



APAT

Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Metodi microbiologici di analisi del compost

Informazioni legali

L'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici o le persone che agiscono per conto dell'Agenzia stessa non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.apat.it

© APAT, Manuali e Linee Guida 20/2003

ISBN 88-448-0090-X

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

APAT

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto: Paolo Orlandi

Coordinamento tipografico

APAT

Impaginazione e stampa

I.G.E.R. srl - Viale C.T. Odascalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare maggio 2003

Autori

Il presente Manuale è stato elaborato dall’Agenzia per la protezione dell’ambiente e per i servizi tecnici, in collaborazione con le Agenzie Regionali per la Protezione dell’Ambiente.

L’impostazione , il coordinamento e la stesura finale sono a cura di
Rosanna LARAIA, APAT

La redazione è stata a cura del Gruppo di lavoro composto da:

Elisa RASO (APAT), Liliana CORTELLINI (esperto ambientale)

Lorena FRANZ, Paolo GIANDON (ARPA Veneto)

Pina NAPPI (ARPA Piemonte)

Rossella FRANCALANCI, Gianna GAVILLI (ARPA Toscana)

Daniela BALLARDINI, Lucia RUBBI (ARPA Emilia Romagna)

Marisa MEGLIOLI, Sergio PICCINNINI, Daniela SASSI C.R.P.A. (Centro Ricerche Produzioni Animali)

Indice

PREMESSA	1
1. ANALISI PARASSITOLOGICHE DEL COMPOST, PARASSITI DELL'UOMO E DEGLI ANIMALI	3
1.1 Generalità	3
1.1.1 <i>Presenza di nematodi parassiti dell'uomo e degli animali, trematodi e cestodi nei compost</i>	3
1.1.2 <i>Efficacia del processo di compostaggio nella disattivazione dei parassiti dell'uomo e degli animali</i>	4
1.1.3 <i>Riferimenti bibliografici</i>	5
1.2 Ricerca delle uova di elminti, nematodi, trematodi, cestodi parassiti dell'uomo e degli animali nel compost	5
1.2.1 <i>Premessa sui riferimenti consultati</i>	7
1.2.2 <i>Ricerca delle uova di elminti parassiti nei compost seconda la normativa USA (Part 503, 1993): identificazione e test di vitalità</i>	7
1.2.3 <i>Ricerca delle uova di elminti parassiti nei compost (metodo per flottazione allo iodomercurato di potassio)</i>	9
1.2.4 <i>Ricerca delle uova di elminti parassiti nei compost (metodo per flottazione in soluzione zuccherina)</i>	11
1.2.5 <i>Tecnica di isolamento di uova di Ascaris Lumbricoides secondo la tecnica di Allen e Ridley modificata</i>	12
1.2.6 <i>Metodica proposta per la ricerca degli elminti parassiti degli animali e dell'uomo nei compost</i>	14
2. ANALISI PARASSITOLOGICHE DEL COMPOST, PARASSITI DELLE PIANTE	15
2.1. Introduzione	15
2.1.1 <i>Premessa</i>	15
2.1.2 <i>Forma e dimensioni</i>	15
2.1.3 <i>Localizzazione</i>	15
2.1.4 <i>Condizioni di sviluppo</i>	16
2.1.5 <i>Diffusione dei nematodi</i>	16
2.1.6 <i>Effetti del processo di compostaggio sulla presenza di nematodi parassiti nel prodotto finale</i>	16
2.1.7 <i>Azione repressiva dei compost rispetto ai nematodi fitopatogeni</i>	17
2.1.8 <i>Riferimenti bibliografici</i>	17
2.2 Le metodiche per la determinazione dei nematodi parassiti nelle normative vigenti in materia di compost	17
2.3 Metodi per la determinazione dei nematodi	18
2.3.1 <i>Campionamento</i>	18
2.3.2 <i>Metodi di estrazione dei nematodi dal compost ripresi dai metodi di analisi utilizzati per i terreni</i>	18
2.3.3 <i>Metodiche proposte per l'identificazione dei nematodi parassiti delle piante nel compost</i>	26
3. METODO PER LA RICERCA DI SALMONELLA SPP	27
3.1 Riferimenti consultati	27
3.2 Metodica proposta	27
3.2.1 <i>Principio del metodo</i>	27
3.2.2 <i>Procedimento</i>	27

4.	STREPTOCOCCHI FECALI	31
4.1	Riferimenti consultati	31
4.2	Metodica proposta	31
4.2.1	<i>Principio</i>	31
4.2.2	<i>Materiali</i>	31
4.2.3	<i>Procedimento</i>	32
5.	METODO PER LA RICERCA DI ENTEROBATTERIACEAE	33
5.1	Riferimenti consultati	33
5.2	Metodica proposta	33
5.2.1	<i>Principio del metodo</i>	33
5.2.2	<i>Strumentazione e materiali, reattivi</i>	33
	<i>Flaconi sterili da 200 o 250 ml in vetro o plastica</i>	33
5.2.3	<i>Procedimento</i>	33
5.2.4	<i>Saggio dell'ossidasi</i>	34
5.2.5	<i>Espressione dei risultati</i>	34
METODI ECOTOSSICOLOGICI PER LA CARATTERIZZAZIONE DI DIVERSE CLASSI DI QUALITÀ DI COMPOST		35
1.	METODOLOGIE UTILIZZABILI PER LA MESSA A PUNTO DI UN MODELLO SPERIMENTALE DI VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ GENOTOSSICA DI COMPOST DI QUALITÀ IN DIFFERENTI SISTEMI BIOLOGICI	35
1.1	Test dei micronuclei in <i>Vicia faba</i>	36
1.1.1	<i>Principio</i>	36
1.1.2	<i>Materiali</i>	36
1.1.3	<i>Reagenti</i>	37
1.1.4	<i>Procedimento</i>	37
1.1.5	<i>Lettura, elaborazione e espressione dei risultati</i>	37
1.1.6	<i>Interpretazione dei risultati</i>	37
1.1.7	<i>Problemi ed interferenze</i>	38
1.1.8	<i>Osservazioni</i>	38
1.2	Test della Cometa in <i>Vicia faba</i>	38
1.2.1	<i>Principio</i>	38
1.2.2	<i>Materiali</i>	38
1.2.3	<i>Reagenti</i>	39
1.2.4	<i>Procedimento</i>	39
1.2.5	<i>Lettura, elaborazione, espressione ed interpretazione dei risultati</i>	40
1.2.6	<i>Osservazioni</i>	40
1.3	Test degli scambi tra cromatidi fratelli - sces	40
1.3.1	<i>Principio</i>	40
1.3.2	<i>Materiali</i>	40
1.3.3	<i>Reagenti</i>	41
1.3.4	<i>Procedimento</i>	41
1.3.5	<i>Lettura, elaborazione, espressione ed interpretazione dei risultati</i>	41
1.3.6	<i>Osservazioni</i>	41
2.	METODOLOGIE PER LA VALUTAZIONE DELLA FITOTOSSICITÀ	42
2.1	Test di Accrescimento in <i>Lepidum sativum</i>	42
2.1.1	<i>Principio</i>	42
2.1.2	<i>Materiali</i>	42
2.1.3	<i>Procedimento</i>	42
2.2	Test di Germinazione in <i>Lepidum sativum</i>	43
2.2.1	<i>Principio</i>	43
2.2.2	<i>Materiali</i>	43
2.2.3	<i>Procedimento</i>	43

2.3	Test dell'Allungamento della radice primaria in Vicia faba	43
2.3.1	<i>Principio</i>	43
2.3.2	<i>Materiali</i>	44
2.3.3	<i>Procedimento</i>	44
2.4	Saggio biologico di compatibilità agronomica: test di vegetazione con lactuca sativa	44
2.4.1	<i>Principio</i>	44
2.4.2	<i>Materiali e reagenti</i>	44
2.4.3	<i>Strutture ed apparecchiature</i>	45
2.4.4	<i>Procedimento</i>	45
2.4.5	<i>Interpretazione dei risultati e giudizio di idoneità</i>	46
BIBLIOGRAFIA		47
3.	PROPOSTA DI UN PROTOCOLLO SPERIMENTALE PER LA VALUTAZIONE DELL'EVENTUALE GENOTOSSICITÀ DI UN COMPOST IN UN SISTEMA SUOLO-PIANTA	48
3.1	Valutazione della genotossicità	48
3.1.1	<i>Principio</i>	48
3.1.2	<i>Materiali</i>	48
3.1.3	<i>Reagenti</i>	48
3.1.4	<i>Procedimento</i>	49
3.1.5	<i>Considerazioni conclusive sull'interpretazione dei risultati</i>	49
3.2	Valutazione della Fitotossicità attraverso il test dell'allungamento della radice primaria	50
3.2.1	<i>Principio</i>	50
3.2.2	<i>Materiali</i>	50
3.2.3	<i>Procedimento</i>	50

Premessa

Il manuale è il risultato di una attività di studio finalizzata all'acquisizione di elementi tecnici a supporto dell'elaborazione di proposte di normativa tecnica e della piena applicazione delle normative in vigore.

Esso intende costituire un primo contributo in vista dell'obiettivo di giungere all'applicazione di metodiche di analisi quanto più possibile uniformi per la specifica matrice organica costituita dal compost di qualità, proveniente da matrici selezionate. Quest'ultimo, come è noto, può rientrare, ove rispondente a specifici requisiti, tra i fertilizzanti commerciali ammessi alla commercializzazione e quindi non soggetti a limiti di impiego, a norma della legge 748 del 19 ottobre 1984, e successive modifiche e integrazioni.

Il manuale analizza, pertanto, i diversi metodi di analisi previsti dalla normativa nazionale ed internazionale e dalla letteratura scientifica al fine di pervenire ad una proposta di metodica per la determinazione dei parametri di natura biologica (Salmonella, Enteriobacteriaceae, Nematodi, Trematodi, Cestodi, Streptococchi fecali, ecc.).

Esso propone, infine, un protocollo sperimentale per la valutazione di eventuali effetti genotossici di differenti dosi di compost in un sistema suolo-pianta.

1. Analisi parassitologiche del compost, parassiti dell'uomo e degli animali

1.1 Generalità

1.1.1 Presenza di nematodi parassiti dell'uomo e degli animali, trematodi e cestodi nei compost

I materiali di partenza utilizzati per la produzione di compost possono contenere numerose tipologie di agenti patogeni. Tra questi, anche uova di Elminti parassiti quali ad esempio (Barbier et al, 1990; Genevini et al., 1983, Thevenot et al., 1985) *Ascaris*, *Toxocara* e *Trichuris*, *Capillaria*, *Strongiloides*, *Enterobius* e *Necator* per i Nematodi; *Hymenolepsis*, *Taenia* e *Echinococcus* per i Cestodi. Ciò si verifica in particolare quando tra le matrici di partenza sono presenti materiali di origine fecale, come ad esempio fanghi di depurazione, taluni residui agro-industriali (quali fanghi e residui di macellazione), ma anche frazioni organiche di rifiuti urbani che possono contenere lettiere e deiezioni di animali domestici.

Un elenco degli elminti e di altri patogeni potenzialmente presenti nei compost viene riportato in tabella 1 (De Bertoldi et al., 1991).

Tabella 1 – Patogeni che possono essere presenti in residui organici e fanghi di depurazione (da: de Bertoldi et al., 1991).

Patogeni	Malattia
Virus	
Enterovirus	Gastro enteriti, meningiti, cardio patie
Rotavirus	Gastro enteriti
Parvovirus	Gastro enteriti
Adenovirus	Infezioni respiratorie, congiuntiviti
Virus Epatite A	Epatite virale
Polio virus	Poliomielite
Ecovirus	Meningite
Coxsachivirus	Meningite
Batteri	
Salmonella (1700 sierotipi)	Tifo, febbri tifoidei, salmonellosi
Shigella	Sigellosi
Mycobacterium tuberculosis	Tubercolosi
Vibrio colerae	Colera
Escherichia coli	Gastro enteriti
Yersinia enterocolitica	Gastro enteriti
Clostridium perfringens	Cancrena
Clostridium botulinum	Botulismo
Listeria monocytogenes	Meningo encefaliti
Funghi	
Candida spp	Micosi sistemiche e cutanee
Trichosporon cutaneum	Micosi cutanee
Aspergillus fumigatus	Micosi polmonare
Trichophyton spp	Micosi cutanee
Epidermophyton spp	Micosi cutanee
Microsporium spp	Micosi cutanee
Protozoi	
Entamoeba	Amebiasi
Giardia lamblia	Giardiasi
Balantidium coli	Balantidiasi
Naegleria fowleri	Meningo encefaliti
A. canthamoebae	Meningo encefaliti

segue

segue

Tabella 1 – Patogeni che possono essere presenti in residui organici e fanghi di depurazione (da: de Bertoldi et al., 1991).

Patogeni	Malattia
Elminti	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariosi
<i>Ancylostoma</i> spp	Ancilostomosi
<i>Necator amaricanus</i>	Necatoriosi
<i>Enterobius vermicularis</i>	Enterobiasi
<i>Strongyloides stercolaris</i>	Strongiloidiasi
<i>Toxocara</i> spp	Larve nella vescica
<i>Trichuris thrichuria</i>	Tricuriasi
<i>Taenia saginata</i>	Teniasi
<i>Hymenolepis nana</i>	Malattia tipo teniasi
<i>Echinococcus granulosus</i>	Echinococcosi
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Echinococcosi

La presenza di agenti patogeni nei fanghi e in altri materiali organici e l'efficacia di tecniche diverse di inattivazione sono stati investigati estensivamente, anche nell'ambito di programmi di ricerca dell'Unione Europea, (Progetto Cost 681, Working Party 3 e Recycling of Urban and Industrial waste) e di gruppi di lavoro dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

Per quanto riguarda gli elminti, i maggiori rischi associati all'uso di materiali organici di origine fecale sono relativi alla possibilità che questi siano vettori di *Taenia saginata* e *Ascaris spp.*

Come è noto l'uomo rappresenta l'ospite definitivo nel caso di *Taenia saginata* e di *Ascaris Lumbricoides* e i materiali organici possono rappresentare il vettore con cui questi parassiti sono trasmessi nel primo caso ai bovini, nel secondo all'uomo, mentre il suino rappresenta l'ospite definitivo di *Ascaris suum*.

Strauch (1996) elenca gli agenti patogeni di maggiore rilevanza nei rifiuti domestici e conferma, tra gli elminti la possibile presenza di *Taenia* e *Ascaris* (Tabella 2).

Tabella 2 - Patogeni che possono essere presenti nelle frazioni organiche di rifiuti domestici (Strauch, 1996).

Batteri	Virus
Salmonellas, E. coli, Enterobacter Yersinia, Streptococci, Proteus	Entero-, Hepatitis-A-, Poliomyelitis- Coxsackie-, ECHO-, Reo-, Adeno-, Parvo-, Pestiviruses
Pseudomonas, Klebsiella, Citrobacter	
Parassiti	Funghi
Taenia, Ascaris	Aspergillus and others

Genevini (1983) in merito ai fanghi di depurazione rileva come la presenza di nematodi possa costituire il problema igienico di maggior rilievo in quanto essi non richiedono un ospite intermedio per sviluppare e producono un enorme numero di uova (una femmina di *Ascaris* produce 200.000 uova al giorno), particolarmente resistenti ai fattori ambientali, in grado di sopravvivere ad alcuni trattamenti quali la digestione anaerobica e in grado di resistere nel suolo e mantenere la loro virulenza per un periodo di 5-6 anni.

1.1.2 Efficacia del processo di compostaggio nella disattivazione dei parassiti dell'uomo e degli animali

Il compostaggio rappresenta un sistema estremamente efficace per l'inattivazione dei patogeni. Tale inattivazione (De Bertoldi et al, 1985) si esplica principalmente attraverso l'innalzamento della temperatura, considerato che la maggior parte dei microrganismi patogeni viene inattivata in caso di riscaldamento oltre i 50 °C per alcune ore.

Tra gli elminti, ad esempio, le uova di *Ascaris Lumbricoides* vengono rapidamente inattivate a temperature superiori a 50°C. Occorre tuttavia considerare la possibilità di distribuzione non omogenea della temperatura e la possibilità di esistenza all'interno del cumulo di compost di zone "fredde". Soprattutto nel caso di *Aspergillus Fumigatus* è stato dimostrato che il micete può sopravvivere nelle aree più esterne della massa e reinvalderla quando la temperatura si è abbassata al di sotto della temperatura critica (<62°C) (Finstein e coll. 1982).

Tra gli altri fattori igienizzanti del processo di compostaggio si ricorda la competizione microbica e l'antibiosi. La competizione microbica favorisce i microrganismi saprofiti, che possono essere considerati la microflora "indigena" del compost, rispetto ai patogeni nell'utilizzo di fattori essenziali quando questi diventano limitanti.

L'antibiosi si esplica nella produzione da parte di eumiceti e attinomiceti di sostanze antibatteriche. Tale azione è stata dimostrata attraverso prove sperimentali che hanno messo a confronto gli effetti del processo su inoculi inseriti in contenitori sigillati e non sigillati, evidenziando una maggiore riduzione dei patogeni in questi ultimi (Goulueke, 1981).

Rispetto all'efficacia di diversi sistemi di compostaggio nella inattivazione dei patogeni secondo alcuni Autori (De Bertoldi et al., 1985), sarebbe dimostrata la maggiore efficacia dei sistemi statici rispetto ai sistemi rivoltati; nel caso degli impianti chiusi risultano maggiormente efficaci ai fini di igienizzazione i reattori orizzontali rispetto ai reattori verticali.

1.1.3 Riferimenti bibliografici

Barbier D., Perrine D., Duhamel C. Doublet R. e Georges P. (1990). Parasitic hazard with sewage sludge applied to land. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1420-1422.

De Bertoldi M., Civilini M. e Manzano M. (1991). Sewage sludge and agricultural waste Hygienization through aerobic stabilization and composting. In *Treatment and use of sewage sludge and liquid agricultural waste* (a cura di L'Hermite P.), Elsevier Appl. Sc.

De Bertoldi M.; Frassinetti S., Bianchin L. e Pera A. (1985). Sludge hygienization with different compost systems. In: *Inactivation of microorganism in sewage sludge by stabilization processes* (a cura di: Strauch D., Havelaar A.H., L'Hermite P.), Els.Sc.Publ., Londra

Finstein M.S., Wei-Ru LinK. E Fischler G.E (1982). Sludge composting and utilization: review of the literature on temperature inactivation of pathogens. New Jersey Agricultural experimental Station.

Genevini P.L, Vismara e Mezzanotte (1983). Utilizzo agricolo dei fanghi di depurazione. *Ingegneria Ambientale*, 12, 9, 1-133.

Golueke C.G. (1981) Destruction of Human, animal and plant pathogens in composting. Relazione presentata al Convegno "Compost-organic and Humic amendments, AVENIR, Parigi, 16-17 Novembre.

Stentiford E.I. (1989): - Health and sanitary aspects of composting – in: *Atti del Simposio Internazionale "Produzione e Impiego del Compost"*, S. Michele all'Adige, 20-23 giugno 1989, p. 406-419.

Strauch D.(1996). Occurrence of microorganisms pathogenic for man and animals in source separated biowaste and compost. Importance, control, limits, epidemiology. In: *Atti del convegno: The science of composting* (a cura di De Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B. e Papi T.) Blackie Academic and Professional, Londra.

Thevenot M.T., Larbaigt G., Collomb J., Bernard C. e Swrtzbrod J. (1985). Recovery of helminths eggs in compost in the course of composting. In: *Inactivation of microorganism in sewage sludge by stabilization processes* (a cura di: Strauch D., Havelaar A.H., L'Hermite P.), Els.Sc.Publ., Londra

1.2 Ricerca delle uova di elminti, nematodi, trematodi, cestodi parassiti dell'uomo e degli animali nel compost

L'esame parassitologico dei compost viene effettuato **mediante tecniche che consentono la concentrazione delle uova presenti nel campione**. A tal fine è possibile adottare:

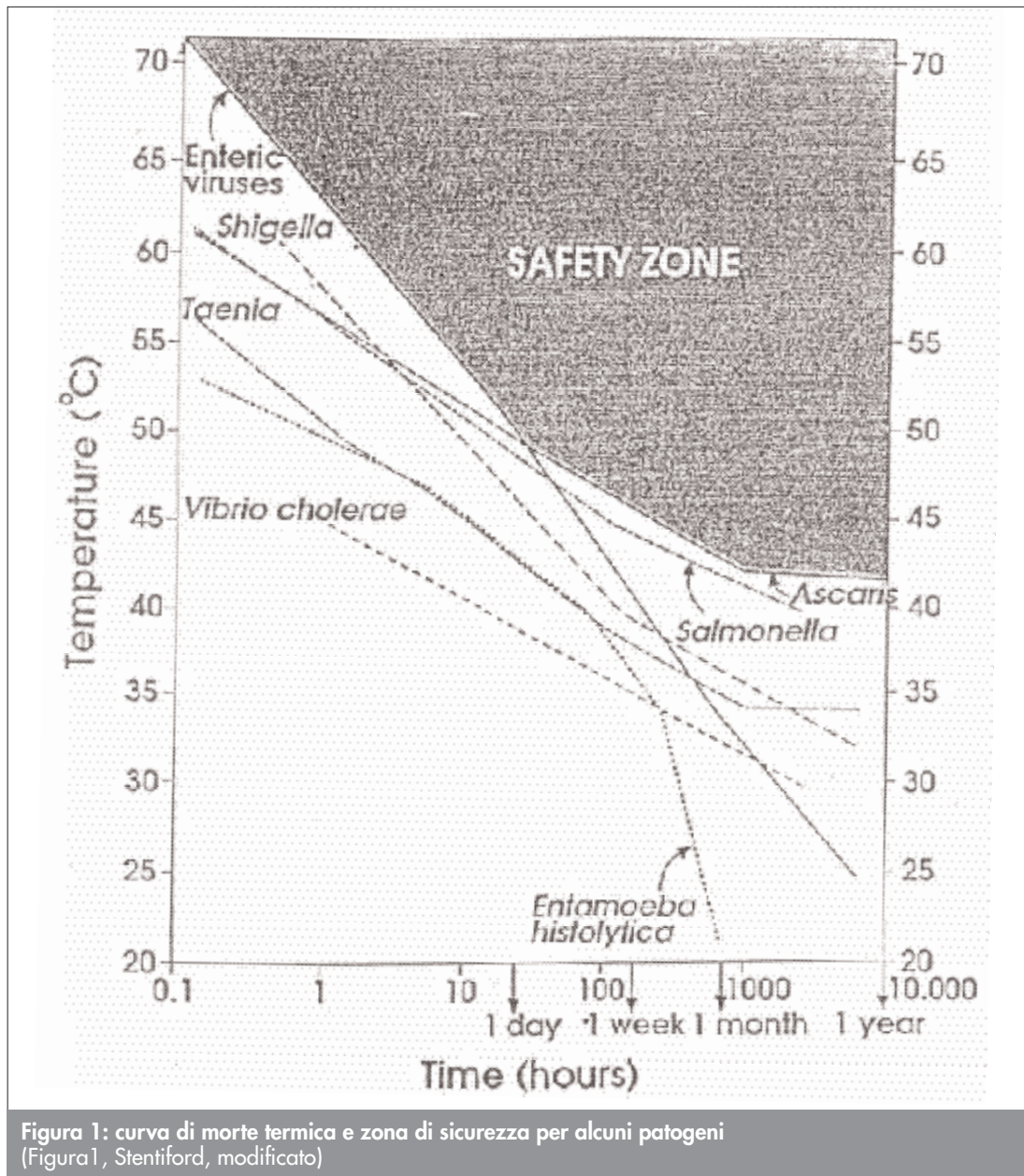


Figura 1: curva di morte termica e zona di sicurezza per alcuni patogeni (Figura1, Stentiford, modificato)

- tecniche di filtrazione;
- tecniche di sedimentazione;
- tecniche di flottazione;
- combinazione di tecniche di filtrazione, sedimentazione e flottazione (è questo il caso più frequente).

Con tali tecniche si identificano sostanzialmente le uova dei nematodi, trematodi e cestodi. Nel caso di *individui a vita libera* e *delle forme larvali* di nematodi (i trematodi e i cestodi sono parassiti obbligati e gli individui adulti e le forme larvali si riscontrano esclusivamente nell'ospite) si utilizza la tecnica dell'imbuto di Baeman (vedi il capitolo relativo alla determinazione delle forme parassite dei nematodi delle piante).

Nel terreno sono presenti numerosissime forme di nematodi a vita libera (e quindi non di interesse per la caratterizzazione del compost dal punto di vista igienico-sanitario) che possono invadere il materiale successivamente al completamento del processo di compostaggio. Questi nematodi strongiloidi possono invadere rapidamente il materiale organico e essere di ostacolo alle letture.

1.2.1 Premessa sui riferimenti consultati

L'unica ulteriore normativa, oltre a quella italiana in materia di compost di qualità, nella quale viene fatto esplicito riferimento a un limite per gli elminti, con riferimento specifico a "uova vitali di elminti" è la normativa USA relativa all'utilizzo di fanghi di depurazione in agricoltura e più in particolare PART 503 "Standards for the use or disposal of sewage sludge" (Federal Register, Volume 58, n.32, Venerdì 19 Febbraio 1993, rules and regulations, p.9387-9404).

Pertanto, oltre alla metodica indicata dalla suddetta normativa, nei paragrafi che seguono vengono analizzate alcune tra le numerose metodiche riportate nella letteratura scientifica, privilegiando quelle applicate routinariamente da Istituti Universitari e di Ricerca attivi nel nostro Paese, adatte all'analisi del compost o di substrati ad essi assimilabili (fanghi di depurazione, deiezioni animali). Le metodiche analitiche applicate, ad esempio in parassitologia umana, operando su quantitativi molto limitati di campione (di solito in parassitologia umana ci si limita a 1g) non risultano adatte all'impiego per le determinazioni su compost e fanghi di depurazione. Inoltre non sono state considerate le metodiche che fanno uso di tecniche di concentrazione per sedimentazione, in quanto i compost contengono concentrazioni elevate di particelle ad alto peso specifico che ostacolano la corretta lettura e interpretazione dei risultati.

1.2.2 Ricerca delle uova di elminti parassiti nei compost seconda la normativa USA (Part 503, 1993): identificazione e test di vitalità

1.2.2.1 Premessa

La Normativa USA in materia di requisiti per l'utilizzo e lo smaltimento dei fanghi di depurazione (PART 503) prevede nel sottocapitolo D, una serie di requisiti per la classificazione qualitativa dei fanghi (a seconda degli standards raggiunti i fanghi sono classificati di classe A o di classe B) con riguardo alla riduzione dei patogeni e alla riduzione della capacità di attrazione verso agenti in grado di trasportare patogeni, quali roditori, insetti etc.

La scelta effettuata dagli estensori della citata normativa è stata quella di offrire ai produttori di fanghi diverse opzioni che si concretizzano in:

- a) possibilità di rispettare i requisiti attraverso l'utilizzo di specifiche tecnologie, applicate in maniera appropriata, che hanno provata efficacia nella riduzione dei patogeni;
- b) possibilità di rispettare i requisiti dimostrando che i fanghi raggiungono determinati standard qualitativi.

Tra le tecnologie indicate al punto a) viene previsto anche il compostaggio, purchè:

- nel caso dei fanghi di classe A la massa in compostaggio mantenga una temperatura di 55°C per almeno tre giorni (compostaggio in reattore o in cumuli statici aerati) o di 55°C per almeno 15 giorni, assicurandosi che durante tale periodo le condizioni vengano rispettate effettuando almeno 5 rivoltamenti;
- nel caso dei fanghi di classe B nel corso del processo la temperatura della massa in compostaggio raggiunga i 40° e venga mantenuta tale per almeno 5 giorni, assicurando nel contempo che, nell'arco dei 5 giorni, per almeno 4 ore la temperatura del compost sia superiore a 55°C.

Tra le opzioni di cui al precedente punto b), viene prevista la possibilità di dimostrare che i fanghi rispettano tutte le seguenti condizioni:

- per i fanghi di classe A una densità di coliformi fecali inferiore a 1000 MPN, una densità di salmonella inferiore a 3MPN per 4g di sostanza secca e **una densità di uova vitali di elminti inferiore a 1 per 4g di sostanza secca;**
- per i fanghi di classe B una densità di coliformi fecali inferiore a 2.000.000 MPN¹ o 2.000.000 UFC² per g di sostanza secca.

La normativa indica il riferimento bibliografico per la determinazione delle uova vitali di elmin-

¹ MPN: most probable number, numero più probabile.

² UFC: unità formanti colonie

ti, nel paragrafo 503.8, relativo alle metodiche di campionamento e analisi. Il riferimento è rappresentato da uno studio sistematico condotto per conto dell'EPA (Yanko, 1988), sulla presenza di microrganismi indicatori e di microrganismi patogeni nei fanghi di depurazione civili.

Lo studio prevedeva l'individuazione dei metodi analitici e l'effettuazione di analisi per un periodo definito su diverse tipologie di fanghi e compost. In particolare sono stati analizzati compost da fanghi provenienti da 7 diversi impianti, prelevando campioni ogni settimana per un anno.

Delle sette tipologie di compost, cinque provenivano da cumuli rivoltati, due da cumuli aerati. In qualche caso sono state rilevate in questi compost uova di elminti, ma in nessun caso il test di vitalità, cui le uova presenti sono state sottoposte, ha dato risultati positivi, cosicché si è potuto concludere che le uova presenti erano non vitali. Una ulteriore fase dello studio ha previsto il campionamento ogni 2 mesi per 6 mesi di compost da fanghi, di fanghi essiccati all'aria e di fanghi essiccati termicamente provenienti da ulteriori 24 impianti.

1.2.2.2 Preparazione del campione

In opportuni contenitori destinati alla miscelazione viene preparata una sospensione di compost in acqua sterile tamponata (al fosfato) contenente lo 0,1% Tween 80 che ha la funzione di disperdente, procedendo alla miscelazione a media e alta velocità per 1 minuto.

Nel campione originario si determina la sostanza secca secondo la metodica relativa a tale parametro riportata nel volume relativo ai metodi chimici.

Nella metodica originale, della sospensione così ottenuta, una aliquota di 100 ml veniva destinata alla identificazione delle cisti di protozoi, la aliquota restante viene destinata alla determinazione degli elminti.

1.2.2.3 Apparecchiature e reagenti

a) Apparecchiature

Setaccio 48 mesh

Bottiglia Erlenmeyer da 500 ml

Imbuto

Centrifuga

Tubi da centrifuga da 100 ml

Tubi da centrifuga conici da 15 ml

Beaker da 2 l

Tubi Nalgene

Vetrini coprioggetto

Microscopio ottico

b) Reagenti

Acqua potabile

Acqua deionizzata

Soluzione di solfato di zinco di peso specifico pari a 1,2

Soluzione di acido e alcool (acido solforico 0,1 N in soluzione di etanolo al 35%)

Soluzione 0,1N di acido solforico

1.2.2.4 Procedimento

Si pesa la sospensione, circa 450 ml, di compost in acqua.

Si versa la soluzione attraverso un setaccio di 48 mesh sistemato su un imbuto largo al di sopra di un beaker di due litri.

Si sottopone più volte a lavaggio con acqua calda, raccogliendo i risciacqui nel beaker.

Si lascia sedimentare per una notte il campione sottoposto ai lavaggi preliminari e, in seguito, si elimina il surnatante fino al limite dello strato di solidi sedimentati.

Si miscela il sedimento e si versa in 2 tubi da centrifuga da 100 ml; si risciacqua due o tre volte il beaker e si versa l'acqua di risciacquo in due tubi da centrifuga da 100 ml.

Si bilancia e si centrifuga a 1250 RPM (400*g) per 3 minuti.

Si elimina il surnatante e si risospende il sedimento in soluzione di solfato di zinco, peso specifico 1,2.

Si centrifuga a 1250 RPM per 3 minuti.

Il surnatante della soluzione di solfato di zinco viene versato in una bottiglia di Erlenmeyer, diluito con acqua deionizzata, coperto e lasciato a sedimentare per tre ore o per l'intera notte.

Si elimina per aspirazione il surnatante fino al limite del materiale sedimentato.

Si risospende il sedimento mediante miscelazione e si pipetta in 2-4 tubi conici da centrifuga da 15 ml

Si risciacqua la bottiglia con acqua deionizzata tre o quattro volte e si versa il risciacquo nei tubi da centrifuga.

Si centrifuga a 1400 (480*g) RPM.

Si miscelano i sedimenti dei diversi tubi combinandoli in un unico tubo e si centrifuga a 1400 RPM (480*g) per 3 minuti.

Si risospende il sedimento in soluzione acida alcolica (acido solforico 0,1 N in soluzione di etanolo al 35%).

Si aggiungono circa 3 ml di etere, si chiude il tubo con un tappo di gomma e si capovolge parecchie volte, aprendo ogni volta l'apertura.

Si centrifuga a 1800 RPM (660*g) per 3 minuti.

Si elimina la soluzione alcolica-acida e l'etere e si rovescia il tubo su di una salvietta di carta.

Si risospende il sedimento in soluzione di acido solforico 0,1% e si versa in tubi Nalgene.

Si incubano i tubi a 26°C per un periodo compreso tra le 3 e le 4 settimane. Si incubano contemporaneamente uova ottenute dalla dissezione di un adulto di *Ascaris Lumbricoides*, var. *suum* e allorchè la maggioranza di queste uova risultano embrionate si procede all'esame del campione.

Si esaminano al microscopio i concentrati utilizzando una cella di conta del tipo Sedgewich Rafter per enumerare le uova

1.2.2.5 Valutazione e espressione e interpretazione dei risultati

La presenza di uova vitali viene determinata sulla base della presenza di **uova embrionate** e sulla base della possibilità di indurre o meno il movimento delle forme larvali.

Le uova vengono identificate e riportate come uova vitali a 50 g di compost.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) gli elminti devono risultare assenti.

1.2.2.6 Riferimenti bibliografici

Yanko William A. (1988). Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges. EPA/600/1-87/014.

1.2.3 Ricerca delle uova di elminti parassiti nei compost (metodo per flottazione allo iodomercurato di potassio)

1.2.3.1 Premessa

Le tecniche di più comune impiego in parassitologia umana non risultano applicabili per le indagini sui fanghi di depurazione e sui compost, sia per le caratteristiche fisiche degli stessi (dato l'elevato contenuto di particelle ad alto peso specifico, non risultano adatte le concentrazioni per sedimentazione), sia per la necessità di effettuare la ricerca su una quantità maggiore di campione (di solito in parassitologia umana ci si limita a 1g).

Viene pertanto proposto un metodo in uso soprattutto in parassitologia veterinaria che utilizza la tecnica di flottazione in una soluzione di iodomercurato di potassio la quale, avendo peso specifico 1,44, consente di evidenziare anche le pesanti uova dei trematodi.

Il metodo di concentrazione di seguito proposto (Ghiglietti et al., 1991) è stato dagli Autori

sottoposto a verifica introducendo quantità note di uova di *Trichuris muris* (ottenute dalle feci di topi infestati in laboratorio) in due fanghi di depurazione (in cui le uova di *Trichuris spp.* risultavano assenti) caratterizzati da un diverso residuo secco, rispettivamente 10% per il primo e 5% per il secondo, ambedue con pH 7.

La prova di recupero quantitativo è stata effettuata in cinque repliche su tre campioni per ciascun fango, a cui sono state aggiunte 10, 100 e 1000 uova di *T. muris*.

Il metodo di concentrazione ha prodotto percentuali di recupero delle uova oscillanti fra il 10 ed il 48%; la sensibilità si presenta pertanto già soddisfacente: nei campioni in cui erano state introdotte anche solo 10 uova (in 100 g) la loro presenza non è mai passata inosservata.

1.2.3.2 Apparecchiature e reagenti

a) Apparecchiature

Agitatore magnetico

Centrifuga

Tubi da centrifuga in plastica da 100 ml

Tubi da centrifuga in plastica da 50 ml

Vetrini coprioggetto 30X30

Microscopio ottico

b) Reagenti

Acqua di fonte

Triton X100

Formaldeide 8%

Etere Etilico

Soluzione di iodomercurato di potassio $d=1.440$

b1) Preparazione della soluzione di iodomercurato di potassio:

Pesare 150g di mercurio ioduro (Hg_2) e 110g di potassio ioduro (KI). Aggiungere 400 ml di acqua distillata e agitare fino a completo dissolvimento; controllare la densità che deve essere 1.440 (a temperatura ambiente)

1.2.3.3 Procedimento

Si sospendono 50 g del compost da analizzare in 150 ml di acqua di fonte;

Si aggiungono alla sospensione ottenuta 1,5 ml di Triton X100 e si miscela manualmente o, meglio, con agitatore magnetico, per circa 5 minuti;

Si aggiungono alla sospensione 100 ml di formaldeide 8%, mescolando;

Si filtra su setacci sovrapposti con maglie da 450 e 250 μm ;

Si aggiungono 40 ml di etere etilico, mescolare su agitatore magnetico e, prima che l'emulsione si separi, si centrifuga per cinque minuti a 3000 RPM (1000 $\times g$)

Si allontana tutto il surnatante, compreso il tappo di detriti che si forma tra l'etere e la parte acquosa, e si trasferisce il sedimento in uno o più provettoni da 50 ml (circa 10 ml di sedimento per provetta);

Si aggiungono a ciascun provettone circa 40 ml di soluzione di iodomercurato di potassio (peso specifico 1,44), si risospende e si ricentrifuga;

Si aggiunge alla provetta altra soluzione di iodomercurato fino a creare un menisco.

Si attendono 5 minuti, e quindi si appoggia al menisco un vetrino coprioggetto: entro 10 minuti tutto il materiale flottato aderirà al vetrino

Si osserva il vetrino al microscopio a 100 ingrandimenti.

1.2.3.4 Espressione e interpretazione dei risultati

Il numero di uova evidenziato dall'osservazione microscopica viene riferito a 50 g di compost tal quale ed espresso come uova di elminti su 50 g di compost tal quale.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) nematodi, trematodi cestodi devono risultare assenti.

1.2.3.5 Riferimenti bibliografici

Ghiglietti R., Di Matteo L., de Carneri I (1991). Ricerca di uova di elminti nei fanghi di depuratori: un metodo semiquantitativo per flottazione con iodomercurato di potassio (risultati preliminari). Bollettino di Microbiologia e indagini di laboratorio, **11**, 4:29-31.

Ghiglietti R., Di Matteo L., Bandi G., Colombi A. e Carneri I. (1992). Affinamento del metodo già da noi descritto per la messa in evidenza delle uova di elminti nei fanghi di depuratori. Parassitologia, **34**, Suppl.1:56-57.

1.2.4 Ricerca delle uova di elminti parassiti nei compost (metodo per flottazione in soluzione zuccherina)

La metodica utilizzata è quella normalmente applicata per la determinazione delle uova di parassiti nelle feci bovine dal **Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia animale Parassitologia e Malattie parassitarie**.

1.2.4.1 Principio

Per la determinazione si procede alla concentrazione delle uova presenti nel campione attraverso l'applicazione di una *combinazione di tecniche filtrazione, sedimentazione e flottazione*. Dopo il procedimento di concentrazione si effettua la lettura al microscopio e l'identificazione delle uova.

1.2.4.2 Apparecchiature e reagenti

a) Apparecchiature

Setacci da 500 e 250 micron

Coni di sedimentazione di capacità pari a 1000 ml

Tubi da centrifuga 10 ml

Vetrini coprioggetti-portaoggetti

Microscopio ottico 10X e 40X

b) Reagenti

Acqua di fonte

Soluzione per flottazione: tiosolfato di sodio; saccarosio e nitrato di sodio avente peso specifico 1,45 – 1,5. Mentre per la concentrazione per flottazione delle uova di nematodi e cestodi è sufficiente una soluzione a peso specifico da 1,05 a 1,3, una densità maggiore è richiesta al fine di separare per flottazione anche le uova di parassiti a maggiore peso specifico, quelle dei trematodi.

b1) Preparazione della soluzione peso specifico 1,3 (utilizzabile per la ricerca di nematodi e cestodi)

Pesare 540 g di Nitrato di sodio e 360 g di zucchero semolato (saccarosio). Aggiungere 1000 ml di H₂O. Agitare con cura e fare sciogliere riscaldando leggermente.

b2) Preparazione della soluzione peso specifico 1,5 (utilizzabile per la ricerca di nematodi e cestodi)

Preparazione della soluzione di iodomercurato di potassio:

b2.1) Soluzione 1

Sciogliere 100 g di ZnSO₄ in 100 ml di H₂O

b.2b.2) Soluzione madre

Sciogliere 125 g di KI e 160g di HgI in 100 ml di H₂O

La soluzione 1500 viene preparata miscelando 100 ml della soluzione 1 con 16 ml della soluzione madre, lasciando sedimentare e sottoponendo poi a filtrazione (si forma rapidamente un precipitato)

Poiché la soluzione di Mercurio ioduro è altamente tossica e inquinante, può essere sostituita (Euzeby, 1988) dalla soluzione ottenuta come di seguito indicato.

Componente	Soluzione peso specifico 1,45	Soluzione peso specifico 1,5
Saccarosio	-	30 g
Tiosolfato di Sodio	62 g	45 g
Nitrato di Sodio	30 g	32 g
Acqua	53 ml	43 ml

1.2.4.3 Procedimento

Si preleva dal campione recapitato al laboratorio una aliquota di 100 g di compost (per le feci bovine la quantità utilizzata è pari a 250 g circa).

Si procede alla sospensione del campione in circa 250 cc di acqua di fonte (si può omogeneizzare in mortaio) e successivamente a filtrazione attraverso 2 setacci di maglie 500 e 250 micron aggiungendo H₂O e mescolando per lavare le scorie più grossolane fino ad arrivare a circa 1 litro. Si effettuano lavaggi successivi in acqua della sospensione passata ai setacci, allontanando il surnatante, dopo un periodo di sedimentazione in calici conici di circa mezz'ora per ciascun lavaggio, rimescolando il residuo con altra acqua pulita. Le eventuali uova di elminti presenti sedimentano sul fondo del recipiente dato il loro peso specifico maggiore di quello dell'acqua. I lavaggi vanno ripetuti molte volte, fino alla completa chiarificazione del surnatante.

Il sedimento ottenuto viene posto in vari tubi da centrifuga (da 10 ml) e sottoposto a centrifugazione a 1500 g per 5 minuti. Si allontana il surnatante.

Si aggiunge al sedimento ottenuto la soluzione di tiosolfato di sodio, saccarosio e nitrato di sodio peso specifico 1,45-1,5 fino a circa 1 cm dal bordo della provetta per riportare il materiale in sospensione. Si sottopone quindi a centrifugazione a 1500 g per 2-5 minuti e si agita per portare il materiale in sospensione. La centrifugazione in soluzione ad alta densità determina la flottazione delle uova di parassiti. Si preleva il campione per l'osservazione utilizzando un'ansa e depositando via via il materiale flottato su vetrino; in alternativa si porta a volume con soluzione ad alto peso specifico formando un menisco sull'orlo della provetta e si preleva il campione direttamente con vetrino per contatto con il menisco.

Si osserva al microscopio per evidenziare e identificare le uova presenti.

1.2.4.4 Espressione e interpretazione dei risultati

Il metodo indicato è di tipo qualitativo e consente di indicare la presenza o l'assenza di uova di elminti in 100 g di materiale.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) nematodi, trematodi cestodi devono risultare assenti (in 50 g).

1.2.4.5 Riferimenti bibliografici

Tampieri M. e Restani R. (1985). Osservazioni sul galleggiamento di uova di elminti parassiti in soluzioni a diverso peso specifico. Documenti Veterinari, **6**,7-8:45-47.

Euzeby Jacques (1988.). Diagnostic Experimental des helminthoses animales (animaux domestiques-animaux de laboratoire – primates). Travaux pratique d'helminthologie veterinaire., Livre 1. Els. Sc.Publ., New York.

Morganti L., Tampieri M.P. e Galuppi R.(1990). Igienicità dei compost da rifiuti solidi urbani, fanghi di risulta e stocchi. Aspetti micologici e parassitologici. L'Igiene moderna, **94**, 2:180-188.

1.2.5 *Tecnica di isolamento di uova di Ascaris Lumbricoides secondo la tecnica di Allen e Ridley modificata*

La metodica di seguito riportata fa riferimento al seguente lavoro scientifico: Steer A. G., Nell J.H. e Weichers S.G. (1974). A modification of Allen and Ridley Techniques for the recovery of Ascaris Lumbricoides ova from municipal compost. Water research, **8**, p. 851-853.

È attualmente in studio presso l'Istituto superiore di Sanità per l'applicazione alla caratterizzazione dei compost di qualità.

1.2.5.1 Generalità

Gli Autori identificano in *Ascaris lumbricoides* il più resistente tra i parassiti del genere presenti in materiali di rifiuto, considerando pertanto che l'assenza possa consentire di concludere per una assenza di parassiti.

Essi partendo da verifiche non soddisfacenti (effettuate su miscele di fanghi di depurazione e rifiuti domestici che erano state precedentemente inoculate con un numero di uova di *Ascaris* conosciuto) in merito alle capacità di recupero ottenibili applicando il metodo originale di Allen e Ridley, propongono alcune modifiche.

Analoghi risultati insoddisfacenti erano stati ottenuti secondo gli Autori con altri metodi quali:

- il metodo al formol-etere;
- il metodo per concentrazione al solfato di zinco;
- il metodo per flottazione in soluzione zuccherina.

La bassa capacità di recupero delle uova con i suddetti metodi viene ricondotta alla interferenza da parte delle particelle solide a matrice fibrosa presenti nei rifiuti con la separazione delle uova, sia a causa di *ritenzione fisica*, sia per *attrazione elettrostatica*.

L'aggiunta di detergenti (anionici, in quanto, invece i cationici non si sono dimostrati altrettanto efficaci) in grado di neutralizzare le cariche e di abbassare la tensione superficiale può pertanto contribuire a innalzare la percentuale di recupero di uova.

Inoltre, in considerazione del fatto che i parassiti sono distribuiti irregolarmente nei fanghi e compost, e che ciò può determinare una bassa riproducibilità del recupero, gli Autori hanno incrementato a 20 g la dimensione del campione rispetto alla metodica originale.

1.2.5.2 Pretrattamento del campione

Tutto il compost viene macinato e setacciato. 20 g di campione vengono sospesi in 200 ml di acqua sterile a 40° C contenente 5 g di detergente. La sospensione viene miscelata con agitatore per 45 secondi

1.2.5.3 Procedura

1. Pesare 30 g della soluzione in un beaker da 100 ml;
2. Setacciare passando tutto il contenuto del beaker attraverso un setaccio a maglia in filo di rame (15 mesh cm⁻¹) in una bacinella evaporativa. Risciacquare i beaker utilizzando 20 ml di acqua sterile e passare il risciacquo attraverso un setaccio;
3. Trasferire il fluido presente nel recipiente in 4 tubi da centrifuga da 40 ml, introducendo circa 12.5 ml per ciascun tubo. Portare a volume con acqua sterile e centrifugare a 2000 RPM al minuto per 1,5 minuti. Scaricare il surnatante e ripetere l'operazione, utilizzando acqua sterile, finché il surnatante non risulta limpido. Scaricare il surnatante finale;
4. Aggiungere 7 ml di formalina 10% (1 volume 40% di formaldeide diluita con 9 volumi di acqua) a ciascun tubo e emulsionare. Aggiungere 2 ml di etere. Mescolare vigorosamente per 30 secondi;
5. Centrifugare a 2000 giri al minuto per 1,5 minuti;
6. All'interfaccia tra i due liquidi si accumula uno strato di detriti. Scioglierlo e scaricare il surnatante;
7. Mescolare il materiale depositato sul fondo e esaminare al microscopio;
8. Trasferire il materiale rimasto sul setaccio di rame in un beaker da 100 ml e immergerlo in 30 ml di acqua sterile, aggiungere 3-4 gocce di detergente e successivamente miscelare per 2 minuti. Setacciare di nuovo il tutto e centrifugare per 2 minuti a 2000 giri al minuto. Eliminare il surnatante e trattare ulteriormente il sedimento secondo la procedura indicata dal precedente punto 4 in poi.

1.2.6 Metodica proposta per la ricerca degli elminti parassiti degli animali e dell'uomo nei compost

In considerazione del fatto che tanto la metodica riportata al paragrafo 1.2.2 (USA, Part. 503), quanto quella riportata al paragrafo 1.2.5 (Metodica di Allen e Rydley modificata) sono relative alla ricerca dell'uovo di *Ascaris* (nematodi) e non sono pertanto utilizzabili per la ricerca di tutte e tre le categorie di elminti previste dal DM 27 marzo 1998 (non sono utilizzabili per evidenziare i trematodi), si propongono per la ricerca degli elminti parassiti dell'uomo e degli animali, le metodiche indicate ai paragrafi 1.2.3 e 1.2.4, ovvero metodi per flottazione allo iodomercurato di potassio e in soluzione zuccherina rispettivamente. Quest'ultimo avrebbe il vantaggio di non essere tossico.

2. Analisi parassitologiche del compost, parassiti delle piante

2.1 Introduzione

2.1.1 Premessa

I nematodi rappresentano una classe degli elminti. Contrariamente agli elminti parassiti dell'uomo e degli animali, i nematodi fitoparassiti sono oggetto di studio da assai meno tempo: considerate infatti le dimensioni ridotte e il mezzo (il suolo) in cui essi vivono soltanto a partire dagli anni 20, lo studio dei nematodi fitoparassiti ha avuto impulso.

Lo strato superficiale del suolo ospita una ricca popolazione di nematodi: in particolare nei primi 30-40 cm si trovano da 10 a 20 individui per cm³ e a volte molti di più; il numero dei nematodi parassiti è modesto in rapporto al totale delle specie che si nutrono di residui organici.

2.1.2 Forma e dimensioni

Rispetto ai nematodi parassiti degli animali e dell'uomo, che, nel caso di alcune specie del genere *Ascaris* raggiungono i 30 cm di lunghezza e i 5-6 mm di diametro, i nematodi parassiti delle piante hanno dimensioni molto minori, considerato che per la stragrande maggioranza si hanno lunghezze dell'ordine di 0,2-2mm e diametri compresi tra 10 e 40 microns. Dimensioni maggiori si rilevano per le specie di alcuni generi: ad esempio *Anguina* e *Xiphinema* (fino a 3-4mm) e *Longidorus* (fino a 10 mm).

2.1.3 Localizzazione

La localizzazione dei nematodi fitoparassiti è in relazione alle modalità di alimentazione.

a) Nel suolo

La gran parte delle specie è localizzata nella rizosfera e resta all'esterno delle radici per cui i nematodi sono denominati ectoparassiti: molti aderiscono periodicamente alle radici delle piante per alimentarsi, trascorrendo il resto del tempo circolando liberi nel terreno alla ricerca dell'ospite (vengono pertanto classificati come **nematodi ectoparassiti migratori**). A questo gruppo appartengono generi quali *Criconema*, *Longidorus*, *Xiphinema*, *Trichodorus* e *Rotylenchus*. Tuttavia, anche, i maschi e le forme larvali di altri gruppi conducono vita libera nel suolo.

Altre specie, pur rimanendo sempre alla superficie delle piante vi dimorano permanentemente, cosicchè vengono denominati **nematodi ectoparassiti sedentari**. Di questo gruppo fanno parte alcune specie del genere *Paratylenchus*.

b) Nello spessore dei parenchimi

Alcune specie, come quelle appartenenti al genere *Aphelenchoides* parassitano le foglie. Questi individui liberi riescono a attraversare le cellule dei tessuti teneri.

Altre specie, come quelle del genere *Ditylenchus*, si ritrovano nelle parti erbacee degli steli e operano secernendo degli enzimi pectinolitici che disorganizzano i tessuti entro i quali sono in grado di circolare liberamente.

Altre specie, come quelle appartenenti al genere *Pratylenchus*, si localizzano di preferenza nel parenchima radicale nel quale la loro presenza e le loro punture soprattutto, determinano profonde alterazioni.

Tutte queste forme possono migrare dai tessuti vegetali e muoversi dalla superficie delle foglie e degli steli e nelle cavità del suolo e sono pertanto denominati **nematodi endoparassiti migratori**.

c) Inclusi nelle zone vascolari delle radici

Le larve e le femmine dei generi *Heterodera* e *Meloidogyne* si trovano profondamente infossati nei tessuti delle giovani radici. (**Nematodi endoparassiti sedentari**)

d) In parte aderenti al parenchima radicale

Alcuni tipi di nematodi penetrano nel parenchima radicale con la parte anteriore del corpo per alimentarsi, restando soltanto per il tempo necessario a nutrirsi (ad es. il genere *Tylenchorhynchus*), altri rimangono permanentemente adesi (ad esempio: *Tylenchulus semipenetrans*) (**Nematodi endoparassiti migratori e sedentari**).

2.1.4 Condizioni di sviluppo

La piena attività dei nematodi nel suolo è influenzata da tre condizioni:

- 1 temperatura sufficiente: le temperature del suolo favorevoli allo sviluppo dei nematodi sono quelle calde o temperate che favoriscono anche la presenza di un numero elevato di specie;
- 2 umidità adeguata: l'acqua è indispensabile in quanto permette ai nematodi di muoversi tra gli interstizi del suolo; inoltre data la piccola taglia sono suscettibili alla disidratazione, cosicché per condizioni siccitose prolungate si determina la scomparsa di gran parte degli individui;
- 3 presenza di nutrimento: è fattore limitante per i nematodi che si nutrono di un numero limitato di specie vegetali, mentre le specie polifaghe sono poco suscettibili a tale fattore.

In caso di assenza di condizioni adeguate è possibile la produzione di forme di quiescenza. Questo stato, che può perdurare fino a 20 anni, interessa soltanto alcuni stadi di sviluppo. La modalità più frequente è rappresentata dallo stadio larvale, che si ritrova per un gran numero di specie e riguarda uno stadio ben preciso (secondo, terzo o quarto stadio larvale a seconda delle specie): la giovane larva si disidrata gradualmente. In particolare, nel caso di *Heterodera*, la forma di resistenza è rappresentata dalle uova embrionate racchiuse nel corpo incistato della femmina. In ogni caso il risveglio delle forme quiescenti si verifica sotto lo stimolo chimico di essudati radicali specifici delle piante ospiti di elezione.

2.1.5 Diffusione dei nematodi

La diffusione avviene attraverso il suolo e attraverso i vegetali e i residui colturali. Di minore incidenza, e condizionata da situazioni specifiche quali la presenza di acqua alla superficie dei vegetali, risulta la disseminazione per via aerea (esclusivamente per le specie che prevedono individui endoparassiti per steli e foglie).

2.1.6 Effetti del processo di compostaggio sulla presenza di nematodi parassiti nel prodotto finale

Data la sensibilità al calore dei nematodi, il processo di compostaggio, con il raggiungimento di temperature superiori a 55° per lunghi periodi rappresenta un metodo estremamente efficace per l'eliminazione di tutte le forme, sia le forme adulte, sia le forme di resistenza quali le cisti e le diverse forme adulte in quiescenza. La gran parte delle specie viene infatti distrutta per temperature di 50-60°. Altri meccanismi di inattivazione dei fitopatogeni che agiscono nel corso del processo di compostaggio, oltre al calore, (particolarmente attivi nel caso di batteri, protozoi e funghi) sono riconducibili alle variazioni del pH del mezzo (anche in interazione con il calore), alla produzione di composti che derivano dalla decomposizione della sostanza organica e che contribuiscono alla inattivazione dei patogeni anche nei casi in cui le temperature richieste per l'inattivazione non sono raggiunte. Nel caso di patogeni come virus, batteri e funghi risultano particolarmente efficaci i meccanismi quali la degradazione enzimatica e l'inattivazione attraverso l'antagonismo microbico.

La sopravvivenza di fitopatogeni in materiali sottoposti a processi di compostaggio (si veda in proposito la rassegna bibliografica sull'argomento di Bollen e Volker, 1996) potrebbe essere riconducibile a disomogeneità di temperatura della massa, in particolare nei casi in cui non viene previsto il rivoltamento, nonché a troppo rapido disseccamento della massa stessa, almeno in alcune specifiche porzioni. A questo proposito è stato notato un notevole incremento di resistenza al calore, ad esempio nel nematode *Globodera rostochiensis*, nelle condizioni di assenza di umidità: qualora nel compost si formino sacche di materiale a tenore di secco più elevato possono crearsi condizioni più favorevoli per talune forme di resistenza.

In effetti, anche i pochi studi specifici sulla sopravvivenza dei nematodi parassiti durante il processo di compostaggio evidenziano che anche le specie che formano cisti (come *Globodera* e *Heterodera*) e le specie che formano galle radicali che sono maggiormente resistenti a condizioni quali la disidratazione e gli agenti chimici di altri nematodi risultano ugualmente inattivate dal processo di compostaggio.

I dati relativi a otto prove sperimentali condotte su frazioni organiche domestiche sottoposte a compostaggio, volte alla verifica sulla sopravvivenza di *Meloidogyne incognita*, ad esempio, hanno mostrato la distruzione del fitofago in tutti i casi. Analoghi risultati sono stati ottenuti per *M. Incognita* per compostaggio in cumuli rivoltati di rifiuti di giardinaggio e di frazioni organiche domestiche (rifiuti di cucina).

Anche nella premessa della direttiva tecnica per l'ottenimento del marchio di qualità olandese KIWA (KIWA, 1996), si riportano alcune considerazioni in materia di inattivazione dei nematodi fitopatogeni a opera del processo di compostaggio, che risulta estremamente efficace purchè condotto secondo requisiti minimi e purchè sia evitata la ricontaminazione nelle fasi successive al trattamento.

2.1.7 Azione repressiva dei compost rispetto ai nematodi fitopatogeni

È ampiamente dimostrata l'azione positiva degli ammendanti organici, e della sostanza organica in generale, come agente repressivo nei confronti dei nematodi fitoparassiti. Numerosi Autori evidenziano l'azione svolta dagli ammendanti (D'Addabbo, 1995; D'Addabbo e Sasanelli, 1996; Khan et al., 1997, D'Addabbo et al. 1997), tanto che ne viene proposto l'impiego a fianco della lotta chimica e a parziale sostituzione di essa. In relazione in particolare all'uso di fanghi di depurazione e compost da rifiuti urbani parrebbe, nelle prove svolte con tali materiali, essersi evidenziata una azione nematocida, sebbene meno efficace di quella dimostrata da altri ammendanti organici (D'Addabbo, 1995).

2.1.8 Riferimenti bibliografici

Bollen G.J., Volker D.(1996). Phitohygienic aspects of composting. In: Atti del convegno: The science of composting (a cura di De Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B. e Papi T.) Blackie Academic and Professional, Londra.

D'Addabbo T.(1995). The nematocidal effect of organic amendments: a review of the literature, 1982-1994. Supplemento Nematologia mediterranea, 23: 299-305.

D'Addabbo T. e Sasanelli N.(1996). Effect of olive pomace soil amendment on *Meloidogyne Incognita*. Nematologia mediterranea, 24: 91-94

D'Addabbo T., Fontanazza G., Lamberti F., Sasanelli N.e Patumi M.(1997). The suppressive effect of soil amendments with olive residues on *Meloidogyne Incognita*. Nematologia mediterranea, 25: 195-198

Khan A., Islam S., Shaukat e Bilquees F.M. (1997). The efficacy of some organic amendmens in controlling spiral nematodes associated with apple. Nematologia mediterranea, 25: 173-175.

Kiwa (1996). Beoordelingsrichtlijn voor het Kiwa productcertificaat voor Compost uit groente, fruit en tuin-afval. BRL-K256/02.

2.2 Le metodiche per la determinazione dei nematodi parassiti nelle normative vigenti in materia di compost

In nessuna delle normative vigenti in materia di compost viene prevista la determinazione dei nematodi fitofagi.

Soltando nel caso del marchio di qualità Olandese KIWA BRL-K256/02 del 1996) vengono previsti limiti specifici per i fitopatogeni, tra i quali i nematodi (individui maturi, uova e cisti) e viene specificato che è richiesta la determinazione dei soli nematodi nocivi di maggiore diffusione in Olanda.

In particolare si richiede la determinazione come individui liberi di *Pratylenchus*, *Roylenchus*, *Meloidogyne*, *Longidorus* e *Xiphinema*.

Per ciascuna specie nociva si richiedono inoltre i dati relativi a uova, larve, cisti vitali. Viene prevista la determinazione di *Ditylenchus dipsaci*.

2.3 Metodi per la determinazione dei nematodi

Riferimenti consultati: i metodi di seguito indicati sono quelli riportati in:

Renzo Tacconi e Lucia Ambrogini (1995), *Nematodi da quarantena, Edizioni scientifiche Lo Scarabeo, Bologna.*

Il testo sopraccitato è stato redatto partendo dalla considerazione che le disposizioni legislative internazionali che regolano gli scambi commerciali di vegetali e prodotti prevedono l'indicazione esplicita di alcune specie di nematodi tra i fitoparassiti di cui deve essere vietata l'introduzione e che a tale proposito si pone l'esigenza di uniformare i metodi di determinazione (estrazione) per ottimizzare i servizi di controllo.

Inoltre, sono stati utilizzati i metodi redatti ad opera di:

Sasanelli, Istituto di Nematologia Agraria Applicata ai Vegetali, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari (Comunicazione personale).

Altri riferimenti consultati:

M. R. Carter (Ed.) (1993). *Soil Sampling and Methods of Analysis. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publ.*

Analoga esigenza a quella derivante dalle disposizioni internazionali che regolano gli scambi commerciali di prodotti vegetali, di disporre di metodi di determinazione uniformi, si pone anche nel caso del controllo del compost.

La definizione dei metodi di estrazione presuppone la conoscenza del ciclo biologico dei nematodi fitoparassiti e del loro rapporto con i vegetali ospiti.

In accordo con Tacconi (1995), come precedentemente rimarcato, si possono distinguere le specie di nematodi in:

- endo e semi-endoparassiti sedentari delle radici;
- endoparassiti migratori delle radici;
- ecto ed endoparassiti migratori degli organi epigei e ipogei delle piante e dei funghi;
- ectoparassiti migratori delle radici.

Di seguito si riportano le metodiche applicabili per la determinazione di nematodi parassiti delle piante in campioni di compost derivati dalle modalità di determinazione applicati al terreno e ai tessuti vegetali (ipogei e epigei).

2.3.1 Campionamento

I campioni di vegetali e/o di prodotti vegetali e/o di terreno da analizzare, costituiti da sub-campioni prelevati a caso, devono essere posti entro un sacchetto di polietilene e conservati, in attesa di essere analizzati, in una cella frigorifera regolata ad una temperatura tra +4°C e +6°C per evitare alterazioni.

2.3.2. Metodi di estrazione dei nematodi dal compost ripresi dai metodi di analisi utilizzati per i terreni

I nematodi fitoparassiti possono essere presenti nel terreno sotto forma di uova libere (endoparassiti migratori) o di uova all'interno di cisti (*Globodera* spp.), di larve infestanti di 2a età (endo e ectoparassiti migratori), di stadi larvali giovanili e di maschi (*Nacobbus* spp.) e di maschi (*Globodera* spp.).

I nematodi liberi presenti nella rizosfera possono essere recuperati con il metodo del travaso di Cobb, del filtro di cartalana e della centrifuga, mentre quelli allo stadio di cisti possono essere recuperati con la centrifuga e con l'apparato di Fenwick modificato da Oostenbrink.

2.3.2.1 Travaso di Cobb.

Il metodo può essere utilizzato per estrarre dal terreno tutte le forme libere attive e immobili dei nematodi. Rappresenta tuttavia un metodo semplicistico, per il quale è ipotizzabile una minore capacità di recupero, rispetto agli altri proposti

Attrezzature e reagenti

a) Attrezzature

Le attrezzature richieste per l'applicazione di questo metodo sono:

- due secchi della capacità di 5-6 litri di acqua;
- due setacci con maglie, rispettivamente, da 1 mm e da 40 micron da porsi l'uno sull'altro;
- microscopio;

b) Reagenti

Non occorrono reagenti

Richiesta soltanto acqua di fonte

Procedimento

Le varie fasi di applicazione possono così essere riassunte:

- si prelevano 200 g di terreno dal campione, si introducono in un secchio con 1 litro di acqua e si lasciano stemperare per qualche ora o, meglio ancora, per una giornata;
- si aggiungono nel secchio 4-5 litri di acqua, si mescola tutta la massa per 2', si fa una pausa di pochi secondi per favorire il deposito dei detriti più grossolani e mantenere in superficie i nematodi;
- si travasa la sospensione nel 2° secchio attraverso un setaccio con maglie da 1 mm per separare il materiale grossolano dal terreno evitando di versare il materiale depositato sul fondo, si aggiunge acqua al 1° secchio e si ripete l'operazione per 2-3 volte e, se necessario, anche per una quarta volta;
- si versa la sospensione (nematodi e piccoli detriti) raccolta nel 2° secchio su un setaccio con maglie da 40 micron evitando di farvi cadere il deposito formato dalle particelle di terreno; si raccoglie dal setaccio (con l'aiuto di un sottile getto d'acqua) la sospensione di nematodi e piccoli detriti in un bicchiere; i nematodi (così raccolti dal setaccio) potranno essere osservati al microscopio versando, in più volte, alcuni millilitri di sospensione dal bicchiere in una capsula a fondo reticolato (la sospensione raccolta dal setaccio con maglie da 40 micron può essere resa più limpida ricorrendo al metodo del filtro di cartalana illustrato di seguito).
- Nel caso in cui i nematodi che interessano abbiano dimensioni inferiori a 45 micron in luogo del setaccio di 45 può essere utilizzato quello da 22 micron. Nel caso dello *Xiphinema* può essere utilizzato il setaccio da 90 micron.

Espressione e valutazione dei risultati

In relazione alla diluizione adottata il valore di nematodi fitoparassiti trovato viene riportato a 50 g di compost tal quale.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) i nematodi devono risultare assenti.

2.3.2.2 Determinazione delle forme libere e attive con il metodo del filtro di cartalana

Il principio su cui il metodo si basa è la concentrazione delle forme libere e attive dei nematodi ottenuta attraverso la sommersione in acqua del campione. I nematodi tendono a muoversi dal campione saturato e sedimentano sul fondo di una bacinella

Attrezzature e reagenti

a) Attrezzature

Le attrezzature richieste per l'applicazione di questo metodo sono:

- una bacinella di acciaio inossidabile o di plastica di circa 13 cm di diametro (quest'ultima è consigliata quando si estraggono dal terreno nematodi longidoridi);
- un setaccio con maglie da 2-3 mm da porsi entro la bacinella e tenuto sollevato dal fondo con 2 sbarre di acciaio di 3-4 mm di diametro saldate a croce;
- un filtro di cartalana da mettersi sul fondo del setaccio e tenuto fermo contro la parete interna dello stesso da una fascia metallica avente un diametro di pochi millimetri più piccolo di quello del setaccio (occorre sostituire il filtro di carta lana con uno di nailon con fori delle stesse dimensioni quando si estraggono nematodi longidoridi);
- bilancia analitica;
- microscopio;
- capsule di osservazione a fondo reticolato.

b) Reagenti

Non occorrono reagenti

Richiesta soltanto acqua di fonte

Procedimento

L'operazione viene effettuata attraverso le seguenti fasi:

- si versa delicatamente la sospensione di residui organici e nematodi, ottenuta dall'omogeneizzazione in acqua del compost (da 50 a 100 g), sul filtro di cartalana già fissato in precedenza sul setaccio o si pongono direttamente sul filtro di 100 g di compost;
- si aggiunge acqua nella bacinella fino ad imbibire il filtro di cartalana e il materiale da analizzare;
- si controlla che il livello dell'acqua non si abbassi per evaporazione e si mantenga a livello del filtro di cartalana;
- si raccoglie la sospensione contenuta nella bacinella dopo 24 ore su un secondo setaccio con maglie da 40 micron, si travasano i nematodi (con l'aiuto di un piccolo getto d'acqua) dal setaccio alla capsula a fondo reticolato e si osserva al microscopio;
- si aggiunge acqua nella bacinella e si ripete l'operazione per due o tre volte.

Espressione e valutazione dei risultati

In relazione alla diluizione adottata il valore di nematodi fitoparassiti trovato viene riportato a 50 g di compost tal quale.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) i nematodi devono risultare assenti.

2.3.2.3 Determinazione delle forme attive di nematodi mediante imbuto di Baermann

L'imbuto di Baermann era una tecnica utilizzata dai parassitologi per recuperare i nematodi presenti nelle feci degli animali ed è stata adattata e modificata dai nematologi per il recupero dei nematodi dal terreno e dai tessuti vegetali. Il principio del metodo prevede di avvolgere il campione da esaminare in un tessuto o in carta e di sommergerlo parzialmente in acqua all'interno di un imbuto. I nematodi si muovono dal materiale saturato all'esterno e sedimentano sul fondo del collo dell'imbuto dal quale vengono recuperati. Un tubo di gomma è fissato sul fondo del collo dell'imbuto, ed è chiuso da una pinza. Dopo un certo periodo di tempo la pinza viene aperta in modo da lasciare cadere una certa quantità di acqua che contiene i nematodi su una piastra da conta per l'esame microscopico. Questo metodo è indicato per il recupero di nematodi attivi endo-parassiti migratori di radici (*Radopholus spp.*, stadi larvali e maschi di *Nacobbus, spp*), di bulbi, steli, gemme, fiori, foglie, semi (*A. besseyi*, *D. destructor*, *D. dipsaci*), di legno delle conifere (*B. xylophilus*) e di funghi (*A. composticola*, *D. destructor*, *D. myceliophagus*).

Apparecchiature e reagenti

a) Apparecchiature

Imbuto di Baermann. È costituito da:

- un imbuto di vetro o di plastica di 10 cm di diametro tenuto in posizione verticale da un apposito supporto;
- un tubo di gomma applicato nella parte inferiore dell'imbuto (gambo) e chiuso all'estremità da una pinza di Mohr.
- bilancia analitica;
- microscopio;
- setaccio con maglie da 40 micron
- capsule di osservazione a fondo reticolato

b) Reagenti

Non occorrono reagenti

Richiesta soltanto acqua di fonte

Procedimento

Le varie fasi di applicazione possono essere così sintetizzate:

- si mettono in una tela di mussola, con maglie non troppo piccole i campioni da esaminare;
- si chiude la mussola con un elastico e si immerge nell'imbuto contenente acqua per favorire il passaggio, attraverso la mussola, delle forme attive e vitali che si depositeranno sul fondo del tubo di gomma;
- si apre dopo 24 ore la pinza e si raccoglie la sospensione su un setaccio con maglie da 40 micron, e si versano (con l'ausilio di un sottile getto di acqua) i nematodi e i piccoli detriti in una capsula a fondo reticolato per osservare e isolare al microscopio gli eventuali nematodi che interessano;
- si aggiunge acqua nell'imbuto e si ripete la stessa operazione 1 o 2 volte dopo 24 ore.

Il metodo dell'imbuto di Baermann ha subito, nel tempo, diverse modifiche e, tra queste, le più utilizzate sono: "l'imbuto a spruzzo di Oostenbrink" e "il metodo del filtro di cartalana" che è stato illustrato nel precedente paragrafo.

Espressione e valutazione dei risultati

In relazione alla diluizione adottata il valore di nematodi fitoparassiti trovato viene riportato a 50 g di compost tal quale.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) i nematodi devono risultare assenti.

2.3.2.4 Determinazione dei nematodi liberi attivi e passivi e dei nematodi cistici mediante metodo per centrifugazione

Il metodo si basa sulla concentrazione dei nematodi e delle cisti mediante filtrazione, centrifugazione e successiva flottazione in soluzione avente peso specifico superiore a quello delle forme che si indagano.

Apparecchiature e reagenti

a) Apparecchiature

- centrifuga con rotori da 4-6 contenitori da 1 litro
- agitatore
- beaker
- bilancia analitica
- microscopio
- setaccio con maglie da 180 micron
- capsule di osservazione a fondo reticolato

b) Reagenti

- acqua di fonte
- caolino
- soluzione di solfato di magnesio densità 1,2, ottenuta addizionando 10 g di magnesio in 20 ml di acqua di fonte
- silice colloidale tipo Ludox AS 40% pH 10 carica negativa (Du Pont) (quando si determinano nematodi longidoridi).

Procedimento

La determinazione viene effettuata attraverso le seguenti fasi:

- si passano, con l'aiuto di un getto d'acqua, 200 g di terreno attraverso un setaccio con maglie da 1 mm per separare il materiale organico dal terreno e raccogliere la sospensione in un secchio di circa 5 l;
- si pone la sospensione in un contenitore da centrifuga di circa 1 litro e si porta ogni contenitore di cui il rotore della centrifuga è dotato al volume di 500 o 1000 ml con un rabbocco di acqua, si aggiunge un cucchiaino di caolino (20 g circa) alla sospensione e si mescola con un agitatore, riequilibrare il peso di ogni contenitore con acqua;
- si centrifuga per 5 minuti a 3000 giri;
- si versa il surnatante in un setaccio con maglie da 180 micron nel caso si intenda recuperare cisti di *Globodera* spp. o in generale di *Heterodera* spp., altrimenti si elimina quando si estraggono solamente nematodi liberi;
- si aggiunge al residuo rimasto nei contenitori una soluzione di solfato di magnesio con peso specifico 1,2 (10 g di solfato di magnesio in 20 ml di acqua);
- si mescola la sospensione ottenuta con un agitatore e si riequilibra il peso dei contenitori aggiungendo la soluzione di solfato di magnesio;
- si centrifuga per 5' a 3000 giri;
- si versa il surnatante su un setaccio con maglie da 180 micron quando si recuperano solo le cisti; su un setaccio con maglie da 40 o 25 o 10 micron, a seconda delle finalità, quando si raccolgono i nematodi liberi; lavare i contenitori con acqua per recuperare eventuali nematodi rimasti sul fondo ed eliminare quindi il residuo rimasto aderente ai contenitori;
- si lava con getti d'acqua il setaccio su cui sono stati raccolti i nematodi liberi o le cisti per eliminare eventuali particelle organiche e si raccolgono i nematodi in un beaker; per osservare e contare al microscopio i nematodi liberi si versano pochi millilitri per volta della sospensione in una capsula a fondo reticolato mentre per le cisti si versa il contenuto del bicchiere su un filtro di carta piegato a cono e posto su un imbuto di Baermann per scolare l'acqua e si esaminano poi le cisti rimaste sul filtro³.

Per l'isolamento di nematodi liberi longidoridi non è possibile usare la soluzione di solfato di magnesio poiché questi nematodi, non tollerando la pressione osmotica di questa soluzione, collassano appena ne vengono a contatto; in questo caso occorre usare silice colloidale tipo Ludox AS 40% Ph 10 carica negativa (Du Pont) che non ha un effetto osmotico su questi elminti.

Espressione e valutazione dei risultati

In relazione alla diluizione adottata il valore di nematodi fitoparassiti trovato viene riportato a 50 g di compost tal quale.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) i nematodi devono risultare assenti.

2.3.2.5 Determinazione dei nematodi mediante metodo per centrifugazione

Il metodo viene utilizzato per l'estrazione dei nematodi liberi, tale metodo è stato redatto da:

³ Per contare le uova e le larve entro le cisti occorre schiacciarle in acqua, porre la sospensione in una capsula a fondo reticolato e osservarla al microscopio.

Sasanelli, Istituto di Nematologia Agraria Applicata ai Vegetali, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari (Comunicazione personale).

Apparecchiature e reagenti

A) Apparecchiature

Beakers

Misurino 0,5 l

Secchio

Setaccio

Apparecchiatura di Coolen

Contenitori di alluminio

Centrifuga

Agitatore

Capsule o filtri da 5 micron

b) Reagenti

Acqua di fonte

Ipoclorito di sodio (varechina)

Antischiuma

Soluzione di Solfato di magnesio densità 1,165

Procedura

Dopo accurata omogeneizzazione si preleva con misurino una quantità di terreno pari a 0,5 l. Il terreno prelevato viene posto in un secchio. Si procede a aggiunta di acqua stemperando opportunamente. Al fine di allontanare lo scheletro si passa il tutto su setaccio frenato al di sotto del quale viene posto un grosso beacker.

La sospensione viene versata nell'apparecchiatura di Coolen, avendo cura di sciacquare il tutto. Si versano 150 ml di varechina, che ha lo scopo di sciogliere le mucillagini eventuali nelle quali sono raccolte le uova di *Meloidogyne*, e alcune gocce di antischiuma. Si collega quindi l'apparecchiatura con un tubo che insuffla aria a 1,5-2 atmosfere, si tolgono i tappi dell'apparecchio di Coolen e si lascia il tutto in mescolamento per 5 minuti. Al termine dell'operazione si lascia sgrondare un po' di liquido e si prelevano 250 ml che vengono versati in appositi contenitori di alluminio nei quali sono stati immessi un cucchiaino di caolino e 250 ml di acqua. Si sottopone ad agitazione con trapano agitatore. Si bilanciano i campioni con aggiunta di acqua e si pongono in centrifuga a 2300 g/minuto per 5 minuti. Al termine della centrifugazione si elimina il liquido surnatante. Il sedimento di fondo ha un aspetto gelatinoso. Si aggiungono 400 ml di $MgSO_4$ e si miscela nuovamente con agitatore. Si bilancia con soluzione $MgSO_4$ l'eventuale differenza di peso e si centrifuga a 2300 g/minuto per 5 minuti. Al termine della centrifugazione il materiale flottato viene versato in apposite capsule o filtri da 5 micron che lasciano sgrondare la parte liquida e trattengono i nematodi. Si pulisce con un getto d'acqua e si raccoglie il campione finale in un piccolo beaker. Si procede all'osservazione microscopica.

Espressione e valutazione dei risultati

Il valore di nematodi fitoparassiti trovato viene riportato a 50 g di compost tal quale.

In osservanza al DM27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) i nematodi devono risultare assenti.

2.3.2.6 Determinazione delle cisti di *Globodera* spp. (e anche di *Heterodera* spp.) attraverso apparato di Fenwick modificato da Oostenbrink.

Il metodo che utilizza questa apparecchiatura è impiegato essenzialmente per il recupero delle cisti di *Globodera* spp. (e anche di *Heterodera* spp.) dai terreni preventivamente asciugati all'aria, ed è basato sulla proprietà delle cisti di galleggiare sull'acqua.

Apparecchiature e reagenti

a) Apparecchiature

Apparecchio di Fenwick. È costituito da

- un tronco di cono di acciaio inossidabile (con la base minore aperta e quella mag-

- giore chiusa da una lamina di acciaio) che ha internamente un piano inclinato per facilitare la pulizia e lo scarico dell'acqua attraverso un foro sito alla base del piano ed esternamente un altro piano inclinato provvisto di un bordo per convogliare l'acqua che deborderà dal tronco di cono durante l'estrazione, in un setaccio con maglie da 180 micron (durante il funzionamento dell'apparecchio il foro di scarico dovrà essere chiuso con un tappo di sughero o di gomma) (Secondo Sasanelli: sue setacci sottostanti l'uno all'altro. Il primo da 710 micron, il secondo da 250 micron);
- un imbuto di acciaio inossidabile (da porre sulla base minore del tronco di cono) dotato internamente di una rete con maglie da 1 mm;
 - una vasca entro cui dovrà essere messo l'intero apparato per raccogliere l'acqua di scarico durante il funzionamento;
 - un getto d'acqua a spruzzo (5-6 l/minuto con una pressione dell'acqua di 3 atm.) al di sopra dell'imbuto per favorire il passaggio del terreno dall'imbuto al tronco di cono sottostante.

Setaccio con maglie 180 micron (o con maglie 710 micron, il secondo di 250 micron);

Beaker

Carta da filtro

Imbuto di vetro

Microscopio

b) Reagenti

Acqua di fonte

Alcool, Acetone o Soluzione di solfato di magnesio per ottenimento di una soluzione con densità 1,165 da utilizzare per la flottazione delle cisti

Procedimento

Le varie fasi di esecuzione del metodo possono essere così riassunte:

- asciugare all'aria (lontano da fonti di calore il campione di terreno, sbriciolarlo e mescolarlo);
- prelevare 100 o 200 o 400 g di terreno e immergerli nell'imbuto;
- aprire il getto d'acqua a spruzzo per favorire il passaggio del terreno dall'imbuto al sottostante tronco di cono dove i turbini creati dall'acqua favoriranno la liberazione delle eventuali cisti dal terreno, queste affioreranno assieme ai detriti sul bordo minore del tronco di cono e deborderanno assieme all'acqua sul piano inclinato che le convoglierà su un setaccio con maglie da 180 micron (o in sue setacci sottostanti, il primo di 710 micron, il secondo di 250 micron: Sasanelli) ove le cisti si depositeranno;
- terminato il passaggio del terreno attraverso l'imbuto si consiglia di lasciare scorrere l'acqua per altri 10-20 minuti e, comunque, fino a quando dall'apparecchio uscirà solamente acqua limpida;
- raccogliere, tramite una spruzzetta, in un beaker dal setaccio con maglie da 180 micron il residuo rimasto (cisti e detriti) e versarlo su una carta da filtro sagomata a cono e appoggiata su un comune imbuto di vetro;
- recuperare dalla carta da filtro le cisti con l'aiuto di una pinza e di un microscopio se interessa conservare la vitalità delle larve entro la cisti oppure, in caso contrario, versare il residuo in un beaker contenente una soluzione di acqua e acetone o acqua ed alcool denaturato o solfato di magnesio, poiché in queste soluzioni galleggiano le cisti, comprese quelle più giovani che generalmente sono piene di uova e tendono a depositarsi sul fondo del beaker.
- Procedere alla conta.

2.3.2.7 Determinazione delle cisti di *Heterodera* spp. attraverso apparato di Fenwick modificato da Oostenbrink secondo Sasanelli e determinazione delle uova in esse contenute

Il metodo, utilizzato per la determinazione su terreni (compost) essiccati all'aria, utilizza per l'estrazione delle cisti di *Heterodera* spp. l'apparecchiatura di Fenwick ed è basata sulla pro-

prietà delle cisti di galleggiare sull'acqua; la determinazione delle cisti sul residuo estratto viene effettuata previa ulteriore concentrazione per successiva flottazione in alcool denaturato.

Apparecchiature e reagenti

a) Apparecchiature

Apparecchio di Fenwick: è costituito da

- un tronco di cono di acciaio inossidabile (con la base minore aperta e quella maggiore chiusa da una lamina di acciaio) che ha internamente un piano inclinato per facilitare la pulizia e lo scarico dell'acqua attraverso un foro sito alla base del piano ed esternamente un altro piano inclinato provvisto di un bordo per convogliare l'acqua che deborderà dal tronco di cono durante l'estrazione, in un setaccio con maglie da 180 micron (durante il funzionamento dell'apparecchio il foro di scarico dovrà essere chiuso con un tappo di sughero o di gomma) (Secondo Sasanelli: due setacci sottostanti l'uno all'altro. Il primo da 710 micron, il secondo da 250 micron);
- un imbuto di acciaio inossidabile (da porre sulla base minore del tronco di cono) dotato internamente di una rete con maglie da 1 mm;
- una vasca entro cui dovrà essere messo l'intero apparato per raccogliere l'acqua di scarico durante il funzionamento;
- un getto d'acqua a spruzzo (5-6 l/minuto con una pressione dell'acqua di 3 atm.) al di sopra dell'imbuto per favorire il passaggio del terreno dall'imbuto al tronco di cono sottostante.

Setaccio con maglie 710 micron e 250 micron;

Imbuto di vetro

Matracci da 100 ml

Baekers

Carta da filtro

Microscopio

b) Reagenti

Acqua di fonte

Alcool etilico 90-95%

Procedimento

Le varie fasi di esecuzione del metodo sono di seguito elencate.

- Asciugare all'aria (lontano da fonti di calore il campione di terreno, sbriciolarlo e mescolarlo);
- prelevare 200 g di compost e immergerli nel crivello poggiato nell'imbuto dell'apparato di Fenwick.
- Tramite getto d'acqua si dilava abbondantemente il campione di compost dal quale si intendono separare le cisti presenti, contemporaneamente insufflando acqua ad adeguata pressione, tramite la valvola posta alla base dell'apparecchio.
- La sospensione terrosa così ottenuta viene convogliata mediante l'imbuto nel recipiente sottostante. Questo, una volta riempitosi, lascia che l'acqua che continua a cadere in esso, trascinando dal bordo superiore trascinando con sé tutto il materiale galleggiante rappresentato in prevalenza da materiali organici e dalle eventuali cisti di *Heterodera* presenti.
- Un convogliatore esterno raccoglie tutto il materiale che tracina dalla sommità del recipiente e lo convoglia unitamente all'acqua che lo accompagna su due setacci sottostanti, il primo di 710 micron, il secondo di 250 micron ove le cisti si depositeranno.
- Non appena l'uscita dell'acqua risulta limpida si pulisce esternamente l'apparecchio con un getto d'acqua, si pulisce il setaccio di 250 micron e se ne raccoglie il contenuto, mediante spruzzetta di laboratorio in un setaccio che viene posto in stufa per 7h a 60°C.
- Il campione estratto dalla stufa viene passato a un setaccio da 710 micron allo scopo di eliminare gli eventuali grumi e posto in setaccini che vengono messi a riscaldare su fornello per eliminare l'umidità assorbita.

- I campioni vengono versati tramite imbuto di vetro in matraccini da 100 ml. Quindi si aggiunge alcool etilico 90-95% fino alla metà del matraccio, si agita e si continua ad aggiungere alcool fino al riempimento.
- Le cisti di *Heterodera* vengono mano a mano in superficie. La flottazione risulta pressochè completa nel giro di 10 minuti.
- A questo punto si mettono due beaker l'uno dentro l'altro e sul più interno si pone un imbuto nel quale è stato preventivamente posato un filtro di cellulosa. Il contenuto del matraccio viene versato all'interno avendo cura di rimuovere tutte le cisti eventualmente attaccate sul collo del matraccio, mediante rotazione dello stesso, mentre le particelle terrose rimangono nel matraccio.
- Si aggiunge acqua all'imbuto con filtro e si soffia aria allo scopo di fare aderire quanto più possibile le cisti al filtro, lasciando sgrondare l'acqua.
- Si pone il filtro su piastra di orologio e si sottopone il tutto a esame al microscopio con oculare 6,3.
- Si prelevano tutte le eventuali cisti e si procede alla conta.
- Per la determinazione del numero di uova si raccolgono le cisti con una spatola, le si pongono in provette di plastica nelle quali è stata immessa una piccola quantità di acqua, si miscela con omogeneizzatore avendo cura di pulire ogni volta la punta con acqua per non fare rimanere attaccate uova che sfuggirebbero alla conta. Il contenuto della provetta viene versato in un beaker con aggiunta di acqua fino a la diluizione voluta (ad esempio 50 ml).
- Si agita con pipetta e si preleva un quantitativo che viene posto su tre vetrini (camere conta-uova).
- Al microscopio con oculare *25 si contano uova e larve
- Qualora si debbano determinare le cisti vitali, il residuo ottenuto con la procedura di concentrazione mediante apparecchiatura di Fenwick non viene posto in stufa, poiché le cisti si devitalizzerebbero. Le cisti raccolte dal setaccio vengono versate direttamente in un beakerino e da queste in un imbuto di plastica nel quale è stato preventivamente sistemato un filtro per cisti. Quindi si versa delicatamente acqua, si soffia per fare aderire le cisti al filtro consentendo nel contempo lo sgrondo dell'acqua.
- Si sistema il filtro su piastra di orologio e si pone al microscopio con oculare *6,3 per consentire la raccolta con pennellino delle cisti vitali.

Espressione e valutazione dei risultati

Il numero delle cisti viene riferito a 50 g di terreno

Dalla conta delle uova eseguita sui tre vetrini si calcola la media (X)

$X \cdot 50$ (diluizione) / 200 g di terreno * 50

Indica il numero di uova per 50 g di terreno

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) i nematodi devono risultare assenti.

2.3.3 Metodiche proposte per l'identificazione dei nematodi parassiti delle piante nel compost

Le metodiche da impiegare dipendono, come precedentemente rimarcato dal tipo di nematodi e dal loro ciclo biologico.

Nel caso del compost, Strutture specializzate che operano nel settore ed effettuano di norma determinazioni sul suolo e sui vegetali, impiegano prevalentemente il metodo Fenwick, il metodo del filtro di cartalana e il metodo per centrifugazione.

3. Metodo per la ricerca di salmonella spp

3.1 Riferimenti consultati

- IRSA-CNR, Quaderni Ist. Ric. Acque, N°64, 1983. Metodi analitici per i fanghi.
- In seguito, **IRSA - CNR, Metodi analitici per i fanghi, 1983.**
- Regione Piemonte, Assessorato all'Ambiente, 1998. Metodi di analisi dei compost. Regione Piemonte - Assessorato all'Ambiente Press, Torino. In seguito, **Regione Piemonte, Metodi di analisi dei compost, 1998.**
- Deliberazione del Comitato interministeriale, 27 luglio 1984 (Disposizioni per la prima applicazione dell'articolo 4 del decreto del Presidente della Repubblica 10 settembre 1982, n. 915, concernente lo smaltimento dei rifiuti), pubblicato nel supplemento ordinario alla G.U. n. 253 del 13 settembre 1984. In seguito, **D.C.I., 27 luglio 1984.**
- Documentazione del gruppo di lavoro per la preparazione del DM 27 Marzo 1998. Modificazione allegato 1C della Legge 19 Ottobre 1984, n.748 recante nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti. Di seguito **Proposta Commissione analisi dei fertilizzanti, 1997.**
- The U.S. Composting Council, 1997. Test methods for examination of composting and compost. First edition. In seguito, **US. TMECC, 1997.**
- Federal Compost Quality Assurance Organization, 1994. Methods Book for the Analysis of Compost, Germany. In seguito, **FCQAO, Germany, 1994.**
- Lavori preparatori alla Decisione 98/488/CE. Application for an ecolabel for soils improvers, 1995. In seguito **Application for an ecolabel for soils improvers, 1995.**

3.2 Metodica proposta

La metodica di seguito riportata riprende quella portata in sede della Commissione tecnica incaricata di elaborare una proposta relativa alla modifica dell'allegato 1C della legge 748/84, che, a propria volta fa riferimento a **IRSA - CNR, Metodi analitici per i fanghi, 1983** e a **Regione Piemonte, Metodi di analisi dei compost, 1998.**

3.2.1 Principio del metodo

La ricerca di *Salmonella* necessita di quattro fasi successive in quanto questi microrganismi possono essere presenti in numero basso ed insieme ad un gran numero di altre *Enterobacteriaceae* o di altre famiglie di batteri:

- 1) - *Prearricchimento in terreno liquido non selettivo*
- 2) - *Arricchimento in terreno liquido selettivo*
- 3) - *Isolamento su terreno solido selettivo*
- 4) - *Conferma ed identificazione*

3.2.2 Procedimento

3.2.2.1 Prearricchimento

Pesare 50 g di campione e seminare in 200 mL di Acqua Peptonata contenuti in beuta. Incubare a 36 +/- 0.5°C per 18-24 ore.

La prova va eseguita in doppio.

Acqua Peptonata

Composizione per 1 litro di terreno:

Peptone 10 g

Sodio cloruro 5 g

pH 7.2 +/- 0.2 dopo sterilizzazione a 121°C per 15 minuti.

Il terreno si prepara a partire dai singoli ingredienti. Si sciolgono i componenti in acqua distillata riscaldando e portando ad ebollizione. Si sterilizza a 121°C per 15 minuti. Dopo sterilizzazione si può conservare a + 4°C per circa una settimana.

3.2.2.2 Arricchimento

Trasferire 0.5 mL della coltura del prearricchimento in una provetta contenente 10 ml di Brodo

Rappaport Vassiliadis.

incubare a $42 \pm 0.5^\circ \text{C}$ per 24 ore.

Brodo Rappaport Vassiliadis

Peptone di soia 5 g

Sodio cloruro 8

Potassio di idrogeno fosfato 1.6

Magnesio cloruro x 6 H₂O 40

Verde Malachite 40 mg

pH 5.2 +/- 0.2 dopo sterilizzazione (115°C per 15 minuti).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo sterilizzazione si può conservare per circa una settimana a + 4°C.

3.2.2.3 Isolamento

Dai tubi di arricchimento prelevare un'ansata dalla brodocoltura e strisciarla su una piastra contenente Hektoen Enteric Agar in modo da ottenere delle colonie ben separate. E' consigliabile eseguire 3 strisci per ciascun tubo.

Incubare le piastre a $36 \pm 0.5^\circ \text{C}$ per 24 ore. Dopo l'incubazione esaminare le piastre per accertare la presenza di colonie sospette, riferibili a *Salmonella*. Su Hektoen Enteric Agar le colonie presunte *Salmonella* si presentano verdi con o senza centro nero.

Hektoen Enteric Agar

Composizione per 1 litro di terreno:

Peptone 12 g

Estratto di lievito 3

Sali biliari 9

Lattosio 12

Saccarosio 12

Salicina 2

Sodio cloruro 5

Sodio tiosolfato 5

Citrato ferrico ammoniacale 1.5

Fucsina acida 0.1

Agar 14

Blu di bromotimolo 65 mg

pH 7.5 dopo dissoluzione degli ingredienti (non si sterilizza).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non si sterilizza. Si distribuisce in piastre Petri e si lascia solidificare. Può essere conservato a + 4°C per circa una settimana.

3.2.2.4 Conferma e identificazione

Le colonie che presentano le caratteristiche tipiche sul terreno di isolamento devono essere sottoposte alle seguenti prove di conferma:

- Prova della fermentazione dei carboidrati
- Prova della decarbossilazione della lisina.

Prova della fermentazione dei carboidrati

Mediante un ago da infissione prelevare una colonia presunta *Salmonella*, e trasferirla, per infissione e successivo strisciamento, su Agar al ferro di Kligler o su Agar ai tripli zuccheri e ferro, solidificati a becco di clarino in provetta.

Incubare a 36 +/- 0.5°C per 18-24 ore.

Al termine del periodo di incubazione interpretare i risultati nel modo seguente:

- Reazione sulla superficie inclinata
- Reazione del fondo provetta
- Produzione di gas

Produzione di H₂S

Le tipiche colture di *Salmonella* danno luogo ad una colorazione rossa o rosso-violacea (reazione alcalina) della superficie inclinata e ad un ingiallimento (reazione acida) del fondo della provetta con produzione di gas, oltre a formazione (in circa il 90% dei casi) di idrogeno solforato prevalentemente lungo il canale di infissione (annerimento del terreno).

Agar al ferro di Kligler

Composizione per 1 litro di terreno:

Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3
Peptone	20
Sodio cloruro	5
Lattosio	10
Glucosio	1
Ferro citrato	0.3
Sodio tiosolfato	0.3
Agar	12
Rosso fenolo	50 mg

pH 7.4 +/- 0.2 dopo sterilizzazione (121°C per 15 minuti).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si distribuisce in provette e dopo sterilizzazione si lascia solidificare a becco di clarino con il fondo alto circa 2.5 cm.

Agar ai tripli zuccheri e ferro

Composizione per 1 litro di terreno:

Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3
Peptone	20
Sodio cloruro	5
Lattosio	10
Saccarosio	10
Destrosio	1
Ferro citrato	0.3
Sodio tiosolfato	0.3
Agar	12
Rosso fenolo	50 mg

pH 7.4 +/- 0.2 dopo sterilizzazione (121°C per 15 minuti).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si distribuisce in provette e dopo sterilizzazione si lascia solidificare a becco di clarino con il fondo alto circa 2.5 cm.

Prova della decarbossilazione della lisina

Mediante un ago da infissione prelevare una colonia, presunta *Salmonella*, e trasferirla, per infissione e successivo strisciamento, su Agar al ferro e lisina, solidificato in provetta a becco di clarino.

Incubare a 36 +/- 0.5° C per 18-24 ore.

Salmonella produce, sia sulla superficie inclinata sia sul fondo della provetta, una colorazione porpora (reazione alcalina) con produzione di idrogeno solforato (annerimento).

Agar al ferro e lisina

Composizione per 1 litro di terreno:

Casitone	5 g
Estratto di lievito	3
Destrosio	1
L – lisina	10
Ferro ammonio citrato	0.5
Agar	13.5
Sodio tiosolfato	40 mg
Porpora bromocresolo	20

pH 6.7+/-0,1 dopo sterilizzazione (121°C per 15 minuti).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Si distribuisce in provette e dopo sterilizzazione si lascia solidificare a becco di clarino con il fondo alto 2,5 cm.

Le colonie risultate essere *Salmonella*, possono essere identificate fino a livello di genere mediante sistemi miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio. Se si vuole effettuare l'identificazione fino a livello di specie si devono eseguire prove sierologiche di tipizzazione mediante l'uso di specifici antisieri polivalenti e monovalenti.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) le *Salmonelle* devono risultare assenti.

4. Streptococchi fecali

4.1 Riferimenti consultati

- IRSA-CNR, Quaderni Ist. Ric. Acque, N°64, 1983. Metodi analitici per i fanghi.
- In seguito, **IRSA - CNR, Metodi analitici per i fanghi, 1983.**
- Regione Piemonte, Assessorato all'Ambiente, 1998. Metodi di analisi dei compost. Regione Piemonte - Assessorato all'Ambiente Press, Torino. In seguito, **Regione Piemonte, Metodi di analisi dei compost, 1998.**
- The U.S. Composting Council, 1997. Test methods for examination of composting and compost. First edition. In seguito, **US. TMECC, 1997.**

4.2 Metodica proposta

- La metodica di seguito riportata è quella indicata in **Regione Piemonte, Metodi di analisi dei compost, 1998**, la quale, a propria volta, fa riferimento a **IRSA - CNR, Metodi analitici per i fanghi, 1983.**

4.2.1 Principio

- diluizione successiva del campione
- saggio presuntivo della presenza degli streptococchi fecali: semina di un substrato colturale liquido con una aliquota delle varie diluizioni e ricerca delle diluizioni che determinano sviluppo microbico
- saggio di conferma della presenza degli streptococchi fecali: trapianto delle colture ottenute nel saggio presuntivo in un substrato liquido selettivo.

4.2.2 Materiali

- tubi da batteriologia 180 x 180 mm
- pipette graduate da 5 ml
- ansa a occhiello diametro 3 mm
- substrato di coltura per il saggio presuntivo: brodo glucosato all'azide sodica

Triptosio	g 15,0
Glucosio	g 7,5
Cloruro di sodio - NaCl	g 7,5
Estratto di carne	g 4,5
Azide sodica - NaN ₃	g 0,2
Acqua distillata	q.b. a ml 1000

Dopo dissoluzione degli elementi costitutivi, il pH della soluzione deve risultare 7,2. Si distribuisce il substrato nei tubi da batteriologia in ragione di 10 ml per tubo, si tappa con tappo di cotone e si sterilizza in autoclave a 121° C per 15'.

Substrato di coltura per il saggio di conferma: *Brodo all'azide sodica ed al violetto di etile:*

Casitone	g 5
Triptosio	g 20,0
Destrosio	g 5,0
Potassio fosfato monobasico - KH ₂ PO ₄	g 2,7
Potassio fosfato bibasico - K ₂ HPO ₄	g 2,7

Cloruro di sodio – NaCl	g 5,0
Azide sodica	g 0,4
Violetto di etile	mg 0,83
Acqua distillata	q.b. a ml 1000

Dopo dissoluzione degli elementi costitutivi, il pH della soluzione deve risultare 6,5. Si distribuisce il substrato nei tubi da batteriologia in ragione di 10 ml per tubo, si tappa con tappo di cotone e si sterilizza in autoclave a 121° C per 15'.

4.2.3 Procedimento

4.2.3.1 Preparazione del campione

Pesare 100 g di compost e sospendere in 900 ml di soluzione fisiologica sterile. Omogeneizzare la sospensione su agitatore magnetico per almeno 30 minuti ed effettuare successivamente diluizioni scalari a base 10, in acqua di diluizione sterile, fino ad arrivare alla diluizione che si presume ottimale.

Saggio presuntivo della presenza degli streptococchi fecali

Da ciascuna delle diluizioni del campione si prelevano 5 ml con una pipetta graduata da 5 ml e si distribuiscono in 5 tubi contenenti il brodo glucosato all'azide sodica in ragione di 1 ml per ciascun tubo; si effettuano in tal modo 5 ripetizioni per ogni diluizione.

L'operazione si effettua in rigorose condizioni di asepsi; le pipette sterili devono essere sostituite ad ogni diluizione.

I tubi inoculati vengono messi ad incubare in termostato alla temperatura di 37° C.

Dopo 24 h si registrano, per ciascuna diluizione, i tubi positivi, considerando positivi quei tubi che manifestano torbidità del substrato. La stessa operazione viene eseguita dopo 48 h.

Saggio di conferma della presenza degli streptococchi fecali

I tubi risultati positivi dalla prova presuntiva vengono agitati delicatamente e da ciascuno di essi si prelevano due ansate e si trasferiscono ad un tubo contenente il brodo all'azide sodica ed al violetto di etile.

L'operazione si effettua in rigorose condizioni di asepsi, l'ansa ad occhiello deve essere sterilizzata alla fiamma prima di ogni prelievo. I tubi inoculati vengono messi ad incubare in termostato alla temperatura di 37° C.

Letture ed espressione dei risultati

Dopo 24 h si registrano per ciascuna diluizione i tubi positivi del saggio di conferma, considerando positivi i tubi che manifestano torbidità del substrato. La stessa operazione viene eseguita dopo 48 h.

Il numero più probabile (MPN) degli streptococchi fecali presenti nel campione è ricavato dalle tabelle statistiche di McCrady.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) le Enterobacteriaceae devono risultare inferiori a 1×10^3 (MPM x g)

5. Metodo per la ricerca di enterobatteriaceae

5.1 Riferimenti consultati

La determinazione delle *Enterobacteriaceae* non viene richiesta da alcuna normativa o linea tecnica per la caratterizzazione del compost e/o dei fanghi di depurazione, ad eccezione della normativa Svizzera alla quale si fa riferimento per la metodica proposta.

5.2 Metodica proposta

5.2.1 Principio del metodo

Dispersione del campione in soluzione sterile, inoculazione e incubazione delle diverse diluizioni in terreno Agarizzato selettivo (VRBG agar), conta delle colonie prodotte dalle cellule di *Enterobacteriaceae*.

5.2.2 Strumentazione e materiali, reattivi

5.2.2.1 Strumentazione e materiali

Flaconi sterili da 200 o 250 ml in vetro o plastica
Frigorifero regolabile a 4°C
Bilancia di precisione
Agitatore e sacchetti in plastica sterili
Autoclave
Stufa da sterilizzazione
Pipette sterili, 1 ml
Piastre Petri in materiale plastico (diametro 9 cm)
Camera da incubazione regolabile a 37°C
Provette

5.2.2.2 Reattivi

Soluzione di dispersione: acqua distillata sterile
Soluzione di diluizione: acqua distillata sterile, 9 ml nelle provette sterili
Mezzo nutritivo: Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) o Violet RedBile Agar con aggiunta di 10 g/l di glucosio per litro d'acqua.

5.2.3 Procedimento

Dispersione-omogeneizzazione: omogeneizzare il campione e prelevare 10 g di compost e inserirli in un sacchetto di plastica. aggiungere 90 g di soluzione disperdente. Omogeneizzare per un minuto mediante omogeneizzatore. La diluizione ottenuta corrisponde alla diluizione 10^{-1}

Diluizione: è necessario allestire una serie di diluizioni successive, a partire dalla diluizione 10^{-1} , trasferendo 1 ml in una provetta con 9 ml di soluzione di diluizione sterile (si ottiene in tal modo la diluizione corrispondente a 10^{-2}). Si ripete l'operazione per allestimento di diluizioni successive in funzione della presunta carica microbica del campione.

Inoculo: a seconda del numero di colonie attese prelevare per ciascuna diluizione 1 ml di soluzione e travasarlo in piastra Petri sterile. Aggiungere a ciascuna piastra Petri circa 20 ml di mezzo nutritivo (VRBG agar), alla temperatura massima di 50°C. Per miscelare l'agar con l'inoculo imprimere alle piastre movimenti circolari, 5 giri a destra e cinque a sinistra. Dopo la solidificazione, ricoprire il contenuto di ciascuna piastra con 10 ml di terreno nutritivo alla temperatura massima di 50°C (si ottengono in tal modo le condizioni anaerobiche che impediscono la crescita dei batteri gram-negativi non fermentanti e agevolano la fermentazione del glucosio). Preparare almeno due piastre per ciascuna diluizione.
Incubazione: rovesciare le piastre e incubare a 37°C per 18-24 ore.

Conta delle colonie: dopo 18-24 ore contare le colonie di Enterobacteriaceae, eventualmente mediante un apparecchio conta-colonie. Soltanto le colonie violette con un alone color porpora sono da considerarsi enterobacteriaceae; le colonie rosse, ma senza alone non devono essere contate. Non prendere in considerazione le piastre che presentano degli aggregati di colonie.

Se si contano più di 100 microrganismi per g di matrice esaminata si deve procedere al saggio dell'ossidasi per le colonie mal definite (ad esempio colonie colorate in rosso con anello rosso). **Soltanto i germi ossidasi negativi sono da considerarsi come Enterobacteriaceae**

5.2.4 Saggio dell'ossidasi

Principio

Diversi batteri aerobi, che ottengono la loro energia dal metabolismo respiratorio, utilizzano l'ossigeno come accettore finale di idrogeno, una tappa che è catalizzata da una ossidasi. I batteri anaerobici non possiedono l'ossidasi.

Applicazione

Il saggio dell'ossidasi consente la differenziazione di *Pseudomonas Aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* (che sono ossidasi positivi) dalle *Enterobacteriaceae* (che sono ossidasi negative), così come all'identificazione di alcuni generi quali *Aeromonas* (+), *Alcaligenes* (+), *Acinetobacter* (-) *Staphylococcus* (-) e *Micrococcus* (-).

Modalità di applicazione

Colture su piastra Petri: si depositano direttamente 2-3 gocce di reattivo di KOVACS sulla superficie delle colonie.

Indicazioni

La reazione positiva (colorazione porpora, da blu scuro a nero) si produce repentinamente, nello spazio di 5-15 secondi

5.2.5 Espressione dei risultati

I risultati vengono espressi in n° di *Enterobacteriaceae* per g di fango. Per ottenere il numero calcolare la media delle analisi in parallelo e calcolare il numero di *Enterobacteriaceae* in funzione del livello di diluizione.

In osservanza al DM 27 marzo 1998, in ammendanti organici naturali (ammendante compostato verde, ammendante compostato misto, ammendante torboso composto) le *Enterobacteriaceae* devono risultare inferiori a 10² UFC per g di compost.

Metodi ecotossicologici per la caratterizzazione di diverse classi di qualità di compost

L'immissione nell'ambiente di sostanze in grado di provocare danni al patrimonio genetico degli organismi che vivono nei differenti comparti ambientali (Genotossine), costituisce di per sé una situazione a rischio per la loro capacità di intaccare direttamente i pools genetici. Tali sostanze, quando presenti in dosi massicce, possono agire sulle capacità riproduttive di molte specie, mentre a basse concentrazioni sono in grado di rafforzare l'instabilità degli ecosistemi ed entrare nella catena alimentare andando, così, incontro a processi di bioconcentrazione. Per quanto concerne, in particolare, i fanghi di depurazione e i compost che da essi derivano, la presenza di microinquinanti sia inorganici che organici dotati di proprietà genotossiche è ben documentata. Per quanto riguarda i primi, la presenza dei metalli pesanti nei compost viene considerata dalla quasi totalità dei ricercatori come il problema principale che limita l'impiego dei compost in agricoltura. Queste considerazioni vengono ancor più rafforzate se si pensa che molti di tali metalli, quali il mercurio (che può derivare dalle batterie), il cadmio (proveniente da batterie, vernici e materie plastiche), il piombo (da vernici e carta stampata) ed il cromo (dalle vernici e dalle pelli), sono dotate di spiccate proprietà mutagene in sistemi sia vegetali che animali. Ma, come ricordato in precedenza, con i compost sono spesso apportati al suolo una vasta gamma di microinquinanti di origine organica. I composti dotati di maggior pericolosità sono classificabili in 5 categorie principali: i clorurati aromatici contenenti ossigeno, le amine aromatiche, i fitofarmaci, i composti aromatici alogenati (PCB) e gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH). Queste ultime due categorie di sostanze sono quelle su cui si è maggiormente appuntata l'attenzione dei ricercatori. Esse, infatti, essendo dotate di notevole resistenza chimica, sono difficilmente biodegradabili e, sovente presenti nelle biomasse di partenza, passano incolumi quei processi di detossificazione che hanno luogo durante la fase di compostaggio e che inattivano o degradano molti composti appartenenti alle altre categorie sopra ricordate.

Da quanto sopra riportato emerge l'opportunità, se non la necessità, di valutare se nei materiali che vengono somministrati al terreno vi sia una significativa presenza di sostanze mutagene, le quali, avendo anche la capacità di indurre danni al DNA in assenza di effetti tossici che fungano da campanello di allarme, rappresentano un parametro da non trascurare nella valutazione dell'impatto ambientale di un determinato composto. In tale contesto, l'uso di tests biologici di genotossicità risultano di fondamentale importanza per valutare le reazioni degli organismi viventi alle quanto mai complesse e diversificate situazioni di inquinamento ambientale e per fornire indicazioni sulla comparsa di eventuali effetti sinergici dei vari inquinanti, effetti sui quali le analisi chimiche e fisiche, peraltro generalmente molto costose e complicate, da sole non sono in grado di fornire dati definitivi.

1. METODOLOGIE UTILIZZABILI PER LA MESSA A PUNTO DI UN MODELLO SPERIMENTALE DI VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ GENOTOSSICA DI COMPOST DI QUALITÀ IN DIFFERENTI SISTEMI BIOLOGICI

Gli sforzi condotti per mettere a punto sistemi che consentissero di evidenziare la presenza nei differenti comparti ambientali di sostanze in grado di alterare le funzioni replicative del DNA hanno intrapreso due strade differenti che portavano, l'una al controllo degli organismi esposti *in situ* a condizioni di rischio e l'altra allo studio in laboratorio dell'attività mutagena di inquinanti ambientali presenti nell'aria, nell'acqua o nel suolo, con e senza preliminari processi di estrazione.

Per entrambi questi approcci in letteratura sono riportati diversi tests su differenti sistemi biologici, che vanno dai microorganismi alle piante superiori fino alle cellule animali, ed appa-

re del tutto evidente come solo l'utilizzazione di diversi organismi possa consentire di evidenziare i vari tipi di alterazione genetica coprendo un più ampio spettro di effetti genotossici. A fianco dei classici tests su microorganismi (ad esempio il Test di Ames in Salmonella), si sono andati sviluppando lo studio di alcuni parametri di danni citogenetici, quali la presenza di micronuclei, di anafasi irregolari, degli scambi tra cromatidi fratelli, di rotture dei filamenti di DNA etc., applicabili a differenti organismi (cellule di meristemi di molte piante superiori, eritrociti nucleati di molti vertebrati, molluschi, celomociti di lombrichi, linfociti umani etc.) e che consentono, quindi di avere un quadro più completo delle caratteristiche genotossiche delle sostanze in studio.

Tra i diversi organismi saggiati le piante superiori si sono rivelate come ottimi indicatori degli eventuali effetti citogenetici e mutageni indotti da differenti sostanze chimiche presenti nell'ambiente ed hanno, inoltre, dimostrato di possedere una maggiore sensibilità (minor presenza di falsi negativi) rispetto ad altri tests che utilizzano organismi non vegetali. Queste caratteristiche, abbinate alla semplicità di conservazione ed alla loro economicità, ne fa, senza dubbio, gli organismi più adatti in caso di uno screening preliminare su un grande numero di sostanze o su composti sulla cui genotossicità non si ha alcun dato preesistente ed il largo uso che di molte di esse (*Vicia faba*, *Tradescantia*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, etc.) si fa in tali studi ne fa senza dubbio fede.

Nel caso specifico, in considerazione sia della destinazione finale (il suolo) del composto da saggiare, nonché della necessità di utilizzare saggi applicabili routinariamente e, dunque, non troppo costosi e difficili da condurre si suggerisce l'uso di quattro tests vegetali che consentirebbero di coprire l'intero spettro degli effetti genotossici possibili (mutazioni somatiche, aberrazioni cromosomiche, micronuclei e ricombinazioni mitotiche):

- Test dei micronuclei in apici radicali di *Vicia faba*.
- Test della Cometa in *Vicia faba*.
- Test degli scambi tra cromatidi fratelli (SCEs).

Qui di seguito verranno illustrati i protocolli sperimentali dei tre tests sopra citati e verranno riportati alcuni riferimenti bibliografici.

In linea generale, si intenderebbe condurre i saggi sia sul compost aggiunto al suolo che ponendo a contatto gli organismi test con estratti del compost stesso. Si fa, inoltre, presente che le prove condotte su campioni di suolo consentono di valutare sia l'influenza delle caratteristiche pedologiche sull'eventuale manifestarsi di fenomeni di genotossicità (utilizzo di suoli differenti) che i rapporti che nel suolo si vanno ad instaurare tra il compost ed altri mutageni presenti (erbicidi, metalli pesanti).

1.1 Test dei micronuclei in *Vicia faba*

1.1.1 Principio

La presenza di sostanze mutagene nel campione da esaminare provoca nelle cellule degli apici radicali di *Vicia faba* danni al DNA cromosomico, provocando il non corretto svolgimento del processo mitotico evidenziato dalla presenza di figure anafasiche irregolari o dalla presenza di frammenti di DNA extranucleari (micronuclei).

Preparazione del campione da saggiare:

Il campione di compost, usato sia tal quale che dopo estrazione, va conservato a -18 °C fino al momento dell'analisi.

Il suolo va seccato all'aria e setacciato a 2 mm. Va utilizzato un suolo a bassissimo tenore in colloidali argillosi e, soprattutto, organici per evitare che le interazioni che essi instaurano con la biomassa in esame mascherino eventuali fenomeni di genotossicità.

1.1.2 Materiali

Semi di *Vicia faba* (varietà *minor*) di recente acquisto (comunque non più di un anno).

Vaschette di alluminio.

Vetrini porta e coprioggetto.

Vaschette con supporti specifici per l'effettuazione dei lavaggi dei vetrini.
Materiale di comune uso di laboratorio.
Apparecchiature indispensabili
Microscopio ottico.
Cella climatica per il controllo della temperatura e dell'umidità.
Strumentazione per la produzione del ghiaccio secco.
Bagnomaria termostato.
Piaccametro.

1.1.3 Reagenti

Alcool etilico 95°.
Histolemon.
Acido acetico glaciale.
Balsamo del Canada.
Reattivo di Schiff.
Acido cloridrico 1 N.

1.1.4 Procedimento

Si seminano 50 semi dell'organismo test (*Vicia faba* var. *minor*) in 500 grammi di un suolo sabbioso (contenuto in sabbia >90 % e bassissimo tenore in colloidali organici ed argillosi) arricchito con differenti dosi del compost da saggiare ed aggiunta di 120 ml di acqua. I campioni vegetali vengono conservati in camera climatica a 20 °C ± 1 per 72 - 96 ore. In alternativa, si pongono 50 piantine di quattro giorni per due ore a contatto con estratti del compost in esame. Trascorso tale periodo si procede, per entrambe le procedure sperimentali, al prelievo degli apici della radice primaria ed alla loro fissazione in una miscela di alcool etilico ed acido acetico 3:1 (v/v). Dopo 24 ore si procede al trattamento con HCl 1 N per 8 minuti a 60 °C, si sciacqua con l'acqua e si aggiunge il reattivo di Schiff, lasciandolo agire per alcune ore (comunque non più di una notte). I vetrini vengono preparati per schiacciamento degli apici. I vetrini coprioggetto vengono, in seguito, fatti saltare con ghiaccio secco, fissati con ripetuti passaggi in Histolemon e Alcool Etilico al 95 % e resi permanenti con balsamo del Canada.

1.1.5 Lettura, elaborazione e espressione dei risultati

Quale parametro di genotossicità viene utilizzata la frequenza di micronuclei (corpuscoli Feulgen positivi, extranucleari che derivano da cromosomi interi o da loro parti che non hanno regolarmente segregato durante la mitosi) e di anafasi irregolari (presenza di ponti o di frammenti cromosomici) nelle cellule degli apici radicali confrontandola con quella presente in campioni non trattati (Controlli). Si consiglia di seguire l'andamento dei suddetti parametri in almeno 20.000 (10 apici radicali, 2000 cellule per ogni apice) per ogni punto sperimentale. Tale lettura può essere condotta sia direttamente al microscopio ottico che attraverso l'ausilio di sistemi di analisi di immagini computerizzati.

I risultati ottenuti devono, infine, essere analizzati tramite analisi della varianza, utilizzando una dei tanti tests multirange disponibili (LSD, Duncan, Tukey etc.) negli svariati pacchetti statistici disponibili in commercio (SPSS, Statgraphics, SAS etc.), al fine di evidenziare incrementi statisticamente significativi della frequenza dei due parametri suddetti nei campioni vegetali trattati con le biomasse in studio rispetto a quelli trattati con solo acqua (Controlli). Si sottolinea come sovente sia necessario far precedere all'elaborazione statistica vera e propria la trasformazione delle variabili (radice quadrata o logaritmo) al fine di ottenere una migliore omogeneità delle varianze. Si consiglia di utilizzare un livello di significatività pari a 0.01.

1.1.6 Interpretazione dei risultati

Incrementi significativi della frequenza di micronuclei o anafasi irregolari nei campioni tratta-

ti rispetto ai controlli (generalmente il primo risulta più sensibile del secondo) indica il manifestarsi di effetti genotossici. Appare evidente come il significato reale di tale eventuale incremento sia strettamente legato alla sua dimensione. Volendo esprimere numericamente tale concetto si può introdurre un Indice di Micronuclei (IM) calcolato come segue:

$$IM = \% MC_i / \% Mc_c$$

Dove:

IM = Indice di Micronuclei

MC_i = Frequenza di Micronuclei nel campione in esame

Mc_c = Frequenza di Micronuclei nel Controllo.

Valori di IM inferiori a 1,5 suggeriscono l'assenza di fenomeni di genotossicità nelle piantine trattate con il campione in esame.

Valori compresi tra 1,5 e 2 indicano, invece, la comparsa di significativi effetti genotossici e suggeriscono una più attenta valutazione del rischio connesso all'uso della biomassa utilizzata, relativamente alle dosi per le quali tali effetti si manifestano.

Valori superiori a 2, evidenziando la presenza di marcati segnali di alterazione genetica, portano a sconsigliare l'impiego, soprattutto se continuativo, del campione in esame. In questo caso, soprattutto in presenza di valori di IM molto elevati, è opportuna un'attenta valutazione anche relativamente all'impiego ripetuto di dosi inferiori a quelle genotossiche.

Ci preme sottolineare come tale test vada sempre affiancato da saggi di fitotossicità (per ovvi motivi sia teorici che pratici si consiglia di utilizzare lo stesso organismo test). Infatti, solo in assenza di significativi effetti fitotossici, l'interpretazione sopra riportata risulta corretta

1.1.7 Problemi ed interferenze

La nostra esperienza personale ha evidenziato l'assenza di particolari problemi, se non quelli legati alla necessità di spargere la biomassa nel modo più uniforme possibile, al fine di ridurre la variabilità resa già sufficientemente elevata dal fatto di aver a che fare con sistemi biologici complessi.

1.1.8 Osservazioni

Il test dei micronuclei può essere applicato, con variazioni metodologiche legate alle caratteristiche dell'organismo test, sia ad altre specie vegetali (ad esempio *Allium cepa* e *Tradescantia*) che a cellule animali (linfociti umani). Esso risulta particolarmente utile qualora si voglia studiare la comparsa di alterazioni cromosomiche in cellule somatiche.

1.2 Test della Cometa in *Vicia faba*

1.2.1 Principio

La presenza di sostanze genotossiche provoca delle rotture in uno o entrambi i filamenti della struttura elicoidale del DNA. Al crescere dell'intensità del danno prodotto si ha un incremento nel numero delle rotture ed una diminuzione della dimensione dei frammenti ottenuti. Poiché la capacità delle molecole di DNA sottoposto ad un campo elettroforetico di migrare verso l'anodo è funzione sia della loro dimensione che del numero dei frammenti, si hanno delle figure, chiamate "Comete", costituite da una testa e da una coda la cui lunghezza risulta direttamente proporzionale all'entità del danno indotto.

1.2.2 Materiali

Semi di *Vicia faba* (varietà *minor*) di recente acquisto (comunque non più di un anno).

Vaschette di alluminio.

Vetrini porta e coprioggetto.

Materiale di comune uso di laboratorio.
Azoto liquido.
Tubi da centrifuga
Suolo sabbioso (come da indicazioni nel test 1).
Filtri in nylon (80 mm mesh).

1.2.3 Reagenti

Ficoll (tipo 400)
Destrano T-40
Tampone Tris-HCl (pH 8.5)
MgCl₂
Mercaptoetanololo
Triton X-100
Glicerolo
Saccarosio
Percoll
Na₂EDTA
NaCl
Dimetilsulfossido
NaOH
Bromuro di Etidio
Agarosio a normale punto di fusione
Agarosio a basso punto di fusione
Sodio ipoclorito
Apparecchiature indispensabili
Microscopio ottico con accessorio per lettura in fluorescenza a 200 ingrandimenti.
Cella climatica per il controllo della temperatura e dell'umidità.
Centrifuga
Omogenizzatore.
Refrigeratore a -80°C.
Piaccametro.
Apparecchiatura per elettroforesi.

1.2.4 Procedimento

Si seminano 50 semi dell'organismo test (*Vicia faba* var. *minor*) in 500 grammi di un suolo sabbioso (contenuto in sabbia >90 % e bassissimo tenore in colloidali organici ed argillosi) arricchito con differenti dosi del compost da saggiare ed aggiunta di 120 ml di acqua. I campioni vegetali vengono conservati in camera climatica a 20 °C ± 1 per 72 - 96 ore. In alternativa, si pongono 50 piantine di quattro giorni per due ore a contatto con estratti del compost in esame.

Le radici vengono, in seguito, tagliate ed immerse in azoto liquido. Dopo l'evaporazione di quest'ultimo, ai pezzi di radice viene aggiunto il tampone Honda, si omogenizza, si filtra, si centrifuga a 5000 rpm per 5 minuti e si risospende il precipitato in tampone Honda. 5 ml della sospensione vengono posti in un tubo da 30 ml riempito dal fondo alla superficie con quattro strati di 4 ml di saccarosio al 68.4%, e di Percoll all'80, 60 e 40% rispettivamente. I tubi vengono nuovamente centrifugati a 5000 per 30 minuti: i nuclei sono localizzati tra lo strato di saccarosio e quello all'80% di Percoll. Gli strati superiori vengono successivamente rimossi e la frazione nucleare viene lavata con una soluzione contenente saccarosio 0.4M, tampone Tris-HCl 50 mM (pH 8.5) e MgCl₂ 5 mM. Si centrifuga a 5000 rpm per 5 minuti e si risospende il precipitato in una sospensione tampone contenente 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM Mg Cl₂ e 50% glicerolo. Tale sospensione va conservata a - 80 °C fino al momento della prova. In seguito, la sospensione nucleare viene miscelata con una soluzione allo 0.5% di agarosio (2 ml di sospensione in 100 ml di agarosio) e posta su di un vetrino da portaoggetti sopra ad uno strato di agarosio all'1% e ricoperta con 100 ml di agarosio allo 0.5%. I vetrini sono, poi, im-

mersi in una soluzione ad attività litica a pH 10 (2.5 M di NaCl, 100 mM di Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% di laurilsarcosina sodica, 1% di Triton X-100 e 10% di DMSO) e mantenuti per almeno 1 h a 4 °C per consentire la lisi dei nuclei e l'apertura del DNA. Dopo la lisi viene effettuata l'elettroforesi con un tampone a pH 13 per 40 minuti per consentire l'espressione dei siti sensibili agli alcali. Dopo la lisi, i vetrini sono posti per 40 minuti in una camera elettroforetica con un tampone a pH 13 (300 mM NaOH e 1 mM Na₂EDTA). L'elettroforesi viene condotta per 10 minuti a 1 V/cm e 300 mA. Dopo l'elettroforesi i vetrini sono sciacquati con un tampone a pH 7.5 (0.4 M Tris-HCl) per 15 minuti a temperatura ambiente. Il DNA viene colorato con bromuro di etidio, sciacquato due volte con acqua distillata e coperto con un vetrino coprioggetto. I preparati sono, infine, osservati con un microscopio a fluorescenza a 200 ingrandimenti con un filtro di eccitazione a 515-560 nm ed un filtro barriera a 590 nm e l'entità della migrazione del DNA viene determinata ("Comete") con un sistema di analisi di immagine (50 cellule per punto sperimentale).

1.2.5 *Letture, elaborazione, espressione ed interpretazione dei risultati*

La lettura può essere effettuata attraverso un microscopio ottico a fluorescenza, ma è raccomandato l'uso di un sistema di analisi di immagine computerizzato.

Si consiglia la lettura di almeno 50-100 cellule per punto sperimentale. Per ogni cometa si possono misurare la lunghezza della coda (dal centro del nucleo) e la percentuale di DNA migrato.

I valori ottenuti sono analizzati attraverso analisi della varianza, utilizzando il test della t di Student presente in tutti gli svariati pacchetti statistici disponibili in commercio (SPSS, Statgraphics, SAS etc.).

1.2.6 *Osservazioni*

Il test della Cometa può teoricamente essere applicato in tutte le cellule eucariotiche, comprese quelle umane, e consente di evidenziare diversi tipi di danni al DNA, quali rotture dei filamenti, alterazione delle funzioni di riparo e siti sensibili agli alcali. Tale test è stato recentemente applicato per evidenziare la presenza di diossina nei suoli utilizzando come organismo test i lombrichi, analizzando i danni al DNA di particolari cellule (celomociti).

1.3 **Test degli Scambi tra Cromatidi Fratelli - SCEs**

1.3.1 *Principio*

In presenza di sostanze mutagene è stato osservato un incremento nello scambio di materiale genetico tra cromatidi fratelli.

1.3.2 *Materiali*

Semi di *Vicia faba* (varietà *minor*) di recente acquisto (comunque non più di un anno).

Vaschette di alluminio.

Vetrini porta e coprioggetto.

Vaschette con supporti specifici per l'effettuazione dei lavaggi dei vetrini.

Materiale di comune uso di laboratorio.

Suolo sabbioso (come da indicazioni nel test 1).

Apparecchiature indispensabili

Microscopio ottico.

Cella climatica per il controllo della temperatura e dell'umidità.

Strumentazione per la produzione del ghiaccio secco.

Bagnomaria termostato.

Piaccametro.

1.3.3 Reagenti

Alcool etilico 95°.
Acido acetico glaciale.
Acido cloridrico 1 N.
NaH₂PO₄
Cellulasi
Pectinasi
Colorante Giemsa

1.3.4 Procedimento

Si seminano 50 semi dell'organismo test (*Vicia faba* var. *minor*) in 500 grammi di un suolo sabbioso (contenuto in sabbia >90 % e bassissimo tenore in colloidali organici ed argillosi) arricchito con differenti dosi del compost da saggiare ed aggiunta di 120 ml di acqua. I campioni vegetali vengono conservati in camera climatica a 20 °C ± 1 per 72-96 ore. In alternativa, si pongono 50 piantine di quattro giorni per due ore a contatto con estratti del compost in esame. Trascorso tale periodo si procede, per entrambe le procedure sperimentali, al prelievo degli apici della radice primaria ed alla loro fissazione in una miscela di alcool etilico ed acido acetico 3:1 (v/v) per 3 ore. Dopo aver sciacquato, gli apici radicali sono digeriti in una miscela di cellulasi e pectinasi (2.5%) a 25 °C per 4-5 ore. Le cellule, in seguito, sono trattate in una soluzione ipotonica in acqua distillata per 1-3 ore e vengono raccolte con il fissativo; alcune gocce della sospensione così ottenuta sono poste su di un vetrino e seccati alla fiamma. I vetrini sono conservati per 7 giorni, trattati con una soluzione di NaH₂PO₄ 1 M (pH 8.0) a 87 °C per 8 minuti, sciacquati con acqua, colorati con la soluzione Giemsa al 3% ed osservati per la presenza di scambi tra cromatidi fratelli.

1.3.5 Lettura, elaborazione, espressione ed interpretazione dei risultati

Per ogni punto sperimentale dovranno essere osservate almeno 50 metafasi. I dati ottenuti sono analizzati attraverso analisi della varianza, utilizzando uno degli svariati pacchetti statistici disponibili in commercio (SPSS, Statgraphics, SAS etc.). Come per i micronuclei, risulta sovente opportuno condurre l'elaborazione statistica sulla radice quadrata dei dati originali, al fine di ridurre le disomogeneità delle varianze.

Come nei tests precedenti, la comparsa di differenze significative nella frequenza di SCE tra i campioni trattati ed i controlli (si consiglia di utilizzare un p<0.01) indica la presenza di attività genotossica da parte della biomassa in esame.

Con modifiche del tutto marginali nella fase di preparazioni delle zone meristematiche da osservare, tale metodica è applicabile anche ad altre specie vegetali, quali *Allium cepa* e *Secale cereale*.

Variazioni metodologiche più marcate sono, ovviamente, richieste per la sua applicazione a cellule animali. Si ritiene opportuno, quindi, fornire qui di seguito alcuni dettagli per l'applicazione di questa tecnica a linfociti umani.

0.3 ml di sangue venoso sono aggiunti a 5 ml di un terreno di coltura a pH 7.0, comprendente 52.0 mg di RPMI 1640, 1 ml di siero di fetto di vitello, 0.3 mg di PHA e 0.1 ml di NaHCO₃ al 5%. La miscela viene incubata per 24 ore e, in seguito, addizionata con idonee quantità del composto da saggiare (o di un suo estratto) per 72 ore. Alle cellule vengono, poi, aggiunti 0.8 mg/ml di colchicina per 2 ore. Tutto il periodo di incubazione deve essere condotto a 37 °C al buio. Trascorso tale periodo, le cellule vengono raccolte tramite centrifugazione (1000 rpm per 10 minuti) e risospese in una soluzione 0.075 M di KCl, ricentrifugate e fissate in metanolo ed acido acetico (3:1 v/v). Alcune gocce della sospensione sono poste su di un vetrino, che viene lasciato seccare all'aria. Dopo 7 giorni, i vetrini sono sciacquati con acqua e colorati con una soluzione di Giemsa al 3%.

1.3.6 Osservazioni

Il test degli SCEs è generalmente considerato uno dei test citogenetici per la determinazione di

danni al DNA indotti da un largo spettro di mutageni ambientali. La possibilità di una sua applicazione a cellule animali lo rende, certamente, molto ricco di informazioni se lo scopo finale è quello di valutare eventuali danni nell'uomo. Va tenuto presente, però, che la conduzione di prove su cellule animali presenta maggiori difficoltà (basti pensare, ad esempio, alle condizioni di sterilità che vanno mantenute durante l'arco della prova) e questo consiglia la loro applicazione solo in caso di fondati sospetti che il composto in esame presenti caratteristiche di genotossicità.

2. METODOLOGIE PER LA VALUTAZIONE DELLA FITOTOSSICITÀ

Per una più completa caratterizzazione della qualità dei compost, risulta di indubbia utilità affiancare ad uno o più dei tests in precedenza descritti almeno un altro che consenta di valutare la fitotossicità del prodotto in esame. Questa necessità nasce, oltre che dall'esigenza di acquisire un più completo quadro ecotossicologico, dall'osservazione che condizioni di stress possono provocare dei falsi positivi nei tests di genotossicità (forse attraverso un incremento della produzione di radicali liberi). Dunque, per essere completamente affidabile un test di genotossicità deve essere condotta in assenza di significativi effetti tossici.

Qui di seguito vanno riportati alcuni metodi utilizzati nella valutazione della fitotossicità dei compost, compreso quello generalmente da noi abbinato ai tests di genotossicità in *Vicia faba*.

2.1 Test di Accrescimento in *Lepidum sativum*

Il presente test è riportato in: IPLA, DIVAPRA, ARPA "Metodi di Analisi dei compost", Torino, 1998.

2.1.1 Principio

Valutazione dell'accrescimento della pianta test su una miscela del campione in esame con un substrato composto da sabbia e torba.

2.1.2 Materiali

- Contenitori tondi da due litri.
- Torba bionda basificata a pH 6.5 con calce idrata
- Sabbia silicea.
- Argilla espansa.
- Perlite.
- Semi di *Lepidum sativum*.

2.1.3 Procedimento

Si miscelano la sabbia e la torba nel rapporto 1:1 (v/v) e ad esse si aggiungono le differenti dosi del campione che si intendono esaminare (vengono consigliate almeno due dosi pari a 75 e 150 g di sostanza secca /litro di substrato). Le prove vanno condotte in triplice.

Le miscele così ottenute vengono poste in vasi da due litri aventi, sul fondo, uno strato di un cm di argilla espansa, al fine di garantirne il drenaggio e ricoperte con uno strato di un cm di sabbia per garantire la germinazione dei semi.

Si passa, poi, alla semina dell'organismo test: il numero dei semi deve essere tale da garantire la germinazione di almeno 100 semi/vaso. I semi vengono, infine, ricoperti con uno strato di perlite dello spessore di un cm.

Dopo 21 giorni, le piantine vengono tagliate al colletto, al fine di determinarne la produzione, calcolata sul peso secco.

L'Indice di Accrescimento Gm (alle diverse dosi di impiego) viene calcolato sulla base della formula seguente:

$$Gm \% = Gc/Gt \times 100$$

Dove:

Gc = Produzione media delle tre repliche di ognuna delle dosi di compost.

Gt = Produzione media delle tre repliche del testimone.

2.2 Test di Germinazione in *Lepidum sativum*

Il presente test è riportato in: IPLA, DIVAPRA, ARPA "Metodi di Analisi dei compost", Torino, 1998.

2.2.1 Principio

Valutazione dell'effetto di un estratto acquoso del compost in esame sulla germinazione della pianta test.

2.2.2 Materiali

- Capsule Petri Ø 90 mm.
- Carta da filtro extrarapida Ø 80 mm.
- Membrane sterilizzanti Ø 0.8 m.
- Semi di *Lepidum sativum*.
- Apparato da filtrazione sotto pressione.

2.2.3 Procedimento

Il campione da saggiare (200 g) viene portato ad un'umidità pari all'85% e lasciato per due ore a contatto con l'acqua aggiunta. Si centrifuga a 6000 rpm per 15 minuti ed il surnatante viene, poi, filtrato sotto pressione a 3.5 atm. con membrana sterilizzante. L'estratto acquoso viene diluito fino ad una concentrazione del 75 e 50 %. Cinque aliquote di un ml ciascuna di ognuna dei due campioni ottenuti (più altrettanti controlli con acqua) vengono poste in Capsule di Petri contenenti carta bibula. In ogni capsula vengono aggiunti 10 semi di *Lepidum sativum*, fatti rigonfiare per un'ora in acqua distillata. Le capsule sono poste ad incubare a 27 °C per 24 ore.

Trascorso tale periodo, si contano i semi germinati e si misura la lunghezza radicale.

L'Indice di Germinazione (I_g) viene calcolato come segue:

$$I_g \% = (G_c \times L_c / G_t \times L_t) \times 100$$

Dove:

G_c = n° medio dei semi germinati nel campione

G_t = n° medio dei semi germinati nel testimone

L_c = lunghezza radicale media nel campione

L_t = lunghezza radicale media nel testimone

2.3 Test dell'Allungamento della radice primaria in *Vicia faba*

2.3.1 Principio

Si valuta la presenza di fitotossine attraverso la riduzione (rispetto al controllo) della lunghezza della radice primaria in piantine di *Vicia faba* trattate con differenti dosi di compost per 96 ore su un suolo sabbioso.

2.3.2 Materiali

- Semi di *Vicia faba* (varietà *minor*) di recente acquisto (comunque non più di un anno).
- Vaschette di alluminio.
- Materiale di comune uso di laboratorio.
- Cella climatica per il controllo della temperatura e dell'umidità.

2.3.3 Procedimento

Si seminano 25 semi dell'organismo test (*Vicia faba* var. *minor*) in 500 grammi di un suolo sabbioso (contenuto in sabbia >90 % e bassissimo tenore in colloidali organici ed argillosi) arricchito con differenti dosi del compost da saggiare ed aggiunta di 120 ml di acqua. I campioni vegetali vengono conservati in camera climatica a 20 °C ± 1 per 96 ore. Trascorso tale periodo, si procede al prelievo della radice primaria di tutte le piantine ed alla misura della sua lunghezza. Per ogni punto sperimentale vanno preparate due vaschette (50 semi).

Le medie ottenute (considerando entrambe le repliche) per i singoli trattamenti vanno confrontate con quelle dei controlli (aggiunta di sola acqua deionizzata), mediante analisi della varianza (ANOVA) per $p < 0.05$, oppure $p < 0.01$, a seconda del grado di sicurezza che si desidera raggiungere. I confronti multipli si possono condurre, utilizzando uno dei tanti tests disponibili nei pacchetti statistici (Duncan, LSD, Tukey etc.).

2.4 Saggio biologico di compatibilità agronomica: Test di vegetazione con *Lactuca sativa*. Il metodo descritto ha lo scopo di saggiare la fitocompatibilità e l'attitudine agronomica di sottoprodotti, ovvero residui e matrici organiche di scarto, liquidi o solidi, di cui si ipotizza il recupero agricolo. Il metodo è quello proposto e utilizzato dal Dipartimento di Fisiologia delle Piante Coltivate e Chimica Agraria dell'Università di Milano (Direttore Prof. P.L. Genevini) ed è descritto in Astori, 1998.

2.4.1 Principio

Il metodo si basa sulla valutazione della produzione di biomassa epigea realizzata da parte di piante di lattuga in presenza di dosi crescenti, di un dato sottoprodotto o biomassa di scarto, applicate ad un opportuno substrato di crescita.

Il disegno sperimentale prevede la miscelazione, a concentrazioni crescenti (6-10 dosaggi), della sostanza test in un substrato suolo-simile; nelle miscele ottenute vengono allevate delle plantule di lattuga per un periodo prestabilito; per ciascun dosaggio vengono allestite 4 repliche; alla fine del periodo di crescita la parte epigea delle piante viene tagliata e pesata; le produzioni rilevate ai diversi dosaggi vengono confrontate statisticamente con quelle ottenute da piante cresciute sul solo substrato (controllo). Le differenze statisticamente significative sono indicative dell'effetto del prodotto testato.

2.4.2 Materiali e reagenti

- Substrato di crescita (Caratteristiche in Scheda 1)

Preparazione di 10 kg di substrato suolo-simile (ovvero preparazione per 40 vasi da 250 g). In un recipiente, da circa 30 l, pesare 400 ml di acqua deionizzata e 150 g di torba. Coprire la sospensione con uno strato di 8750 g di sabbia; attendere circa 10 minuti in modo tale che torba e sabbia siano imbibite e successivamente mescolare; aggiungere 900 g di argilla e 200 g di suolo agrario; mescolare nuovamente fino ad ottenere una miscela omogenea.

- Soluzione fertilizzante concentrata

Per la fertilizzazione (corrispondente a 25 kg/ha di N, 12.5 kg/ha di P₂O₅ e 30kg/ha di K₂O): pesare 0.115g di Ca(H₂PO₄)₂, 0.655 g di (NH₄)₂SO₄, 0.308 g

di K_2SO_4 in un matraccio da 1000 ml; sciogliere con circa 700 ml di acqua deionizzata e portare a volume.

La soluzione fertilizzante preparata è sufficiente per fertilizzare 25 kg di substrato (ovvero 100 vasi contenenti 250 g di substrato).

Distribuire 10 ml di soluzione in ciascun vaso contenente 250 g di substrato suolo-simile (40 ml/kg substrato).

- Specie vegetale utilizzata

Lactuca sativa L. cv Augusta. Consigliati i semi confettati.

- Germinatoio

Disporre nella bacinella uno strato di sabbia di circa un centimetro (circa 1500 g di sabbia). Imbibire con acqua deionizzata e distribuire i semi confettati (distanza tra semi circa 0.5 cm x 1 cm); coprire i semi con poca sabbia fino a completa copertura degli stessi e coprire la bacinella con film plastico per evitare perdite per evaporazione. Riporre la bacinella al buio per 48 h: all'emissione dei cotiledoni porre la bacinella alla luce. Attendere la formazione della prima foglia vera prima del trapianto.

2.4.3 Strutture ed apparecchiature

Sono necessarie per la conduzione del saggio le seguenti apparecchiature e strutture:

- serra (o fitotrone o camera di crescita), bilancia analitica e bilancia tecnica, stufa.
- contenitori non porosi (vasi in materiale plastico cilindrici di circa 300 ml sprovvisti di buchi): da 24-40 per ciascun test;
- una serie di bicchieri in materiale plastico di circa 1000 ml e 5000 ml;
- 1 bacinella in materiale plastico (es.: 40 cm x 30 cm x 8 cm);
- 1 contenitore in materiale plastico da 30 l;
- computer con software statistico e (facoltativo) di interpolazione dati.

2.4.4 Procedimento

- Analisi preliminari

Nel caso di sottoprodotti solidi deve essere determinato il contenuto in sostanza secca del sottoprodotto.

- Preparazione dosaggi

Devono essere previsti come minimo sei dosaggi (compreso il testimone).

I dosaggi vengono scelti in funzione della tipologia del sottoprodotto da saggiare (fanghi e compost):

- per i fanghi le dosi devono essere comprese tra 0 e 3,33 g di s.s./kg di substrato;
- per i compost tra 0 e 15 g di s.s./kg di substrato.

I dosaggi possono essere convenientemente espressi in q/ha di sostanza secca o di prodotto tal quale in modo da facilitare la trasferibilità dei risultati del test alla realtà di pieno campo. Per esprimere i dosaggi in q/ha e t/ha di sostanza secca moltiplicare il dosaggio (g/kg) rispettivamente per 45,3 e 4,53. Per esprimere i dosaggi in q/ha di prodotto tal quale moltiplicare il dosaggio (g/kg) per il rapporto (4530/%s.s.)

- Allestimento del test

Si opera nel modo seguente per ciascuna dose (4 vasi): pesare 1000 g di substrato standard, preparato come indicato in 2.4.2; aggiungere il sottoprodotto nella quantità prevista dal disegno sperimentale per i quattro vasi; la miscela ottenuta viene ripartita esattamente, mediante pesata, nei quattro vasi; Per i quattro vasi della dose 0 (controllo) al substrato standard non viene aggiunto sottoprodotto.

Tutti i vasi vengono fertilizzati con la soluzione nutritiva preparata come indicato in 2.4.2 (10 ml/vaso). Si procede con il trapianto delle plantule di lattuga (tre per ciascun vaso) prelevate dal germinatoio. Dopo 14-21 gg dal trapianto si effettua, separatamente per ciascun vaso, la raccolta, mediante taglio al colletto, della parte aerea delle piante; si determina il peso fresco e, dopo essiccazione a 105 °C, il peso secco (peso/vaso).

- Condizioni del biosaggio

Temperatura e luce devono essere scelte e mantenute per tutto il periodo di prova al fine di ottimizzare le condizioni di crescita delle piante (ad es.: 16 ore di luce, 8 di buio; 25 °C giorno, 16 °C notte). Le perdite di acqua per evapotraspirazione devono essere compensate, giornalmente, mediante l'aggiunta di acqua deionizzata.

- Trattamento dei risultati

I dati relativi al peso fresco e secco di ciascun vaso vengono elaborati per determinare, per ciascuna dose, il peso medio (fresco e secco in mg/vaso) e la deviazione standard. Successivamente si esegue l'ANOVA e sulle medie un test di confronto statistico. I risultati così elaborati devono essere:

- riportati in forma tabulare affiancando ai dati medi relativi a ciascuna dose lettere indicanti le differenze significative
- rappresentati graficamente in un diagramma di andamento dose-effetto dove in ascissa si riportano le dosi (esprese in g/kg o q/ha) e in ordinata le produzioni.

2.4.5 Interpretazione dei risultati e giudizio di idoneità

I risultati sono riconducibili a questi tre casi:

1. le produzioni medie (fresche e/o secche) dei trattamenti sono tutte o in parte significativamente inferiori a quelle del testimone;
2. sono evidenti nella parte epigea modificazioni nella morfologia e nel portamento (necrosi, accartocciamenti, etc.)
- b) più della metà delle produzioni medie (sia fresche che secche) sono significativamente superiori a quelle del testimone e solo le produzioni relative ai dosaggi più elevati risultano uguali o inferiori a quelle del testimone.
- c) le produzioni medie (fresche e/o secche) dei trattamenti sono tutte o in parte uguali e/o significativamente superiori a quelle del testimone.

Relativamente alle tre categorie sopra menzionate il giudizio di idoneità può essere espresso nei termini seguenti:

- a) Il prodotto induce effetti avversi sulla crescita delle piante. Non si ritiene idoneo all'utilizzo agricolo.
- b) Il prodotto non induce effetti avversi sulla crescita delle piante e ha indotto significativi incrementi di produzione sino alla dose corrispondente alla massima produzione rilevata, indicando in tal modo una sua valenza concimante. Alle dosi successive si rileva una riduzione di crescita imputabile, verosimilmente, ad un eccesso di nutrienti.
- c) Il prodotto non induce effetti avversi sulla crescita delle piante. Il prodotto si ritiene idoneo all'utilizzo agricolo.

Il valore agronomico o attitudine concimante del prodotto è funzione degli incrementi indotti.

**METODI ECOTOSSICOLOGICI PER LA CARATTERIZZAZIONE
DI DIVERSE CLASSI DI QUALITÀ DI COMPOST**

Scheda 1 - Substrato di crescita per il test di vegetazione con *Lactuca sativa* (da Marino et al., 1993)

Composizione:	
Componente	% in peso
Sabbia	87.5
Argilla	9
Terreno	2
Torba	1.5
Caratteristiche componenti:	
Sabbia	quarzifera lavata e vagliata, di granulometria 0.5-0.8 mm a reazione neutra.
Argilla	Bentonite calcica naturale, a reazione neutra setacciata a 1 mm; capacità di scambio cationica: 65 meq/100g; composizione percentuale del complesso di scambio: sodio 1%, potassio 0.5%, magnesio 20%, calcio 78%.
Torba	Bionda di sfagno
Terreno	Agrario franco a reazione neutra; setacciato a 2 mm e conservato umido a circa il 60% della capacità idrica massima a 4 °C contenuto in sostanza organica 1.8-2.2%, C.S.C. 12-22 meq/100 g.
Caratteristiche chimiche del substrato:	
pH	6±0.5
C.S.C. meq/100g	8±1.0
Cationi sul complesso di scambio (%):	
Calcio	58.0±5
Idrogeno	25.0±2
Magnesio	14.0±1
Sodio	1.6±0.5
Potassio	0.9±0.1
Conducibilità (ms/cm, 25°C)	57.0±5
Densità apparente	1.51 g/cm ³

Bibliografia

- Adler, I.D. (1988). A review of the coordinate research effort on the comparison of test system for the detection of mutagenic effects, sponsored by the E.E.C. *Mutation Res.*, 74, 77-93.
- Baud-Grasset S., Baud-Grasset F., Bifulco J.M., Meier J.R., Ma T.H. (1993). Reduction of genotoxicity of a creosote-contaminated soil after fungal treatment determined by the Tradescantia-micronucleus test. *Mutation Res.* 303, 77-82.
- Combes R.D. (1992). Genotoxicity testing: recent advances and future trends. *Chem. Indust.*, 24, 950-954.
- Cortés F., Escalza P., Mateos and M. Diaz-Recasens. Factors affecting the production of SCEs by maleic hydrazide in root-tip chromosomes of *Allium cepa*. *Mutation Res.*, 192, 125-130.
- De Flora S., Bagnasco M. and Zancacchi P. (1991). Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. (1991). *Mutation Res.* 258, 285-320.
- De Marco A, De Simone C., Raglione M., Lorenzoni P. (1995). Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*. *Mutation Res.*, 344, 5-12.
- De Simone C., Piccolo A., De Marco A. (1992): Genotoxic effect induced by herbicides atrazine and glyphosate in plants of *Vicia faba* grown in different soils. *The Sci. of the Total Environ.*, 123-124, 233-240.
- Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Res.*, 339, 37-59.
- IPLA, DIVAPRA, ARPA "Metodi di Analisi dei compost", Torino, 1998.
- Koppen G., Verschaeve L. (1996). The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Res.*, 360, 193-200.
- Ma, T.H. (1982). *Vicia faba* cytogenetic tests for environmental mutagens - A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 99, 257-271.
- Patra J., Panda K.K., Panda B.B. (1997). Differential induction of adaptative responses by paraquat and hydrogen peroxide against the genotoxicity of methyl mercuric chloride, maleic

- hydrazide and ethyl methane sulfonate in plant cells in vivo. *Mutation Res.*, 393, 215-222.
13. Schvatzman J.B. and Cortés F. (1977). Sister Chromatid exchanges in *Allium cepa*. *Chromosoma*, 62, 119-131.
14. Shane B.S., Gutenman W.H. and Lisk D.J. (1993). Variability over time in the mutagenicity of ashes from municipal solid-waste incinerators. *Mutation Res.* 301, 39-43.
15. Smaka-Kinel V., Stegnar P., Lovka M., Toman M. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Res.*, 368, 171-179.
16. Zhang Z., Yang J., Zhang Q., Cao X.. (1991). Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents. *Mutation Res.*, 261, 69-73.

3. PROPOSTA DI UN PROTOCOLLO SPERIMENTALE PER LA VALUTAZIONE DELL'EVENTUALE GENOTOSSICITÀ DI UN COMPOST IN UN SISTEMA SUOLO-PIANTA

3.1 Valutazione della genotossicità

A completamento di quanto in precedenza riportato, viene qui di seguito illustrato un protocollo sperimentale teso a determinare gli eventuali effetti genotossici in piantine di *Vicia faba* di differenti dosi di compost aggiunto ad un suolo a basso tenore in colloidali organici ed argillosi.

3.1.1 Principio

La presenza di sostanze mutagene nel campione da esaminare provoca nelle cellule degli apici radicali di *Vicia faba* danni al DNA cromosomico, provocando il non corretto svolgimento del processo mitotico evidenziato dalla presenza di figure anafasiche irregolari o dalla presenza di frammenti di DNA extranucleari (micronuclei).

Preparazione del campione da saggiare:

Il campione di compost, usato sia tal quale che dopo estrazione, va conservato a -18 °C fino al momento dell'analisi.

Il suolo va seccato all'aria e setacciato a 2 mm. Va utilizzato un suolo a bassissimo tenore in colloidali argillosi e, soprattutto, organici per evitare che le interazioni che essi instaurano con la biomassa in esame mascheri eventuali fenomeni di genotossicità.

3.1.2 Materiali

Semi di *Vicia faba* (varietà *minor*) di recente acquisto (comunque non più di un anno).

Vaschette di alluminio.

Vetrini porta e coprioggetto.

Vaschette con supporti specifici per l'effettuazione dei lavaggi dei vetrini.

Materiale di comune uso di laboratorio.

Apparecchiature indispensabili

Microscopio ottico.

Cella climatica per il controllo della temperatura e dell'umidità.

Strumentazione per la produzione del ghiaccio secco.

Bagnomaria termostato.

Piaccametro.

3.1.3 Reagenti

Alcool etilico 95°.

Histolemon.

Acido acetico glaciale.

Balsamo del Canada.

Reattivo di Schiff.
Acido cloridrico 1 N.

3.1.4 Procedimento

Quando si vogliono saggiare differenti dosi di compost il problema principale consiste nel mantenere costante, rispetto alle corrispondenti prove in campo, il rapporto suolo/compost. Occorre, dunque, conoscere la densità del suolo che verrà sottoposto a trattamento e lo spessore ad esso interessato.

Qui di seguito verrà presentato un esempio caratterizzato dai seguenti parametri iniziali:

Densità dei suoli (campo e laboratorio): 1,2.

Spessore di suolo interessato al trattamento: 40 cm (in campo) 4 cm (in laboratorio).

Dosi di compost utilizzate: 0, 50, 100 e 600 t s.s. ha⁻¹.

Contenuto in s.s. del compost: 690 g /kg

100 semi di *Vicia faba* vengono seminati in miscele suolo/compost preparate secondo il seguente schema:

Dose di compost			
t s.s. ha ⁻¹	Dose di compost tal quale (g)	Rapporto compost/suolo (g/g)	Acqua da aggiungere (ml/vaschetta)
50	7,5	7,5 / 480	120
100	15	15 / 480	120
600	90	90 / 480	200

Il controllo va effettuato aggiungendo 110 ml di acqua a 480 g di suolo.

Le quantità di acqua da aggiungere, possono modificarsi in relazione alle caratteristiche del suolo usato nel test e vanno, quindi, preliminarmente definite. Comunque, lavorando con un suolo sabbioso, esse non dovrebbero discostarsi molto dai valori sopra riportati.

Ovviamente, al variare dei parametri sopra ricordati varieranno i valori riportati, a titolo di esempio, nella tabella precedente.

Dopo 5 giorni si prelevano le radici primarie, si misura la loro lunghezza (al fine di evidenziare eventuali effetti tossici) e si preparano gli apici per l'osservazione microscopica. A tale scopo si procede al prelievo degli apici della radice primaria ed alla loro fissazione in una miscela di alcool etilico ed acido acetico 3:1 (v/v). Dopo 24 ore si procede al trattamento con HCl 1 N per 8 minuti a 60 °C, si sciacqua con l'acqua e si aggiunge il reattivo di Schiff, lasciandolo agire per alcune ore (comunque non più di una notte). I vetrini vengono preparati per schiacciamento degli apici. I vetrini coprioggetto vengono, in seguito, fatti saltare con ghiaccio secco, fissati con ripetuti passaggi in Histolemon e Alcool Etilico al 95 % e resi permanenti con balsamo del Canada.

Si consiglia di non effettuare i tests di genotossicità in presenza di significativi effetti tossici. Pertanto è necessario applicare al test di genotossicità un test quale quello dell'allungamento della radice primaria atto a evidenziare la riduzione della lunghezza della radice primaria nelle piantine trattate, rispetto ai controlli.

Nello svolgimento del test di genotossicità è opportuno osservare almeno 10 apici e 2000 cellule per ogni apice.

L'elaborazione statistica dei risultati può essere condotta tramite la classica Analisi della varianza univariata e, solo in caso di differenze significative, si può ricorrere ad uno dei tanti test multirange (Duncan, Tukey, LSD etc.), per evidenziare l'eventuale livello di trattamento responsabile della significatività del test.

3.1.5 Considerazioni conclusive sull'interpretazione dei risultati

Come ricordato in precedenza, la comparsa di differenze significative (il livello di tale soglia va scelto in relazione al grado di protezione che si vuole mantenere) tra la frequenza di dan-

ni genotossici nei campioni trattati e quella nei controlli indica "di per sé" la presenza di una situazione che necessita di essere approfondita.

Non è possibile, per evidenti motivi sia pratici che teorici, fornire dei valori soglia dei differenti test, al di sopra dei quali scatti la presenza di effetti genotossici; questi, infatti, sono legati alle condizioni sperimentali, alla condizione fisiologiche del materiale vegetale (ad esempio età dei semi), alla normale variabilità dei sistemi biologici. L'unica strada percorribile risulta, a parere di chi scrive, una corretta elaborazione statistica dei risultati, che può derivare solamente da un ben studiato piano sperimentale. E', altresì, consigliabile nei casi dubbi (differenze non particolarmente marcate ed al limite della significatività) procedere ad ulteriori approfondimenti di carattere statistico, che vanno da un incremento delle osservazioni alla ricerca di eventuali "outliers", che, influenzando pesantemente la media, possono falsare l'interpretazione dei risultati.

3.2 Valutazione della Fitotossicità attraverso il test dell'allungamento della radice primaria

Per una più completa caratterizzazione della qualità dei compost, risulta di indubbia utilità affiancare al test in precedenza descritto almeno un altro che consenta di valutare la fitotossicità del prodotto in esame. Questa necessità nasce, oltre che dall'esigenza di acquisire un più completo quadro ecotossicologico, dall'osservazione che condizioni di stress possono provocare dei falsi positivi nei tests di genotossicità (forse attraverso un incremento della produzione di radicali liberi). Dunque, per essere completamente affidabile un test di genotossicità deve essere condotta in assenza di significativi effetti tossici.

Qui di seguito viene riportato come metodo utilizzabile nella valutazione della fitotossicità dei compost quello dell'allungamento della radice primaria.

3.2.1 Principio

Si valuta la presenza di fitotossine attraverso la riduzione (rispetto al controllo) della lunghezza della radice primaria in piantine di *Vicia faba* trattate con differenti dosi di compost per 96 ore su un suolo sabbioso.

3.2.2 Materiali

- Semi di *Vicia faba* (varietà *minor*) di recente acquisto (comunque non più di un anno).
- Vaschette di alluminio.
- Materiale di comune uso di laboratorio.
- Cella climatica per il controllo della temperatura e dell'umidità.

3.2.3 Procedimento

Si seminano 25 semi dell'organismo test (*Vicia faba* var. *minor*) in 500 grammi di un suolo sabbioso (contenuto in sabbia >90 % e bassissimo tenore in colloidali organici ed argillosi) arricchito con differenti dosi del compost da saggiare ed aggiunta di 120 ml di acqua. I campioni vegetali vengono conservati in camera climatica a 20 °C ± 1 per 96 ore. Trascorso tale periodo, si procede al prelievo della radice primaria di tutte le piantine ed alla misura della sua lunghezza. Per ogni punto sperimentale vanno preparate due vaschette (50 semi).

Le medie ottenute (considerando entrambe le repliche) per i singoli trattamenti vanno confrontate con quelle dei controlli (aggiunta di sola acqua deionizzata), mediante analisi della varianza (ANOVA) per $p < 0.05$, oppure $p < 0.01$, a seconda del grado di sicurezza che si desidera raggiungere. I confronti multipli si possono condurre, utilizzando uno dei tanti tests disponibili nei pacchetti statistici (Duncan, LSD, Tukey etc.).

