni meteo nel periodo primaverile.

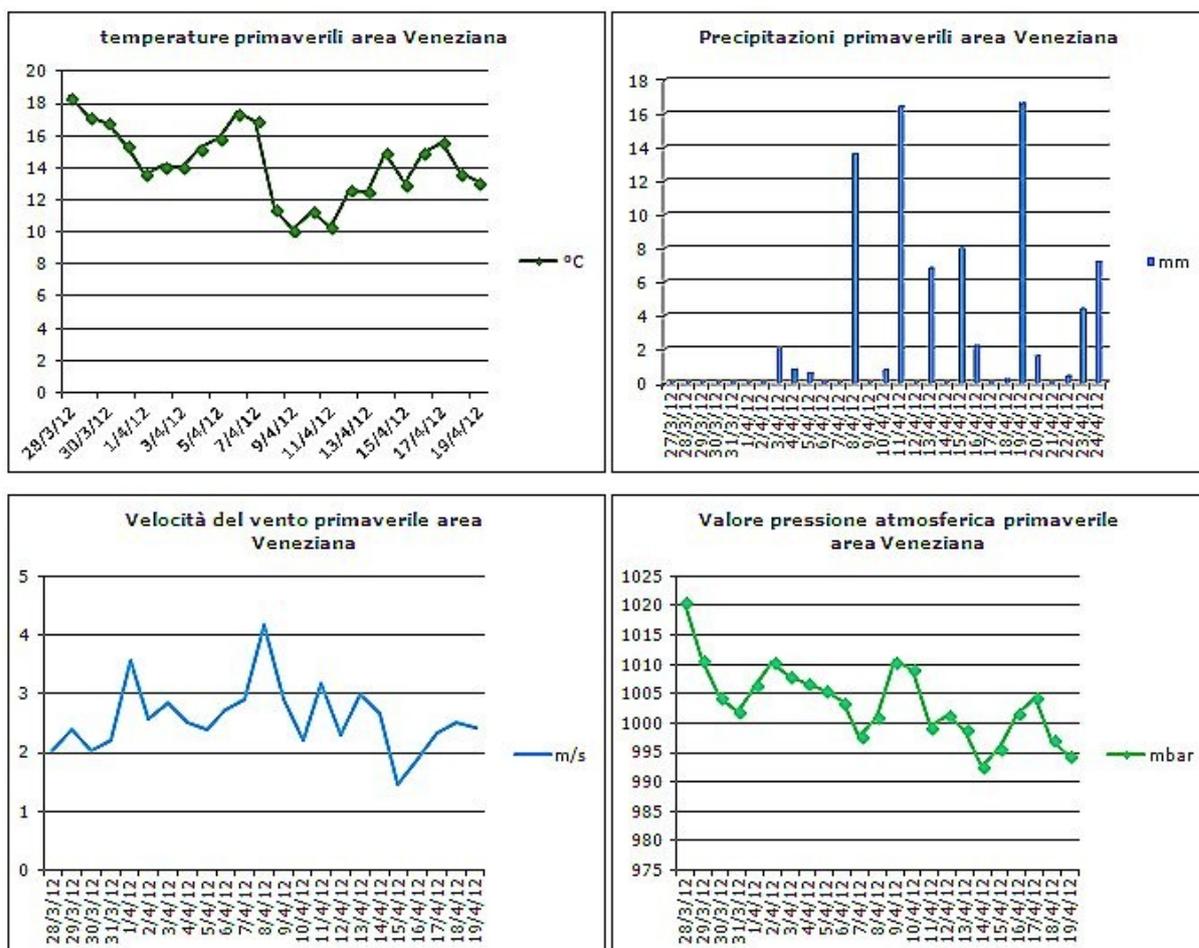


Fig. 3.5. Grafici che sintetizzano l'andamento delle condizioni meteo nel periodo primaverile.

3.1.3 L'AREA MILANESE

Il clima della pianura lombarda ha le caratteristiche del clima continentale, anche se risente dell'influenza del mar Mediterraneo. Questo risulta caratterizzato da inverni freddi e nebbiosi ed estati calde ed umide.

Il regime anemometrico, a causa della barriera naturale offerta dalle Alpi a nord e dagli Appennini a sud, risulta piuttosto basso specialmente in inverno.

Le precipitazioni medie annue solitamente presentano due picchi massimi, uno primaverile ed uno autunnale, (Marcazzan et al 2003b; Mariani, 1998; Canepa 2011).

3.1.3.1 Le condizioni atmosferiche nell'area della milanese durante il periodo di campionamento

Il primo periodo di campionamento, la cui sintesi meteo è riportata in tabella 3.6, nell'estate del 2011 (5 luglio - 2 agosto) è caratterizzata da una prima parte del mese di luglio piuttosto calda e stabile, particolare fra l'8 e l'11 quando le temperature hanno superato ripetutamente i 30°C di massima, interrotti da brevi, ma intensi, fenomeni temporaleschi nei giorni 7, 10 e 13.

Nella seconda parte del mese, la persistenza di una struttura ciclonica sull'Europa ha favorito condizioni più instabili e fresche sulla Lombardia. In particolare gli eventi temporaleschi più forti si sono registrati il 19, il 23, il 24 e il 27 con conseguente abbassamento delle temperature anche sotto la media stagionale.

Luglio, quindi ha presentato caratteri tardo-primaverili piuttosto che da piena estate: brevi periodi di stabilità, abbondanti precipitazioni, e temperature massime frequentemente sotto la media.

Agosto ha presentato, nella prima parte del mese, caratteri abbastanza simili al mese di luglio con temperature nella norma e precipitazioni sparse (ARPA Lombardia 2011).

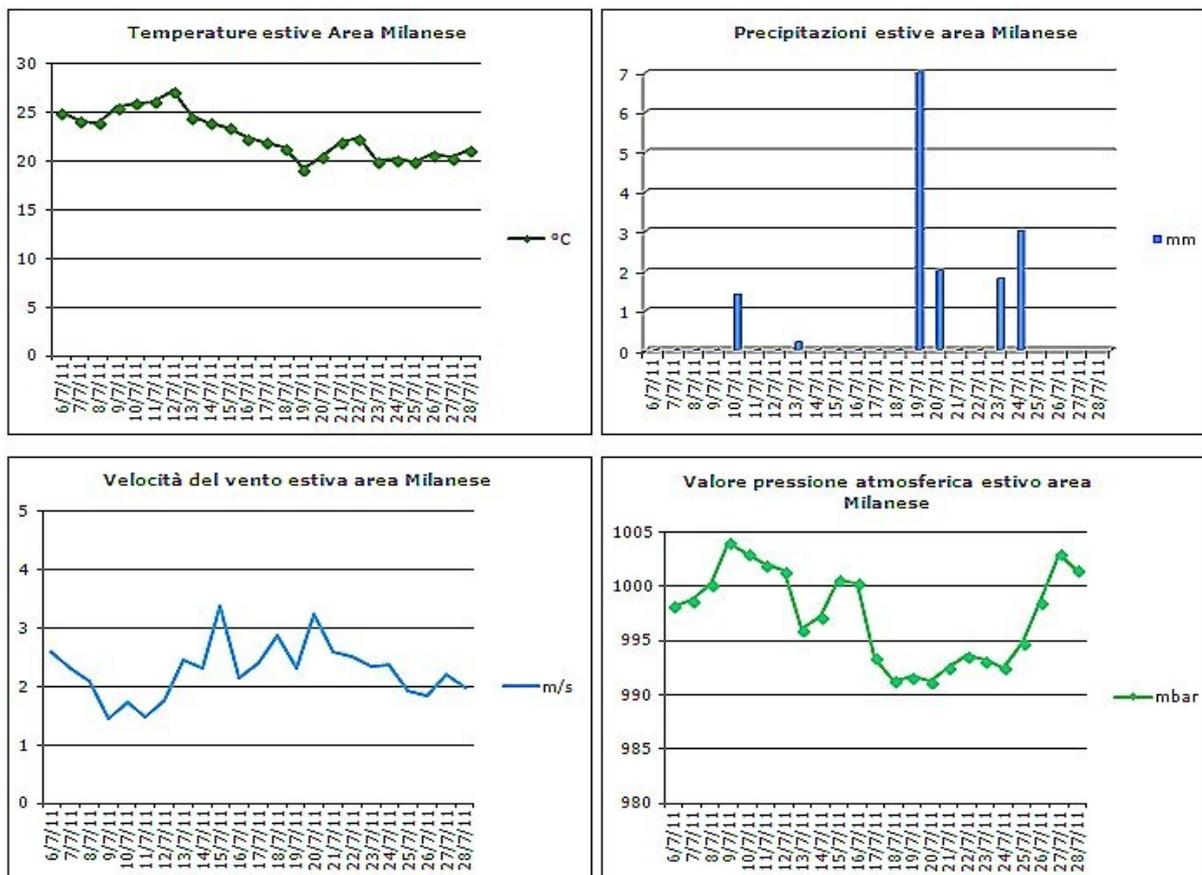


Fig. 3.6. Grafici che sintetizzano l'andamento delle condizioni meteo nel periodo estivo.

Il secondo periodo di campionamento, nell'autunno 2011 (4 ottobre - 1 novembre) è stato caratterizzato da una buona variabilità: ottobre si è aperto con un stabile regime anticiclonico, quasi estivo, ma un transito di un fronte freddo fra il 7 ed il 9 ha permesso un abbassamento delle temperature ed un passaggio a condizioni tipicamente autunnali. Nel complesso le temperature e le precipitazioni di ottobre sono risultate essere nella media con i valori attesi, anche se va segnalato un sistema depressionario nei giorni 24 e 25 che hanno portato forti piogge (ARPA Lombardia 2011).

In figura 3.7 è riportata la sintesi dell'andamento delle condizioni meteo nel periodo autunnale.

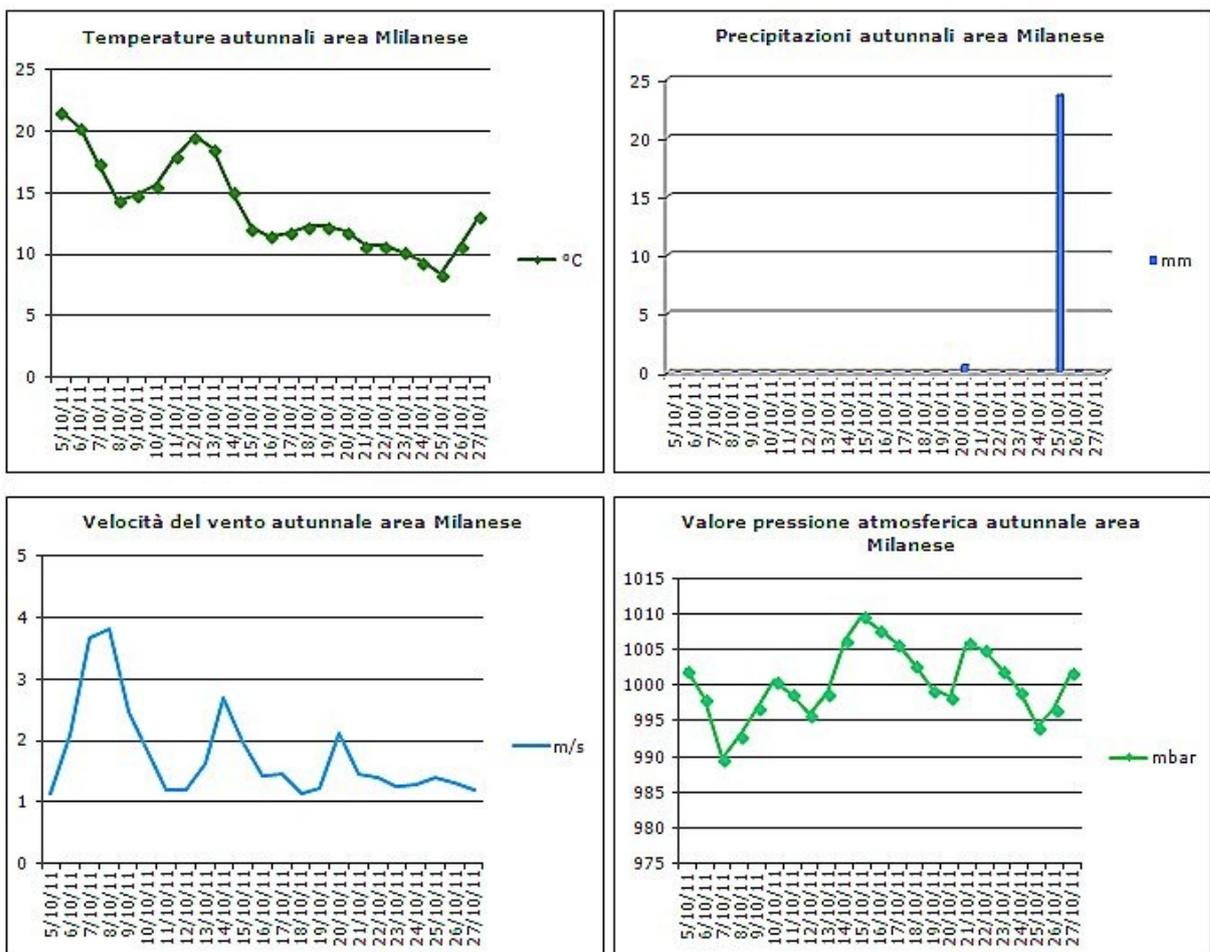


Fig. 3.7. Grafici che sintetizzano l'andamento delle condizioni meteo nel periodo autunnale.

Il terzo periodo di campionamento, nell'inverno 2012 (10 gennaio - 7 febbraio) si apre con temperature non eccessivamente rigide ed assenza di precipitazioni.

Ma già dal 14 gennaio le temperature scendono bruscamente accompagnate da un deciso calo della pressione atmosferica.

Dal 18 di gennaio in poi la situazione si ristabilisce, le temperature si alzano assieme alla pressione atmosferica.

Tuttavia si tratta solo di una fase momentanea, già dal giorno dopo la pressione atmosferica diminuisce, anche se le temperature non subiscono grossi cali. Il giorno 28, complice dei fenomeni piovosi che perdureranno fino alla fine del periodo in esame, la temperatura si riabbassa, fino al giorno 1 di febbraio dove raggiunge i valori minimi del periodo.

In figura 3.8 è riportata la sintesi dell'andamento delle condizioni meteo nel periodo invernale.

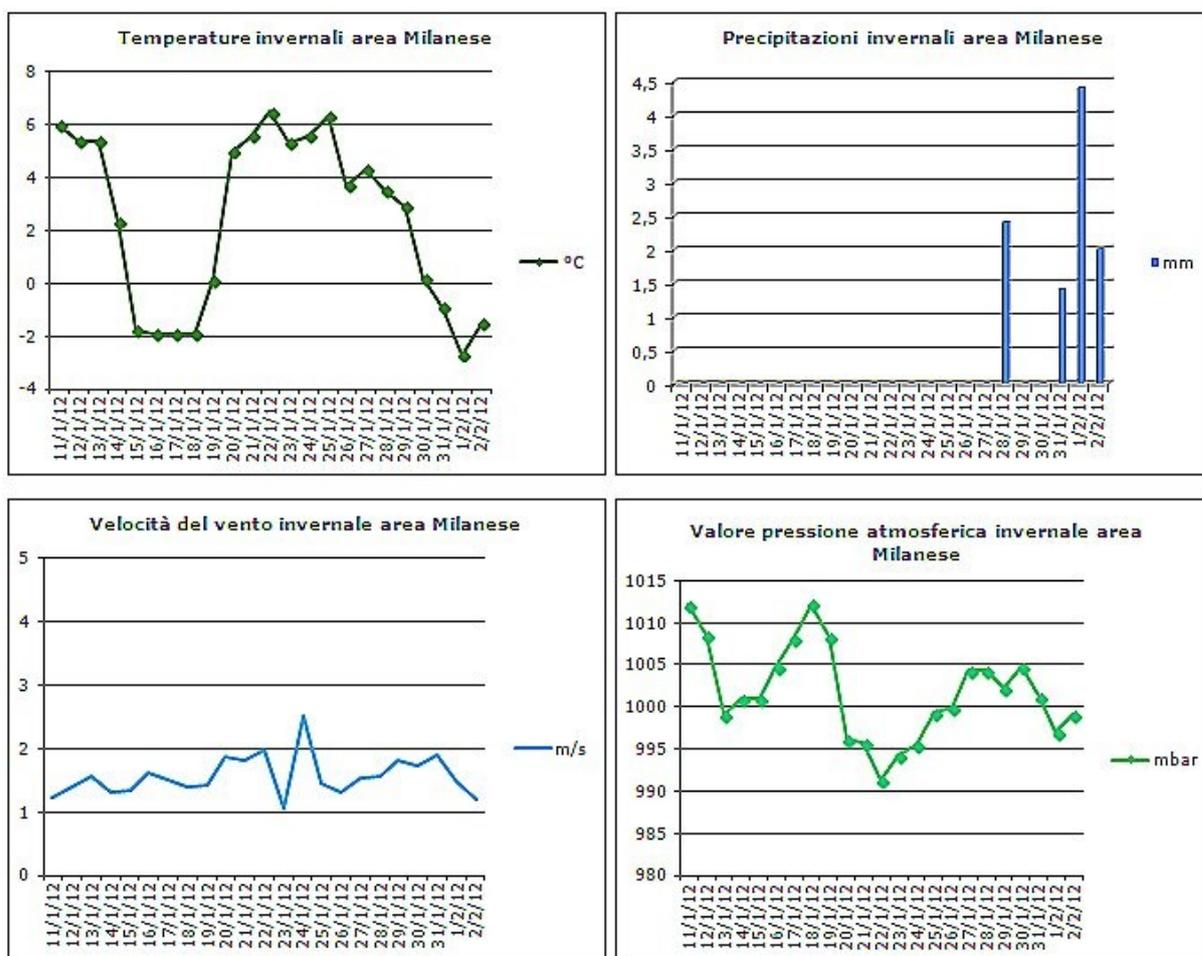


Fig. 3.8. Grafici che sintetizzano l'andamento delle condizioni meteo nel periodo invernale.

È noto che nell'area milanese la velocità del vento sia fra le più basse in Europa (Nordio et al., 2013), quindi gli effetti della bora non sono così intensi e la

velocità del vento nei giorni 1 e 2 febbraio 2012 non si discosta più di tanto dalla media.

La direzione del vento prevalente anche in questo caso è nord est anche se non mancano contributi dalla direzione sud e nord ovest.

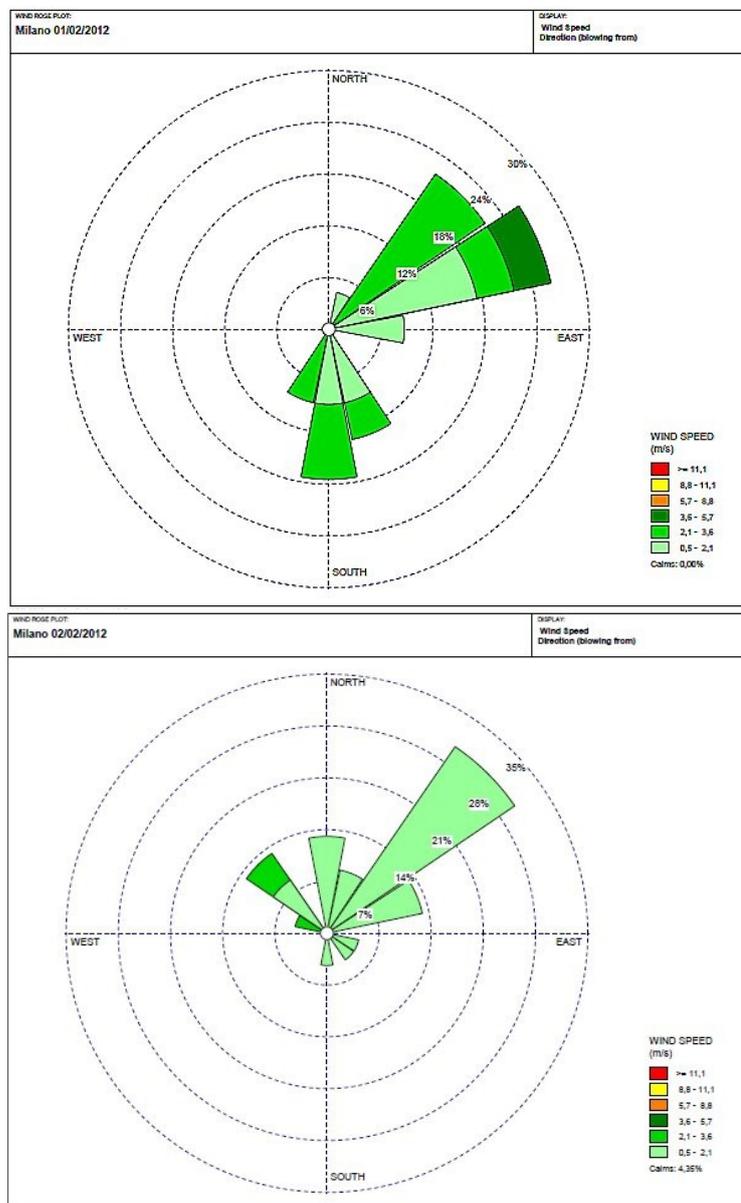


Fig. 3.9. Grafici della velocità e della direzione del vento nell'area veneziana del 1 febbraio 2012 e del 2 febbraio 2012.

Il quarto periodo di campionamento, nella primavera 2012 (27 marzo - 24 aprile) si apre con una situazione meteo caratterizzata da temperature miti, pressione piuttosto elevata assenza di precipitazioni. Questa situazione risulta ininterrotta fino al 30, quando un passaggio di fenomeni nuvolosi porta ad un abbassamento delle temperature.

Vi è assenza di precipitazioni fino al giorno 4 di aprile fino al giorno 8 si hanno condizioni instabili caratterizzate da piogge, pressioni più basse e temperature in deciso calo.

L'otto e il nove si assiste ad un innalzamento della pressione ed ad un momentaneo arrestarsi delle precipitazioni, anche se le temperature si mantengono basse. Dal 10 di aprile fino al 16 si assiste a sporadici fenomeni piovosi, che risultano essere particolarmente intensi nel giorno 11. I fenomeni piovosi perdureranno fino alla fine del campionamento, con temperature che, pur essendosi alzate non raggiungono i valori che presentavano inizialmente.

In figura 3.10 è riportata la sintesi dell'andamento delle condizioni meteo nel periodo primaverile.

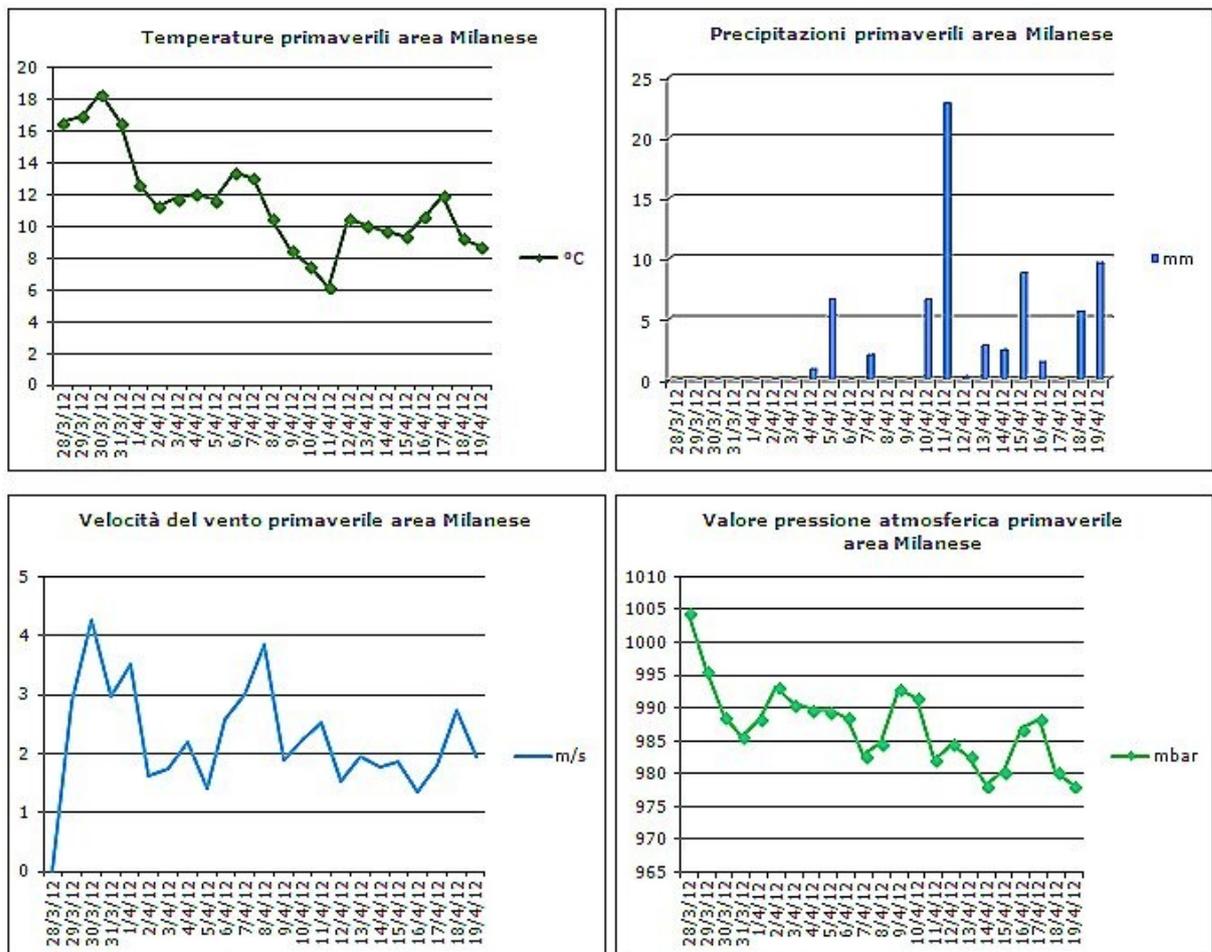


Fig. 3.10. Grafici che sintetizzano l'andamento delle condizioni meteo nel periodo primaverile.

3.2 LE CONDIZIONI DELL'INQUINAMENTO ATMOSFERICO

3.2.1 LA PIANURA PADANA

Con i suoi 19 milioni di abitanti la pianura padana è una delle aree più densamente popolate dell'intera Europa.

Un grandissimo numero di sorgenti di inquinamento generano un ambiente caratterizzato da alte concentrazioni di particolato atmosferico (PM). Le condizioni meteo climatiche e la particolare orografia, caratterizzata dalle Alpi a nord, nord ovest che proteggono dai venti sinottici e dagli Appennini a sud, ostacolano la dispersione degli inquinanti atmosferici come ozono ossidi di azoto e particolato atmosferico (Larsen et al., 2012; Masiol et al., 2012).

Queste condizioni, che perdurano soprattutto nei mesi invernali, fanno di quest'area uno dei siti maggiormente inquinati a livello europeo.

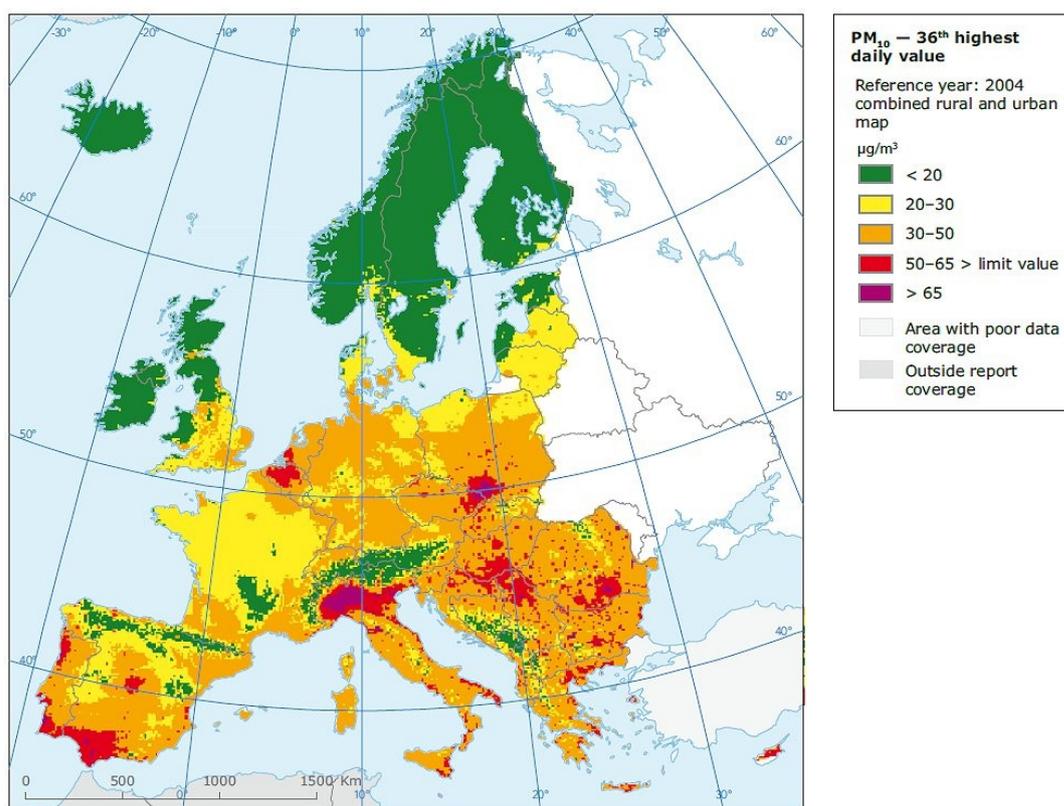


Fig.3.11. Mappa delle concentrazioni di PM₁₀ a livello europeo (EEA, 2007).

Come si può osservare dalla mappa in figura 4.11, che riporta le concentrazioni di PM₁₀ a livello europeo, la pianura padana è una delle aree che presentano le maggiori concentrazioni di polveri sottili.

3.2.2 L'AREA VENEZIANA

Tale area è caratterizzata da un ambiente lagunare tipico e di terraferma, in cui insistono aree prettamente naturali, aree urbane, siti storici e siti estremamente industrializzati.

Questa varietà di tipologie ambientali ed antropiche che si susseguono nel centro storico di Venezia, la sua laguna, il centro abitato di Mestre (270000 abitanti) e il distretto industriale di Porto Marghera configurano un complesso scenario di tipologie emissive caratterizzate da differenti tipologie di sorgente.

Il centro storico di Venezia, ad esempio, è influenzato dalle emissioni dell'industria tradizionale del Vetro Artistico di Murano (Rampazzo et al., 2008b) dal traffico marittimo, dalle operazioni di banchina. Altre sorgenti di emissioni sono state individuate nella zone urbane di terraferma, un cui esempio è la città di Mestre, e nella zona industriale di Porto Marghera nella quale sono presenti industrie chimiche e metallurgiche, raffinerie d'olio e centrali termoelettriche alimentate a carbone.

In più va considerata l'estesa e trafficata rete stradale ed autostradale presente nell'area in esame, gravata dal notevole traffico veicolare pesante (Rampazzo et al., 2008a).

Infine va ricorda l'apporto dello spray marino, dovuto alla prossimità dell'area veneziana alla laguna ed al mare Adriatico (Masiol et al., 2012).

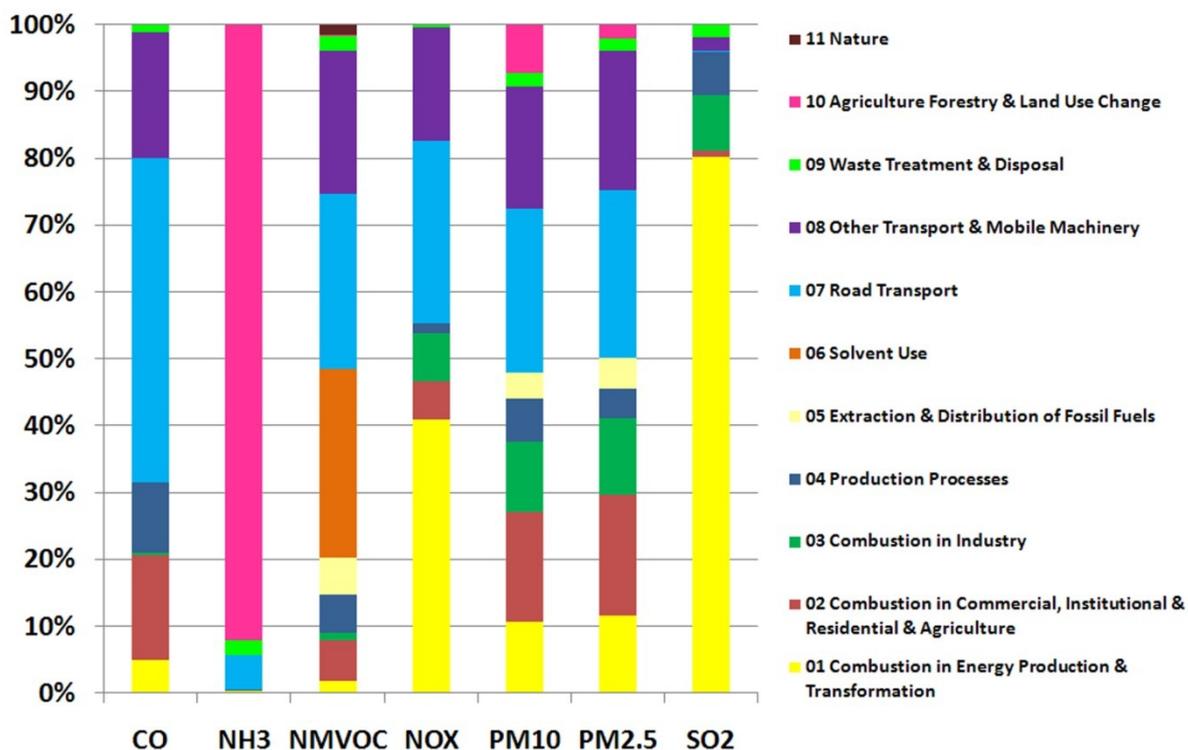


Fig. 3.12. Distribuzioni percentuali degli inquinanti primari rispetto alle sorgenti EMEP CORINAIR (Pecorari et al., 2013).

3.2.3 L'AREA MILANESE

Milano è una grande città sita al centro della pianura padana, che, come detto prima risulta essere un'area estremamente industrializzata ed urbanizzata. L'area milanese in particolare è caratterizzata da un'alta densità di popolazione e di sedi attività commerciali, da alta densità di traffico. È inoltre sede di molte attività industriali, quali centrali elettriche, raffinerie, inceneritori, industrie chimiche e metallurgiche. Tutto questo, assieme alle condizioni meteo e la topografia della città portano a dei seri problemi di inquinamento atmosferico, soprattutto durante la stagione invernale (Marcazzan et al., 2001).

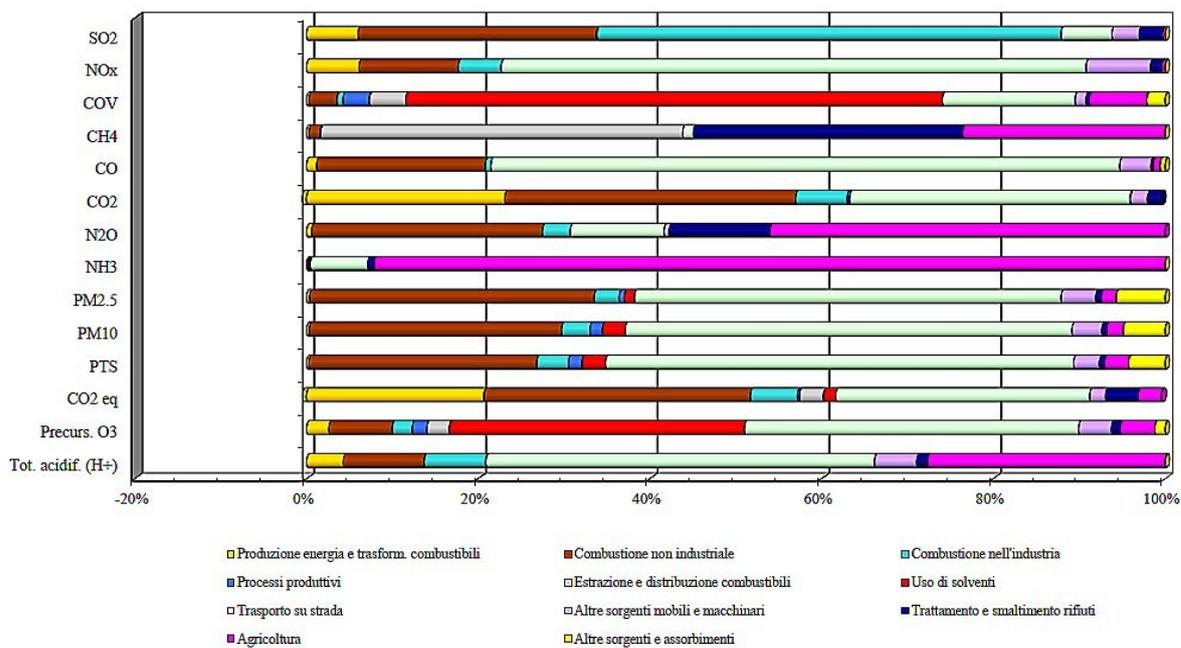


Fig. 3.13. Inventario delle Emissioni in Atmosfera della Provincia di Milano, contributi percentuali (ARPA Lombardia 2012).

4 STRATEGIE E SITI DI CAMPIONAMENTO

4.1 SITI DI CAMPIONAMENTO

Nell'ambito di questo lavoro di ricerca sono stati selezionati quattro siti di campionamento uno in area Milanese e tre nell'area Veneziana.

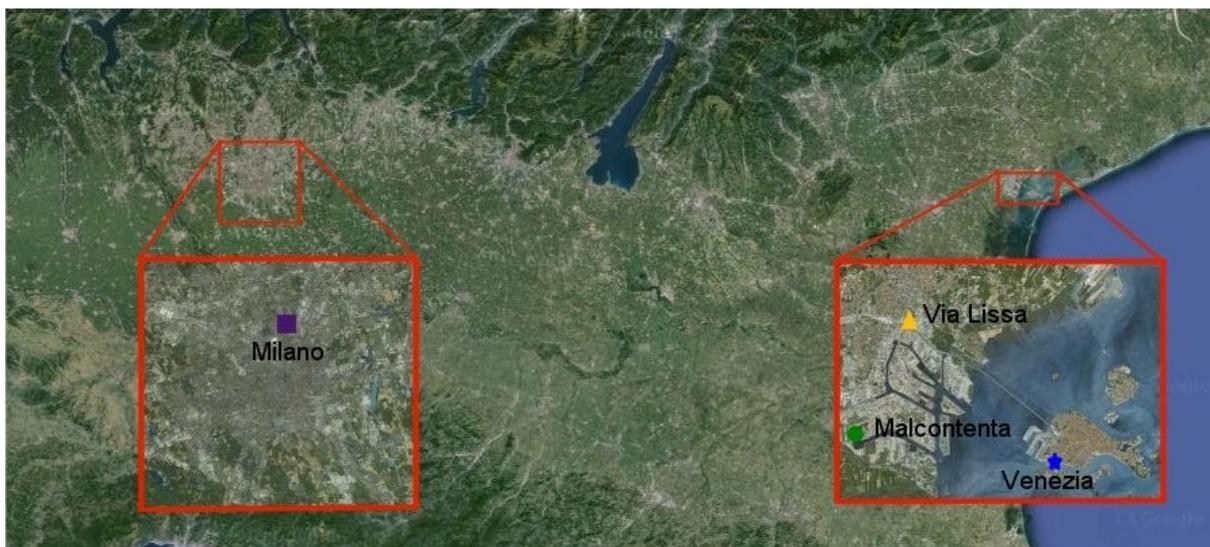


Fig. 4.1. Siti di campionamento.

- Mestre, via Lissa: sito posto nel centro urbano della città presso la sede dell'ARPAV. È considerato un sito di traffico urbano, proprio in prossimità della tangenziale (Squizzato, 2011);
- Venezia, San Sebastiano: sito di background urbano a sud-ovest della città (ARPAV, 2011);
- Malcontenta: sito ad ovest del centro storico di Venezia, in via Lago di Garda, adiacente a una strada. È considerato un punto di ricaduta di composti chimici industriali provenienti dal polo industriale di Porto Marghera; la centralina è classificata come IS, stazione industriale situata in zona suburbana (ARPAV, 2012);
- Milano, via Roberto Cozzi: il sito si trova nella zona a nord-est della città; è considerata una stazione di traffico situata in zona urbana.

Sono stati poi selezionati quattro periodi rappresentativi delle stagioni, distribuiti negli anni 2011 e 2012:

- Estate 2011: (5/07/2011-2/08/2011),
- Autunno 2011: (5/10/2011-27/10/2011),
- Inverno 2012: (11/01/2012-02/02/2012),
- Primavera 2012: (28/03/2012-19/04/2012).

4.2 STRATEGIA DI CAMPIONAMENTO PER LA DETERMINAZIONE GRAVIMENTRICA

La strategia di raccolta dei campioni impiegati per la determinazione gravimetrica della massa di PM₁₀ è quella indicata nella norma EN 12341 1999 "*Air quality. Determination of the PM10 fraction of suspended particulate matter. Reference method and field test procedure to demonstrate reference equivalence of measurement methods*" e dalla D.Lgs. n. 155/2010 "*Attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa*".

Seguendo le indicazioni riportate in queste norme il campionamento è stato impostato in cicli di 24 ore per ciascun filtro con un flusso di 16,76 L min⁻¹: l'aria passa attraverso una testa che raccoglie particelle di diametro aerodinamico minore o uguale a 10 µm con un flusso costante di aria. I filtri utilizzati vengono condizionati sia prima che dopo il campionamento secondo i parametri stabiliti da tali normative: 48 ore di condizionamento a 20 °C con umidità relativa del 50%.

La massa del particolato raccolto su ogni filtro viene poi determinata per via gravimetrica (tramite bilancia automatica con climat cabinet Sartorius Microbalance, precisione di 1 µg) ossia per differenza tra il peso del filtro prima e dopo il campionamento in una stanza condizionata, tale da mantenere temperatura e umidità relativa costanti (T = 20°C; UR = 50%).

Tutte le operazioni di condizionamento e pesatura dei filtri vengono svolte all'interno della camera pesate dell'ARPA Veneto.

La raccolta dei campioni di PM₁₀ destinati alla determinazione gravimetrica avviene tramite campionatori sequenziali automatici, il filtro utilizzato per la raccolta è un filtro in fibra di quarzo (Whatman QM-A Ø 47 mm).

La scelta di questo materiale è dovuta alla sua minor sensibilità all'umidità, che permette una stabilità maggiore delle pesate, e una sua minor suscettibilità all'intasamento che porta ad un blocco del campionamento.

4.3 STRATEGIA DI CAMPIONAMENTO PER LA DETERMINAZIONE DELLE POPOLAZIONI BATTERICHE E PER L'ANALISI DELLE SPECIE CHIMICHE.

I campioni destinati alle determinazioni chimiche e delle popolazioni batteriche sono stati raccolti nella frazione granulometrica del PM₁₀ (siti di: Milano, Malcontenta, Via Lissa) e del Particolato Totale Sospeso, TSP, (Venezia Centro Storico) impiegando, come nel caso dei campioni destinati all'analisi gravimetrica, dei filtri in fibra di quarzo (Whatman QMA Ø 15 cm e 10 cm)

In letteratura, per la raccolta di materiale destinato alle analisi della popolazione batterica, sono indicate svariate modalità di campionamento (impiego di campionatori ad impatto, campionatori alto volume e basso volume) (Douwes et al., 1995; Lee e Kim, 2003; Boreson et al., 2004; Després, 2007; Menetrez et al., 2007).

Nel caso vengano utilizzate membrane filtranti in bibliografia è noto l'impiego di supporti in teflon, fibra di quarzo, cellulosa nitrato, fibra di vetro (Lee e Kim, 2003; Boreson et al., 2004; Heinrich et al., 2006; Merrill et al., 2006; Després et al., 2007; Menetrez et al., 2007).

In questa campagna di campionamento si è preferito l'impiego di filtri in fibra di quarzo, poiché da esperienze pregresse del laboratorio di biologia molecolare dell'Università Bicocca di Milano si è riscontrata una difficoltà di estrazione del genoma batterico dalla matrice in teflon, mentre è risultata essere più agevole l'estrazione dalla fibra di quarzo.

La strategia di prelievo del particolato atmosferico è stata impostata su cicli di campionamento di 24 ore, con un flusso di 500 L min⁻¹ (stazioni di Via Lissa e Malcontenta) e di 250 L min⁻¹ (stazione di Venezia e di Milano), a seconda dello strumento campionatore impiegato.

Su questi campioni, oltre alle determinazioni chimiche, sono state effettuate le indagini di biologia molecolare, che per loro natura necessitano di particolari pretrattamenti, conservazione e divisione del supporto filtrante su cui sono state campionate le polveri atmosferiche.

Prima del campionamento il filtro è stato sterilizzato mediante l'impiego di lampade UV, esponendo alla luce ambo i lati per mezz'ora. Una volta sterilizzati i filtri sono stati avvolti in un sacchetto di plastica e successivamente in un foglio di alluminio sterilizzati.

Una volta completato il ciclo di campionamento di 24 ore il filtro va riposto, con le dovute accortezze, in una Petri sterile per poi essere conservato a -20°C fino al momento della preparazione alle diverse tipologie di analisi.

Nei periodi di campionamento sono stati raccolti stati raccolti 119 campioni destinati alle determinazioni chimiche e delle popolazioni batteriche. In tabella 4.1 sono riportati il numero di campioni raccolti e la granulometria per sito di campionamento.

Tab. 4.1. Tipologia e numero di campioni per sito di campionamento

Stagione	PM ₁₀			TSP
	Via Lissa	Malcontenta	Milano	Venezia
Estate	8	7	8	-
Autunno	8	8	8	8
Inverno	8	8	8	8
Primavera	8	8	8	8
Totale	32	31	32	24

Nel sito di Malcontenta è stato raccolto un campione in mano durante la stagione estiva a causa di un blocco dello strumento campionatore, mentre nel sito di Venezia centro storico il campionamento è partito nella stagione autunnale a causa del mancanza dello strumento nella stagione estiva.

5 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni, impiegando le dovute cautele per impedirne la contaminazione esterna, dopo il campionamento sono stati divisi in due parti uguali, una parte destinata alle determinazioni chimiche ed una parte destinata alle determinazioni microbiologiche.

5.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LE DETERMINAZIONI MICROBIOLOGICHE

La porzione del filtro destinata alle determinazioni del DNA batterico è stata inviata presso l'università di Milano Bicocca.

In questa sede il campione è stato ridotto in piccole parti sotto cappa a flusso laminare. Questa preparazione è necessaria alla successiva estrazione del DNA impiegando un kit commerciale (Fast-DNA[®] spin kit for soil, MP Biomedicals) con procedura opportunamente modificata per poter procedere all'estrazione del campione dalla matrice del filtro.

Il DNA così estratto viene poi amplificato con l'impiego della PCR con primers e barcodes noti che permetteranno il riconoscimento dei frammenti DNA.

5.1.2 IL GENE 16S rRNA.

La determinazione delle popolazioni batteriche è stata effettuata mediante l'amplificazione della regione ipervariabile V5-V6 del gene 16S rRNA (Baker et al., 2003; Cleasson et al. 2010).

Da sempre gli studiosi sentono la necessità dell'assegnazione del nome scientifico agli organismi viventi.

Questo nel campo microbiologico, è valido soprattutto nel campo clinico dove la rapidità e la precisione dell'identificazione di un agente eziologico, che potrebbe causare patologie talvolta infettive, le associazioni patologiche dell'agente stesso e il possibile trattamento antimicrobico sono di assoluta rilevanza.

Prima dell'avvento delle tecniche di biologia molecolare, il metodo impiegato nella determinazione dell'agente patologico consisteva nel paragonare l'accurata descrizione morfologica e fenotipica dell'isolato da identificare con una simile

descrizione del tipo di ceppi o di ceppi tipici presenti in manuali di riferimento standard o con i riferimenti pubblicati da centri di ricerca medica o microbiologica, come il Centers for diseases control and prevention o l'American Type Culture Collection (ATCC).

Questi enti o le pubblicazioni fornivano delle tabelle descrittive che riassumevano le caratteristiche di ogni specie di batteri che venivano confrontate con i risultati ottenuti dai laboratori.

Molto spesso non vi era completa sovrapposizione fra quello che si osservava in laboratorio e le descrizioni date: è da tener infatti presente che una minima variazione delle condizioni colturali può avere forti ripercussioni sulla texture di una colonia da identificare. Persino con l'avvento dei computer e di programmi che potevano aiutare nell'identificazione, i risultati potevano essere estremamente variabili da laboratorio a laboratorio.

Durante gli anni ottanta del secolo scorso in svariati laboratori si dimostrò che la relazione filogenetica fra le varie forme di vita, poteva essere determinata paragonando una parte stabile del codice genetico: si cominciarono così a sviluppare dei nuovi metodi di determinazione tassonomica delle forme di vita batteriche.

Nel caso dei batteri la parte del codice genetico ritenuta più stabile e quindi adatta a questo tipo di analisi è stata individuata nei geni che codificavano il 5S, il 16S e il 23 S che codificano per l'rRNA ribosomiale (rRNA).

Al giorno d'oggi il 16S rRNA è il gene maggiormente impiegato nelle determinazioni tassonomiche e delle affinità di un ampio range di taxa di batteri. (Clarridge 2004, Baker et al., 1999; McInnery et al., 1995), ed è considerato un potente strumento per poter valutare la somiglianza o la differenza genetica di campioni ambientali (Baker et al., 2001, 2003).

L'analisi, previa amplificazione PCR, del gene 16S rRNA di organismi che sono al momento non coltivabili in laboratorio ha permesso di poter condurre indagini sulle strutture di comunità di ceppi, adattati a condizioni di vita estreme, praticamente impossibili da riprodurre in un laboratorio.

Come detto precedentemente è noto che il gene 16S rRNA sia una dei componenti meglio conservati delle cellule: nel corso dell'evoluzione ha subito ben poche variazioni a causa delle sue caratteristiche funzionali.

Solitamente, infatti, dopo la trascrizione non viene tradotto in proteina, ma assume una struttura secondaria di costruzione del ribosoma. L'assunzione di una specifica forma tridimensionale induce un basso tasso di mutazione poiché la maggior parte di quest'ultime che avvengono a carico del 16S rRNA producono ribosomi non funzionanti, che non vengono trasmessi alla progenie.

Nella sequenza del gene 16S rRNA sono state individuate diverse regioni:

- regioni conservate universali: cioè quelle che hanno la stessa sequenza in tutti i batteri,
- regioni semiconservate: hanno sequenza uguale tra batteri dello stesso taxon,
- regioni variabili: hanno la stessa sequenza fra batteri della stessa specie.

Confrontando la sequenza di questo gene in diversi batteri è possibile:

- quantificare la distanza filogenetica al fine di determinare a che punto dell'evoluzione due microorganismi si sono differenziati,
- determinare la diversità dei microrganismi,
- identificare un batterio: se due organismi hanno un gene 16S rRNA con più del 97% di basi omologhe, essi appartengono alla stessa specie (Carraro, 2010).

5.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LE DETERMINAZIONI CHIMICHE

5.2.1 TRATTAMENTO PER IEC (cromatografia a scambio ionico)

La metodologia di preparazione per successiva analisi in IEC, ha interessato diverse fasi:

- La porzione di filtro destinata alla determinazione delle specie chimiche è stato tagliato a metà utilizzando delle forbici con la lama in ceramica;
- Una delle due metà è stata pesata tramite l'impiego di una bilancia analitica (Gibertini);
- La metà pesata (un quarto di filtro) viene inserita in un beaker a cui si aggiungono 20 mL di Acqua MilliQ[®] (resistività 18 M Ω cm) e sottoposta ultrasuoni per 60 minuti per estrarre gli ioni solubili in acqua dalla matrice.

5.2.2 TRATTAMENTO PER ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) E ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

La porzione rimanente del filtro è stata destinata all'analisi degli elementi maggiori ed in traccia tramite l'utilizzo della strumentazione ICP-MS e ICP-OES. Per poter procedere all'analisi del campione è necessario disgregare la matrice solida del filtro, sulla quale è depositata la polvere campionata. Per la dissoluzione dei campioni è stato scelto il sistema di digestione a microonde MDR (Microwave Digestor Rotor) Ethos 1600 - Milestone[®] che sfrutta le microonde come fonte di calore.

Il processo di riscaldamento da parte delle microonde agisce sia sulla polvere del filtro che sulla soluzione acida di trattamento. Le microonde non agiscono solamente sulla miscela di digestione, ma vengono anche assorbite dalle molecole del campione e questo aumenta l'energia cinetica della matrice e causa un riscaldamento interno ed una polarizzazione differenziale che provoca espansione, agitazione e rottura degli strati superficiali del materiale solido, esponendo le superfici libere all'attacco degli acidi (Jarvis et al., 1992; Squizzato, 2011).

Per quanto riguarda i filtri da 100 mm è stato mineralizzato un quarto di filtro, mentre per quanto riguarda i filtri da 150 mm è stato mineralizzato 1/8 del supporto filtrante.

La miscela acida impiegata nella mineralizzazione dei campioni in analisi è composta da HNO_3 (6 mL), H_2O_2 (2 mL) e HF (0.5 mL) (Karthikeyan et al., 2006).

I contenitori chiusi impiegati durante il processo di disgregazione sono in Teflon TFM (tetrafluorometilene), caricati al carbonio. La scelta di questo materiale deriva da alcune sue caratteristiche, tra cui la trasparenza alle microonde, il fatto che sia inerte all'azione degli acidi anche per temperature superiori a 230 °C e che presenti un'elevata resistenza alle alte pressioni ed alla rottura (Brunelli, 2009, Squizzato, 2011).

Al termine della disgregazione, la soluzione ottenuta viene successivamente portata al volume di 25 mL, filtrata e raccolta in boccette di teflon.

5.2.3 LIMITI DI RILEVABILITÀ

In questo lavoro le analisi dei campioni sono state effettuate tramite metodo comparativo: vi è cioè la necessità di calibrazione mediante una soluzione standard, dalla quale si risale poi all'effettiva concentrazione degli elementi chimici di interesse.

Per ciascun metodo, al fine sia di esprimere in modo corretto un risultato di un'analisi chimica, che di caratterizzare adeguatamente il procedimento scelto, è necessario conoscere i rispettivi limiti di rilevabilità o LOD (limit of detection).

Il limite di rilevabilità viene definito come *"la minima concentrazione da cui si possa dedurre con ragionevole certezza statistica la presenza dell'analita"* (Istituto Superiore di Sanità, 2001)

Il limite di rilevabilità viene determinato moltiplicando per tre la deviazione standard (3σ) del valore medio dei bianchi campo. Quando viene registrato un segnale maggiore di LOD, possiamo affermare l'esistenza dell'analita nel campione. (Brunelli 2009)

Le tabelle riportate in seguito (tab 5.1- 5.12) riportano i LOD, espressi in μg assoluti per le analisi svolte in cromatografia a scambio ionico (IEC), in ICP-MS e in ICP MS nelle diverse stazioni di campionamento.

Tab. 5.1. Limiti di rilevabilità di anioni e cationi estivi analizzati con la cromatografia a scambio ionico Dionex 500.

μg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Milano
Na^+	48,3	26,1	23,1
NH_4^+	-	-	0,00
Mg^{2+}	7,14	8,95	2,75
Ca^{2+}	24,1	245	26,1
Cl^-	1,91	-	5,97
NO_3^-	-	0,29	0,10
F^-	2,68	0,43	3,83

Tab. 5.2. Limiti di rilevabilità di anioni e cationi autunnali analizzati con la cromatografia a scambio ionico Dionex 500.

µg ass.	Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
Na ⁺	5,99	32,2	3,96	11,1
NH ₄ ⁺	-	-	-	0,00
Mg ²⁺	3,83	9,70	5,31	3,36
Ca ²⁺	17,8	32,2	2,26	29,8
Cl ⁻	4,43	1,27	3,39	2,14
NO ₃ ⁻	-	0,00	0,39	
F ⁻	3,57	5,09	7,46	0,35

Tab. 5.3. Limiti di rilevabilità di anioni e cationi invernali analizzati con la cromatografia a scambio ionico Dionex 500.

µg ass.	Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
Na ⁺	2,77	18,4	1,35	4,70
NH ₄ ⁺	-	-	0,05	0,00
Mg ²⁺	7,59	7,30	3,26	2,33
Ca ²⁺	65,3	18,4	14,7	6,23
Cl ⁻	-	1,29	6,91	4,66
NO ₃ ⁻	0,07	-	0,81	0,01
F ⁻	0,77	1,66	0,90	4,01

Tab. 5.4. Limiti di rilevabilità di anioni e cationi primaverili analizzati con la cromatografia a scambio ionico Dionex 500.

µg ass.	Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
Na ⁺	20,2	4,88	28,1	11,1
NH ₄ ⁺	-	-	-	-
Mg ²⁺	4,81	2,39	1,84	0,31
Ca ²⁺	26	193	62,1	19
Cl ⁻	5,53	3,65	3,52	-
NO ₃ ⁻	0,20	-	0,41	0,10
F ⁻	3,13	5,02	5,12	3,66

Tab. 5.5. Limiti di rilevabilità di ciascun elemento estivo analizzato con Elan 6100 ICP-MS.

µg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Milano
As	0,10	0,00	0,00
Ag	0,30	0,00	0,01
Cd	0,12	0,01	-
Ni	0,99	0,51	0,63
Pb	0,03	0,09	0,03
Sb	0,63	0,02	0,01
V	0,13	0,03	0,00
Co	0,27	0,00	0,00

Tab. 5.6. Limiti di rilevabilità di ciascun elemento autunnale analizzato con Elan 6100 ICP-MS.

µg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
As	0,02	0,06	0,00	0,02
Ag	0,01	0,03	0,09	0,01
Cd	0,05	0,00	-	0,01
Ni	0,44	0,66	0,38	0,20
Pb	0,02	0,52	0,10	0,64
Sb	0,00	0,02	0,06	0,00
V	0,06	0,07	0,09	0,02
Co	0,06	0,02	0,04	0,01

Tab. 5.7. Limiti di rilevabilità di ciascun elemento invernale analizzato con Elan 6100 ICP-MS.

µg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
As	0,14	0,01	0,01	0,00
Ag	0,19	0,54	0,00	0,01
Cd	-	-	-	-
Ni	2,74	0,07	0,68	0,02
Pb	0,54	0,24	0,09	0,02
Sb	0,38	0,05	0,02	0,00
V	0,18	0,02	0,01	0,01
Co	0,33	0,10	0,01	0,02

Tab. 5.8. Limiti di rilevabilità di ciascun elemento primaverile analizzato con Elan 6100 ICP-MS.

µg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
As	0,01	0,03	0,00	0,01
Ag	0,01	0,00	0,01	0,24
Cd	-	-	0,00	0,04
Ni	0,51	0,64	0,20	0,17
Pb	0,04	0,01	0,05	0,02
Sb	0,03	0,02	0,02	0,59
V	0,05	0,02	0,01	0,11
Co	0,07	0,04	0,00	0,03

Tab. 5.9. Limiti di rilevabilità di ciascun elemento estivo analizzato con Optima™ 5300 ICP-OES DV.

µg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Milano	
Al	48,4	184	77,1	
S	67,5	2,16	50,9	
Fe	4,14	54	2,86	
Ca	288	198	30,1	
Mg	171	164	50,1	
K	86,4	85,4	12,3	
Ti	1,68	5,17	0,53	
Cr	0,50	0,02	0,43	
Mn	0,03	0,79	0,08	
Zn	4,73	3,17	4,63	
Cu	2,25	0,78	0,51	
Ba	0,89	2,23	0,53	

Tab. 5.10. Limiti di rilevabilità di ciascun elemento autunnale analizzato con Optima™ 5300 ICP-OES DV

µg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
Al	313	74,7	26,1	33,3
S	421	19,7	14,5	28,1
Fe	41,8	5,71	0,06	8,81
Ca	91,6	24,3	62,7	122
Mg	11,2	77,0	19,9	22,4
K	6,96	13,3	0,52	3,48
Ti	1,47	0,51	0,20	0,40
Cr	0,79	0,45	0,12	0,42
Mn	1,26	0,14	0,05	0,07
Zn	3,20	3,55	1,02	2,13
Cu	0,21	0,02	0,19	0,21
Ba	12,9	5,83	0,22	0,64

Tab. 5.11. Limiti di rilevabilità di ciascun elemento invernale analizzato con Optima™ 5300 ICP-OES DV.

µg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
Al	208	133	122	98,6
S	28,4	32,0	23,3	21,3
Fe	23,1	5,00	13,5	6,67
Ca	83,0	141	72,3	85,6
Mg	103	65,7	72,3	96,2
K	16,9	55,6	44,2	39,7
Ti	0,14	1,01	0,79	1,42
Cr	4,39	0,61	0,36	0,17
Mn	0,19	0,09	0,26	0,54
Zn	7,61	0,86	1,89	1,00
Cu	0,31	0,04	0,06	0,18
Ba	0,12	4,46	0,82	3,12

Tab. 5.12. Limiti di rilevabilità di ciascun elemento primaverile analizzato con Optima™ 5300 ICP-OES DV.

µg ass.	Via Lissa	Malcontenta	Venezia	Milano
Al	97,7	7,96	89,1	41,8
S	122	33,7	91,4	19,5
Fe	16,3	51,5	13,1	
Ca	29,1	40,1	289	83,2
Mg	75,2	62,0	120	0,63
K	12,2	17,8	42,0	13,3
Ti	1,60	1,60	0,29	0,06
Cr	1,20	0,60	0,15	0,07
Mn	0,30	0,44	0,10	0,03
Zn	1,55	0,86	1,15	2,02
Cu	-	0,67	-	0,45
Ba	3,86	3,77	1,80	0,30

5.3 MATERIALE DI RIFERIMENTO CERTIFICATO

La caratteristica principale del materiale di riferimento certificato è di possedere valori di una o più specifiche proprietà sufficientemente omogenei e ben stabilizzati in modo da poter essere impiegato in operazioni di taratura della strumentazione analitica o di valutazione dei metodi.

Le funzioni dei materiali di riferimento sono rivolte quindi alla calibrazione della strumentazione, sviluppo e valutazione dei metodi, qualificazione della riferibilità della misura, controllo di qualità interno e più in generale a tutte quelle funzioni che caratterizzano l'attività di assicurazione e controllo qualità che garantisce l'accuratezza e la precisione di un dato analitico.

Il materiale è accompagnato da un certificato rilasciato da un Ente autorevole, che ne attesta la validità secondo una specifica procedura. A ciascun valore certificato è inoltre associata un'incertezza con un determinato livello di confidenza (Brunelli, 2009; Norma ISO Guide 30:1992).

La scelta del materiale da utilizzare cade naturalmente su quello che presenta la stessa matrice del campione, se ciò non è possibile si può ripiegare su un materiale con la matrice più vicina possibile.

Nelle analisi svolte è stato utilizzato lo Standard Reference Material (SRM) 1648 "Urban Particulate Matter", del *National Institute of Standard Technology* (N.I.S.T.), materiale di riferimento certificato sviluppato per determinare le specie presenti nel particolato fine che consiste in materiale particolato atmosferico, raccolto in un sito di tipo urbano.

Dal confronto dei risultati ottenuti emerge che le concentrazioni dei campioni analizzati rientrano nell'intervallo di valori di concentrazione (85-90%) del materiale di riferimento certificato.

6 STRUMENTAZIONE ANALITICA

6.1 ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY (IEC)

La cromatografia a scambio ionico (*Ion-Exchange Chromatography*) è una tecnica di cromatografia liquida, che permette la separazione delle sostanze ioniche di interesse. Le tecniche di scambio ionico vengono applicate tra gli ioni presenti sulla superficie di un solido (fase stazionaria) e gli ioni in una soluzione (fase mobile). In fase di preparazione il campione viene disciolto nella fase mobile, che successivamente viene fatta eluire in continuo attraverso la fase stazionaria la quale deve essere immiscibile nell'eluente. La fase stazionaria e quella mobile sono scelte in modo tale che i componenti della miscela da separare si distribuiscano tra le due fasi, in base alla costante di ripartizione: i componenti più affini alla fase stazionaria impiegheranno più tempo per percorrerla, a differenza di quelli più affini alla fase mobile, che si sposteranno più velocemente. In base alla velocità di percorrenza dei diversi componenti lungo la fase stazionaria, si otterranno i corrispettivi tempi di ritenzione (picchi cromatografici) tramite un apposito rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'eluato. L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla concentrazione di ogni singolo componente (Brunelli 2009).

Il cromatografo ionico utilizzato è stato il Dionex 500. Gli anioni ritenuti di interesse costituenti il particolato atmosferico e quindi analizzati, sono stati: F^- , Cl^- , NO_3^- ; i cationi ricercati sono stati Na^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} .

La fase stazionaria per la determinazione degli anioni è costituita da una colonna anionica AS14, preceduta da una colonna di guardia AG14. La fase mobile, in eluizione isocratica (ovvero inalterata nel tempo), è composta da:

- soluzione tampone di ioni carbonato/bicarbonato 3,5 mM in acqua MilliQ®;
- flusso $1,2 \text{ mL min}^{-1}$;
- corrente 100 mA.

Per quanto riguarda i cationi, la fase stazionaria è una colonna CS12, preceduta da una colonna di guardia CG12A. La fase mobile, in eluizione isocratica, consiste di:

- una soluzione di $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ 20 nM in acqua MilliQ®;
- flusso 1 mL min^{-1} ;
- corrente 100 mA.

6.2 ICP-MS

L'ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) è una tecnica analitica di spettrometria altamente sensibile per la determinazione di diversi elementi quali arsenico, cromo, nickel, rame, cadmio, piombo, cobalto, manganese, vanadio, zinco, bario, bismuto, selenio, titanio e stronzio.

L'ICP-MS Elan 6100 (Perkin - Elmer) interfaccia una sorgente al plasma ad accoppiamento induttivo con uno spettrometro di massa a quadrupolo.

Il plasma ad accoppiamento induttivo è un plasma generato e mantenuto dall'interazione tra un campo a radiofrequenza e gas argon ionizzato.

Il plasma raggiunge temperature fino a $10000 \text{ }^\circ\text{C}$; le temperature utili per l'analisi dei campioni sono comprese tra 5500 e $8000 \text{ }^\circ\text{C}$; tali temperature portano alla completa ionizzazione degli elementi presenti nel campione, permettendo la minimizzazione delle interferenze chimiche.

Lo spettrometro di massa separa gli ioni delle specie chimiche presenti nel campione, generati dal plasma, in accordo con il loro rapporto massa/carica. Gli ioni del rapporto massa/carica selezionato sono inviati ad un detector che determina il loro numero.

Lo strumento è costituito da cinque parti principali (Brunelli 2009):

- nebulizzatore;
- spray chambre;
- torcia al plasma;
- coni sampler e skimmer;
- spettrometro di massa;

Il nebulizzatore (cross flow-nebulizer) trasforma il campione in microscopiche goccioline.

La camera di nebulizzazione (di tipo Ryton Scott) rimuove le gocce non diventate aerosol e quindi troppo grosse per essere analizzate e rende omogeneo il flusso. Generalmente viene utilizzato questo tipo di camera perché è resistente alla miscela acida contenente acido fluoridrico, utilizzata per la disgregazione dei filtri di particolato.

La torcia è costituita da due tubi concentrici di quarzo e in essa viene generato il plasma. Nel tubo centrale fluisce argon e campione, provenienti dalla camera di nebulizzazione. Nel tubo esterno fluisce argon per alimentare il plasma. Nella parte finale della torcia c'è una spira di rame connessa con un generatore di radiofrequenza (RF).

Il plasma si genera quando l'argon diventa conduttore per esposizione ad una scarica elettrica. La presenza di corrente elettrica genera un campo magnetico. L'argon sottoposto alla scarica elettrica perde alcuni elettroni, accelerati dal campo magnetico; all'interno del campo magnetico indotto le particelle cariche (elettroni e ioni) vengono forzate a fluire in una traiettoria circolare. Appena si accoppiano con il campo elettromagnetico si sviluppa calore ed avviene un'ulteriore ionizzazione.

Il processo di accoppiamento induttivo corrisponde alla conversione dell'energia elettrica alimentata dalla spirale in energia cinetica degli elettroni.

Quando il campione giunge in torcia, gli atomi degli elementi chimici subiscono alcuni processi quali:

- Desolvatazione: processo di separazione del solvente e scomposizione del campione in particelle microscopiche;
- Vaporizzazione: processo di decomposizione delle particelle in gas molecolare;
- Atomizzazione: dissociazione degli atomi;
- Ionizzazione: processo più importante ed è la dissociazione degli ioni.

La zona di interfaccia è il collegamento tra il sistema di generazione del plasma, operante a pressione ambiente ed a temperatura di 7500 °C e lo spettrometro di massa, che lavora in condizioni di alto vuoto e bassa temperatura. Questa zona è composta da due coni coassiali in nichel: il primo ha un foro di circa 1,1 mm ed è

detto campionatore ("*sampler*"). Gli ioni prodotti dal plasma passano attraverso tale foro formando un getto supersonico.

Nella zona di interfaccia una pompa aspira la maggior parte del gas argon permettendo agli ioni di passare attraverso il foro di 0,9 mm di un secondo cono detto "*skimmer*" (scrematore), posto a 10 mm dal primo. Oltre allo skimmer gli ioni si trovano all'interno dello spettrometro di massa ("*vacuum chamber*") a pressione di 10^{-7} torr e temperatura di 287 °C. la lente ionica focalizza il fascio in un raggio diretto all'analizzatore, dirigendo gli ioni nel quadrupolo (Squizzato, 2007).

La separazione degli analiti avviene attraverso uno spettrometro di massa a quadrupolo, secondo il rapporto massa/carica (m/z).

Il quadrupolo è formato da quattro barre metalliche tra loro parallele ed equidistanti, collegate elettricamente tra loro. Gli ioni vengono separati quando sono introdotti lungo l'asse del quadrupolo, in base alla velocità con la quale si muovono all'interno, determinata dalla loro massa e dalla loro energia.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto m/z , generalmente tramite campi magnetici statici od oscillanti. Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto m/z è detto spettro di massa ed è tipico di ogni composto, in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è sottoposto (Squizzato, 2007).

Lo spettrometro di massa è controllato da un computer che permette l'esplorazione estremamente rapida dello spettro di massa, e garantisce una risoluzione eccellente ed un'elevata sensibilità cioè la capacità della macchina di rilevare un picco poco pronunciato immediatamente adiacente ad uno più emergente.

Gli ioni in uscita al quadrupolo vengono catturati da un rivelatore che funziona come contatore e produce segnali elettrici proporzionali al flusso ionico trasmesso dall'analizzatore di massa.

6.2.1 INTERFERENZE IN ICP-MS

Uno dei problemi della tecnica ICP-MS è quello delle interferenze spettrali, dovuto principalmente alle condizioni chimico-fisiche esistenti nel plasma, che promuovono la formazione di composti poliatomici interferenti nella determinazione di alcuni analiti. Le interferenze si dividono in spettroscopiche e non spettroscopiche (o "effetto matrice").

Le interferenze spettroscopiche comprendono (Squizzato, 2007):

- *Sovrapposizione isobarica*: si manifesta quando due elementi hanno isotopi con la stessa massa. Al segnale dell'analita si somma quello dello ione interferente. Questa interferenza viene corretta tramite l'utilizzo di un software specifico, valutando l'abbondanza dell'interferente attraverso un suo isotopo non interferito e tenendo presente il suo rapporto isotopico;
- *Ioni poliatomici*: si assiste ad una ricombinazione di due o più specie di ioni atomici. Argon, idrogeno e ossigeno sono gli elementi più abbondanti del plasma e possono ricombinarsi tra loro e con gli elementi della matrice dell'analita;
- *Ossidi refrattari*: si formano per dissociazione incompleta della matrice del campione o per ricombinazione di atomi con l'ossigeno. Aumentando il tempo di residenza del campione nel plasma si migliora il rapporto MO^+/M^+ , riducendo il livello degli ossidi;
- *Ioni a doppia carica*: si formano quando l'energia di seconda ionizzazione di un elemento è minore rispetto a quella di prima ionizzazione dell'argon e dipende dalle condizioni di equilibrio del plasma. Questa interferenza comporta una piccola perdita di segnale e di sensibilità per le specie a singola carica ed una sovrapposizione isobarica con gli ioni aventi metà della loro massa (ad es. $^{137}Ba^{2+}$ e $^{68}Ga^+$ hanno lo stesso rapporto massa/carica).

Le interferenze non spettroscopiche comprendono (Squizzato, 2007):

- *Elevata presenza di solidi disciolti*: la presenza di alte quantità di solidi disciolti può creare incrostazioni ai coni dell'interfaccia ed otturare i due fori. Di solito il contenuto di solidi accettato è $< 1000 \mu gL^{-1}$ (cioè 0,1%),

che consente di evitare una deriva del segnale nel tempo o di renderla comunque correggibile con l'uso di uno standard interno;

- *Effetto matrice*: la presenza di alcuni ioni nella matrice che si legano all'analita provoca effetti di soppressione o aumento del segnale. Per evitare tale effetto è opportuno l'uso di uno standard o la diluizione del campione.

I numeri di massa tenuti in considerazione durante le analisi con Elan 6100 ICP-MS per i diversi elementi chimici sono elencati nella tabella sottostante:

Tab. 6.1. Elementi chimici analizzati con Elan 6100 ICP-MS e relativi numeri di massa presi in considerazione.

ELEMENTI	NUMERO DI MASSA
V	51
Co	59
Ni	60
As	75
Ag	109
Cd	111
Sb	121
Pb	208

6.3 ICP-OES

L'ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) è una tecnica largamente utilizzata per la determinazione delle concentrazioni elementali in traccia (μgL^{-1}) in campioni allo stato liquido.

Le tecniche spettroscopiche sono basate sulla rivelazione della radiazione elettromagnetica emessa o assorbita dagli atomi e/o dalle molecole del campione esaminato; con la tecnica ICP-OES viene analizzato lo spettro elettromagnetico nella banda del visibile e UV emesso dal campione opportunamente eccitato per sondare la sua composizione. Il campione liquido, trasportato dal gas carrier inerte argon, viene nebulizzato e flussato attraverso una torcia al plasma indotto a radiofrequenza dove subisce vaporizzazione, atomizzazione, eccitazione e ionizzazione degli elementi che lo compongono.

Quando questi ultimi (atomi eccitati e ioni) ritornano ad un livello energetico inferiore o al loro "*ground state*" emettono una radiazione elettromagnetica caratteristica per ogni elemento; l'intensità della luce emessa a determinate lunghezze d'onda viene rivelata per determinare la concentrazione degli elementi di interesse. Questa sorgente di eccitazione termica permette la contemporanea eccitazione di tutti gli elementi contenuti nel campione con diverse transizioni energetiche. La luce policromatica emessa dal campione eccitato viene trasmessa attraverso un sistema ottico dove viene selezionata in funzione della lunghezza d'onda (λ). Le intensità di ciascuna lunghezza d'onda vengono infine convertite in segnali elettrici da un rivelatore CCD (Charge-Coupled device Detector) (Valotto, 2009).

Durante l'analisi è possibile sondare le lunghezze d'onda caratteristiche di ogni elemento con la migliore efficienza d'emissione e la cui rivelazione risulta meno disturbata dalla presenza di altri picchi prodotti dall'emissione di altri elementi interferenti a lunghezze d'onda vicine a quella di interesse. Utilizzando le appropriate rette di calibrazione che correlano l'intensità rivelata con la concentrazione dell'analita nel campione è possibile valutare la composizione del campione sondato (Valotto, 2009).

Il modello utilizzato in laboratorio è "Optima™ 5300 DV" (Perkin-Elmer), caratterizzato da un sistema doppio di detector: il detector UV lavora ad una lunghezza d'onda compresa tra 165 e 403 nm, mentre il detector VIS tra 404 e

782 nm, così da coprire un elevato range di lunghezze d'onda. La torcia è posta in posizione orizzontale, con la possibilità di scegliere la configurazione radiale o assiale del plasma, in base alla concentrazione dei diversi elementi. Solitamente la configurazione radiale è quella preferita, perché presenta un rumore di fondo minore rispetto a quella assiale, che però deve essere impiegata in caso di concentrazioni di analiti basse.

Di seguito vengono elencate le componenti dello strumento utilizzato (Valotto, 2009):

- Auto-campionatore S10 (Perkin-Elmer) che può contenere 157 provette porta campione;
- Nebulizzatore concentrico tipo Meinhard (pneumatico) in quarzo per nebulizzare il campione liquido;
- Camera ciclonica (spray chambre), in quarzo per rimuovere le goccioline con diametro maggiore di 10 μm e omogeneizzare l'aerosol prodotto dal nebulizzatore;
- Pompa peristaltica per il trasporto del campione liquido dalla provetta porta campione al nebulizzatore e per il drenaggio del campione non selezionato all'interno della camera ciclonica;
- Torcia composta da tre tubi concentrici in quarzo per il flussaggio dell'argon e un iniettore in allumina per l'iniezione del campione nebulizzato e selezionato all'interno della camera ciclonica;
- Generatore a radiofrequenza, che garantisce la potenza necessaria all'innescio e al mantenimento del plasma, (40 MHz, 750–1500 W) free-running dotato di RF Power Control (RFPC) collegato ad una spirale in rame che funge da antenna e avvolge la parte terminale della torcia;
- Ugello che flussa aria compressa perpendicolarmente all'estremità del plasma (shear gas ovvero il gas che minimizza l'effetto di auto-assorbimento nella configurazione assiale allontanando la zona "fredda" del plasma, ovvero la punta che contiene gli atomi del campione che sono già tornati al loro ground state, dal cammino ottico);
- Fenditura ad apertura variabile che permette l'entrata della luce policromatica emessa dal campione eccitato e uno specchio parabolico che la collima (l'apertura della fenditura è indirettamente proporzionale alla risoluzione della rivelazione);

- Sistema ottico mantenuto in atmosfera d'azoto a 38°C composto da un policromatore Echelle grating ad alta dispersione combinato con un dispersore incrociato (cross disperser) che direziona lungo cammini ottici differenti la luce visibile e quella UV, un prisma per la dispersione della luce visibile e un dispersore UV per la dispersione della luce UV;
- Due rivelatori SCD bidimensionali (Segmented-array, Charge-coupled device Detector) per la rivelazione simultanea di tutte le lunghezze d'onda. Questi rivelatori sono mantenuti alla temperatura di -40°C per minimizzare il rumore di fondo. Il primo viene utilizzato per rivelare le intensità delle lunghezze d'onda comprese fra 165 nm e 403 nm (UV), il secondo per quelle comprese fra 404 nm e 782 nm (Visibile).

Per la calibrazione dello strumento sono state preparate delle soluzioni standard a diverse concentrazioni note.

Le lunghezze d'onda prese in considerazione per i diversi elementi tramite l'analisi con Optima™ 5300 ICP-OES DV sono riportate in tabella:

Tab. 6.2. Elenco delle lunghezze d'onda considerate per ogni elemento durante le analisi con Optima™ 5300 ICP-OES DV.

ELEMENTI	λ (nm)
S	181,975
Zn	213,867
Ba	233,572
Fe	239,562
Mn	257,610
Cr	267,716
Mg	280,271
Ca	317,938
Cu	327,393
Al	396,153
Ti	337,279
K	766,490

7 STUDI PRECEDENTI

Nel corso del 2010, sono stati raccolti 40 campioni di Particolato Totale Sospeso (TSP) distribuiti nelle 4 stagioni a Milano presso Torre Sarca. I risultati delle analisi microbiologiche e dei principali ioni inorganici solubili in acqua sono stati pubblicati in Bertolini et al. (2013).

In quell'occasione si è tentato un primo approccio integrato nella trattazione di dati chimici e biologici, conducendo un'analisi fattoriale sui risultati di entrambe le determinazioni.

Il risultato è sintetizzato in figura 7.1.

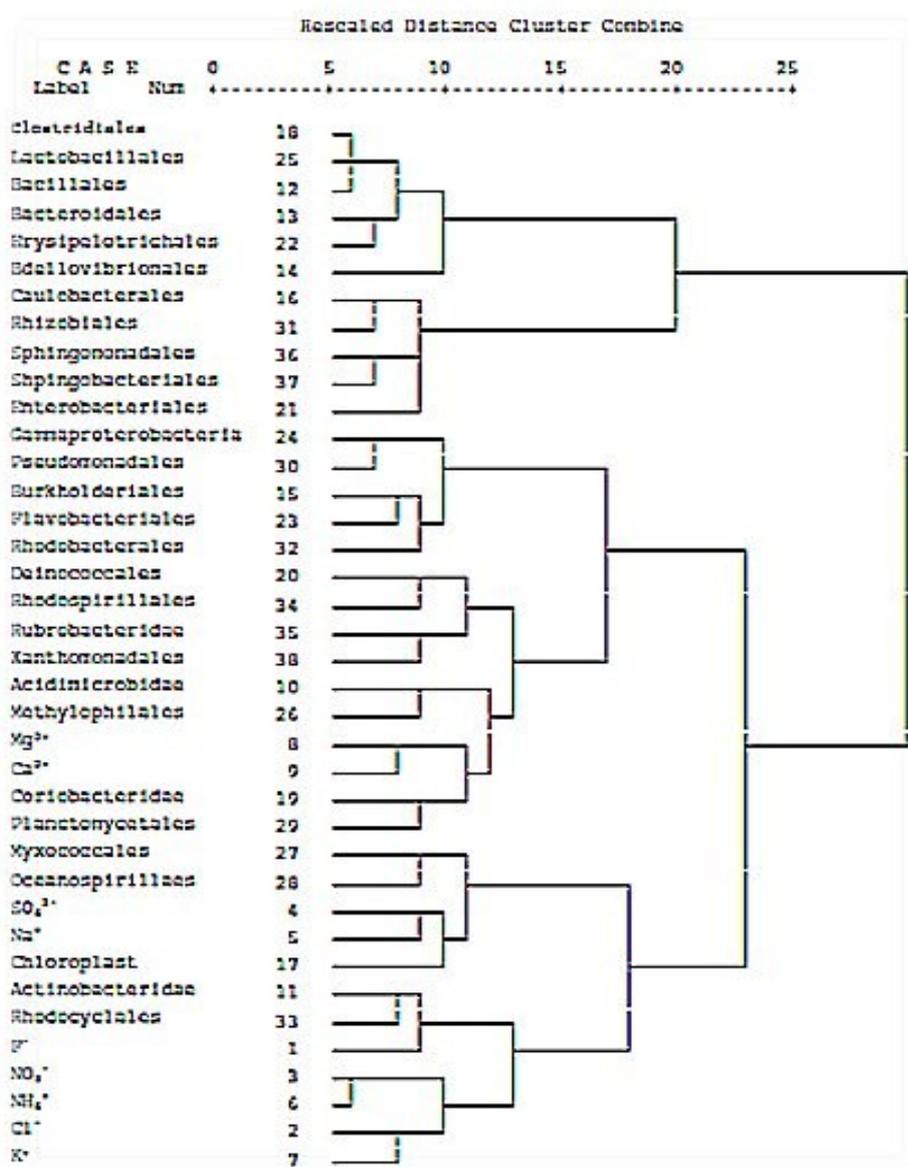


Fig. 7.1. Cluster analysis condotta sui dati del 2010.

Questo tipo di approccio statistico è stato poi abbandonato a causa di una scarsa significatività dell'analisi.

Tuttavia è interessante notare come vi fossero già dei primi segnali di interazione fra i dati biologici e gli ioni: nello stesso gruppo erano presenti solfati e cloroplasti, tipici del periodo estivo. Gli *Oceanospirillales*, ordine Alotollerante o Alofilo si presentavano nello stesso gruppo del sodio e del cloro (Garitty et al., 2005b).

8 METODOLOGIE DI ANALISI STATISTICA DEL DATO

I dati, sia di natura chimica che di natura biologica, sono stati sottoposti ad un'analisi esplorativa al fine di comprendere al meglio quali siano gli andamenti delle variabili prese in esame.

Questi andamenti sono stati confrontati con i parametri meteo, al fine di poter meglio comprendere eventuali interazioni fra le popolazioni batteriche ed alcuni eventi meteo.

È stato calcolato l'indice di Shannon, H' , con i dati di origine biologica e il risultato è stato correlato con le variabili chimiche.

È stata effettuata un'analisi discriminante su quegli ordini di batteri che possiedono un'abbondanza relativa significativa.

Successivamente si è tentato l'approccio di correlazione fra le variabili di origine biologica e le variabili ambientali. Attraverso il Software CANOCO® si è effettuata un'analisi delle ridondanze (RDA) al fine di comprendere se vi fosse una correlazione fra queste.

Infine è stata condotta un'analisi fattoriale, tramite l'impiego del software SPSS sulle matrici di dati dell'area veneziana. I risultati di quest'analisi di statistica multivariata sono stati impiegati come input per una nuova analisi delle ridondanze.

8.1 INDICE DI SHANNON

Vi sono numerosi indici che permettono la stima della ricchezza in specie o della diversità. Sicuramente il più famoso ed usato è l'indice di Shannon, H' , un indice mutuato dalla teoria dell'informazione (Clarke e Warwick, 2001).

8.2 L'ANALISI DELLA RIDONDANZA

Attraverso l'impiego di CANOCO[®] si è condotta l'analisi della ridondanza sui campioni considerati significativi.

L'analisi di ridondanza (RDA) può essere considerata una forma chiusa di analisi dei componenti principali (PCA). Con i dati ecologici, i metodi di statistica multivariata sono usati comunemente per individuare quali fattori possano spiegare al meglio le differenze nella composizione in specie fra i campioni. Quindi la PCA è il metodo più usato. Questo approccio statistico usa modelli lineari simili ai modelli che stanno alla base dell'analisi di regressione. La differenza con l'analisi di regressione è che le variabili spiegate non sono misurate (manifeste), ma sono latenti.

Il valore delle variabili latenti per i vari campioni sono chiamati scores dei campioni, e il coefficiente di regressione del modello lineare è detto peso delle specie (species weight).

Se come nell'analisi della ridondanza le variabili spiegate sono manifeste (per esempio fissate a priori) la varianza totale può essere separata attraverso un'analisi di regressione multivariata in varianza spiegata e varianza residuale.

L'analisi di ridondanza, estrae informazione solo dalla varianza spiegata, gli assi dell'RDA rappresentano la percentuale di tale varianza.

Più formalmente l'analisi delle ridondanze può essere definita in due modi equivalenti. L'analisi della ridondanza è una PCA che viene applicata ai dati fittati. L'analisi di ridondanza è una PCA in cui i sample scores sono confinati ad essere combinazioni lineari delle variabili spiegate (explanatory).

Entrambe le definizioni assicurano che il diagramma mostri solo quelle differenze fra i campioni che possono essere spiegati dalle variabili spiegate.

Nel software CANOCO[®] l'analisi delle ridondanze è accompagnata dal test di permutazione di Monte Carlo, al fine di valutare la significatività statistica e gli effetti delle variabili spiegate sulla composizione in specie del campione (Van Den Brink e Ter Braak, 1999).

8.3 L'ANALISI FATTORIALE

Le sorgenti di emissione nell'area veneziana sono state identificate tramite l'analisi fattoriale con rotazione Varimax. Attraverso questo strumento statistico un insieme di variabili intercorrelate (le specie chimiche analizzate) è ridotto ad un numero minore di variabili indipendenti (i fattori) tramite una trasformazione ortogonale (rotazione), attraverso la diagonalizzazione della matrice di covarianza delle variabili determinando autovalori ed autovettori.

Questi fattori sono una combinazione lineare delle variabili originali, che spiegano il massimo della variabilità totale dell'insieme di dati e sono tra loro incorrelati.

Ogni variabile all'interno del fattore è caratterizzata dai pesi fattoriali (loading) e sono definiti come i coefficienti di combinazione lineare e rappresentano il grado di correlazione tra le variabili ed il fattore.

Quindi le variabili, ovvero le specie chimiche, con i "loadings" più elevati per ogni fattore vengono interpretate come traccianti (fingerprint) delle sorgenti di emissione che essi rappresentano (Salvador et al., 2004; Squizzato 2011).

8.4 ANALISI DISCRIMINANTE

L'analisi discriminante è un metodo statistico di classificazione che può essere impiegata per spiegare l'appartenenza o la non appartenenza di un'osservazione ad un gruppo.

L'analisi viene applicata ad un insieme di valori all'interno del quale sono stati precedentemente definiti dei gruppi.

Si basa sulla correlazione tra variabili e/o campioni e serve a valutare, se e quanto sono "differenti" statisticamente i siti di campionamento.

Tale tecnica consente di individuare alcune variabili rilevanti al fine della distinzione fra gruppi. Le combinazioni lineari delle variabili discriminanti formano le funzioni discriminanti che massimizzano la separazione o la distanza tra i gruppi stessi.

Tale separazione è evidenziata graficamente tramite il grafico di dispersione, una rappresentazione della distribuzione dei gruppi (stazioni) in base alla correlazione tra le variabili discriminanti (Ordini dei batteri) e le funzioni discriminanti.

Secondo questa assunzione gli Ordini definiti "non discriminanti" tra i gruppi sono elementi presenti nell'area di studio con una distribuzione pressoché ubiquitaria, mentre gli Ordini detti "discriminanti" sono peculiari di una stazione (Squizzato 2011).

9 RISULTATI E DISCUSSIONE

9.1 DETERMINAZIONI MICROBIOLOGICHE

Dal sequenziamento dell'amplificato tramite PCR si sono ottenute delle unità tassonomiche (OTU) da cui sono stati individuati 109 gruppi che rappresentano 107 Ordini.

Di questi Ordini 98 sono presenti nel sito di Via Lissa, 96 nel sito di Malcontenta, 95 nel sito di Milano e 97 nel sito di Venezia.

Tab. 9.1. Numero di Ordini rinvenuti per stagione e per sito di campionamento.

	Via Lissa	Malcontenta	Milano	Venezia
Estate	79	80	80	-
Autunno	73	83	85	90
Inverno	88	80	86	86
Primavera	81	81	87	84

Il numero di Ordini rinvenuti, presenta valori stagionali più elevati nel sito di Venezia, forse questo riscontro è imputabile alla frazione totale (TSP) campionata nel centro città, invece che il PM₁₀ campionato negli altri tre siti di campionamento.

Il numero di Ordini, tuttavia non sembra affatto correlato ($r < 0,003$) alle concentrazioni di PM₁₀ rilevate nei siti di Malcontenta, Via Lissa e da ARPA Lombardia presso la centralina di Pascal-città studi.

In questo primo approccio allo studio di interazione fra la chimica e il bioaerosol, nella frazione biologica sono stati presi in considerazione solo i procarioti, tralasciando altre componenti biologiche presenti in aria quali, ad esempio, i funghi.

La presenza dei cloroplasti è dovuta al fatto che essi rispondono ai primer dei procarioti, poiché essi erano batteri che, nel corso dell'evoluzione, sono entrati nelle cellule vegetali.

Si suppone infatti che i cloroplasti si siano originati da protobatteri liberi in che possedevano capacità fotosintetica. Questi batteri ancestrali, secondo la teoria

endosimbiontica, sono stati inglobati da cellule eucariote primitive di maggiori dimensioni prive della capacità di catturare energia dalla luce solare. Successivamente si è stabilita una relazione simbiotica vantaggiosa per entrambi gli esseri viventi, e i batteri persero infine la capacità di funzionare autonomamente. Le cellule eucariote divennero degli ospiti capaci di compiere fotosintesi (Klug et al., 2007).

9.1.1 ORDINI DI BATTERI PRESENTI NEL SITO DI VIA LISSA

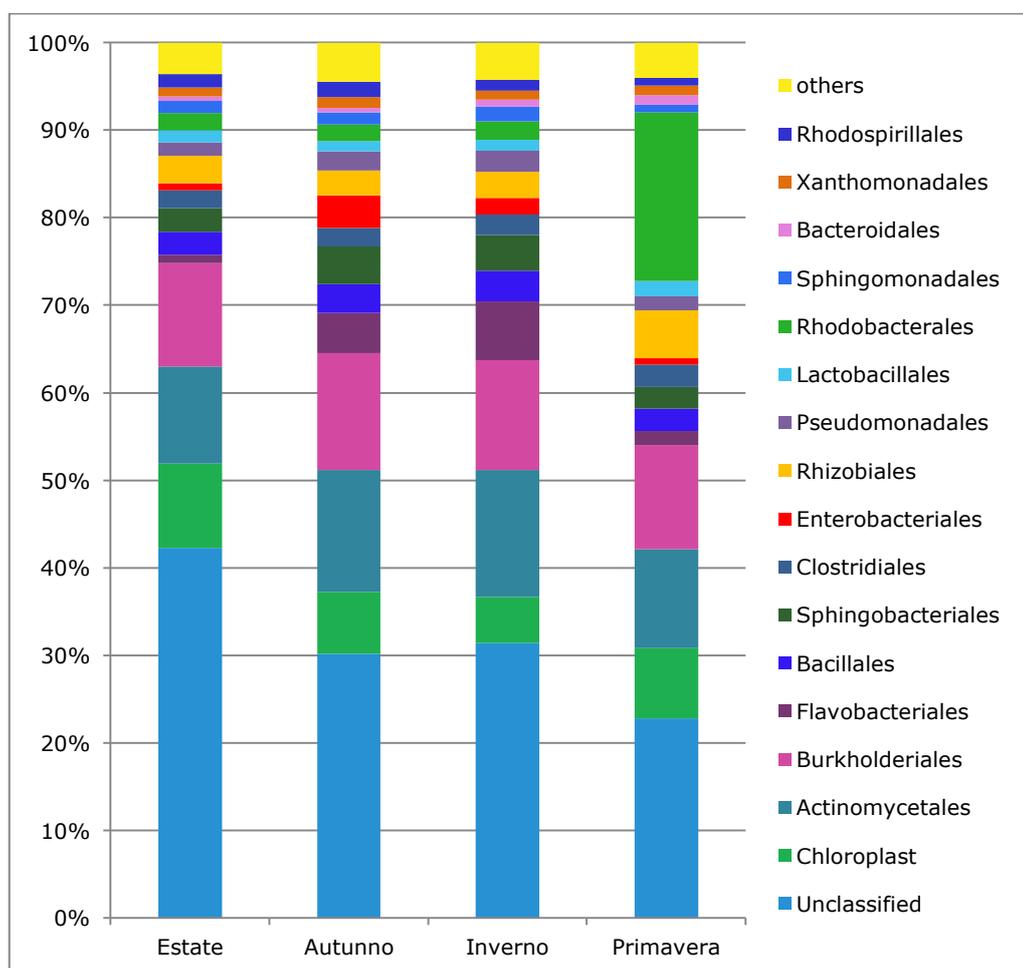


Fig. 9.1. Ordini di batteri individuati nel sito di Via Lissa.

Nella figura 9.1 sono rappresentati quegli Ordini che, fra i 99 nel sito di via Lissa, superano l'1% del numero totale di sequenze ottenute (Bertolini et al., 2013).

Per poter permettere una rappresentazione complessiva dell'amplificato, si è deciso di presentare nel grafico anche le percentuali di sequenze non classificate

e i cloroplasti che, come già detto, non sono un ordine di batteri e che, di conseguenza non verranno prese in considerazione nelle elaborazioni successive.

La percentuale di sequenze che non si sono potute classificare va da circa il 40% al 20%.

Nel sito di Via Lissa sono ben rappresentati gli *Actinomycetales* e *Burkholderiales*, che mantengono circa le stesse abbondanze nelle quattro stagioni.

I *Flavobacteriales* e gli *Sphingobacteriales* sono presenti con maggiori abbondanze relative nei periodi autunnale ed invernale rispetto a quelli primaverile ed estivo.

Per quanto riguarda i *Bacillales* e *Clostridiales* essi sono sempre presenti con abbondanze relative simili nei quattro periodi di campionamento.

Gli *Enterobacteriales* presentano delle abbondanze relative maggiori nel periodo autunnale, mentre *Rizobiales* e *Rhodobacterales* presentano percentuali maggiori nel periodo primaverile. Questi ultimi presentano circa un 20% abbondanza nel periodo primaverile: è interessante perché questi batteri sono dei batteri dominanti e colonizzatori di superficie delle acque costiere temperate (Dang et al., 2008).

9.1.2 ORDINI DI BATTERI PRESENTI NEL SITO DI MALCONTENTA

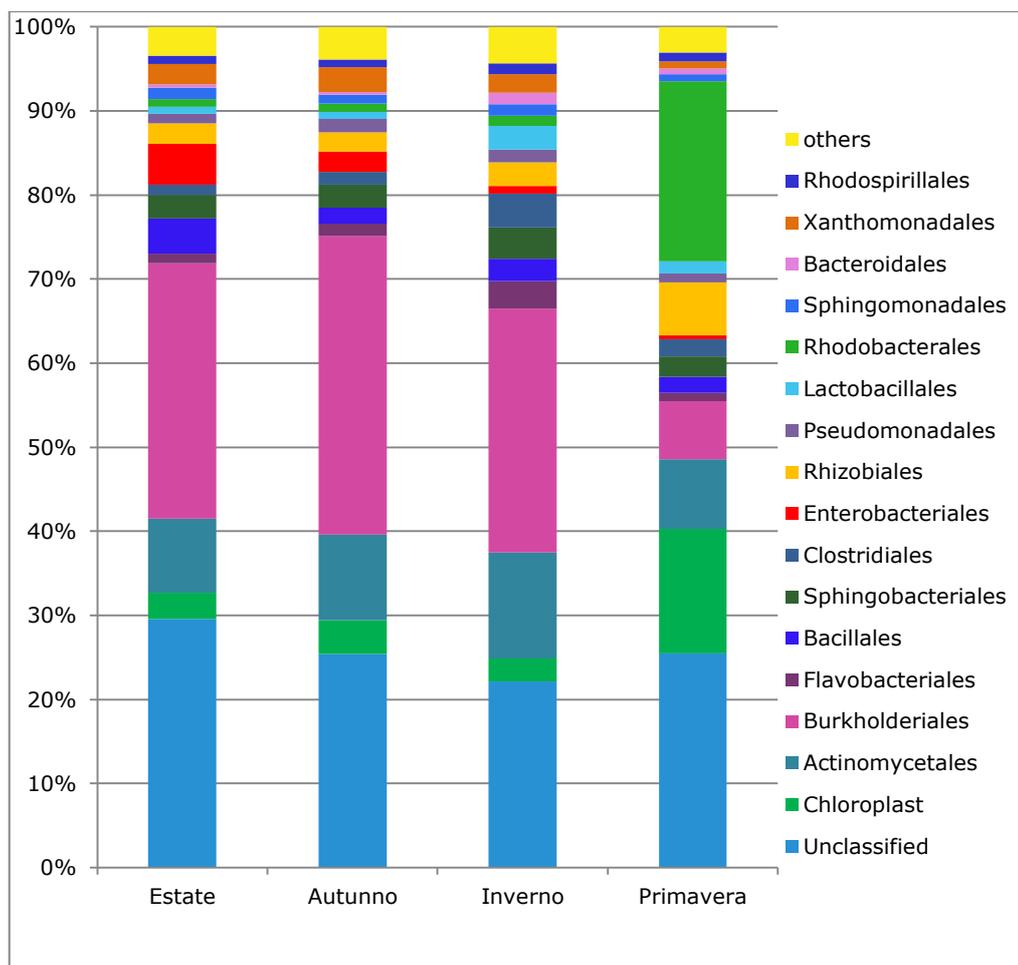


Fig. 9.2. Ordini di batteri individuati nel sito di Malcontenta.

Nella figura 9.2 sono rappresentati quegli Ordini che, fra i 97 nel sito di Malcontenta, superano l'1% del numero totale di sequenze ottenute (Bertolini et al., 2013).

Anche in questo caso vi sono una percentuale di sequenze che non sono state classificate (dal 20 al 30%), tuttavia la percentuale è inferiore rispetto a quelle di Via Lissa. Anche in questo caso per completezza sono stati rappresentati i cloroplasti.

In questa stazione è interessante notare che i cloroplasti, presentano delle percentuali maggiori in primavera, mentre nel sito di Via Lissa le percentuali erano piuttosto stabili nelle quattro stagioni. Probabilmente questo è dovuto alla localizzazione del campionatore, situato vicino ad un prato ed ad un filare di Pioppi.

Gli *Actinomycetales* sono presenti con percentuali più o meno simili nelle quattro stagioni, mentre i *Burkholderiales* presentano percentuali molto alte in estate autunno e primavera (circa il 30%) e relativamente bassa (meno del 10%) in prima.

Anche in questo caso i *Flavobacteriales* e *Sphingobacteriales* sono presenti con una percentuale maggiore nel periodo invernale mentre i *Bacillales* in quello estivo.

In questo caso le percentuali maggiori di *Enterobacteriales* si hanno nel periodo estivo, mentre come prima, *Rizobiales* e *Rhodobacteriales* sono maggiormente presenti in primavera. La percentuale di questi ultimi è piuttosto importante anche in questo caso, circa il 20%.

9.1.3 ORDINI DI BATTERI PRESENTI NEL SITO DI MILANO

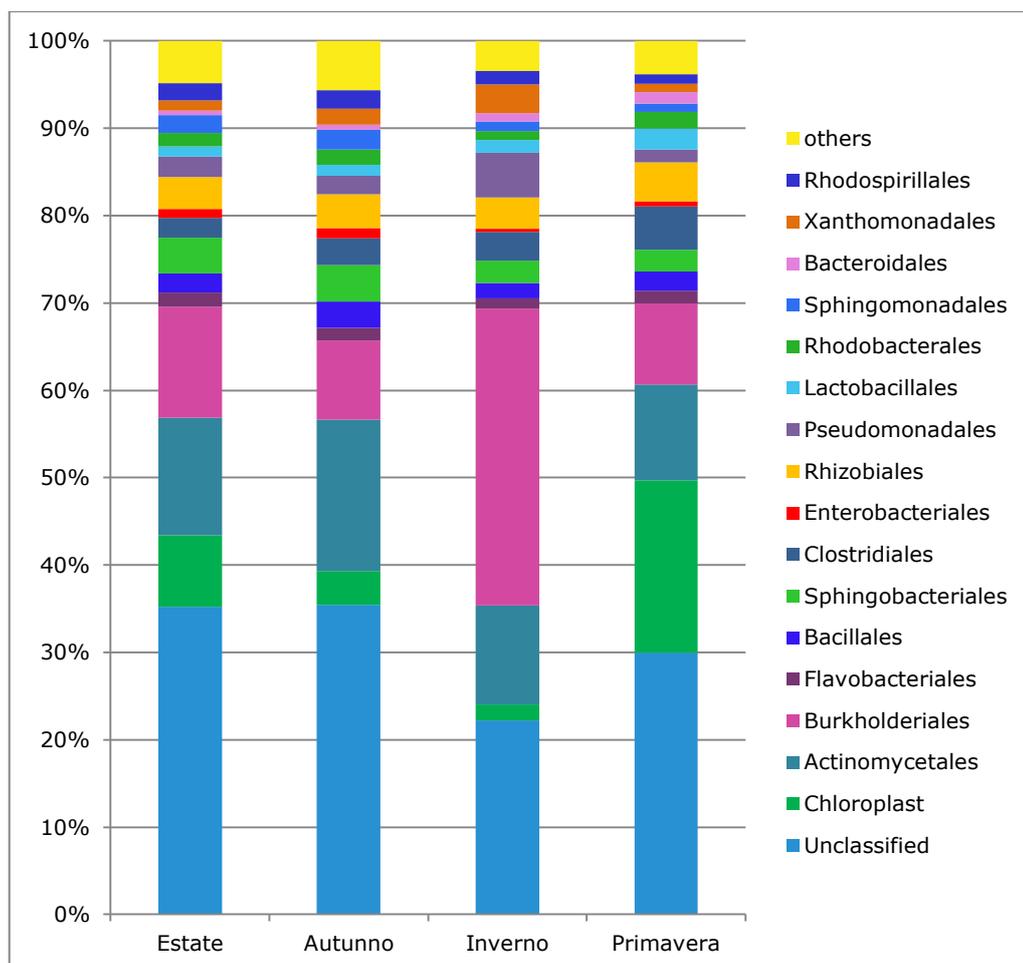


Fig. 9.3. Ordini di batteri individuati nel sito di Milano.

Nella figura 9.3 sono rappresentati quegli Ordini che, fra i 96 nel sito di Milano, superano l'1% del numero totale di sequenze ottenute (Bertolini et al., 2013).

Le sequenze non classificate sono più abbondanti nei periodi estivo, autunnale e primaverile rispetto a quello invernale.

I cloroplasti, rappresentati sempre per avere una visione complessiva dell'amplificato, presentano un andamento percentuale stagionale marcato, con un minimo in inverno ed un massimo in primavera.

Gli *Actinomycetales* presentano percentuali simili in tutte le stagioni, con un'abbondanza leggermente maggiore nel periodo autunnale.

I *Burkholderiales* sono presenti in percentuali maggiori in inverno, mentre *Flavobacteriales* e *Bacillales* e *Rizobiales* sono presenti con percentuali simili in tutti i periodi.

Gli *Sphingobacteriales* e *Enterobacteriales* presentano percentuali simili nei periodi estivo ed autunnale e nei periodi invernale primaverile.

9.1.4 ORDINI DI BATTERI PRESENTI NEL SITO DI VENEZIA

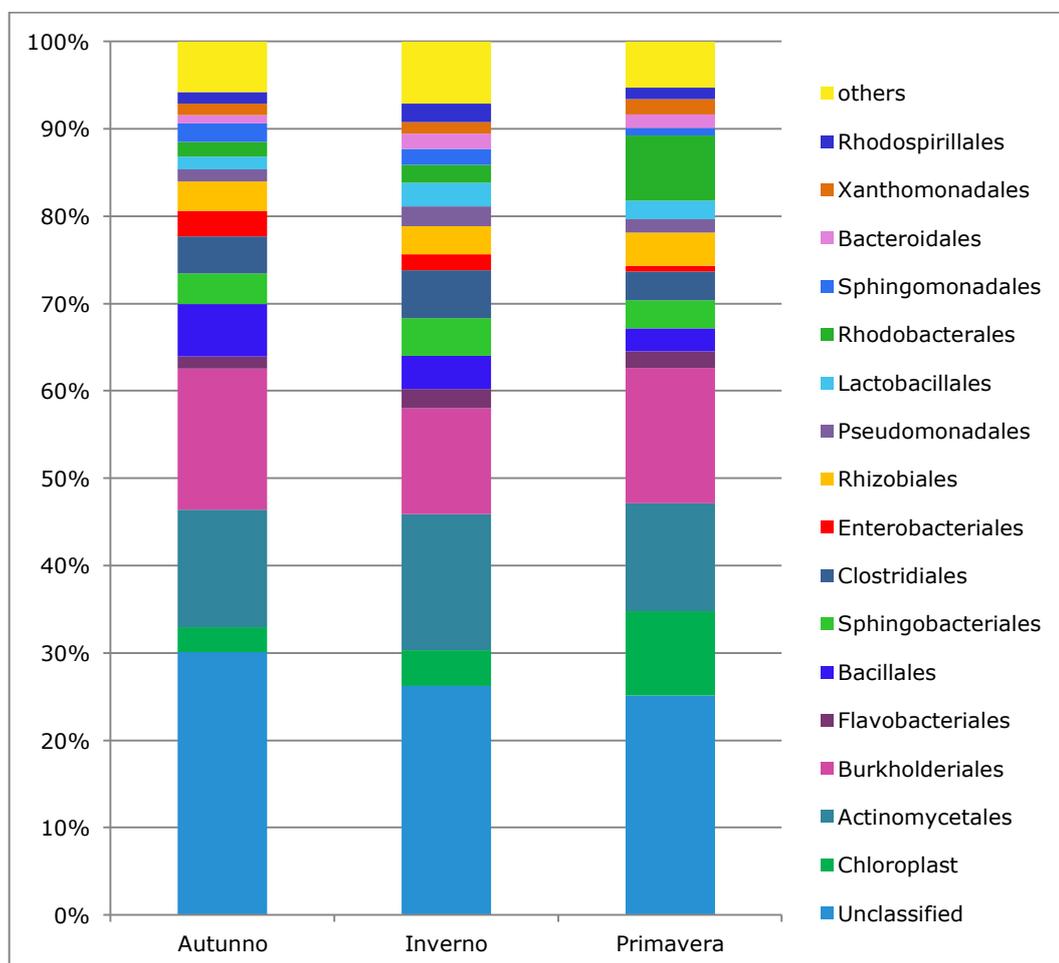


Fig. 9.4. Ordini di batteri individuati nel sito di Venezia.

Nella figura 9.4 sono rappresentati quegli Ordini che, fra i 98 nel sito di Venezia, superano l'1% del numero totale di sequenze ottenute (Bertolini et al., 2013).

Le sequenze non classificate sono più o meno presenti in percentuali simili nei tre periodi di campionamento. In questo caso mancano i campioni riferiti alla stagione estiva a causa della mancanza dello strumento campionario durante quel periodo.

Anche in questo caso i cloroplasti sono rappresentati per avere la visione complessiva dell'amplificato, con la loro percentuale che aumenta nel periodo primaverile.

Gli *Actinomycetales*, i *Flavobacteriales* e gli *Sphingobacteriales* presentano percentuali simili in tutte le stagioni.

I *Burkholderiales* presentano percentuali leggermente maggiori in autunno e primavera.

Bacillales e *Enterobacteriales* sono presenti in percentuale maggiori nel periodo autunnale.

Anche in questo caso, come negli altri due punti di campionamento dell'area veneziana i *Rhodobacteriales* si presentano con una percentuale maggiore nel periodo primaverile

9.1.4.1 Gli *Halobacteriales* a Venezia

Gli *Halobacteriales* sono presenti, nel sito di Venezia con una percentuale totale dell'0,06% decisamente maggiore rispetto a quelle degli altri tre siti, dove si arriva a circa ad un 0,01%.

I batteri appartenenti a quest'ordine sono aerobi, che vivono e crescono negli ambienti ipersalini, tanto che fra di essi vi sono gli esseri viventi più alofili che si conoscano. Questi batteri per la loro crescita ottimale richiedono un'alta concentrazione di NaCl (Wright, 2006).

Come si vedrà successivamente le concentrazioni degli ioni sodio e cloro sono maggiori nel sito di Venezia, quindi questo potrebbe essere considerato un segnale di una possibile relazione fra questi ioni e quest'ordine di batteri.

Altra cosa interessante è l'abbondanza relativa che quest'ordine raggiunge nei giorni 1 e 2 febbraio 2012, pari rispettivamente ad uno 0,56% e 0,41%. Questa percentuale non solo è molto maggiore rispetto agli altri siti, dove in quei giorni essi risultano assenti, ma anche rispetto allo stesso sito di campionamento nella settimana precedente, quando la percentuale giornaliera di quei batteri era pari ad uno 0,07%.

Nei giorni 1 e 2 febbraio come si è visto spirava un forte vento di bora, che potrebbe aver trasportato questi microorganismi in aria, avendo arricchito il bioaerosol spirando attraverso l'Alto Adriatico.

9.1.5 ANDAMENTO STAGIONALE DEI BATTERI

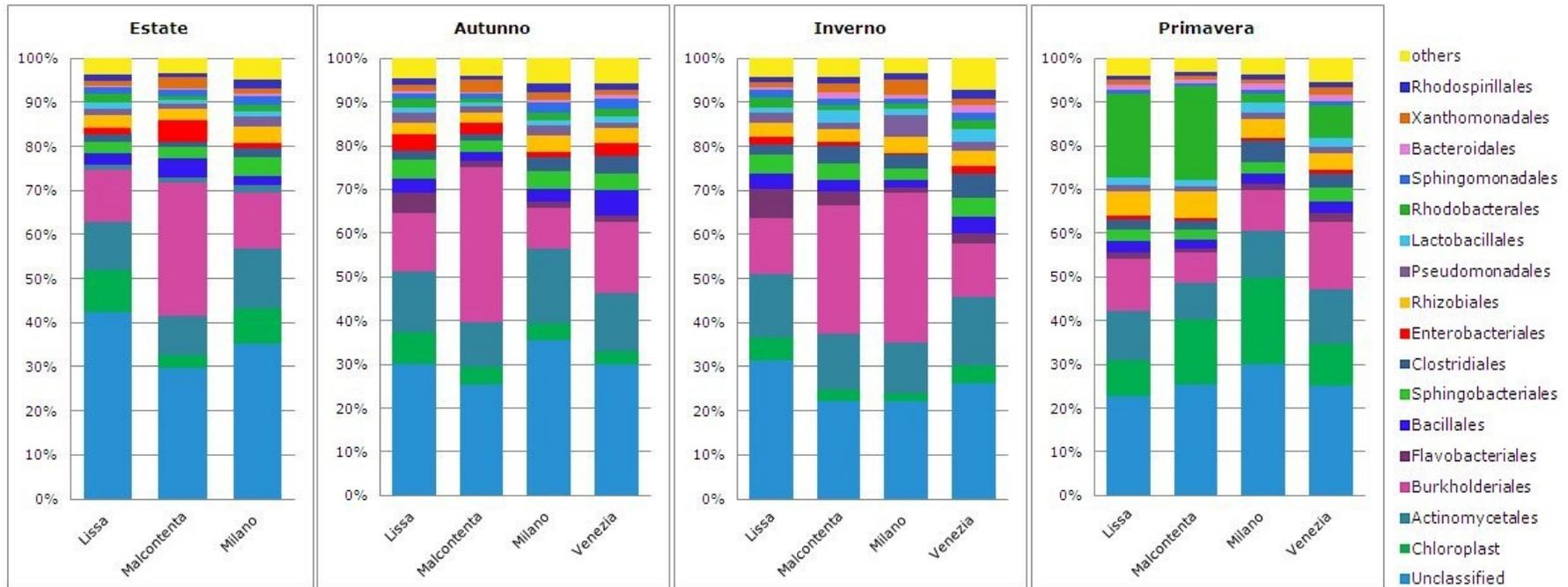


Fig. 9.5. Ordini di batteri individuati stagionalmente nei siti di campionamento.

Come si può osservare confrontando le stazioni di campionamento sono presenti delle differenze fra le percentuali degli Ordini batterici.

Durante il periodo estivo, nel sito di Malcontenta i *Burkholderiales* sono presenti in percentuale nettamente maggiore rispetto agli altri due siti di campionamento, mentre i cloroplasti sono presenti in percentuale minore. Anche gli *Enterobacterales* son presenti in percentuale leggermente minore a Malcontenta.

Nel periodo autunnale, i *Burkholderiales* sono sempre presenti con le percentuali maggiori nel sito di Malcontenta, i *Flavobacterales* sono maggiormente abbondanti nel sito di Via Lissa, gli *Actinomycetales* nel sito di Milano.

Nel periodo invernale, i *Burkholderiales* si presentano con le percentuali maggiori nei siti di Milano e Malcontenta, mentre i *Flavobacterales* sono sempre presenti in percentuale leggermente maggiore nel sito di Via Lissa.

Nel periodo primaverile nei siti Veneziani vi è l'incremento della percentuale dei *Rhodobacterales*, tipici degli ambienti delle acque costiere temperate (Dang et al., 2008).

A Milano sono invece i cloroplasti a presentare le percentuali maggiori.

9.2 INDICE DI SHANNON

Attraverso l'impiego di PRIMER 6[®] (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research) è stato calcolato l'indice di Shannon nei diversi siti di campionamento. L'indice di Shannon nella stazione di Via Lissa presenta delle variazioni stagionali, la massima diversità si ha nel periodo autunnale e la minima diversità nel periodo di campionamento primaverile.

Tab. 9.2. Valori di H' nella stazione di Via Lissa.

H'	media	Estate	Autunno	Inverno	Primavera
Via Lissa	3,70	3,67	3,85	3,83	3,45

Nella stazione di campionamento di Malcontenta l'indice di Shannon presenta dei valori inferiori rispetto a quelli della stazione di Via Lissa. La diversità maggiore si ha nel periodo invernale, la minore nel periodo estivo.

Tab. 9.3. Valori di H' nella stazione di Malcontenta.

H'	media	Estate	Autunno	Inverno	Primavera
Malcontenta	3,18	3,11	3,02	3,33	3,27

Nella stazione di campionamento di Milano la diversità si mantiene alta, presentando delle differenze stagionali abbastanza marcate con il massimo in autunno e il minimo in inverno.

Tab. 9.4. Valori di H' nella stazione di Milano.

H	media	Estate	Autunno	Inverno	Primavera
Milano	3,53	3,72	3,88	3,08	3,44

Nella stazione di campionamento di Venezia la variabilità è alta, il massimo si raggiunge in inverno, il minimo in primavera.

Tab. 9.5. Valori di H' nella stazione di Venezia

H	media	Autunno	Inverno	Primavera
Venezia	3,81	3,77	3,99	3,66

La maggiore variabilità, fra le stazioni, si raggiunge nel sito del centro storico di Venezia, dove è stato campionato il TSP, il particolato totale.

Nelle stazioni in cui è stato campionato il PM₁₀ la massima variabilità si riscontra nel sito di Via Lissa.

Si può inoltre notare come nel sito milanese il minimo di variabilità si riscontri in inverno, mentre nelle stazioni dell'area veneziana in quello stesso periodo la variabilità presenti dei valori piuttosto elevati (3,83 nel sito di via Lissa; 3,33 nel sito di Malcontenta; 3,99 nel sito di Venezia).

Con i valori giornalieri di H' e con i valori ottenuti dalle determinazioni chimiche si è costruita una matrice di correlazione al fine di valutare eventuali relazioni fra la variabilità della componente batterica e delle variabili chimiche.

Per $p < 0,05$ sono risultati significative:

Tab. 9.6. Valori significativi ($p < 0,05$) della matrice di correlazione fra i valori di H' e le specie chimiche analizzate.

Via Lissa		Malcontenta		Milano		Venezia	
H'	1,00	H'	1,00	H'	1,00	H'	1,00
Fe	0,49	Al	0,41	S	-0,58	Zn	0,52
K	0,46	Fe	0,61	As	-0,40	Cu	0,43
Ti	0,43	Ca	0,64	Cl ⁻	-0,46	Ba	0,51
Cr	0,41	Ti	0,55			Ni	-0,47
Mn	0,55	Cr	0,38			Cl ⁻	-0,47
Zn	0,40	Mn	0,37			Na ⁺	-0,54
Cu	0,47	Cu	0,42			Mg ²⁺	-0,66
Ba	0,36	V	0,38				
Ag	0,58	Co	0,53				
Ni	0,42	Ca ²⁺	0,64				
Mg ²⁺	-0,36						

Come si può osservare nella stazione di Via Lissa vi è una relazione diretta fra l'indice di Shannon e gli elementi Fe, K, Ti, Cr, Mn, Zn, Cu, Ba, Ag, Ni, mentre vi è una relazione inversa con lo ione Mg²⁺.

Nel sito di Malcontenta sono presenti solo casi di relazione diretta fra l'indice di Shannon e Al, Fe, Ca, Ti, Cr, Mn, Cu, V, Co e lo ione Ca²⁺.

Nel sito di Milano sono presenti solo casi di relazione inversa, con S, As e lo ione Cl⁻.

Nel sito di Venezia vi è una correlazione diretta fra Zn, Cu, Ba e inversa con Cl⁻, Na⁺, Mg²⁺. La significativa correlazione inversa con lo ione cloro appare particolarmente interessante, in quanto è spesso considerato un disinfettante.

E interessante notare come nei siti dell'area veneziana, in particolare quelli di Via Lissa e Malcontenta, vi siano delle correlazioni positive dell'indice di Shannon con gli stessi elementi (Fe, Ti, Cr, Mn, Cu). Quest'ultimo elemento è significativamente correlato con l'indice di Shannon anche nel sito di Venezia.

Nickel e bario sono invece significativamente correlati nei due siti veneziani di Via Lissa e Venezia.

9.3 DETERMINAZIONI CHIMICHE

Le determinazioni chimiche sono state condotte su tutti i campioni raccolti durante i periodi di campionamento per un totale di 119 campioni di cui 95 di PM₁₀ (32 campioni nel sito di Milano, 32 campioni nel sito di Via Lissa, 31 campioni nel sito di Malcontenta) e 24 campioni di TSP nel sito di Venezia.

Per le successive elaborazioni statistiche eventuali dati mancanti, vale a dire i valori inferiori al LOD (limit of detection), sono stati sostituiti con LOD/2.

9.3.1 IL PARTICOLATO ATMOSFERICO

La legislazione italiana, in ottemperanza a quella europea, fissa i limiti per il PM₁₀ a 50 µg/m³.

I valori di PM₁₀ sono stati rilevati nel sito di Via Lissa e nel sito di Malcontenta per l'area Veneziana, mentre nell'area Milanese sono stati richiesti i dati da ARPA Lombardia, la quale ha indicato nella loro stazione di monitoraggio Pascal-Città Studi la più simile alla situazione presente nella stazione di campionamento predisposta dall'Università Milano Bicocca in Via Roberto Cozzi, per lo svolgimento di questo lavoro di ricerca.

Le determinazioni del PM₁₀ sul sito di Via Lissa e Malcontenta sono state eseguite per via gravimetrica, mentre le determinazioni del PM₁₀ del sito Milanese di Pascal-Città Studi sono state effettuate con una microbilancia oscillante e attenuazione della radiazione beta, i cui risultati sono stati corretti con un opportuno fattore al fine di eliminare l'errore indotto dell'evaporazione di materiale volatile su questa tipologia di strumenti (ARPA Lombardia 2011).

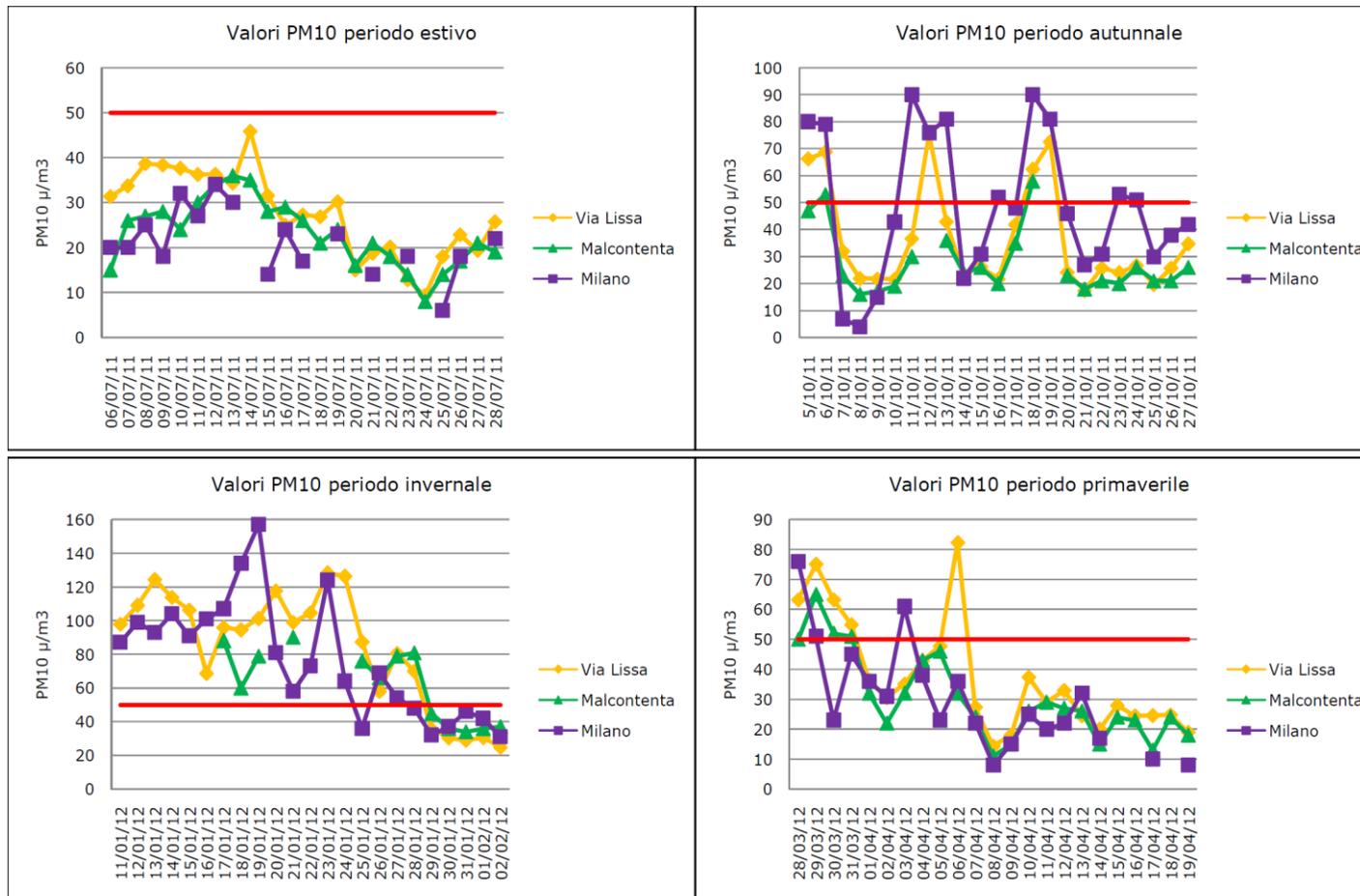


Fig. 9.7. Valori giornalieri assunti dal PM_{10} nei periodi di campionamento. Le scale sono differenti per permettere una migliore visualizzazione.

Come si può osservare dai grafici l'andamento del PM₁₀ nei siti di campionamento è abbastanza omogeneo, tranne alcuni episodi in cui le concentrazioni, soprattutto nei siti di Via Lissa e Milano Pascal-Città Studi, sono maggiori rispetto alle altre due stazioni.

Si può notare inoltre, che le concentrazioni seguono i noti andamenti stagionali, con i valori massimi nel periodo invernale e minimi nel periodo estivo.

L'abbassamento dei valori di concentrazione nel periodo invernale che si rileva a partire dal 28 gennaio e che riporta i valori al di sotto della soglia del limite di legge è dato nell'area veneziana dall'arrivo di un forte vento di bora e nell'area milanese da fenomeni piovosi.

9.3.2 ANALISI ELEMENTARE

Gli elementi analizzati tramite le metodologie di analisi elementare sono state ordinate in base alle concentrazioni, date dalle conoscenze geochimiche, degli elementi presenti sulla crosta terrestre.

Gli elementi sono quindi stati ordinati come segue:

- Elementi maggiori: tutti quegli elementi presenti in concentrazioni aventi percentuali superiori all' 1% (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, Mg, K),
- Elementi minori: tutti quegli elementi presenti in concentrazioni aventi percentuali variabili fra l' 1% e lo 0,1% (Ti, Mn, Ba,)
- Elementi in traccia: tutti quegli elementi presenti in concentrazioni aventi percentuali inferiori allo 0,1% (Sr, S, V, Cr, Rb, Ni, Zn, Cu, Co, Li, Pb, Be, As, Mo, Cd, Sb, Bi e Ag).

Gli elementi possono poi essere classificati secondo le definizioni.

- Elementi litofili, atmofili, biofili e talassofili, quando si rinvencono tendenzialmente legati all'ossigeno come ossidi e silicati (K, Ca, Mn, Ti, Zr, Sr, Ge, Br).
- Elementi siderofili: quando tendono ad assumere comportamento metallico, con affinità alla fase ferro-nickel (Fe, Cr, Co, Mo, Ni, Pt).
- Elementi calcofili: quegli elementi che tendono a concentrarsi come solfuri (Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Sn, Sb, Hg, Ti, Pb, Bi) (Fornasieri, 1994).

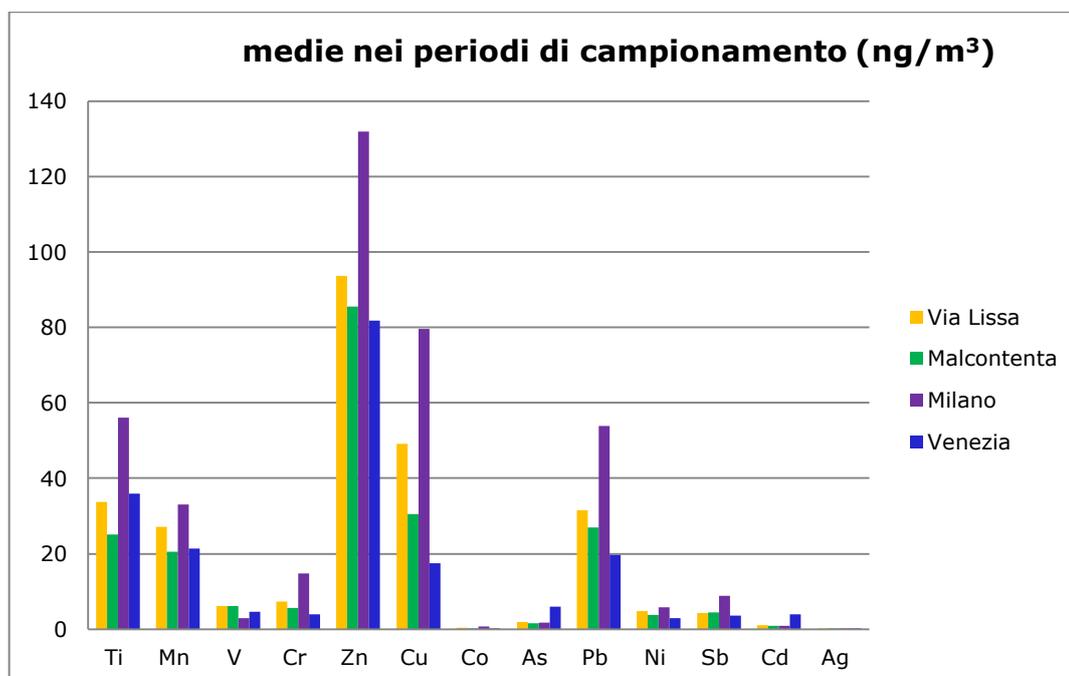
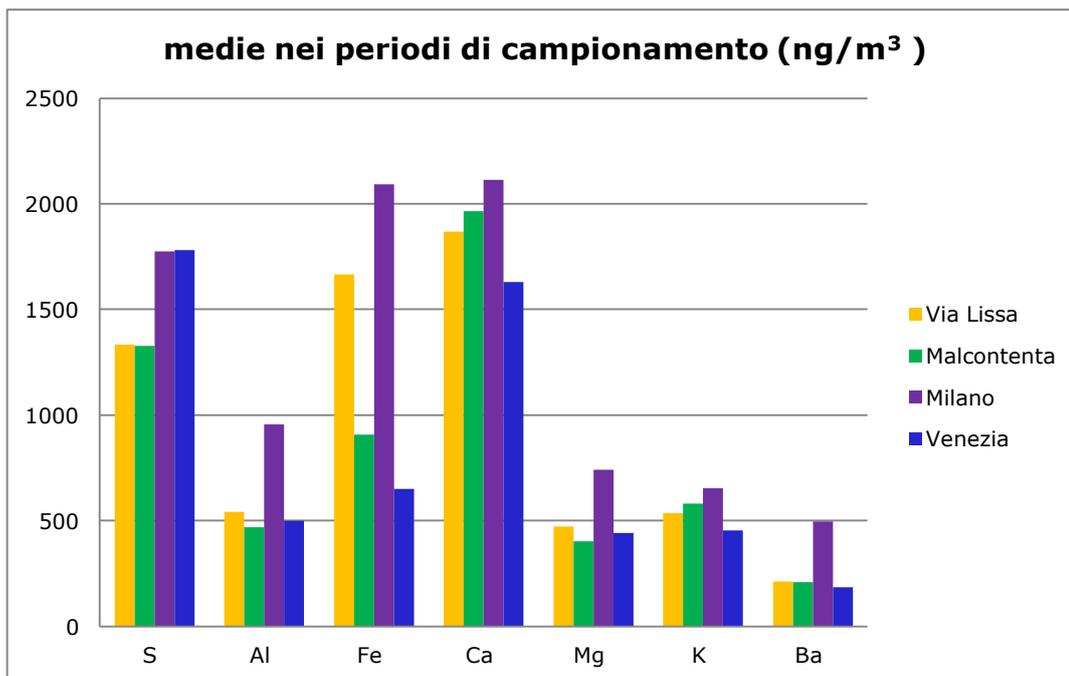


Fig. 9.8. Grafici sintetizzanti il confronto fra le medie, sui periodi di campionamento.

Per questa prima sintesi sono stati riportati negli stessi grafici sia i risultati derivati dalle analisi dei campioni di PM₁₀ di Via Lissa, Malcontenta e Milano; sia i risultati derivati dai campioni di TSP di Venezia.

Come si può osservare lo zolfo e il bario, nonostante siano classificati come elementi in tracce e minore sono presenti in concentrazioni piuttosto elevate in aria.

Il bario, in associazione con lo zinco, che fra gli elementi minori presenta anch'esso valori piuttosto elevati, solitamente viene associato alle emissioni da traffico, in particolare all'usura dei pneumatici (Querol et al., 2007).

L'alta concentrazione di ferro nel sito di Via Lissa può essere imputabile alla contiguità del campionario ai binari ferroviari, mentre nel sito Milanese esso, assieme a calcio ed alluminio, potrebbe essere imputato alla presenza di un vicino cantiere che potrebbe aver movimentato materiale crostale (Querol et al., 2001).

9.3.3 ANALISI DEI PRINCIPALI IONI INORGANICI SOLUBILI IN ACQUA

Gli ioni inorganici solubili in acqua presentano dei valori, in ng/m^3 nettamente superiori ai componenti elementari, in percentuale essi raggiungono circa il 50-55% del peso totale della frazione analizzata.

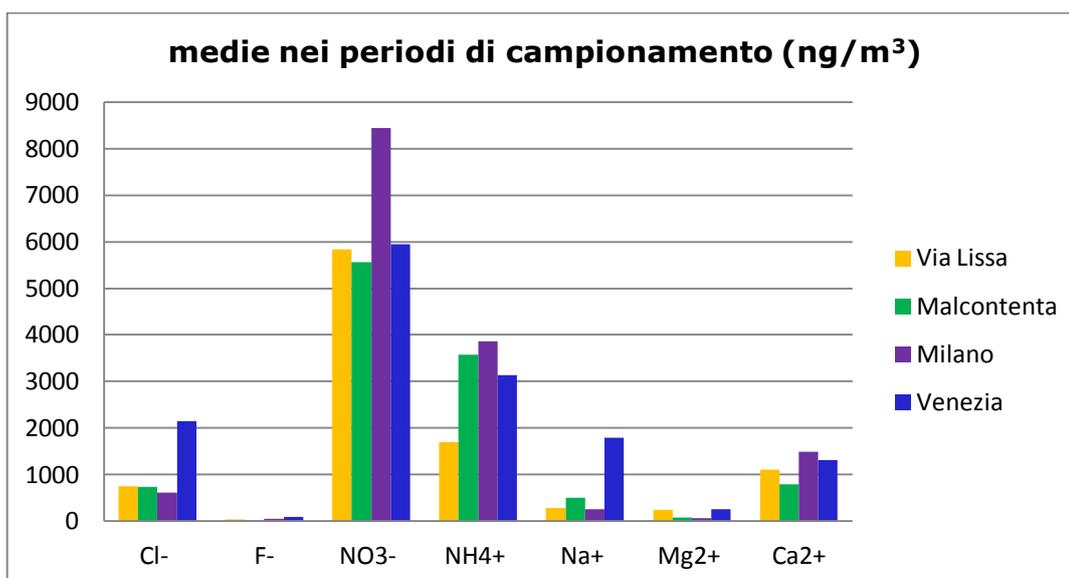


Fig. 9.9. Grafico sintetizzante le medie, sui periodi di campionamento

Come prima si è deciso di rappresentare nello stesso grafico sia i risultati derivati dalle analisi dei campioni di PM_{10} , sia i risultati derivati dai campioni di TSP.

Le medie dei nitrati sono estremamente elevate in tutti e quattro i siti di campionamento, con i massimi raggiunti a Milano nelle stagioni autunnali ed invernali. Essi solitamente sono di origine secondaria, dovuti all'ossidazione dei loro gas precursori (NO_x) emessi da svariate attività antropiche (Guo et al. 2012; Deshmukh et al., 2012).

Interessanti sono anche le concentrazioni degli ioni sodio e cloro della stazione di campionamento veneziana, che potrebbero essere legati alla generazione di spray marino (Querol et al., 2006).

9.3.4 ANDAMENTO STAGIONALE DELLE SPECIE CHIMICHE ANALIZZATE

9.3.4.1 Sito di via Lissa

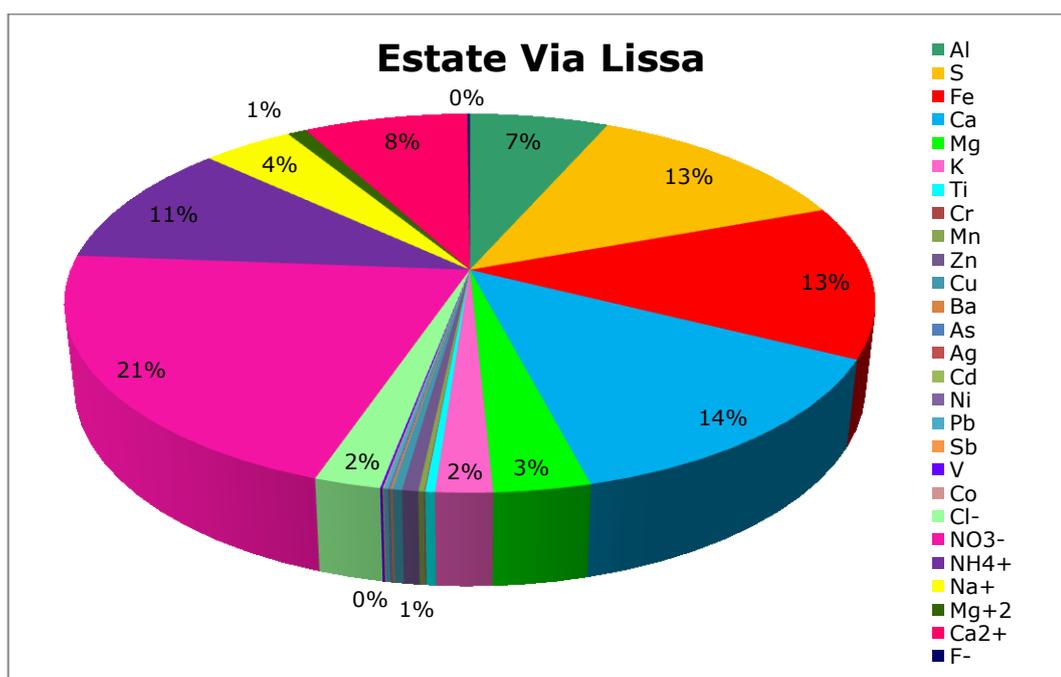


Fig. 9.10. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Via Lissa nel periodo estivo.

In questo grafico sono sintetizzate le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Via Lissa nel periodo estivo.

Le specie che si presentano in percentuali maggiori sono il nitrato (21%), seguito dal calcio elementare (14%), dal ferro e dallo zolfo (13%).

Il calcio elementare, lo ione calcio, l'alluminio ed il magnesio potrebbero essere dovuti ad una risospensione di materiale crostale (Querol et al., 2001).

Il ferro, presente con una percentuale del 13%, è probabilmente dovuto alla vicinanza del sito di campionamento con la ferrovia.

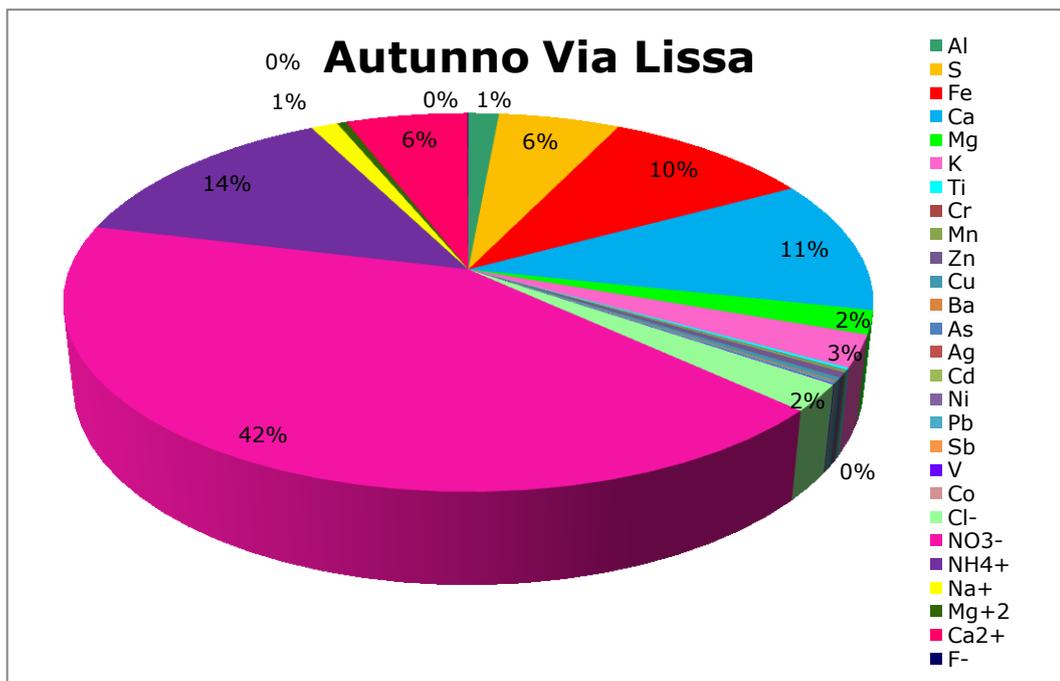


Fig. 9.11. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Via Lissa nel periodo autunnale.

La percentuale di nitrato, all'abbassarsi delle temperature del periodo autunnale, aumenta (Querol et al., 2001).

L'aumento del nitrato nei periodi autunnale ed invernale è dovuto alla forte influenza della temperatura e dell'umidità sulle reazioni chimico fisiche che permettono la trasformazione di gas precursori, quali gli NO_x, in nitrati. All'abbassarsi della temperatura queste reazioni sono favorite, permettendo un maggiore accumulo di nitrati in atmosfera (Squizzato et al., 2013).

Le percentuali di zolfo ed alluminio diminuiscono rispettivamente al 6% e all'1%.

Le percentuali di calcio elementare, ione calcio e ferro sono anch'esse in leggera diminuzione.

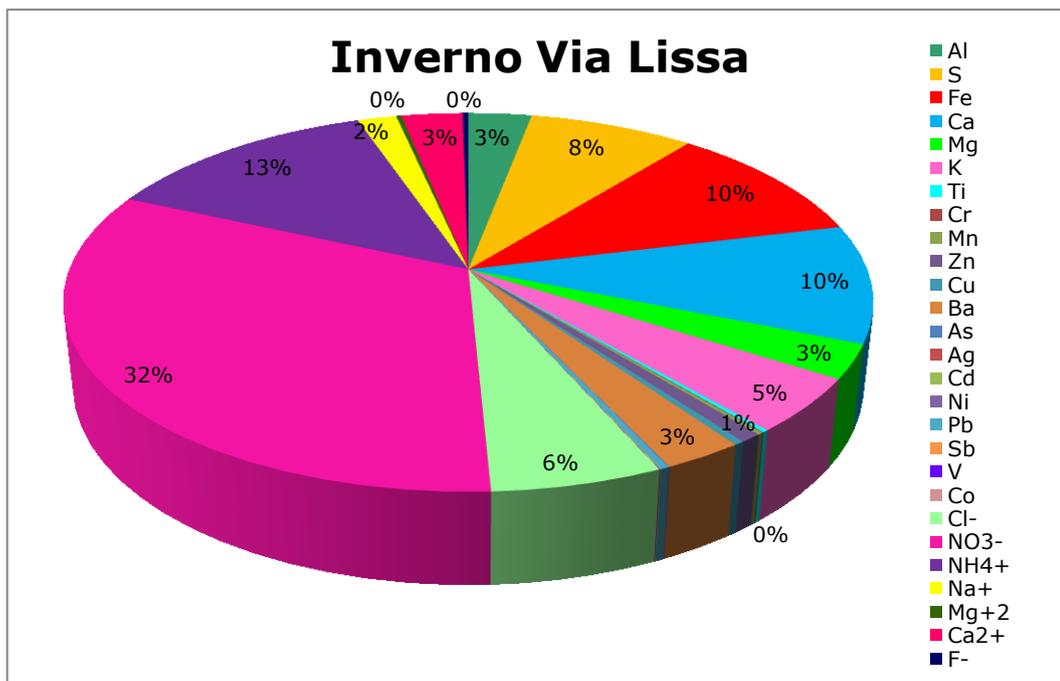


Fig. 9.12. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Via Lissa nel periodo invernale.

In grafico 9.X mostra come nel periodo invernale la percentuale di nitrato, pur mantenendosi piuttosto elevata (32%), rispetto al periodo autunnale diminuisce. Questo è dovuto alle condizioni meteo delle ultime giornate di campionamento invernale, caratterizzate da un forte vento di bora.

Diminuisce la percentuale dello zolfo e dell'alluminio, mentre le percentuali di ammonio, calcio elementare, ione calcio e ferro, pur diminuendo, non subiscono una forte riduzione.

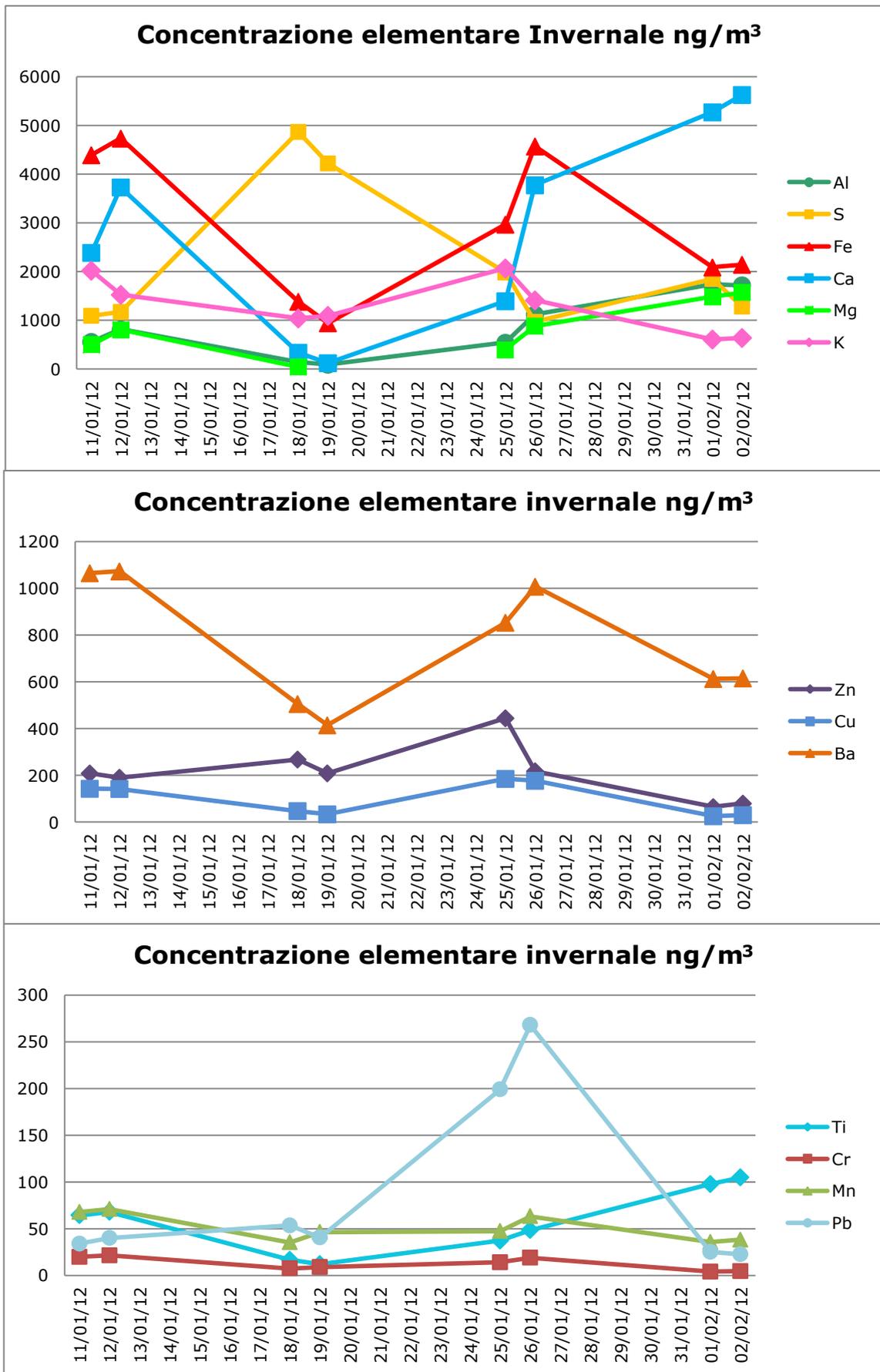


Fig. 9.13. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Via Lissa nel periodo invernale.

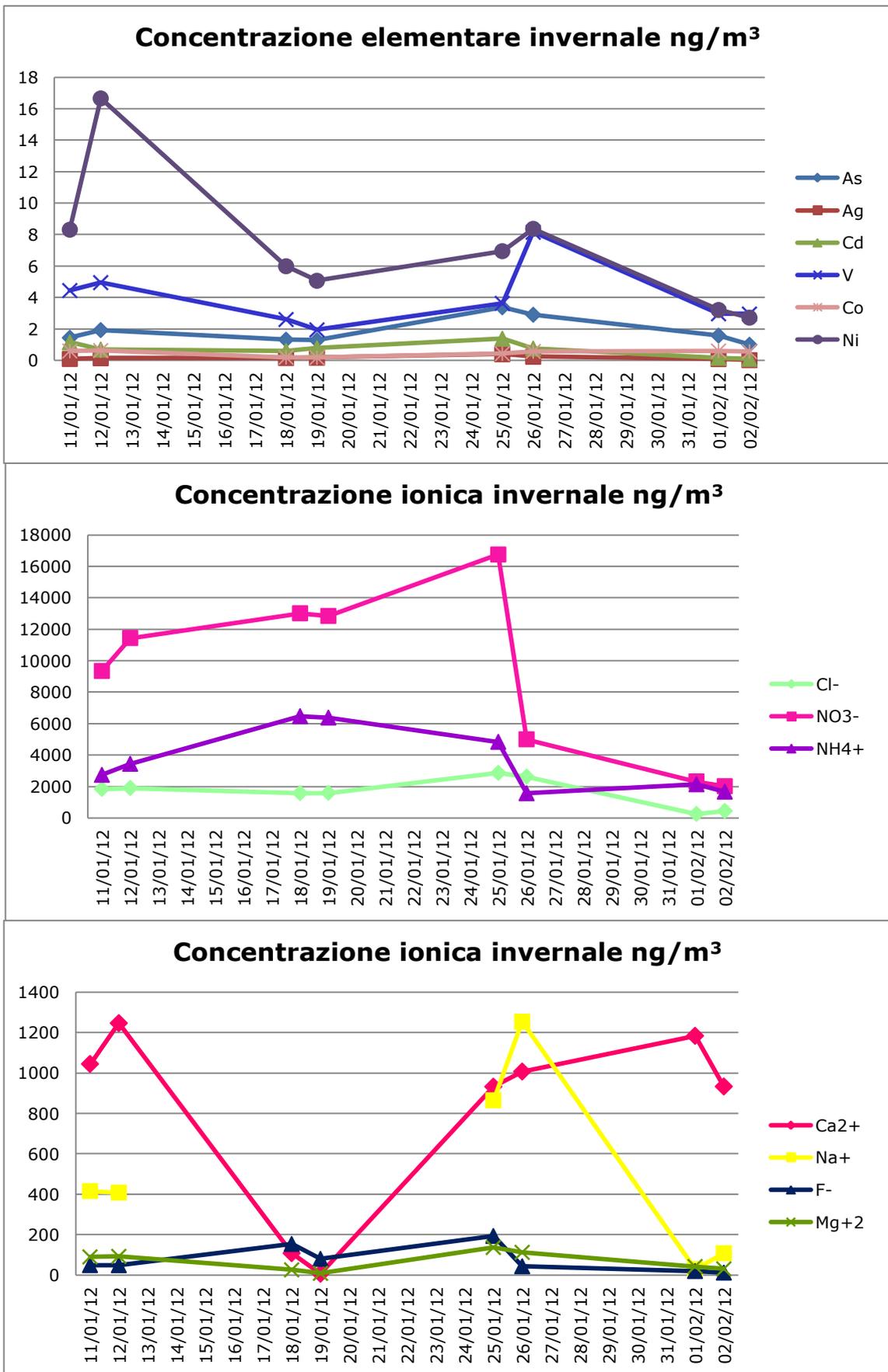


Fig. 9.14. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Via Lissa nel periodo invernale.

Durante il periodo invernale nel sito di Via Lissa si assiste ad una brusca diminuzione delle concentrazioni elementari e ioniche negli ultimi due giorni di campionamento a causa delle condizioni meteo caratterizzate da un forte vento di bora. È interessante notare invece come le specie definite "cristalli" quali alluminio, calcio elementare, magnesio elementare e titanio (Pandolfi et al., 2010).

La diminuzione delle concentrazioni che si riscontra nei giorni 18 e 19 gennaio potrebbe essere dovuta alle lievi precipitazioni del 18 gennaio.

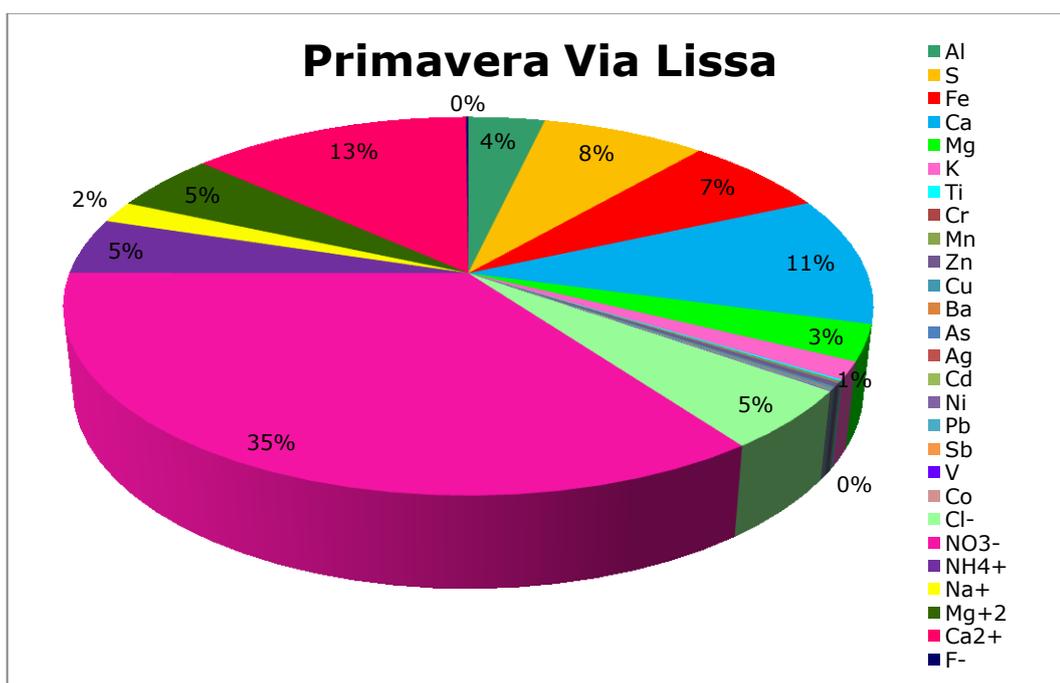


Fig. 9.15. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Via Lissa nel periodo primaverile del 2012.

La percentuale di nitrato, si mantiene piuttosto elevata (35%). Diminuisce la percentuale di ammonio (5%), mentre le percentuali di calcio elementare, zolfo, ione cloro e ferro, pur diminuendo, non subiscono una forte riduzione.

9.3.4.2 Sito di Malcontenta

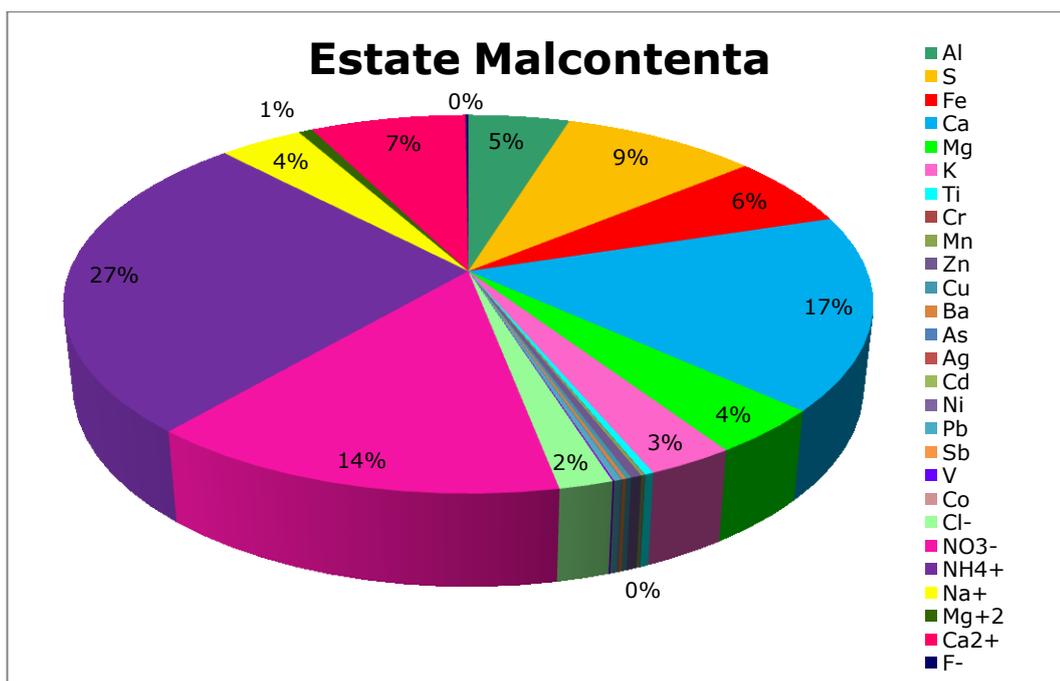


Fig. 9.16. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Malcontenta nel periodo estivo.

In questo grafico sono sintetizzate le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Malcontenta nel periodo estivo.

Le specie che si presentano in percentuali maggiori sono l'ammonio (27%), seguito dal calcio elementare (17%), dal calcio in forma ionica (7%), dallo zolfo (9%) e dal ferro (6%).

La percentuale del ferro nel sito di Malcontenta diminuisce rispetto al sito di Via Lissa.

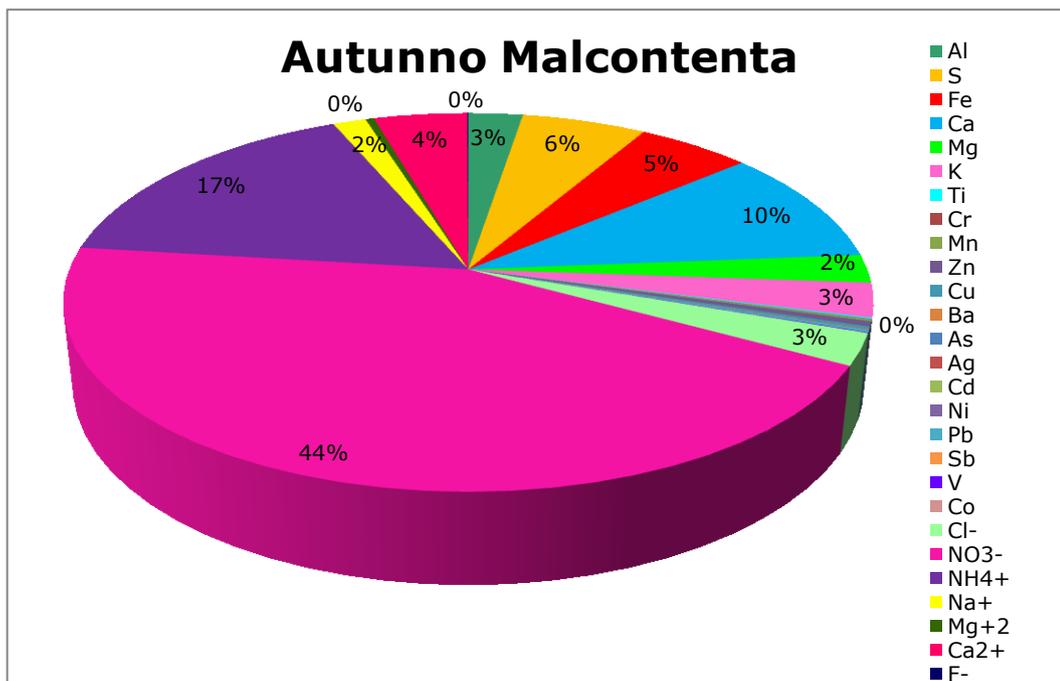


Fig. 9.17. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Malcontenta nel periodo autunnale.

Anche in questo caso la percentuale del nitrato, con l'abbassamento delle temperature, aumenta di più del doppio raggiungendo una percentuale del 44% (Querol et al., 2001).

Diminuisce di 10 punti percentuali l'abbondanza dell'ammonio, come diminuisce anche la percentuale del calcio elementare.

Diminuisce la percentuale dello zolfo e dell'alluminio, mentre le percentuali di cloro e potassio rimangono praticamente inalterate.

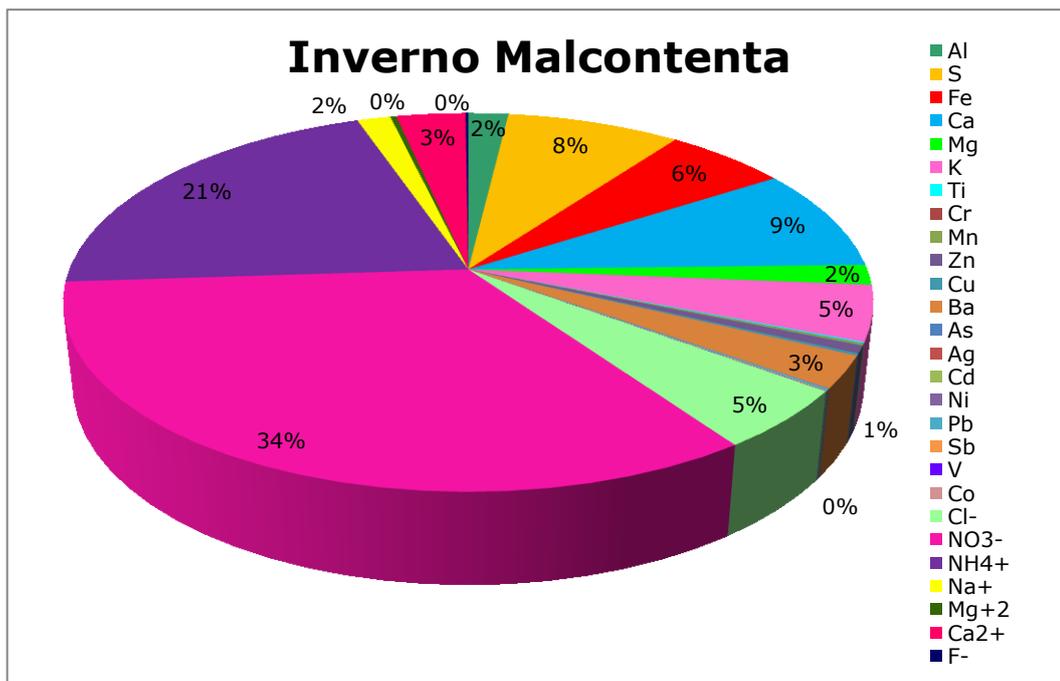


Fig. 9.18. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Malcontenta nel periodo autunnale.

Anche in questo caso la percentuale di nitrato, pur mantenendosi piuttosto elevata (34%), rispetto al periodo autunnale diminuisce. Come prima si suppone sia dovuto alle condizioni meteo delle ultime giornate di campionamento invernale, caratterizzate da un forte vento di bora. Diminuisce la percentuale dello zolfo, mentre le percentuali di ammonio, calcio elementare, ione calcio e ferro, pur diminuendo, non subiscono una forte riduzione. L'alluminio e il cloro, invece incrementano, anche se di pochissimo.

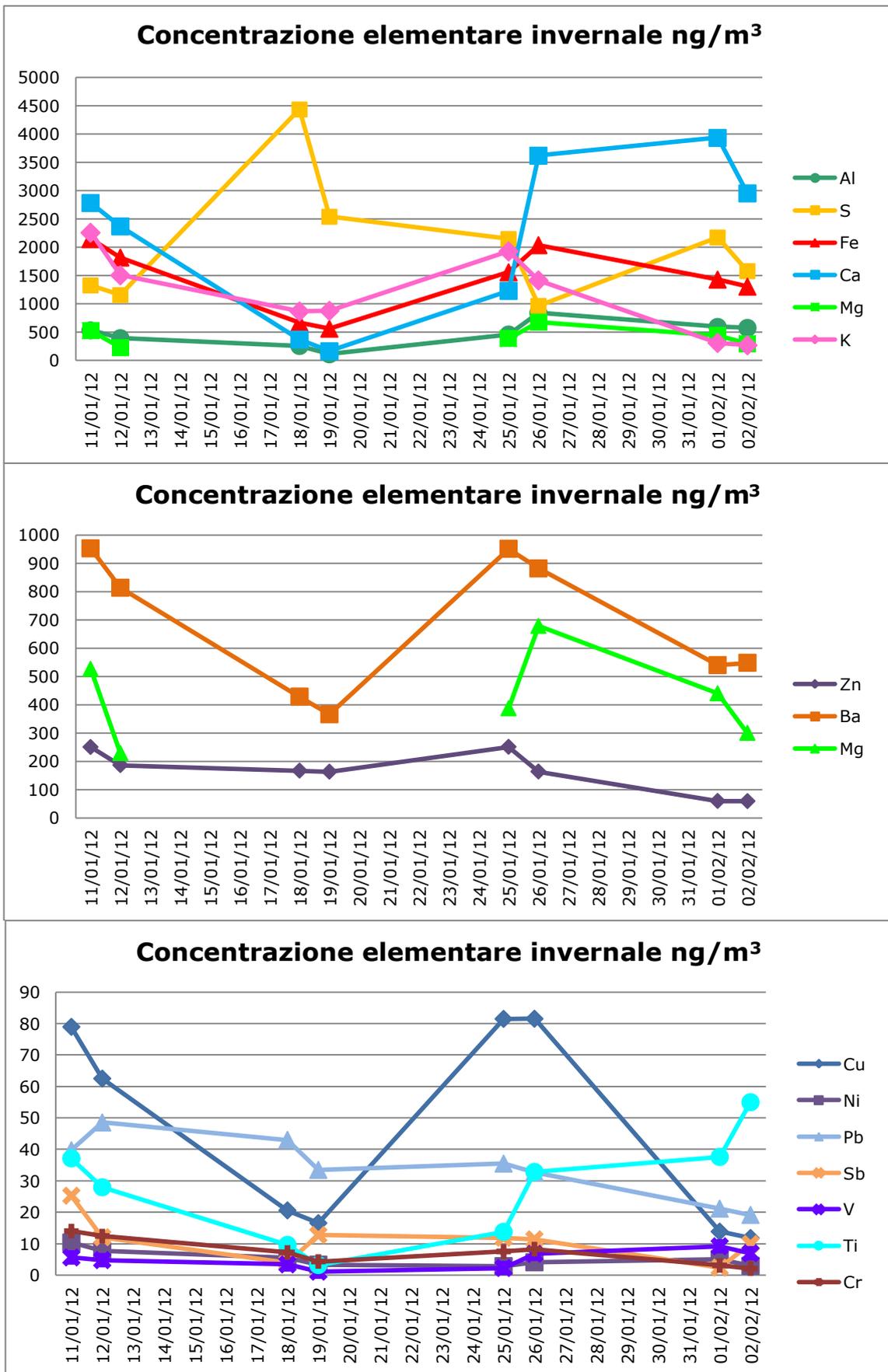


Fig. 9.19. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Via Malcontenta nel periodo invernale.

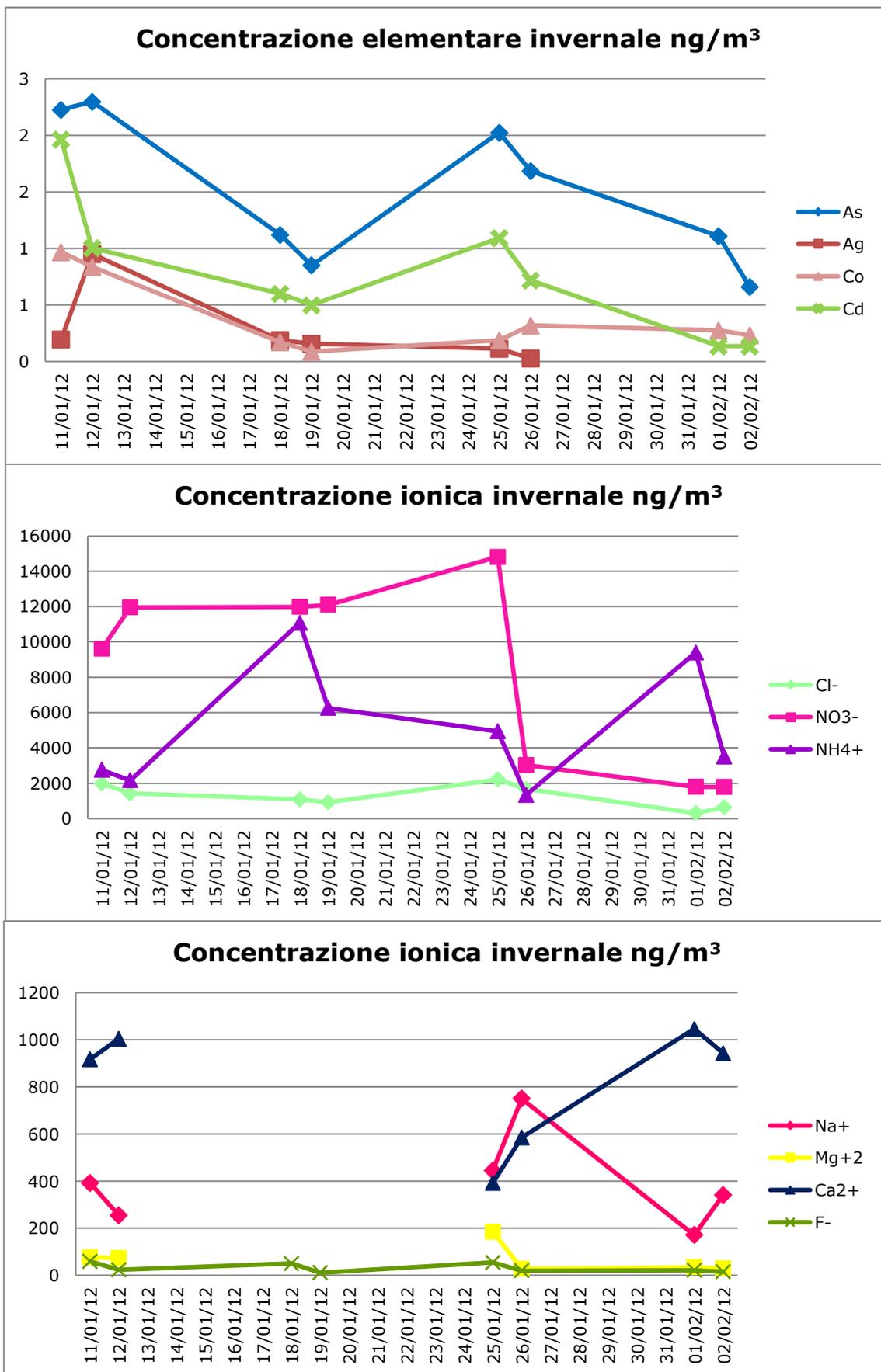


Fig. 9.20. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Malcontenta nel periodo invernale.

Anche nel sito di Malcontenta nel periodo invernale si assiste ad una diminuzione delle concentrazioni elementari e ioniche nei giorni 1 e 2 febbraio 2012 dovuta al vento ed una diminuzione nei giorni 18 e 19 gennaio 2012.

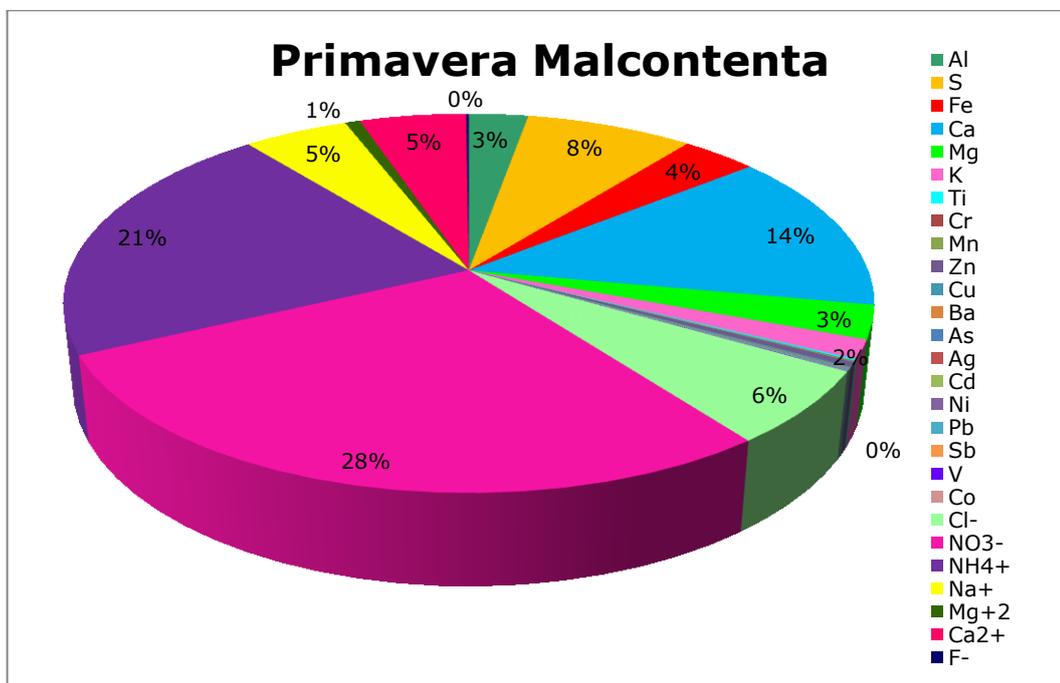


Fig. 9.21. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Malcontenta nel periodo primaverile.

La percentuale di nitrato, si mantiene piuttosto elevata (28%). La percentuale di ammonio rimane inalterata, mentre le percentuali di ione cloro e sodio, calcio elementare e in forma ionica aumentano. Le percentuali di zolfo rimangono inalterate.

9.3.4.3 Sito di Milano

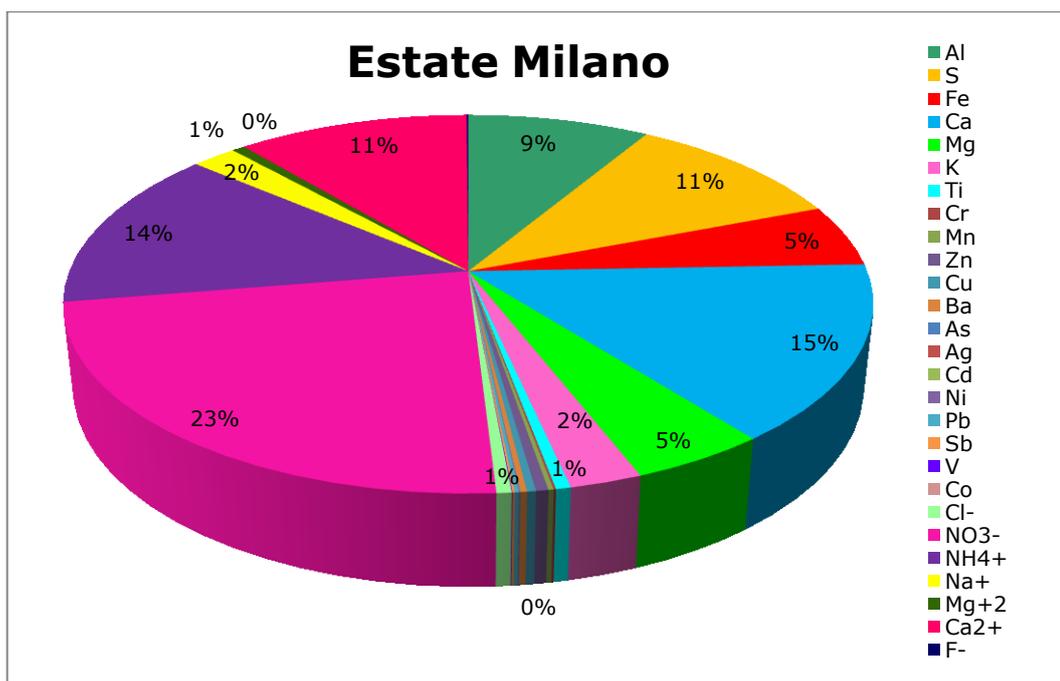


Fig. 9.22. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Milano nel periodo estivo.

In questo grafico sono sintetizzate le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Milano nel periodo estivo.

Come si può notare anche in questo caso le specie che si presentano in percentuali maggiori sono il nitrato (23%), seguito dal calcio elementare (15%), dall'ammonio (14%), dal calcio in forma ionica e dallo zolfo (11%).

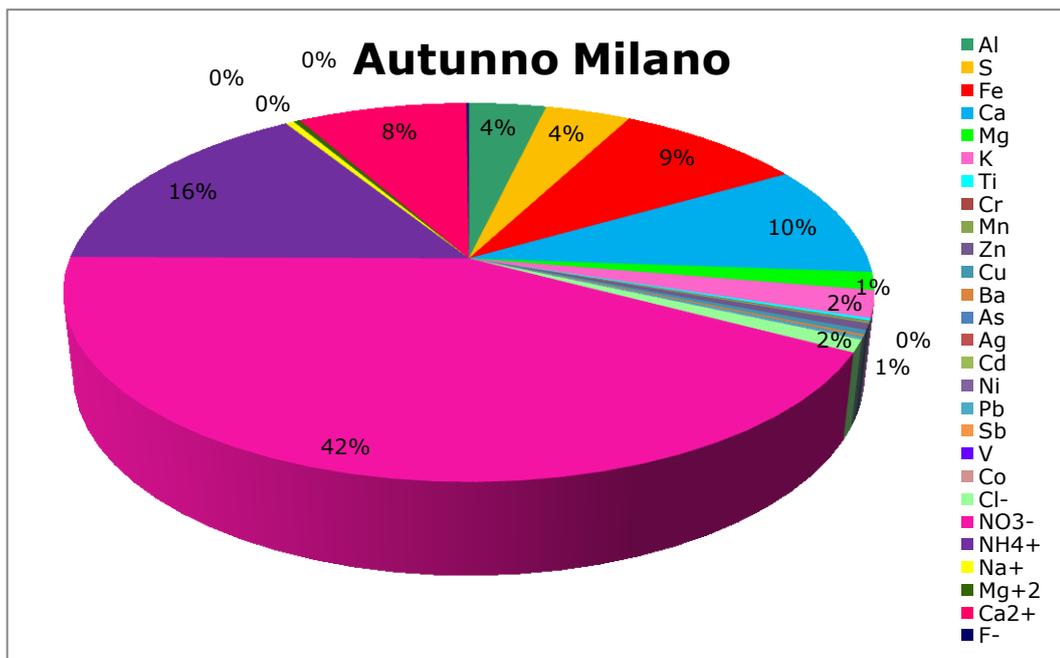


Fig. 9.23. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Milano nel periodo autunnale.

Come nei siti dell'area veneziana presi precedentemente in considerazione anche nel sito di Milano nel periodo autunnale la percentuale di nitrato, aumenta. Aumenta la percentuale dell'ammonio (16%), diminuisce la percentuale dello zolfo e dell'alluminio, del magnesio, ionica dello ione calcio e del calcio elementare.

La percentuale di ferro invece, aumenta.

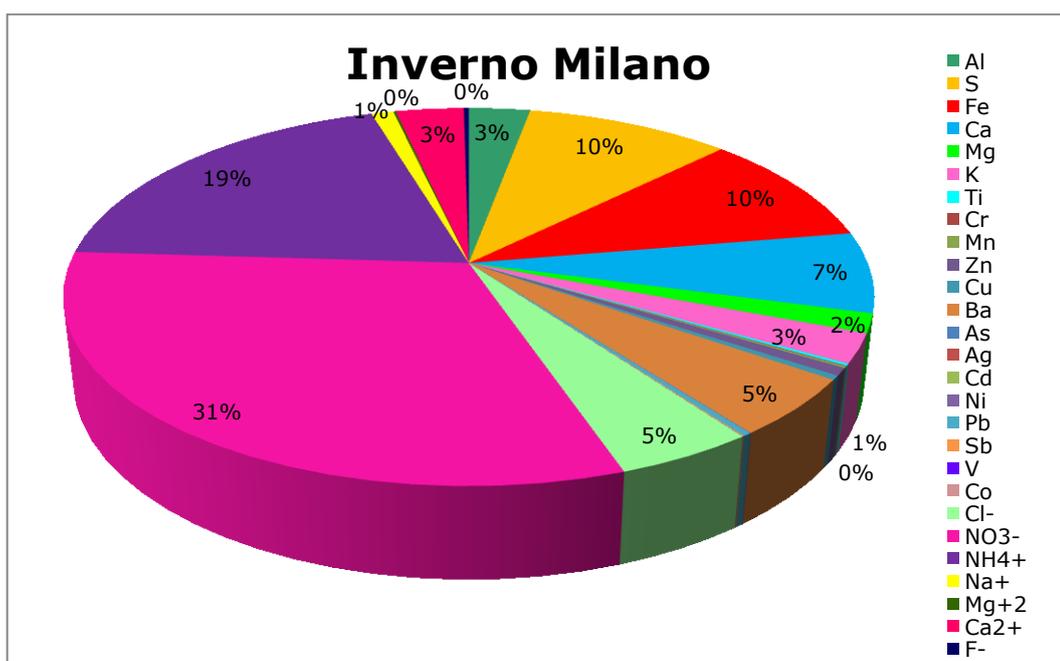


Fig. 9.24. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Milano nel periodo invernale.

La percentuale di nitrato anche in questo caso diminuisce rispetto al periodo autunnale.

Aumenta invece la percentuale di ammonio, di cloro, di zolfo, di ferro e soprattutto di bario, che aumenta di cinque punti percentuali. Quest'ultimo elemento potrebbe essere associato all'usura dei pneumatici o agli additivi impiegati nei veicoli (Querol et al., 2007, Rampazzo et al., 2008a).

Diminuisce la percentuale di alluminio, di calcio elementare e ione calcio.

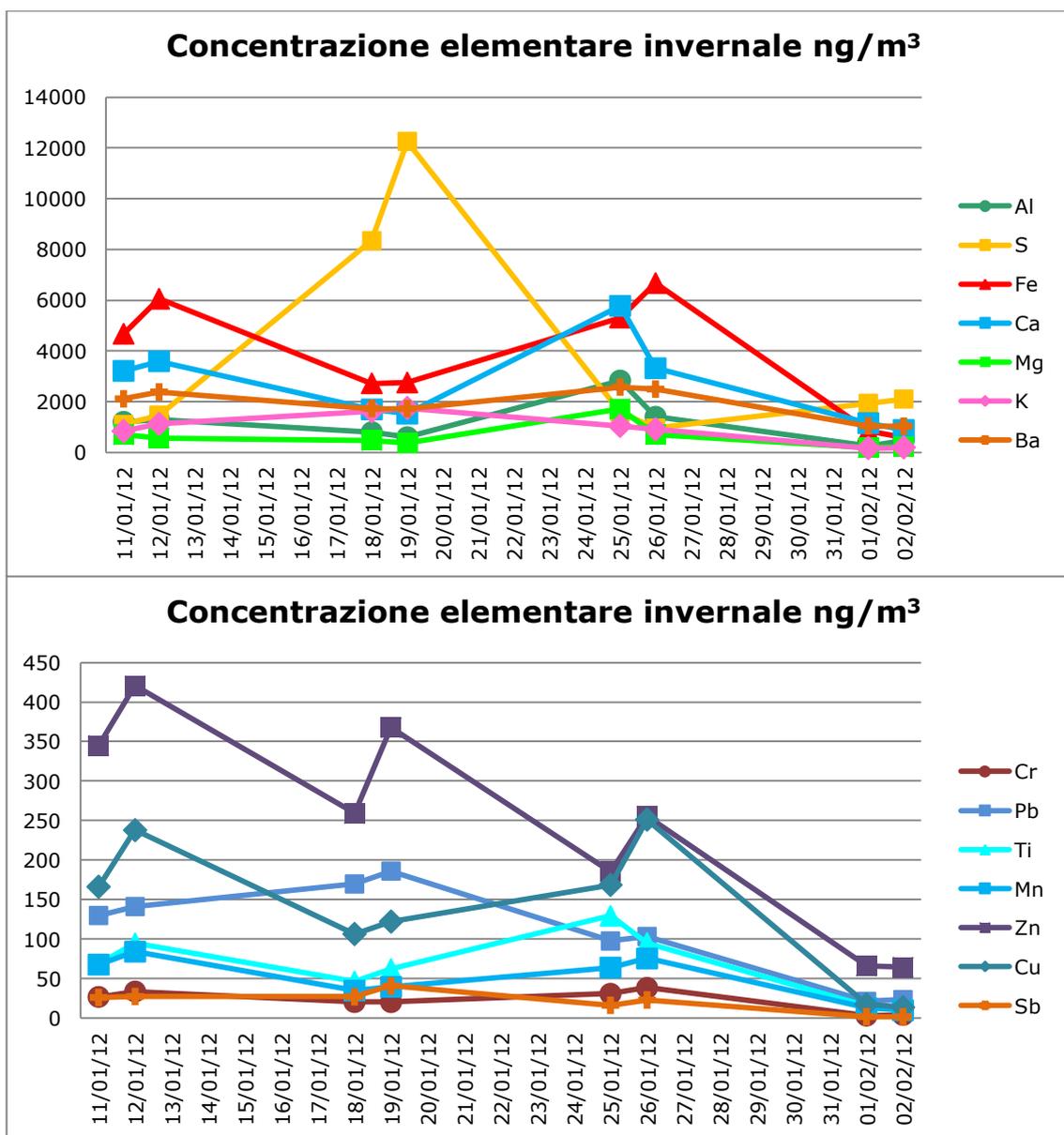


Fig. 9.25. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Milano nel periodo invernale.

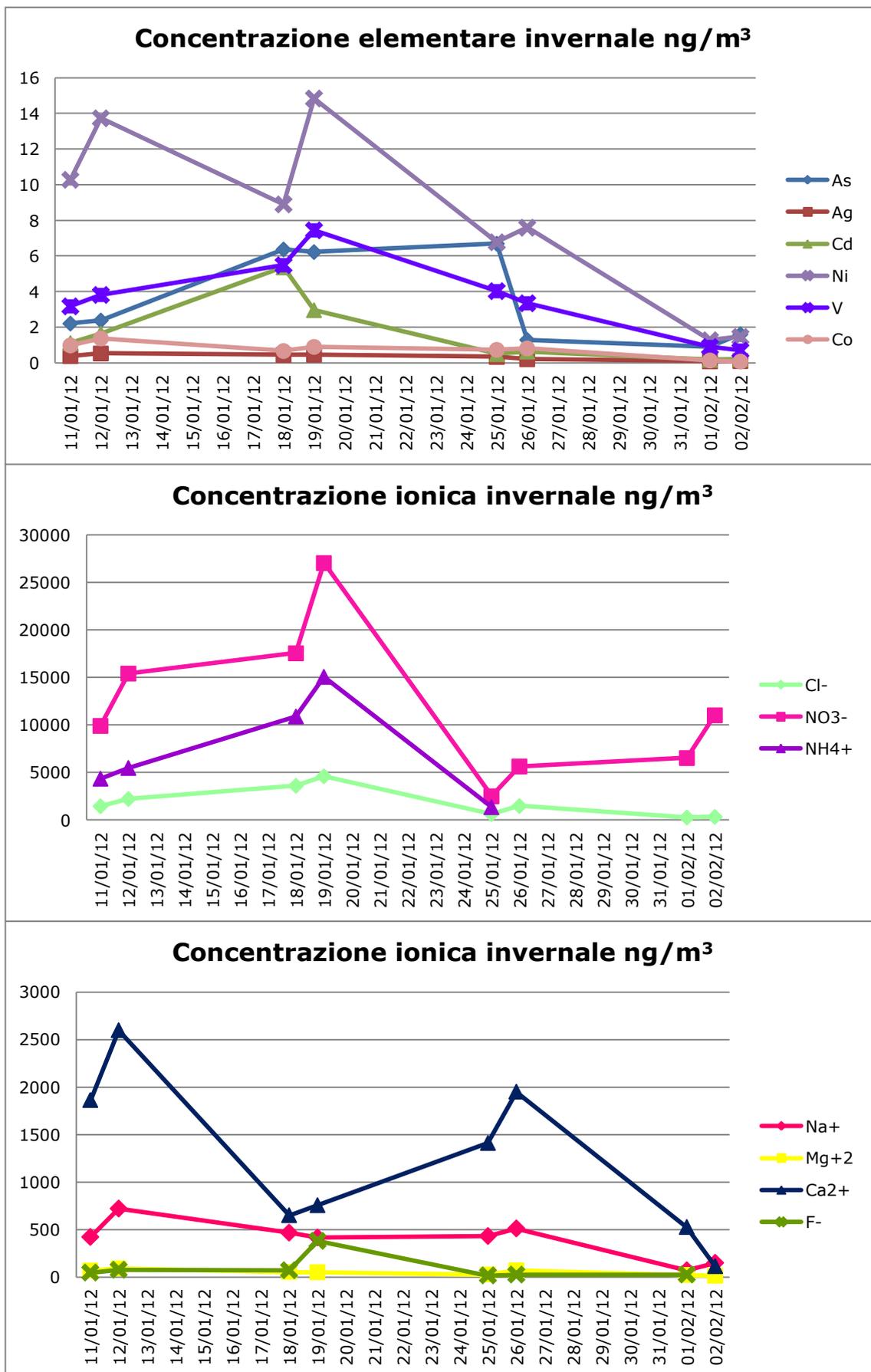


Fig. 9.26. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Milano nel periodo invernale.

Anche nel caso del sito di Milano le concentrazioni diminuiscono nelle ultime quattro giornate di campionamento.

Questo è dovuto al fatto che nel giorno 24 gennaio 2012 nell'area milanese si è alzato del vento e nei giorni 1 e 2 febbraio pioveva.

È interessante notare come, anche in questo caso, le concentrazioni di calcio, alluminio, magnesio e titanio, di probabile origine crostale (Pandolfi et al., 2010), si alzano leggermente nelle giornate di campionamento del 25 gennaio.

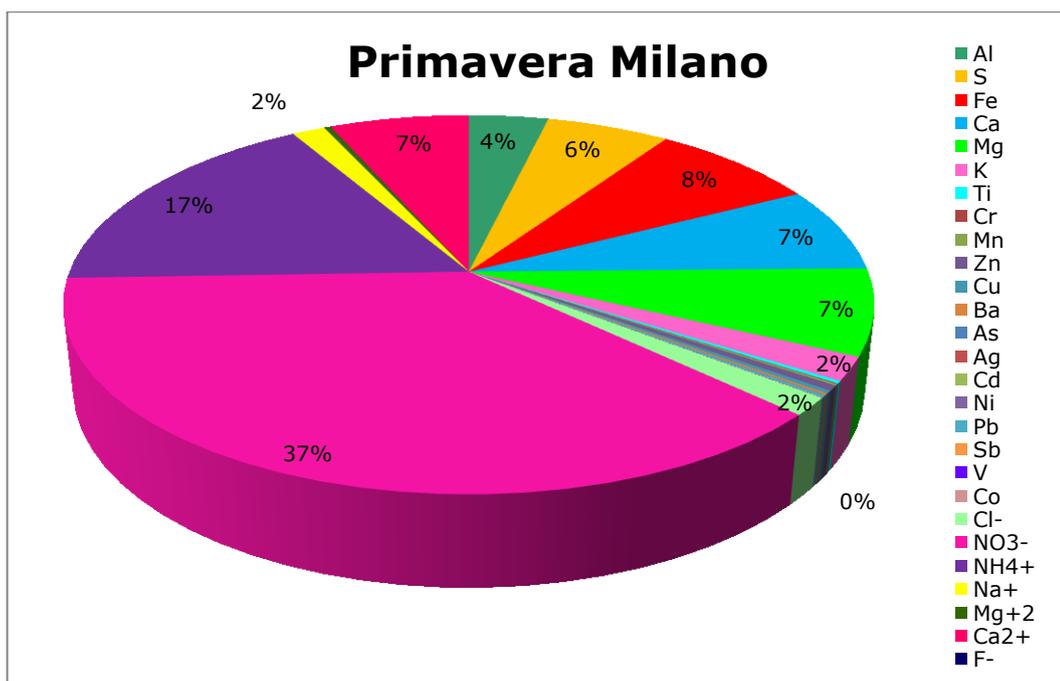


Fig. 9.27. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Milano nel periodo primaverile.

La percentuale di nitrato si mantiene piuttosto elevata (37%). La percentuale di ammonio, ione cloro, bario, zolfo, ferro, ione calcio diminuiscono, mentre la percentuale di calcio elementare rimane inalterata. Aumenta la percentuale di magnesio.

9.3.4.4 Sito di Venezia

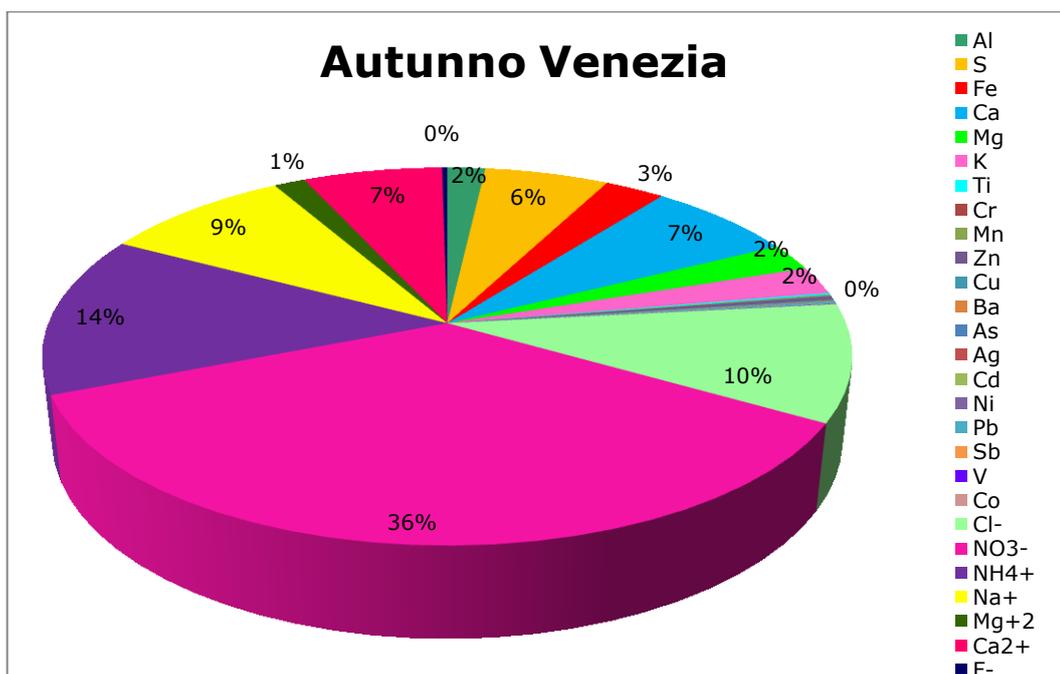


Fig. 9.28. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Venezia nel periodo autunnale.

Nel periodo autunnale, nel sito di Venezia la percentuale del nitrato di presenta piuttosto elevata (36%). Seguono l'ammonio (14%) lo ione cloro (10%) e sodio (9%) probabilmente originati dall'aerosol marino (Querol et al., 2006).

Sono poi presenti con circa le stesse percentuali lo ione calcio, il calcio, e lo zolfo.

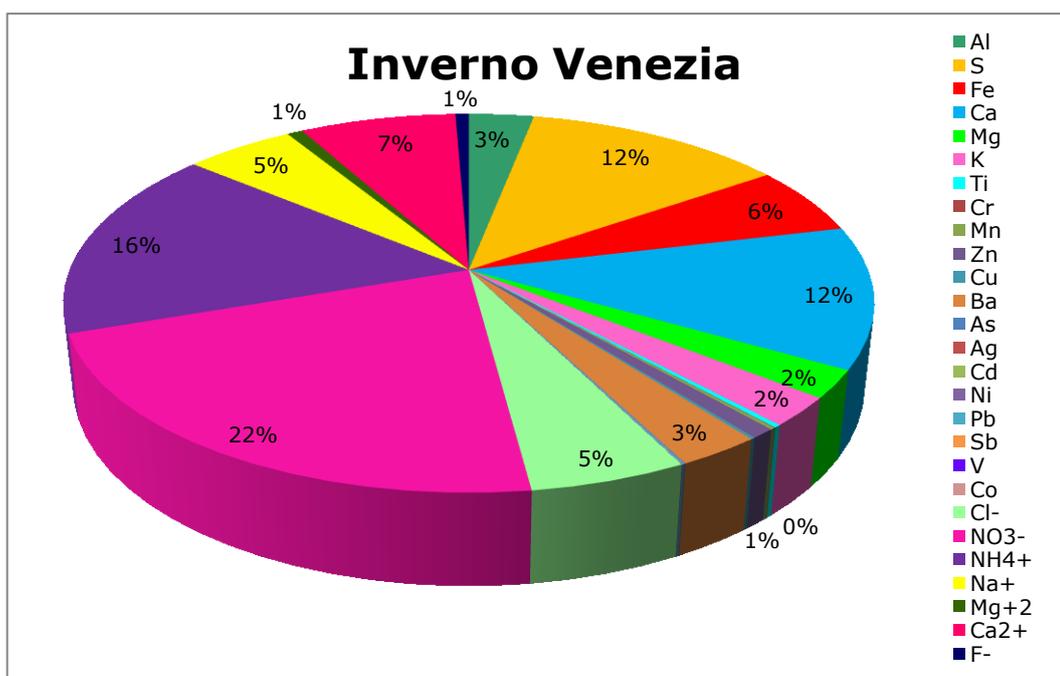


Fig. 9.29. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Venezia nel periodo autunnale.

Durante il periodo di campionamento invernale, come nelle altre stazioni di campionamento la percentuale dello ione nitrato diminuisce, mentre aumentano le percentuali di ione ammonio, di zolfo elementare, calcio ed alluminio. Diminuiscono anche le concentrazioni di ioni sodio e cloro.

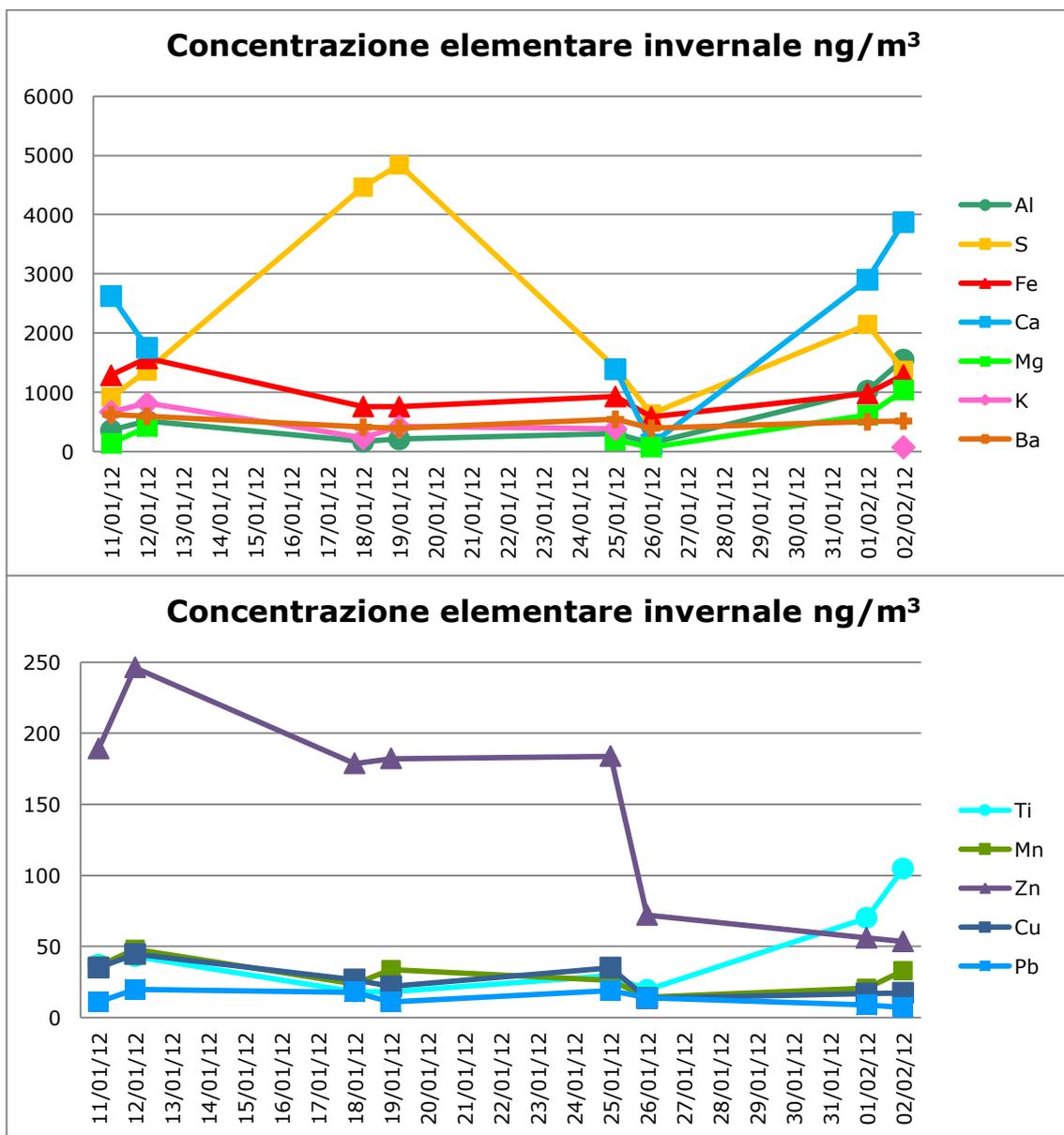


Fig. 9.30. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Venezia nel periodo invernale.

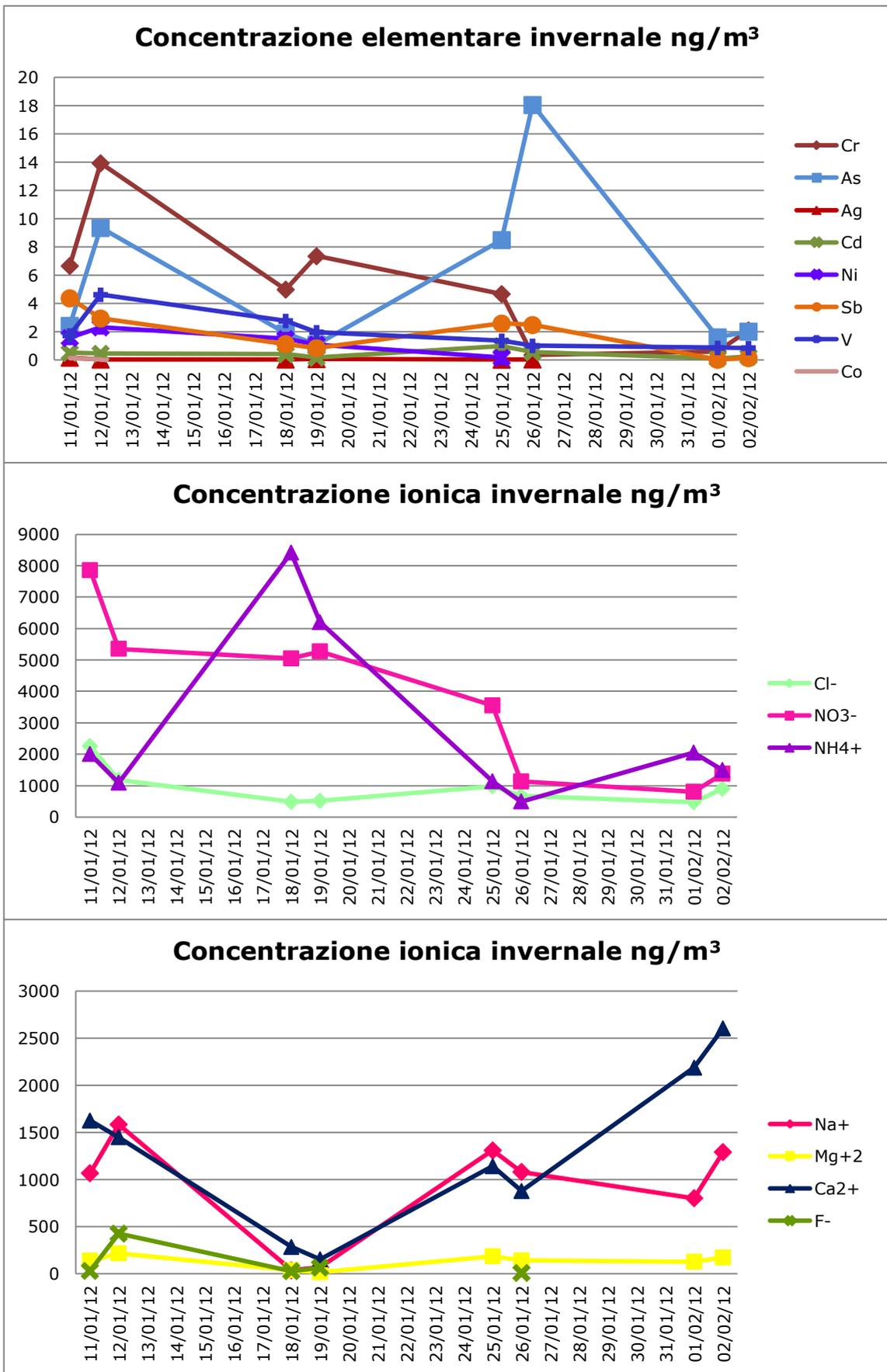


Fig. 9.31. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Venezia nel periodo invernale.

Anche in questo caso è possibile notare come nei giorni caratterizzati da vento di bora le concentrazioni degli elementi calcio, magnesio, alluminio e titanio, definiti elementi crostali (Pandolfi et al., 2010) si alzano.

Il giorno 26 gennaio si può osservare un picco di arsenico, con il raggiungimento della concentrazione di 18 ng/m³.

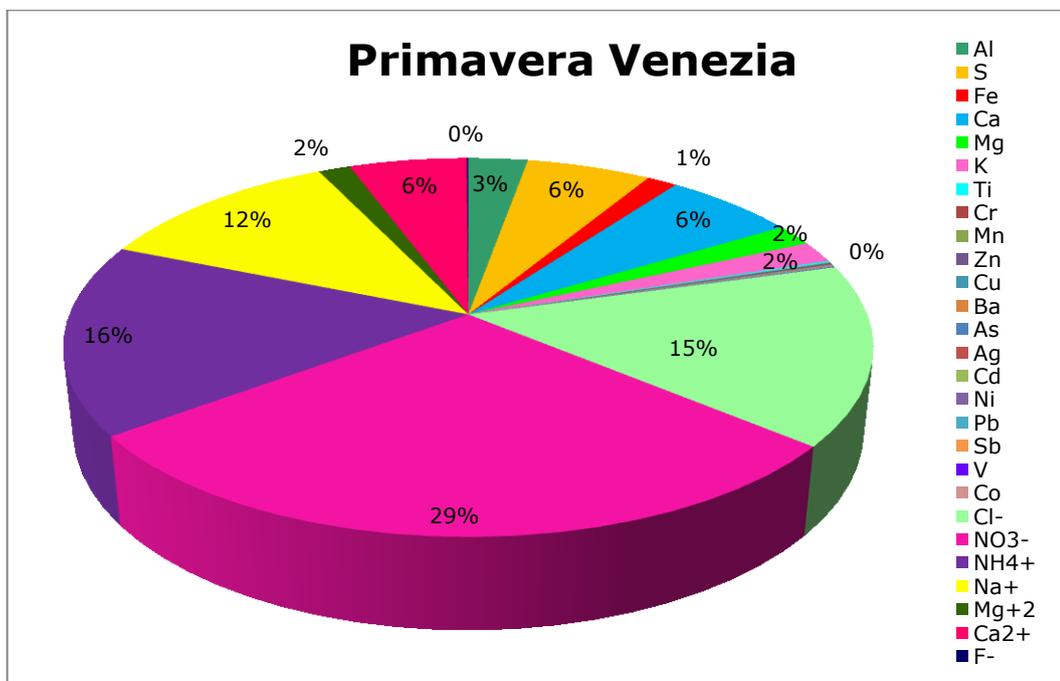


Fig. 9.32. Grafico sintetizzante le percentuali delle specie chimiche analizzate nel sito di Venezia nel periodo primaverile.

La percentuale di nitrato si mantiene piuttosto elevata (29%). La percentuale di ammonio e di alluminio rimangono inalterate, diminuiscono le percentuali di calcio e zolfo.

Aumentano le percentuali di ioni sodio e cloro.

9.3.5 CONFRONTO FRA LE STAZIONI

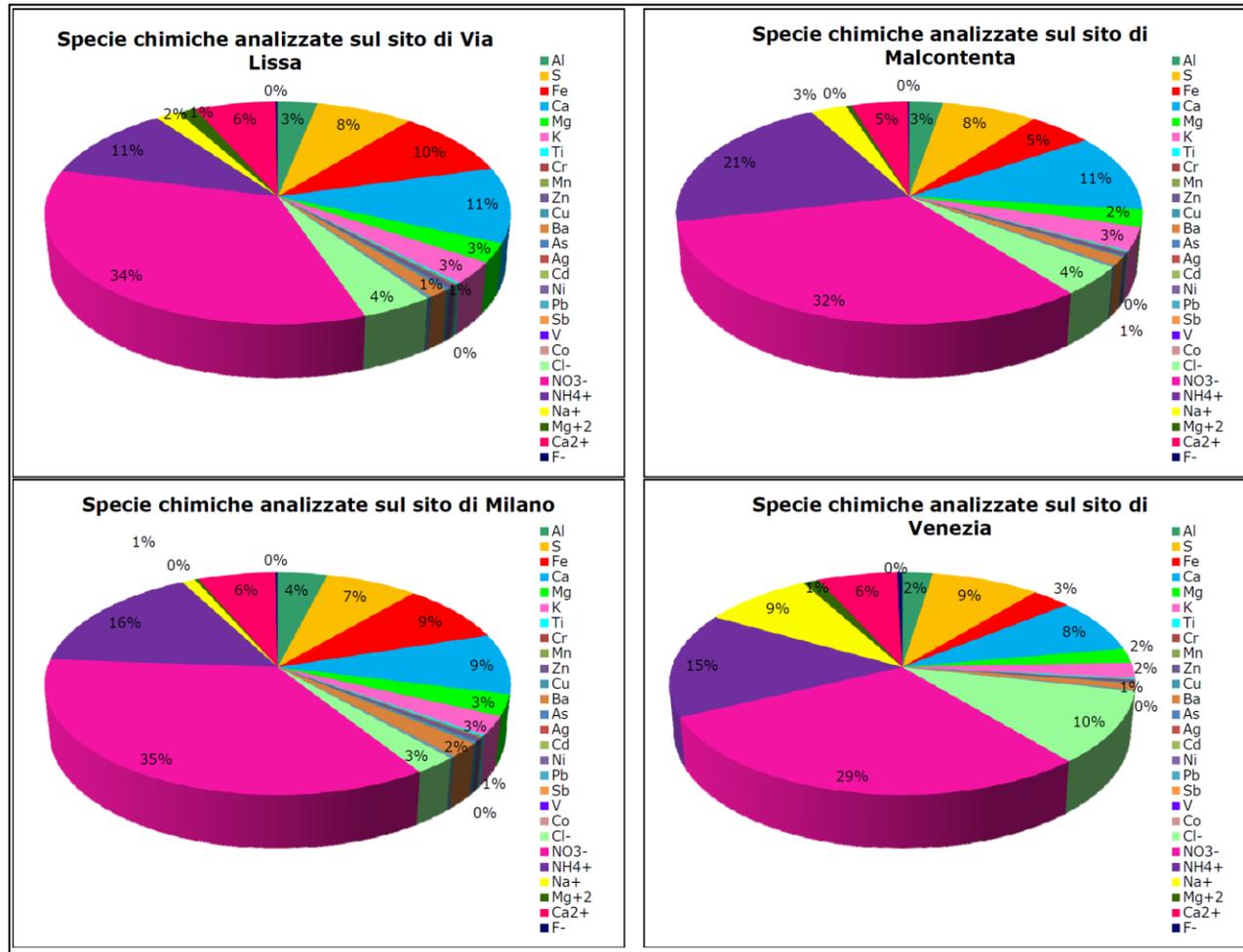


Fig. 9.33. Grafici sintetizzanti le percentuali delle specie chimiche analizzate nei siti di campionamento.

Come si può osservare dai grafici in figura 9.X le percentuali dello ione nitrato sono le più alte. Inoltre esse risultano essere abbastanza omogenee sui siti di campionamento di Via Lissa (34%), Malcontenta (32%), Milano (35%), mentre nel sito di Venezia la percentuale è inferiore (29%).

Anche nel caso dello zolfo e del calcio in forma elementare e ionica si hanno delle percentuali piuttosto simili fra i siti di campionamento,

La percentuale dello ione ammonio è abbastanza variabile fra i siti di campionamento, il ferro è presente in percentuale maggiore nei siti di Milano e Via Lissa.

È interessante notare come nel sito di Milano vi sia una percentuale maggiore di bario (3%) rispetto agli altri siti di campionamento, probabilmente imputabile all'usura dei pneumatici (Querol et al., 2007).

Nel sito di Venezia le percentuali di ione cloro (10%) e sodio (9%) sono più alte rispetto agli altri siti di campionamento, probabilmente dovute alla generazione di spray marino (Querol et al., 2006)

9.4 L'ANALISI DISCRIMINANTE

L'analisi discriminante è stata effettuata sugli Ordini di batteri che presentavano un'abbondanza relativa significativa, per avere la certezza che non vi fossero degli ordini non rinvenuti, e sulle specie chimiche analizzate.

Sugli Ordini selezionati e sulle specie chimiche, analizzate separatamente a causa della diversa natura del dato, è stata effettuata una rankizzazione al fine di normalizzarne la distribuzione.

Con questo approccio si è voluto tentare di vedere se vi fossero degli Ordini e delle specie chimiche "discriminanti" per questi 4 siti di campionamento, cioè che caratterizzano un singolo sito, o se vi siano degli ordini o specie chimiche ubiquitari. Questa distinzione avviene in base ai test di uguaglianza delle medie di gruppo, che permette di individuare quali siano gli Ordini e le specie chimiche discriminanti (che non accettano il test delle medie di gruppo, sig. <0.05) fra i gruppi e gli Ordini e le specie chimiche non discriminanti fra i gruppi (che accettano il test delle medie di gruppo, sig. >0.05). Le specie chimiche o gli ordini discriminanti possono essere considerati come presenti in modo discontinuo sull'area in esame e la loro sorgente di emissione potrebbe essere di tipo puntuale.

9.4.1 L'analisi discriminante sugli Ordini dei Batteri

Tab 9.7. Test di uguaglianza delle medie di gruppo.

	Wilks'				
	Lambda	F	df1	df2	Sig.
<i>Actinomycetales</i>	0,83	7,59	3	115	0,000
<i>Burkholderiales</i>	0,91	3,85	3	115	0,011
<i>Flavobacteriales</i>	0,87	5,73	3	115	0,001
<i>Bacillales</i>	0,81	9,26	3	115	0,000
<i>Sphingobacteriales</i>	0,93	2,86	3	115	0,040
<i>Clostridiales</i>	0,82	8,19	3	115	0,000
<i>Enterobacteriales</i>	0,90	4,11	3	115	0,008
<i>Rhizobiales</i>	0,95	2,08	3	115	0,107
<i>Pseudomonadales</i>	0,78	10,50	3	115	0,000
<i>Lactobacillales</i>	0,91	3,83	3	115	0,012
<i>Rhodobacterales</i>	0,88	5,46	3	115	0,002
<i>Sphingomonadales</i>	0,89	4,63	3	115	0,004
<i>Bacteroidales</i>	0,86	6,03	3	115	0,001
<i>Xanthomonadales</i>	0,86	6,19	3	115	0,001
<i>Rhodospirillales</i>	0,92	3,43	3	115	0,020
<i>Myxococcales</i>	0,98	0,81	3	115	0,488
<i>Planctomycetales</i>	0,94	2,25	3	115	0,086
<i>Erysipelotrichales</i>	0,85	6,90	3	115	0,000
<i>Solirubrobacterales</i>	0,95	1,90	3	115	0,134
<i>Acidimicrobiales</i>	0,94	2,24	3	115	0,088
<i>Caulobacterales</i>	0,95	1,97	3	115	0,123
<i>Selenomonadales</i>	0,84	7,47	3	115	0,000
<i>Verrucomicrobiales</i>	0,94	2,41	3	115	0,071
<i>Deinococcales</i>	0,80	9,48	3	115	0,000
<i>Desulfurococcales</i>	0,95	2,17	3	115	0,095
<i>Rhodocyklales</i>	0,85	6,53	3	115	0,000
<i>Oceanospirillales</i>	1,00	0,14	3	115	0,938

Il test di uguaglianza delle medie di gruppo, presentato in tabella 9.7 è accettato da *Rhizobiales* (significatività 0,10%), dai *Myxococcales* (significatività 0,49%), dai *Planctomycetales* (significatività 0,08%), dai *Solirubrobacterales* (significatività 0,13%), dagli *Acidimicrobiales* (significatività 0,08%), dai *Caulobacterales* (significatività 0,12%), dai *Verrucomicrobiales* (significatività 0,07%), dai *Desulfurococcales* (significatività 0,09%) e dagli *Oceanospirillales* (significatività 0,93%). Questi Ordini di batteri, potrebbero essere considerati ubiquitari sui siti di campionamento.

Tutti gli altri ordini non accettano, invece, il test di uguaglianza delle medie di gruppo, quindi si possono definire discriminanti fra i siti di campionamento.

In prima funzione discriminante si hanno *Pseudomonadales*, *Sphingomonadales* e *Rhodospirillales*, in seconda funzione discriminante *Xanthomonadales*, *Enterobacteriales* e *Myxococcales*, ed in terza funzione discriminante *Bacillales*, *Selenomonadales* e *Bacteroidales*.

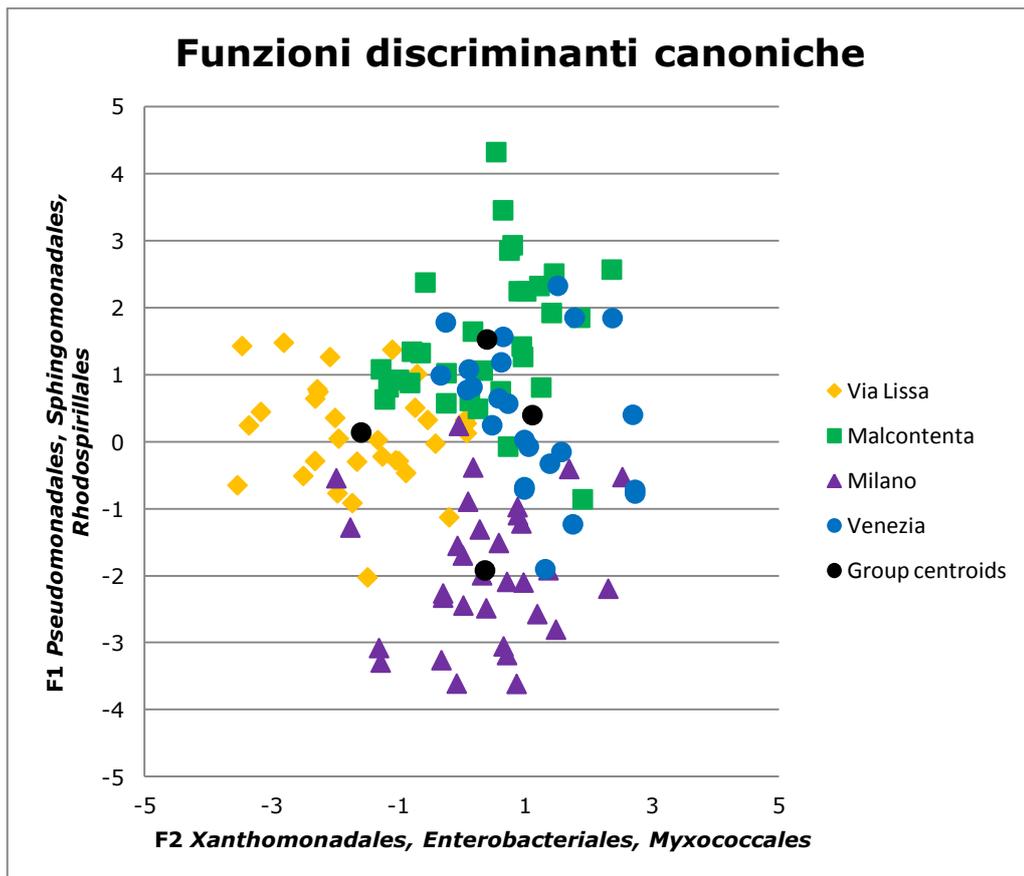


Fig. 9.34. Grafico di dispersione delle funzioni discriminanti canoniche. Gruppo 1 Via Lissa, gruppo 2 Malcontenta, gruppo 3 Milano, gruppo 4 Venezia.

Il grafico di dispersione della prima e seconda funzione discriminante mostra come i campioni siano abbastanza dispersi rispetto ai centroidi. Tuttavia i gruppi sono abbastanza distinti, con una maggiore sovrapposizione fra i siti dell'area veneziana.

Il gruppo riferito ai campioni di Milano presenta qualche sovrapposizione, ma rimane molto distinto dagli altri tre gruppi.

Questo potrebbe essere indicativo di differenze nel bioaerosol fra i siti dell'area veneziana e il sito di Milano.

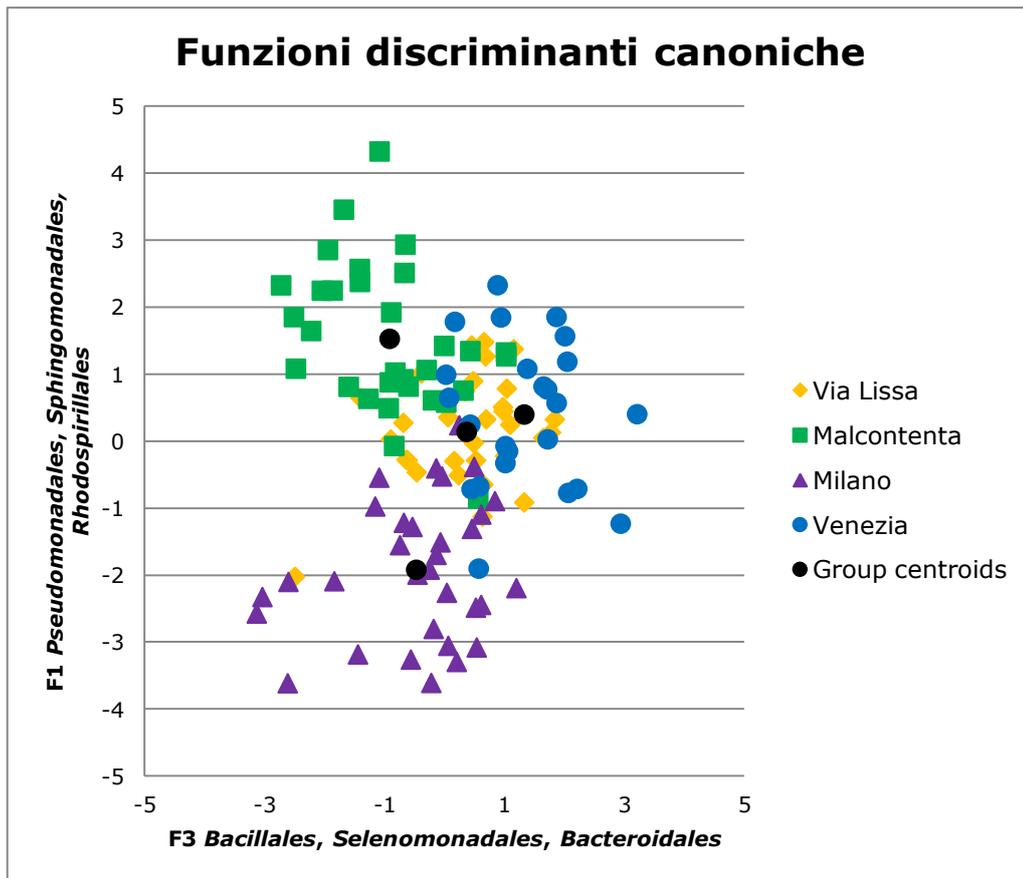


Fig. 9.35. Grafico di dispersione delle funzioni discriminanti canoniche. Gruppo 1 Via Lissa, gruppo 2 Malcontenta, gruppo 3 Milano, gruppo 4 Venezia.

Il grafico di dispersione della prima e terza funzione discriminante mostra come i gruppi sono abbastanza distinti fra siti dell'area veneziana, che risultano piuttosto sovrapposti e il sito milanese.

Il gruppo riferito ai campioni di Milano, infatti, pur presentando qualche sovrapposizione, resta comunque ben distinto dagli altri tre gruppi.

Anche in questo caso le funzioni discriminanti individuano delle probabili differenze nel bioaerosol fra i siti dell'area veneziana e il sito di Milano.

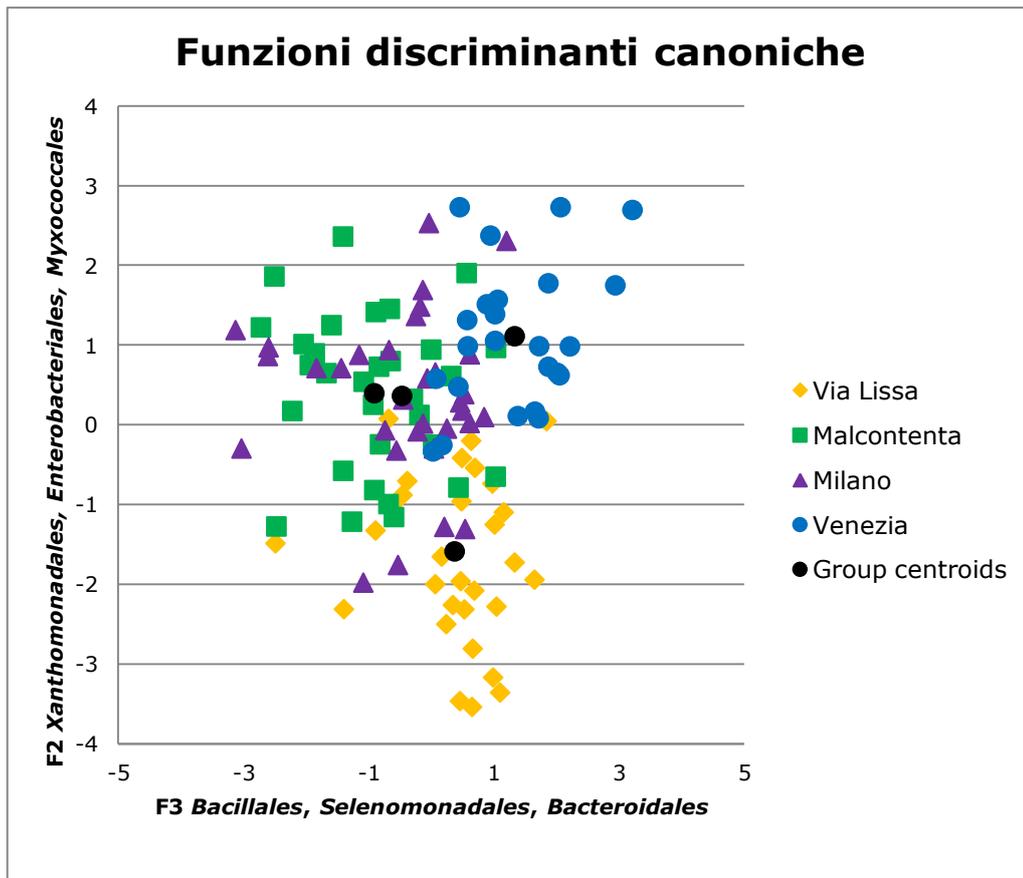


Fig. 9.36. Grafico di dispersione delle funzioni discriminanti canoniche. Gruppo 1 Via Lissa, gruppo 2 Malcontenta, gruppo 3 Milano, gruppo 4 Venezia.

Il grafico di dispersione della seconda e terza funzione discriminante mostra come i gruppi siano abbastanza sovrapposti fra di loro.

Le funzioni caratterizzate da questi Ordini di batteri, permettono ai gruppi di sovrapporsi, in questo caso non si possono distinguere delle sostanziali differenze nel bioaerosol nelle stazioni di campionamento. È però da notare come in seconda funzione siano presenti i *Myxococcales*, Ordine non discriminante e quindi ubiquitario nei siti di campionamento.

9.4.2 L'analisi discriminante sulle specie chimiche

Tab 9.8. Test di uguaglianza delle medie di gruppo.

	Wilks'		df1	df2	Sig.
	Lambda	F			
Al	0,87	5,58	3	115	0,001
S	0,99	0,47	3	115	0,705
Fe	0,85	6,71	3	115	0,000
Ca	0,98	0,78	3	115	0,505
Ti	0,90	4,38	3	115	0,006
Cr	0,78	10,76	3	115	0,000
Mn	0,96	1,79	3	115	0,152
Zn	0,97	1,07	3	115	0,366
Cu	0,77	11,36	3	115	0,000
Ba	0,91	3,66	3	115	0,014
As	0,80	9,59	3	115	0,000
Cd	0,96	1,76	3	115	0,159
Ni	0,89	4,53	3	115	0,005
Pb	0,91	3,58	3	115	0,016
Sb	0,98	0,69	3	115	0,558
V	0,86	6,38	3	115	0,000
Cl ⁻	0,75	12,56	3	115	0,000
NO₃⁻	0,96	1,72	3	115	0,166
NH ₄ ⁺	0,89	4,77	3	115	0,004
Mg ²⁺	0,73	14,12	3	115	0,000
Ca ²⁺	0,90	4,48	3	115	0,005

Il test di uguaglianza delle medie di gruppo, presentato in tabella 9.8 è accettato dallo zolfo (significatività 0,70%), dal calcio elementare (significatività 0,50%), dal manganese (significatività 0,15%), dallo zinco (significatività 0,36%), dal cadmio (significatività 0,15%), dall'antimonio (significatività 0,55%) e dallo ione nitrato (significatività 0,16%).

Queste specie chimiche, potrebbero essere considerate ubiquitarie sui siti di campionamento.

Tutte le altre specie chimiche accettano, invece, il test di uguaglianza delle medie di gruppo, quindi si possono definire discriminanti fra i siti di campionamento.

In prima funzione discriminante si hanno rame, cloro e cromo, in seconda funzione discriminante vanadio, ione calcio e titanio, ed in terza funzione discriminante ione ammonio, ferro e piombo.

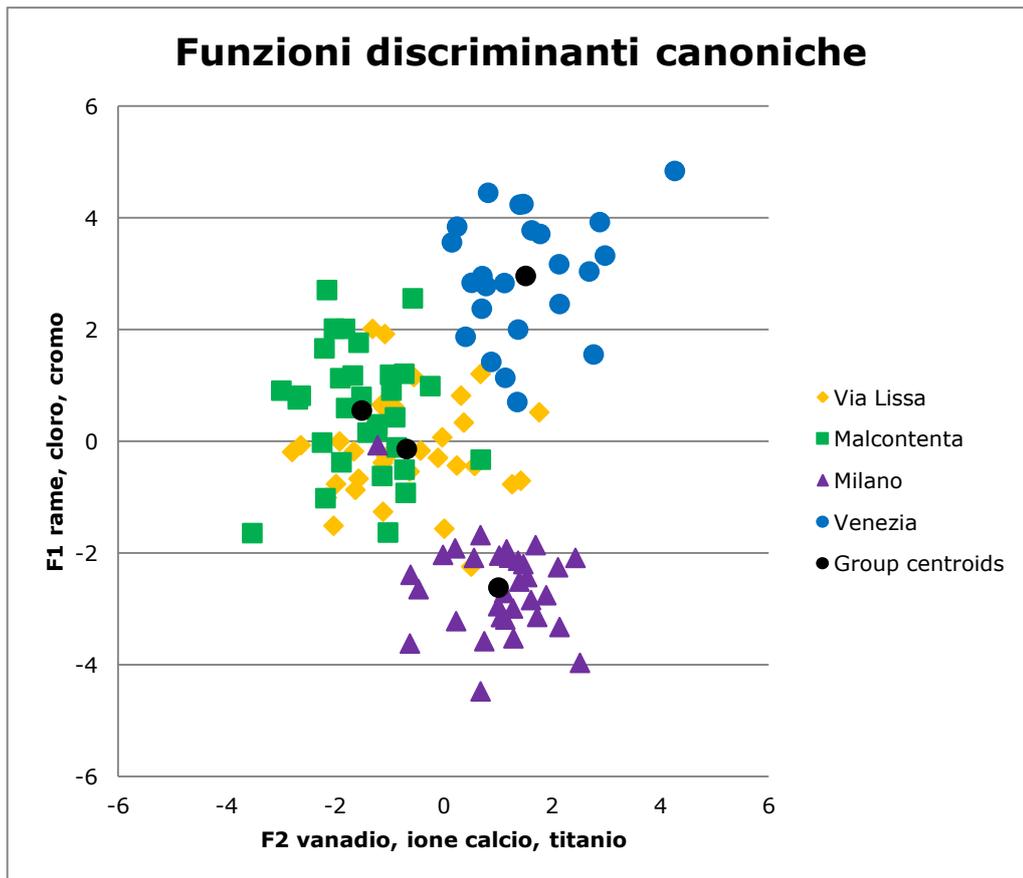


Fig. 9.37. Grafico di dispersione delle funzioni discriminanti canoniche. Gruppo 1 Via Lissa, gruppo 2 Malcontenta, gruppo 3 Milano, gruppo 4 Venezia.

Il grafico di dispersione della prima e seconda funzione discriminante mostra come i campioni non siano così dispersi rispetto ai centroidi. Tuttavia i gruppi sono abbastanza distinti, con una buona sovrapposizione fra i siti dell'area veneziana di Via Lissa e Malcontenta.

I gruppi riferiti ai campioni di Milano e di Venezia centro storico presentano qualche sovrapposizione, ma rimangono molto distinti dagli altri due gruppi. Questo potrebbe essere indicativo di differenze nella composizione chimica del particolato atmosferico fra i siti dell'area veneziana di Malcontenta e Via Lissa e i siti di Milano e Venezia centro storico.

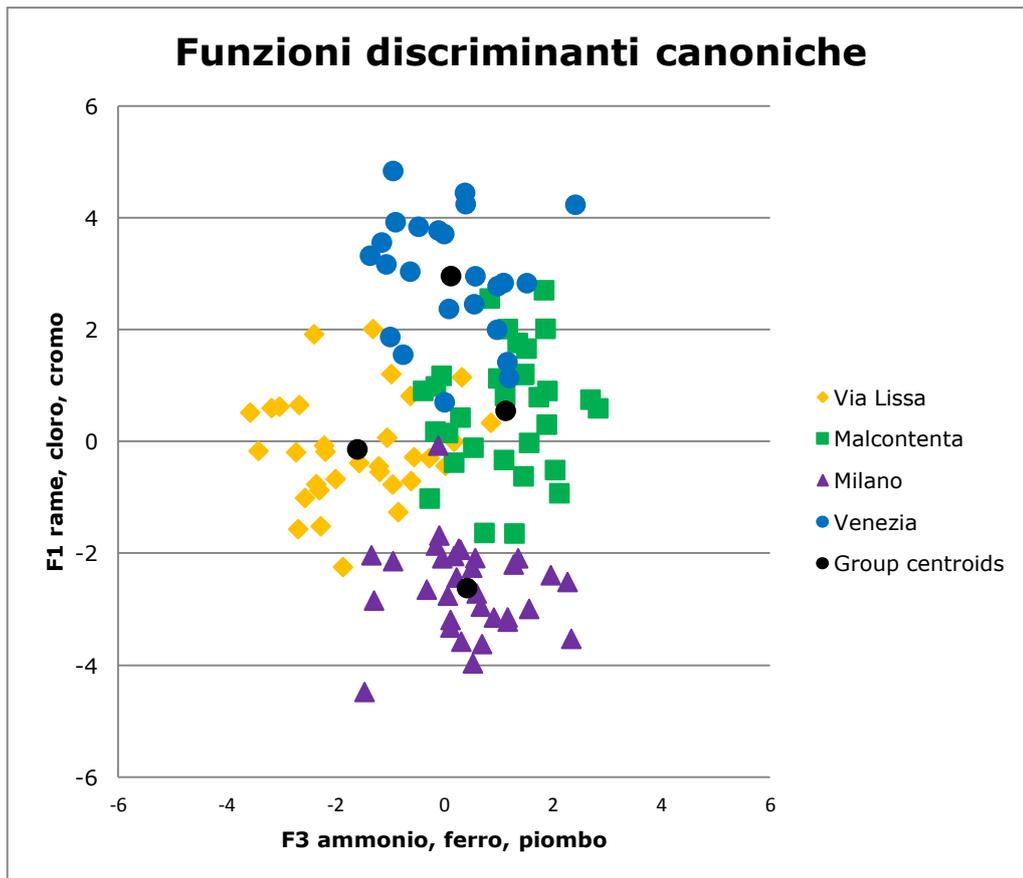


Fig. 9.38. Grafico di dispersione delle funzioni discriminanti canoniche. Gruppo 1 Via Lissa, gruppo 2 Malcontenta, gruppo 3 Milano, gruppo 4 Venezia.

Il grafico di dispersione della prima e terza funzione discriminante mostra come i campioni non siano così dispersi rispetto ai centroidi. I gruppi sono abbastanza distinti, con una buona sovrapposizione fra i siti dell'area veneziana.

I gruppi riferiti ai campioni di Milano presentano qualche sovrapposizione, ma rimane molto distinto dagli altri tre gruppi.

Anche in questo caso si può ipotizzare un'indicazione delle differenze che potrebbero esserci fra i siti veneziani e quello milanese.

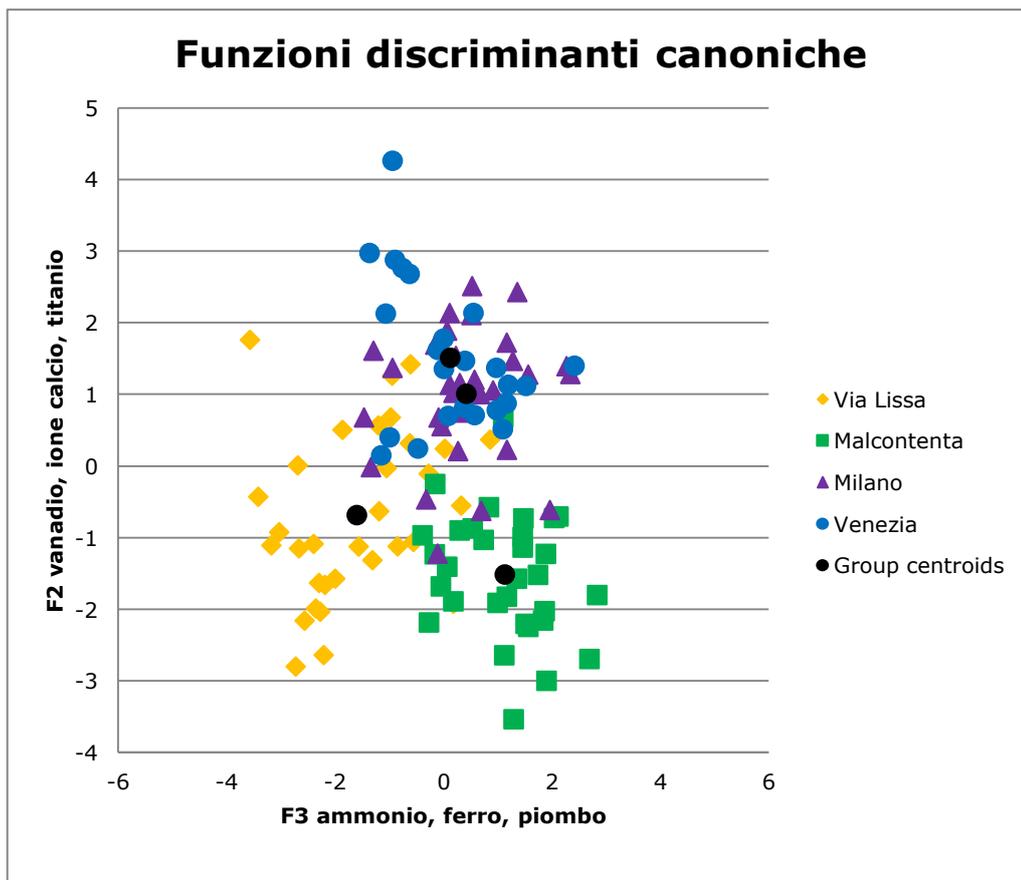


Fig. 9.39. Grafico di dispersione delle funzioni discriminanti canoniche. Gruppo 1 Via Lissa, gruppo 2 Malcontenta, gruppo 3 Milano, gruppo 4 Venezia.

Il grafico di dispersione della seconda e terza funzione discriminante mostra come i campioni non siano così dispersi rispetto ai centroidi. I gruppi non sono così distinti, con una buona sovrapposizione fra i siti di Venezia e Milano.

Restano abbastanza distinti gli altri due gruppi riferiti ai campioni dell'area veneziana, soprattutto il gruppo di Malcontenta.

Si può ipotizzare che le due funzioni in questo caso non separino del tutto i gruppi, identificando delle similitudini nella composizione dell'aerosol.

9.5 ANALISI RDA

Sui dati biologici e chimici attraverso l'uso di CANOCO4.5[®] è stata effettuata l'analisi delle ridondanze (RDA) (Wakelin et al, 2006; Feinstein et al, 2009; Wang et al 2012) per poter comprendere quanto siano correlati gli Ordini dei batteri alle variabili ambientali. Come indicato in Yergeau et al. (2009) *“Le abbondanze relative dei taxa sono state usate come “species”, le variabili chimiche significative per ogni punto di campionamento sono state introdotte nell'analisi quali variabili “environmental”.*

L'analisi RDA è stata preceduta da un test di Monte Carlo (499 permutazioni) al fine di valutare la significatività statistica dell'analisi.

Le specie chimiche considerate in questa trattazione sono quelle che sono state ritenute significative, cioè quelle che presentano almeno cinque valori rilevati per stagione nei vari siti di campionamento.

Gli Ordini batterici considerati e rappresentati nei grafici dell'analisi delle ridondanze sono quelli che risultano avere un migliore adattamento (20%) alla distribuzione: questi Ordini risultano essere i più significativi e correlati alle specie chimiche prese in esame.

Per la corrispondenza fra i nomi degli Ordini e i numeri corrispondenti impiegati nell'elaborazione si veda la Tabella 1 posta in Allegato 1.

9.5.1 ANALISI RDA COMPLESSIVA

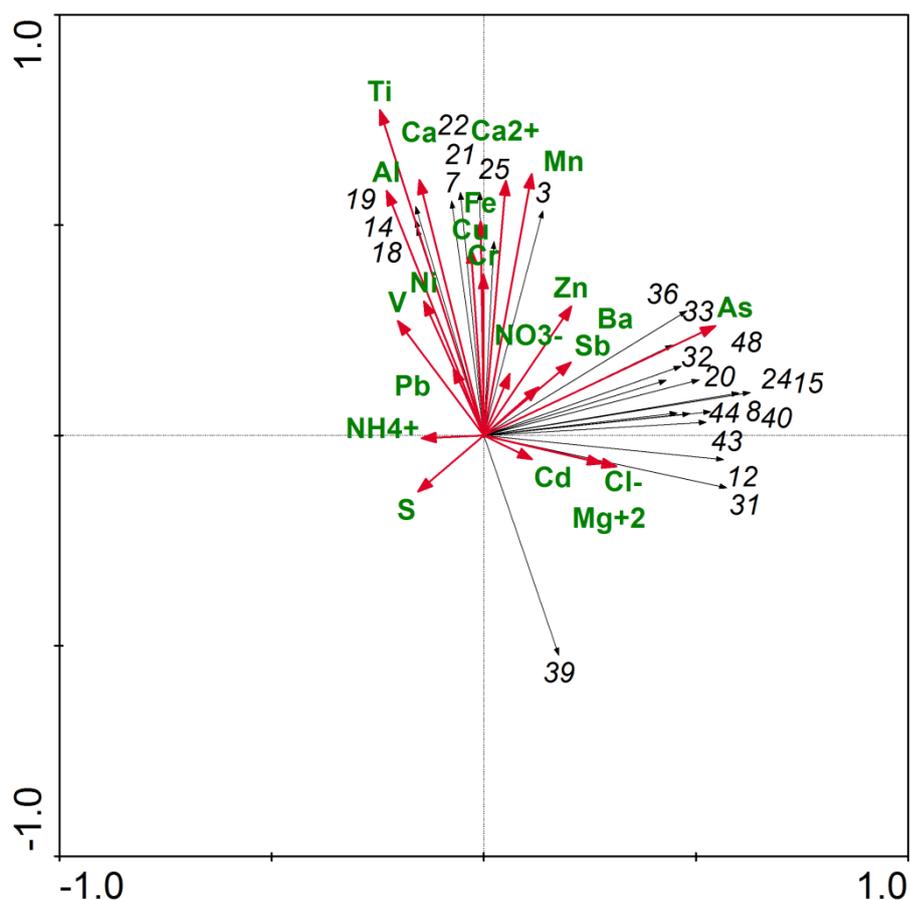


Fig. 9.40. Grafico RDA delle specie chimiche e degli ordini di batteri analizzati.

L'analisi RDA complessiva degli Ordini dei batteri e degli elementi chimici analizzati su tutti e quattro i siti di campionamento presenta una significatività poco elevata, ma viene presentata perché descrive un primo approccio allo studio e permette uno sguardo d'insieme alle stazioni di campionamento.

I *Planctomycetales* (19), *Myxococcales* (18) *Sphingomonadales* (14) sono correlati ad alluminio, titanio, calcio e nickel ed inversamente correlati a Neisseriales (39).

Solirubrobacterales (21), *Acidimicrobiales* (22) *Verrucomicrobiales* (25) *Sphingobacterales* (7) e *Actinomycetales* (3) sono correlati con ferro, rame, cromo, ione calcio e manganese.

Alteromonadales (33) e *Campylobacterales* (36) sono correlati con arsenico, bario ed antimonio.

Methanobacterales (32), *Thiotrichales* (48) e *Erysipelotrichales* (20) sono correlati all'arsenico.

Lactobacillales (12), *Bifidobacteriales* (31) e *Coriobacteriales* (43) sono correlati con ione cloro, ione magnesio e cadmio.

9.5.2 ANALISI RDA DEL SITO DI VIA LISSA

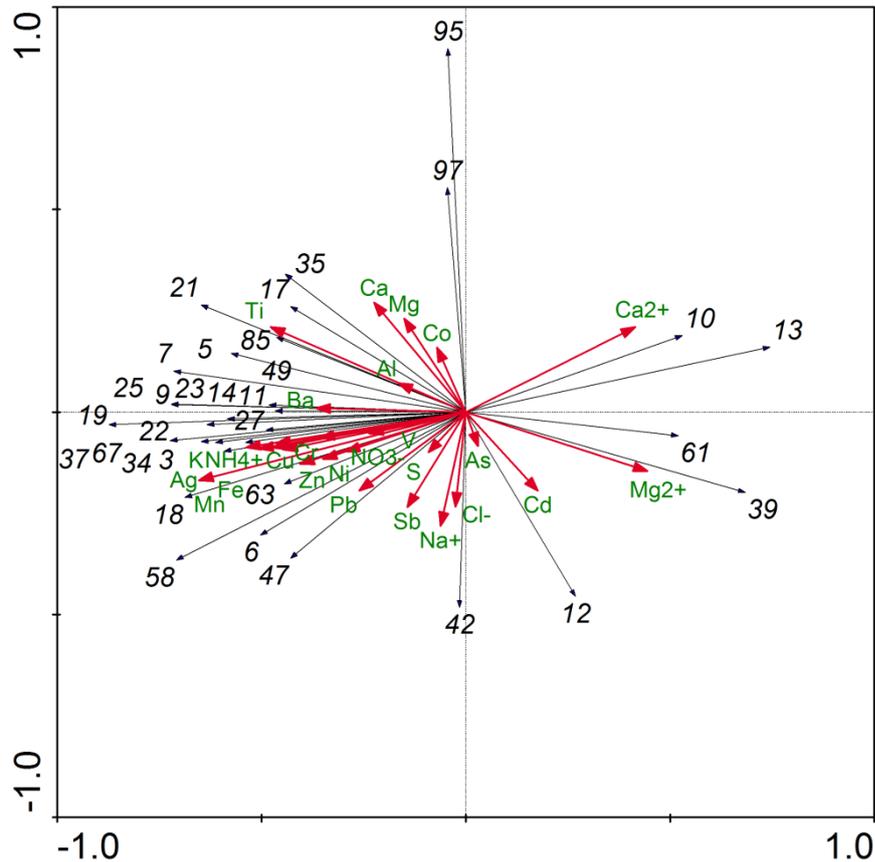


Fig. 9.41. Grafico RDA delle specie chimiche analizzate e degli ordini di batteri nel sito di Via Lissa.

I risultati di questa analisi esplorativa condotta su una matrice che comprende tutti gli Ordini dei batteri e le specie chimiche significative del sito di Via Lissa mostrano come le specie chimiche tendano ad essere molto correlate fra di loro. Tale analisi contiene un elevato numero di variabili e quindi la sua significatività non è alta ma permette di evidenziare il grado di sovrapposizione (e quindi la correlazione) tra le variabili chimiche.

Le variabili tendono a dividersi in due gruppi principali, il primo caratterizzato dagli ioni calcio e magnesio, l'altro dagli altri analiti presi in esame in questa stazione che si raggruppano in piccoli sottogruppi estremamente correlati fra loro.

In particolare si nota una forte correlazione fra (I) Ca, Mg, e Co; (II) Ti e Al; (III) K, NH_4^+ , Mn, Ag, Cu, Fe, Zn, Ni, V, NO_3^- e Pb; (IV) S e Sb, (V) Na^+ , Cl^- e As.

Al primo gruppo, costituito da ione calcio e magnesio si associano gli ordini *Rhizobiales* (10), *Rhodobacterales* (13), *Neisseriales* (39) e *Pasteurellales* (61).

I sottogruppi (I) e (II), risultano correlati con *Bdellovibrionales* (35) e *Rhodospirillales* (17), in particolare (II) è fortemente correlato anche con *Solirubrobacterales* (21) e *Mycoplasmatales* (85) ed inversamente correlato allo ione magnesio e a *Neisseriales* (39) e *Pasteurellales* (61).

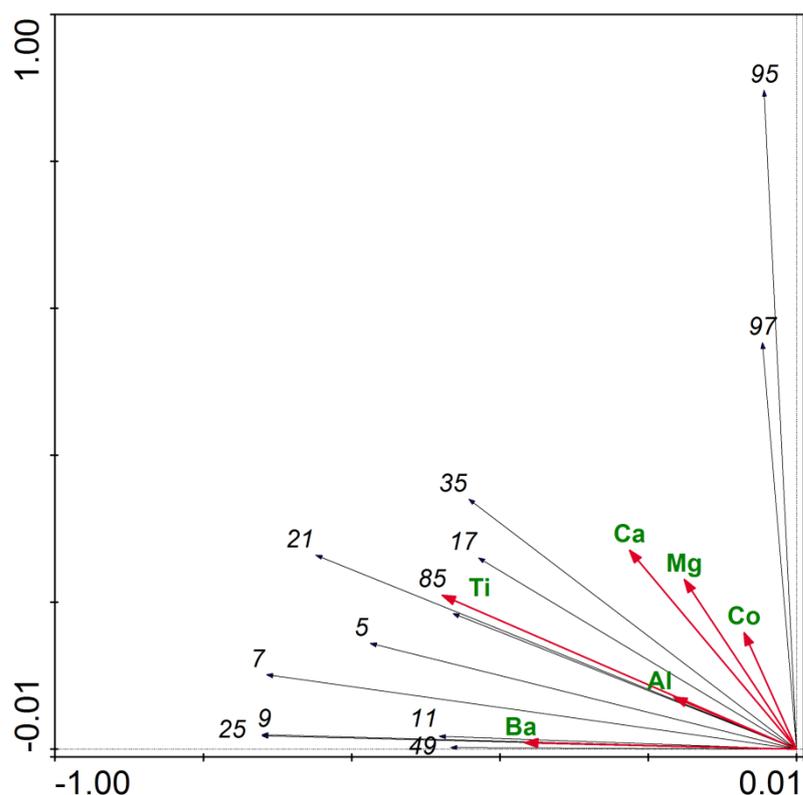


Fig. 9.42. Dettaglio del secondo quadrante e dei sottogruppi (I) e (II) del grafico in figura 9.10.

Il sottogruppo (III) è correlato con un gran numero di Ordini ed inversamente correlato con lo ione calcio, *Rhizobiales* (10), *Rhodobacterales* (13).

Il sottogruppo (V) è strettamente correlato all'ordine *Rickettsiales* (42) e inversamente correlato a *Deferribacterales* (95) e *Synergistales* (97)

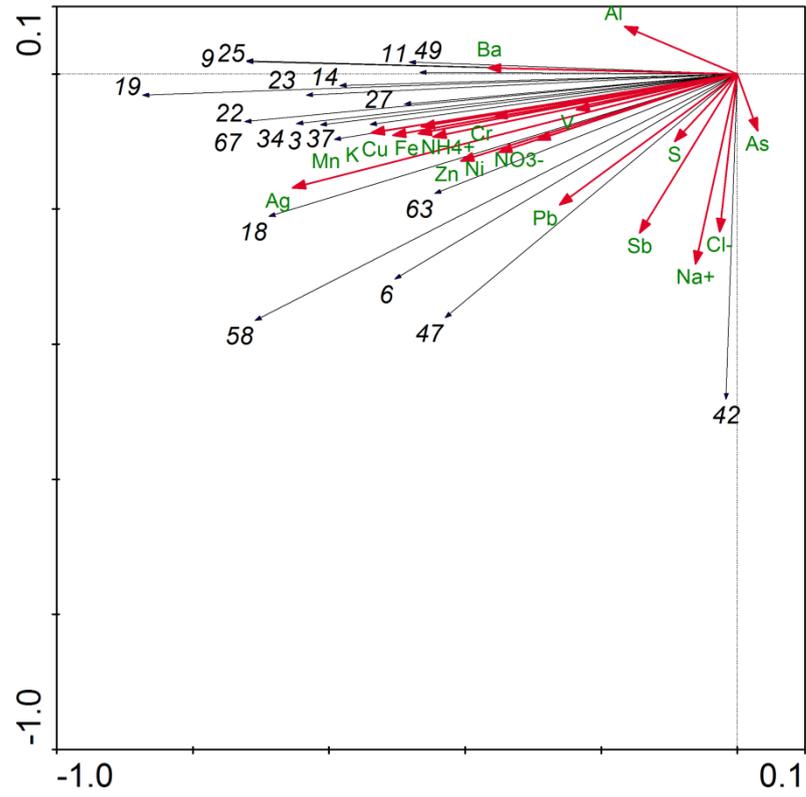


Fig. 9.43. Dettaglio del terzo quadrante del grafico in figura 9.10.

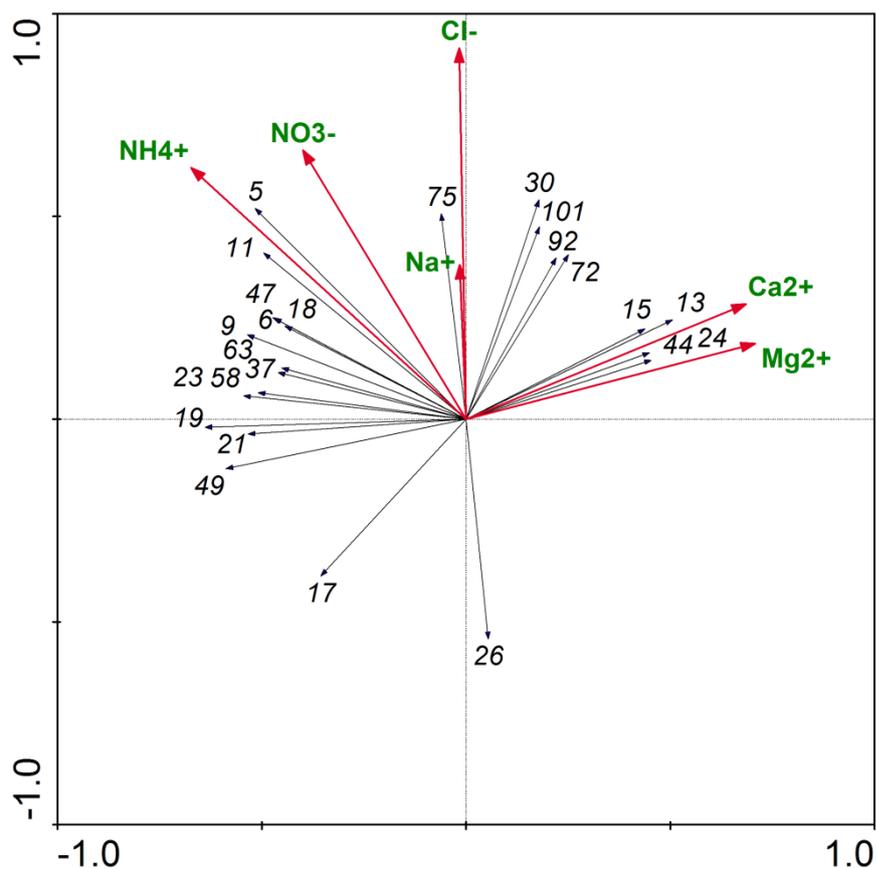


Fig. 9.44. Grafico RDA della componente ionica analizzata degli Ordini di batteri nel sito di Via Lissa.

L'analisi RDA della componente ionica analizzata e degli ordini dei batteri mostra un suddivisione in 3 gruppi di ioni ed ordini correlati fra di loro.

Il primo gruppo (I) caratterizzato dagli ioni calcio e magnesio associati a *Rhodobacterales* (13), *Bacteroidales* (15), *Selenomonadales* (24) e *Fusobacteriales* (44).

Il secondo gruppo (II) principalmente costituito da ioni cloro e sodio e *Desulfarculales* (75) strettamente correlati fra di loro e inversamente correlati a *Deinococcales* (26).

Il terzo gruppo (III) è caratterizzato da ioni ammonio e nitrato, correlati a più ordini batterici.

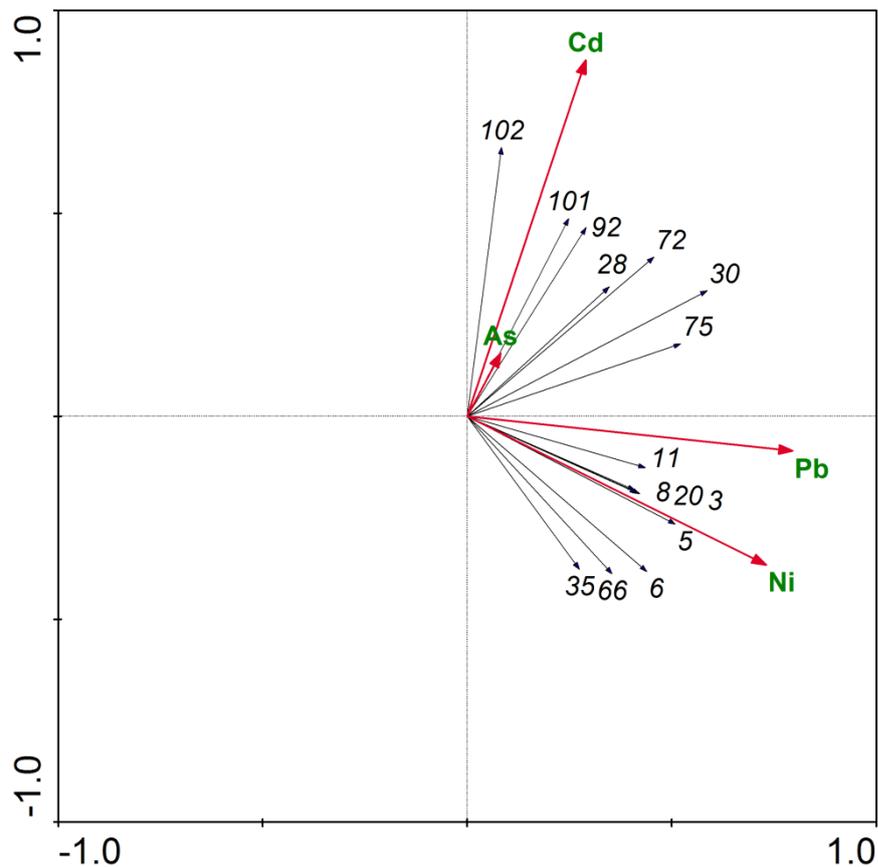


Fig. 9.45. Grafico RDA dei metalli di interesse sanitario analizzati e degli Ordini di batteri nel sito di Via Lissa.

Dall'analisi RDA condotta fra i metalli di interesse sanitario analizzati e gli ordini batterici risulta evidente la suddivisione delle specie chimiche in due gruppi.

Un primo gruppo è caratterizzato da cadmio ed arsenico, correlati ad alcuni ordini. In particolare questi due metalli risultano strettamente correlati a *Ignavibacteriales* (101) e *Aquificales* (102).

Il secondo gruppo è caratterizzato da piombo e nickel correlato ad alcuni ordini. In particolare il nickel è strettamente correlato a *Clostridiales* (8) *Actinomycetales* (3), *Erysipelotrichales* (20), *Flavobacteriales* (5).

9.5.3 ANALISI RDA DEL SITO DI MALCONTENTA

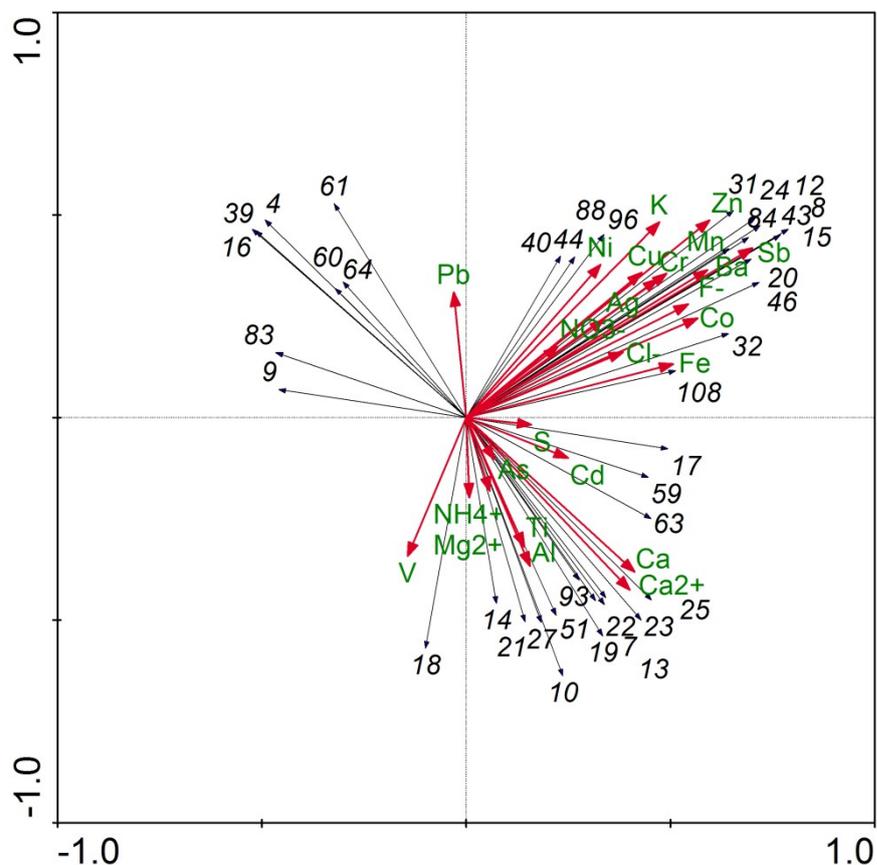


Fig. 9.46. Grafico RDA delle specie chimiche analizzate e degli Ordini di batteri nel sito di Malcontenta.

I risultati dell'analisi esplorativa condotta su tutti gli Ordini dei batteri e le specie chimiche significative rilevate per il sito di Malcontenta, nonostante la significatività non sia molto elevata per la forte sovrapposizione delle variabili e la loro numerosità, evidenziano una distribuzione in tre gruppi principali.

Due di questi gruppi sono caratterizzati da specie chimiche e Ordini dei batteri correlati fra di loro e uno, in correlazione negativa con il gruppo presente nel secondo quadrante, composto esclusivamente da Ordini di batteri.

Il gruppo presente nel quarto quadrante, come si vedrà successivamente nel dettaglio, può essere suddiviso ulteriormente in due sottogruppi distinti.

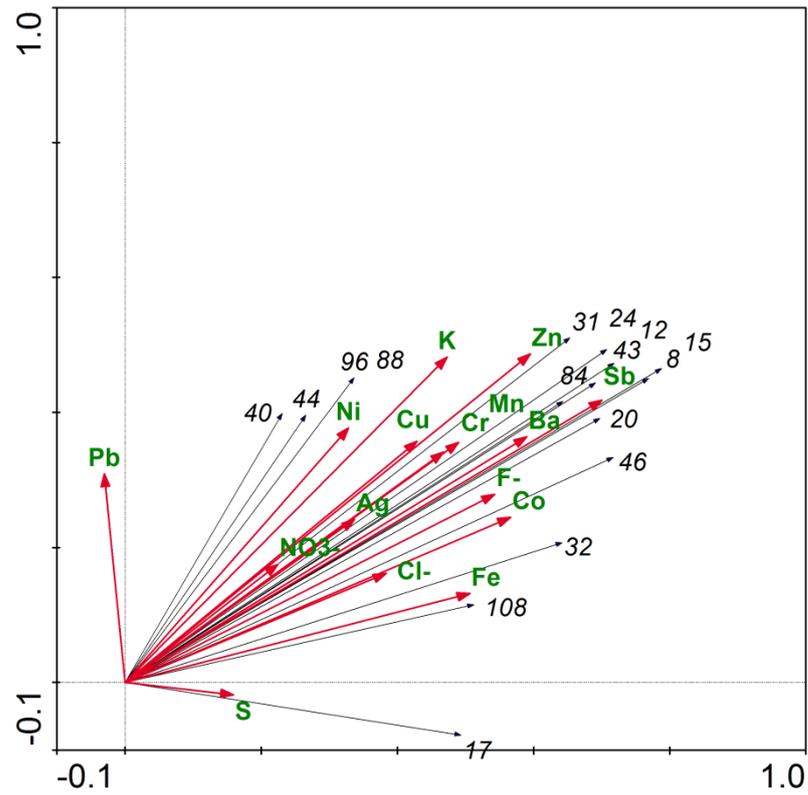


Fig. 9.47. Dettaglio del primo quadrante del grafico in figura 9.14.

Osservando il dettaglio del primo quadrante si osserva come numerose specie chimiche siano strettamente correlate fra di loro, e agli ordini dei batteri. Osservando nel dettaglio si può inoltre osservare come il piombo si discosti leggermente da questo gruppo.

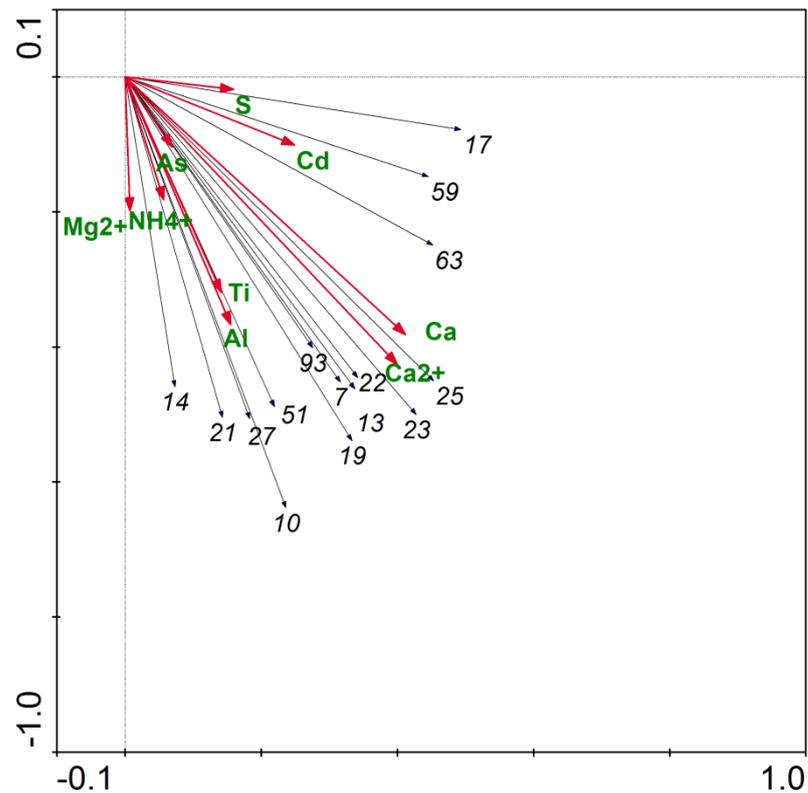


Fig. 9.48. Dettaglio del quarto quadrante del grafico in figura 9.14.

Il dettaglio del quarto quadrante mostra la suddivisione delle specie chimiche in due sottogruppi. Nel primo sottogruppo zolfo e cadmio sono strettamente correlati con *Rhodospirillales* (17), *Methanosarcinales* (59), *Legionellales* (63).

Nel secondo sottogruppo, i batteri e le specie chimiche prese in esame sono correlate fra di loro, ma in particolare si osserva che lo ione calcio e il calcio elementare sono strettamente correlati a *Caulobacterales* (23) e *Verrucomicrobiales* (25); Ti ed Al e NH₄⁺ a *Thermoanaerobacterales* (51), *Desulfurococcales* (27), *Solirubrobacterales* (21) e *Rhizobiales* (10).

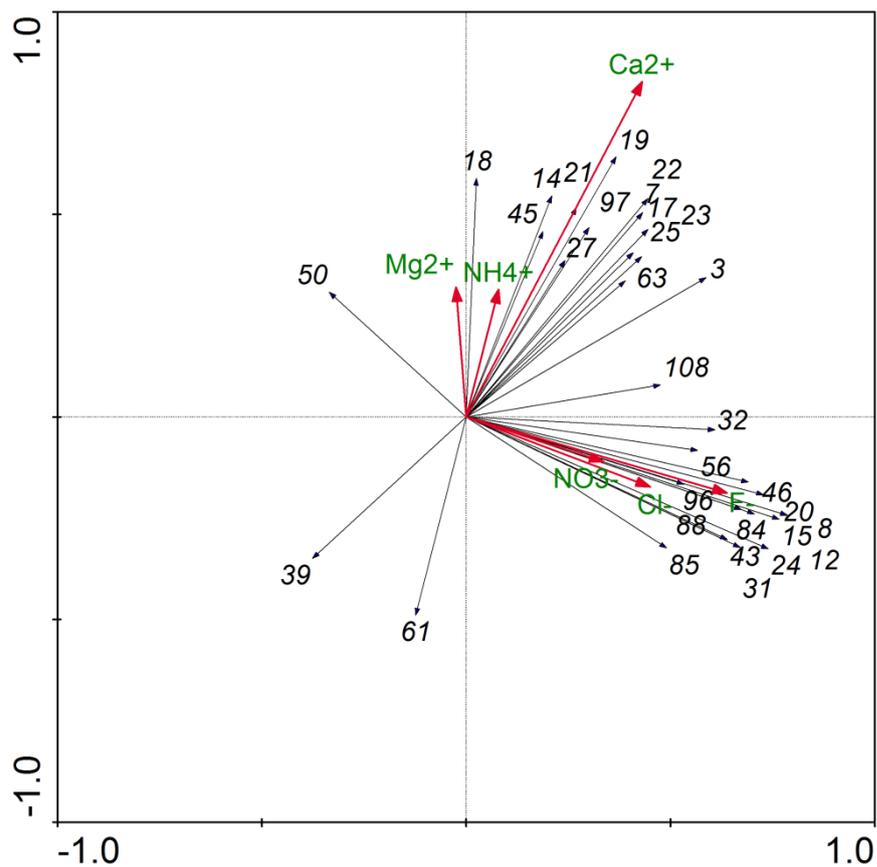


Fig. 9.49. Grafico RDA della componente ionica analizzata degli Ordini dei batteri nel sito di Malcontenta.

In questo caso i batteri si correlano strettamente con le variabili chimiche andando a formare due gruppi, il primo (I) formato da Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , il secondo gruppo (II) formato da NO_3^- , Cl^- e F^- entrambi correlati direttamente a numerosi Ordini e indirettamente il gruppo (I) a *Neisseriales* (39) e *Pasteurellales* (61) il gruppo (II) a *Desulfuromonadales* (50).

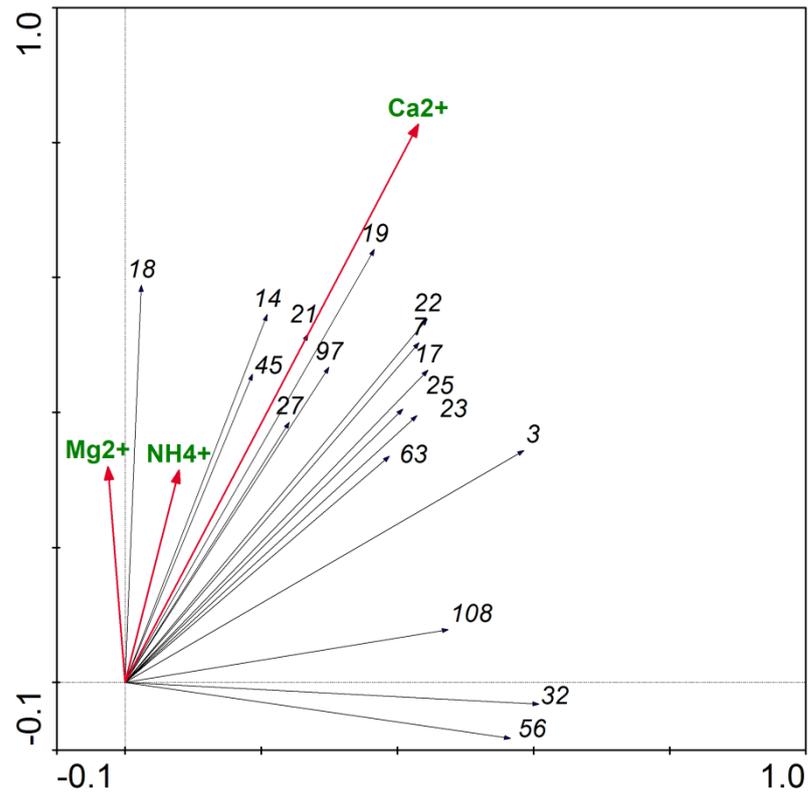


Fig. 9.50. Dettaglio del primo quadrante del grafico in figura 9.18.

In figura 9.18 è riportato il dettaglio del gruppo (I) è possibile notare come vi sia una correlazione strettissima fra lo ione calcio, *Solirubrobacterales* (21), *Planctomycetales* (19). Sempre lo ione calcio e ammonio sono correlati con *Sphingomonadales* (14), *Gemmatimonadales* (45). Lo ione magnesio risulta correlato con i *Myxococcales* (18).

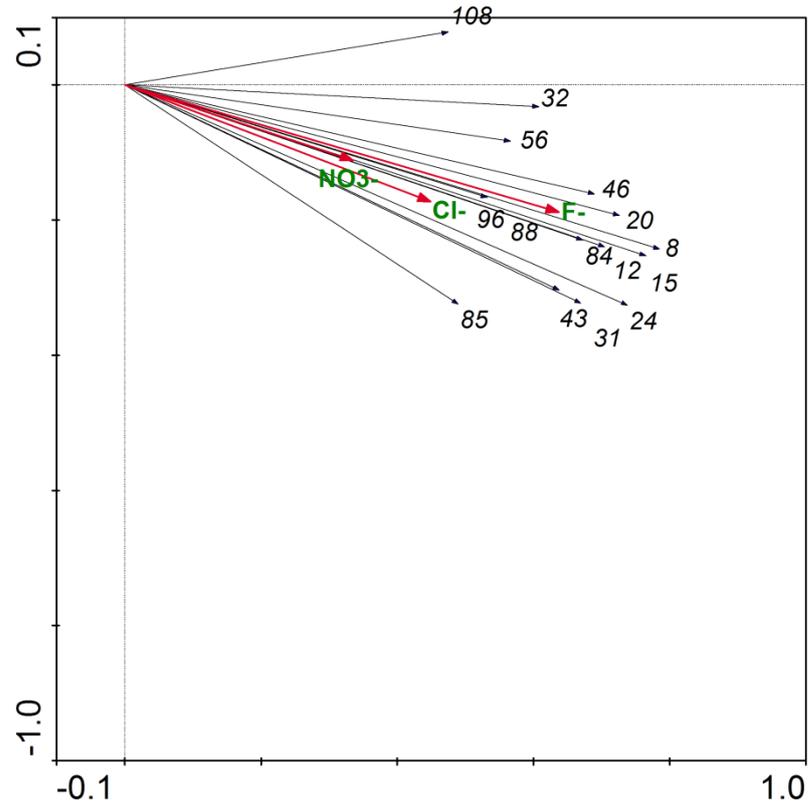


Fig. 9.51. Dettaglio del quarto quadrante del grafico in figura 9.18.

Nel dettaglio del quarto quadrante si possono osservare le correlazioni fra il gruppo (II) e gli Ordini dei batteri.

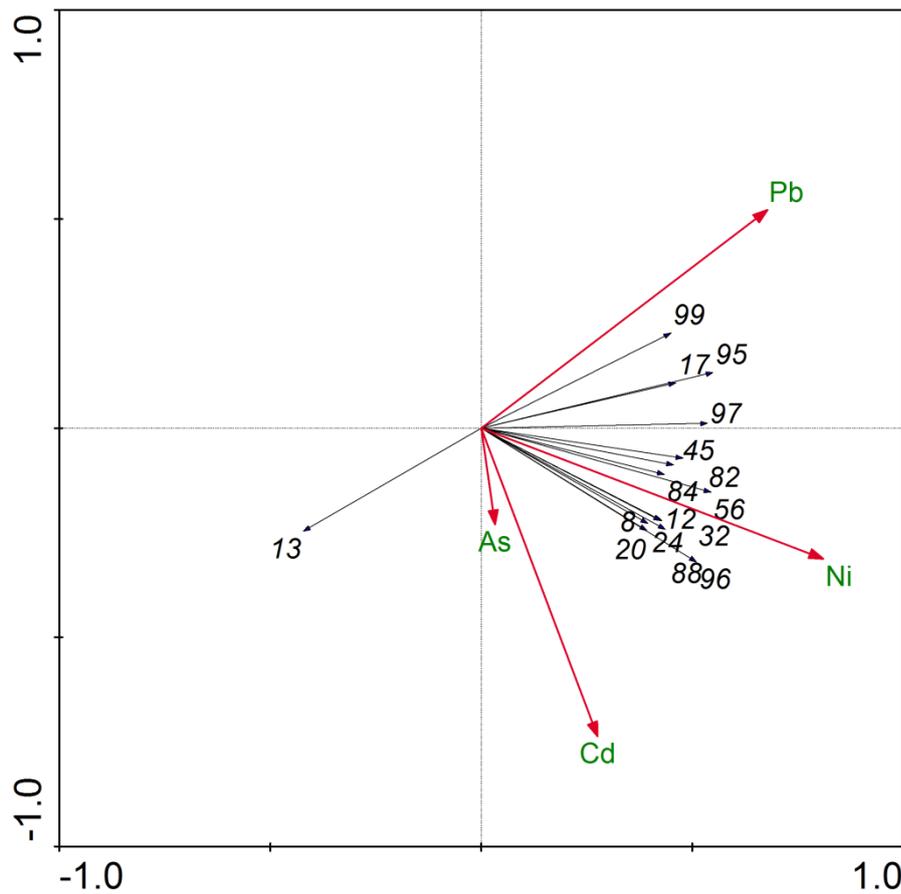


Fig. 9.52. Grafico RDA dei metalli di interesse sanitario analizzati e degli Ordini dei batteri nel sito di Malcontenta.

La correlazione fra i metalli di interesse sanitario e i batteri presenta tre gruppi distinti. Il primo (I) è caratterizzato da *Rhodobacterales* (13) e da una correlazione inversa con il piombo. Il secondo gruppo è caratterizzato da As e Cd, il terzo (III) da Ni e Pb correlati con numerosi ordini.

9.5.4 ANALISI RDA DEL SITO DI MILANO

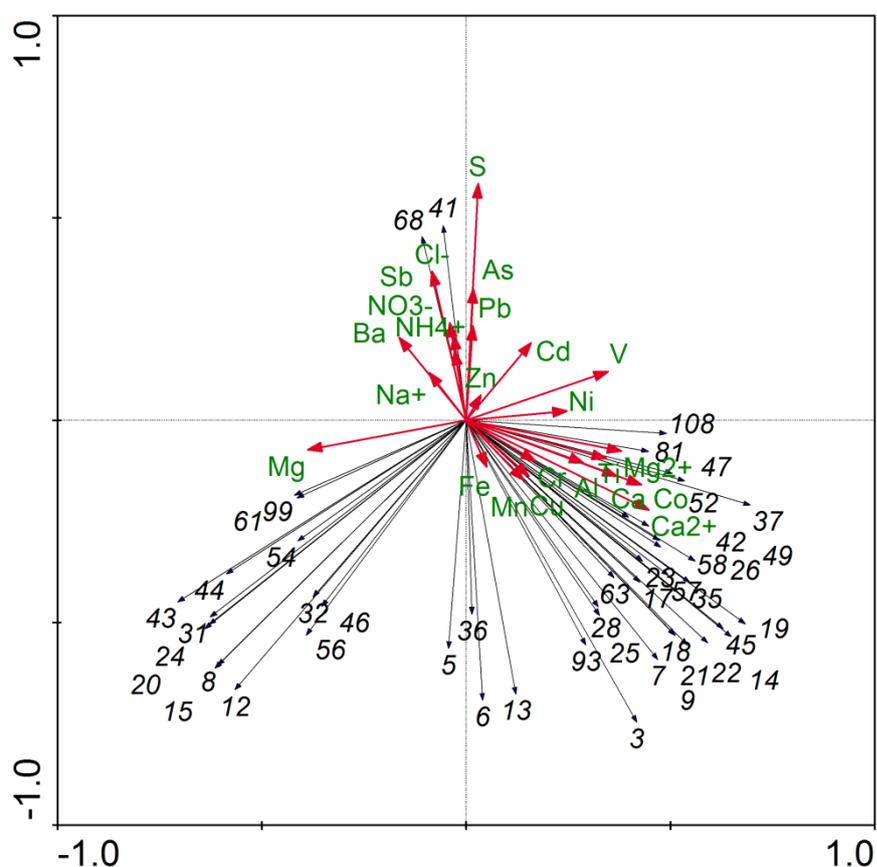


Fig. 9.53. Grafico RDA delle specie chimiche analizzate e degli Ordini dei batteri nel sito di Milano.

I risultati dell'analisi esplorativa condotta su tutti gli Ordini dei batteri e le specie chimiche significative rilevate per il sito di Milano, nonostante la significatività non sia molto elevata a causa delle sovrapposizioni delle variabili data dal loro numero troppo elevato mostrano come le specie chimiche tendano ad essere molto correlate fra di loro.

Si possono individuare tre gruppi di distribuzione delle variabili: un primo gruppo nel primo e nel secondo quadrante, un secondo gruppo nel terzo quadrante e un terzo gruppo nel quarto quadrante.

Il secondo gruppo è caratterizzato dal magnesio elementare correlato a svariati Ordini di batteri e correlati inversamente a cadmio, zinco, vanadio e nickel.

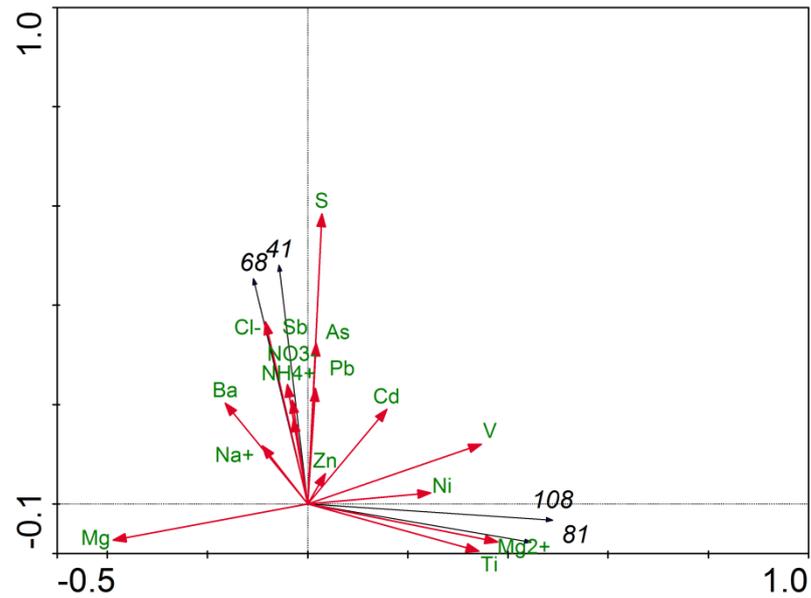


Fig. 9.54. Dettaglio del primo e del secondo quadrante del grafico in figura 9.22.

Il primo gruppo è caratterizzato quasi esclusivamente specie chimiche. In particolare lo ione cloruro è strettamente correlato a *Sneathiellales* (68); mentre antimonio e gli ioni nitrato ed ammonio sono correlati strettamente con *Gammaproteobacteria incertae sedis* (41). Infine il Nickel è correlato ai *Halobacteriales* (108).

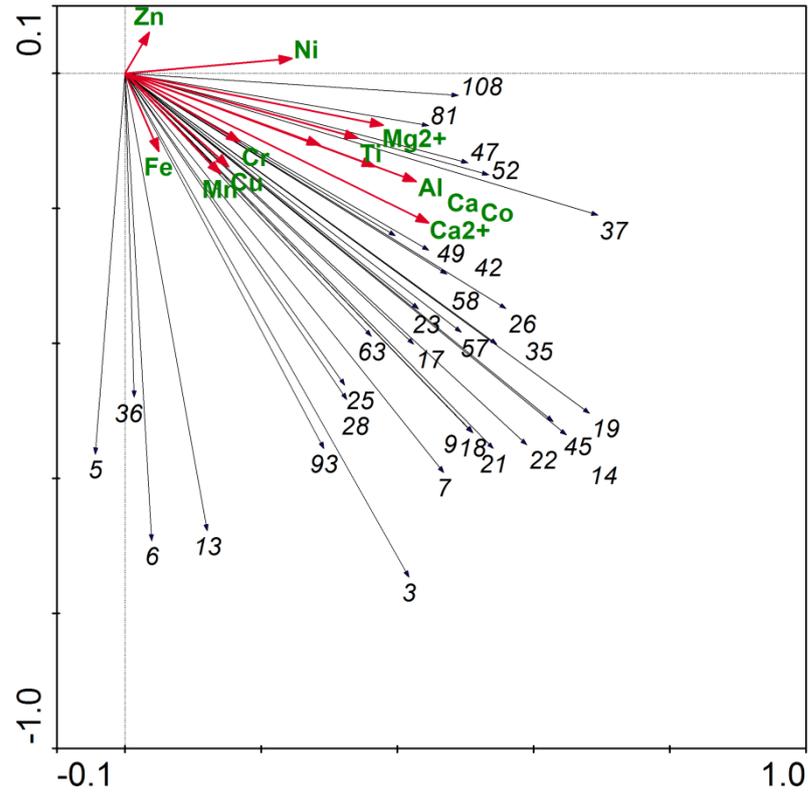


Fig. 9.55. Dettaglio del quarto quadrante del grafico in figura 9.22.

Il terzo gruppo risulta caratterizzato da numerose specie chimiche fortemente correlate fra di loro e agli Ordini dei batteri.

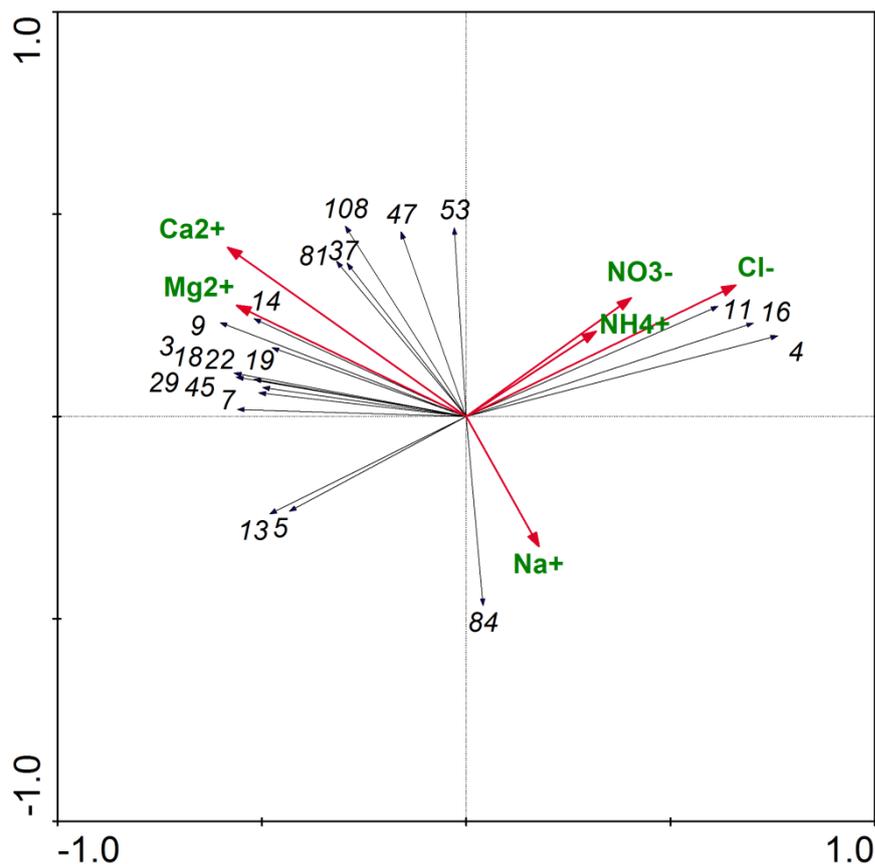


Fig. 9.56 Grafico RDA della componente ionica analizzata degli Ordini di batteri nel sito di Milano.

Dal grafico che riporta i risultati dell'analisi RDA degli ioni presi in esame e degli Ordini di batteri, possono essere distinti quattro gruppi, uno per quadrante.

Il primo gruppo, nel primo quadrante, associa in correlazione diretta gli ioni nitrato, ammonio e cloruro, *Burkholderiales*, (4) *Pseudomonadales* (11) e *Xanthomonadales* (16); mentre sono in correlazione inversa con il gruppo presente nel terzo quadrante caratterizzato dalla correlazione di *Rhodobacterales* (13), *Flavobacteriales* (5).

Il secondo quadrante presenta gli ioni calcio e magnesio in relazione con molti ordini, in particolare lo ione magnesio è fortemente correlato con gli *Sphingomonadales* (14), *Enterobacteriales* (9) e *Planctomycetales* (19).

Sempre di questo gruppo *Rubrobacterales* (37), *Phycisphaerales* (81) e gli *Halobacteriales* (108) appaiono in relazione inversa allo ione sodio, mentre *Holophagales* (53) è in relazione inversa a *Anaeroplasmatales* (84).

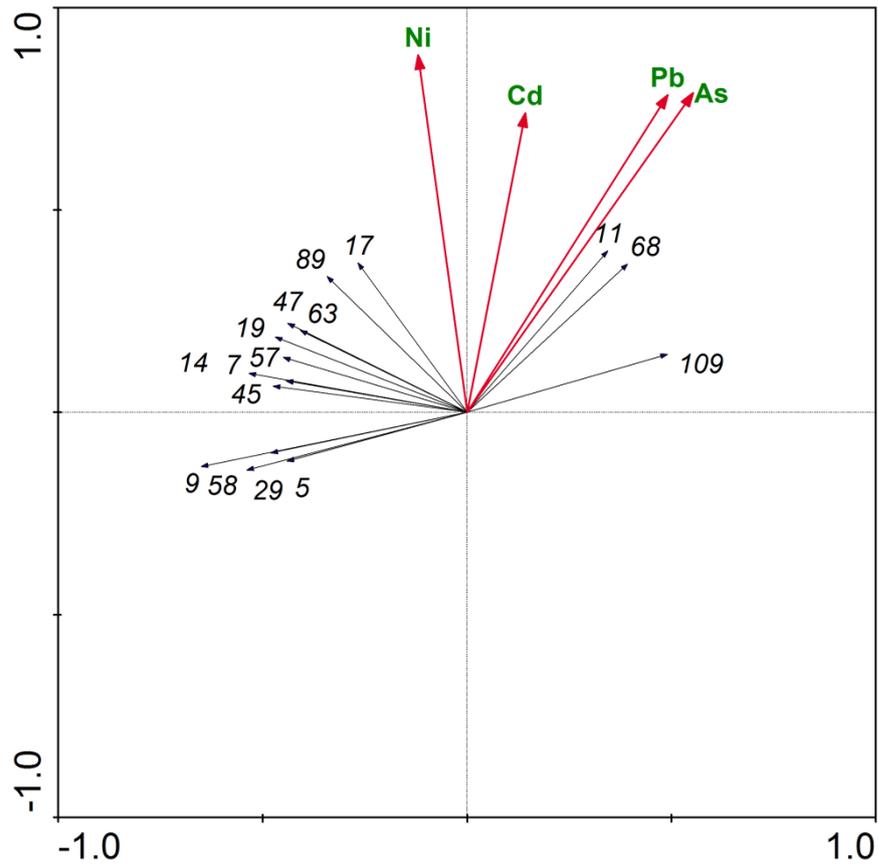


Fig. 9.57. Grafico RDA dei metalli di interesse sanitario analizzati e degli Ordini dei batteri nel sito di Milano.

Da questa elaborazione dei dati risulta che piombo, arsenico, *Pseudomonadales* (11) *Sneathiellales* (68) sono fortemente correlati fra loro.

I *Thermoplasmatales* (109) si trovano in correlazione negativa con *Oceanospirillales* (29), *Enterobacteriales* (9), *Flavobacteriales* (5) e *Chlamydiales* (58).

Nel sottogruppo (II) vi è Zn in forte correlazione con *Bacteroidales* (15), *Clostridiales* (8) e *Coriobacteriales* (43)

Il gruppo fortemente correlato del terzo quadrante presenta delle correlazioni forti fra Argento, *Burkholderiales* (4), *Enterobacteriales* (9) e *Neisseriales* (39); fra Cadmio e *Aquificales* (102); ione sodio e *Methanosarcinales* (59).

Il gruppo del quarto quadrante presenta delle correlazioni positive fra la maggior parte degli elementi e numerosi ordini di batteri.

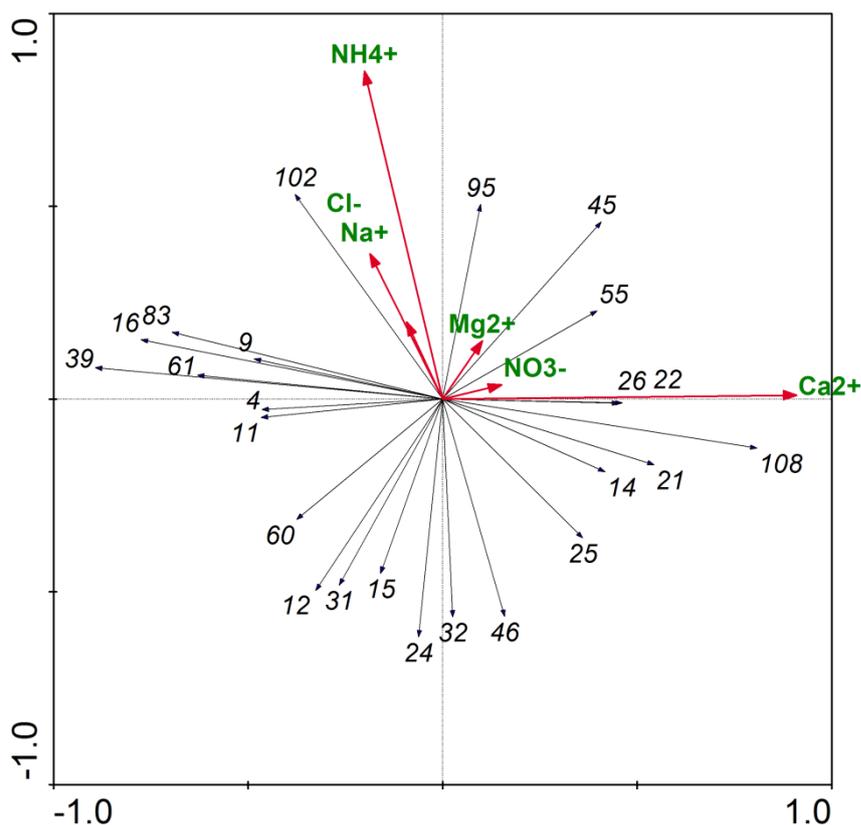


Fig. 9.59. Grafico RDA della componente ionica analizzata degli Ordini dei batteri nel sito di Venezia.

Da questa elaborazione dei dati relativi ai batteri e agli ioni, a cui si è dovuto rimuovere lo ione sodio per motivi di troppa correlazione con le altre variabili chimiche, si nota come lo ione calcio sia strettamente correlato a *Halobacteriales* (108) e allo ione nitrato a sua volta correlato agli *Armatimonadales* (55). Lo ione magnesio, poco significativo risulta però ben correlato con *Gemmatimonadales* (45). Lo ione cloruro è correlato direttamente con *Aquificales* (102) ed inversamente con *Acholeplasmatales* (46)

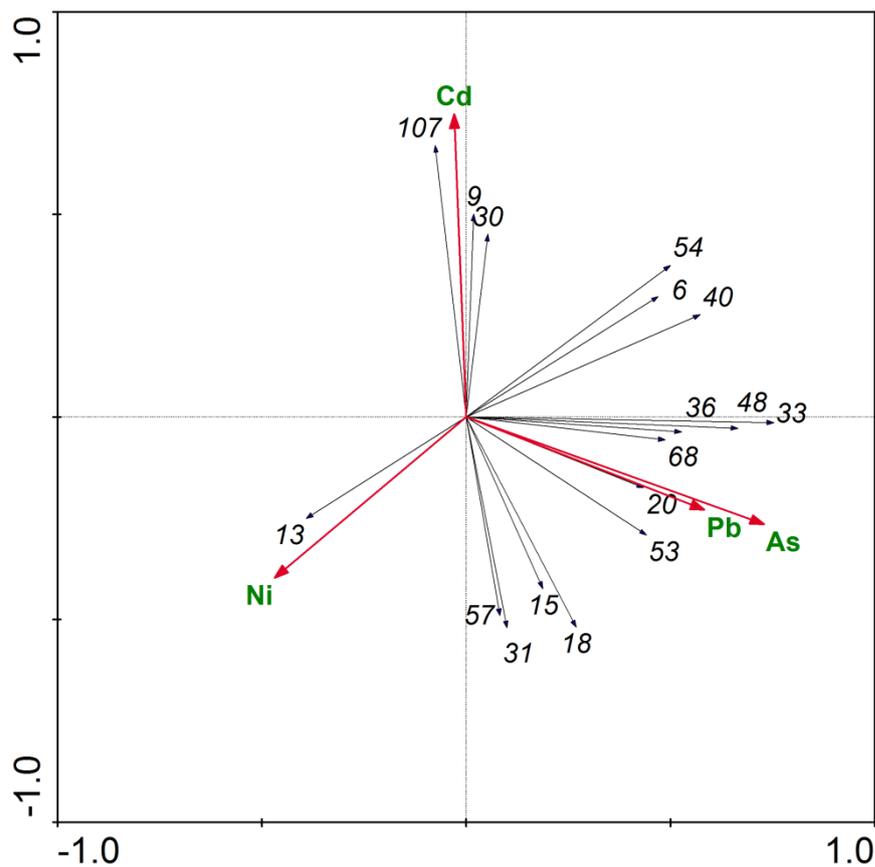


Fig. 9.60. Grafico RDA dei metalli di interesse sanitario analizzati e degli Ordini dei batteri nel sito di Venezia.

I metalli di interesse sanitario nel sito di Venezia presentano delle correlazioni molto forti con alcuni Ordini di batteri.

In particolare il nickel è correlato positivamente con *Rhodobacterales* (13) ed inversamente correlato con *Puniceococcales* (54), *Bacillales* (6) e *Aeromonadales* (40).

Piombo ed arsenico sono correlati con *Erysipelotrichales* (20) e il cadmio con *Methanocellales* (107), *Enterobacteriales* (9) e *Methylophilales* (30).

9.5.6 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DELL'ANALISI RDA

L'analisi RDA ha mostrato come vi siano delle correlazioni positive e negative fra gli Ordini dei batteri e le specie chimiche prese in esame.

Si possono inoltre osservare delle similarità di correlazione fra le stazioni di campionamento.

L'analisi RDA complessiva degli Ordini dei batteri e degli elementi chimici, nonostante, come già detto precedentemente, abbia una la significatività di poco elevata, viene comunque esposta, poiché rappresenta un primo approccio allo studio e permette uno sguardo d'insieme delle quattro stazioni prese in esame.

Analizzando i grafici e le relative correlazioni si nota che i *Planctomycetales* (19) sono correlati al calcio in forma elementare e ionica nelle stazioni di Malcontenta, Venezia e Milano. Nella stazione di Via Lissa non è così strettamente correlato né al calcio in forma elementare né ionica.

I *Chlamydiales* (58), batteri intracellulari, appaiono correlati, nei siti di Via Lissa e Venezia, allo ione nitrato.

Gli *Acidimicrobiales* (22) sono correlati nei siti di Via Lissa, Venezia e Milano ai metalli, in particolare al ferro. Nel sito di Malcontenta essi sono correlati ad arsenico, titanio ed alluminio, ma meno al ferro.

I *Caulobacterales* (23) nei siti di Malcontenta, Milano e Via Lissa sono correlati con gli *Acidimicrobiales* e, di conseguenza, agli elementi a loro correlati.

I *Myxococcales* (18) batteri a bastoncino, sono strettamente aerobi e si rinvencono nel suolo, nell'acqua e nell'humus (Huntley et al., 2011), sono presenti a Milano e Malcontenta in associazione con gli ioni calcio e magnesio e in Via Lissa con il calcio e magnesio elementare. Queste specie chimiche spesso sono associate all'erosione e la risospensione del suolo (Perrone et al, 2010).

I *Rhodobacterales* (13) batteri dominanti e ubiquitari colonizzatori di superficie nelle acque costiere temperate (Dang et al., 2008) sono correlati a ioni calcio e magnesio nei siti di Malcontenta e Via Lissa e al ferro nel sito di Milano.

Nitrosomonadales (47), Ordine gram negativo dei Proteobacteria sono noti perché alcuni membri di questo Ordine ossidano, con il processo di nitrificazione l'ammonio a nitrito (Garrit et al., 2005). In quest'analisi esplorativa appaiono

correlati con lo ione ammonio nel sito di Via Lissa, mentre lo sono poco nel sito di Milano.

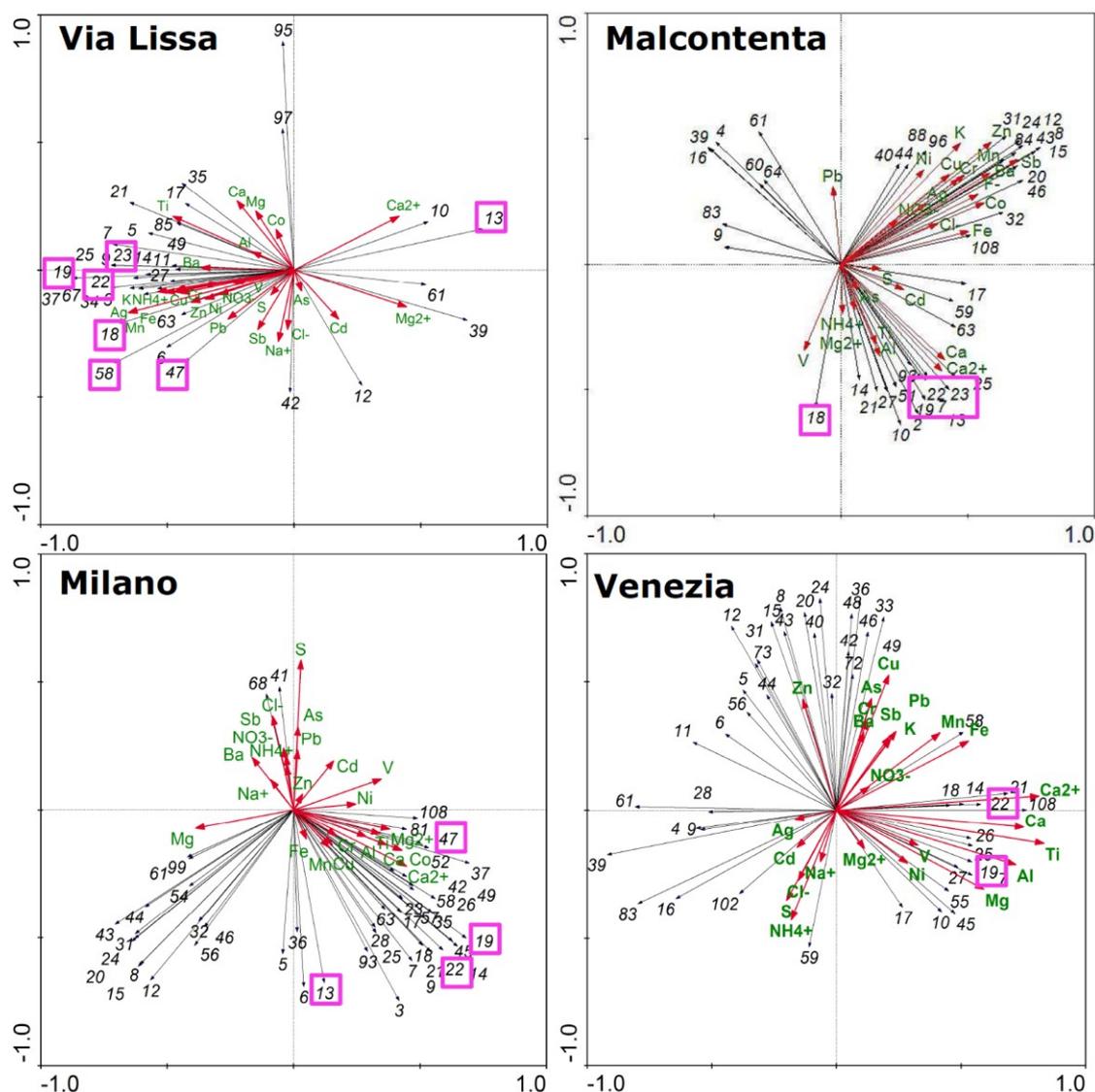


Fig. 9.61. Analisi RDA per le specie chimiche significative e gli Ordini dei batteri condotta sui quattro siti di campionamento.

L'analisi RDA sugli ordini dei batteri e gli ioni presenta una buona significatività ($p=0,0040$ nel sito di via Lissa e $p=0,0020$ nei siti di Malcontenta, Milano, Venezia).

In tabella 9.9 sono riportate le varianze spiegate dalla correlazione batteri-ioni.

Tab. 9.9. Varianza spiegata della correlazione fra gli Ordini dei batteri e gli ioni.

Relazione specie/ambiente	assi			
	1	2	3	4
Via Lissa	36,7	58,3	75,1	84,6
Malcontenta	41,1	64,0	77,4	86,8
Milano	36,7	56,7	72,9	84,9
Venezia	39,5	69,2	82,4	93,2

Con questo approccio si vuole tentare di osservare se vi sono delle interazioni fra la componente biotica presente in atmosfera e la frazione solubile del particolato.

I *Burkholderiales* (4) correlati con ione cloruro ed ammonio nei siti di Milano e Venezia, sono batteri con caratteristiche fenotipiche, metaboliche e ecologiche diverse. Questo ordine include batteri strettamente aerobi e anaerobi facoltativi chemoorganotrofi, chemolitotrofi obbligati e facoltativi, agenti azoto fissatori e patogeni per piante, animali e per l'uomo (Garrit et al., 2005a).

Gli *Pseudomonadales* (11) sono un ordine di batteri chemorganotrofi, con metabolismo respiratorio. I più sono mobili per mezzo di flagelli. *Azomonas* spp. e *Azobacter* spp. fissano l'azoto. Quest'ordine si presenta in buona correlazione con lo ione ammonio nei siti di Milano e Via Lissa.

I *Myxococcales* (18) come esplicitato in precedenza sono batteri a bastoncino, strettamente aerobi che si rinvencono nel suolo, nell'acqua e nell'humus (Huntley et al., 2011). Si trovano in correlazione con gli ioni calcio e magnesio dei siti di Milano e Malcontenta. Nel sito di Via Lissa essi non appaiono affatto correlati a questi ioni, ma piuttosto agli ioni ammonio e nitrato, probabilmente per la maggior propensione, in questo sito, alla correlazione con il calcio e magnesio elementare.

Gli *Sphingomonadales* (14) appaiono in correlazione, nei siti di Malcontenta, Milano e Venezia con lo ione calcio. In entrambi i siti di Malcontenta e Venezia essi appaiono correlati negativamente con Pasteurellales (61).

L'ordine *Planctomycetales* (19) appare ben correlato nei siti di Milano e Malcontenta allo ione calcio, in particolare nel sito di Milano anche allo ione

magnesio. Nel sito di Via Lissa quest'ordine è correlato inversamente con questi due ioni.

Nitrosomonadales (47) sono un ordine gram negativo dei Proteobacteria noti perché alcuni membri di questo ordine ossidano, con il processo di nitrificazione l'ammonio a nitrito (Garrit et al., 2005b). In quest'analisi esplorativa appaiono correlati con lo ione ammonio nel sito di Via Lissa, mentre lo sono poco nel sito di Milano.

Caulobacterales (23) nei siti di Malcontenta e Via Lissa appaiono ben correlati a allo ione ammonio e, nel caso di Malcontenta, allo ione calcio.

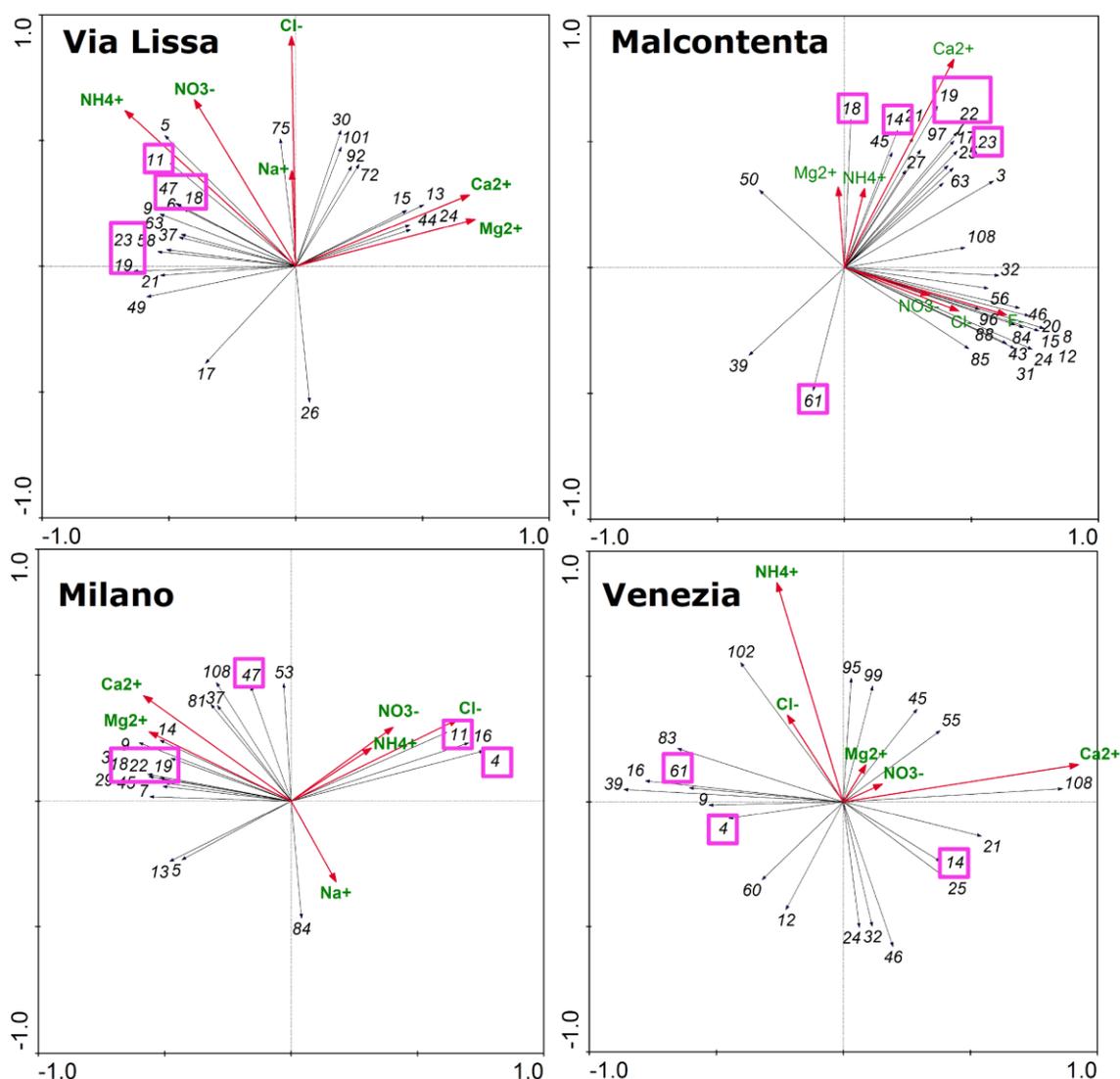


Fig. 9.62. Analisi RDA delle specie ioniche significative e gli Ordini dei batteri condotta sui quattro siti di campionamento.

L'analisi RDA sugli ordini dei batteri e i metalli di interesse significativa solo per alcuni siti, ($p=0,192$ nel sito di via Lissa e $p=0,0140$ nel sito di Malcontenta, $p=0,250$ nel sito di Milano, $p=0,0050$ nel sito di Venezia). Tuttavia la varianza spiegata della correlazione fra gli ordini e l'ambiente è abbastanza buona.

Tab. 9.10. Varianza spiegata della correlazione fra gli Ordini dei batteri e l'ambiente.

Relazione specie/ambiente	assi			
	1	2	3	4
Via Lissa	41,8	72,2	87,7	100,0
Malcontenta	44,7	69,1	87,6	100,0
Milano	41,6	72,8	90,4	100,0
Venezia	35,9	67,7	89,7	100,0

I metalli di interesse sanitario sono quegli elementi capaci produrre effetti pesanti sull'uomo, sugli animali e sugli ecosistemi a causa della loro biodisponibilità e tossicità, tanto da essere soggetti a limiti per la loro concentrazione nella normativa italiana.

Gli appartenenti all'Ordine *Clostridiales* (8) sono dei batteri profondamente diversi fenotipicamente, chemotassonomicamente, fisiologicamente ed ecologicamente (Vos et al., 2009). Quest'Ordine contiene batteri sia Gram positivi che Gram negativi. Nei siti di Via Lissa e Malcontenta appaiono correlati al nickel.

Gli *Erysipelotrichales* (20) risultano correlati, nei siti di Malcontenta e Via Lissa con il nickel mentre nel sito di Venezia la correlazione più forte si ha con il piombo e l'arsenico.

Rhodospirillales (17) si presentano in correlazione positiva con il nickel nei punti di campionamento di Malcontenta e Milano.

Gli appartenenti all'ordine *Gemmatimonadales* (45) sono batteri a bastoncino aerobi (Zhang et al., 2003) che nei siti di Milano e Malcontenta risultano essere fortemente correlati al nickel. Nella banca dati UniProt, una banca dati di sequenze di proteine, è riportato che *Gemmatimonas aurantica*, una specie appartenente a quest'ordine, potrebbe possedere una proteina ad alta affinità con il

nickel. Questo, se fosse confermato, andrebbe a chiarire il motivo di tale correlazione.

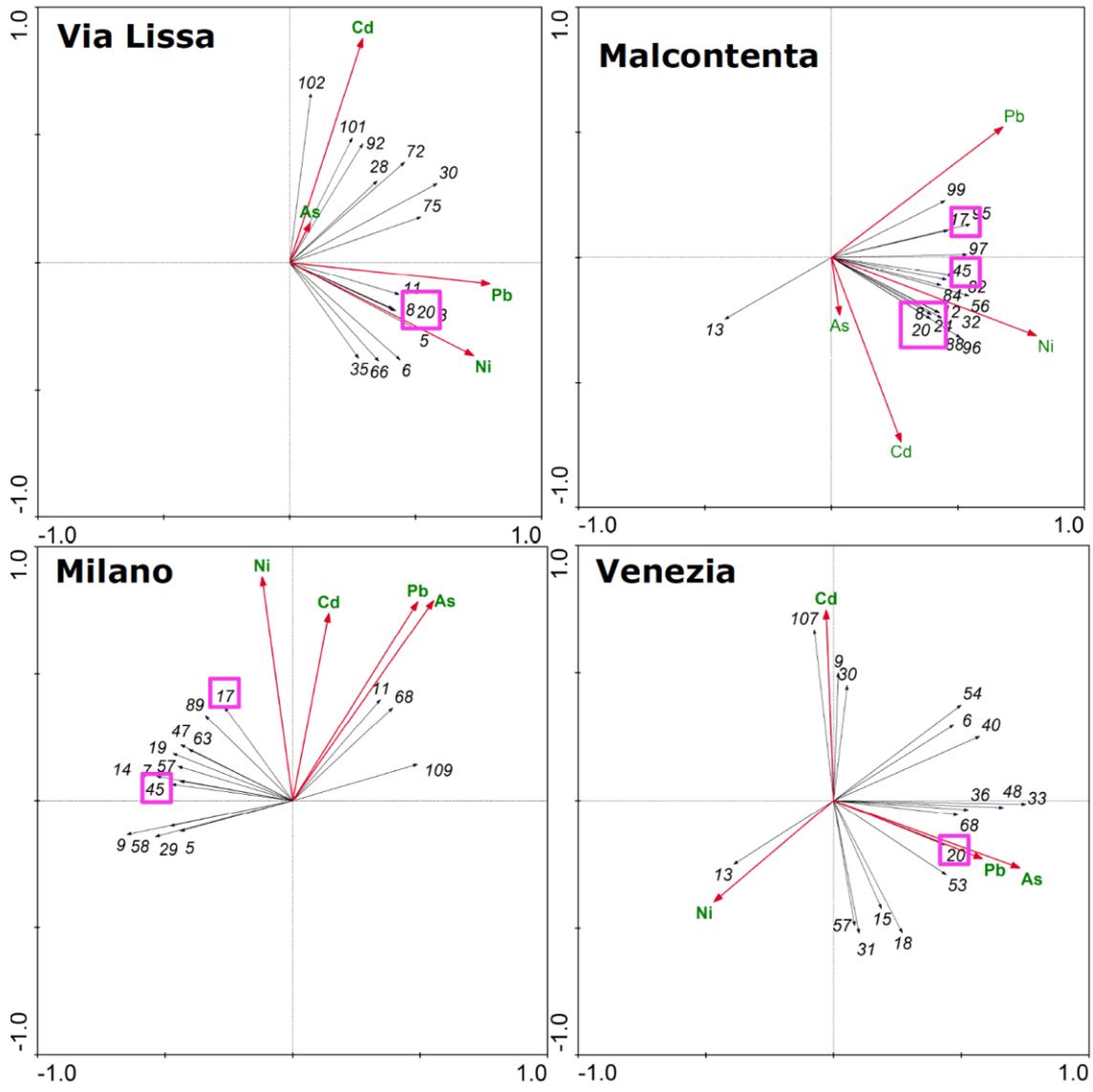


Fig. 9.63. Analisi RDA dei metalli di interesse sanitario e gli Ordini dei batteri condotta sui quattro siti di campionamento.

9.6 ANALISI FATTORIALE

Sui campioni di Via Lissa, Malcontenta e Venezia è stata effettuata un'analisi fattoriale al fine di poter individuare le principali sorgenti e i principali processi che hanno portato alla formazione del particolato atmosferico.

Per poterla portare a termine è stato necessario unire le tre matrici dei dati dell'area veneziana, poiché, affinché questo metodo di statistica multivariata sia significativo, la matrice deve avere dimensioni pari a $50+n$, con n rappresentante il numero di variabili considerate.

Tramite analisi della varianza (ANOVA) sono state selezionate 13 variabili che risultano omogeneamente distribuite ($p>0.05$). Queste variabili sono: Al, S, Ca, K, Ti, Mn, Zn, Ba, Pb, Sb, V, NH_4^+ e NO_3^- .

L'analisi fattoriale (tabella 9.11) ha estratto 4 fattori per una varianza totale spiegata dell'82,4%.

I fattori che si presentano sono:

- Fattore 1: combustione e traffico, caratterizzato da K, Mn, Zn, Ba, Ni, Sb e NO_3^- (Querol et al., 2007).
- Fattore 2: crostale, caratterizzato da Al, Ca e Ti (Querol et al., 2001).
- Fattore 3: aerosol secondario, caratterizzato da S e NH_4^+ (Kong et al., 2010)
- Fattore 4: combustione di idrocarburi, caratterizzato da V e Ni. In questo caso si è in presenza di specie che caratterizzano i processi di combustione di idrocarburi (Querol et al 2007, Rampazzo et al., 2008a)

Tab. 9.11. Valori dei loadings dell'analisi fattoriale condotta fra i campioni nell'area veneziana.

	1	2	3	4
Al	0,05	0,93	0,04	0,10
S	0,14	0,04	0,91	-0,11
Ca	0,15	0,90	-0,06	0,23
K	0,91	0,16	0,11	0,16
Ti	0,15	0,91	0,00	0,07
Mn	0,77	0,44	0,06	0,21
Zn	0,87	0,01	0,26	-0,10
Ba	0,82	0,31	0,11	-0,29
Ni	0,54	0,20	-0,04	0,70
Sb	0,84	0,02	-0,05	0,03
V	-0,15	0,27	0,05	0,88
NO ₃ ⁻	0,56	-0,19	0,34	0,28
NH ₄ ⁺	0,12	-0,03	0,91	0,13
Varianza spiegata	32,8	22,8	14,4	12,3
Varianza cumulata	32,8	55,6	70,0	82,4

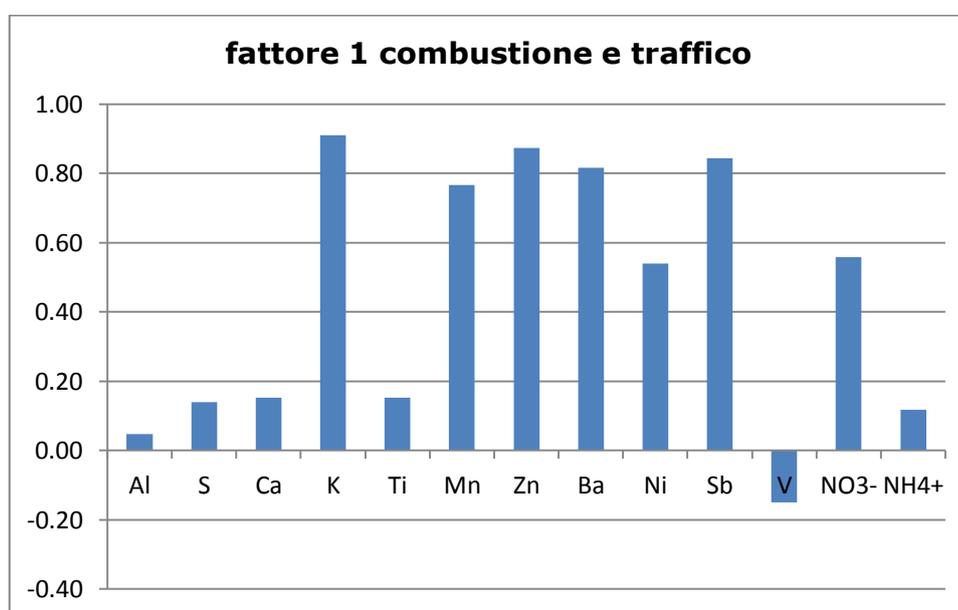


Fig. 9.64. Fattore 1 risultante dai campioni dell'area veneziana.

Nel grafico 9.64 sono riportate le variabili estratte e i relativi pesi dei loadings del primo fattore, denominato "combustione e traffico" caratterizzato da K, Mn, Zn, Ba, Ni, Sb, NO₃⁻.

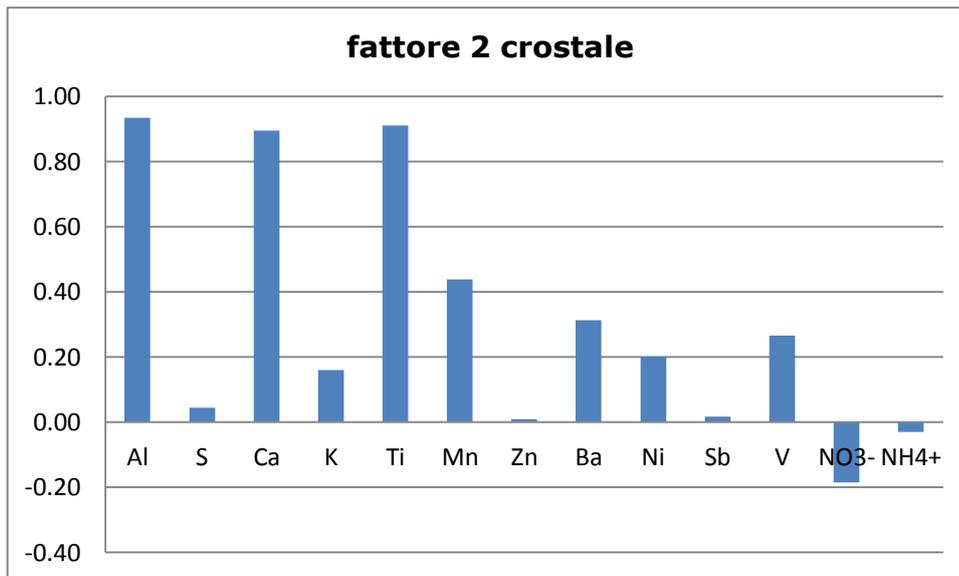


Fig. 9.65. Fattore 2 risultante dai campioni dell'area veneziana.

Nel grafico 9.65 sono riportate le variabili estratte e i relativi pesi dei loadings del secondo fattore, denominato "crostale", caratterizzato da Al, Ca, Ti.

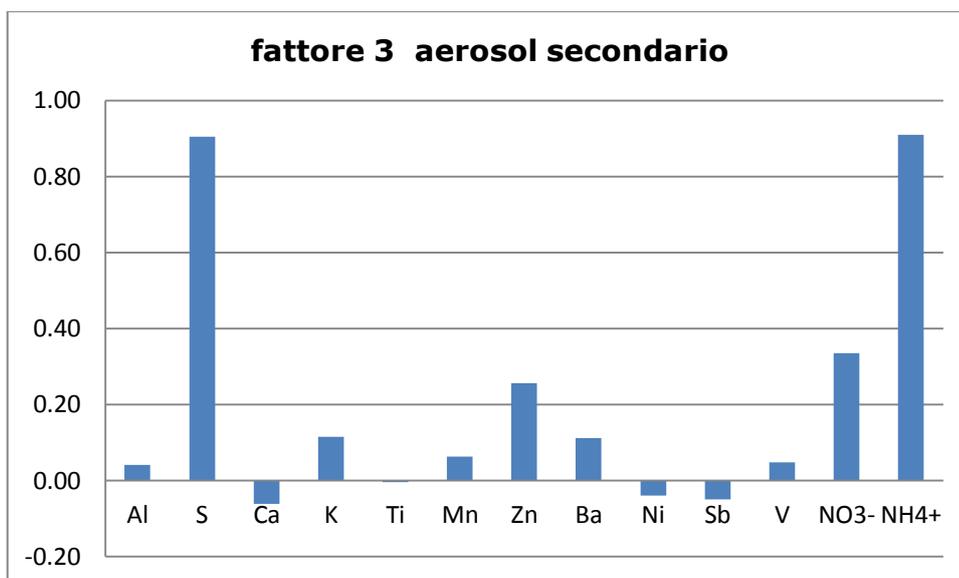


Fig. 9.66. Fattore 3 risultante dai campioni dell'area veneziana.

Nel grafico 9.66 sono riportate le variabili estratte e i relativi pesi dei loadings del terzo fattore, denominato "aerosol secondario" caratterizzato da S e NH₄⁺.

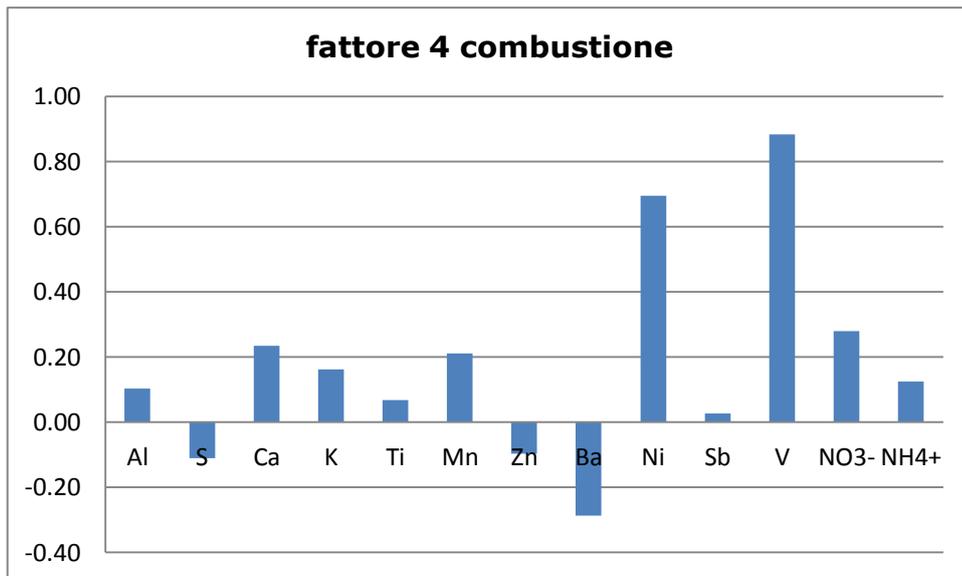


Fig. 9.67. Fattore 4 risultante dai campioni dell'area veneziana.

Nel grafico 9.67 sono riportate le variabili estratte e i relativi pesi dei loadings del quarto fattore, denominato "combustione di idrocarburi", caratterizzato da V_e Ni.

9.6.1 ANALISI RDA

Analogamente a quanto fatto con le singole specie chimiche si è condotta un'analisi RDA fra gli scores, che rappresentano i "pesi" dei fattori nel campione, ottenuti dall'analisi fattoriale, e gli ordini batterici presenti nei tre siti dell'area Veneziana.

9.6.1.1 Analisi RDA del sito di Via Lissa

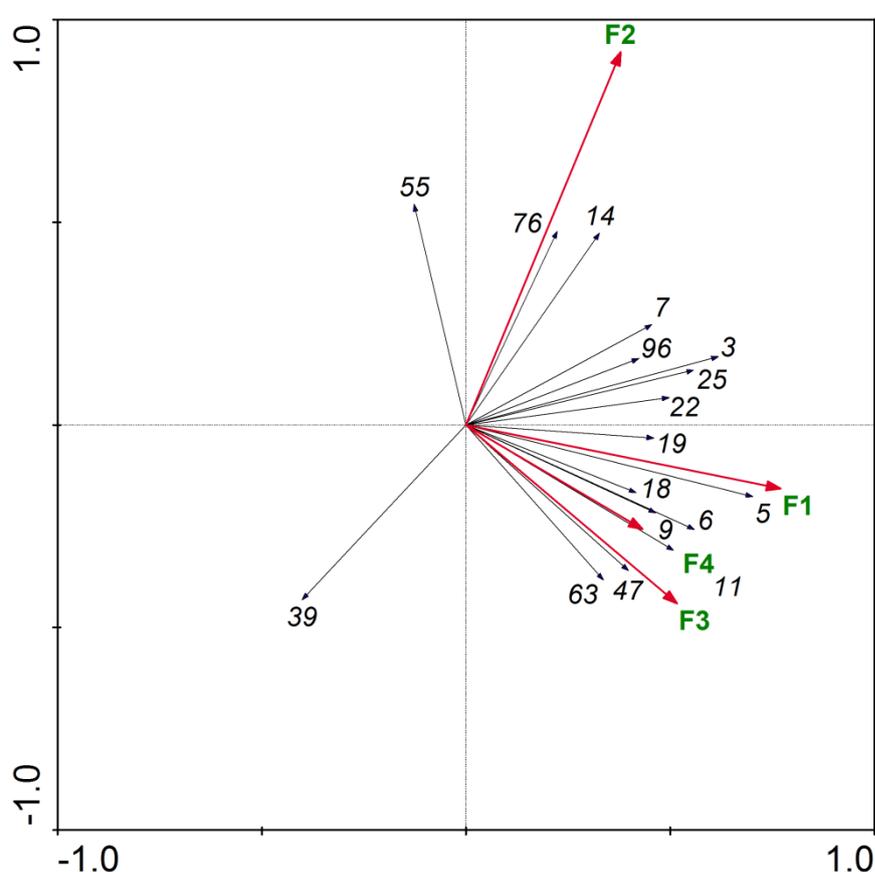


Fig. 9.68. Grafico dell'analisi RDA degli scores dei fattori dell'analisi fattoriale e degli Ordini di batteri nel sito di Via Lissa.

Dall'analisi RDA tre dei quattro fattori ricavati dall'analisi fattoriale risultano più strettamente correlati fra di loro.

In particolare il primo fattore (fattore combustione e traffico) risulta correlato direttamente con *Flavobacteriales* (5) e *Planctomycetales* (19). Il secondo fattore

(crostale) è correlato direttamente con *Natranaerobiales* (76) e inversamente correlato con *Neisseriales* (39).

Il quarto fattore (combustione da idrocarburi) risulta fortemente correlato a *Pseudomonadales* (11), *Enterobacteriales* (9) e *Bacillales* (6).

9.6.1.2 Analisi RDA del sito di Malcontenta

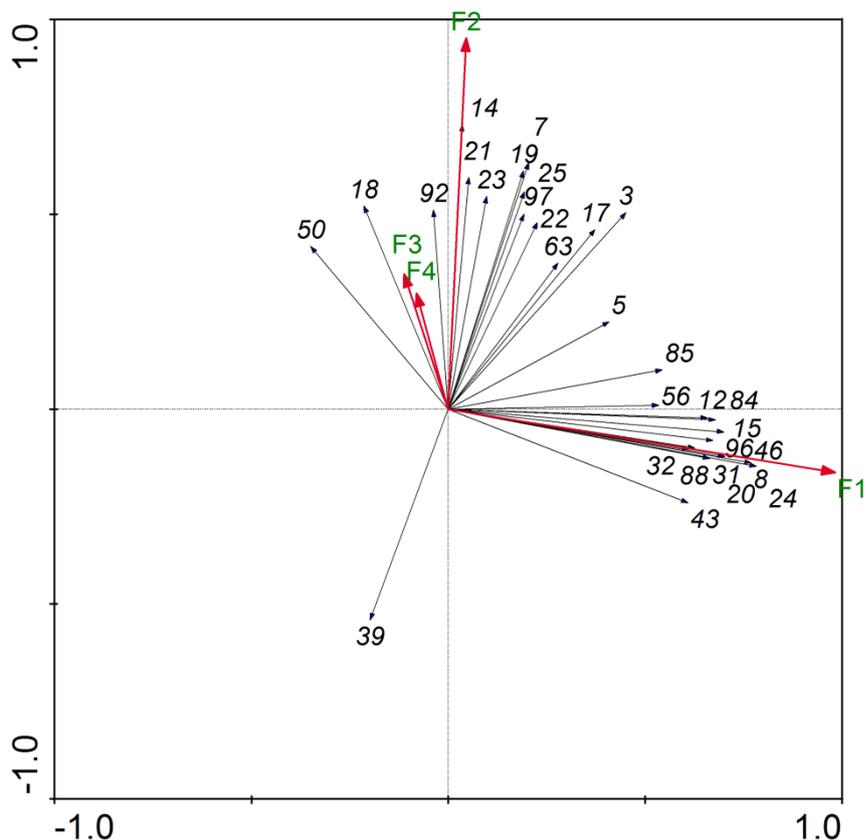


Fig. 9.69. Grafico dell'analisi RDA degli scores dei fattori dell'analisi fattoriale degli ordini dei batteri nel sito di Malcontenta.

Dall'analisi RDA tre dei quattro fattori risultano più strettamente correlati fra di loro.

Il secondo fattore (crostale), il terzo (secondario) e il quarto (combustione) risultano correlati fra di loro e ad alcuni ordini batterici. In particolare, il terzo e il quarto fattore sono strettamente correlati fra di loro e ai *Myxococcales* (18) e *Anaerolineales* (92). Il secondo fattore invece risulta più strettamente correlato a *Sphingomonadales*, (14) *Solirubrobacterales* (21) e *Caulobacterales* (23).

Il primo fattore invece risulta strettamente correlato molti ordini batterici: *Elusimicrobiales* (96), *Acholeplasmatales* (46), *Thermomicrobiales* (88), *Bifidobacteriales* (31), *Methanobacteriales* (32), *Erysipelotrichales* (20), *Selenomonadales* (24), *Clostridiales* (8).

9.6.1.3 Analisi RDA del sito di Venezia

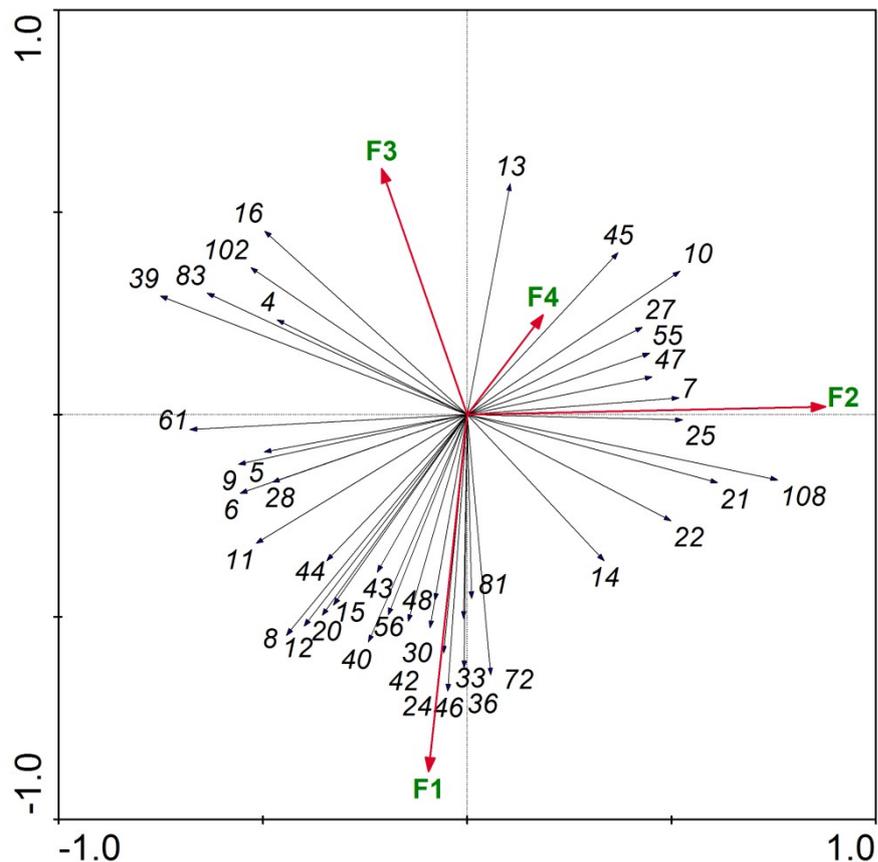


Fig. 9.70. Grafico dell'analisi RDA degli scores dei fattori dell'analisi fattoriale degli Ordini dei batteri nel sito di Venezia.

I risultati dell'elaborazione mostrano un grafico in cui i fattori 1 (combustione traffico) e 3 (aerosol secondario) sono significativamente e negativamente correlati tra loro.

Il fattore combustione e traffico è il fattore che presenta le maggiori correlazioni con i batteri. Esso infatti è fortemente correlato a *Methylophilales* (30), *Selenomonadales* (24), *Alteromonadales* (33), *Campylobacteriales* (36), *Rickettsiales* (42), *Acholeplasmatales* (46) e *Desulfobacteriales* (72). È invece correlato negativamente con *Rhodobacteriales* (13).

Il secondo fattore (crostale) appare fortemente correlato con *Sphingobacteriales* (7) e *Verrucomicrobiales* (25) e correlato negativamente con *Pasteurellales* (61)

Il terzo fattore (aerosol secondario) risulta meno correlato degli altri con i batteri, ad eccezione della correlazione negativa con *Sphingomonadales* (14).

Il quarto fattore (combustione) è in correlazione positiva con *Gemmatimonadales* (45) e negativa con *Fusobacteriales* (44), *Clostridiales* (8), *Lactobacillales* (12), *Bacteroidales* (15) ed *Erysipelotrichales* (20).

9.6.1.3 Discussione dei risultati dell'analisi RDA

Anche in questo caso l'analisi RDA ha mostrato come vi siano delle correlazioni positive e negative fra i generi dei batteri e gli scores dei fattori e come precedentemente si possono osservare delle similarità di correlazione fra le stazioni di campionamento.

L'analisi RDA sugli ordini dei batteri e gli scores dei fattori dell'analisi fattoriale condotta sui siti dell'area veneziana è significativa per per il sito di Via Lissa $p=0,0240$ e per il sito di Malcontenta ($p=0,0020$).

Per il sito di Venezia non risulta essere significativa ($p=0,337$) forse a causa del numero inferiore di campioni. Tuttavia anche nel sito di Venezia la varianza spiegata della correlazione fra gli Ordini dei batteri e l'ambiente rimane buona.

Tab. 9.12. Varianza spiegata della correlazione fra gli ordini dei batteri e gli scores.

Relazione specie/ambiente	assi			
	1	2	3	4
Via Lissa	47,1	72,3	90,4	100,0
Malcontenta	44,8	73,7	90,3	100,0
Venezia	42,3	74,1	89,6	100,0

Con questa elaborazione statistica si sono voluti correlare gli ordini dei batteri con gli scores dei fattori dell'analisi fattoriale condotta sui campioni dell'area veneziana.

Gli *Sphingomonadales* (14) sono dei batteri gram-negativi, a forma di bastoncino od ovoidali, aerobi, con un metabolismo strettamente legato all'ossigeno quale accettore terminale di elettroni, con l'unica eccezione del genere *Zymomonas* che è un anaerobo facoltativo e ha un metabolismo fermentativo. Alcune specie sintetizzano la batterioclorofilla e sono fototrofi facoltativi (Garrity et al. 2005).

Quest'ordine è fortemente correlato al fattore 2 il fattore crostale in tutti e tre i siti dell'area veneziana.

Sphingobacteriales (7) ed *Acidimicrobiales* (22) anche i batteri di questi ordini sono correlati con il fattore crostale in tutti e tre i siti dell'area veneziana.

I *Planctomycetales* (19) sono correlati con il fattore crostale nel sito di Malcontenta, ma sono correlati al fattore 1 (combustioni e traffico) nel sito di Via Lissa.

I batteri dell'ordine *Solirubrobacterales* (21) sono Gram-positivi, mesofili, talvolta psicrotolleranti (Reddy e Garcia-Pichel, 2009). I batteri di quest'ordine sono correlati al fattore crostale sia nel sito di Malcontenta che di Venezia.

I batteri dell'ordine *Erysipelotrichales* (20) risultano correlati al primo fattore (combustione e traffico) nei siti di malcontenta e Venezia.

I *Neisseriales* (39) sono descritti come Gram-negativi, aerobi, non sporigeni e mesofili (Adeolu e Gupta, 2013) sono correlati negativamente con il secondo fattore.

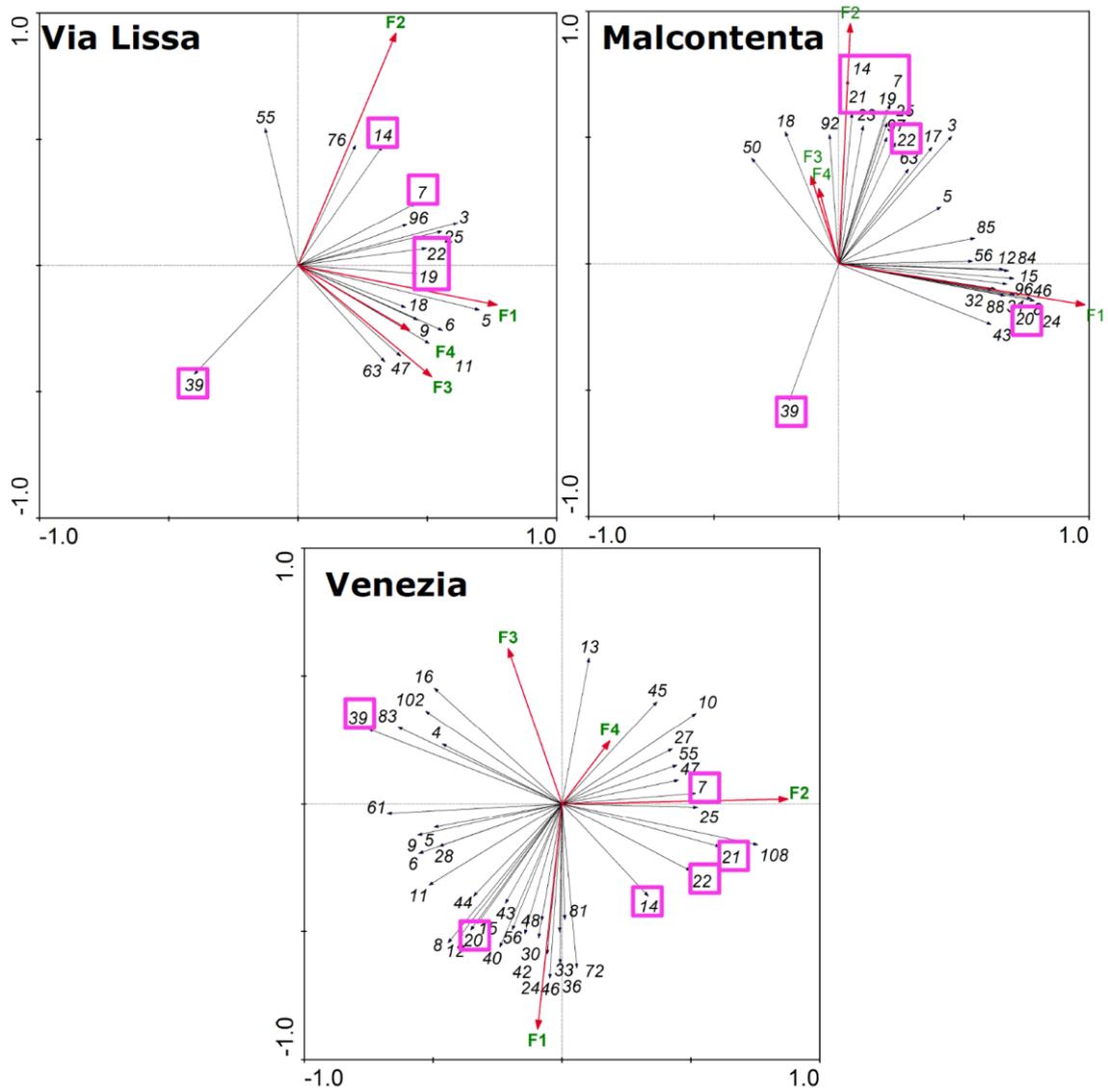


Fig. 9.71. Analisi RDA condotta sugli scores dei fattori e gli ordini batterici sui quattro siti di campionamento.

9.7 RELAZIONE CON I PARAMETRI AMBIENTALI

Si è cercato di comprendere se esistessero delle relazioni fra i parametri meteo-climatici e le determinazioni delle popolazioni batteriche e delle specie chimiche, ma le metodologie di indagine statistica impiegate non erano idonee e si è ritenuto di non presentare i risultati.

È chiaro che questa relazione debba essere argomento di future indagini, al fine di comprendere se la composizione tassonomica delle popolazioni batteriche aerodisperse siano influenzate dalle condizioni meteorologiche.

10 CONCLUSIONI

Con questo lavoro, si è tentato un approccio integrato fra una metodologia prettamente geochimica e una prettamente biologica allo studio dell'inquinamento atmosferico.

Per poter ottenere dei campioni idonei a tutte e due le tipologie di analisi si sono dovute ideare delle strategie di campionamento, conservazione e trattazione del supporto filtrante su cui sono state raccolte le polveri atmosferiche. Successivamente si è dovuto comprendere come trattare i dati ottenuti, poiché sono di natura estremamente diversa fra di loro.

Dall'analisi dei dati si è potuto osservare che gli andamenti delle concentrazioni delle polveri sottili sono simili nei siti di Milano Via Lissa e Malcontenta, anche se queste non sembrano correlate né con l'indice di Shannon, né con il numero di Ordini di batteri osservati.

L'analisi degli elementi ha restituito valori piuttosto elevati di zolfo e bario, quest'ultimo associato con lo zinco, è probabilmente associabile ad emissioni da traffico (Querol et al., 2007).

La concentrazione anomala di ferro osservata in Via Lissa è probabilmente causata dalla vicinanza del campionatore con i binari ferroviari, mentre l'alta concentrazione di calcio e alluminio a Milano probabilmente sono dovuti alla vicinanza di un cantiere (Querol et al., 2001).

Sempre a Milano vi è un'alta concentrazione di ioni nitrato, di probabile origine secondaria, mentre a Venezia vi è una preponderanza di ioni sodio e cloro.

Durante il periodo di campionamento invernale i giorni di bora hanno determinato un abbassamento delle concentrazioni delle specie chimiche, tranne degli elementi definiti cristallini, quali alluminio, calcio elementare, magnesio elementare e titanio (Pandolfi et al., 2010), che presentano degli aumenti nelle concentrazioni.

Si nota come in tutte e quattro le stazioni di campionamento la specie chimica che si presenta con maggior percentuale è lo ione nitrato, seguita solitamente dallo ione ammonio. È interessante notare che durante l'inverno nel sito di Milano, vi sia una percentuale più alta rispetto alle altre stagioni e agli altri siti di campionamento di bario, probabilmente imputabile all'usura dei pneumatici (Querol et al., 2007).

Da una prima analisi delle Ordini dei batteri campionati si osserva che solitamente vi è una percentuale di sequenze non riconosciute che va dal 40 al 20%.

Fra gli ordini che presentano abbondanze relative maggiori in tutte le stazioni di campionamento vi sono gli *Actinomycetales* e i *Burkholderiales*, questi ultimi sono presenti in maggior percentuale nel sito di Malcontenta in tre stagioni su quattro (estate, autunno e primavera) mentre a Milano è l'ordine presente con più abbondanza in inverno.

I *Rhizobiales* sono invece quasi sempre presenti con la stessa percentuale in tutte le stazioni e tutti i periodi di campionamento con un aumento di percentuale nella stagione primaverile.

In primavera, a Milano e Malcontenta vi è una percentuale abbastanza elevata di cloroplasti, probabilmente dovuta alla posizione del campionario nelle vicinanze di erba o alberi.

Sempre nella stagione primaverile è interessante osservare che nelle stazioni dell'area Veneziana l'abbondanza relativa dei *Rhodobacterales* sia abbastanza alta. Come già detto quest'ordine è composto da batteri dominanti e colonizzatori di superficie delle acque costiere temperate (Dang et al., 2008). La loro presenza percentuale maggiore in quest'area è probabilmente dovuta alla vicinanza con l'ambiente marino.

Nella stazione di Venezia sono presenti, in abbondanze relative maggiori rispetto alle altre stazioni di campionamento, gli *Halobacteriales*, batteri che vivono in ambienti ipersalini e che nel loro metabolismo impiegano cloruro di sodio (Wright, 2006). In questo sito, per la presenza della Laguna di Venezia, sono stati rinvenuti alti tenori degli ioni cloro e sodio, che potrebbero spiegare ed la presenza di questi microorganismi. Si è inoltre osservato che le abbondanze relative maggiori di questi batteri siano associabili ai giorni 1 e 2 febbraio 2012, giorni in cui spirava un forte vento di bora che potrebbe aver contribuito al loro trasporto.

L'indice di Shannon è risultato essere di 3,70 nel sito di Via Lissa, 3,18 nel sito di Malcontenta, 3,53 nel sito di Milano e 3,81 nel sito di Venezia. Questo è risultato correlato a numerosi ioni ed elementi chimici. Particolarmente interessante è la sua correlazioni inversa con gli ioni cloro e sodio nel sito di Venezia e le correlazioni positive di H' con ferro, titanio, cromo, manganese e rame che sono presenti nei siti di Via Lissa e Malcontenta.

L'analisi discriminante condotta sugli Ordini di batteri ha mostrato come la rappresentazione della prima e seconda funzione discriminante e della prima e terza funzione discriminante indichino delle differenze, nel bioaerosol, fra l'area veneziana e l'area milanese.

La rappresentazione della seconda e terza funzione ha mostrato invece una parziale sovrapposizione dei gruppi, forse dovuto alla presenza, in seconda funzione, dell'Ordine *Myxococcales*, Ordine non discriminante e quindi ubiquitario nei siti di campionamento.

Anche l'analisi discriminante condotta fra le specie chimiche ha mostrato un andamento simile, presentando però una maggiore separazione fra i siti di campionamento.

Con l'analisi RDA si è cercato di comprendere quanto siano correlati gli ordini batterici alle variabili ambientali.

L'analisi degli ordini dei batteri e delle specie chimiche ritenute significative, nonostante la significatività statistica non sia elevata, permette un primo approccio allo studio e permettono uno sguardo d'insieme alle quattro stazioni prese in esame. Questo approccio ha permesso di individuare degli ordini di batteri correlati alle variabili chimiche e delle correlazioni che si ripetono nelle stazioni di campionamento.

Questo è il caso di *Planctomycetales* correlati al calcio elementare e ionico nei siti di Milano, Malcontenta e Venezia.

I *Chlamydiales* invece appaiono correlati, nei siti di Via Lissa e Venezia, allo ione nitrato.

Particolarmente interessanti sono i *Myxococcales*, correlati a calcio e magnesio elementari o ionici nei siti di Milano, Via Lissa e Malcontenta. Questi batteri, che solitamente si rinvencono nel suolo (Huntley et al., 2011), sono risultati essere correlati a specie chimiche associate all'erosione e risospensione del suolo (Perrone et al., 2010). Questo potrebbe essere un segnale della provenienza comune di batteri e specie chimiche.

Sempre significativa e interessante per comprendere se vi sia una relazione fra i batteri aerodispersi e le variabili chimiche dell'atmosfera è la correlazione, nel sito di Via Lissa, fra ione ammonio e i *Nitrosomonadales*, un ordine nel quale sono presenti specie che generano ossidano, con il processo di nitrificazione l'ammonio a nitrito (Garrit et al., 2005).

L'analisi degli Ordini di batteri e gli ioni solubili inorganici ha evidenziato numerose correlazioni, anche ripetute nelle stazioni di campionamento.

Sono state osservate numerose correlazioni fra ammonio e nitrato con batteri azoto fissatori.

È il caso dei *Burkholderiales*, correlati con cloruro e ammonio nei siti di Milano e Venezia. Alcuni degli appartenenti a quest'ordine sono infatti agenti azoto fissatori (Garritty et al., 2005a).

Anche l'Ordine *Pseudomonadales* ha al suo interno dei batteri che fissano l'azoto e sono correlati allo ione ammonio sia a Milano che in Via Lissa.

Anche l'analisi condotta con i metalli di interesse sanitario ha permesso l'osservare di correlazioni ripetute nei siti.

Particolarmente interessante è la correlazione dei *Gemmatimonadales* al nickel nei siti di Milano e Malcontenta, perché nella banca dati UniProt, una banca dati di sequenze di proteine, è riportato che *Gemmatimonas aurantica*, una specie appartenente a quest'ordine, potrebbe possedere una proteina con un'alta affinità al nickel. Questo, se fosse confermato potrebbe chiarire questa correlazione.

Infine è stata effettuata un'analisi fattoriale condotta sui soli campioni dell'area veneziana.

Da quest'analisi sono risultati quattro fattori che sono stati definiti: (1) combustione e traffico, caratterizzato da K, Mn, Zn, Ba, Ni, Sb e NO_3^- ; (2) crostale, caratterizzato da Al, Ca e Ti; (3) aerosol secondario, caratterizzato da S e NO_3^- e NH_4^+ (4) combustione di idrocarburi, caratterizzato da V e Ni.

Gli scores dell'analisi fattoriale sono stati poi utilizzati come variabili ambientali nell'analisi RDA condotta con i batteri presenti nell'area Veneziana.

Si è potuto osservare le correlazioni che si presentano in più di un sito quasi tutte con il fattore 2 cioè quello definito crostale. Questo potrebbe indicare una sospensione del suolo e dei batteri presenti in esso in aria.

Secondariamente essi appaiono correlati al fattore 1 combustione e traffico.

Infine si è tentato di comprendere se esistano delle relazioni fra i parametri meteo-climatici, le specie chimiche e gli ordini dei batteri, ma le metodologie di analisi statistica impiegate non sono risultate idonee e i risultati non sono stati presentati.

Con questo lavoro si è evidenziato come vi siano delle buone probabilità per le quali i batteri e la composizione chimica del particolato siano correlati fra di loro. Data la complessità dell'argomento, le probabili implicazioni in campo scientifico-sanitario e le poche informazioni attualmente disponibili è auspicabile che in futuro vengano effettuate ulteriori indagini su questo argomento ancora così poco sviluppato, al fine di comprendere a fondo come i batteri siano influenzati ed influenzino le dinamiche atmosferiche e se vi siano delle composizioni della stessa che inibiscano o favoriscano la loro eventuale crescita.

BIBLIOGRAFIA

Adeolu M., Gupta R. S. 2013. Phylogenomics and molecular signatures for the order Neisseriales: proposal for division of the order Neisseriales into the emended family Neisseriaceae and Chromobacteriaceae fam. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 104, 1–24.

Alastuey, A., Querol, X., Rodriguez, S., Plana, F., Lopez-Soler, A., Ruiz, C., Mantilla, E., 2004. Monitoring of atmospheric particulate matter around sources of secondary inorganic aerosol. *Atmospheric Environment* 38, 4979–4992.

Aldabe, J., Elustondo, D., Santamaría, C., Lasheras, E., Pandolfi, M., Alastuey, A., Querol, X., Santamaría, J.M., 2001. Chemical characterisation and source apportionment of PM_{2.5} and PM₁₀ at rural, urban and traffic sites in Navarra (North of Spain). *Atmospheric Research* 102, 191–205.

Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and Delort, A., 2007a. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dome: major groups and growth abilities at low temperatures, *FEMS Microbiology Ecology* 59, 255– 264.

Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Fontanella, S., Martin-Biesse, A., Sancelme, M., Laj, P., Delort, A., 2007b. A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms, *Atmospheric Chemistry and Physics* 7, 4159–4169.

Ariya, P.A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O., Amyot, M, 2002. Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophysical Research Letters* 29, 2077–2080.

ARPA Lombardia 2012 Rapporto sulla qualità dell'aria- anno 2011.

ARPA Lombardia 2011. Sintesi climatica del 2011.

ARPAV-osservatorio regionale aria - Regione del veneto -unità complessa tutela atmosfera (2006).Piano Progressivo di Rientro del Piano Regionale di Tutela e Risanamento dell'Atmosfera (P.R.T.R.A.) relativo alle polveri PM₁₀.

ARPAV, 2011. Rapporto annuale aria, qualità dell'aria nel comune di Venezia.

ARPAV 2012. Relazione regionale della qualità dell'aria 2011.

ARPAV 2013. Relazione regionale della qualità dell'aria 2012.

Badman, D.G., Jaffe, E.R., 1996. Blood and air pollution: state of knowledge and research needs. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 114, 205-208.

Baker, G.C., Beebee, T.J.C., Ragan, M.A., 1999. *Prototheca richardsi*, a pathogen of anuran larvae, is related to a clade of protistan parasites near the animal-fungal divergence. *Microbiology* 145, 1777– 1784.

Baker, G.C., Gaffar, S., Cowan, D.A., Suharto, A.R., 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiol. Lett.* 200, 103– 109.

Baker, G. C., Smith, J. J., Cowan, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers (2003). *Journal of Microbiological Methods* 55, 541–555.

Benassi, A, Dalan, F, Gnocchi, A, Maffeis, G, Malvasi, G, Liguori, F, Pernigotti, D, Pillon, Sansone, S. M., Susanetti, L., 2011. A one-year application of the Veneto air quality modelling system: regional concentrations and deposition on Venice lagoon. *International Journal of Environment and Pollution* 44, 32–42.

Becker, S., . Soukup, J.M., Sioutas, C, Cassee F. R., (2003). Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles 29, 29-44.

Bertolini, V., Gandolfi, I., Ambrosini, R., Bestetti, G., Innocente, E., Rampazzo, G., Franzetti, A., 2013. Temporal variability and effect of environmental variables

on airborne bacterial communities in an urban area of Northern Italy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 6561-6570.

Boreson J., Dillner A. M., Peccia J., 2004. Correlating bioaerosol load with PM_{2.5} and PM₁₀ concentrations: a comparison between natural desert and urban-fringe aerosols. *Atmospheric Environment Experimental Lung Research* 38, 6029-6041.

Brunelli A., 2009. Caratterizzazione degli inquinanti gassosi e del particolato fine (PM_{2.5}) in un sito industriale suburbano dell'area veneziana. Tesi di laurea specialistica, corso di laurea in Scienze Ambientali Anno accademico 2008/2009.

Burger, H., 1990. Bioaerosols: prevalence and health effects in the indoor environment. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 86 687-701.

Burrows, S. M., Elbert, W., Lawrence, M. G., Poschl U., 2009. Bacteria in the global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics* 9, 9263-9280.

Cabada, J. C., Rees, S., Takahama, S., Khlystov A., Pandis S. N., Davidson, C. I., Robinson A. L., 2004. Mass size distributions and size resolved chemical composition of fine particulate matter at the Pittsburgh supersite. *Atmospheric Environment* 38, 3127-3141.

Canepa, P., 2011. Il bilancio delle acque sotterranee nella pianura lombarda in relazione agli effetti del cambiamento climatico. Tesi di dottorato, Università degli studi di Milano – Bicocca.

Campurra G. 2009, *Manuale Medicina del lavoro* 2009. Ipsoa.

Carnevale C, Pisoni E, Volta M, 2010. A non-linear analysis to detect the origin of PM₁₀ concentrations in Northern Italy. *Science of The Total Environment* 409, 182-191.

Carraro, L., 2010. Caratterizzazione molecolare delle comunità batteriche coinvolte nella maturazione del formaggio Montasio D.O.P.. Tesi di dottorato, Università degli Studi di Padova.

Christner, B., Morris, C., Foreman, C., Cai, R., Sands, D. 2008. Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall, *Science*, 319, 1214.

Claesson, M. J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross R. P., O'Toole P. W., 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions *Nucleic Acids Research* 8, e200.

Clarridge J. E., 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 17, No. 4 840–862.

Clarke, K. R., Warwick, R.M., (2001). Change in marine communities. An approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edition. PRIMER-E Plymouth.

Dang, H., Li, T., Chen, M., Huang, G., 2008. Cross-Ocean Distribution of Rhodobacterales Bacteria as Primary Surface Colonizers in Temperate Coastal Marine Waters. *Applied And Environmental Microbiology* 74, 52–60.

Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 "Norme in materia ambientale."

Decreto Legislativo 4 aprile 2006, n. 216 "Attuazione delle direttive 2003/87 e 2004/101/CE in materia di scambio di quote di emissioni dei gas a effetto serra nella Comunità, con riferimento ai meccanismi di progetto del Protocollo di Kyoto."

Decreto Legislativo 7 marzo 2008, n. 51 "Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 4 aprile 2006, n. 216, recante attuazione delle direttive 2003/87/CE e 2004/101/CE in materia di scambio di quote di emissione dei gas a effetto serra"

nella Comunità, con riferimento ai meccanismi di progetto del protocollo di Kyoto.”

Decreto Legislativo 13 agosto 2010 , n. 155 “Attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa.”

Decreto Legislativo 30 dicembre 2010, n. 257 “Attuazione della direttiva 2008/101/CE che modifica la direttiva 2003/87/CE al fine di includere le attività di trasporto aereo nel sistema comunitario di scambio delle quote di emissioni dei gas a effetto serra.”

Deguillaume, L., Leriche, M., Amato, P., Ariya, P. A., Delort, A.- M., Pöschl, U., Chaumerliac, N., Bauer, H., Flossmann, A. I., Morris, C. E., 2008. Microbiology and atmospheric processes: Chemical interactions of primary biological aerosols, *Biogeosciences* 5, 1073–1084.

De Kok, T. M. C. M., Driessens, H. A. L., Hogervorst, J. G. F., Briedè, J. J., 2006. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutation Research* 613, 103-122.

Deshmukh, D. K., Tsai, Y. I., Deb, M. K., Zampas, P., 2012. Characteristics and Sources of Water-Soluble Ionic Species Associated with PM₁₀ Particles in the Ambient Air of Central India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89, 1091-1097.

Després V. R., Nowoisky J. F., Klose M., Conrad R., Andreae M. O., Pöschl U., 2007. Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. *Biogeosciences* 4, 1127-1141.

Direttiva 1999/30/CE del Consiglio del 22 aprile 1999 “concernente i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, gli ossidi di azoto, le particelle e il piombo.”

Douwes J., Versloot P., Hollander A., Heederik D., Doekes G, 1995. Influence of Various Dust Sampling and Extraction Methods on the Measurement of Airborne Endotoxin. *Applied Environmental Microbiology* 61,1763-1769.

Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. 2003. Review. Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *The Annals of Occupational Hygiene* 47, 187–200

EEA, 2007. Europe's environment-The fourth assessment. EEA, Copenhagen.

European Commission (2003). Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air.

Feinstein, L. M., Sul W. J., Blackwood, C, B., 2009. Assessment of Bias Associated with Incomplete Extraction of Microbial DNA from Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5428–5433.

Finlay, B., 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296, 1061–1063.

Fornaseri, M., 1994. *Lezioni di geochimica*. Veschi, Milano.

Fuzzi S., Mandrioli P., Perfetto A., 1997. Fog droplets-an atmospheric source of Secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment* 31, 2, 281-290.

Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T. (eds.) 2005a. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. New York, New York: Springer.

Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T. (eds.) 2005b. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part B: the Gammaproteobacteria*. New York, New York: Springer.

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Schaller, K-H., 2006. Acute and Chronic Toxicity of Metals and Metal Compounds for Man, in Elements and Their Compounds in the Environment. Edito da E. Merian , M. Anke, M. Ihnat and M.Stoeppler. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Gilli, G., Pignata, C., Schilirò, T., Bono, R., La Rosa, A., Traversi, D., 2006. The mutagenic hazards of environmental PM 2.5 in Turin. Environmental Research 103, 168-175.

Guo, Y., Zhang, J., Wang, S., She, F., Li, X., (2012). Long-term characterization of major water-soluble inorganic ions in PM₁₀ in coastal site on the Japan Sea. Journal of Atmospheric Chemistry, 68, 299-316.

Hamilton, A. J., 2005.Species diversity or biodiversity? Journal of Environmental Management,75 89–92.

Heinrich J., Pitz M., Bischofb W., Krugc N., Borm P. J. A,2003. Endotoxin in fine (PM_{2.5}) and coarse (PM_{2.5-10}) particle mass of ambient aerosols. A temporo-spatial analysis. Atmospheric Environment 37, 3659–3667.

Heinrich J., Thiering E., Rzehak P., Krämer U., Hochadel M., Rauchfuss K.M., Gehring U., Wichmann H., 2013. Long-term exposure to NO₂ and PM₁₀ and all-cause and cause-specific mortality in a prospective cohort of women Occupational and Environmental Medicine ;70, 179–186.

Huang, Y.C., Ghio, A.J., 2006. Vascular effects of ambient pollutant particles and metals. Current Vascular Pharmacology 4, 199-203.

Huntley, S., Hamann, N., Wegener-Feldbrügge, S., Treuner-Lange, A., Kube, R., Reinhardt, R., Klages, S., Müller, R., Ronning, C. M., Nierman, W.,C., Søggaard-Andersen, L., 2011. Comparative Genomic Analysis of Fruiting Body Formation in Myxococcales. Molecular Biology Evololution, 28, 1083–1097.

Istituto Superiore di Sanità 2001. Parere Istituto Superiore di Sanità, 20 luglio 2001.

ISO Guide 30:1992 - Term and definitions used in connection with reference materials.

Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167–182.

Jarvis, K. E., Gray, A. L., Houk, R. S., 1992. *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Blackie Academic and Professional.

Junge, K., Swanson, B., 2008. High-resolution ice nucleation spectra of sea-ice bacteria: Implications for cloud formation and life in frozen environments, *Biogeosciences* 5, 865– 873.

Kampa, M., Castanas, E., 2008. Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution* 151, 362-367.

Karthikeyan, S., Joshi, U. M., Balasubramanian, R. 2006. Microwave assisted sample preparation for determining water-soluble fraction of trace elements in urban airborne particulate matter: Evaluation of bioavailability. *Analytica Chimica Acta* 576, 23–30.

Kim, K. Y., Kim, C. N., 2007. Airborne microbiological characteristics in public buildings of Korea *Building and Environment* 42, 2188–2196.

Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., 2007. *Concetti di genetica*, ottava edizione. Pearson Education Italia, 237.

Kong, S., Han, B., Bai Z., Chen, L., Shi, J., Xu, Z., 2010. Receptor modeling of PM_{2.5}, PM₁₀ and TSP in different seasons and long-range transport analysis at a coastal site of Tianjin, China. *Science of The Total Environment* 408, 4681–4694.

Kuske C. R. 2006. Current and emerging technologies for the study of bacteria in the outdoor air. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 291–296.

Lacey M.E.; West J.S., 2006. *The Air Spora: A Manual for Catching and Identifying Airborne Biological Particles*; Springer: Dordrecht, The Netherlands. 1-2.

Larsen, B.R., Gilardoni, S., Stenström, K., Niedzialek, J., Jimenez, J. Belis, C.A., 2012. Sources for PM air pollution in the Po Plain, Italy: II. Probabilistic uncertainty characterization and sensitivity analysis of secondary and primary sources. *Atmospheric Environment* 50, 203-213.

Legge 13 luglio 1966, n. 615 . Provvedimenti contro l'inquinamento atmosferico.

Lee, B. U., & Kim, S. S. (2002). Sampling *E. coli* and *B. subtilis* bacteria bioaerosols by a new type of impactor with a cooled impaction plate. *Journal of Aerosol Science*, 34 , 1097–1100.

Levin, Z. and Yankofsky, S. A., 1988. Lecture notes in physics, atmospheric aerosols and nucleation, chap. Ice nuclei of biological origin, edited by: Wagner, P. E. and Vali, G., Springer Verlag, 620–633.

Lonati, G, Pirovano, G, Sghirlanzoni, GA, Zanoni, A, 2010. Speciated fine particulate matter in Northern Italy: a whole year chemical and transport modelling reconstruction. *Atmospheric Research* 95, 496–514.

Manoli, E., Voutsas, D., Samara C., Chemical characterization and source identification/ apportionment of fine and coarse air particles in Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment* 36 949–961.

Marcazzan, G. M., Vaccaro, S., Valli, G., Vecchi, R., 2001. Characterisation of PM₁₀ and PM_{2.5} particulate matter in the ambient air of Milan (Italy). *Atmospheric Environment* 35, 4639–4650.

Marcazzan, GM, Ceriani, M, Valli, G, Vecchi, R, 2003a. Source apportionment of PM₁₀ and PM_{2.5} in Milan (Italy) using receptor modelling. *Science of The Total Environment* 317, 137–147.

Marcazzan, G.M., Caprioli, E., Valli, G., Vecchi, R., 2003b. Temporal variation of ^{212}Pb concentration in outdoor air of Milan and a comparison with ^{214}Bi . *Journal of Environmental Radioactivity* 65 77–90.

Mariani, L., 1998. Meteorologia e clima - in Programma regionale di previsione e prevenzione di protezione civile. Regione Lombardia, 22-46.

Masiol, M, Squizzato, S, Ceccato, D, Rampazzo, G, Pavoni, B., 2012. A chemometric approach to determine local and regional sources of PM10 and its geochemical composition in a coastal area. *Atmospheric Environment* 54 127–133.

McInnery, J.O., Wilkinson, M., Patching, J.W., Embley, T.M., Powell, R., 1995. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1646–1648.

Menetrez M. Y., Foarde K. K., Esch R. K. , Dean T. R., Betancourt D. A., Moore S. A., Svendsen E. R., Yeatts K., 2007. The Measurement of Ambient Bioaerosol Exposure. *Aerosol Science and Technology* 41, 884–893.

Merrill L., Dunbar J., Richardson J., Kuske C. R., 2006. Composition of *Bacillus* Species in Aerosols from 11 U.S. Cities. *Journal of Forensic Sciences* 51, 559–565.

Meyer C., Gilbert D., Gaudry A., Franchi M., Nguyen- Viet H., Fabure J., Bernard N., 2010. Relationship of Atmospheric Pollution Characterized by Gas (NO_2) and Particles (PM10) to Microbial Communities Living in Bryophytes at Three Differently Polluted Sites (Rural, Urban, and Industrial) *Microbial Ecology*, 59, 2, pp 324-334.

Morris, C., Georgakopoulos, D., and Sands, D., 2005. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation, *Journal de Physique* 121, 87–103.

Mohler, O., Georgakopoulos, D. G., Morris, C. E., Benz, S., Ebert, V., Hunsmann, S., Saathoff, H., Schnaiter, M., Wagner, R., 2008. Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: New laboratory experiments at simulated cloud conditions. *Biogeosciences*, 5, 1425–1435.

Nies, D. H., 2004. *Elements and their Compounds in the Environment*. 2nd Edition. Edited by E. Merian, M. Anke, M. Ihnat, M. Stoepler WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.

Nordio, F., Kloog, I., Coull, B. A., Chudnovsky, A., Grillo, P., Bertazzi, P. A., Baccarelli, A. A., Schwartz, J., 2013. Estimating spatio-temporal resolved PM₁₀ aerosol mass concentrations using MODIS satellite data and land use regression over Lombardy, Italy. *Atmospheric Environment* 74, 227-236.

Pandis, S. N., Wexler, A. S., Seinfeld, J. H., 1995. Dynamics of Tropospheric Aerosols. *Journal of Physical Chemistry* 99, 9646-9659.

Pandolfi, M., Gonzalez-Castanedo, Y., Alastuey, A., de la Rosa, J. D., Mantilla, E., de la Campa, A. S., Querol, X., Pey, J., Amato, F., Moreno, T., 2010. Source apportionment of PM₁₀ and PM_{2.5} at multiple sites in the strait of Gibraltar by PMF: impact of shipping emissions. *Environmental Science and Pollution Research*, 18 260-269

Peccia, J., Milton, D. K., Reponen, T., Hill, J., 2008. A Role for Environmental Engineering and Science in Preventing Bioaerosol-Related Disease. *Environmental Science & Technology*, 4631-4637.

Pecorari, E., Squizzato, S., Masiol, M, Radice, P., Pavoni, B, Rampazzo, G., 2013. Using a photochemical model to assess the horizontal, vertical and time distribution of PM_{2.5} in a complex area: Relationships between the regional and local sources and the meteorological conditions. *Science of the Total Environment* 443, 681–691.

Perrone, M. G, Gualtieri, M., Ferrero, L., Lo Porto, C., Udisti, R., Bolzacchini, E., Camatini, M., 2010. Seasonal variations in chemical composition and in vitro biological effects of fine PM from Milan. *Chemosphere* 78, 1368–1377.

Peters, A., Dockery, D. W., Muller, J. E., Mittleman, M. A., 2001. Increased Particulate Air Pollution and the Triggering of Myocardial Infarction. *Circulation* 103, 2810-2815.

Polymenakou P. N., 2012. Atmosphere: A Source of Pathogenic or Beneficial Microbes? *Atmosphere*, 3, 87-102.

Pope III C.A., Dockery D.W., 2006. Health Effects of Fine Particulate Air Pollution: Lines that Connect. *Journal of the Air & Waste Management Association* 56, 709–742.

Pratt, K., DeMott, P., French, J., Wang, Z., Westphal, D., Heymsfield, A., Twohy, C., Prenni, A., Prather, K., 2009. In situ detection of biological particles in cloud ice-crystals, *Nature Geosci.*, 2, 398–401.

Putaud J-P, Van Dingenen R, Alastuey A, Bauer H, Birmili W, Cyrys J, Flentje, H., Fuzzi, S., Gehrig, R., Hansson, H.C., Harrison, R.M., Herrmann, H., Hitenberger, R., Hüglin, C., Jones, A.M., Kasper-Giebl, A., Kiss, G., Koussa, A., Kuhlbusch, T.A.J., Löschau, G., Maenhaut, W., Molnar, A., Moreno, T., Pekkanen, J., Perrino, C., Pitz, M., Puxbaum, H., Querol, X., Rodriguez, S., Salma, I., Schwarz, J., Smolik, J., Schneider, J., Spindler, G., Ten Brink, H., Tursic, J., Viana, M., Wiedensohler, A., Raes, F., 2010. A European aerosol phenomenology — 3: physical and chemical characteristics of particulate matter from 60 rural, urban, and kerbside sites across Europe. *Atmospheric Environment* 44, Pages 1308–1320.

Querol, X., Alastuey, A., Rodriguez, S., Plana, F., Ruiz, C.R., Cots N., Massagué, G., Puig O., 2001. PM10 and PM2.5 source apportionment in the Barcelona Metropolitan area, Catalonia, Spain. *Atmospheric Environment* 35 6407–6419.

Querol, X., Alastuey, A., Moreno T., Viana, M. M., Castillo, S., Pey, J., Rodriguez, S., Artinano, B., Salvador, P., Sanchez, M., Dos Santos, S. G., Garraleta, M. D. H., Fernandez-Patier, R., Moreno-Grau, S., Negral, L., Minguillo, M. C., Monfort, E., Sanz, M. J., Palomo-Marín, R., Pinilla-Gil, E., Cuevas, E., De la Rosa, J., Sanchez de la Campa, S., 2006. Spatial and temporal variations in airborne particulate matter (PM₁₀ and PM_{2.5}) across Spain 1999–2005. *Atmospheric Environment* 42, 3964–3979.

Querol, X., Viana, M., Alastuey, A., Amato, F., Moreno, T., Castillo, S., Pey, J., de la Rosa, J., Sánchez de la Campa, A., Artiñano, B., Salvador, P., García Dos Santos, S., Fernández-Patier, R., Moreno-Grau, S., Negral, L., Minguillón, M. C., Monfort, E., Gil, J. I., Ortega, L. A., Santamaría, J. M., Zabalza, J., 2007. Source origin of trace elements in PM from regional background, urban and industrial sites of Spain. *Atmospheric Environment* 41, 7219–7231.

Raes, F., Van Dingenen, R., Vignati, E., Wilson, J., Putaud, J. P., Seinfeld, J.H, Adams, P., 2000. Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. *Atmospheric Environment*, 34, 4215–4240.

Rampazzo, G, Masiol, M, Visin, F, Pavoni, B, 2008a. Gaseous and PM₁₀-bound pollutants monitored in three environmental conditions in the Venice area (Italy). *Water Air Soil Pollution* 195, 161–176.

Rampazzo, G, Masiol, M, Visin, F, Rampado, E, Pavoni, B., 2008b. Geochemical characterization of PM₁₀ emitted by glass factories in Murano, Venice (Italy). *Chemosphere* 71, 2068–2075.

Reddy, G. S. N., Garcia-Pichel F., (2009) Description of *Patulibacter americanus* sp. nov., isolated from biological soil crusts, emended description of the genus *Patulibacter* Takahashi et al. 2006 and proposal of *Solirubrobacterales* ord. nov. and *Thermoleophilales* ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 87–94.

Regione Lombardia, Fondazione Lombardia per l'Ambiente, 1998. Il Piano Regionale per la Qualità dell'Aria (P.R.Q.A.).

Regione Lombardia, 2005. Misure Strutturali per la Qualità dell'Aria in Regione Lombardia 2005 – 2010.

Regione Lombardia. Legge Regionale n. 24 dell'11 Dicembre 2006 "Norme per la prevenzione e la riduzione delle emissioni in atmosfera a tutela della salute e dell'ambiente".

Regione Veneto, 2004 Piano Regionale di Tutela e Risanamento dell'Atmosfera.

Salvador, P., Artinano, B., Alonso, D. G., Querol et al., Alastuey, A., 2004. Identification and characterisation of sources of PM10 in Madrid (Spain) by statistical methods. *Atmospheric Environment* 38, 435-447.

Sattler, B., Puxbaum, H., Psenner, R., 2001. Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters* 28, 239–242.

Shinn, E. A., Smith, G. W., Prospero, J. M., Betzer, P., Hayes, M. L., Garrison, V., Barber, R. T., 2000. African dust and the demise of Caribbean coral reefs. *Geophysical Research Letters* 27, 3029-3032.

Schnell, R. and Vali, G., 1972 Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation, *Nature*, 236, 163–165.

Schnell, R., Vali, G., 1973. World-wide source of leaf-derived freezing nuclei, *Nature*, 246, 212–213.

Strincone, M., Fino, A., Cattani, G., Catrambone, M., Pirrone, N., 2013. Emissions, air concentrations and atmospheric depositions of arsenic, cadmium, lead and nickel in Italy in the last two decades: A review of recent trends in relation to policy strategies adopted locally, regionally and globally. *EDP Sciences* DOI: 10.1051/e3sconf/20130138003.

Squizzato, S., 2011. Polveri sottili e particolato secondario inorganico: distribuzione e origine nell'area veneziana. Tesi di dottorato, Università Ca' Foscari, Venezia.

Squizzato, S., Masiol, M., Brunelli, A., Pistolato, S., Tarabotti, E., Pavoni, B., 2013. Factors determining the formation of secondary inorganic aerosol: a case study in the Po Valley (Italy). *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13 1927–1939.

Squizzato, S., 2007. Caratterizzazione geochimica del particolato fine (PM_{2.5}) in siti dell'area veneziana con differenti condizioni ambientali. Tesi di Laurea specialistica, Corso di Laurea in Scienze Ambientali, Anno Accademico 2006/2007.

Sun, J., Ariya, P. A., 2006. Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. *Atmospheric Environment* 40, 795–820

UNI EN 12341:1998. "Air Quality – Determination of the PM₁₀ fraction of suspended particulate matter – Reference method and field test procedure to demonstrate reference equivalence of measurements".

UNI EN 14907:2005 "Qualità dell'aria ambiente - Metodo normalizzato di misurazione gravimetrico per la determinazione della frazione massica PM_{2,5} del particolato in sospensione."

Valotto, G., 2009. Tecniche fisiche di indagine e loro potenziale applicazione in tematiche attinenti alle Scienze della Terra. Tesi di dottorato, Università Ca' Foscari di Venezia.

Van Dingenen, R., Raes, F., Putaud, J. P., Baltensperger, U., Charron, A., Facchini, M. C., Decesari, S., Fuzzi, S., Gehrig, R., Hansson, H-C., Harrison, R. M., Hüglin, C., Jones, A. M., Laj, P., Lorbeer, G., Maenhaut, W., Palmgren, F., Querol, X., Rodriguez, S., Scheider, J., ten Brink, H., Tunved, P., Tørseth, K., Wehner, B., Weingartner, E., Wiedensohler, A., Wahlin, P., 2004. A European aerosol phenomenology—1: physical characteristics of particulate matter at

kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmospheric Environment* 38, 2561-2577.

Van Den Brink, P. J., Ter Braak, C. J. F. (1999) Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress *Environmental Toxicology and Chemistry* 18,. 138–148.

Vermeylen, J., Nemmar, A., Nemery, B., Hoylaerts, M.F., 2005. Ambient air pollution and acute myocardial infarction *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3, 1955–1961.

Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W.B. (Eds.) (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3: The Firmicutes. New York, New York: Springer.

Wakelin, S. A., Colloff, M. J., Harvey, P. R., Marschner, P., Gregg, A. L., L. Rogers, S., 2006. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize. *FEMS microbiology ecology* 59, 661-670.

Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., Zhao, L., 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME Journal* 6, 320–329.

Wright, A.-D. G., 2006. Phylogenetic relationships within the order Halobacteriales inferred from 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 , 1223–1227.

Wu, Y. H., Chan, C. C., Chew, G. L., Shih, P.-W., Lee, C.-T., Chao, H. J. 2011. Meteorological factors and ambient bacterial levels in a subtropical urban environment. *International Journal of Biometeorology* 56, 1001-1009

Yergeau, E., Schoondermark-Stolk, S. A., Brodie, E. L., Dejean, S., DeSantis T.Z., Goncalves, O., Piceno, Y. M., Andersen, G. L., Kowalchuk, G. A., 2009.

Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities. The ISME Journal 3, 340–351.

Yankofsky, S. A., Levin, Z., Bertold, T., Sandlerman, N. 1981a. Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei, Journal of Applied Meteorology, 20, 1013–1019.

Yankofsky, S. A., Levin, Z., Moshe, A.. 1981b. Association with citrus of ice nucleating bacteria and their possible role as causative agents of frost damage, Current Microbiology, 5, 213–217.

Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., Nakamura K., 2003. Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53 1155–1163.

SITI WEB VISITATI

<http://www.uniprot.org/> (ultima visita 02/07/2013)

Allegato 1: corrispondenza fra i nomi degli ordini e i numeri corrispondenti impiegati nell'analisi RDA.

Tab.1. Corrispondenza fra i nomi degli ordini e i numeri corrispondenti impiegati nell'analisi RDA.

Unclassified	1	Coriobacteriales	43
Chloroplast	2	Fusobacteriales	44
Actinomycetales	3	Gemmatimonadales	45
Burkholderiales	4	Acholeplasmatales	46
Flavobacteriales	5	Nitrosomonadales	47
Bacillales	6	Thiotrichales	48
Sphingobacteriales	7	Chromatiales	49
Clostridiales	8	Desulfuromonadales	50
Enterobacteriales	9	Thermoanaerobacterales	51
Rhizobiales	10	Nitriliruptorales	52
Pseudomonadales	11	Holophagales	53
Lactobacillales	12	Puniceicoccales	54
Rhodobacterales	13	Armatimonadales	55
Sphingomonadales	14	Spirochaetales	56
Bacteroidales	15	Caldilineales	57
Xanthomonadales	16	Chlamydiales	58
Rhodospirillales	17	Methanosarcinales	59
Myxococcales	18	Hydrogenophilales	60
Planctomycetales	19	Pasteurellales	61
Erysipelotrichales	20	Cardiobacteriales	62
Solirubrobacterales	21	Legionellales	63
Acidimicrobiales	22	Vibrionales	64
Caulobacterales	23	Methylococcales	65
Selenomonadales	24	Salinisphaerales	66
Verrucomicrobiales	25	Alphaproteobacteria_incertae_sedis	67
Deinococcales	26	Sneathiellales	68
Desulfurococcales	27	Kordiimonadales	69
Rhodocyclales	28	Parvularculales	70
Oceanospirillales	29	Kiloniellales	71
Methylophilales	30	Desulfobacterales	72
Bifidobacteriales	31	Desulfovibrionales	73
Methanobacteriales	32	Syntrophobacterales	74
Alteromonadales	33	Desulfarculales	75
Opitutales	34	Natranaerobiales	76
Bdellovibrionales	35	Halanaerobiales	77
Campylobacterales	36	Thermolithobacterales	78
Rubrobacterales	37	Thermoleophilales	79
Methanomicrobiales	38	Euzebyales	80
Neisseriales	39	Phycisphaerales	81

Aeromonadales	40	Chthonomonadales	82
Gammaproteobacteria incertae sedis	41	Thermales	83
Rickettsiales	42	Anaeroplasmatales	84
Mycoplasmatales	85	Victivallales	99
Entomoplasmatales	86	Fibrobacterales	100
Sphaerobacterales	87	Ignavibacteriales	101
Thermomicrobiales	88	Aquificales	102
Ktedonobacterales	89	Acidilobales	103
Herpetosiphonales	90	Sulfolobales	104
Chloroflexales	91	Fervidicoccales	105
Anaerolineales	92	Thermoproteales	106
Nitrospirales	93	Methanocellales	107
Thermotogales	94	Halobacteriales	108
Deferribacterales	95	Thermoplasmatales	109
Elusimicrobiales	96		
Synergistales	97		
Lentisphaerales	98		

Allegato 2: Concentrazioni degli elementi e degli ioni determinati nel PM₁₀ e TSP

Tab. 1. Concentrazioni medie, massime minime e mediana nel sito di Via Lissa (PM₁₀).

Elemento ng/m ³	Media	Mediana	Massimo	Minimo	dev. st.
S	1332	1143	4867	443	953
Al	541	342	1731	78,9	476
Fe	1666	1058	4728	298,9	1302
Ca	1869	1425	5625	47,2	1584
Mg	472	335	1566	4,91	412
K	536	355	2064	14,92	545
Ti	33,7	27,1	104	4,25	25,2
Cr	7,34	4,56	21,3	1,45	6,11
Mn	27,1	19,3	70,9	7,17	18,9
Zn	93,6	63,3	444	25,4	90,6
Cu	49,2	29,0	185	11,8	48,2
Ba	211	10,5	1072	0,99	365
As	1,98	1,64	8,14	0,38	1,43
Ag	0,12	0,11	0,40	0,01	0,09
Cd	1,08	0,80	5,51	0,10	1,12
Ni	4,84	3,57	16,7	1,56	3,20
Pb	31,57	17,8	268	5,68	55,1
Sb	4,26	2,42	20,9	0,18	4,83
V	6,07	4,02	25,2	1,00	4,80
Co	0,34	0,33	0,77	0,04	0,22
NO ₃ ⁻	5842	4567	16931	392	50,91
NH ₄ ⁺	1693	1527	5228	99,1	4881
Ca ²⁺	1106	1025	3224	6,88	424
Mg ²⁺	242	87,5	1898	7,14	306
Na ⁺	287	244	1253	1,94	1373
Cl ⁻	749	333	2892	47,85	866
F ⁻	34,3	14,8	193	0,49	827

Tab. 2. Concentrazioni medie, massime minime e mediana nel sito di Malcontenta (PM₁₀).

Elemento ng/m ³	Media	Mediana	Massimo	Minimo	dev. st.
S	1328	1019	4433	397	812
Al	469	437	1867,	14,4	374
Fe	906	837	2145	176	570
Ca	1963	1791	4505	163	1144
Mg	401	370,9	1130	52,5	255
K	580	395,7	2257	63,1	549
Ti	25,1	21,5	74,9	3,19	16,9
Cr	5,67	4,38	14,6	0,98	3,6
Mn	20,6	18,2	54,3	4,66	12,9
Zn	85,4	61,4	251	24,3	61,4
Cu	30,5	20,6	81,5	7,82	22,4
Ba	209	11,8	952	0,76	338
As	1,63	1,68	4,78	0,20	1,01
Ag	0,12	0,08	0,95	0,03	0,17
Cd	0,83	0,72	2,57	0,05	0,66
Ni	3,85	3,41	10,3	0,45	2,07
Pb	26,9	20,9	124	3,48	23,1
Sb	4,52	2,37	25,2	0,13	5,40
V	6,17	5,41	14,8	1,09	3,55
Co	0,26	0,21	0,97	0,01	0,20
NO ₃ ⁻	5561	3397	17649	904	4792
NH ₄ ⁺	3577	2921	11066	1224	2317
Ca ²⁺	787	736	2004	51,2	454
Mg ²⁺	80,9	60,3	345	12,7	74,2
Na ⁺	501	311	3102	16,8	664
Cl ⁻	738	328	3891	41,0	857
F ⁻	18,4	13,3	58,8	0,39	15,5

Tab. 3. Concentrazioni medie, massime minime e mediana nel sito di Milano (PM₁₀).

Elemento ng/m ³	Media	Mediana	Massimo	Minimo	dev. st.
S	1774	1198	12252	320	2354
Al	954	935	2833	149	636
Fe	2090	1015	6674	62,9	1864
Ca	2112	1539	5773	144	1434
Mg	739	604	1850	53,3	506
K	652	787	1751	108	461
Ti	56,1	49,2	129	6,2	38,3
Cr	14,7	10,4	38,3	3,0	10,6
Mn	33,0	23,7	84,1	7,16	23,2
Zn	131	78,6	420	12,7	110
Cu	79,5	43,7	251	13,6	68,3
Ba	496	30,6	2578	1,98	867
As	1,67	1,15	6,70	0,30	1,71
Ag	0,22	0,17	0,53	0,09	0,13
Cd	0,88	0,53	5,37	0,11	1,21
Ni	5,86	4,92	14,8	0,94	4,13
Pb	53,9	33,2	186	6,20	51,6
Sb	8,82	3,15	40,65	0,42	11,5
V	3,00	3,27	7,44	0,47	1,95
Co	0,69	0,52	2,31	0,08	0,54
NO ₃ ⁻	8448	6663	27027	232	6889
NH ₄ ⁺	3858	3042	15056	40,1	3499
Ca ²⁺	1492	1381	4460	113	1077
Mg ²⁺	65,6	50,9	199	7,39	49,1
Na ⁺	259	190	821	27,1	206
Cl ⁻	615	271	4586	15,5	1036
F ⁻	49,6	22,6	378	3,87	87,1

Tab. 4. Concentrazioni medie, massime minime e mediana nel sito di Venezia (TSP).

Elemento ng/m ³	Media	Mediana	Massimo	Minimo	dev. st.
S	1780	1368	7466	468	1626
Al	498	304	1555	3,85	457
Fe	650	717	1575	0,61	463
Ca	1628	1569	3873	116	1221
Mg	441	405	1278	36,44	339
K	454	452	1044	74,7	258
Ti	35,9	34,4	104	0,39	26,1
Cr	3,93	3,51	13,9	0,03	3,50
Mn	21,3	22,7	47,8	2,87	13,1
Zn	81,8	60,5	246	10,4	65,4
Cu	17,4	17,6	44,5	2,40	10,8
Ba	183	27,1	630	0,69	242
As	5,96	4,71	25,5	0,17	5,87
Ag	0,05	0,04	0,16	0,02	0,04
Cd	4,00	0,78	27,1	0,01	7,01
Ni	2,90	2,57	6,04	0,16	1,43
Pb	19,7	15,8	60,0	1,93	14,1
Sb	3,64	2,76	11,8	0,02	2,90
V	4,70	3,49	11,1	0,85	3,23
Co	0,24	0,17	0,86	0,01	0,24
NO ₃ ⁻	5942	5312	16049	803	4053
NH ₄ ⁺	3139	2400	8881	495	2185
Ca ²⁺	1310	1082	3690	152	964
Mg ²⁺	260	214	759	15,3	170
Na ⁺	1795	1606	6535	34,7	1455
Cl ⁻	2155	1544	9676	469	2147
F ⁻	94,5	27,8	424	7,28	163

Ringraziamenti

Ringrazio il Professor Rampazzo, che in questi anni è sempre stato una valida guida e fonte di confronti, scientifici e non!!

Un grosso ringraziamento va a Flavia, che con fare materno, mi ha seguita durante tutto il percorso del dottorato, fra analisi, standard, cartamodelli e fettucce!

Non posso poi dimenticarmi di Stefania ed Eliana, con cui ho condiviso tutti i momenti divertenti, belli, tristi e di nervosismo legati alla tesi e alla vita.

Un ringraziamento infinito va a Chiara Facca, per i consigli sull'elaborazione dati e a Sabrina Manente, che mi ha dato le ultime "dritte" sulla parte biologica.

Ringrazio i miei genitori, che mi son sempre stati vicini in questi anni e mi hanno incoraggiata nei momenti bui.

Poi un grazie particolare va a tutti i laureandi: Chiara, Sara, Andrea, Daniele, Marta, Claudio Deborah e Alessia.

Grazie a tutti gli amici che mi hanno accompagnata in questi tre anni.

Infine un grazie speciale a Giuseppe che ha deciso, incautamente, di diventare il mio compagno di viaggio durante l'avventura del dottorato. Grazie Beppe, per il sostegno e la pazienza che hai avuto.