



BIOSENSORE AMPEROMETRICO PER LA DETERMINAZIONE DELLA TOSSICITÀ INTEGRALE DI PARTICOLATO ATMOSFERICO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di determinare, con un biosensore respirometrico, la tossicità integrale di differente particolato atmosferico (PM) campionato in diverse località d'Italia. Il metodo d'analisi proposto e testato consiste nel determinare (mediante la misura dell' O_2) l'inibizione dell'attività respiratoria delle cellule di lievito dopo esposizione al PM.

L'attenzione della ricerca scientifica nel selezionare e verificare soluzioni per la descrizione dei parametri legati al materiale particolato aereodisperso (MPA), nasce dalle crescenti preoccupazioni in merito agli effetti biologici di tali materiali sia attraverso sollecitazioni chimiche che fisiche a livello dell'apparato respiratorio umano.

Il materiale particolato nell'atmosfera è definito come una sospensione di particelle solide o liquide di diversa dimensione e composizione in funzione della loro origine; la loro dimensione è generalmente compresa in un intervallo di diametri tra 0,01 e 100 μm . In particolare, le particelle ultrafini o UF hanno un diametro $<0,1 \mu\text{m}$, le particelle di accumulazione un diametro $>0,1\text{-}ca.2 \mu\text{m}$ e le particelle grossolane un diametro $>2 \mu\text{m}$.

I maggiori costituenti di queste particelle sono il solfato, il nitrato, l'ammonio, il carbonio elementare e i composti del carbonio (soprattutto nelle aree industrializzate). Ulteriori componenti sono diversi metalli in traccia provenienti dai processi di combustione ed elementi presenti nel suolo e nell'atmosfera marina, quali silicio, alluminio, ferro, calcio, potassio, sodio, manganese, stronzio. Quindi, si può affermare che il sistema in studio è molto complesso e dipende da molti fattori, quali le sorgenti, il clima e la situazione topografica.

Gli effetti biologici delle particelle aerodisperse dipendono dalla natura delle particelle stesse e dal luogo della loro deposizione nel sistema respiratorio umano. Certamente, hanno un peso importante la loro massa e il diametro aerodinamico in relazione anche alle singole regioni

*Fabio Borzetti,
Luigi Campanella,
Nicola Caretto,
Roberto Dragone,
Tatiana Zaccarato
Dipartimento di Chimica,
Università di Roma
"La Sapienza"
Patrizia Di Filippo
ISPESL
Achille Marconi
Istituto Superiore di Sanità
nicocare@libero.it*

Tab. 1

Limite	1/1/2005	1/1/2010
Media su 24 ore ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	50	50
Numero di superamenti ammessi	35	7
Media anno civile ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	40	20

in cui è possibile suddividere il tratto respiratorio. Numerosi studi epidemiologici effettuati negli ultimi dieci anni in diversi paesi europei hanno evidenziato un'associazione tra incrementi della concentrazione di massa delle particelle fini (PM_{10} e $\text{PM}_{2,5}$) e il peggioramento dello stato di salute (incremento del numero di visite di pronto soccorso e di ricoveri in ospedale associato agli eventi di picco), specialmente a carico di individui suscettibili (persone affetti da patologie respiratorie o cardiovascolari, bambini, anziani). Le crescenti evidenze in campo clinico hanno spinto varie organizzazioni internazionali e locali a varare provvedimenti migliorativi e cautelativi rispetto agli standard di qualità dell'aria. In particolare, l'Unione Europea ha affrontato questo problema con la direttiva 1999/30/EC (127) nella quale sono stabiliti i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il PM_{10} (tale sigla identifica materiale presente nell'atmosfera in forma di particelle microscopiche, il cui diametro è uguale o inferiore a $10\text{ }\mu\text{m}$), mentre per il $\text{PM}_{2,5}$ non viene fissato un valore limite, ma viene richiesto agli Stati membri di effettuare campionamenti e fornire informazioni al pubblico. In Italia si è approvato, in tale materia, il DM

n. 60 del 2 aprile 2002. Recentemente la Commissione europea ha presentato la proposta di una nuova direttiva sulla qualità dell'aria, in cui viene indicato un valore limite annuale pari a $25\text{ g}/\text{m}^3$ anche per il $\text{PM}_{2,5}$. La Tab. 1 riporta valori limiti previsti per il PM_{10} .

Analizzando questa tabella, si evince che la legge fissa solo limiti quantitativi. Pertanto, un'analisi qualitativa è importante per la valutazione della tossicità dell'MPA poiché tale proprietà può essere collegata ad importanti patologie relative alla salute umana.

Per il campionamento selettivo delle frazioni dimensionali per gli studi di caratterizzazione chimico-fisica e tossicologica sono stati utilizzati sistemi di prelievo basati sul principio della separazione dimensionale per impatto inerziale (impattori a cascata e sistemi mono/bi-stadio). I campionamenti sono stati eseguiti con alcuni strumenti di cui si riportano le caratteristiche (vedi Tab. 2).

I filtri che si utilizzano per le raccolte possono essere di vario tipo: membrane usate per filtrazione, policarbonato, cellulosa, quarzo e fibra di vetro. Per i nostri prelievi sono stati utilizzati substrati di raccolta costi-

Tab. 2

Tipo	N°stadi/substrati	Portata
DEKATI		
Low Pressure impactor 13025 mm	da 10 a $0,030\text{ }\mu\text{m}$	10 l/min. ($0,6\text{ m}^3/\text{h}$)
ANDERSEN		
$\varnothing 81\text{ mm}$	8 stadi + back-up (da 10 a $0,4\text{ }\mu\text{m}$)	28,3 l/min. ($1,7\text{ m}^3/\text{h}$)

Tab. 3 - Valori delle concentrazioni di PM_1 , $\text{PM}_{2,5}$, e PM_{10} in periodo invernale - Novembre 2005

	$\text{PM}_1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{PM}_{2,5}\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{PM}_{10}\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$
5/11/05	18,8	14,5	24,4
6/11/05	17,1	12,5	27,4
7/11/05	14,7	11,4	16,3
8/11/05	22,5	18,4	41,9
9/11/05	29,4	21,8	53,7
10/11/05	30,0	24,0	54,2
11/11/05	31,0	24,2	57,2
12/11/05	30,2	23,6	53,6
13/11/05	27,7	20,2	72,4
14/11/05	25,4	21,0	-
15/11/05	18,5	16,4	-
16/11/05	15,6	13,8	-
17/11/05	18,4	15,7	41,2
18/11/05	8,5	6,8	18,3
19/11/05	7,1	6,8	13,3

Tab. 4 - Risultati prelievi con impattore Dekati nel periodo invernale

data inizio prelievo: 04/11/2005 18.00
 data fine prelievo: 18/11/2005 10.30
 durata minuti: 19710 min.
 flusso di lavoro: 10 l min.⁻¹
 metri cubi prelevati: 197,1 m³

DEKATI-ISPEL	massa filtro bianco	massa filtro dopo prelievo	massa particolato	concentrazione di massa particolato	D _a 50%
	mg	mg	mg	µg m ⁻³	µm
ISP 1	23,611	23,763	0,152	0,8	0,03
ISP 2	23,441	23,576	0,134	0,7	0,06
ISP 3	24,204	24,591	0,386	2,0	0,108
ISP 4	23,822	24,713	0,890	4,5	0,17
ISP 5	24,464	24,675	0,211	1,1	0,26
ISP 6	24,101	24,553	0,451	2,3	0,4
ISP 7	23,185	24,142	0,957	4,9	0,65
ISP 8	23,664	24,183	0,519	2,6	1
ISP 9	24,032	24,664	0,631	3,2	1,6
ISP 10	24,139	25,205	1,066	5,4	2,5
ISP 11	24,013	25,125	1,112	5,6	4,4
ISP 12	25,144	26,035	0,891	4,5	6,8
ISP 13	24,564	25,189	0,625	3,2	10
50 mg (peso riferimento) totale	49,710	49,7105	0,001	8,0	40,7

Tab. 5 - Risultati prelievi con impattore Dekati modello DLPI nel periodo estivo

data inizio prelievo: 16/06/05 18.00
 data fine prelievo: 30/06/05 14.30
 durata minuti: 19950 min
 flusso di lavoro: 10 l min.⁻¹
 metri cubi prelevati: 199,5 m³

DEKATI-ISPEL	massa filtro bianco	massa filtro dopo prelievo	massa particolato	concentrazione di massa particolato	D _a 50%
	mg	mg	mg	µg m ⁻³	µm
ISP 1	18,975	18,98	0,005	0,0	0,03
ISP 2	19,958	20,028	0,070	0,4	0,06
ISP 3	19,193	19,285	0,092	0,5	0,108
ISP 4	19,709	19,804	0,095	0,5	0,17
ISP 5	19,350	19,729	0,379	1,9	0,26
ISP 6	20,109	20,826	0,717	3,6	0,4
ISP 7	20,005	20,559	0,554	2,8	0,65
ISP 8	18,061	18,325	0,264	1,3	1
ISP 9	19,413	19,776	0,363	1,8	1,6
ISP 10	20,696	21,126	0,430	2,2	2,5
ISP 11	20,336	21,184	0,848	4,3	4,4
ISP 12	19,590	20,524	0,934	4,7	6,8
ISP 13	20,243	21,07	0,827	4,1	10
AG8 SPIA1	19,579	19,577	- 0,002		
100 mg (peso riferimento) totale	99,980	99,977	-0,003	5,6	28,0

tuiti da membrane filtranti in PTFE (porosità 2 µm e diametro 47 mm). Nelle Tab. 4 e 5 si riportano i risultati tipici di prelievi con impattore Dekati nei due periodi invernale ed estivo. Inoltre, si riportano anche i valori delle concentrazioni di PM₁, PM_{2,5}, e PM₁₀ in periodo invernale - novembre 2005 (sito ISS) (Tab. 3).

Vi sono varie tecniche di analisi del materiale particolato raccolto in riferimento all'obiettivo della ricerca e alla valutazione dei parametri scelti. Le apparecchiature di microscopia (a scansione elettronica e a scansione a forza atomica) ricoprono un ruolo di primo piano nella valutazione di alcuni parametri salienti dei MPA accanto a misure spettrometriche a vario livello. Certamente, c'è da osservare che per molte applicazioni tali strumenti rappresentano soluzioni costose e che necessitano di personale altamente qualificato per la loro gestione. Viceversa, viene qui proposto un sistema di facile utilizzo, poco costoso e che non richiede per l'uso particolari esperienze per ottenere una risposta rapida ed affidabile circa la tossicità del particolato raccolto dalle stazioni di prelievo.

Tale sistema è di tipo elettrochimico e si basa sull'accoppiamento di un elettrodo di Clark con cellule di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) e un potenziometro. I filtri contenenti materiale particolato vengono incubati con le cellule di lievito ed è determinata (mediante la variazione della misura dell'O₂ disciolto in soluzione) l'inibizione dell'attività respiratoria delle cellule dopo esposizione al PM.

In questo lavoro si descrive lo schema dell'apparato sperimentale, la

taratura dello strumento utilizzato e la modalità operativa. Inoltre, la metodica è stata applicata ad alcuni filtri contenenti particolato atmosferico ottenuti mediante le varie collaborazioni che il nostro gruppo ha avviato con enti locali e università italiane. Tali filtri provengono dalle seguenti località: Bari, Lampedusa, Messina, Monte Morello (FI), Roma e Taranto e si riferiscono tutti al PM 10 (cioè particolato non frazionato) a parte quattro filtri con particolato 2,5 provenienti da Lampedusa e cinque filtri con particolato 1 della postazione dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma).

Materiali e metodi

La strumentazione utilizzata consiste di un biosensore amperometrico e un potenziometro dell'AMEL.

Le cellule di lievito liofilizzate sono fornite dalla Sigma.

Il biosensore (Fig. 1)

Il biosensore è costituito da un elettrodo di Clark appartenente alla categoria dei sensori elettrochimici di tipo amperometrico, pertanto ad un determinato valore di concentrazione di ossigeno in soluzione corrisponderà un segnale di corrente che lo strumento converte e visualizza in un segnale più immediato e intelligibile di concentrazione, espresso in parti per milione (ppm). La taratura dello strumento viene eseguita in una soluzione di solfito di sodio a 10 g/L. Il potenziometro a cui è collegato il bio-

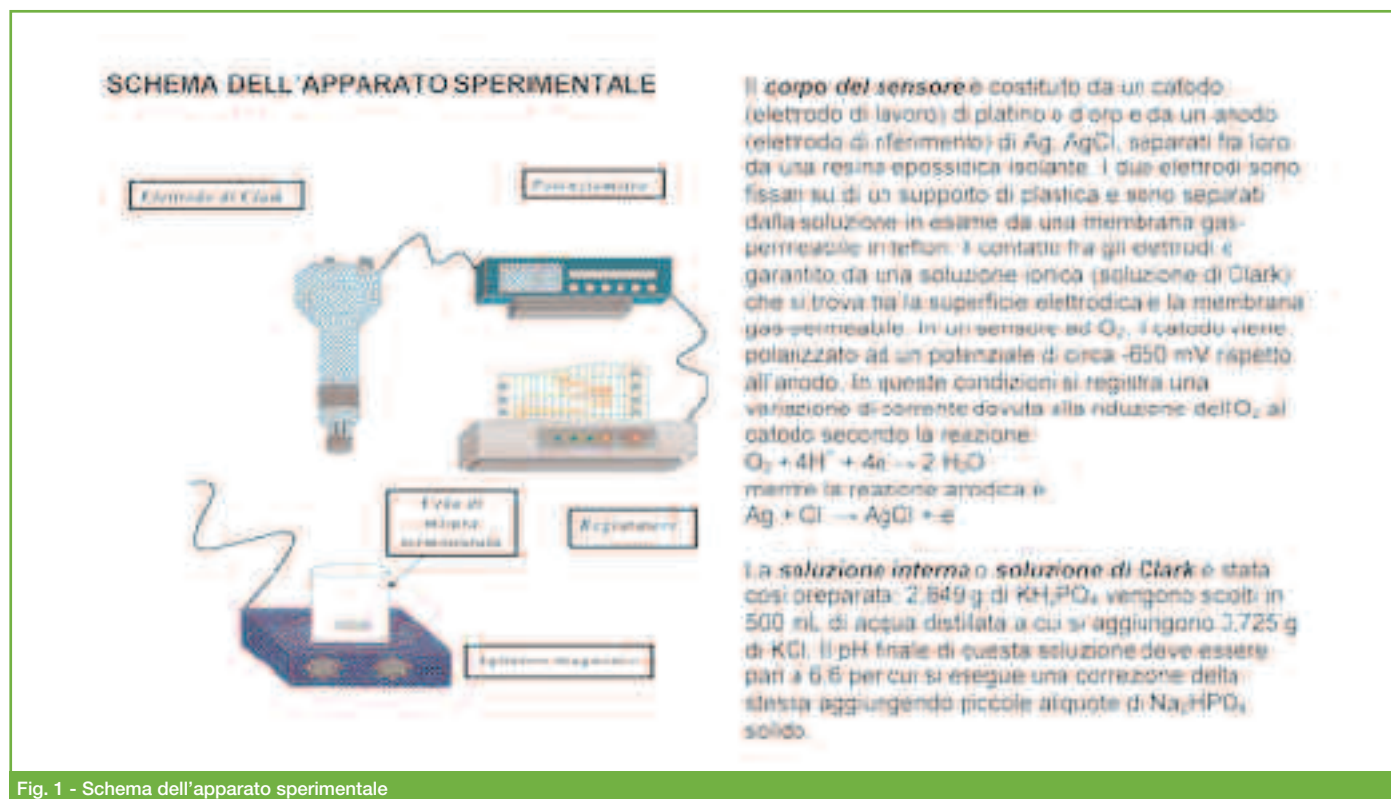


Fig. 1 - Schema dell'apparato sperimentale

senore permette di variare i parametri di riferimento affinché si abbia una misura di circa zero ppm di ossigeno nella soluzione standard.

Metodo d'analisi

La modalità operativa da noi utilizzata prevede le cellule di lievito in sospensione acquosa. Il lievito scelto come indicatore biologico è il *Saccharomyces cerevisiae* (liofilizzato). Il lievito pesato, poche decine di mg, viene sospeso in una soluzione acquosa di glucosio (quale nutriente delle cellule), preparando varie provette, e lasciato idratare per circa un'ora a T ambiente. Questa prima operazione si rende necessaria per riattivare le cellule di lievito liofilizzate. Dopo tale operazione, una o più provette vengono utilizzate per eseguire l'analisi di riferimento (bianco), previa incubazione delle cellule di lievito con un filtro senza particolato. Le altre provette vengono utilizzate per eseguire le analisi dei campioni mettendo a contatto le cellule di lievito con il particolato raccolto sul filtro. L'incubazione avviene per circa 24 ore. Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un sistema formato da un "treppiede" sul quale vengono posizionati i filtri (sia "bianco" che "campione") che poi sarà inserito in un becker per l'incubazione, sotto agitazione (Fig. 2).

Tale sistema permette una migliore interazione tra le cellule e il filtro con il risultato di una maggiore sensibilità del sistema. L'analisi, sia per il "bianco" che per il "campione", prevede l'inserimento dell'elettrodo, pre-

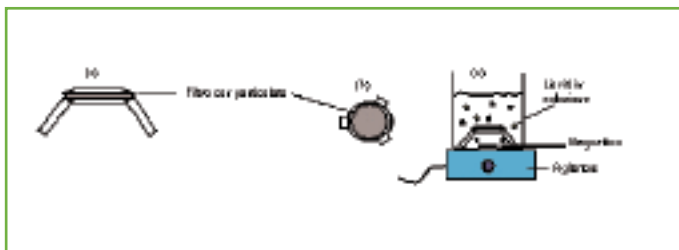


Fig. 2 - (a) e (b) Schema del treppiede utilizzato per sostenere il filtro con particolato atmosferico; (c) becker con treppiede e soluzione di lieviti (fase di incubazione)

cedentemente tarato, all'interno di una soluzione di glucosio 1 M (10 mL) e l'attesa della stabilizzazione intorno ad un valore 8 ppm di ossigeno (circa 15/20 minuti). Dopo si aggiunge 1 mL di sospensione cellulare e si osserva una diminuzione di ossigeno (zona di alto gradiente di ppm di ossigeno - Fig. 3).

Il raggiungimento di un secondo stato stazionario pone fine all'esperimento. Tipicamente si osserva una variazione di ppm di ossigeno (tra i due stati stazionari) per il "campione" minore della variazione del "bianco" a causa dell'incubazione delle cellule con il filtro contenente il PM di cui si vuole misurare la tossicità. L'indice di inibizione respiratoria (IAR), in percentuale, esprime questo risultato.

La sua definizione è la seguente:

$$IAR(\%) = \frac{[(\text{ppmO}_2)\text{Campione} - (\text{ppmO}_2)\text{Bianco}]/(\text{ppmO}_2)\text{Bianco}}{1} \times 100$$

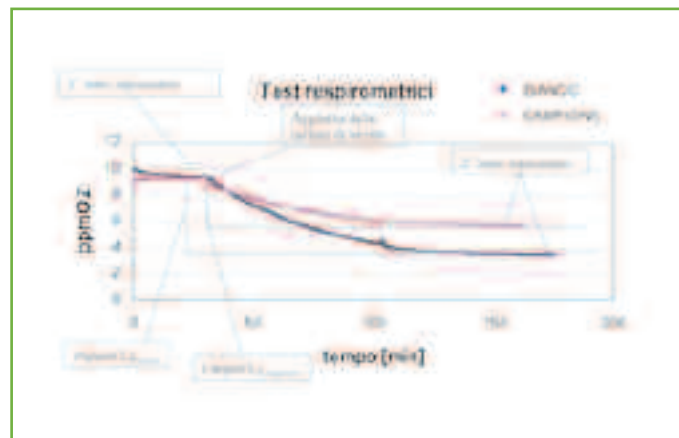


Fig. 3 - Esempio di test respirometrici. In particolare analisi di un campione proveniente dalla città di Bari e l'analisi di riferimento (bianco)

Risultati e conclusioni

I filtri sono stati inseriti tra le due sezioni del "treppiede" e, conseguentemente, messi in un becker contenente 50 mL di cellule di lievito a concentrazione 5 g/L. Si è stabilito un tempo di incubazione di circa 24 ore, intervallo di tempo necessario affinché la tossicità del particolato faccia effetto sulle cellule (esposto). Contemporaneamente, è stata preparata una sospensione di lievito messa a contatto con un filtro tal quale (bianco). Il segnale proveniente dal biosensore è registrato su un file attraverso un programma dedicato che ha la caratteristica di produrre il grafico dei ppm di ossigeno in funzione del tempo in "real time". L'elaborazione dei dati è stata eseguita attraverso il programma Excel (vedi Tab. 6-11). L'errore sulla misura del potenziometro è di 0,01 ppmO₂.

L'errore sull'indice di inibizione respiratoria è stato calcolato con la formula di propagazione degli errori. Dall'analisi dei dati sperimentali si può affermare che l'indice di inibizione respiratoria non è univocamente determinato dalla massa di particolato raccolto su filtro. Tale risultato è congruente con le nostre ipotesi: infatti, una quantità di MPA più elevata può non corrispondere ad un aumento della tossicità integrale, poiché può essere dovuto alla deposizione di materiale di provenienza naturale (sabbia, polveri). Un altro risultato che ci conforta è che i filtri con PM 10 sono, generalmente, più tossici di quelli contenenti solo le frazioni minori; infatti queste sono contenute in quello. Nell'inibizione respiratoria è emerso un buon accordo fra quanto atteso e quanto trovato sulla base della natura del sito campionato (urbano, rurale, intensivo e ventilato) e delle condizioni atmosferiche al momento del campionamento. Si può, pertanto, apprezzare la praticità e l'affidabilità del sistema costituito dal metodo amperometrico a cellule di lievito, il quale riesce ad essere sensibile anche a piccole variazioni di tossicità, poco costoso e di facile uso. Tale sistema, rispetto a quello alternativo che utilizza cellule immobilizzate, prescinde dall'uso di autoclave o metodi simili per la sterilizzazione del terreno di cultura.

Tab. 6 - Risultati delle analisi sui filtri con PM 10 - campionamenti nella città di Messina (primo set)

Bianco $\text{ppmO}_2 = 6,62$

Massa polveri [mg]	ppmO_2 (campione)	IAR(%)
0,97	2,45	(63,0 $\pm$ 0,2)%
1,28	0,65	(90,2 $\pm$ 0,2)%
2,07	3,51	(47,0 $\pm$ 0,2)%
1,66	4,67	(29,5 $\pm$ 0,3)%
0,79	2,86	(56,8 $\pm$ 0,2)%
2,64	1,42	(78,5 $\pm$ 0,2)%
1,57	1,32	(80,1 $\pm$ 0,2)%
0,44	5,37	(18,9 $\pm$ 0,3)%
0,95	4,45	(32,8 $\pm$ 0,3)%
0,70	6,43	(2,9 $\pm$ 0,3)%
1,11	5,32	(19,6 $\pm$ 0,3)%
0,38	4,72	(28,7 $\pm$ 0,3)%
0,72	4,05	(38,8 $\pm$ 0,2)%
0,72	6,52	(1,5 $\pm$ 0,3)%

Tab. 7 - Risultati delle analisi sui filtri con PM 10 - campionamenti nella città di Messina (secondo step)
postazione Forestale Colle S. Rizzo (sopra) e postazione Capitaneria di porto (sotto)

Massa polveri [mg]	ppmO_2 (bianco)	ppmO_2 (campione)	IAR(%)
1,03	4,750	1,702	(64,2 $\pm$ 0,3)%
1,86	4,750	2,434	(48,8 $\pm$ 0,3)%
0,78	4,750	1,079	(77,3 $\pm$ 0,3)%
1,24	4,750	1,602	(66,3 $\pm$ 0,3)%
0,39	4,750	2,703	(43,1 $\pm$ 0,3)%
1,46	4,750	0,673	(85,8 $\pm$ 0,2)%
0,51	4,750	1,034	(78,2 $\pm$ 0,3)%
1,47	4,998	3,817	(23,6 $\pm$ 0,4)%
4,38	4,998	1,599	(68,0 $\pm$ 0,3)%
2,39	4,998	0,431	(91,4 $\pm$ 0,2)%
0,58	4,998	1,368	(72,6 $\pm$ 0,3)%
1,24	4,998	2,597	(48,0 $\pm$ 0,3)%
0,67	4,998	1,056	(78,9 $\pm$ 0,2)%
2,30	4,998	0,850	(83,0 $\pm$ 0,2)%

Tab. 8 - Risultati delle analisi sui filtri con PM 10 - campionamenti nelle città di Bari (BJ, BC) e di Taranto (TO, Tdante)

Bianco $\text{ppmO}_2 = 5,727$

Nome filtro	Massa polveri [mg]	ppmO_2 (campione)	IAR(%)
BJ 10A	8,706	4,924	(14,0 $\pm$ 0,3)%
BJ 10B	8,706	4,931	(13,9 $\pm$ 0,3)%
BC 10	31,821	4,185	(26,9 $\pm$ 0,3)%
TO10 10	32,458	3,371	(41,1 $\pm$ 0,3)%
TO10 14	31,765	3,500	(38,9 $\pm$ 0,3)%
Tdante 10A	16,263	4,443	(22,4 $\pm$ 0,3)%
Tdante 10B	16,263	4,272	(25,4 $\pm$ 0,3)%

Tab. 9 - Risultati delle analisi sui filtri con PM 10 e PM 1 - campionamenti a Roma presso l'Istituto Superiore di Sanità

Bianco $\text{ppmO}_2 = 5,661$

PM	Massa polveri [mg]	ppmO_2 (campione)	IAR(%)
10	6,11	2,365	(58,2 $\pm$ 0,3)%
10	5,77	3,258	(42,4 $\pm$ 0,3)%
10	5,23	3,762	(33,5 $\pm$ 0,3)%
10	6,35	2,850	(49,7 $\pm$ 0,3)%
10	5,92	3,112	(45,0 $\pm$ 0,3)%
1	4,32	4,525	(20,1 $\pm$ 0,3)%
1	3,89	3,988	(29,6 $\pm$ 0,3)%
1	4,25	4,052	(28,4 $\pm$ 0,3)%
1	3,98	5,013	(11,4 $\pm$ 0,3)%
1	3,55	4,963	(12,3 $\pm$ 0,3)%

Tab. 10 - Risultati delle analisi sui filtri con PM - campionamenti a Lampedusa (PM 10 - sopra e PM 2,5 - sotto)

Bianco $\text{ppmO}_2 = 5,661$

Massa polveri [mg]	ppmO_2 (bianco)	ppmO_2 (campione)	IAR(%)
1,03	7,28	2,86	(61,1 $\pm$ 0,3)%
	0,78	4,00	5,150%
0,49	6,32	8,00	0%
0,68	6,32	8,24	0%
4,68	7,52	5,83	(22,1 $\pm$ 0,1)%
3,01	7,52	6,47	(14 $\pm$ 0,1)%
0,50	4,07	5,01	0%
0,68	4,07	5,72	0%
3,55	4,07	3,68	(4,00 $\pm$ 0,02)%
0,48	4,07	3,92	(4,00 $\pm$ 0,02)%

Tab. 11 - Risultati delle analisi sui filtri con PM - campionamenti a Monte Morello (FI) (PM 10)

Bianco $\text{ppmO}_2 = 5,661$

Massa polveri [mg]	ppmO_2 (bianco)	ppmO_2 (campione)	IAR(%)
0,90	5,22	1,04	(80 $\pm$ 0,2)%
0,69	5,22	4,18	(20 $\pm$ 0,1)%
3,55	5,22	2,08	(60 $\pm$ 0,2)%
0,48	5,22	6,06	0%

Bibliografia

- [1] L. Campanella *et al.*, *Analytical Letters*, 2004, **37**, 3047.
- [2] M.P. Sammartino *et al.*, *Water Resources Management II*, 2003, 191.
- [3] Rapporti ISTISAN 06/13 - Stazione di rilevamento dell'Istituto Superiore di Sanità per lo studio della qualità dell'aria: anni 2003 e 2004, a cura di Giorgio Cattani, Giuseppe Viviano.
- [4] A. Marconi, Polveri, fumi e nebbie aerodispersi: criteri e sistemi di campionamento, in *Il Rischio Chimico negli Ambienti di Lavoro*, G. Lazzaretti, C. Govoni (Ed.) 10-12 ottobre, Modena, Regione Emilia Romagna, Azienda USL di Modena, 1996, p. 271-278.
- [5] US Environmental Protection Agency (USEPA), Air quality criteria for particulate matter. External Review Draft, October 1999 (Report n. EPA/600/P-99/002a Vol. I).
- [6] CAFE Working Group on Particulate Matter. Second Position Paper on Particulate Matter. Final draft, April.2004. http://europa.eu.int/comm/environment/air/cafe/pdf/working_groups/2nd_position_paper_pm.pdf; ultima consultazione 19/4/2006.
- [7] K.E. Pinkerton *et al.*, *Environ Health Perspect*, 2000, **108**(11), 1063.
- [8] M. Brauer *et al.*, *Environ Health Perspect*, 2001, **109**, 1039.
- [9] UNI ISO 7708. Norma Italiana. Qualità dell'aria. Definizioni delle frazioni granulometriche per il campionamento relativo agli effetti sanitari. Milano, Ente Italiano di Unificazione, 1998.

- [10] US Environmental Protection Agency (USEPA). National ambient air quality standards for particulate matter. Final Rule, *Federal Register* 1997, 62, 38652-760.
- [11] Unione Europea (UE), 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 ed il piombo, *Gazzetta Ufficiale CE L* 163, 29 giugno 1999.
- [12] Italia DM 2 aprile 2002, n. 60. Recepimento della 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 e della direttiva 2000/69/CE relativa ai valori limite di qualità dell'aria ambiente per il benzene ed il monossido di carbonio. *Supplemento n. 77 alla Gazzetta Ufficiale* n. 87, 13 aprile 2002.
- [13] Unione Europea (UE), Commissione Europea, Proposta di Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio sulla Qualità dell'Aria ed un'Aria più Pulita per l'Europa. COM (2005) 447 final, 21 Settembre 2005.
- [14] Comité Européen de Normalisation (CEN). 1998. Air quality. Determination of the PM₁₀ fraction of suspended particulate matter. Reference method and field test procedure to demonstrate reference equivalence of measurement methods. European Standard 12341.
- [15] J.K. Agarwal, G.J. Sem, *J. Aerosol Sci.*, 1980, **11**, 343.
- [16] G.J. Sem, *Atmos Res.*, 2002, **62**, 267.
- [17] P. Aalto *et al.*, *J. Air Waste Manag. Assoc.*, 2005, **55**(8), 1064.
- [18] D.W. Dockery, C.A. Pope, *Annu. Rev. Public Health.*, 1994, **15**, 107.
- [19] J. Schwartz *et al.*, *J. Air & Waste Manage. Assoc.*, 1996, **46**, 927.
- [20] World Health Organisation (WHO). Air quality guidelines for Europe. Second Edition, WHO Regional Publications, European Series, No. 91. Regional Office for Europe, Copenhagen, WHO 2000.
- [21] K. Katsouyanni *et al.*, *BMJ*, 1997, **314**, 1658.
- [22] C.A. Pope III, *Environ. Health Perspect.*, 2000, **108**(suppl 4), 713.
- [23] A. Biggeri *et al.*, *Epidemiol. Prev.*, 2004, **28**(4-5, suppl.), 1.
- [24] A. Zanobetti *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 2000, **108**, 841.
- [25] M.J. Daniels *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 2000, **152**(59), 397.
- [26] H.E. Wichmann, A. Peters, *Phil. Trans. R. Soc. London*, 2000, **A358**, 2751.
- [27] Unione Europea (UE), Commissione Europea. Proposta di Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio sulla Qualità dell'Aria ed un'Aria più Pulita per l'Europa. COM (2005) 447 final, 21 settembre 2005.
- [28] CAFE Working Group on Particulate Matter. Second Position Paper on Particulate Matter, final draft, December 20th, 2004.
- [29] CAFE 2005. A final set of scenarios for the Clean Air For Europe (CAFE) programme" (April 2005) available at www.iiasa.ac.at/rains/index.html
- [30] D.W. Dockery *Environ. Health Perspect.*, 2001, **109**(S4), 483.
- [31] EC (1999) Council directive 1999/30/EC of April 1999 relating to limit values for sulphur dioxide, nitrogen dioxide and oxide of nitrogen, particulate matter and lead in ambient air, *Official Journal of the European Commission* (26.6.1999). L 163/41-60.
- [32] S. Lagorio *et al.*, *Ann. Ist. Super. San.*, 2003, **39**(3), 395.
- [33] A. Seaton *et al.*, *Lancet*, 1995, **345**, 176.
- [34] M. Diociaiuti *et al.*, *Environ. Res.*, 2001, **86**, 254.
- [35] Commissione delle Comunità Europee (CCE). Comunicazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento Europeo-Strategia tematica sull'inquinamento atmosferico, COM(2005) 446 definitivo, 21.9.2005 (accessibile dal sito: <http://europa.eu.int/comm/environment/air/cafe/index.htm>)
- [36] A. Marconi, *Ann. Ist. Super. San.*, 2003, **39**(3), 329.
- [37] M. Stafoggia *et al.*, *Epid Prev.*, 2005, **29**(1), 40.
- [38] A. Marconi *et al.*, Two years fine and ultrafine particles measurements in Rome, Italy, in: Proceedings of AIRNET Conference/NERAM International Colloquium, November 5-7, 2003, Rome, Italy, L. Craig *et al.* (Eds.), p. 35-46.
- [39] P. Paatero *et al.*, *Atmos Environ.*, 2005, **39**, 2261.
- [40] P. D'Innocenzo *et al.*, *Ann. Chimica*, 1998, **88**, 281.
- [41] A. Marconi *et al.*, *Ann. Ist. Super. San.*, 2000, **36**(3), 285.
- [42] G. Ziemacki *et al.*, *Ann. Ist. Super. San.*, 2003, **39**(3), 371.
- [43] M.C. Cattani *et al.*, *Ann. Ist. Super. San.*, 2003, **39**(3), 357.
- [44] Comitato Europeo di Normazione (CEN) (1998). Air quality - Determination of the PM₁₀ fraction of suspended particulate matter - Reference method and field test procedure to demonstrate reference equivalence of measurement methods. European Standard 12341, CEN 1998.
- [45] Comitato Europeo di Normazione (CEN) (2005). Ambient air quality - Standard gravimetric measurement method for the determination of the PM_{2.5} mass fraction of suspended particulate matter. European Standard EN 14907, September 2005.

Amperometric Biosensor for Determination of Total Toxicity of Atmospheric Particulate

The aim of this work has been the determination of the atmospheric particulate integral toxicity collected in different cities in Italy. In order of that a respirometric biosensor was used based on respiring yeast cells. The analytical method permitted us to evaluate respiratory activity inhibition of the cells after PM exposure for 24 hours. The respiratory ability of the cells resulted decreasing proportionally to the toxicity of the tested PM samples.