



*Ministero dell'Ambiente
e della Tutela del Territorio*
Servizio Difesa Mare

*Programma di monitoraggio per il controllo
dell'ambiente marino-costiero
(triennio 2001-2003)*

Metodologie analitiche di riferimento



ICRAM

CON LA COLLABORAZIONE DI ANPA



La realizzazione del volume delle Metodologie Analitiche di Riferimento è stata coordinata da **Anna Maria CICERO** (ICRAM, Roma) e **Irene Di GIROLAMO** (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio)

Gli autori, riportati anche in calce alla fine di ciascun contributo, sono:

Antonella AUSILI (ICRAM, Roma)
Nicola BIGONCIARI (CIBM, Livorno)
Lucia BONADONNA (Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma)
Giulio CATALANO (CNR, Istituto Talassografico di Trieste)
Anna Maria CICERO (ICRAM, Roma)
Alfonso Di MUCCIO (Laboratorio Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma)
Tania DOLCE (Università Tor Vergata, Roma)
Silvano FOCARDI (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena)
Franca FRASCARI (IGM-CNR, Bologna)
Eugenio FRESI (Università Tor Vergata, Roma)
Massimo GABELLINI (ICRAM, Roma)
Gioacchino GENCHI (Assessorato Territorio e Ambiente, Regione Sicilia)
Michele GIANI (ICRAM, Chioggia)
Mario INNAMORATI (Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Firenze)
Simone LUCAROTTI (CIBM, Livorno)
Chiara MACGI (ICRAM, Roma)
Luigi MANZUETO (ICRAM, Roma)
Carlo MERCURIALI (IGM-CNR, Bologna)
Roberto MORABITO (ENEA Casaccia, Roma)
Ornella NONNIS (ICRAM, Roma)
Fulvio ONORATI (ICRAM, Roma)
David PELLEGRINI (ICRAM, Roma)
Marina PULCINI (ICRAM, Roma)
Francesco REGOLI (Istituto Biologia e Genetica, Università di Ancona)
Maurizio RIBERA D'ALCALÀ (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)
Elena ROMANO (ICRAM, Roma)
Barbara SALIVA (CIBM, Livorno)
Vincenzo SAGGIOMO (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)
Andrea VALENTINI (Università di Modena e Reggio Emilia)
Claudia VIRNO LAMBERTI (ICRAM, Roma)
Tecla ZUNINI SERTORIO (Dip. Te. Ris, Università di Genova)

Hanno inoltre collaborato alla raccolta e revisione dei metodi, nonché al loro adattamento alle esigenze del piano di monitoraggio:

Stefano BATALONI (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – SDM)
Rosella BERTOLOTTO (ARPA Liguria)
Silvia BLASI (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – SDM)
Duilio BUCCI (ARPA Marche)
Marina CABRINI (Laboratorio di Biologia Marina, Trieste)
Gianna CASAZZA (ANPA)
Bruno CATALETTO (Laboratorio di Biologia Marina, Trieste)
Alessandra COMASCHI (Laboratorio di Biologia del Mare, Venezia)
Marisa DE LILLO (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – SDM)
Lucio DE MAIO (ARPA Toscana)
Manuela ERCOLESSI (ARPA Marche)
Emanuela FANELLI (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – SDM)
Carla Rita FERRARI (ARPA Emilia Romagna, Struttura Oceanografica Daphne-Cesenatico)
Michele GIANI (ICRAM, Chioggia)
Anna GHETTI (ARPA Emilia Romagna, Struttura Oceanografica Daphne-Cesenatico)
Elena GUERRERA (ICRAM, Roma)
Marisa IOZZELLI (Regione Toscana)
Tristano LEONI (ARPA Marche)
Erika MACALETTI (ICRAM, Roma)
Gloria MANARATTI (ARPA Liguria)
Maria Grazia MAZZOCCHI (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)
Mauro MECOZZI (ICRAM, Roma)
Luisella MILANI (Laboratorio di Biologia del Mare, Venezia)
Marinella POMPEI (Centro Ricerche Marine, Cesenatico)
Cecilia SILVESTRI (ANPA)
Emanuela SPADA (ANPA)
Benedetta TRABUCCO (ICRAM, Roma)
Leonardo TUNESI (ICRAM, Roma)
Paolo ZOTTI (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – SDM)

L'editing finale è stato curato da:

Chiara MACGI (ICRAM, Roma)
Ornella NONNIS (ICRAM, Roma)

Presentazione

Com'è noto, il Servizio Difesa Mare del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio svolge da circa 10 anni, ai sensi della legge 979/82 sulla tutela e difesa del mare, un'attività sistematica di monitoraggio delle acque marino-costiere italiane, in collaborazione con 14 Regioni costiere. I programmi messi a punto, predisposti per ottenere le conoscenze di base sugli ecosistemi marini, sono tesi a verificare lo stato di qualità delle acque marino-costiere da un punto di vista ambientale e non in funzione della salute pubblica, come avviene per esempio nel caso delle analisi per la balneazione.

I dati provenienti da queste ricerche sono a tutt'oggi gli unici che descrivono a livello nazionale la qualità di tali ambienti; pur tuttavia essi sono stati talvolta caratterizzati da una insufficiente omogeneità nelle metodologie analitiche utilizzate, che ha conseguentemente comportato delle notevoli difficoltà nella elaborazione complessiva dei dati. Per tale motivo, nel pianificare il nuovo Programma di Monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003) ufficialmente iniziato il 4 giugno 2001, si è ritenuto necessario fornire agli operatori metodiche analitiche di riferimento, affinché tutti gli esami vengano eseguiti con gli stessi protocolli.

Dal momento che per le acque marine non esistono metodi analitici ufficiali, si è ritenuto necessario raccogliere, con il supporto tecnico-scientifico dell'ICRAM, dei metodi di riferimento; questi sono stati successivamente discussi e revisionati con i tecnici dei laboratori coinvolti nel Programma di Monitoraggio.

Il risultato di tali iniziative è rappresentato dal presente volume, che nasce da un confronto reale tra le strutture centrali e gli organismi tecnici periferici operanti sul mare e che è frutto delle sinergie tra approcci, culture ed esperienze differenti.

L'auspicio è che questa pubblicazione contribuisca ad alimentare il patrimonio comune in termini di conoscenza e valutazione della qualità degli ambienti marini lungo il perimetro costiero italiano. Infatti solo tenendo costantemente sotto controllo il mare, punto di arrivo finale di tutti i fattori di inquinamento, sarà possibile definire adeguatamente ed attuare le politiche di risanamento e valorizzazione delle zone costiere italiane.

Renato Grimaldi

*Direttore Generale Servizio Difesa Mare
del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio*

Presentazione

L'insieme dei metodi raccolti in questo volume ha lo scopo di uniformare e rendere comparabili le misure e le analisi riguardanti i piani regionali di monitoraggio del sistema marino-costiero.

In applicazione all'articolo 3 della L. 979/82 (Interventi per la difesa del mare), da oltre dieci anni vengono eseguite attività routinarie di controllo definite da precisi strumenti convenzionali tra Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio (Servizio Difesa Mare) e Regioni. Gli accordi stipulati prevedono, oltre alla definizione delle specifiche tecniche da adottare, la messa a disposizione delle risorse finanziarie necessarie allo svolgimento dei piani di monitoraggio. Tale partecipata "simbiosa" ha nel tempo consentito il controllo dello stato di qualità della fascia di mare strettamente costiera e la raccolta di una importante mole di dati e informazioni la cui elaborazione, realizzata dall'ICRAM in collaborazione con il Servizio Difesa Mare, ha consentito una prima definizione spaziale e temporale delle principali condizioni fisico-chimiche dei livelli di trofia e degli inquinanti misurati.

Al valore di tali conoscenze può essere attribuito anche un significato storico, soprattutto se si considera che tale progetto ha per la prima volta consentito la realizzazione di una rete di controllo nazionale che, pur avendo nella fase iniziale assunto un taglio sperimentale e di collaudo, si è in breve tempo consolidata assumendo la forma di una vera e propria rete di monitoraggio.

La recente promulgazione del D.L. 152/99 (Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento) ha ulteriormente affinato i criteri attuativi del piano di monitoraggio, introducendo importanti innovazioni sia di tipo operativo che di carattere generale. Il nuovo piano che ad esso si è ispirato presenta minori rigidità, in quanto commisurato alle diverse condizioni idrografiche, biologiche ed antropiche (in termini di impatto) delle singole realtà regionali. Affronta inoltre nuove materie di indagini quali l'ecotossicologia e l'uso di indicatori biologici che possono fornire utili integrazioni interpretative sullo stato di qualità ambientale del sistema marino-costiero, costituendo altresì le basi per la realizzazione di attività formative e la definizione di esercizi di intercalibrazione.

Il significato ultimo di questo approccio consiste nell'uniformare le procedure per ridurre il margine di errore e affermare la necessità di una azione sinergica di reale collaborazione tra le parti coinvolte.

Lo stile editoriale adottato è quello manualistico, consistente nella raccolta modulare delle metodiche e delle procedure da adottare sia durante le crociere che nei laboratori a terra.

Come è noto agli operatori, si tratta di materia caratterizzata da significativi momenti evolutivi. Sarà cura dell'ICRAM provvedere all'aggiornamento periodico dell'opera tramite l'invio di schede aggiuntive e integrative.

Attilio Rinaldi
Direttore Generale dell'ICRAM



Indice

Il Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero 2001-2003
Valutazione ed elaborazione del dato analitico

ACQUA

SCHEDA 1	Campionamento
SCHEDA 2	Impiego della sonda multiparametrica
SCHEDA 3	Disco di Secchi
SCHEDA 4	Ortofosfati
SCHEDA 5	Nitriti
SCHEDA 6	Nitrati
SCHEDA 7	Ammoniaca
SCHEDA 8	Silicati
SCHEDA 9	Azoto e fosforo totali
SCHEDA 10	Mesozooplankton
SCHEDA 11	Fitoplancton

BENTHOS

SCHEDA 1	Analisi delle comunità bentoniche di fondi mobili in ambiente marino
SCHEDA 2	Studio della <i>Posidonia oceanica</i>

BIOACCUMULO IN BIVALVI

SCHEDA 1	Utilizzo dei molluschi bivalvi nel programma di monitoraggio dell'ambiente costiero (<i>Protocollo Mussel Watch</i>)
SCHEDA 2	Raccolta e preparazione dei molluschi
SCHEDA 3	Analisi dei composti organoclorurati
SCHEDA 4	Analisi di tributilstagno (TBT), dibutilstagno (DBT) e monobutilstagno (MBT)
SCHEDA 5	Analisi di idrocarburi policiclici aromatici
SCHEDA 6	Analisi del contenuto di alcuni elementi chimici in <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Zn)



SEDIMENTI

SCHEDA 1	Campionamento
SCHEDA 2	Analisi del contenuto d'acqua
SCHEDA 3	Analisi delle caratteristiche granulometriche
SCHEDA 4	Analisi di carbonio totale e organico (Metodo Analizzatore Elementare)
SCHEDA 5	Analisi della sostanza organica
SCHEDA 6	Analisi di spore di clostridi solfitoriduttori
SCHEDA 7	Analisi del tributilstagno (TBT)
SCHEDA 8	Analisi dei composti organoclorurati
SCHEDA 9	Analisi degli idrocarburi policiclici aromatici
SCHEDA 10	Determinazione del contenuto di alcuni elementi chimici nei sedimenti marini (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Zn)
SCHEDA 11	Applicazione di saggi biologici su sedimenti marini

APPENDICI

APPENDICE 1	Metodo per la determinazione di composti organostannici in sedimenti e matrici biologiche tramite GC-MS e GC-FPD
APPENDICE 2	Valutazione della tossicità naturale nel saggio Microtox [®] in fase solida: la normalizzazione pelitica



Il Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero 2001-2003

In Italia l'attività di monitoraggio dell'ambiente marino-costiero è stata finora condotta in riferimento ai dettati della legge 979/82. Inizialmente finalizzata alla conoscenza dello stato degli ecosistemi marini-costieri e al controllo dell'eutrofizzazione e condotta attraverso il monitoraggio delle acque e dei bivalvi, tale attività si è finora esplicata attraverso l'analisi di alcuni parametri chimici, fisici e microbiologici. L'emanazione delle più recenti normative nazionali ed internazionali in materia di monitoraggio dell'ambiente marino-costiero hanno, oggi, portato alla definizione di una strategia di monitoraggio più complessa per ciò che attiene la selezione dei comparti di indagine e dei parametri indagati.

Di seguito, per maggiore chiarezza, viene presentata l'articolazione dell'intero Programma di monitoraggio, così come allegato alle convenzioni firmate, nel dicembre 2000, tra il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e le Regioni costiere italiane.

Il Programma è stato avviato ufficialmente il 4 giugno 2001.

→ CRITERI PER LA SCELTA DELLE AREE DI CAMPIONAMENTO

La selezione delle aree oggetto di indagine (aree di campionamento) è stata condotta sulla base delle conoscenze relative alle diverse realtà territoriali, nonché sulla base dei risultati ottenuti dai precedenti programmi di monitoraggio, così da individuare aree sottoposte a specifiche pressioni antropiche, *aree critiche*, e aree scarsamente sottoposte a impatti antropici, che assumono in tal modo la funzione di zone di controllo o *aree di bianco*. Queste ultime sono state individuate principalmente all'interno di Aree Marine Protette (AMP).

Posizionamento dei transetti

All'interno di ogni area di indagine, si effettueranno i campionamenti lungo i transetti disposti perpendicolarmente alla linea di costa.

Nel posizionare i transetti dovranno essere privilegiati i siti nei quali siano presenti banchi naturali di *Mytilus galloprovincialis* e praterie di *Posidonia oceanica* o biocenosi caratteristiche di fondi mobili.

Posizionamento delle stazioni di campionamento

Su ciascun transetto verranno posizionate le stazioni di prelievo (stazioni di campionamento).

Per le acque, il posizionamento delle stazioni di prelievo lungo il transetto varia in funzione della tipologia del fondale, suddivisa in:

- **Alto fondale:** caratterizzata da una batimetrica superiore a 50 m a 3000 m dalla costa.
- **Medio fondale:** caratterizzata da una batimetrica superiore a 5 m a 200 m dalla costa e da una batimetrica inferiore a 50 m a 3000 m dalla costa.
- **Basso fondale:** caratterizzata da una batimetrica inferiore a 5 m a 200 m dalla costa.

Per ogni tipologia così individuata, il posizionamento delle stazioni di prelievo viene condotto secondo quanto riportato nello schema all'inizio della pagina seguente.

Le stazioni di prelievo per l'analisi dei sedimenti dovranno essere individuate, a seconda della geomorfologia del tratto costiero considerato, in corrispondenza della fascia di sedimentazione della frazione pelitica.

	I stazione	II stazione	III stazione
Alto fondale	entro e non oltre 100 m dalla costa	in posizione intermedia tra la I e la III stazione se la distanza tra dette stazioni è maggiore di 1000 m. Se invece la distanza è inferiore o uguale a 1000 m i prelievi e le misure verranno effettuati solo nella I e nella III stazione	non oltre la batimetrica dei 50 m
Medio fondale	200 m dalla costa	1000 m dalla costa	3000 m dalla costa
Basso fondale	500 m dalla costa	1000 m dalla costa	3000 m dalla costa

→ ARTICOLAZIONE DEL PIANO DI MONITORAGGIO

Acque

Con cadenza quindicinale, nelle stazioni individuate secondo i criteri illustrati ai punti precedenti, verranno condotte sulle acque le indagini di cui alla tabella qui a destra.

Per ogni data di campionamento dovranno essere acquisiti i dati relativi alle variabili meteo-marine a disposizione presso le Stazioni costiere.

I campionamenti sulle acque vanno eseguiti entro la I ed entro la III settimana di ogni mese. In caso di particolari avversità meteo-marine o per cause fortuite o di forza maggiore, tali scadenze possono essere procrastinate di una settimana, purché ne sia informato il Ministero e sia garantito un intervallo minimo di sette giorni tra un campionamento ed il successivo.

Biota (bioaccumulo in *Mytilus*) e sedimenti

Due volte l'anno, lungo i transetti specificati, si individuerà un sito dove verranno effettuate misure di bioaccumulo sul bivalve *Mytilus galloprovincialis* e un sito dove verranno effettuate le analisi su campioni di sedimento, indagando le variabili di seguito specificate.

Qualora non fossero presenti banchi naturali di *Mytilus galloprovincialis*, si provvederà alla predisposizione di impianti artificiali lungo i transetti già individuati (vedi capitolo *Utilizzo dei molluschi bivalvi nel programma di monitoraggio dell'ambiente costiero - Protocollo Mussel Watch*).

Temperatura (lungo la colonna d'acqua)
pH (lungo la colonna d'acqua)
Salinità (lungo la colonna d'acqua)
Ossigeno disciolto (lungo la colonna d'acqua)
Clorofilla "a" (lungo la colonna d'acqua)
Azoto totale (in superficie)
Azoto ammoniacale (in superficie)
Azoto nitroso (in superficie)
Azoto nitrico (in superficie)
Fosforo totale (in superficie)
Ortofosfato (in superficie)
Silicati (in superficie)
Trasparenza
Analisi quali-quantitativa del fitoplancton*
Analisi quali-quantitativa dello zooplancton*

I anno: densità delle Diatomee, densità dei Dinoflagellati, densità dell'altro fitoplancton

II anno: lista e densità delle specie

I anno: densità dei Copepodi e dei Cladoceri

II anno: lista e densità delle specie

* Un solo punto di prelievo nella stazione più vicina alla costa.

Variabili indagate su <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Variabili indagate su campioni di sedimento
Composti organoclorurati*	Granulometria
Metalli pesanti**	Composti organoclorurati*
Idrocarburi Policiclici Aromatici***	Metalli pesanti**
Composti organostannici (TBT)	Idrocarburi Policiclici Aromatici***
	Carbonio organico totale
	Composti organostannici (TBT)
	Saggi biologici (<i>Vibrio fischeri</i> più un'altra specie a scelta)
	Spore di clostridi solfitoriduttori

*DDT e analoghi (DD's); isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH's); Aldrin, Dieldrin (Drin's); esaclorobenzene; PCB's (4/7 atomi di cloro, specificando quali congeneri sono stati ricercati ed i valori delle singole concentrazioni).

**Hg, Cd, Cr, Pb, Zn, Cu, V, As, Ni, Al e Fe come screening preliminare per il I anno.

***Naftalene, Acenaftene, Acenaftilene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benz(a)antracene, Crisene, Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(a)pirene, Dibenz(a,h)antracene, Benzo(g,h,i)perilene, Indeno(1,2,3,c,d)pirene.



Benthos

Una volta l'anno, nelle aree individuate secondo i criteri riportati ai punti precedenti, verranno effettuate indagini sulle praterie di *Posidonia oceanica* o, ove non presenti, sulle comunità bentoniche di fondi mobili.

Analisi sulla <i>Posidonia oceanica</i>	Comunità Bentoniche di Fondi Mobili
Densità fogliare	Lista delle specie completa o, in alternativa, la lista delle specie guida della biocenosi
Lepidocronologia	Numero di individui per specie e parametri strutturali della biocenosi
Fenologia	
Marcaggio del limite inferiore	

Valutazione ed elaborazione del dato analitico

Qualsiasi determinazione analitica sperimentale, seppure condotta con la massima cura, comporta un certo errore. L'obiettivo del ricercatore deve essere quello di perseguire la messa a punto, e quindi successivamente l'impiego, di un metodo che fornisca risultati attendibili.

L'**attendibilità** di un risultato è la rispondenza tra il risultato sperimentale ed il valor "vero"; essa è condizionata da molti fattori, di cui alcuni dipendenti dal metodo, altri dall'esecuzione ed altri ancora dall'efficienza della strumentazione. La differenza tra il risultato di un'analisi ed il valor "vero" rappresenta, complessivamente, l'errore da cui è inficiata una determinazione.

→ ERRORI

Gli errori, che normalmente si compiono nell'eseguire un'analisi, si distinguono in sistematici (determinati) e casuali (indeterminati).

Errori sistematici

Gli errori sistematici sono di entità costante o tutt'al più variabile secondo una legge ben definita e si ripetono ogni volta che si effettua una stessa determinazione nelle stesse condizioni.

Questo tipo di errori è sempre dovuto ad una causa nota od individuabile; può essere previsto e quindi evitato oppure corretto. Le cause che originano tali errori sono dovute:

- alle caratteristiche specifiche del metodo di analisi (es. parziale solubilizzazione di un precipitato oppure presenza di reazioni collaterali); sono le cause più serie di risultati poco attendibili;
- all'impiego di apparecchiature non adeguatamente messe a punto o funzionanti, e all'impiego di reagenti non correttamente standardizzati o inquinati da sostanze estranee;
- alle caratteristiche personali dell'operatore (es. incapacità di apprezzare la variazione di colore di un indicatore per daltonismo).

Errori casuali

Gli errori casuali sono dovuti all'effetto di variabili incontrollate e la loro comparsa non segue alcuna legge. Essi variano da determinazione a determinazione e non possono essere individuati e corretti, come avviene per gli errori sistematici, poiché non se ne conosce la causa o la legge secondo cui si verificano. In ogni caso possono essere considerevolmente ridotti operando con la massima cura, ripetendo la stessa analisi con lo stesso metodo n volte e facendo la media fra i singoli risultati ottenuti.

L'influenza degli errori indeterminati sui risultati può essere stimata teoricamente applicando l'analisi statistica (legge della probabilità) ai valori ottenuti da una serie di determinazioni.

Senza entrare nel merito di una trattazione statistica approfondita, il che esula dagli obiettivi di queste brevi righe, è doveroso accennare ai concetti di media, deviazione standard e scarto per poter meglio comprendere i fattori che incidono maggiormente sull'attendibilità di un risultato.

Se in una serie di analisi non vi sono particolari motivi per ritenere che un risultato sia più attendibile degli altri (il che significa che tutti i risultati hanno uguale peso statistico), il **valore medio** o media aritmetica è **più probabile** di ogni singolo risultato. Inoltre, da un punto di vista prettamente matematico, quando il numero delle determinazioni tende ad infinito il valore medio tende al valore "vero" e la somma delle differenze degli **scarti** tende a zero.

Tuttavia la media aritmetica da sola non è in grado di rappresentare in maniera univoca una serie di risultati e necessita dell'aggiunta di un valore statistico che esprima come i singoli risultati siano distribui-

ti intorno alla media stessa. Per infinite determinazioni, gli errori si distribuiscono intorno alla media secondo una distribuzione normale, detta curva di Gauss o curva delle probabilità (Fig. 1).

I singoli risultati sperimentali si addensano intorno al valor medio, che è quindi il più probabile.

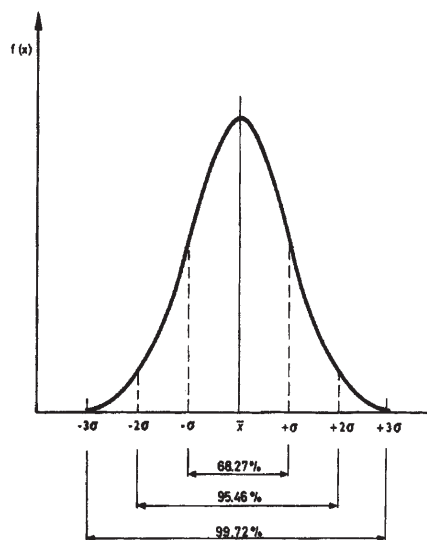


Fig. 1 - Distribuzione degli errori: curva di Gauss.

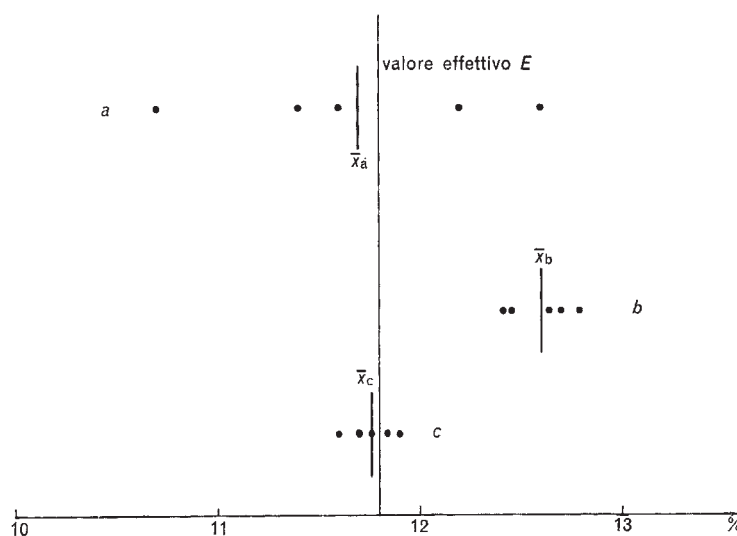


Fig. 2. Accuratezza e precisione in tre serie di analisi (a, b, c). In ascisse i valori delle determinazioni (espressi come percentuali). Le sbarrette verticali rappresentano i valori medi di ciascuna serie.

La probabilità di errore è nulla per il valor medio e cresce in valore assoluto allontanandosi da esso. La distanza tra il valor medio e i due punti di flesso si chiama **deviazione standard** e normalmente si indica con σ (sigma). Questa grandezza è un indice della dispersione dei valori intorno al valor medio ed è pertanto un indice di precisione delle misure sperimentali. Più piccolo è il valore di σ , maggiore è la precisione della misura.

I fattori più importanti che incidono sull'attendibilità di un risultato sono l'accuratezza e la precisione; i concetti, appena visti, di errore determinato ed errore indeterminato sono strettamente connessi con essi (Fig. 2).

L'**accuratezza** è il grado di concordanza tra il valore medio di un certo numero di misure ed il valor "vero"; essa è quindi tanto maggiore quanto minore è l'errore sistematico. La **precisione** è il grado di concordanza tra i risultati ottenuti da prove indipendenti sotto condizioni definite, applicando uno stesso metodo analitico su uno stesso materiale, ed è quindi tanto più grande quanto più piccoli sono gli errori indeterminati.

Nella figura 2 i risultati della Serie *a* sono poco precisi, mentre il valor medio è accurato perché si scosta assai poco dal valor "vero"; nella Serie *b* le misure sono precise perché ben riproducibili, ma poco accurate in quanto il valor medio si scosta notevolmente dal valor "vero"; nella Serie *c* le misure sono sia precise che accurate.

La precisione di un'analisi può variare notevolmente da un operatore all'altro; è bene distinguere, pertanto, tra la **ripetibilità** di un'analisi (grado di concordanza tra i risultati ottenuti da prove indipendenti *effettuate da uno stesso operatore*, utilizzando lo stesso metodo, sullo stesso materiale, in un ristretto arco di tempo) e la **riproducibilità** di questa (grado di concordanza fra i risultati ottenuti da prove indipendenti *effettuate da operatori diversi, in laboratori diversi* utilizzando lo stesso metodo, sullo stesso materiale, in tempi diversi).

Per la verità ripetibilità, accuratezza e riproducibilità sono caratteristiche analitiche dei risultati ottenuti con un certo metodo; tuttavia esse vengono spesso estese anche al metodo di analisi. Tale estensione, che a rigore non sarebbe accettabile, è entrata ormai nel linguaggio comune.

Per definire la ripetibilità, l'accuratezza e la precisione di un metodo è quindi necessario aver cura di utilizzare laboratori opportunamente scelti tra quelli che presumibilmente dovranno applicare il metodo stesso, o con caratteristiche simili, eseguendo prove interne e prove interlaboratorio.

Per caratterizzare in maniera completa un metodo di analisi è necessario conoscere anche i valori di altre due grandezze, rispettivamente **limite di rivelabilità** (qualitativo) e **limite di determinazione** (quantitativo).

Per limite di determinazione (spesso indicato come limite di quantificazione) si intende la minima concentrazione di sostanza da analizzare alla quale si ha un recupero medio accettabile (normalmente tra il 70 e il 110% con una deviazione standard $\leq 20\%$); si può definire anche come quel valore pari a dieci volte la deviazione standard calcolata su 7 o più repliche del campione di *bianco*.

Il limite di rivelabilità rappresenta, a sua volta, il valore limite di una certa grandezza che è possibile distinguere in modo significativo dal valore di *bianco* e può essere definito come quel segnale (es. altezza di un picco cromatografico) della grandezza da misurare pari almeno a tre volte il rumore di fondo.

Conoscere tali limiti non solo dà informazioni sul valore minimo rilevabile di una certa grandezza, ottenuto con un certo metodo, ma consente anche di esprimere correttamente il risultato di una analisi il cui valore non sia significativamente diverso da zero (valore del *bianco* o rumore di fondo). Non è corretto, infatti, riportare zero come risultato di un'analisi, mentre è corretto riportare che la grandezza misurata è risultata inferiore al limite di determinazione.

BIBLIOGRAFIA

- APHA, AWWA, WEF (1992) *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 18° ed. (Washington, APHA).
- Young F. (1998) *Statistical Analysis*, Journal of AOAC International, Vol. 81, n. 1, pag. 101.
- Saini G., Liberti A. (1980) *Fondamenti di metodologie e tecniche analitiche strumentali*, UTET Torino.
- G. C.C. Su (1998) *A comparison of statistical and empirical detection limits*, Journal of AOAC International, Vol. 81, n. 1 pag. 106.
- Gazzetta Ufficiale del 30/1/97 n. 24, *Decreto del 6 dic. 1996 del Ministero della Sanità*, Allegato 1, pag. 13.
- Gazzetta Ufficiale del 31/10/94 n. 83, *Direttiva CEE*, Allegato 2, pag. 56.
- Gorbach S.G., Bos U., Thier H.P., Frehse H., Weinmann W. D. (1987) *Limits of Detection and Determination*, Manual of Pesticide Residue Analysis, DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft, pag. 37.
- Istituto Superiore di Sanità (1997) *Linee guida per l'applicazione di buone pratiche di laboratorio*, Rapporti ISTISAN.
- Miller J.C., Miller J.N. (1988) *Statistics for analytical chemistry*. Ed. Ellis Horwood.



Campionamento

→ INTRODUZIONE

Il campionamento costituisce la prima fase di ogni procedimento di analisi e la sua corretta esecuzione è fondamentale per lo sviluppo dell'intero processo. Infatti si tratta di una fase piuttosto complessa e delicata in quanto condizionante i risultati di tutte le operazioni successive. Bisogna, inoltre, considerare la necessità di ottenere campioni il più possibile rappresentativi delle reali condizioni quali-quantitative che si intendono determinare e, pertanto, è importante che il campionamento venga effettuato da personale qualificato ed opportunamente addestrato.

→ CAMPIONAMENTO ACQUE

Per raccogliere i campioni di acqua a diversa profondità e non solo alla superficie di un corpo idrico, lo strumento campionario deve essere dotato di un sistema di apertura e chiusura attivabile alla profondità richiesta.

Il modello base di questo tipo di strumento è la classica bottiglia Niskin. Si tratta di uno strumento cilindrico dotato di due aperture, una superiore e una inferiore, e di un meccanismo che gli permette di rimanere aperto durante la calata in acqua. La bottiglia, legata a un cavo di diametro variabile (5÷8 cm), viene calata aperta; una volta raggiunta la profondità richiesta, la sua chiusura viene effettuata tramite l'invio, lungo il cavo, di un messaggero (costituito da un cilindro metallico) che urta l'estremo superiore di un meccanismo il quale sganciandosi provoca la chiusura della bottiglia.

Il prelievo dei campioni, per l'analisi dei vari parametri, va effettuato direttamente dalla bottiglia Niskin nel più breve tempo possibile; il recipiente di conservazione deve essere sciacquato almeno due volte con l'acqua della bottiglia di campionamento.

Analisi dei nutrienti

Per l'analisi dei nutrienti bisogna filtrare circa 250 ml di acqua come segue:

- predisporre l'apparato di filtrazione ponendo in esso un filtro in acetato di cellulosa da 0,45 µm, previamente lavato con 150-200 ml di acqua ultrapura;
- sciacquare l'apparato di filtrazione con 50-100 ml di acqua del campione;
- filtrare circa 250 ml di campione.

Se l'analisi viene effettuata entro 2-6 ore dal prelievo il campione può essere conservato al fresco (circa 4°C) e al buio; viceversa, nel caso intercorra più tempo tra il prelievo e l'analisi, è necessario congelare il campione a -20°C.

Analisi di azoto e fosforo totali

Per l'analisi di azoto e fosforo totali non bisogna filtrare il campione; è necessario soltanto avvinare bene il recipiente con l'acqua della bottiglia di campionamento, come riportato sopra.

Analisi del fitoplancton

Per l'analisi del fitoplancton si conservano 250, 500 o 1000 ml preferibilmente in bottiglie di vetro scuro con tappo ermetico. Il travaso dei campioni deve avvenire immediatamente evitando di riempire le bottiglie fino all'orlo, in modo da consentire, successivamente in laboratorio, l'agitazione del campione per renderlo omogeneo.

I campioni vanno mantenuti in luogo fresco e al buio.

**BIBLIOGRAFIA**

- Bicking C. A. (1978) *Principles and methods of sampling*. In *Treatise on Analytical Chemistry*, di I. M. Kolthoff e P. J. Elving, Vol 1, Part I, sez. B, 2° ed. J. Wiley & Sons, New York, 299.
- Rossi D., Baudo R., Muntau H. (1992) *Campionatori per acqua*. *Acqua e Aria*, 4, 309
- Krajca J. M. (1989) *Water sampling*. Ellis Horwood Ltd.



Impiego della sonda multiparametrica

Considerando che l'attività di monitoraggio si svolge in ambiente costiero, caratterizzato da una variabilità dei parametri chimico-fisici, per lo svolgimento delle attività di misura sono ritenuti idonei sia strumenti a flusso libero sia strumenti a flusso controllato. In ogni caso, i sensori dovranno rispondere alle caratteristiche riportate qui a fianco.

Si raccomanda di:

- Utilizzare sensori calibrati con alta precisione che vanno tenuti sotto osservazione per almeno 6 mesi dalla data di fabbricazione.
- Calibrare gli strumenti almeno una volta l'anno presso la SACLANT (*Supreme Allied Commander Atlantic* della NATO) di La Spezia. Attualmente il Laboratorio di Calibrazione della SACLANT effettua solo calibrazioni per i sensori di temperatura e conducibilità. Per gli altri sensori la calibrazione verrà effettuata secondo le specifiche tecniche riportate nel manuale di utilizzo della sonda. È opportuno effettuare di routine dei controlli del valore di ossigeno e salinità da sonda con analisi in laboratorio rispettivamente con il metodo Winkler e con un salinometro a conferma del dato rilevato con la sonda. Il sensore della clorofilla dovrebbe essere tarato periodicamente con valori di clorofilla ottenuti per via spettrofluorimetrica su colture di fitoplancton.
- Calibrare i sensori prima di ogni crociera; il sensore di clorofilla, viceversa, può essere tarato ogni 6 mesi.
- Calare la sonda con velocità di 1 m/s, per campionamenti su "alto fondale"; per campionamenti in "basso fondale", ed in particolare in situazioni di accentuata stratificazione termica, tale velocità può essere ridotta a circa 50 cm/s. Infatti, per "l'alto fondale" velocità inferiori a 1m/s massimizzano gli errori di misura dovuti allo "shed wakes", in quanto il movimento verticale indotto da barca/cavo/verricello assume una importanza percentuale maggiore tanto più lento è il movimento della sonda. Per il "basso fondale", viceversa, velocità più elevate di quella consigliata potrebbero comportare una errata stima del valore di ossigeno disciolto.

L'acquisizione dei dati dovrà essere fatta in continuo o, comunque, ad intervalli spaziali compatibili con le caratteristiche del sensore di profondità. L'invio alla Banca Dati Si.Di.Mar. sarà viceversa riferito a intervalli di un dato al metro. L'acquisizione dovrà iniziare dai 50 cm dalla superficie dell'acqua e terminare a circa 50 cm dal fondo.

Le misure di clorofilla, oltre che dalla temperatura, sono notevolmente influenzate dalla torbidità. Si consiglia l'utilizzo di un turbidimetro integrato sul sensore di clorofilla, al fine di compensare la lettura del valore della clorofilla, e ottenere il valore della torbidità.

CARATTERISTICHE RACCOMANDATE

Conducibilità

- Range 0-7 S/m
- Accuratezza 0,005 S/m
- Risoluzione 0,001 S/m

Temperatura

- Range -2 + 35°C
- Accuratezza 0,005°C
- Risoluzione 0,0005°C

Pressione

- Range variabile
- Accuratezza 0,25%
- Risoluzione 0,04 %

pH

- Range 0-14 unità di pH
- Accuratezza 0,01 unità di pH
- Risoluzione 0,001 unità di pH

Ossigeno disciolto con sistema di calcolo della percentuale di saturazione

- Compensazione di temperatura
- Range 0-50 ppm
- Accuratezza 0,1 ppm
- Risoluzione 0,01 ppm

Clorofilla "a"

- Compensazione di temperatura
- Compensazione di torbidità
- Completo di Standard Solido Secondario per ricalibrazione automatica
- Autorange su 4 ordini di grandezza senza necessità di modifica manuale
- Accuratezza 0,01 µg/L



La definizione di salinità e il calcolo delle variabili oceanografiche (misura dei valori di conducibilità, temperatura e pressione) sono riportati in:

- The Practical Salinity Scale of 1978 (IEEE) (1980) *Journal of Oceanic Engineering*. Vol. OE-5, n. 1, pag. 14.
- UNESCO Technical Papers in Marine Science *Algorithms for Computation of Fundamental Properties of Seawater*. n. 44

Copie della pubblicazione possono essere richieste a:

UNESCO • Division of Marine Science - UNESCO • Place de Fontenoy • 75700 Paris, France.

→ OSSERVAZIONI SUL COMPORTAMENTO DEI SENSORI

Accuratezza dello strumento o sensore

L'accuratezza è definita come la capacità di uno strumento (o sensore) di misurare il valore vero all'interno di un margine di errore predefinito.

La capacità di misura di un sensore è valutata durante la calibrazione paragonando la lettura del sensore con una lettura di riferimento, ad accuratezza nota, durante un periodo in cui sia il sensore che il riferimento sono stabili.

Questo procedimento prende il nome di "Calibrazione della Accuratezza Statica".

La risposta del sensore su tutto il range operativo è valutata, in maniera più adeguata, confrontando le risposte del sensore con il riferimento, nel maggior numero possibile di punti lungo tutto il range di misura.

Questa procedura permette di identificare eventuali non-linearità, anche minime, nel sensore e permette di "linearizzare la risposta" attraverso l'applicazione di opportuni coefficienti di calibrazione. In questo modo vengono minimizzati gli eventuali errori tra i punti osservati durante la calibrazione.

Se non è fornita una spiegazione diversa, va inteso che le specifiche dell'accuratezza dei sensori fornite dai produttori di CTD sono l'indicazione dell'accuratezza durante la calibrazione iniziale.

Accuratezza della calibrazione

L'accuratezza della calibrazione dipende da numerosi fattori, ma principalmente dall'accuratezza del riferimento, dalla stabilità ed omogeneità del bagno di calibrazione e dalla precisione con la quale viene fatto il paragone fra sensore da calibrare e riferimento di calibrazione.

Normalmente si pensa che 2 strumenti (o sensori) con la stessa accuratezza di calibrazione abbiano anche la stessa *performance* in acqua. Al contrario l'esperienza dimostra che in un ambiente dinamico (es. calata di una sonda multiparametrica) molti fattori cambiano rapidamente e simultaneamente (temperatura, conducibilità, pressione ecc.); in tal caso si possono riscontrare sorgenti di errore aggiuntivo che riducono l'accuratezza potenziale.

La progettazione del sensore e dello strumento giocano un ruolo fondamentale (e spesso dominante) sull'accuratezza raggiungibile in condizioni dinamiche.

Accuratezza dinamica

In poche parole, per accuratezza dinamica si intende l'accuratezza in calibrazione a meno degli errori presenti in un ambiente dinamico come quello reale (errori che non si ritrovano nei bagni di calibrazione).

Le principali sorgenti di errore dinamico nelle misure CTD sono:

- il moto turbolento generato dall'effetto di modulazione del movimento verticale (*heave*) della nave sul movimento dello strumento attraverso l'acqua; questo fenomeno è noto con il nome di "*shed wakes*" e causa un'alterazione delle misure di temperatura e conducibilità e determina un andamento a picchi dei dati di densità e salinità;
- i diversi tempi di risposta dei sensori di conducibilità e temperatura;
- le misure di temperatura e conducibilità non coordinate nello spazio e nel tempo, che cioè non sono effettuate nella stessa porzione d'acqua.

Questi fattori causano gran parte degli errori nelle misure CTD e nel calcolo della salinità. L'effetto combinato di questi fattori può portare ad errori variabili da parti per milione a parti per mille (errori nel calcolo della salinità variabili entro un range di 0,020-2,0 PSU).

SENSORI ADDIZIONALI

Potenziale di ossidoriduzione (ORP)

- Range -1000 mV +1000 mV
- Accuratezza 1 mV
- Risoluzione 0,1 mV

Torbidità

- Autorange su 3 ordini di grandezza senza necessità di modifica manuale
- Accuratezza 0,05 NTU
- Tempo di risposta 0,2 secondi



Un'accurata progettazione dello strumento permette di annullare l'effetto di questi errori, i rimanenti errori dinamici (massa termica del sensore, riscaldamento viscoso, sensibilità alla pressione) possono indurre errori nel calcolo della salinità variabili tra 0,005 e 0,020 PSU (da 5 a 20 parti per milione).

L'effetto "shed wakes" avviene in tutti i profilatori CTD calati da imbarcazioni. In generale i CTD di dimensioni minori creano un effetto ridotto ed errori più piccoli di durata inferiore rispetto a quelli riscontrati nei CTD più grandi, specialmente in quelli integrati su campionatori d'acqua (tipo *rosette* o *carousel*).

L'errore dovuto all'effetto "shed wakes" viene minimizzato attraverso un accurato posizionamento dei sensori in ogni specifica configurazione di una sonda multiparametrica. In questo modo si evita di posizionare i sensori in aree dove ci si può attendere turbolenza.

Per ottimizzare i risultati, l'utente deve dotarsi di strumenti calibrati ad altissima precisione e con dettagli progettuali che minimizzino gli errori dinamici.

→ CARATTERISTICHE PROGETTUALI PER UNA MAGGIORE ACCURATEZZA DELLA MISURA DELLA SALINITÀ

Tempo di risposta dei sensori di Temperatura (T) e Conducibilità (C)

Per un calcolo accurato la salinità, la temperatura, la conducibilità e la pressione devono essere combinate matematicamente. Se i sensori di T e di C hanno lo stesso tempo di reazione e sono posizionati nello stesso punto, il calcolo della salinità è effettuato in maniera corretta.

Aumentando la differenza dei tempi di reazione e la distanza (posizione fisica, o inclinazione della sonda, o inclinazione della microstruttura Temperatura/Salinità dovuta ad onde interne) fra i due sensori, aumenta anche la differenza tra i punti misurati dai sensori. Di conseguenza gli errori relativi al calcolo della salinità si osservano sotto forma di picchi.

Se i sensori potessero misurare la stessa porzione d'acqua, la precisione potenziale della misura della salinità sarebbe massimizzata.

Strumenti a flusso libero (senza pompa) e strumenti a flusso controllato (con pompa)

Dei tre parametri principali misurati da un CTD, la conducibilità è più suscettibile ad errori e quindi la scelta del sensore richiede una maggiore attenzione.

I sensori di conducibilità installati su sonde multiparametriche possono essere di due tipi: ad elettrodi ed a celle di induzione. In entrambi i modelli, il tempo di risposta del sensore è esclusivamente funzione della velocità del flusso attraverso il sensore (flusso più veloce = tempo di risposta minore). Variando la velocità del flusso attraverso il sensore varia anche il tempo di risposta del sensore.

Un sensore di conducibilità in uno strumento a flusso libero è soggetto a continue variazioni di velocità del flusso dell'acqua al suo interno, a causa del movimento della nave e delle variazioni di velocità di calata dovute alla variazione del diametro del rullo sul verricello.

Un sensore di conducibilità in uno strumento a flusso controllato, invece, utilizza una pompa a portata (e volume) costante che garantisce una velocità costante del flusso all'interno del sensore, e quindi il tempo di risposta che ne deriva è costante ed è completamente indipendente dal movimento del CTD attraverso l'acqua. Questo comporta una notevole riduzione dei picchi di salinità.

La tecnologia dei sensori di pressione contribuisce limitatamente all'errore nel calcolo della salinità. È comunque possibile riscontrare differenze significative nell'errore registrato da sensori di pressione di produttori diversi, in funzione della implementazione, compensazione per la temperatura e calibrazione.

BIBLIOGRAFIA

Lueck, R.G. (1990) *Thermal Inertia of Conductivity Cells: Theory*. JAOT V7 (5), 741-755.



Disco di Secchi

Tratto e modificato da: *NOVA THALASSIA, Vol. 11, pp. 23-27, 1990*

Il disco del Secchi, detto del “marinaio”, è un disco di 30 cm di diametro e 0,5 cm di spessore e viene quasi sempre autofabbricato con plastica bianco-latte (pvc, moplen, plexiglas, perspex ecc.). Il centro è fissato in vari modi da una parte alla cima di una sagola metrata con segni ben visibili, dall'altra a un peso per zavorra.

→ MISURE CON IL DISCO DEL SECCHI

Si fanno con mare sufficientemente calmo, calando il disco in acqua dal bordo dove non batte il sole, al riparo dalla radiazione diretta. Viene calato lentamente fino a che non scompare alla vista. Si legge la misura, segnata sulla sagola metrata dal pelo dell'acqua, facendo una media a occhio tra i cavi e le creste delle onde. Si ripete l'operazione facendolo ricomparire e scomparire alcune volte per ottenere una buona stima della profondità di svanimento.

N.B. Per le misure della trasparenza è opportuno, vista l'empiricità del metodo stesso, far eseguire le misurazioni sempre allo stesso operatore.

BIBLIOGRAFIA

- Biospherical Instruments Inc. (Ed.) (1986) *Technical Notes on: Underwater Light Measurement Sensors and Systems*. QSP Series, MER Series Spectroradiometers. Biospherical Instr. Inc., San Diego.
- Baney A.D. (1975) *Phytoplankton*. Arnold, London.
- Chelsea Instruments Ltd. (1985) *Technical Notes on Deep Sea Photometer*. CEI, Calchester.
- Kirk J.T.O. (1983) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Li-Cor Inc. (Ed.) (1986) *Radiation Measurement Instruments*. Lincoln, USA.
- Preisendorfer R.W. (1986) *Secchi Disk science: visual optics of natural waters*. *Limnol. Oceanogr.*, 31, 909-926.
- Skye Instruments Ltd. (1985) *Technical Notes on: Quantum Radiation Sensor, PAR Radiation Sensor, 660-730, Radiation Detector, Photometric (Light) Sensor*. London Caledonian Press, London.
- Tait R.V. (1981) *Elements of Marine Ecology*. Butterworths, London.
- Vercelli F. (1951) *La luce nel mondo subacqueo*. In: “Il Mare, i Laghi, i Ghiacciai”, UTET, Torino, 169-200.
- W.S. Ocean Systems (Ed.) (1987) *Technical Notes on: Irradiance Meter OIM-1*. Horiemere, Surrey.

a cura di Mario INNAMORATI (Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Firenze)

modifiche a cura del Servizio Difesa Mare



Ortofosfati

Tratto e modificato da: *NOVA THALASSIA, Vol. 11, pp. 123-132, 1990*

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso fosfomolibdico di colore blu (del gruppo dei blu di molibdeno) la cui concentrazione viene misurata per via colorimetrica (spettrofotometro o colorimetro) (Deniges, 1920). Gli aspetti rilevanti per lo sviluppo del complesso fosfomolibdico vengono qui schematizzati.

Lo ione molibdato MoO_4^{2-} ed i suoi polimeri formano, in ambiente acido, eteropoliacidi stabili con elementi del IV e V gruppo (Boltz e Mellon 1947; Cotton e Wilkinson, 1968). L'acido fosfomolibdico è un complesso di colore giallo. La riduzione del molibdato da Mo(VI) a Mo(V) in questo complesso produce un eteropoliacido di colore blu. Il picco massimo di assorbanza varia a secondo del tipo di riducente adoperato, probabilmente in relazione al variare del rapporto tra Mo(VI) e Mo(V) nel complesso e al tipo di aggregazione delle unità base nella soluzione.

Murphy e Riley (1962) introdussero, nella procedura per la determinazione dei fosfati nell'acqua di mare, l'uso di un sale di antimonio trivalente, che entra nell'eteropoliacido in un rapporto di circa 1:1 con il fosforo. Questa modificazione induce uno spostamento del massimo di assorbanza verso l'infrarosso, con un incremento del coefficiente di estinzione molare e un drastico aumento nella velocità di formazione. Le proprietà ottiche di questa classe di composti sono state esaminate da Going e Eisenreich (1974). La successiva riduzione avviene ad opera dell'acido ascorbico, eliminando così dipendenze dalla forza ionica (effetto salino) e dalla temperatura (Harvey, 1948; Murphy e Riley, 1958, 1962; Jones e Spencer, 1963). Per minimizzare l'interferenza di altri ioni che reagiscono in maniera analoga con i molibdati è necessario mantenere il pH della soluzione finale al di sotto di 1, condizione nella quale la formazione di eteropoliacidi con Si e As è decisamente sfavorita (Koroleff, 1983).

La metodologia proposta è quella di Murphy e Riley (1962) nella versione riportata da Strickland e Parsons (1968).

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

Procedura di campionamento

- Il prelievo va effettuato direttamente dalla bottiglia di campionamento nel più breve tempo possibile, seguendo i criteri generali per l'ordine di prelievo dei subcampioni necessari per l'analisi dei vari parametri.
- Per minimizzare i problemi di inquinamento, è preferibile adoperare un recipiente unico, di plastica scura, avente volume sufficiente a contenere l'acqua necessaria per eseguire l'analisi di tutti i nutrienti.
- Il recipiente va sciacquato almeno due volte con l'acqua della bottiglia di campionamento.
- Si procede quindi alla filtrazione secondo quanto indicato di seguito.
- Predisporre l'apparato di filtrazione montando in esso filtri in acetato di cellulosa con porosità dichiarata di $0,45 \mu\text{m}$, preventivamente lavati con $150\text{-}200 \text{ cm}^3$ di acqua grado reagente.
- Sciacquare accuratamente l'apparato di filtrazione con l'acqua del campione adoperando almeno 100 cm^3 di acqua, se si tratta di un filtro da 47 mm di diametro, o almeno 50 cm^3 se si adopera un filtro da 25 mm di diametro.
- Filtrare il campione.

OPERAZIONI IN MARE

Attrezzatura:

- bottiglia da almeno 1 L in plastica scura (unica per tutti i prelievi relativi all'analisi dei nutrienti inorganici)
- bottiglie a chiusura ermetica in polietilene o altro materiale congelabile da 150 cm^3 (o di volume maggiore in relazione al numero di repliche che si intende effettuare)
- apparato per la filtrazione del campione
- filtri acetato di cellulosa con porosità dichiarata di $0,45 \mu\text{m}$
- frigorifero o congelatore

Conservazione dei campioni

- Conservare almeno 70 cm³ di campione per ogni replica che si intende effettuare in sede di analisi e 70 cm³ come eventuale riserva in caso di incidente nelle operazioni.
- Travasare il subcampione in una bottiglia di materiale congelabile, preventivamente sciacquata almeno due volte col campione.
- Se l'analisi viene effettuata entro 2-6 ore dal prelievo, conservare il campione al fresco e al buio. In caso contrario è necessario congelare il campione a -20°C.

La conservazione dei fosfati presenta numerosi problemi dovuti all'effetto del recipiente (Murphy e Riley, 1956; Eicholz *et al.*, 1965), all'attività biologica e all'idrolisi delle forme polimeriche di fosfato (Collier e Marvin, 1953; Fitzgerald e Faust, 1967; Gilmartin, 1967; Jenkins, 1968; Thayer, 1970; Klingaman e Nelson, 1976; MacDonald e McLaughlin, 1980, 1982; Kremling e Wenck, 1986).

In sede di analisi di dati ricavati da campioni conservati, va tenuta presente la possibilità di modificazione delle caratteristiche del campione.

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Preparazione delle soluzioni stock

Acido solforico 5 N

Misurare 140 cm³ di acido solforico concentrato per analisi e versarlo lentamente in un beaker contenente circa 800 cm³ di acqua grado reagente. Far raffreddare e portare a volume in un matraccio da 1 L. La soluzione, conservata in bottiglia di vetro scura, è stabile indefinitamente.

Soluzione di ammonio molibdato

Sciogliere, in un matraccio da 500 cm³, 15 g di ammonio eptamolibdato tetraidrato cristallino in 450 cm³ di acqua grado reagente e portare a volume.

La soluzione, conservata in bottiglia di plastica o di vetro borosilicato, lontano da luce diretta, è utilizzabile fino a che non si forma un precipitato bianco.

Soluzione di potassio antimonio tartrato

Sciogliere, in un matraccio da 250 cm³, 0,34 g di potassio antimonio tartrato in 250 cm³ di acqua grado reagente.

La soluzione, conservata in bottiglia di vetro o plastica, è stabile per molti mesi, a meno che non si noti la formazione di un flocculato bianco.

Soluzione standard di potassio diidrogeno fosfato 2 mmol/L

Essiccare in stufa a 110°C qualche grammo di potassio diidrogeno fosfato. Pesarne, con una bilancia analitica, 272,18 mg e discioglierli in 900 cm³ di acqua grado reagente in un matraccio da 1 L (classe A). Portare a volume ed aggiungere qualche goccia di cloroformio come conservante. La soluzione, conservata in bottiglia di vetro borosilicato, è stabile per qualche mese.

Preparazione di attrezzatura specifica per l'analisi

Trattamento dei recipienti di reazione

Lavare periodicamente le beute per la reazione con miscela solfocromica bollente. Conservarle ben tappate, riempite di acqua grado reagente e reattivo misto (eventualmente si può lasciare nella beuta il residuo del campione analizzato).

OPERAZIONI IN LABORATORIO

Attrezzatura:

- cilindri graduati o pipette da 50 cm³
- contenitori in vetro borosilicato da 100 cm³ (preferibilmente beute con tappo)
- vetreria da laboratorio per preparazioni chimiche
- dispenser automatico da 5 cm³
- matracci tarati da 50, 250 e 500 cm³
- matracci tarati da 100 cm³ classe A
- matraccio tarato da 1 L classe A
- micropipette di precisione per misurare volumi compresi nell'intervallo di 10-100 mm³
- bilancia analitica
- stufa
- forno a microonde
- essiccatore
- spettrofotometro o colorimetro sensibile a 880 nm (come ripiego 705 nm)
- munito di cellette di almeno 50 mm di cammino ottico

OPERAZIONI IN LABORATORIO

Prodotti chimici:

- miscela solfocromica
- acido solforico concentrato [H₂SO₄]
- ammonio eptamolibdato tetraidrato [(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O]
- potassio antimonio tartrato [K(SbO)₆H₄O₆]
- acido ascorbico [C₆H₈O₆]
- potassio diidrogeno fosfato [KH₂PO₄]
- cloroformio [CHCl₃]



→ PROCEDURA ANALITICA

Reagenti da preparare al momento dell'uso

Soluzione di acido ascorbico

Sciogliere, in un matraccio da 50 cm³, 2,7 g di acido ascorbico in 45 cm³ di acqua grado reagente e portare a volume. La soluzione, conservata in bottiglia di plastica o vetro, è stabile per 24 ore.

Reagente misto

Miscelare in un contenitore di vetro: 100 cm³ di soluzione di ammonio molibdato, 250 cm³ di acido solforico 5 N, 100 cm³ di soluzione di acido ascorbico e 50 cm³ di soluzione di potassio antimonio tartrato. La soluzione è sufficiente per circa 100 campioni ma si deteriora nel giro di qualche ora, per cui va sostituita quando il suo colore muta da giallo chiaro a giallo molto scuro.

Preparazione delle soluzioni standard

Preparare 5 soluzioni a concentrazione nota di fosfato diluendo, in matracci da 100 cm³ (classe A), rispettivamente 10, 25, 50, 75, 100 mm³ di soluzione standard di potassio diidrogeno fosfato (misurati con una pipetta di precisione) con acqua di mare oligotrofica. Le concentrazioni risultano così comprese tra 0,2 e 2 µmol/L in fosfato, a meno del contenuto in ortofosfati dell'acqua di mare oligotrofica.

Trattamento analitico

- Al momento dell'analisi, se il campione era stato congelato, scongelarlo rapidamente, possibilmente adoperando un bagno a 37°C o un forno a microonde.
- Sciacquare preventivamente le beute con un'aliquota dei campioni o delle soluzioni standard a diversa concentrazione.
- Riempire le beute con 50 cm³ di campione o di ciascuna delle soluzioni standard (misurati con un cilindro graduato). Date le concentrazioni notevolmente basse di fosfati e la relativa sensibilità della metodica analitica, è opportuno effettuare almeno due determinazioni per ciascun campione da analizzare.
- Aggiungere con un dispenser 5 cm³ di reagente misto a ciascun campione o soluzione standard e agitare.
- Attendere che la reazione abbia luogo (almeno 5 minuti e non oltre 2 ore).

Preparazione dei bianchi dei reagenti

- Riempire quattro beute da 100 cm³ con 50 cm³ di acqua di mare oligotrofica, povera in fosfati, dopo averle sciacquate con la stessa acqua.
- Aggiungere in due beute 5 cm³ di reagente misto e, nelle altre due, una quantità doppia.
- Attendere che la reazione abbia luogo come per i campioni e le soluzioni standard.

Dosaggio spettrofotometrico

- Misurare l'assorbanza a 882 nm del bianco (bl_{c_i}) di ciascuna celletta dello spettrofotometro o del colorimetro usata per la lettura contro la celletta di riferimento, ambedue riempite con acqua senza reattivi. L'operazione è superflua se si opera con una sola cella.
- Per ogni beuta registrare su un apposito foglio il numero della celletta adoperata e l'identificazione del contenuto della beuta (campione, soluzione standard, bianco). Sciacquare con parte del suo contenuto la celletta, riempirla e leggere l'assorbanza a 882 nm, registrando la lettura sullo stesso foglio. In alternativa, con perdita di sensibilità di circa 30%, si può leggere l'assorbanza a 705 nm.

→ CALCOLI

- Calcolare il bianco dei reagenti (bl) come differenza media tra i valori dei bianchi contenenti 10 cm³ e quelli contenenti 5 cm³ di reagente misto.
- Calcolare la correlazione tra i valori delle assorbanze delle 5 soluzioni standard e le concentrazioni presunte, adoperando il metodo dell'asse maggiore ridotto. Il coefficiente angolare sarà il fattore colorimetrico (f).
- È consigliabile considerare come soluzione standard a concentrazione nulla di ortofosfati anche il campione di acqua di mare oligotrofica cui si è aggiunta una sola dose di reagente misto (vedi "Bianchi dei

reagenti”). In tal modo si ottengono in totale 6 soluzioni standard che coprono un intervallo di concentrazioni di 2,0 µmol/L.

- Calcolare la concentrazione di fosfati nei campioni applicando la seguente formula:

$$[\text{PO}_4] = (\text{ABS} - \text{bl} - \text{bl}_{c,i}) \cdot f$$

dove:

$[\text{PO}_4]$ = concentrazione dei fosfati (espressa in µmol/L)

ABS = assorbanza del campione

bl = bianco dei reagenti

$\text{bl}_{c,i}$ = bianco della cella i-esima adoperata

f = fattore colorimetrico

Per una cella di 50 mm di cammino ottico, il fattore colorimetrico è pari a circa 9,9 µmol/L, ovvero una differenza in concentrazione di 1 µmol/L (ad esempio tra la soluzione standard 3 e la 5) dovrebbe risultare in una differenza in assorbanza pari a circa 0,1.

I risultati saranno espressi in µmol/L.

Il limite di determinazione è pari a 0,03 µmol/L, ovvero a 0,92 µg/L.

→ RACCOMANDAZIONI

- Le cellette dello spettrofotometro (oppure colorimetro) vanno lavate periodicamente con una soluzione al 5% di soda o di acido fluoridrico perché il complesso fosfomolibdico tende ad attaccarsi alle pareti conferendo loro una leggera colorazione blu.
- Non lasciare per molto tempo i campioni in contenitori di plastica a temperatura ambiente. La concentrazione dei fosfati tende infatti a diminuire, sia a causa dell'attività batterica che si sviluppa sulle pareti della bottiglia sia per fenomeni di adsorbimento.
- Dopo lo scongelamento dei campioni, completare l'analisi in breve tempo per evitare fenomeni di idrolisi di fosfati organici o polifosfati.
- Nel caso la soluzione standard sia stata conservata in frigorifero, occorre portarla alla temperatura di laboratorio prima di iniziare la procedura di standardizzazione.
- Effettuare le letture allo spettrofotometro entro due ore dall'aggiunta del reattivo per evitare la lenta formazione di eteropoliacidi silicomolibdici.

→ PROBLEMI POSSIBILI

- I solfuri possono interferire con la reazione, se presenti in concentrazione superiore a 50 µmol/L di S^{2-} , in quanto alterano il coefficiente di estinzione e il massimo di assorbanza (De Jonge e Villerius, 1980). In questo caso occorre rimuovere i solfuri dal campione (Airey *et al.*, 1984).
- I silicati creano interferenza se presenti a concentrazioni superiori a 150 µmol/L in quanto sviluppano un complesso che assorbe nella stessa banda (Koroleff, 1983).
- Il bianco del reattivo, se preparato usando acqua distillata, può avere densità ottica maggiore dei campioni da analizzare. Ciò può derivare da cause diverse, per cui si consiglia di seguire scrupolosamente la procedura indicata nel paragrafo “Bianchi dei reagenti” oppure di applicare la metodica suggerita da Novoselov *et al.* (1976).

→ ALTRI METODI

Se la concentrazione dell'ortofosfato è inferiore a 0,05 µmol/L, si può usare un metodo per estrazione (Proctor e Hood, 1954; Cescon e Scarazzato, 1973; Motomizu *et al.*, 1984).

Se si pensa di poter analizzare i campioni nel giro di 24 ore e non si può conservarli congelati, si può adoperare il metodo di Murphy e Riley (1958), che richiede un'incubazione di circa 24 ore. Un possibile errore deriva dall'idrolisi dei polifosfati organici ed inorganici.

Le tecniche automatiche, il cui uso è limitato a causa del costo delle apparecchiature necessarie, consentono di ottenere risultati più rapidi ed attendibili.

Per l'analisi automatica con sistemi a flusso continuo segmentato, consultare Mangelsdorf (1972), Treguer *et al.* (1976), Folkard (1978), Lennox (1979), Hudes (1984), Airey e Sandars (1987).



Per l'analisi con la tecnica FIA (Flow Injection Analysis), consultare Hirai *et al.* (1980), Coetzee e Gardner (1986), Van Staden (1987); per l'analisi mediante cromatografia ionica consultare Tabatabai e Dick (1983), Nguyen e Baker (1987); per l'analisi con tecniche cromatografiche o di dosaggio conduttometrico consultare Ivey e Davics (1987), Rössner *et al.* (1987) e Weiss (1987).

BIBLIOGRAFIA

- Airey D., Dal Pont G., Sandars G. (1984) *A method of determining and removing sulphide to allow the determination of sulphate, phosphate, nitrite and ammonia by conventional methods in small volumes of anoxic waters.* Analytica Chim. Acta, 166, 79-92.
- Airey D., Sandars G. (1987) *Automated analysis of nutrients in seawater.* Rep. C.S.I.R.O. Mar. Lab., 166, 1-106.
- Boltz D.F., Mellon M.G. (1947) *Determination of phosphorus, germanium, silicon, and arsenic by the heteropolyblue method.* Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 19, 873-877.
- Cescon B.S., Scarazzato P.G. (1973) *Determination of low phosphate concentrations in seawater by an isobutyl acetate extraction procedure.* Limnol. Oceanogr., 18, 499-500.
- Coetzee J.F., Gardner C.W. Jr. (1986) *Determination of sulphate, orthophosphate, and triphosphate ion by flow injection analysis with lead ion selective electrode as detector.* Anal. Chem., 58, 608-611.
- Collier A.W., Marvin K.T. (1953) *Stabilization of the phosphate ratio of seawater by freezing.* Bull. U.S. Bur. Fish., 79,71-76.
- Cotton F.A., Wilkinson G. (1968) *Gli elementi della seconda e terza serie di transizione.* In: "Chimica Inorganica", Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 914-1059.
- De Jonge V.N., Villerius L.A. (1980) *Interference of sulphide in inorganic phosphate determination in natural waters.* Mar. Chem., 9, 191-197.
- Deniges M.G. (1920) *Reaction de coloration extrêmement sensible des phosphate et des arseniates. Ses applications.* C. R. Acad. Sci., Paris, 171, 802-804.
- Eicholz G.H., Nagel A.E., Hughes R.B. (1965) *Adsorption of ions in dilute aqueous solutions on glass and plastic surfaces.* Anal. Chem., 37, 863-868.
- Fitzgerald G.P., Faust S.L. (1967) *Effects of water sample preservation methods on the release of phosphorus from algae.* Limnol. Oceanogr., 12, 332-334.
- Folkard A.R. (1978) *Automatic analysis of seawater nutrients.* Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft, 46,1-23.
- Gilmartin M. (1967) *Changes in inorganic phosphate concentration occurring during seawater sample storage.* Limnol. Oceanogr., 12, 325-328.
- Going H.E., Eisenreich S.J. (1974) *Spectrophotometric studies of reduced molybdo-antimonylphosphoric acid.* Analytica Chim. Acta, 70, 95-106.
- Harvey H.W. (1948) *The estimation of phosphate and total phosphorus in sea waters.* J. Mar. Biol. Ass. U.K., 27, 337-359.
- Hirai Y., Yoza N., Ohashi S. (1980) *Flow-injection analysis of inorganic ortho- and poly-phosphate using ascorbic acid as reductant of molybdophosphate.* Chem. Lett., 5, 499-502.
- Hudes D.J. (1984) *A manual of methods for the continuous flow determination of ammonia, nitrate-nitrite, phosphate and silicate in seawater.* Rep. Inst. Oceanogr. Sci. Wormerly, 177, 1-37.
- Ivey J.P., Davies D.M. (1987) *Ion chromatographic determination of selected ions in Antarctic ice.* Analytica Chim. Acta, 194, 281-286
- Jenkins D. (1968) *The differentiation, analysis, and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters.* Advan. Chem. Ser., 73, 265-280.
- Jones P.W.G., Spencer C.P. (1963) *Comparison of several methods of determining inorganic phosphate in sea-water.* J. Mar. Biol. Ass. U.K., 43, 251-273.
- Klingaman E.D., Nelson D.W. (1976) *Evaluation of methods for preserving the levels of soluble inorganic phosphorus and nitrogen in unfiltered water samples.* J. Envir. Qual., 5, 42-46.
- Koroleff F. (1983) *Determination of phosphorus.* In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 125-139.
- Kremling K., Wenck A. (1986) *On the storage of dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate in Atlantic Ocean water samples.* Meeresforsch., 31, 69-74.
- Lennox L.J. (1979) *An automated procedure for the determination of phosphorus.* Water Res., 13, 1329-1333.
- MacDonald R.W., McLaughlin F.A., Page J.S. (1980) *Nutrient Storage by freezing: data report and statistical analysis.* Pac. Mar. Sci. Rep., 80, 1-69.
- MacDonald R.W., McLaughlin F.A. (1982) *The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters.* Water Res., 16, 95-104.
- Mangelsdorf P. (1972) *Methodische Verbesserungen der Phosphat-Bestimmung in Meerwasser mit dem AutoAnalyzer insbesondere für den Bordbetrieb.* Helgoländer Kiss. Meeresunters., 23, 376-382.
- Motomizu S., Wakimoto T., Toei K. (1984) *Solvent extraction spectrophotometric determination of phosphate with molybdate and malachite green in river water and seawater.* Talanta, 31, 235-240.
- Murphy J., Riley J.P. (1956) *The storage of sea-water samples for the determination of dissolved inorganic phosphate.* Analytica Chim. Acta, 14, 318-319.
- Murphy J., Riley J.P. (1958) *A single-solution method for the*



determination of soluble phosphate in sea water. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 37, 9-14.

- Murphy J., Riley J.P. (1962) *A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters.* Analytica Chim. Acta, 27, 31-36.
- Nguyen T.H., Baker L.M. (1987) *Total phosphate determination by ion chromatography.* Proceedings AWWA Water Quality Technology Conference. Baltimore, Maryland, November 15-20, 1987, 577-590.
- Novoselov A.A., Sheremet'Yeva A.I., Danilenko A.F. (1976) *Method for simultaneous obtaining silicon-free and phosphate-free sea water aboard ship.* Oceanology, 16, 358-359.
- Proctor C.M., Hood D.W. (1954) *Determination of inorganic phosphate in sea water by an iso-butanol extraction procedure.* J. Mar. Res., 13, 122-132.
- Rössner B., Behnert J., Kipplinger A. (1987) *Ion-chromatography in the routine analysis of water and environmental material.* Z. Analyt. Chem., 327, 698-700.
- Strickland Ld., Parsons T.R. (1968) *A practical handbook of sea-water analysis.* Bull. Fish. Res. Board Can., 167, 1-312.
- Tabatabai Ma, Dick W.A. (1983) *Simultaneous determination of nitrate, chloride, sulphate, and phosphate in natural waters by ion chromatography.* J. Envir. Qual., 12, 209-213.
- Thayer G.W. (1970) *Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine waters.* Chesap. Sci., 11, 155-158.
- Treguer P., Le Corre P., Courtot P. (1976) *Dosage automatique des orthophosphates dans l'eau de mer utilisation de l'AutoAnalyzer II.* J. Cons. Int. Explor. Mer., 36, 289-294.
- Van Staden J.F. (1987) *Flow-injection analysis of substances in water. I. Anions. A critical review.* Water S.A., 13, 197-208.
- Weiss J. (1987) *Ion chromatography: a review of recent developments.* Z. Analyt. Chem., 327, 451-455.

a cura di

Maurizio RIBERA D'ALCALÀ (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

Giulio CATALANO (CNR, Istituto Talassografico di Trieste)

Vincenzo SACCIOMO (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

modifiche a cura di Carla Rita FERRARI (ARPA Emilia Romagna)



Nitriti

Tratto e modificato da: *NOVA THALASSIA, Vol. 11, pp. 133-138, 1990*

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo proposto si basa su una serie di reazioni che portano alla formazione di un composto diazoico colorato che viene dosato per via colorimetrica. Questa procedura, tra le più sensibili tra le analisi colorimetriche dirette, è specifica per i nitriti e non presenta alcuna variazione di efficienza in relazione alla forza ionica della soluzione. Il metodo originale, proposto da Griess-Ilosvay (Ilosvay, 1889), è stato successivamente modificato da Shinn (1941) e applicato all'analisi dell'acqua di mare da Bendschneider e Robinson (1952).

La procedura analitica consiste nella formazione, in ambiente con pH inferiore a 2 e temperatura non superiore a 40°C, di un sale di diazonio (cloruro di diazosulfanilammide) che reagisce successivamente con naftiletilendiammina per generare un colorante diazoico.

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

Procedura di campionamento

Il prelievo va effettuato direttamente dalla bottiglia di campionamento nel più breve tempo possibile, seguendo quanto illustrato nella scheda *Ortofosfati*.

Conservazione dei campioni

Conservare almeno 70 cm³ di campione per ogni replica che si intende effettuare in sede di analisi e 70 cm³ come eventuale riserva in caso di incidente nelle operazioni.

- I nitriti, tra i sali di azoto, rappresentano uno stato di ossidazione intermedio e pertanto possono subire notevoli variazioni nel campione (Jenkins, 1968; Thayer, 1970). È necessario dunque procedere ad un rapidissimo congelamento del campione dopo la filtrazione, se l'analisi non viene iniziata entro 2-3 ore dal prelievo.
- Travasare il campione filtrato in una bottiglia di materiale congelabile, preventivamente sciacquata almeno due volte col campione stesso, e congelare a -20°C.

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Preparazione delle soluzioni stock

Sulfanilamide reagente

Versare 50 cm³ di acido cloridrico concentrato in un beaker da almeno 600 cm³, contenente 400 cm³ di acqua grado reagente, ed agitare fino al mescolamento completo. Disciogliere in questa soluzione 5 g di sulfanilamide. Portare a volume con acqua grado reagente in un matraccio tarato da 500 cm³. La soluzione è stabile per molti mesi se conservata in recipienti di plastica o vetro, in frigorifero.

OPERAZIONI IN MARE

Attrezzatura:

- bottiglie a chiusura ermetica in polietilene o altro materiale congelabile da 150 cm³ (o di volume doppio nel caso si intenda replicare l'analisi)
- apparato per la filtrazione del campione
- filtri in acetato di cellulosa con porosità dichiarata di 0,45 µm
- frigorifero o congelatore

OPERAZIONI IN LABORATORIO

Prodotti chimici:

- miscela solfocromica
- acido cloridrico concentrato [HCl]
- sulfanilamide [NH₂SO₂C₆H₄NH₂]
- n-(1-naftil)etilendiaminadiidrocloreuro [C₁₀H₇NHCH₂CH₂NH₂ 2HCl]
- nitrito di sodio [NaNO₂]
- cloroformio [CHCl₃]

NNEDDC reagente

Sciogliere 500 mg di N-(1-naftil)etilendiaminadiidrocloreuro in 450 cm³ di acqua grado reagente. Portare a volume con acqua grado reagente in un matraccio da 500 cm³.

La soluzione conservata in frigorifero, in bottiglie scure, è stabile per 1-2 mesi; dev'essere scartata se assume un colore marrone.

Soluzione standard di nitrito di sodio 2 mmol/L

Essiccare in stufa qualche grammo di nitrito di sodio e far raffreddare in un essiccatore con gel di silice. Pesare 138 mg di nitrito di sodio, scioglierli in circa 800 cm³ di acqua grado reagente in un matraccio tarato da 1 L (classe A) e portare a volume con acqua grado reagente.

La soluzione va conservata refrigerata, in bottiglia scura, aggiungendo qualche goccia di cloroformio; è stabile per circa un mese.

Preparazione di attrezzatura specifica per l'analisi***Trattamento dei recipienti di reazione***

Lavare periodicamente con miscela solfocromica i beaker di vetro borosilicato da 100 cm³, sciacquarli abbondantemente con acqua grado reagente e asciugarli. Per l'ordinaria manutenzione è sufficiente, dopo l'uso, sciacquarli con acqua grado reagente e riporli a testa in giù su carta filtro.

→ PROCEDURA ANALITICA***Preparazione delle soluzioni standard***

Preparare 5 soluzioni a concentrazione nota di nitrito diluendo, in matracci da 100 cm³ (classe A), rispettivamente 10, 25, 50, 75, 100 mm³ di soluzione standard di nitrito di sodio (misurati con una micropipetta di precisione) con acqua di mare oligotrofica o acqua grado reagente. Le concentrazioni risultano così comprese tra 0,2 e 2,0 µmol/L in nitrito, a meno del contenuto di nitrito dell'acqua di mare oligotrofica nel caso venga adoperata per la diluizione.

Trattamento analitico

- Al momento dell'analisi, se il campione era stato congelato, scongelarlo rapidamente, possibilmente adoperando un bagno a 37°C o un forno a microonde.
- Misurare con un cilindro graduato 50 cm³ di campione e di ciascuna delle soluzioni standard e versarli nei beaker.
- Aggiungere con un dispenser 1 cm³ di sulfanilamide reagente e lasciar reagire per 5 minuti.
- Aggiungere con un dispenser 1 cm³ di NNEDDC reagente e attendere 10 minuti.

Preparazione dei bianchi dei reagenti

Preparare nello stesso tipo di contenitore di vetro borosilicato da 100 cm³ almeno due replicati di bianchi dei reagenti, utilizzando 50 cm³ di acqua grado reagente e applicando la stessa procedura dei campioni e delle soluzioni standard.

Dosaggio spettrofotometrico

- Misurare l'assorbanza a 543 nm del bianco ($b_{c,i}$) di ciascuna celletta dello spettrofotometro o del colorimetro usata per la lettura contro la celletta di riferimento, ambedue riempite con acqua senza reattivi. L'operazione è superflua se si opera con una sola cella.
- Per ogni beuta registrare su un apposito foglio il numero della celletta adoperata e l'identificazione del contenuto della beuta (campione, soluzione standard, bianco).
- Sciacquare con parte del suo contenuto la celletta, riempirla e leggere l'assorbanza a 543 nm, registrando la lettura sullo stesso foglio.

OPERAZIONI IN LABORATORIO**Attrezzatura:**

- cilindri graduati o pipette da 50 cm³
- contenitori in vetro borosilicato da 100 cm³ (beaker)
- vetreria da laboratorio per preparazioni chimiche
- dispenser automatici da 1 cm³
- matracci tarati da 500 cm³
- matracci tarati da 100 cm³ classe A
- matraccio tarato da 1 L classe A
- micropipette di precisione per misurare volumi compresi nell'intervallo di 10-100 mm³
- bilancia analitica
- stufa
- forno a microonde
- essiccatore
- spettrofotometro o colorimetro sensibile a 543 nm, munito di cellette di almeno 50 mm di cammino ottico



→ CALCOLI

- Calcolare il bianco dei reagenti (bl) come media delle due letture effettuate sui bianchi.
- Calcolare la correlazione tra i valori delle assorbanze delle 5 soluzioni standard e le concentrazioni presunte, adoperando il metodo dell'asse maggiore ridotto. Il coefficiente angolare sarà il fattore colorimetrico (f).
- Calcolare la concentrazione di nitriti nei campioni applicando la seguente formula:

$$[\text{NO}_2^-] = (\text{ABS} - \text{bl} - \text{bl}_{c,i}) \cdot f$$

dove:

$[\text{NO}_2^-]$ = concentrazione dei nitriti (espressa in $\mu\text{mol/L}$)

ABS = assorbanza del campione

bl = bianco dei reagenti

$\text{bl}_{c,i}$ = bianco della cella i-esima adoperata

f = fattore colorimetrico

Per una cella di 50 mm di cammino ottico, il fattore colorimetrico è pari a circa $4,0 \mu\text{mol/L}$, ovvero una differenza in concentrazione di $1 \mu\text{mol/L}$ (per esempio tra la soluzione standard 3 e la 5) dovrebbe risultare in una differenza in assorbanza pari a circa 0,25.

I risultati saranno espressi in $\mu\text{mol/L}$.

Il limite di determinazione è pari a $0,01 \mu\text{mol/L}$, ovvero a $0,14 \mu\text{g/L}$.

→ RACCOMANDAZIONI

Rinnovare frequentemente (almeno una volta al mese) la soluzione standard stock.

→ PROBLEMI POSSIBILI

Il metodo suggerito è esente da problemi e da interferenze. Tuttavia l'acido solfidrico eventualmente presente nel campione dev'essere rimosso prima dell'analisi (Grasshoff, 1983; Airey *et al.*, 1984).

→ ALTRI METODI

Nonostante l'elevata sensibilità del metodo proposto, se fosse richiesto un aumento di sensibilità, si può applicare la metodica proposta da Nakashima *et al.* (1983).

Per quanto riguarda l'analisi a flusso continuo segmentato, largamente utilizzata da anni, consultare Folkard (1978), Hansen e Grasshoff (1983), Airey e Sandars (1987). Queste metodiche presentano il vantaggio di un'alta riproducibilità dei risultati e velocità di analisi. L'unico svantaggio è rappresentato dal costo elevato delle apparecchiature. Oudot e Montel (1988) propongono un metodo con sensibilità a livello di nmol/L .

Per le tecniche FIA (Flow Injection Analysis), consultare Zagatto *et al.* (1980) e Nakashima *et al.* (1983) per metodiche relative ad acque dolci; Johnson e Petty (1983) propongono una metodologia per acqua di mare che richiede un'attrezzatura di costo relativamente basso.

BIBLIOGRAFIA

- Airey D., Dal Pont G., Sandars G. (1984) *A method of determining and removing sulphide to allow the determination of sulphate, phosphate, nitrite and ammonia by conventional methods in small volumes of anoxic waters.* Analytica Chim. Acta, 166, 79-92.
- Airey D., Sandars G. (1987) *Automated analysis of nutrients in seawater.* Rep. C.S.I.R.O. Mar. Lab., 166,1-106.
- Bendschneider K., Robinson R.J. (1952) *A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water.* J. Mar. Res., 11, 87-96.
- Folkard A.R. (1978) *Automatic analysis of seawater nutrients.* Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft, 46,1-23.
- Grasshoff, K. (1983) *Determination of nitrite.* In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 139-142.
- Hansen H.P., Grasshoff Y. (1983) *Automated chemical analysis.* In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 347-379.



- Ilosvay L. (1889) *Determination of nitrite in saliva and exhaled air*. Bull. Soc. Chim. Fr., 2, 388-391.
- Jenkins D. (1968) *The differentiation, analysis, and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters*. Advan. Chem. Ser., 73, 265-280.
- Johnson K.S., Petty R.L. (1983) *Determination of nitrate and nitrite in seawater by flow injection analysis*. Limnol. Oceanogr., 28, 1260-1266.
- Nakashima S., Masakazu Y., Zenki M., Takahashi A., Toei K. (1983) *Spectrophotometric determination of nitrite in natural waters by flow injection analysis*. Analytica Chim. Acta, 155, 263-268.
- Oudot C., Montel Y. (1988) *A high sensitivity method for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater with a Technicon AutoAnalyzer II*. Mar. Chem., 24, 239-252.
- Shinn M.B. (1941) *A colorimetric method for the determination of nitrite*. Ind. Eng. Chem Anal. Ed., 13, 33-35.
- Thayer G.W. (1970) *Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine waters*. Chesap. Sci., 11, 155 - 158.
- Zagatto E.A.G., Jacintho A.O., Mortam J., Bergamin H. (1980) *An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows*. Analytica Chim. Acta., 120, 399-403.

a cura di

Maurizio RIBERA D'ALCALÀ (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

Giulio CATALANO (CNR, Istituto Talassografico di Trieste)

Vincenzo SACCIOLO (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

modifiche a cura di Carla Rita FERRARI (ARPA Emilia Romagna)



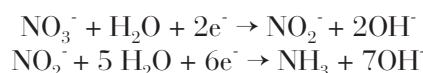
Nitrati

Tratto e modificato da: *NOVA THALASSIA, Vol. 11, pp. 139-150, 1990*

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo proposto per l'analisi dei nitrati si basa sulla loro riduzione, in fase eterogenea, a nitriti e sul successivo dosaggio dei nitriti totali utilizzando una metodica colorimetrica.

Il metodo è stato introdotto da Morris e Riley (1963), ma solo successivamente la dinamica delle reazioni implicate è stata studiata approfonditamente (Nydhal, 1976; Grasshoff, 1983). Le reazioni principali su cui si basa la procedura analitica, in ambiente basico, sono:

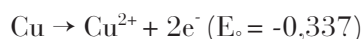


L'ulteriore riduzione di N(III) risulta sfavorita in condizioni di pH elevato.

Il riducente utilizzato è il cadmio, il cui potenziale di semicoppia è:



il cadmio viene parzialmente ricoperto da rame con potenziale di semicoppia pari a



per cui il potenziale riducente totale risulta essere pari a -0,740 V.

Un aspetto spesso trascurato è l'ossidazione del cadmio e del rame per effetto non tanto della riduzione dell'azoto, quanto di quella dell'ossigeno disciolto. Infatti, mentre la concentrazione di nitrato è dell'ordine delle $\mu\text{mol/L}$, la concentrazione dell'ossigeno disciolto è pari a circa 0,25 mmol/L, per cui la quantità di cadmio ossidato dall'ossigeno risulta maggiore di almeno un ordine di grandezza.

La principale reazione in cui è coinvolto il cadmio risulta essere la seguente:



Il prodotto di solubilità dell'idrossido di cadmio in acqua pura è $6 \cdot 10^{-15}$ per cui in acqua distillata, con valori di pH pari a 8,5, l'idrossido di cadmio inizia a precipitare, depositandosi sulla superficie del reattore ed alterandone le caratteristiche.

Per ovviare alla precipitazione dell'idrossido di cadmio e ridurre al minimo la possibilità di un'ulteriore riduzione dei nitriti, si tampona la soluzione a pH 8,5 con un tampone ammonio-cloruro di ammonio che complessa il cadmio, spostandolo dall'equilibrio di precipitazione. Nel paragrafo "Altri metodi" vengono forniti i riferimenti per tutte le varianti a questa procedura.

I fattori che influenzano maggiormente il tempo di contatto dei nitrati con il cadmio, e quindi l'efficienza della reazione, sono: le caratteristiche della superficie del reattore, l'entità della superficie attiva del reattore stesso, il tempo di residenza della soluzione nel reattore e di conseguenza le caratteristiche del flusso.

L'uso di cadmio granulare presenta il vantaggio di essere facilmente disponibile ed economico e di avere un eccellente rapporto superficie/volume. Il principale inconveniente risiede nella variabilità nel tem-



po delle caratteristiche del riduttore. La progressiva dissoluzione del cadmio elimina infatti i granuli di dimensione minore, alterando lo spettro di grandezza dei granuli stessi. È opportuno quindi utilizzare cadmio con una ristretta gamma di misura dei granuli.

Un'altra variabile da considerare è il tempo di contatto fra cadmio, nitrato e nitrito. Un tempo di contatto eccessivamente lungo favorisce la riduzione del nitrito, per cui la lunghezza della colonna di riduzione, a parità di sezione, deve essere ottimizzata al fine di ottenere una riduzione totale del nitrato e una minima riduzione del nitrito. Nella procedura proposta, le dimensioni della colonna e la velocità di flusso suggerite sono adatte per analisi di campioni con concentrazioni di nitrato nell'intervallo 0-10 $\mu\text{mol/L}$ e prevedono l'uso di cadmio in granuli da 0,25-0,42 mm di diametro (60-40 mesh). Queste caratteristiche vanno eventualmente modificate sulla base delle misure di efficienza della colonna.

Va infine segnalato che gli ioni cloruro rallentano, per cause ancora poco chiare, la reazione di riduzione, che pertanto ha efficienza diversa in acqua di mare e in acqua dolce.

Il metodo proposto è sostanzialmente quello illustrato da Grasshoff (1983).

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

Procedura di campionamento

Il prelievo va effettuato direttamente dalla bottiglia di campionamento, nel più breve tempo possibile, seguendo quanto illustrato nella scheda *Ortofosfati*.

OPERAZIONI IN MARE

Attrezzatura:

- bottiglie a chiusura ermetica in polietilene o altro materiale congelabile da 150 cm^3 (o di volume doppio nel caso si intenda replicare l'analisi)
- apparato per la filtrazione del campione
- filtri in acetato di cellulosa con porosità dichiarata di 0,45 μm
- frigorifero o congelatore

Conservazione dei campioni

- Conservare almeno 70 cm^3 di campione per ogni replica che si intende effettuare in sede di analisi e 70 cm^3 come eventuale riserva in caso di incidente nelle operazioni.
- La conservazione dei nitrati non presenta particolari problemi (Jenkins, 1968; Thayer, 1970; MacDonald *et al.*, 1980; MacDonald e McLaughlin, 1982; Kremling e Wenck, 1986). È necessario procedere al congelamento del campione dopo la filtrazione, se l'analisi non viene iniziata entro 5-6 ore dal prelievo.
- Travasare il campione filtrato in una bottiglia di materiale congelabile, preventivamente sciacquata almeno due volte col campione, e congelare a -20°C .

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Preparazione delle soluzioni stock

Sulfanilamide reagente

Versare 50 cm^3 di acido cloridrico concentrato in un beaker da almeno 600 cm^3 contenente 400 cm^3 di acqua grado reagente e agitare fino al mescolamento completo. Disciogliere in questa soluzione 5 g di sulfanilamide. Portare a volume con acqua grado reagente in un matraccio tarato da 500 cm^3 . La soluzione è stabile per molti mesi se conservata in recipienti di plastica o vetro, in frigorifero.

NNEDDC reagente

Sciogliere 500 mg di N-(1-naftil)etilendiaminadiidrocloreuro in 450 cm^3 di acqua grado reagente. Portare a volume in un matraccio da 500 cm^3 . La soluzione, conservata in frigorifero in bottiglie scure, è stabile per 1-2 mesi; dev'essere sostituita se assume un colore marrone.

Soluzione di solfato di rame

Sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 20 g di solfato di rame

OPERAZIONI IN LABORATORIO

Prodotti chimici:

- miscela solfocromica
- acido cloridrico concentrato [HCl]
- sulfanilamide [$\text{NH}_2\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$]
- n-(1-naftil)etilendiaminadiidrocloreuro [$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 2HCl]
- nitrato di potassio 99,999% [KNO_3]
- nitrito di sodio [NaNO_2]
- cloruro di ammonio [NH_4Cl]
- idrossido di ammonio [NH_4OH]
- cadmio granulare per reattori [Cd]
- solfato di rame pentaidrato [$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]
- cloroformio [CHCl_3]

OPERAZIONI IN LABORATORIO**Attrezzatura:**

- cilindri graduati o pipette da 50 cm³
- contenitori in vetro borosilicato da 100 cm³ (beaker)
- vetreria da laboratorio per preparazioni chimiche
- dispenser automatici da 1 cm³
- matracci tarati da 500 e 1000 cm³
- matracci tarati da 100 cm³ classe A
- matraccio tarato da 1 L classe A
- micropipette di precisione per misurare volumi compresi nell'intervallo di 10-100 mm³
- bilancia analitica
- stufa
- forno a microonde
- essiccatore
- spettrofotometro o colorimetro sensibile a 543 nm munito di cellette di almeno 50 mm di cammino ottico
- pompa peristaltica ad uno o più canali
- colonne di riduzione
- tubo di tygon da 4-4,5 mm di diametro interno
- nipple N6
- lana di vetro
- pHmetro
- setacci per granulometria da 0,25 e 0,42 mm di maglia (60 e 40 mesh)

pentaidrato in acqua grado reagente e conservare in bottiglia scura. La soluzione è stabile indefinitamente.

Acido cloridrico circa 0,2 mol/L

Miscelare in un beaker, sotto agitazione, 100 cm³ di acido cloridrico concentrato e 500 cm³ di acqua grado reagente. Conservare in bottiglia di vetro. La soluzione è stabile indefinitamente.

Tampone ammonio-cloruro di ammonio

Sciogliere in un beaker 10 g di cloruro di ammonio per analisi in 1 L di acqua grado reagente e portare il pH della soluzione a 8,5 aggiungendo, goccia a goccia sotto agitazione e controllando il pH con un pHmetro, una piccola quantità di soluzione di idrossido di ammonio (dovrebbe essere sufficiente circa 1,5 cm³). La soluzione tampone dev'essere conservata in bottiglia scura ed è stabile per molti mesi.

Soluzione standard di nitrato di potassio 5 mmol/L

Essiccare in stufa qualche grammo di nitrato di potassio, e far raffreddare in un essiccatore con gel di silice. Pesare 505,6 mg di nitrato di potassio, scioglierli in circa 800 cm³ di acqua grado reagente in un matraccio tarato da 1 L (classe A) e portare a volume. La soluzione va conservata refrigerata, in bottiglia scura, con qualche goccia di cloroformio, e rinnovata ogni sei mesi.

Soluzione standard di nitrito di sodio 2 mmol/L

Essiccare in una stufa qualche grammo di nitrito di sodio e far raffreddare in un essiccatore con gel di silice. Pesare 138 mg di nitrito di sodio, scioglierli in circa 800 cm³ di acqua grado reagente in un matraccio tarato da 1 L (classe A) e portare a volume. La soluzione va conservata refrigerata, in bottiglia scura, con qualche goccia di cloroformio; è stabile per circa un mese.

cia di cloroformio; è stabile per circa un mese.

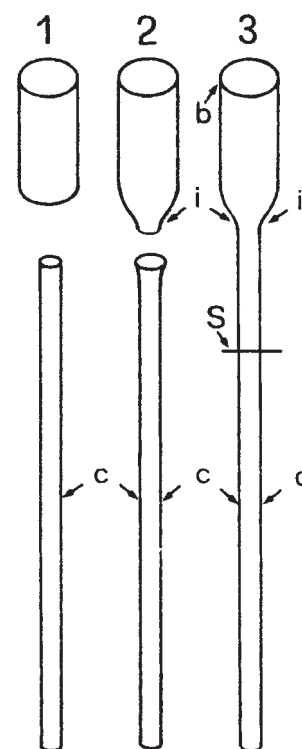
Preparazione di attrezzatura specifica per l'analisi**Trattamento dei recipienti di reazione**

Lavare periodicamente con miscela solfocromica i beaker di vetro borosilicato da 100 cm³, sciacquarli abbondantemente con acqua grado reagente e asciugarli.

Per l'ordinaria manutenzione è sufficiente, dopo l'uso, sciacquarli con acqua grado reagente e riporli a testa in giù su carta filtro.

Colonna di riduzione

- Da un capillare di vetro borosilicato di 3 mm di diametro interno e 5 mm di diametro esterno, ricavare un pezzo di 33 cm di lunghezza (Fig. 1, c).
- Allargare sulla fiamma un'estremità del capillare (Fig. 2, c).
- Ridurre sulla fiamma il diametro di un'estremità di un tubicino di vetro di almeno 3 cm di lunghezza e 8 mm di diametro interno (Fig. 2, i), fino a raggiungere le dimensioni dell'estremità allargata del capillare.
- Saldare a fuoco le estremità del capillare (Fig. 3, c) e del tubicino (Fig. 3, i) aventi lo stesso diametro, arrotondando il bordo libero del tubicino (Fig. 3, b).
- Tagliare il pezzo ottenuto con molta cura, per non scheggiare la superficie di taglio (Fig. 3, s), in modo da ottenere un capillare da 30 cm di lunghezza (Fig. 3, e) e un imbutino di circa 6 cm di lunghezza totale (Fig. 3, i).

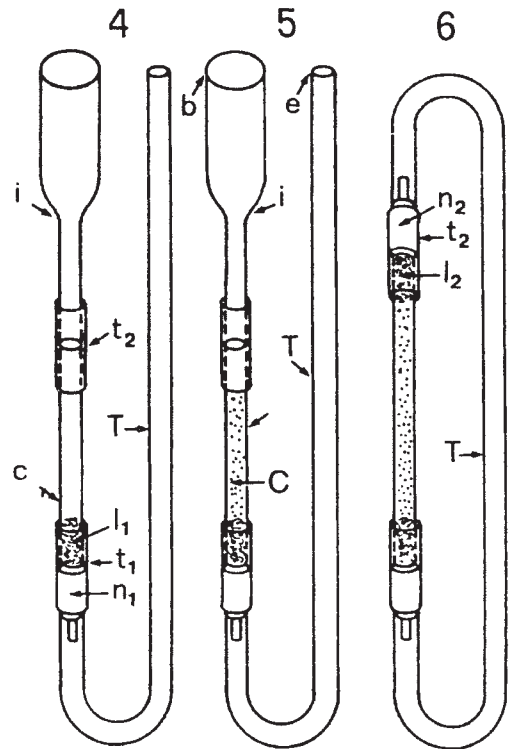


Preparazione del cadmio

- Setacciare nei due setacci circa 10 g di cadmio, separando la frazione costituita da granuli compresi tra 0,25 e 0,42 mm (60-40 mesh).
- Lavare il cadmio con una soluzione di acido cloridrico 0,2 mol/L e successivamente con acqua grado reagente, in modo da rimuovere gli ossidi presenti sulla superficie dei granuli.
- Diluire 10 cm³ di soluzione di solfato di rame con 80 cm³ di tampone ammonio e versarli, insieme con il cadmio, in una beuta provvista di tappo.
- Agitare vigorosamente fino alla scomparsa del colore blu del rame.
- Lavare numerose volte (almeno 10) il cadmio con il tampone ammonio-cloruro di ammonio fino alla totale scomparsa del rame colloidale, di colore rosso scuro nero, adeso al cadmio.

Allestimento della colonna di riduzione

- Disporre il capillare di vetro in posizione verticale ed inserire un po' di lana di vetro all'estremità inferiore (Fig. 4, l₁).
- Fissare a questa estremità, utilizzando il tubo di tygon (Fig. 4, t₁) come manicotto, un nipple (Fig. 4, n₁) e innestare in questo un tubo di tygon di circa 35 cm di lunghezza (Fig. 4, T).
- Collegare l'imbutino (Fig. 4, i) all'estremità superiore del capillare (Fig. 4, c) come manicotto.
- Disporre il capillare e l'imbutino ad esso collegato (Fig. 5, c, i) in un cilindro vuoto tenendo ripiegato verso l'alto il tubo di tygon (Fig. 5, T) in modo che la sua estremità libera (Fig. 5, e) si trovi all'altezza del bordo dell'imbutino (Fig. 5, b).
- Riempire il capillare ed il tubo di tygon con la soluzione tampone fin quasi al bordo dell'imbutino (Fig. 5, i).
- Con una pipetta Pasteur, privata della parte più sottile della punta, aspirare il cadmio dal fondo della beuta in cui è stato lavato e lasciarlo scivolare nel capillare di vetro (Fig. 5, C), battendo di tanto in tanto la colonnina con una bacchetta per compattarlo.
- Quando il capillare è riempito fin quasi all'orlo, tenendo sollevata l'estremità del tubo di tygon (Fig. 5, e) per evitare che penetri aria nel capillare, distaccare l'imbutino (Fig. 5, i) dall'estremità superiore del capillare (Fig. 5, c), inserire un po' di lana di vetro (Fig. 6, l₂) e innestare con un manicotto (Fig. 6, t₂) un secondo nipple (Fig. 6, n₂).
- Abbassare leggermente l'estremità libera del tubo di tygon ed attendere che fuoriesca dal nipple la prima goccia di tampone.
- Connettere l'estremità libera del tubicino di tygon (Fig. 6, T) al nipple (Fig. 6, n₂).
- La colonna è pronta per l'uso ed è stabile per qualche mese.



→ PROCEDURA ANALITICA

Preparazione delle soluzioni standard

- Preparare 5 soluzioni a concentrazione nota di nitrato diluendo, in matracci di 100 cm³ (classe A), rispettivamente 10, 25, 50, 75, 100 mm³ di soluzione standard stock di nitrato di potassio (misurati con una micropipetta di precisione) con acqua di mare oligotrofica o acqua grado reagente. Le concentrazioni risultano così comprese tra 0,5 e 5,0 μmol/L in nitrato, a meno del nitrato contenuto nell'acqua di mare oligotrofica, se usata per la diluizione.
- Preparare 3 soluzioni a concentrazione nota di nitrito diluendo, in matracci da 100 cm³ (classe A), rispettivamente 50, 75, 100 cm³ di soluzione standard di nitrito di sodio (misurati con una micropipetta di precisione) con acqua di mare oligotrofica o acqua grado reagente. Le concentrazioni risultano così comprese tra 1 e 2 μmol/L, a meno del nitrito contenuto nell'acqua oligotrofica.



Trattamento analitico

- Al momento dell'analisi, se il campione era stato congelato, scongelarlo rapidamente, possibilmente adoperando un bagno a 37°C o un forno a microonde.
- Misurare con un cilindro graduato 50 cm³ di campione e di ciascuno degli standards di nitrati e di nitriti e versarli nei beaker da 100 cm³.
- Aggiungere 50 cm³ di tampone ammonio (misurati con un cilindro graduato) e mescolare bene.
- Disinserire il tubo di tygon dalla parte superiore della colonna di riduzione e far uscire dal nipple una goccia di tampone.
- Immergere nel beaker contenente il primo campione da analizzare l'estremità del tubo di aspirazione della pompa peristaltica, regolata in modo tale da garantire una velocità di flusso tra i 2,5 e i 3 cm³/min.
- Mettere in funzione la pompa ed attendere che la prima goccia di campione fuoriesca dal tubo di uscita.
- Interrompere il funzionamento della pompa e collegare immediatamente, badando che non si formino bolle d'aria, il nipple della colonna di riduzione con il tubo di uscita della pompa stessa.
- Far passare, azionando la pompa, il campione attraverso la colonna di riduzione, scartando i primi 25 cm³ di campione (misurati con un cilindro graduato) che escono dal tubo di tygon.
- Raccogliere in una beuta o beaker da 50 cm³ i 25 cm³ successivi.
- Far passare attraverso il sistema gli altri campioni da analizzare, gli standards di nitrati e quelli di nitriti, interrompendo il funzionamento della pompa peristaltica tra un campione e l'altro per impedire l'ingresso di bolle d'aria.
- Dopo il passaggio dell'ultimo campione, lasciar passare nella colonna di riduzione 50 cm³ di tampone ammonio e conservare la colonna completamente piena di tampone.
- Misurare con un cilindro graduato 12,5 cm³ di ciascuno degli standards di nitriti, versarli in un beaker, aggiungervi 12,5 cm³ di tampone ammonio e mescolare bene. La preparazione di questi standards, non passati attraverso la colonna di riduzione, si rende necessaria per verificare il grado di trasformazione del nitrito a composti a più basso numero di ossidazione, in maniera indipendente dal grado di efficienza della colonna, a meno di impurezze di nitrato presenti nello standard di nitrito.
- Aggiungere con un dispenser 1 cm³ di sulfanilamide reagente nelle beute contenenti i campioni e le tre serie di standards (nitrati, nitriti e nitriti non passati attraverso la colonna di riduzione) e lasciar reagire per 5 minuti.
- Aggiungere con un dispenser 1 cm³ di NNEDDC reagente e attendere 10 minuti.

Preparazione dei bianchi dei reagenti

- Preparare in beaker di vetro borosilicato da 100 cm³ almeno due replicati di bianchi dei reagenti utilizzando 50 cm³ di acqua grado reagente. I bianchi vanno trattati con la stessa procedura applicata ai campioni ed alle soluzioni standard, incluso, ovviamente, il passaggio attraverso la colonna.

Dosaggio spettrofotometrico

- Misurare l'assorbanza a 543 nm del bianco ($bl_{c,i}$) di ciascuna celletta dello spettrofotometro, o del colorimetro, usata per la lettura contro la celletta di riferimento, ambedue riempite con acqua senza reattivi. L'operazione è superflua se si opera con una sola cella.
- Per ogni beaker registrare su un apposito foglio il numero della celletta adoperata e l'identificazione del contenuto del beaker (campione, soluzione standard, bianco).
- Sciacquare con parte del suo contenuto la celletta, riempirla e leggere l'assorbanza a 543 nm, registrando la lettura sullo stesso foglio.
- La lettura dei bianchi è inficiata da un piccolo errore dovuto alla diversa matrice adoperata, ma è di solito trascurabile in quanto è legato solo alle impurezze di nitrato nel tampone ammonio.

→ CALCOLI

- Calcolare il bianco dei reagenti (bl) come media delle due letture effettuate sui bianchi.
- Calcolare la correlazione tra i valori delle assorbanze delle tre serie di soluzioni standard e le concentrazioni presunte, adoperando il metodo dell'asse maggiore ridotto. I coefficienti angolari ottenuti saranno i fattori colorimetrici per i nitrati (f_1), per i nitriti (f_2) e per i nitriti non passati sulla colonna di riduzione (f_3).
- I rapporti f_1/f_2 e f_2/f_3 forniscono indicazioni sull'efficienza della colonna per la riduzione del nitrato e per la preservazione del nitrito presente nel campione. Nel caso in cui l'efficienza nella riduzione fosse non

soddisfacente (< 90%), occorre aumentare la lunghezza della colonna, mentre questa va diminuita se la resa di nitrito è inferiore al 95%.

- Calcolare la concentrazione dei nitrati nei campioni applicando la seguente formula:

$$[\text{NO}_3^-] = (\text{ABS} - \text{bl} - \text{bl}_{\text{ci}} - [\text{NO}_2^-] / f_2) \cdot f_1$$

dove:

$[\text{NO}_3^-]$ = concentrazione dei nitrati (espressa in $\mu\text{mol/L}$)

$[\text{NO}_2^-]$ = concentrazione dei nitriti nel campione (ricavata indipendentemente ed espressa in $\mu\text{mol/L}$)

ABS = assorbanza del campione

bl = bianco dei reagenti

bl_{ci} = bianco della cella i-esima adoperata

f_1 = fattore colorimetrico dei nitrati

f_2 = fattore colorimetrico dei nitriti

Per una cella di 50 mm di cammino ottico, il fattore colorimetrico dei nitrati è pari a circa $8,0 \mu\text{mol/L}$, ovvero una differenza in concentrazione di $2 \mu\text{mol/L}$ (ad esempio tra la soluzione standard 1 e la 3) dovrebbe risultare in una differenza in assorbanza pari a circa 0,25.

I risultati saranno espressi in $\mu\text{mol/L}$.

Il limite di determinazione è pari a $0,05 \mu\text{mol/L}$, ovvero a $0,7 \mu\text{g/L}$.

→ RACCOMANDAZIONI

- Prima di effettuare l'analisi, verificare accuratamente le caratteristiche della colonna. Se entrano bolle di aria nella colonna, è preferibile svuotarla e rimpacchettarla, in quanto il tempo di ritenzione diviene variabile in seguito alla progressiva espulsione dell'aria. In alternativa si può lasciar passare la soluzione tampone attraverso la colonna, per circa 20-30 minuti, per espellere la maggior parte dell'aria. In entrambi i casi occorre far passare attraverso la colonna almeno una serie di standards per verificare eventuali variazioni nella resa della riduzione.
- La determinazione del fattore f_2 è superflua quando le concentrazioni dei nitriti risultano essere di un ordine di grandezza inferiore a quelle dei nitrati. In tal caso è sufficiente calcolare il fattore colorimetrico f_1 e sottrarre la concentrazione dei nitriti dai valori ottenuti.
- Nel caso si debba analizzare un gran numero di campioni, controllare periodicamente l'efficienza della colonna di riduzione nel corso delle analisi.

→ PROBLEMI POSSIBILI

- Il metodo proposto è esente da problemi e da interferenze. L'acido solfidrico, difficilmente presente nei campioni contenenti nitrato, può essere fatto precipitare come solfuro di rame o cadmio (Grasshoff, 1983).
- Concentrazioni di fosfati superiori a $2 \mu\text{mol/L}$ possono ridurre l'efficienza della colonna (Olsen, 1980).

→ ALTRI METODI

Per quanto riguarda l'analisi a flusso continuo segmentato, largamente utilizzata da anni, consultare Hager *et al.* (1972), Folkard (1978), Hansen e Grasshoff (1983), Airey e Sandars (1987). Queste metodiche presentano il vantaggio di un'alta riproducibilità dei risultati e velocità di analisi. L'unico svantaggio è rappresentato dal costo elevato delle apparecchiature.

Tra i lavori sui metodi automatici vanno segnalati Stainton (1974), Propp e Propp (1979), Willis (1980), Hydes e Hill (1985), Mourino e Fraga (1985), in cui vengono suggeriti riduttori con caratteristiche diverse che possono essere facilmente utilizzati anche nel metodo proposto. Otsuki (1978) suggerisce inoltre un metodo per riattivare il riduttore senza spaccettarlo. Oudot e Montel (1988) propongono un metodo con sensibilità a livello di nmol/L .

Un metodo di riduzione che prevede l'agitazione del cadmio granulare nel campione è stato messo a punto da Jones (1984), per evitare l'uso della colonna.

Per l'utilizzo della tecnica FIA (Flow Injection Analysis) si possono consultare Zagatto *et al.* (1980), Nakashima *et al.* (1983), i cui metodi sono stati sperimentati per acque dolci, e Johnson e Petty (1983), che propongono una metodologia per acqua di mare che richiede un'attrezzatura di costo non elevato.

Motomizu *et al.* (1987) utilizzano l'emissione fluorescente di un composto derivato. Aoki *et al.* (1986) propongono un metodo per la determinazione contemporanea di ammoniaca e nitrato.

Un'interessante alternativa è costituita dall'uso della spettrofotometria UV (Armstrong, 1963), ma questo metodo è decisamente meno sensibile e risente delle interferenze di tutte le sostanze che assorbono nell'UV. Può essere utilizzato tuttavia per dosare il nitrato nella metodica dell'azoto totale, dove le sostanze organiche vanno prima ossidate.

Più promettente è l'analisi dei nitrati con tecniche cromatografiche o di dosaggio conduttometrico (Itoh e Shinboro, 1980; Ivey e Davies, 1987; Rössner *et al.*, 1987; Weiss, 1987). È stato proposto anche un metodo mediante HPLC (Schroeder, 1987).

BIBLIOGRAFIA

- Airey D., Sandars G. (1987) *Automated analysis of nutrients in seawater*. Rep. C.S.I.R.O. Mar. Lab., 166, 1-106.
- Aoki T., S. Uemura, M. Munemori (1986) *Continuous flow method for simultaneous determination of nitrate and ammonia in water*. *Envir. Sci. Technol.*, 20, 515-517.
- Armstrong F.A.J. (1963) *Determination of nitrate in water by ultraviolet spectrophotometry*. *Anal. Chem.*, 35, 1292-1294.
- Folkard A.R. (1978) *Automatic analysis of seawater nutrients*. *Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft*, 46, 1-23.
- Grasshoff K. (1983) *Determination of nitrate*. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 143-150.
- Hager S.W., Atlas E.L., Gordon L.I., Mantyla A.W., Park P.K. (1972) *A comparison at sea of manual and autoanalyzer analyses of phosphate, nitrate, silicate*. *Limnol. Oceanogr.*, 17, 931-937.
- Hansen H.P., Grasshoff K. (1983) *Automated chemical analysis*. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 347- 379.
- Hydes D.L., Hill N.C. (1985) *Determination of nitrate in seawater: nitrate to nitrite reduction with copper-cadmium alloy*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 21, 127-130.
- Itoh H., Shinboro Y. (1980) *Determination of anions in sea water by ion chromatography*. *Bunseki Kagaku*, 29, 239-243.
- Ivey J.P., Davies D.M. (1987) *Ion chromatographic determination of selected ions in Antarctic ice*. *Analytica Chim. Acta*, 194, 281-286.
- Jenkins D. (1968) *The differentiation, analysis, and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters*. *Advan. Chem. Ser.*, 73, 265-280.
- Johnson K.S., Petty R.L. (1983) *Determination of nitrate and nitrite in seawater by flow injection analysis*. *Limnol. Oceanogr.*, 28, 1260-1266.
- Jones M.N. (1984) *Nitrate reduction by shaking with cadmium. Alternative to cadmium columns*. *Water Res.*, 18, 643-646.
- Kremling K., Wenk A. (1986) *On the storage of dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate in Atlantic Ocean water samples*. *Meeresforsch.*, 31, 69-74.
- MacDonald R.W., McLaughlin F.A., Page J.S. (1980) *Nutrient storage by freezing: data report and statistical analysis*. *Pac. Mar. Sci. Rep.*, 80, 1-69.
- MacDonald R.W., McLaughlin F.A. (1982) *The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters*. *Water Res.*, 16, 95-104.
- Morris A.W., Riley J.P. (1963) *The determination of nitrate in sea water*. *Analytica Chim. Acta*, 29, 272-279.
- Motomizu S., Mikasa H., Toei K. (1987) *Fluorimetric determination of nitrate in natural waters with 3-amino-1,5-naphthalenedi-sulphonic acid in a flow-injection system*. *Analytica Chim. Acta*, 193, 343-347.
- Mourino C., Fraga F. (1985) *Determinacion de nitratos en agua de mar*. *Inv. Pesq.*, 49, 81-96.
- Nakashima S., Masakazu Y., Zenki M., Takahashi A., Toei K. (1983) *Spectrophotometric determination of nitrite in natural waters by flow injection analysis*. *Analytica Chim. Acta*, 155, 263-268.
- Nydhal F. (1976) *On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium*. *Talanta*, 23, 349-357.
- Olsen R.J. (1980) *Phosphate interference in the cadmium reduction analysis of nitrate*. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 758-760.
- Otsuki A. (1978) *A reactivation solution or a copperized cadmium column in the automatic determination of nitrate in natural waters*. *Analytica Chim. Acta*, 99, 375-377.
- Oudot C., Montel Y. (1988) *A high sensitivity method for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in sea water with a Technicon AutoAnalyzer II*. *Mar. Chem.*, 24, 239-252.
- Propp M.V., Propp L.N. (1979) *An improved reduction column for determination of nitrates in sea and fresh waters*. *Oceanology*, 19, 748-750.
- Rössner B., Behnert J., Kipplinger A. (1987) *Ion-chromatography in the routine analysis of water and environmental material*. *Z. Analyt. Chem.*, 327, 698-700.
- Schroeder D.C. (1987) *The analysis of nitrate in environmental samples by reversed-phase HPLC*. *J. Chromatog. Sci.*, 25, 405-408.
- Stainton M.P. (1974) *Simple, efficient reduction column for use in the automated determination of nitrate in water*. *Anal.*



Chem.,46, 1616-1616.

- Thayer G.W. (1970) *Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine waters*. Chesap. Sci., 11, 155-158.
- Weiss J. (1987) *Ion chromatography - a review of recent developments*. Z. Analyt. Chem., 327, 451-455.
- Willis R.B. (1980) *Reduction column for automated determination of nitrate and nitrite in water*. Anal. Chem., 52, 1376-1377.
- Zagatto E.A.G., Jacintho A.O., Moratti J., Bergamin H. (1980) *An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows*. Analytica Chim. Acta, 120, 399-403.

a cura di

Maurizio RIBERA D'ALCALÀ (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

Giulio CATALANO (CNR, Istituto Talassografico di Trieste)

Vincenzo SACCIOMO (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

modifiche a cura di Carla Rita FERRARI (ARPA Emilia Romagna)



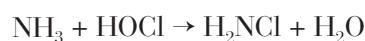
Ammoniaca

Tratto e modificato da: *NOVA THALASSIA, Vol. 11, pp. 151-160, 1990*

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo proposto si basa su una serie di reazioni, catalizzate fotochimicamente, che portano alla formazione del blu di indofenolo. La concentrazione del composto viene poi dosata per via colorimetrica. La prima applicazione analitica della formazione di indofenolo a partire da fenolo e ipoclorito risale a Berthelot (1859). Solo di recente sono stati approfonditi alcuni aspetti dei vari stadi della reazione (Patton e Crouch, 1977), che rimangono comunque non completamente chiariti.

Il primo stadio consiste nella formazione della monoclorammina secondo la reazione:



La formazione della monoclorammina predomina, rispetto a quella della di- e triclorammina, per valori di pH superiori a 7,5. In dettaglio, il massimo della velocità di formazione di questo composto intermedio si ha a pH 8, ma il pH ottimale per ottenere la massima concentrazione stabile risulta essere circa 10,5. A pH inferiori, infatti, la monoclorammina si decompone abbastanza rapidamente, mentre a pH superiori a 11,5 la sua formazione è troppo lenta per poter essere sfruttata in una metodica analitica (Patton e Crouch, 1977). Inoltre, a pH superiore a 11, l'ipoclorito ossida l'ammoniaca a nitrito (Richards e Kletsch, 1964).

Lo stadio successivo della reazione consiste nell'attacco della monoclorammina sull'anello benzenico del fenolo per formare, probabilmente, cloramminochinone. Questo è lo stadio più lento, e tuttora poco noto, della reazione. Lubochinsky e Zalta (1954) introdussero per primi l'uso di nitroprussiato, per accelerare la reazione. Patton e Crouch (1977) affermano che la specie chimica attiva non è il nitroprussiato, bensì l'acquapentacianoferrato, che si forma dal nitroprussiato o dal ferricianuro, ambedue comunemente usati per questa metodica. Questo sembra confermato dall'effetto catalizzatore della luce (Liddicoat *et al.*, 1975), perché l'acquapentacianoferrato si forma anche per irraggiamento ultravioletto del ferricianuro (Patton e Crouch, 1977; Catalano, 1987).

Infine il chinone, o comunque l'intermedio formatosi, produce indofenolo per copulazione con un altro fenolo. Questo stadio è strettamente dipendente dal pH, in quanto OH^- entra direttamente nella reazione. Il valore del pK di formazione oscilla intorno a 8÷9 (Koroleff, 1969), per cui per una buona resa è necessario, anche in questo caso, mantenere il pH al di sopra di 10. Per questo motivo, tutti i metodi che utilizzano fenolo e ipoclorito richiedono un ambiente avente pH intorno a 10,5 (Ivancic e Degobbi, 1984). Va rilevato che a questo pH gli ioni bivalenti presenti in acqua di mare precipitano in forma di idrossidi, rendendo necessaria la loro chelazione con un complessante, che di solito è citrato trisodico (Solorzano, 1969). Vi è inoltre da dire che un'eccessiva quantità di nitroprussiato, in presenza di luce, induce reazioni collaterali che portano alla formazione di indofenolo anche in assenza di ammoniaca (Gravitz e Gleye, 1975).

Infine, data l'importanza del controllo del pH nello sviluppo della reazione (Sasaki e Sawada, 1980), il significativo effetto salino (differente resa della reazione in acqua dolce o salata) che si manifesta in questa metodica (Koroleff, 1983) dipende in larga misura dalla capacità tampone della matrice del campione. Per tale motivo il metodo può essere applicato a campioni raccolti in ambienti estuari, dove sono forti le variazioni di alcalinità, tamponando adeguatamente la soluzione (Mantoura e Woodward, 1983).

Il metodo proposto è quello messo a punto da Catalano (1987).

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

Procedura di campionamento

Il prelievo va effettuato direttamente dalla bottiglia di campionamento seguendo quanto illustrato nella scheda *Ortofosfati*.

OPERAZIONI IN MARE**Attrezzatura:**

- bottiglie a chiusura ermetica in polietilene o altro materiale congelabile da 150 cm³ (o di volume doppio nel caso si intenda replicare l'analisi)
- apparato per la filtrazione del campione
- filtri in acetato di cellulosa con porosità dichiarata di 0,45 µm
- frigorifero o congelatore

Per quanto riguarda la filtrazione, occorre tener presente che l'ammoniaca si trova in forma gassosa nell'atmosfera, nei fumi ecc., per cui è preferibile filtrare sotto pressione, piuttosto che a mezzo di una depressione. Adoperare la stessa metodica suggerita per gli altri nutrienti, stando bene attenti ad effettuare la filtrazione in ambiente pulito e lontano da fumi o altre sorgenti inquinanti (vedi scheda *Ortofosfati*).

Conservazione dei campioni

- Conservare almeno 70 cm³ di campione per ogni replica che si intende effettuare in sede di analisi e 70 cm³ come eventuale riserva in caso di incidente nelle operazioni.
- È raccomandabile eseguire le analisi entro poche ore dal campionamento (Degobbis, 1973; Klingmann e Nelson, 1976; Koroleff, 1983), in quanto la conservazione dei campioni comporta sempre dei rischi a causa della rapidità con cui l'ammoniaca viene assimilata e/o escretata dagli organismi viventi (Marvin e Proctor, 1965; Thayer, 1970). Nel caso ciò non fosse possibile, i campioni filtrati devono essere congelati.
- Travasare il campione filtrato in una bottiglia di materiale congelabile, preventivamente sciacquata almeno due volte col campione, e congelare rapidamente a -20°C.
- I campioni, se analizzati entro pochi giorni dal prelievo, possono essere conservati anche a temperatura ambiente aggiungendo una quantità di fenolo pari a quella usata per l'analisi (Degobbis, 1973).

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Preparazione delle soluzioni stock**Acqua di mare artificiale (ASW)**

Sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 10 g di magnesio solfato eptaidrato, 31,3 g di sodio cloruro e 0,2 g di sodio bicarbonato in acqua deionizzata e portare a volume (la soluzione ha una salinità di 35).

In alternativa all'ASW, può essere utilizzata acqua di mare oligotrofica che sia stata stagionata per qualche settimana alla luce in recipienti di polietilene.

Fenolo-Etanol

Sciogliere, in un matraccio tarato da 100 cm³, 10 g di fenolo in etanol 95% e portare a volume. La soluzione, conservata in bottiglia scura al freddo, è stabile per una settimana.

Soluzione standard di ammonio cloruro 2 mmol/L

Sciogliere 0,107 g di ammonio cloruro in un matraccio tarato da 1 L (classe A) con acqua grado reagente e portare a volume. Aggiungere 1 cm³ di cloroformio e conservare in bottiglia di vetro scuro. La soluzione, ben tappata e conservata in luogo fresco, è stabile per alcuni mesi.

Preparazione di attrezzatura specifica per l'analisi**Trattamento dei recipienti di reazione**

Lavare accuratamente le bottiglie con miscela solfocromica,

OPERAZIONI IN LABORATORIO**Attrezzatura:**

- bottiglie da 125 cm³ (preferibilmente di Teflon FEP) o beute di vetro Pyrex
- vetreria da laboratorio per preparazioni chimiche
- dispenser automatici da 5 cm³ (ovvero, 2 da 2 cm³ e 1 da 5 cm³)
- matracci tarati da 100 cm³ e 1 L
- matracci tarati da 1 L classe A
- matracci tarati da 100 cm³ classe A
- box cilindrico (Ø 70-80 cm) internamente bianco, aperto superiormente per permettere una libera circolazione d'aria
- micropipette automatiche a volume regolabile da 10 a 100 mm³
- lampada a filamento da 300 W
- spettrofotometro o colorimetro sensibile ai 640 nm, dotato di cellette di almeno 50 mm di cammino ottico
- bilancia analitica



sciacquarle e conservarle riempite con acido cloridrico diluito.

→ PROCEDURA ANALITICA

Reagenti da preparare al momento dell'uso

Soluzione ossidante

Sciogliere in un beaker 0,2 g di sodio dicloroisocianurato diidrato in una soluzione di 1,6 g di sodio idrossido in 40 cm³ di acqua grado reagente, misurata con un cilindro graduato. A questa aggiungere una soluzione, preparata in un beaker, di 20 g di sodio citrato tribasico diidrato in 40 cm³ di acqua deionizzata, misurata in un cilindro graduato. Portare a volume in un matraccio tarato da 100 cm³ con acqua deionizzata. La soluzione va preparata al momento dell'uso.

Catalizzatore

Sciogliere, in un matraccio tarato da 100 cm³, 0,5 g di potassio ferrocianuro in acqua deionizzata e portare a volume. La soluzione va preparata al momento dell'uso e conservata in bottiglia scura.

Preparazione delle soluzioni standard

Preparare 5 soluzioni a concentrazione nota di ammoniaca diluendo, in matracci tarati da 100 cm³ (classe A), rispettivamente 10, 25, 50, 75 e 100 mm³ di soluzione standard di ammonio cloruro (misurati con una micropipetta di precisione) con acqua ASW. Le concentrazioni risultano così comprese tra 0,2 e 2,0 µmol/L, a meno dell'ammoniaca presente nella ASW.

Trattamento analitico

- Al momento dell'analisi, se il campione era stato congelato, scongelarlo rapidamente, possibilmente adoperando un bagno a 37°C o un forno a microonde.
- Sciacquare accuratamente le bottiglie di reazione con acqua grado reagente prima dell'uso.
- Sciacquare le bottiglie con un'aliquota dei campioni e delle soluzioni standard a diversa concentrazione.
- Riempire le bottiglie con 50 cm³ di campione e di ciascuna delle soluzioni standard (misurati con un cilindro graduato). È opportuno effettuare almeno due determinazioni per ciascun campione da analizzare.
- Aggiungere a ciascun campione e soluzione standard, mediante dispenser, 2 cm³ di fenolo-etanolo, 5 cm³ di soluzione ossidante e 2 cm³ di catalizzatore, rispettando rigorosamente l'ordine e mescolando ogni volta.
- Tappare le bottiglie ed allinearle lungo le pareti dei box.
- Illuminare il sistema per un'ora con una lampada al tungsteno da 300 W, posta a non meno di 35 cm dalle bottiglie al centro dei box, assicurandosi che all'interno vi sia circolazione d'aria. Alla fine del periodo di illuminazione, in attesa della lettura spettrofotometrica, i campioni e gli standards devono essere mantenuti al buio e a temperatura ambiente.

Preparazione dei bianchi dei reagenti

- Versare 50 cm³ di ASW in quattro bottiglie da 125 cm³.
- Aggiungere in due bottiglie, mediante dispenser, 2 cm³ di fenolo-etanolo, 5 cm³ di soluzione ossidante e 2 cm³ di catalizzatore, rispettando rigorosamente l'ordine e mescolando ogni volta. Nelle altre due bottiglie aggiungere una dose doppia degli stessi reagenti, seguendo la stessa procedura.
- Applicare la stessa procedura analitica adoperata per i campioni e per le soluzioni standard.

Dosaggio spettrofotometrico

- Misurare l'assorbanza a 640 nm del bianco ($b_{l,c,i}$) di ciascuna celletta dello spettrofotometro, o del colorimetro, usata per la lettura contro la celletta di riferimento, ambedue riempite con acqua senza reattivi. L'operazione è superflua se si opera con una sola cella.

OPERAZIONI IN LABORATORIO

Prodotti chimici:

- miscela solfocromica
- ammonio cloruro [NH₄Cl]
- magnesio solfato eptaidrato [MgSO₄ 7H₂O]
- fenolo [C₆H₅OH]
- etanolo 95% v/v [C₂H₅OH]
- sodio dicloroisocianurato diidrato [C₃N₃O₃Cl₂·Na⁺]
- sodio idrossido [NaOH]
- trisodio citrato tribasico diidrato [NaO₂CCH₂C(OH)(CO₂Na)CH₂CO₂Na 2H₂O]
- potassio ferrocianuro [K₃Fe(CN)₆]
- cloroformio [CH₃Cl]
- sodio cloruro [NaCl]
- sodio bicarbonato [NaHCO₃]
- acido cloridrico [HCl]

- Per ogni beuta registrare su un apposito foglio il numero della celletta adoperata e l'identificazione del contenuto della beuta (campione, soluzione standard, bianco). Sciacquare con parte del suo contenuto la celletta, riempirla e leggere l'assorbanza a 640 nm, registrando la lettura sullo stesso foglio. Il colore blu, per un valore iniziale di assorbanza di 0,200, decade alla velocità di circa 0,003 unità per ora.
- Il valore del bianco non deve essere superiore a 0,030 unità di assorbanza, altrimenti vi è un probabile inquinamento del bianco o dei reattivi.

→ CALCOLI

- Calcolare il bianco dei reagenti (bl) utilizzando la differenza media tra i valori dei bianchi contenenti una doppia dose di reagenti e di quelli contenenti una singola dose di reagenti.
- Calcolare la correlazione tra i valori delle assorbanze delle 5 soluzioni standard e le concentrazioni presunte, adoperando il metodo dell'asse maggiore ridotto. È consigliabile considerare come standard a concentrazione nulla di ammoniaca il campione di ASW cui si è aggiunta una sola dose delle soluzioni reagenti (vedi "Preparazione dei bianchi dei reagenti"). In tal modo si ottengono in totale 6 soluzioni standard che coprono un intervallo di concentrazioni pari a 2,0 µmol/L.
- Calcolare la concentrazione dell'ammoniaca nei campioni applicando la seguente formula:

$$[\text{NH}_4^+] = (\text{ABS} - \text{bl} - \text{bl}_{c,i}) f$$

dove:

$[\text{NH}_4^+]$ = concentrazione dell'ammoniaca (espressa in µmol/L)

ABS = assorbanza del campione

bl = bianco dei reagenti

$\text{bl}_{c,i}$ = bianco della cella i-esima adoperata

f = fattore colorimetrico

I risultati saranno espressi in µmol/L.

Il limite di determinazione è pari a 0,10 µmol/L, ovvero a 1,4 µg/L.

Per una cella di 50 mm di cammino ottico e per campioni aventi salinità di circa 35, il fattore colorimetrico è pari a circa a 9,2 µmol/L, ovvero una differenza in concentrazione di 1 µmol/L (ad esempio tra la soluzione standard 3 e la 5) dovrebbe risultare in una differenza in assorbanza pari a circa 0,11.

→ RACCOMANDAZIONI

- Il metodo è sensibilissimo agli effetti di una possibile contaminazione della vetreria o dei reagenti, per cui si raccomanda di attenersi scrupolosamente alle indicazioni date circa il lavaggio della vetreria e di usare i prodotti chimici consigliati.
- È essenziale garantire che l'ambiente di lavoro sia privo di fumi e che non vi siano nelle vicinanze reagenti che possano liberare ammoniaca.

→ PROBLEMI POSSIBILI

- Se il valore dei bianchi risulta troppo elevato, la causa è da attribuirsi all'inquinamento della vetreria, dell'acqua grado reagente oppure dei reagenti. Non rimane in tal caso che ripetere la procedura, affrontando questi problemi dal più semplice al più tedioso e ripreparando, se è il caso, anche tutti i reagenti.
- Se la reazione presenta una bassa efficienza, occorre controllare il pH finale, che dovrebbe essere compreso tra 10,5 e 11. In caso contrario, è necessario usare un appropriato tampone (Mantoura e Woodward, 1983).
- Non risultano esserci interferenze nel metodo proposto, che è specifico per l'ammoniaca (Zadorojni *et al.*, 1973). Tuttavia campioni contenenti più di 2 mg/L di solfuro dovrebbero essere diluiti o trattati in modo da rimuovere il solfuro (Koroleff, 1983; Airey *et al.*, 1984).

→ ALTRI METODI

Esistono numerose metodiche alternative, sempre basate su reazioni che portano alla formazione di indofenolo.



Il metodo introdotto da Koroleff (1969) prevede un tempo di reazione lungo e quindi una lettura lontana dall'inoculazione dei reattivi. È pertanto consigliabile per analisi di campioni raccolti su base giornaliera. Koroleff (1983) suggerisce l'uso di una stufa per accelerare la reazione.

Bower e Holm-Hansen (1980) hanno proposto un metodo che prevede l'uso di salicilato, che presenta il vantaggio di adoperare reagenti meno tossici e volatili.

Esistono poi le metodiche basate su sistemi automatici, che presentano il vantaggio di far aumentare la velocità delle analisi e di limitare l'inquinamento dei campioni. Tali metodiche non sono però molto diffuse a causa del costo delle attrezzature. Per sistemi tipo AutoAnalyzer, consultare Grasshoff e Johannsen (1972), Johannsen (1972), Slawyk e MacIsaac (1972), Berg e Abdullah (1977), Folkard (1978), Le Corre e Treguer (1978), Helder e De Vries (1979), Crowther e Evans (1980), Mantoura e Woodward (1983), Airey e Sandars (1987). Per i sistemi tipo FIA (Flow Injection Analysis) consultare Kurashina *et al.* (1979), Rios *et al.* (1986), Kraus e Crouch (1987), Yuan (1987).

Un certo interesse riveste anche il lavoro di Gardner (1978), che propone un metodo semimanuale applicabile a volumi di campione inferiori a 1 cm³.

Si possono infine adoperare elettrodi selettivi, quando non sia richiesta un'alta accuratezza (Mercks, 1975; Simenov, 1980; Walters *et al.*, 1984; Hara *et al.*, 1987).

BIBLIOGRAFIA

- Airey D., Dal Pont G., Sandars G. (1984) *Method of determining and removing sulphide to allow the determinations of sulphate, phosphate, nitrite and ammonia by conventional methods in small volumes of anoxic water.* Analytica chim. Acta, 166, 79-92.
- Airey D., Sandars G. (1987) *Automated analysis of nutrients in seawater.* Rep. CSIRO Mar. Lab., 166,1-106.
- Berg B.R., Abdullah M.I. (1977) *An automatic method for the determination of ammonia in seawater.* Water Res., 11, 637-638.
- Berthelot, M.P. (1859) *Repertoire de Chimie Appliquée*, pp. 284.
- Bower C.E., Holm-Hansen O. (1980) *A salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater.* Can. J. Aquat. Sci., 37, 794-798.
- Catalano G. (1987) *An improved method for the determination of ammonia in seawater.* Mar. Chem., 20, 289-295.
- Crowther J., Evans J. (1980) *Blanking system for the spectrophotometric determination of ammonia in surface waters.* Analyst, 105, 849-854.
- Degobbi D. (1973) *On the storage of seawater samples for ammonia determination.* Limnol. Oceanogr., 18, 146-150.
- Folkard A.R. (1978) *Automatic analysis of seawater nutrients.* Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowesloft (UK), 46,1-23.
- Gardner W.S. (1978) *Microfluorimetric method to measure ammonium in natural waters.* Limnol. Oceanogr., 23, 1069-1072.
- Grasshoff K., Johannsen H. (1972) *A new automatic and direct method for the automatic determination of ammonia in sea water.* J. Cons. Int. Explor. Mer, 34, 516-521.
- Gravit N., Gleye L. (1975) *A photochemical side reaction that interferes with phenolhypochlorite assay for ammonia.* Limnol Oceanogr., 20, 1015-1017.
- Hara H., Moitoke A., Okazaki S. (1987) *Alternate washing method for flowthrough determination of ammonium ion using an ammonia gas electrode.* Anal. Chem., 59,1995-1999.
- Helder W., De Vries R.T.P. (1979) *An automatic phenohypochlorite method for the determination of ammonia in sea- and brackish waters.* Neth. J. Sea Res., 13,154-160.
- Ivancic I., Degobbi D. (1984) *An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by indophenol blue method.* Water Res., 18, 1143-1147.
- Johannsen H. (1972) *A new sensitive and direct method for the automatic determination of ammonia in seawater.* J. Cons. C.I.E.M., 34, 516-521.
- Klingaman E.R., Nelson D.W. (1976) *Evaluation of methods for preserving the levels of soluble inorganic phosphorus and nitrogen in unfiltered water samples.* J. Envir. Qual., 5, 42-46.
- Koroleff F. (1969) *Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue.* ICES paper, C.M./C., 9,19-22.
- Koroleff F. (1983) *Determination of ammonia.* In: "Methods of seawater analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremfing Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 150-175.
- Kraus P.R., S.R. Crouch (1987) *Investigation of a chemiluminescent system for determination of ammonia by flow-injection analysis.* Anal. Lett., 20, 183-200.
- Kurashina S., Hishida M., Ueno Y., Imoto T. (1979) *An investigation of the coastal environment with a consecutive-automatic analyzer (CAA).* Rep. Hydrogr. Res. 14, 39-48.
- Le Corre O., Treguer P. (1978) *Dosage de l'ammonium dans l'eau de mer: comparaison entre deux methodes d'analyse automatique.* J. Con. C.I.E.M., 38, 147-153.
- Liddicoat M.I., Tibbitts S., Butler E.I. (1975) *The determination of ammonia in seawater.* Limnol. Oceanogr., 20, 131-132.
- Lubochinsky B., Zalta J. (1954) *Microdosage colorimetricque de l'azote ammoniacal.* Bull. Soc. Chim. Biol., 36, 1363-1366.



- Mantoura R.F.C., Woodward E.M.S. (1983) *Optimization of the indophenol blue method for the automated determination of ammonia in estuarine water*. Eustar. Coast. Shelf, Sci., 17, 219-229.
- Marvin K.T., Proctor R.R. Jr. (1965) *Stabilizing the ammonia-nitrogen content of estuarine and coastal water by freezing*. Limnol. Oceanogr., 10, 288-290.
- Merks A.G.A. (1975) *Determination of ammonia in sea water with an ion-selective electrode*. Neth. J. Sea Res. 9, 371-375.
- Patton J.C., Crouch S.R. (1977) *Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia*. Anal. Chem., 49, 464-469.
- Richards F.A., Kletsch R.A. (1964) *The spectrophotometric determination of ammonia and labile amino compounds in fresh and seawater by oxidation to nitrite*. In: "Recent research in the fields of hydrosphere, atmosphere and nuclear geochemistry", Miyake Y., T. Koyama Eds., Maruzen Co. Tokio, 65-81.
- Rios A., Luque de Castro M.D., Valcárcel M. (1986) *Simultaneous flow-injection fluorimetric determination of ammonia and hydrazine with a novel mode of forming pH gradients*. Analytica Chim. Acta, 187, 139-145.
- Sasaki K., Sawada Y. (1980) *Determination of ammonia in estuary*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 46, 319-321.
- Simenov V. (1980) *Critical consideration on the practical application of Orion ion-sensitive electrodes to sea and other natural water samples*. Z. Anal. Chem., 301, 290-293.
- Slawyk G., MacIsaac M. (1972) *Comparison of two automated ammonium methods in a region of coastal upwelling*. Deep-Sea Res., 19, 521-524.
- Solorzano L. (1969) *Determination of ammonia in natural waters by phenylhypochlorite method*. Limnol. Oceanogr., 14, 799-801.
- Thayer G.W. (1970) *Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine water*. Chesap. Sci., 11, 155-158.
- Walters F.H., Griffin K.B., Keeley D.F. (1984) *Use of ammonia-sensing electrodes in salt media*. Analyst, 109, 663-665.
- Yuan Y. (1987) *Merging-zone flow-injection analysis of nitrite-nitrogen and ammonia-nitrogen in natural waters*. Fenxi Huaxue, 15, 454-457.
- Zadorojny C., Saxton S., Finger R. (1973) *Spectrophotometric determination of ammonia*. J. Water Poll. Control Fed., 45, 905-912.

a cura di

Giulio CATALANO (CNR, Istituto Talassografico di Trieste)

Maurizio RIBERA D'ALCALÀ (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

Vincenzo SACCIOMO (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

modifiche a cura di Carla Rita FERRARI (ARPA Emilia Romagna)



Silicati

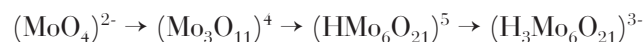
Tratto e modificato da: *NOVA THALASSIA, Vol. 11, pp. 161-170, 1990*

→ PRINCIPIO DEL METODO

La determinazione dei silicati disciolti viene effettuata inducendo la formazione di un poliacido silicomolibdico che viene successivamente ridotto a blu di molibdeno. Il composto finale ha un massimo di assorbanza a 810 nm, e viene dosato per via colorimetrica.

La catena di reazioni è fortemente influenzata da variazioni anche minime delle condizioni di reazione a causa della molteplicità dei prodotti intermedi e della loro instabilità. Presentiamo perciò solo un quadro sintetico del processo utilizzato e dei fattori che influenzano le reazioni implicate.

Lo ione molibdato in ambiente acquoso dà luogo alla formazione di numerosi poliacidi polisomeri. Con il diminuire del pH, le forme più abbondanti seguono una sequenza di equilibri del tipo

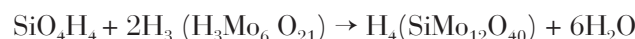


(Garrett e Walker, 1964), rendendo il pH una variabile essenziale nel determinare il tipo di polimero molibdico presente in maggiore quantità.

L'acido silicomolibdico si forma con differente velocità in relazione al grado di polimerizzazione del silicato. I trimeri infatti hanno un tempo di formazione circa cento volte più lungo dei monomeri (Mullin e Riley, 1955). Il grado di polimerizzazione dipende a sua volta dal pH, aumentando in ambiente acido, e dal trattamento subito dalla soluzione.

L'acido silicomolibdico esiste in almeno due isomeri α e β (Strickland, 1952 a, b, c; Morrison e Wilson, 1963 a, b, c; Garrett e Walker, 1964; Scott, 1975; Truesdale e Smith, 1975), di cui il primo è termodinamicamente più stabile ma sfavorito cineticamente a valori di pH minori di 2.

Secondo Grasshoff (1964) la reazione di formazione è una reazione reversibile che procede secondo l'equilibrio:



Il prodotto di reazione dipende fortemente dal pH e dalle concentrazioni dei reagenti in quanto il tipo di cinetica muta anche in relazione alla concentrazione del molibdato (Garrett e Walker, 1964). Inoltre la forma β si trasforma lentamente nella forma α anche a pH bassi.

I due isomeri α e β dell'acido silicomolibdico presentano un picco di massima assorbanza nella parte blu dello spettro, ma con coefficienti di estinzione piuttosto diversi, nessuno dei quali particolarmente elevato. Per le ragioni dette in precedenza, inoltre, essi non garantiscono sufficiente stabilità nel tempo. Questa affermazione è però contraddetta da Grasshoff (1964), che suggerisce un metodo per produrre l'isomero α in condizioni da mantenerlo stabile per almeno 24 ore.

La successiva riduzione dell'isomero β ad opera del solfato di p-metilamminofenolo (metolo) in ambiente acido e in presenza di solfito produce un blu di molibdeno stabile per almeno 2 ore dal completamento della reazione (Mullin e Riley, 1955).

Anche in questo processo è importante il controllo del pH per evitare una riduzione, diretta del molibdato in eccesso ad opera del metolo.

Tutte le reazioni sopra schematizzate dipendono sia dalla forza ionica della soluzione che dalla presenza di specifici ioni, specie quelli bivalenti; pertanto la concentrazione del prodotto finale e forse anche la sua estinzione molare dipendono dalla concentrazione salina del miscuglio di reazione e, di conseguenza,



del campione. La formazione di poliacidi con il molibdato, infatti, è caratteristica anche di altri ioni, in particolare fosfato e arseniato (Boltz e Mellon, 1947; Cotton e Wilkinson, 1968); per evitare le interferenze dei fosfomolibdati, questi possono essere eliminati con acido ossalico (Strickland e Parsons, 1968).

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

Procedura di campionamento

Il prelievo va effettuato direttamente dalla bottiglia di campionamento nel più breve tempo possibile seguendo quanto illustrato nella scheda *Ortofosfati*.

Conservazione dei campioni

- Conservare almeno 40 cm³ di campione per ogni replica che si intende effettuare in sede di analisi e 40 cm³ come eventuale riserva in caso di incidente nelle operazioni.
- Rispetto agli altri nutrienti, i silicati presentano minori problemi di conservazione. Se si tratta di campioni di acque profonde, è sufficiente conservarli in un recipiente di plastica, lontano dalla luce. Tuttavia, nel caso di campioni superficiali, può essere preferibile il congelamento entro qualche ora dal prelievo, se l'analisi non viene effettuata entro 6 ore.
- Travasare il campione filtrato in una bottiglia di materiale congelabile, sciacquata almeno due volte col campione stesso, e congelare rapidamente a -20°C.

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Preparazione delle soluzioni stock

Reagente molibdato

Sciogliere 4,0 g di ammonio molibdato eptaidrato (preferibilmente cristallino) in circa 300 cm³ di acqua grado reagente. Diluire 12 cm³ di acido cloridrico concentrato in 100-150 cm³ di acqua grado reagente, mescolando bene. Sotto agitazione, diluire la soluzione di molibdato in quella di acido cloridrico. Portare la soluzione ottenuta a volume in un matraccio da 500 cm³ con acqua grado reagente.

Conservare in una bottiglia di polietilene, lontano dalla luce e non refrigerato. Il reagente non è più utilizzabile quando si forma un precipitato bianco o assume una colorazione blu. In condizioni normali è stabile per molti mesi.

Soluzione di metolo e solfito

Sciogliere 6 g di sodio solfito anidro in 400 cm³ di acqua grado reagente e aggiungere 10 g di metolo agitando fino alla sua completa dissoluzione. Filtrare su filtro di carta Whatman n. 1, preventivamente sciacquato con acqua grado reagente, e portare a volume in un matraccio da 500 cm³. Conservare in bottiglia di vetro borosilicato ben chiusa.

Questo reattivo non è molto stabile e pertanto non va conservato per più di un mese.

Soluzione di acido ossalico

Preparare una soluzione satura di acido ossalico sciogliendo 50 g di acido in 400 cm³ di acqua grado reagente. Decantare la soluzione separandola dai cristalli residui e portare a volume in un matraccio da 500 cm³. Conservare la soluzione in bottiglia di polietilene.

Il reagente è stabile indefinitamente.

OPERAZIONI IN MARE

Attrezzatura:

- bottiglie a chiusura ermetica in polietilene o altro materiale congelabile da 100 cm³ (o di volume doppio nel caso si intenda replicare l'analisi)
- apparato per la filtrazione del campione
- filtri in acetato di cellulosa di porosità dichiarata di 0,45 µm
- frigorifero o congelatore

OPERAZIONI IN LABORATORIO

Attrezzatura:

- cilindro o pipetta da 25 cm³, preferibilmente in plastica
- contenitori in materiale plastico da 50 cm³ (preferibilmente beute o bottiglie con tappo in polietilene o trimetilpentene)
- vetreria da laboratorio per preparazioni chimiche
- dispenser automatici o pipette da 10 e 15 cm³
- filtri di carta Whatman n. 1
- matracci tarati da 500 cm³
- matracci tarati da 100 cm³ classe A
- matraccio tarato da 1 L classe A
- micropipette di precisione per misurare volumi compresi nell'intervallo di 10-100 mm³
- spettrofotometro o colorimetro sensibile a 810 nm, che disponga di cellette di almeno 50 mm di cammino ottico
- crogiolo di platino
- agitatore
- bilancia analitica
- stufa
- essiccatore



Soluzione di acido solforico 50% (v/v)

Versare lentamente e sotto agitazione 250 cm³ di acido solforico concentrato in 250 cm³ di acqua grado reagente. Raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume con acqua grado reagente in un matraccio da 500 cm³. La soluzione, conservata in un contenitore di plastica scura, è stabile indefinitamente.

Soluzione standard di silicato 10 mmol/L

Riscaldare la silice pura a 1000°C, raffreddarla in un essiccatore e controllare con pesate ripetute che il composto abbia peso costante. Pesare 601,0 mg di silice (la quantità teorica corrispondente a 10 mmol di Si) in un crogiolo di platino e aggiungere 1,5 g di carbonato di sodio anidro. Mescolare con un spatola metallica e fondere, fino a completa omogeneizzazione, ad una temperatura di 1000°C. Mantenere il prodotto fuso a 1000°C fino a che non diviene chiaro. Raffreddare e sciogliere in più porzioni di acqua molto calda, trasferendole, dopo raffreddamento, in un matraccio da 1 L (classe A). Portare a volume con acqua grado reagente e trasferire rapidamente in una bottiglia di polietilene ad alta densità. La soluzione è stabile per alcuni mesi.

In alternativa, è possibile adoperare del sodio esafluorosilicato, dopo averlo essiccato in stufa a 105°C per un'ora in un crogiolo metallico. In questo caso, data la bassa solubilità, è preferibile preparare soluzioni di concentrazioni non superiori a 2 mmol/L, per cui le diluizioni andranno corrette proporzionalmente. Poiché il prodotto non è a tutt'oggi fornito in purezza analitica, la quantità da pesare va calcolata sulla base delle indicazioni di purezza del fornitore (12075,22 mg purezza dichiarata per una soluzione 2,0 mmol/L). Dissolvere il sodio esafluorosilicato in 700 cm³ di acqua grado reagente in un contenitore di plastica, sotto leggero riscaldamento, e trasferire la soluzione in un matraccio da 1 L (classe A). Il tempo di dissoluzione dipende molto dalla forma cristallina del prodotto e può essere necessaria anche qualche ora. Portare a volume e travasare rapidamente in una bottiglia di plastica per evitare che il fluoruro asporti silicio dal vetro. La soluzione è stabile per alcuni mesi.

Preparazione di attrezzatura specifica per l'analisi

Trattamento dei recipienti di reazione

Lavare con miscela solfocromica i contenitori di polietilene o trimetilpentene da 50 cm³, sciacquarli abbondantemente con acqua grado reagente ed asciugarli. Per l'ordinaria manutenzione è sufficiente, dopo l'uso, sciacquarli con acqua grado reagente e riporli a testa in giù su carta filtro.

→ PROCEDURA ANALITICA

Reagenti da preparare al momento dell'uso

Reagente riducente

Mescolare 100 cm³ di soluzione di metolo e solfito con 60 cm³ di soluzione di acido ossalico. Aggiungere lentamente 60 cm³ di acido solforico al 50% e portare il volume della soluzione a 300 cm³ in un cilindro con acqua grado reagente. Questo reagente va preparato immediatamente prima dell'uso.

Preparazione delle soluzioni standard

Preparare 5 soluzioni a concentrazione nota di silicato diluendo, in matracci da 100 cm³ (classe A), rispettivamente 10, 25, 50, 75, 100 mm³ di soluzione standard di silicato (misurati con una micropipetta di precisione) con acqua di mare oligotrofica. Le concentrazioni risultano così comprese tra 1 e 10 µmol/L in silicato, a meno del contenuto in silicati dell'acqua oligotrofica.

Trattamento analitico

- Al momento dell'analisi, se il campione era stato congelato, scongelarlo lentamente e, tenendolo lontano dalla luce, non analizzarlo prima di 12 ore, per dar tempo alle forme polimeriche di silicati di depolimerizzarsi.

OPERAZIONI IN LABORATORIO

Prodotti chimici:

- miscela solfocromica
- acido solforico concentrato [H₂SO₄]
- acido cloridrico concentrato [HCl]
- ammonio molibdato eptaidrato [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O]
- acido ossalico [C₂H₂O₄·2H₂O]
- 4-metilamminofenolo solfato (metolo) [(CH₃NHC₆H₄OH)₂·H₂SO₄]
- sodio solfito anidro [Na₂SO₃]
- silice in polvere [SiO₂] e sodio carbonato anidro [Na₂CO₃]
(in alternativa, sodio esafluorosilicato [Na₂SiF₆])

- Versare (adoperando un dispenser) 10 cm³ di reattivo molibdico nel contenitore e aggiungere, agitando, 25 cm³ di campione o di ciascuna delle soluzioni standard (misurati con un cilindro graduato).
- Lasciar reagire per almeno 15 minuti ma non oltre i 30 minuti, rispettando gli stessi tempi per tutti i campioni e per gli standards di calibrazione.
- Aggiungere con un dispenser 15 cm³ di reagente riducente mescolando bene e lasciar reagire per almeno 1 ora. Anche in questo caso è importante rispettare gli stessi tempi di reazione per tutto il gruppo di campioni.

Preparazione dei bianchi dei reagenti

Preparare in contenitori da 50 cm³ di polietilene almeno due replicati di bianchi dei reagenti, utilizzando 25 cm³ di acqua di mare oligotrofica. I bianchi vanno quindi trattati con la stessa procedura analitica applicata ai campioni e agli standards.

Il valore del bianco può in alcuni casi risultare troppo alto a causa di un'elevata concentrazione di silicati nell'acqua oligotrofica. In tal caso è consigliabile rimuoverli (Novoselov *et al.*, 1976) o preparare i bianchi con acqua grado reagente.

Dosaggio spettrofotometrico

- Misurare l'assorbanza a 810 nm del bianco ($bl_{c,i}$) di ciascuna celletta dello spettrofotometro, o del colorimetro, usata per la lettura contro la celletta riferimento, ambedue riempite con acqua senza reattivi. L'operazione è superflua se si opera con una sola cella.
- Per ogni beuta registrare su un apposito foglio il numero della celletta adoperata e l'identificazione del contenuto della beuta (campione, soluzione standard, bianco). Sciacquare con parte del suo contenuto la celletta, riempirla e leggere l'assorbanza a 882 nm, registrando la lettura sullo stesso foglio.

→ CALCOLI

- Calcolare il bianco dei reagenti (bl) come media delle due letture effettuate sui bianchi.
- Calcolare la correlazione tra i valori delle assorbanze delle 5 soluzioni standard e le concentrazioni presunte, adoperando il metodo dell'asse maggiore ridotto. Il coefficiente angolare sarà il fattore colorimetrico (f).
- Calcolare la concentrazione di silicati nei campioni applicando la seguente formula:

$$[SiO_4^-] = (ABS - bl - bl_{c,i}) \cdot f$$

dove:

$[SiO_4^-]$ = concentrazione dei silicati (espressa in $\mu\text{mol/L}$)

ABS = assorbanza del campione

bl = bianco dei reagenti

$bl_{c,i}$ = bianco della cella i -esima adoperata

f = fattore colorimetrico

Per una cella di 50 mm di cammino ottico, il fattore colorimetrico è pari a circa 19 $\mu\text{mol/L}$ ovvero per una differenza di 10 $\mu\text{mol/L}$ (come ad esempio tra l'acqua usata per diluire le soluzioni standard e lo standard 5) la differenza in assorbanza dovrebbe essere pari a circa 0,52 nel caso di campioni con salinità di 37.

I risultati saranno espressi in $\mu\text{mol/L}$.

Il limite di determinazione è pari a 0,10 $\mu\text{mol/L}$, ovvero a 2,81 $\mu\text{g/L}$.

→ RACCOMANDAZIONI

- Come già detto, dopo lo scongelamento, lasciare riposare il campione almeno 12 ore a temperatura ambiente per favorire la depolimerizzazione dei silicati. Il congelamento infatti favorisce la polimerizzazione, che può causare una sottostima della concentrazione dei silicati reattivi (Burton e Leatherland, 1970; MacDonald e McLaughlin, 1980, 1982; Kremling e Wenck, 1986; MacDonald *et al.*, 1986).
- Aggiungere il campione al reattivo molibdico, e non viceversa, così da garantire un valore di pH corretto.
- Mantenere, durante l'analisi, tutti i campioni alla stessa temperatura, possibilmente intorno ai 20°C, per evitare una variabilità dipendente dal coefficiente termico della reazione.



- Preparare gli standards di calibrazione adoperando acqua di mare con salinità uguale a quella dei campioni. Se si lavora in ambiente estuariale, preparare una serie di standards che coprano la gamma di valori di salinità riscontrata nei campioni. Il coefficiente salino (rapporto tra il valore del fattore colorimetrico in acqua grado reagente ed in acqua salata) è piuttosto variabile: per acqua con salinità intorno a 35 esso ha un valore di circa 0,85 (Bien, 1958; Fanning e Pilson, 1973; Koroleff, 1983).

→ PROBLEMI POSSIBILI

- Una resa anomala della reazione dipende quasi sempre da valori di pH che si discostano molto da 2 o da cattiva manipolazione. Verificare che il pH nella miscela finale sia compreso tra 1,8 e 2,2. Talvolta un cattivo mescolamento della miscela di reazione, oltre che ad uno scorretto valore dei pH, può portare alla formazione di un colore blu dovuto alla riduzione diretta del molibdato e non a quella dei poliacidi.
- Il metodo suggerito è in genere esente, per l'acqua di mare, da interferenze. Tuttavia cationi quali rame, ferro, cobalto e nichel interferiscono per il colore dei loro ioni. In questo caso si rende necessaria la misura dell'assorbanza del campione alla stessa lunghezza d'onda senza l'aggiunta dei reattivi ed il valore di questa lettura dev'essere addizionato al bianco dei reagenti. Nel caso siano presenti ioni ferro, che formano, nel corso della reazione, molibdato ferrico, occorre anche aggiungere ai campioni una soluzione di idrocloruro di idrossilammina (Mullin e Riley, 1955) prima dell'analisi. I solfuri, se presenti in concentrazione inferiore ai 5 mg/L, non influenzano lo sviluppo del colore. Altrimenti devono essere ossidati con acqua di bromo (Koroleff, 1983).

→ ALTRI METODI

Una maggiore sensibilità del metodo può essere ottenuta adottando le modifiche proposte da Koroleff (1983).

Nell'ambito del metodo colorimetrico esistono poi due principali alternative. La prima consiste nel dosaggio del poliacido non ridotto, soprattutto la forma α che è quella termodinamicamente più stabile (Grasshoff, 1964). La reazione chimica è più semplice, l'effetto salino è trascurabile ed il prodotto è più stabile. Lo svantaggio principale consiste nella bassa sensibilità del metodo (circa 1/6 del metodo proposto). La seconda alternativa si basa sull'uso del cloruro stannoso come riducente e dell'acido tartarico per l'eliminazione del complesso fosfomolibdico (Armstrong, 1952). I vantaggi di questo metodo consistono nella più alta velocità di reazione, nella maggiore stabilità nell'arco delle 24 ore della soluzione riducente e nel valore leggermente più alto del coefficiente di estinzione molare. Lo svantaggio principale è rappresentato invece dal rapido decadimento del prodotto colorato.

Le analisi a flusso continuo segmentato (Brewer e Riley, 1966; Hager *et al.*, 1972; Folkard, 1978; Hansen e Grasshoff, 1983) presentano il vantaggio di un'alta riproducibilità dei risultati e di una elevata velocità di analisi. L'unico svantaggio è rappresentato dal costo elevato delle apparecchiature.

Altre tecniche alternative sono: la tecnica FIA (Flow Injection Analysis) (Van Staden, 1987), l'analisi per cromatografia e dosaggio conduttometrico (Itoh e Shinboro, 1980; Ivey e Davies, 1987; Rössner *et al.*, 1987; Weiss, 1987) ed una tecnica per assorbimento atomico (Voinovitch e Druon, 1986). Queste due ultime richiedono l'utilizzazione di una costosa apparecchiatura.

BIBLIOGRAFIA

- Armstrong F.A.J. (1952) *The determination of silicate in sea water*. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 30, 149-160.
- Bien G.S. (1958) *Salt effect correction in determining soluble silica in sea water silicomolybdic acid method*. Anal. Chem., 30, 1525-1526.
- Boltz D.F., Mellon M.G. (1947) *Determination of phosphorus, germanium, silicon, and arsenic by the heteropolyblue method*. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 19, 873-877.
- Brewer P.G., Riley J.P. (1966) *The automatic determination of silicate-silicon in natural waters with special reference to sea water*. Analytica Chim. Acta, 35, 514-519.
- Burton J.D., Leatherland T.M. (1970) *The reactivity of dissolved silicon in some natural waters*. Limnol. Oceanogr., 15, 473-476.
- Cotton F.A., Wilkinson G. (1968) *Gli elementi della seconda e terza serie di transizione*. In: "Chimica Inorganica", C. Ed. Ambrosiana, Milano, 917-1059.
- Fanning K.A., Pilson M.E.Q. (1973) *On the spectrophotometric determination of dissolved silica in natural waters*. Anal. Chem., 45, 136-140.
- Folkard A.R. (1978) *Automatic analysis of seawater nutrients*. Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft, 46, 1-23.

- Garrett H.E., Walker A.J. (1964) *The spectrophotometric determination of silicic acid in dilute solution*. Analyst, 89, 642-650.
- Grasshoff K. (1964) *On the determination of silica in sea water*. Deep-Sea Res., 11, 597-604.
- Hager S.W., Atlas E.L., Gordon L.I., Mantyla A.W., Park P.K. (1972) *A comparison at sea of manual and autoanalyzer analyses of phosphate, nitrate, silicate*. Limnol. Oceanogr., 17, 931-937.
- Hansen H.P., Grasshoff K. (1983) *Automated chemical analysis*. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 347-379.
- Itoh H., Shinboro Y. (1980) *Determination of anions in sea water by ion chromatography*. Bunseki Kagaku, 29, 239-243.
- Ivey J.P., Davies D.M. (1987) *Ion chromatographic determination of selected ions in Antarctic ice*. Analytica Chim. Acta, 194, 281-286.
- Koroleff F. (1983) *Determination of silicon*. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 174-183.
- Kremling K., Wenck A. (1986) *On the storage of dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate in Atlantic Ocean water samples*. Meeresforsch., 31, 69-74.
- MacDonald R.W., McLaughlin F.A., Page J.S. (1980) *Nutrient storage by freezing: data report and statistical analysis*. Pac. Mar. Sci. Rep., 80, 1-69.
- MacDonald R.W., McLaughlin F.A. (1982) *The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters*. Water Res., 16, 95-104.
- MacDonald R.W., McLaughlin F.A., Wong C.S. (1986) *The storage of reactive silicate samples by freezing*. Limnol. Oceanogr., 31, 1139-1142.
- Morrison I.R., Wilson A.L. (1963a) *The absorptiometric determination of silicon in water. Part I. Formation, stability and reduction of β - and α -molybdosilicic acids*. Analyst, 88, 88-99.
- Morrison I.R., Wilson A.L. (1963b) *The absorptiometric determination of silicon in water. Part II. Method for determining "reactive" silicon in power-stations waters*. Analyst, 88, 100-104.
- Morrison I.R., Wilson A.L. (1963c) *The absorptiometric determination of silicon in water. Part III. Method for determining the total silicon content*. Analyst, 88, 446-455.
- Mullin J.B., Riley J.P. (1955) *The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters*. Analytica Chim. Acta, 12, 162-176.
- Novoselov A.A., Sheremet'Yeva A.I., Danilenko A.F. (1976) *Method for simultaneous obtaining silicon-free and phosphate-free sea water aboard ship*. Oceanology, 16, 358-359.
- Rössner B., Behnert J., Kipplinger A. (1987) *Ion-chromatography in the routine analysis of water and environmental material*. Z. Analyt. Chem., 327, 698-700.
- Scott B.D. (1975) *Reactive silicate in seawater. A comparison of the reduced alpha and beta molybdosilicic acid methods of spectrophotometric analysis*. C.S.I.R.O. Aust. Div. Fish. Oceanogr. Report, 65, 1-10.
- Strickland J.D.H. (1952a) *The preparation and properties of silicomolybdic acid I. The properties of alpha silicomolybdic acid*. J. Amer. Chem. Soc., 862-867.
- Strickland J.D.H. (1952b) *The preparation and properties of silicomolybdic acid. II. The preparation and properties of alpha silicomolybdic acid*. J. Amer. Chem. Soc., 74, 868-871.
- Strickland J.D.H. (1952c) *The preparation and properties of silicomolybdic acid. III. The combination of silicate and molybdate*. J. Amer. Chem. Soc., 872-876.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1968) *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Bull. Fish. Res. Board Can., 167, 1-312.
- Truesdale V.W., Smith C.J. (1975) *The formation of molybdosilicic acids from mixed solutions of molybdate and silicate*. Analyst, 100, 203-212.
- Van Staden J.F. (1987) *Flow-injection analysis of substances in water. I. Anions. A critical review*. Water S.A., 13, 197-208.
- Voinovitch I.A., Druon M. (1986) *Methode generale d'analyse des silicates par spectrometrie d'absorption atomique*. Analusis, 14, 87-94.
- Weiss J. (1987) *Ion chromatography - a review of recent developments*. Z. Analyt. Chem., 327, 451-455.

a cura di

Maurizio RIBERA D'ALCALÀ (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

Giulio CATALANO (CNR, Istituto Talassografico di Trieste)

Vincenzo SACCIO (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

modifiche a cura di Carla Rita FERRARI (ARPA Emilia Romagna)



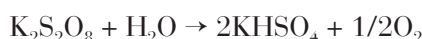
Azoto e fosforo totali

Tratto e modificato da: *NOVA THALASSIA, Vol. 11, pp. 171-179, 1990*

→ PRINCIPIO DEL METODO

Per concentrazione di azoto o fosforo totale in un campione d'acqua si intende la somma delle moli dell'elemento in questione presenti sotto forma di specie organiche ed inorganiche, disciolte e particellate. La procedura analitica prevede che ambedue gli elementi vengano dosati dopo ossidazione e idrolisi della maggior parte dei composti inizialmente presenti nel campione in una stessa miscela di reazione, con la produzione, rispettivamente, di nitrato e ortofosfato. In questa scheda viene quindi descritta la procedura per la mineralizzazione comune ai due elementi. Le differenze nella metodica analitica per la determinazione delle due specie prodotte vengono esaminate successivamente, facendo riferimento alle schede *Ortofosfati* e *Nitrati*.

L'agente ossidante utilizzato è il potassio persolfato $K_2S_2O_8$, che si decompone a caldo secondo la reazione:



Nel corso della reazione di ossidazione si ha produzione di H^+ che determina una variazione del pH.

Goulden e Anthony (1978) hanno condotto uno studio cinetico sulla decomposizione del persolfato in acque naturali in funzione del pH e della temperatura. Sia una temperatura troppo elevata (superiore ai $120^\circ C$) che un pH troppo acido accelerano eccessivamente la decomposizione del persolfato, rendendolo inattivo per l'ossidazione. Questi autori hanno inoltre dimostrato che, per valori di pH superiori a 10, l'ossidazione dei composti organici diviene eccessivamente lenta.

Nello stesso anno Nydhal (1978) conduceva uno studio più sistematico sulle condizioni di ossidazione dei composti organici azotati con persolfato e giungeva alla conclusione che l'ossidazione può avvenire tra i 100 e i $120^\circ C$ con rese simili, anche se con tempi diversi.

Il comportamento dei vari composti azotati nella reazione di ossidazione è diverso. Quelli contenenti legami N-N vengono ossidati più difficilmente mentre quelli con legami N=N risultano piuttosto refrattari all'ossidazione a nitrato. Inoltre è necessario un tempo di almeno 30 minuti per garantire la completa scomparsa del persolfato dalla soluzione di ossidazione, prevenendo così possibili interferenze nelle fasi successive del dosaggio analitico, specie per la determinazione del nitrato.

La comparsa nella miscela di reazione, anche in ambiente alcalino, di Cl_2 che interferirebbe con la successiva riduzione dei nitrati ad opera del cadmio (vedi scheda *Nitrati*) è da attribuirsi alla sottrazione di OH^- ad opera del magnesio in forma di precipitato, che non neutralizza prontamente lo ione H^+ prodotto dalla reazione (Nydhal, 1978). Pertanto l'Autore suggerisce di aggiungere OH^- alla miscela di reazione o di agitare i recipienti di reazione. Koroleff (1968; 1983a) sostiene d'altra parte che in ambiente alcalino, mentre si ottiene la completa idrolisi del fosforo legato in composti organici, la resa di decomposizione dei polifosfati è intorno al 60%. La concentrazione di questi ultimi è però generalmente di secondaria importanza rispetto al fosforo legato in composti organici, per cui lo stesso Koroleff (1968; 1983a, b) e Valderrama (1981) ritengono che un metodo unico per la determinazione di azoto e fosforo totali in acqua di mare sia ugualmente affidabile.

Nel metodo riportato da Valderrama (1981), grazie all'uso di un tampone basato sulla coppia acido bórico-borato e sulla base delle reazioni coinvolte, il pH della miscela parte da circa 9,7 e arriva a fine processo a circa 4-5, realizzando così le condizioni opportune per l'ossidazione-idrolisi sia dell'azoto che del fosforo e la necessaria decomposizione del persolfato in eccesso. Il metodo qui proposto è il metodo di Valderrama (1981) nella versione di Koroleff (1983a, b).



→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

Preparazione dei reagenti**Soluzione ossidante**

Sciogliere 50 g di potassio persolfato (basso contenuto in N) e 30 g di acido bórico in 1 L di sodio idrossido 0,375 mol/L (15 g di NaOH sciolti e diluiti a 1 L con acqua distillata e conservati in bottiglia di polietilene).

OPERAZIONI IN MARE**Prodotti chimici:**

- potassio persolfato [$K_2S_2O_8$] (contenuto di azoto < 0,001%)
- sodio idrossido [NaOH] (contenuto di azoto < 0,001%)
- acido bórico [H_3BO_3]

Il reagente, se conservato in bottiglia di polietilene ben tappata ed avvolta in foglio di alluminio, è stabile per almeno una settimana.

Il reagente, se conservato in bottiglia di polietilene ben tappata ed avvolta in foglio di alluminio, è stabile per almeno una settimana.

Procedura di campionamento

- Utilizzando un cilindro da 50 cm³, sciacquato almeno due volte con il campione, prelevare direttamente dalla bottiglia di campionamento 50 cm³ di acqua per ciascun subcampione e travasarli direttamente nei contenitori di reazione, anch'essi preventivamente sciacquati con il campione.
- Se il campione risulta particolarmente torbido (fatto frequente nelle acque costiere), è necessario fare un prelievo in doppio per la determinazione della torbidità.
- Come in tutte le determinazioni che includono materiale particellato, il prelievo di subcampioni deve avvenire dopo aver accuratamente agitato la bottiglia da campionamento o entro tempi molto brevi che prevengano una significativa sedimentazione del particellato stesso.

Conservazione dei campioni

Per quanto attiene alla conservazione, si può adoperare uno dei tre metodi di seguito indicati, che assicurano buoni risultati.

- Conservare i campioni, al momento del prelievo, nei contenitori di reazione chiusi ermeticamente. L'analisi può essere effettuata anche dopo un lungo periodo di tempo. Infatti, a seguito della reazione di ossidazione, i nitrati ed i fosfati prodotti rimangono costanti.
- Inoculare, subito dopo il prelievo, 5 cm³ di reattivo ossidante e chiudere ermeticamente i contenitori dei campioni. In queste condizioni i campioni sono stabili per almeno 48 ore. Se entro questo tempo si procede alla reazione di ossidazione, i nitrati ed i fosfati prodotti rimangono costanti anche per 2÷3 mesi (Nydhal, 1978).
- Congelare rapidamente i campioni in bottiglia di polietilene, ovviamente senza procedere alla filtrazione.

OPERAZIONI IN MARE**Attrezzatura:**

- cilindri graduati da 50 cm³
- contenitori in vetro borosilicato, di polipropilene, TPX o teflon, da 100 cm³ con tappo a vite a tenuta ermetica munito di flangia o di guarnizione in teflon. Si consiglia di utilizzare bottiglie in polietilene se si procede al congelamento dei campioni

→ SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Preparazione delle soluzioni stock

Per quanto riguarda la determinazione dell'azoto totale, occorre preparare le soluzioni stock indicate nella scheda *Nitrati* e una soluzione di azoto organico.

Soluzione di azoto organico (10 mmol/L)

Disciogliere 186,2 mg di disodio-EDTA in 90 cm³ di acqua grado reagente. Portare a volume in un matraccio tarato da 100 cm³ (classe A). Conservare in frigorifero, in bottiglia di vetro scura. La soluzione è stabile per qualche mese.

Per la determinazione del fosforo totale occorre preparare le soluzioni di seguito elencate.

Acido solforico 4,5 mol/L

Aggiungere con cautela 250 cm³ di acido solforico concentrato a 750 cm³ di acqua grado reagente. Far raf-

OPERAZIONI IN LABORATORIO**Attrezzatura:**

- tutta quella indicata nelle schede *Nitrati* e *Ortofosfati*
- autoclave o normale pentola a pressione (in quest'ultimo caso può essere più pratico usare, come contenitori per i campioni, provettoni da circa 50 cm³ con tappi a vite e guarnizioni in teflon e utilizzare un volume ridotto di campione)



freddare e portare a 1 L. Conservata in una bottiglia da reagente, la soluzione è stabile indefinitamente.

Reagente misto

Sciogliere 12,5 g di ammonio eptamolibdato tetraidrato cristallino in 125 cm³ di acqua grado reagente. Sciogliere separatamente 0,5 g di potassio antimonio tartrato in 20 cm³ di acqua grado reagente. Aggiungere, sotto agitazione, la soluzione di molibdato a 350 cm³ di acido solforico 4,5 mol/L. Aggiungere successivamente la soluzione di potassio antimonio tartrato e mescolare il tutto. Conservata in bottiglia di vetro scuro, la soluzione è stabile per parecchi mesi.

OPERAZIONI IN LABORATORIO

Prodotti chimici:

- tutti i prodotti indicati nelle schede *Ortofosfati e Nitrati*
- acido etilendiaminotetra-acetico, sale bisodico diidrato (disodio-EDTA) [(CH₂N(CH₂COOH)CH₂COONa)₂·2H₂O]

→ PROCEDURA ANALITICA

Reagenti da preparare al momento dell'uso

Soluzione acidificata di acido ascorbico

Sciogliere 10 g di acido ascorbico in 50 cm³ di acqua reagente ed aggiungere 50 cm³ di acido solforico 4,5 mol. Conservare in una bottiglia di vetro scuro, in frigorifero. La soluzione è utilizzabile finché rimane incolore (circa una settimana), ma è preferibile prepararla al momento dell'uso.

Preparazione delle soluzioni standard

Procedere secondo quanto indicato nelle schede *Ortofosfati e Nitrati*.

Preparazione della soluzione per la verifica dell'efficienza del reagente ossidante

Preparare una soluzione 10 µmol/L in azoto, diluendo con acqua grado reagente, in un matraccio da 100 cm³ (classe A), 100 mm³ (misurati con una pipetta di precisione) di soluzione stock di azoto organico. Dividere la soluzione in due subcampioni da 50 cm³, travasandola nei contenitori di reazione. Aggiungere 5 cm³ di reattivo ossidante. L'analisi deve portare alla determinazione di tutta la quantità di azoto presente nella soluzione (10 µmol/L). Nel caso ciò non si verificasse, occorre preparare di nuovo la soluzione ossidante.

Preparazione dei bianchi dei reagenti

- Trasferire 50 cm³ di acqua grado reagente in 3 contenitori di reazione ed inoculare 5 cm³ di reagente ossidante in ciascuno di essi.
- Autoclavare seguendo la procedura indicata per il trattamento analitico dei campioni.

Per preparare i bianchi dei reagenti relativi all'analisi dell'azoto totale (bl_N):

- prelevare (con una pipetta automatica) 5 cm³ da ciascuno dei 3 contenitori, versarli in beaker da 100 cm³;
- aggiungere a ciascuno 45 cm³ di acqua grado reagente;
- trattare i bianchi dei reagenti dell'azoto con la stessa procedura applicata ai campioni ed illustrata in dettaglio nella scheda *Nitrati* (tampone ammonio, colonna di riduzione, sulfanilammide, NNEDDC, dosaggio spettrofotometrico).

Per preparare i bianchi dei reagenti relativi all'analisi del fosforo totale (bl_P):

- aggiungere, a ciascuno dei 50 cm³ rimasti nei 3 contenitori, i reagenti (soluzione acidificata di acido ascorbico e reagente misto) così come indicato per il trattamento analitico dei campioni;
- procedere al dosaggio spettrofotometrico come indicato nella scheda *Ortofosfati*.

Trattamento analitico

- Mettere in autoclave o in pentola a pressione, per almeno 30 minuti a 120°C, i contenitori con i campioni e le soluzioni da analizzare.
- Portare i contenitori a temperatura ambiente e controllare che il volume dei campioni sia rimasto invariato. Eventualmente riportare il volume a 55 cm³ con acqua grado reagente, ma registrare il cambiamento di volume che può aver comportato un parallelo inquinamento del campione.
- Alla fine dello stadio di ossidazione tutto l'azoto del campione dovrebbe essere stato convertito a nitrato e tutto il fosforo a fosfato.

- Procedere secondo quanto indicato per la determinazione del nitrato e fosfato, tenendo conto delle integrazioni e modifiche che seguono.

Per l'analisi dell'azoto:

- prelevare (con una pipetta automatica) 5 cm³ di ogni campione e dei due campioni di controllo con EDTA. Versarli in beaker da 100 cm³ ed aggiungere 45 cm³ di acqua grado reagente;
- procedere alla determinazione della concentrazione di nitrati (vedi scheda *Nitrati*).

Per l'analisi del fosforo adoperare i restanti 50 cm³ di campione:

- aggiungere con un dispenser 1 cm³ di soluzione acidificata di acido ascorbico;
- agitare e, dopo circa 30 secondi, aggiungere 1 cm³ di reagente misto (misurato con un dispenser) agitando nuovamente;
- procedere al dosaggio spettrofotometrico seguendo la procedura indicata nella scheda *Ortofosfati*.

→ CALCOLI

- Determinare il bianco delle celle ($bl_{c,N}$ e $bl_{c,P}$) secondo quanto indicato nelle schede *Nitrati* e *Ortofosfati*.
- Calcolare il bianco dei reagenti (reagente ossidante più reagente per lo sviluppo del colore), sia per il fosfato (bl_P) che per il nitrato (bl_N) come media dei valori di assorbanza delle tre soluzioni con acqua grado reagente.
- Determinare il fattore colorimetrico per i due componenti secondo la procedura indicata nelle metodiche per fosfati (f_P) e nitrati (f_N).
- Calcolare le concentrazioni secondo le formule:

$$[NO_3^-, tot] = (ABS_N - bl_{c,i,N} - bl_N) f_N$$

$$[PO_4^{3-}, tot] = (ABS_P - bl_{c,i,P} - bl_P) f_P$$

dove:

ABS_N = assorbanza dei campione a 553 nm

ABS_P = assorbanza del campione a 882 nm

$bl_{c,i,N}$ = bianco della cella i-esima a 553 nm

$bl_{c,i,P}$ = bianco della cella i-esima a 882 nm

bl_N = bianco dei reagenti dell'azoto

bl_P = bianco dei reagenti del fosforo

f_N = fattore colorimetrico per i nitrati

f_P = fattore colorimetrico per i fosfati

I risultati saranno espressi in $\mu\text{mol/L}$.

Per il fosforo totale il limite di determinazione è pari a 0,03 $\mu\text{mol/L}$, ovvero a 0,92 $\mu\text{g/L}$.

Per l'azoto totale il limite di determinazione è pari a 0,05 $\mu\text{mol/L}$, ovvero a 0,7 $\mu\text{g/L}$.

→ RACCOMANDAZIONI

I contenitori vanno sciacquati con acqua grado reagente per almeno un paio di volte. Fra una determinazione e l'altra i contenitori vanno conservati pieni di una soluzione di HCl circa 0,1 mol/L.

La soluzione di verifica non deve essere usata per correggere la resa della reazione, ma solo come controllo di massima dell'efficienza delle ossidazioni, dal momento che un ridotto potere ossidante si può manifestare in relazione al diverso tipo di composti azotati coinvolti nella reazione.

→ PROBLEMI POSSIBILI

Per quanto riguarda la determinazione dell'azoto si deve far rilevare che alcuni problemi possono essere dovuti ad impurezze dei reattivi. È importante utilizzare persolfato a basso contenuto di azoto oppure seguire la tecnica di ricristallizzazione riportata in Nydhal (1978). È importante inoltre controllare sempre la qualità dell'acqua grado reagente che si utilizza. Infatti l'ammoniaca è presente quasi sempre in ambienti chiusi e si scioglie facilmente in acqua, per cui occorre utilizzare sempre acqua appena uscita dal depuratore, anche se questo non elimina il rischio di sostanze rilasciate dalle resine scambiatrici.



→ ALTRI METODI

La determinazione di azoto e fosforo totali può essere condotta anche su una sola classe di composti, quelli azotati o quelli fosfatati.

Per la determinazione dell'azoto totale con il metodo dell'ossidazione con persolfato consultare Koroleff (1969; 1972b; 1983b), D'Elia *et al.* (1977), Kalff e Bentzen (1984). Va inoltre precisato che possono essere introdotte molte varianti nella fase di determinazione dei nitrati mediante l'uso di metodiche più semplici ma meno sensibili, specie nel caso di concentrazioni elevate. Per questo tipo di metodiche si rimanda alla bibliografia della scheda *Nitrati*.

Sono stati inoltre proposti vari metodi di digestione di "Kjeldahl" effettuata in presenza di catalizzatori (Strickland e Parsons, 1968; Bietz, 1974; Nicholls, 1975; Koroleff, 1983b) o mediante sistemi automatici (Tenny, 1966; Marten e Catanzaro, 1966). Questi metodi, considerati quantitativi, si presentano però più delicati da un punto di vista operativo ed inoltre richiedono, come stadio finale, la determinazione dell'ammoniaca, che è un parametro certamente più difficoltoso da misurare.

Esistono poi sistemi di ossidazioni catalitiche ad alta temperatura con produzione di gas azotati determinabili per via gas-cromatografica o fotometrica indiretta (Gordon e Sutcliffe, 1973; Suzuki *et al.*, 1985); anch'essi sono metodi quantitativi ma richiedono una strumentazione *ad hoc*. È spesso adoperata anche l'ossidazione ultravioletta (Armstrong *et al.*, 1966; Henricksen, 1970), che si presta all'analisi automatica ma che non ossida tutte le sostanze presenti.

Infine, per ciò che riguarda l'azoto organico disciolto, si può fare riferimento ai lavori di Solorzano e Sharp (1980) e Koroleff (1983a).

Il fosforo totale viene determinato anche per ossidazione con persolfato in ambiente acido, eliminando così il possibile inconveniente derivante dalla incompleta ossidazione dei polifosfati (Koroleff 1968; 1972a; 1983a).

Per le procedure automatiche consultare Grassoff (1966), Kneeland Mc Nulty e Johnson (1970), Stanley e Richardson (1970) e Tyler e Biles (1970), mentre per la determinazione della parte organica solubile o particellata si può consultare Solorzano e Sharp (1980) e Koroleff (1983b).

BIBLIOGRAFIA

- Armstrong F.A., Williams P.M., Strickland J.D. (1966) *Photo-oxidation of organic matter in seawater by ultra-violet radiation; analytical and other applications*. Nature, 211, 481-481.
- Bietz J.A. (1974) *Micro-Kjeldahl analysis by an improved automated ammonia determination following manual digestion*. Anal. Chem., 46, 1617-1618.
- D'Elia C.F., Steudler P.A., Corwin N. (1977) *Determination of total nitrogen in aqueous samples using persulfate digestion*. Limnol. Oceanogr., 22, 760-764.
- Gordon D.C. Jr., Sutcliffe W.H. Jr. (1973) *A new dry combustion method for the simultaneous determination of total organic carbon and nitrogen in seawater*. Mar. Chem., 1, 231-244.
- Goulden P.D., Anthony D.H.J. (1978) *Kinetics of uncatalyzed proxidisulfate oxidation of organic material in fresh water*. Anal. Chem., 50, 953-958.
- Grasshoff K. (1966) *Über eine Methode zur automatischen Bestimmung von Aufschluß mit ultravioletten Licht*. Kieler Meeresforsch., 22, 89-95.
- Henricksen A. (1970) *Determination of total phosphorus and iron in fresh water by photo-oxidation with ultra-violet radiation*. Analyst, 95, 601-608.
- Kalff J., Bentzen E. (1984) *A method for the analysis of total nitrogen in natural waters*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41, 815-819.
- Kneeland Mc Nulty J., L. Johnson (1970) *Automated determination of total phosphorus in estuarine waters*. Technicon International Congress, November 2-4, 1970, Technicon, New York, 353- 355.
- Koroleff F. (1968) *Determination of total phosphorus in natural waters by means of persulphate oxidation*. ICES C.M./C, 33, 209-212.
- Koroleff F. (1969) *Determination of total nitrogen in natural waters by means of persulphate oxidation*. ICES C.M./C, 8,148-151.
- Koroleff F. (1972a) *Determination of dissolved phosphorus and total phosphorus*. ICES Comparative Research Report, 29A, 44-49.
- Koroleff F. (1972b) *Determination of total nitrogen in natural waters by means of persulphate oxidation*. In: "New Baltic Manual", Carlberg S.R., Ed., ICES Comparative Research Report, 29A, 73-78.
- Koroleff, F. (1983a) *Determination of phosphorus*. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K, M. Ehrhardt, K. Kremling Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 125-139.
- Koroleff, F. (1983b) *Total and organic nitrogen*. In: "Methods of Seawater Analysis", Grasshoff K., M. Ehrhardt, K. Kremling



Eds, Verlag Chemie, Weinheim, 162-173.

- Marten J.F., Catanzaro G. (1966) *Fundamental studies in automatic nitrogen digestion*. Analyst, 91, 42-52.
- Nicholls K.H. (1975) *A single digestion procedure for rapid manual determination of Kjeldahl nitrogen and total phosphorus in natural waters*. Anal. Chim. Acta, 76, 208-212.
- Nydahl F. (1978) *On the peroxodisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate*. Talanta, 12, 1123-1130.
- Solorzano L., Sharp J.H. (1980) *Determination of total dissolved nitrogen in natural waters*. Limnol. Oceanogr., 25, 751-754.
- Solorzano L., Sharp J.H. (1980) *Determination of total dissolved phosphorus and particulate phosphorus in natural waters*. Limnol. Oceanogr., 25, 754-758.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1968) *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Bull. Fish. Res. Board Canada, 167,1-312.
- Stanley G.H., Richardson G.R. (1970) *The automation of the single reagent method for total phosphorus*. Technicon International Congress, November 2-4, 1970, Technicon, New York, 305-311.
- Suzuki Y., Sugimura Y., Tadamasa I. (1985) *A catalytic oxidation method for the determination of total nitrogen dissolved in seawater*. Mar. Chem., 16, 83-97.
- Tenny A.M. (1966) *Automatic Kjeldahl nitrogen measurements in waste treatment and water pollution control*. Technicon Symposia, Automated Analytical Chemistry, 1, 580-588.
- Tyler L.P., Biles A.F. (1970) *Complete automation of low-level total phosphorus analysis in water*. Technicon International Congress, November 2-4, 1970, Technicon, New York, 313-316.
- Valderrama J.C. (1981) *The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters*. Mar. Chem., 10, 109-122.

a cura di Gioacchino GENCHI (Assessorato Territorio e Ambiente, Regione Sicilia)

modifiche a cura di Carla Rita FERRARI (ARPA Emilia Romagna)



Mesozooplankton

Tratto e modificato da: *NOVA THALASSIA, Vol. 11, pp. 265-288, 1990*
 e dall'Allegato A del Rapporto *Progetto per le Attività di Ricerca e Sperimentazione
 per la Salvaguardia del Mare Adriatico: Sviluppo di sistemi conoscitivi per la gestione dei problemi
 ambientali dell'ecosistema Adriatico. Rapporto Intermedio. Marzo 1996.*

→ CAMPIONAMENTO

Gli organismi mesozooplanctonici, di dimensioni convenzionalmente comprese fra 0,2 e 20 mm, vengono raccolti nella colonna d'acqua con pescata obliqua, utilizzando una rete standard WP-2 (Ø 57 cm, lunghezza totale 260 cm) con vuoto di maglia di 200 µm e munita di flussometro.

Il campionamento viene eseguito su tutta la colonna d'acqua. Sotto la rete deve essere collocato un peso (circa 10-15 kg) che aiuta a calarla ed evita che la corrente la sposti. La rete va calata lentamente da un battello fermo fino alla massima profondità (facendo attenzione che il collettore non tocchi il fondo) e subito salpata obliquamente ad una velocità compresa tra 0,5-1 m/s, o comunque non superiore ai 2 nodi, in modo da permettere alla rete di filtrare l'acqua senza rigurgiti.

Il volume di acqua filtrato viene calcolato con la seguente formula:

$$V = N \cdot c \cdot A$$

N = numero di giri dell'elica del flussometro

c = costante di calibrazione

A = area della bocca della rete in m²

Gli organismi vengono raccolti in un collettore cilindrico di materiale plastico posto nella parte finale della rete da plancton e dotato di finestra munita di retino da 200 µm, per facilitare il deflusso dell'acqua durante la raccolta. Prima di trasferire il plancton nel barattolo di plastica da 500 ml in cui sarà conservato, è necessario lavare la rete con acqua di mare, solo dall'esterno, in modo da convogliare nel collettore tutto il materiale raccolto. Il collettore viene poi staccato dalla rete e il campione viene versato nel barattolo.

→ FISSAZIONE

I campioni vengono fissati aggiungendo 20 ml di formaldeide al 37% neutralizzata con tetraborato di sodio per ogni 500 ml di campione. Il campione deve essere fissato immediatamente o comunque entro dieci minuti dal momento della raccolta.

→ ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Allo scopo di evitare l'inalazione dei vapori tossici di formalina da parte dell'operatore, durante l'analisi si può filtrare il campione sotto cappa, su un filtro con maglie da 200 µm. L'acqua di mare con formalina viene conservata in un recipiente chiuso ermeticamente e il campione viene subito risospeso, lasciando il filtro a secco per il minor tempo possibile, in 200 ml di acqua di mare filtrata (su filtri GF/F) priva di fissativi. Durante l'analisi quali-quantitativa è bene comunque che l'operatore sia munito di una mascherina adeguata.

L'analisi viene effettuata su almeno 4 subcampioni, da 5 ml ciascuno, prelevati dai 200 ml del campione originale. Nel caso in cui l'analisi del campione portasse a conteggiare pochi individui appartenenti a molte classi tassonomiche, il numero di subcampioni da esaminare deve necessariamente essere aumentato. Prima di procedere al subcampionamento, il campione totale deve essere mescolato delicatamente affinché gli organismi risultino uniformemente distribuiti. In alternativa, il campione originario può essere sottoposto, in base alla ricchezza del materiale, a frazionamenti atti ad ottenere aliquote cor-



rispondenti ad 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dell'intero campione, su cui saranno effettuati i conteggi. L'identificazione ed il conteggio degli organismi appartenenti ai diversi taxa viene eseguito allo stereomicroscopio utilizzando una capsula Petri con una griglia tracciata sul fondo (mediante un pennarello) per assicurare il conteggio di tutti gli individui presenti nella piastra. Dal numero totale di organismi presenti nei subcampioni (N_{sc}) e dal numero di ml esaminati nel subcampione (v) si risale al numero di organismi presenti nel campione originale (N_c).

$$N_c = N_{sc} \cdot 200/v$$

L'abbondanza di individui, *espressa come il numero di individui/m³*, si ottiene infine dividendo N_c per il volume di acqua filtrato durante il campionamento.

Alla fine dell'analisi, operando sotto cappa, il campione viene rifiltrato e sospeso nuovamente nell'acqua di mare con formalina originaria.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- ICES (Ed. Harris) (2000) *Zooplankton Methodology Manual*. WIEBE, LENZ, SKJODAL, HUNTLEY, ACADEMIC PRESS, ISBN 0-12-327645-4.

BIBLIOGRAFIA

- Zunini Sertorio T. (1990) *Campionamento dello zooplancton*. In: *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia, Vol. 11. SIBM-Comitato Plancton: 265-275
- Zunini Sertorio T. (1990) *Stima della densità zooplanctonica*. In: *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia, Vol. 11. SIBM-Comitato Plancton: 285-288.

a cura di Tecla ZUNINI SERTORIO (Dip. Te.Ris, Università di Genova)

modifiche a cura di

Elena GUERRERA (ICRAM, Roma)

Maria Grazia MAZZOCCHI (Stazione Zoologica "A. Dohrn", Napoli)

Alessandra COMASCHI (Laboratorio di Biologia del Mare, Venezia)

Bruno CATALETTO (Laboratorio di Biologia Marina, Trieste)



Fitoplancton

Tratto e modificato da: Allegato A del Rapporto *Progetto per le Attività di Ricerca e Sperimentazione per la Salvaguardia del Mare Adriatico: Sviluppo di sistemi conoscitivi per la gestione dei problemi ambientali dell'ecosistema Adriatico. Rapporto Intermedio. Marzo 1996.*

→ CAMPIONAMENTO

Campionamento di acque superficiali (ca. 0,5 m di profondità) mediante bottiglia Niskin o, in alternativa, direttamente con un secchio e conservazione di 250, 500 o 1000 ml preferibilmente in bottiglie di vetro scuro con tappo ermetico. Il travaso dei campioni deve avvenire immediatamente ed evitando di riempire le bottiglie fino all'orlo in modo da consentire, successivamente in laboratorio, l'agitazione del campione per renderlo omogeneo. I campioni vanno mantenuti in luogo fresco e non illuminato.

→ CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I fissativi maggiormente utilizzati sono la soluzione di Lugol e la formaldeide.

Lugol

La soluzione di Lugol acida è il fissativo consigliato, in quanto meno tossico per l'operatore rispetto alla formaldeide. Il Lugol è adeguato alla preservazione di dinoflagellati, diatomee anche poco silicificate, e di specie delicate, quali piccoli flagellati (Hällfors *et al.*, 1979); è meno indicato per i coccolitoforidei, in quanto può dissolvere il CaCO_3 se preservati per tempi lunghi (comunque superiori a 1 mese).

L'aggiunta di Lugol esclude la lettura a epifluorescenza e al microscopio a scansione.

Aggiungere 0,5-1 ml di soluzione Lugol ogni 250 ml di campione tal quale.

Nel caso in cui gli organismi risultino colorati eccessivamente si possono schiarire con l'aggiunta di tiosolfato di sodio.

I campioni fissati come sopra, mantenuti a temperatura ambiente ed al buio, si mantengono anche 12 mesi; va comunque controllato il colore della soluzione, che tende a schiarirsi col tempo per ossidazione dello iodio, riducendo le sue proprietà fissative.

Formaldeide

In alternativa, in particolare per i laboratori che intendono effettuare degli approfondimenti tramite lettura a epifluorescenza e al microscopio elettronico a scansione (SEM), può essere usata la formaldeide.

→ ANALISI DEI CAMPIONI

L'analisi qualitativa e quantitativa del subcampione sedimentato segue il metodo della sedimentazione ovvero metodo di Utermöhl (1958) (Zingone *et al.*, 1990).

Nella scelta del volume da mettere a sedimentare si può far riferimento ai valori di clorofilla "a" relativi al campione da analizzare. Dopo aver randomizzato il campione, capovolgendo delicatamente la bottiglia almeno 100 volte (o per circa 1 minuto), si sedimentano 10, 25, 50 o 100 ml di subcampione a seconda della densità fitoplanctonica.

Il conteggio verrà effettuato quando sarà completata la sedimentazione di tutti gli organismi. Si ritiene comunemente sufficiente un tempo pari a tre ore per ogni centimetro d'altezza del cilindro; si consiglia però, se possibile, di prolungare i tempi soprattutto per campioni ricchi di specie di dimensioni molto piccole.

Preparazione della soluzione di Lugol con acido acetico:

- 20 g potassio ioduro (KI)
- 200 ml H_2O distillata
- 10 g iodio (I_2)
- 20 ml acido acetico (CH_3COOH)

Preparazione della formaldeide (UNESCO, 1978):

- formaldeide al 40% diluita al 20% con acqua distillata e tamponata preferibilmente con dolomite (Carlo Erba Reagenti) o con 100 g/L di esametilentetramina e filtrata prima dell'uso. Il pH finale deve essere neutro o leggermente basico
- la formaldeide (mantenuta a 5-6°C) va versata nelle bottiglie di vetro scuro, preferibilmente prima del travaso del campione, in ragione di 20-40 ml per litro a seconda della densità fitoplanctonica.



Il conteggio delle cellule algali presenti va effettuato per campi casuali o transetti per le specie abbondanti, e sull'intera camera di sedimentazione per quelle poco abbondanti.

- **conteggio per campi casuali:** il numero dei campi casuali deve corrispondere ad almeno un centesimo dell'area totale della camera di sedimentazione per l'obiettivo utilizzato. Se il totale delle cellule fitoplanctoniche contato è inferiore a 200, si deve aumentare il numero dei campi.
- **conteggio per transetti:** si devono considerare due transetti diametrali, ortogonali fra di loro, ed in caso di densità planctonica ridotta aumentarne il numero, in modo da contare almeno 200 cellule totali. Per l'osservazione dovrà essere utilizzato un microscopio rovesciato con ingrandimento di circa 400x.

Il calcolo della densità fitoplanctonica va effettuato applicando le seguenti formule:

a) per conteggi su transetti passanti per il centro della camera di sedimentazione

$$C = (N \cdot \pi \cdot r \cdot 1000) / (2 \cdot h \cdot v \cdot n)$$

dove:

C = densità fitoplanctonica del campione, espressa come cellule/L

N = totale cellule contate su tutti i transetti

r = raggio (in mm) della camera di sedimentazione

h = altezza (in mm) del transetto

v = volume (in ml) del campione messo a sedimentare

n = numero dei transetti sui quali si è effettuato il conteggio

b) per conteggi su campi di dimensioni pari al campo visivo

$$C = (N \cdot 1000 \cdot A) / (n \cdot v \cdot a)$$

dove:

C = densità fitoplanctonica del campione, espressa come cellule/L

N = totale cellule contate su tutti i campi

A = area totale della superficie di fondo della camera (in mm²)

n = numero dei campi sui quali si è effettuato il conteggio

v = volume (in ml) del campione messo a sedimentare

a = area del campo visivo considerato (in mm²)

I *subtotali del fitoplancton* da considerare nelle tabelle dei dati sono: Diatomee, Dinoflagellati, Altri e Totale, comprendendo nella categoria "Altri" tutto il fitoplancton che non rientra né nelle Diatomee né nei Dinoflagellati.

BIBLIOGRAFIA

- Hällfors, G., Melvasalo, T., Niemi, Å. & H. Viljamaa (1979) *Effects of different fixatives and preservatives on phytoplankton counts*. Publications of the Water Research Institute, National Board of Waters, Finland, 34, 25-34.
- UNESCO (1978) *A phytoplankton manual*. Monographs on Oceanographic Methodology n. 6. The UNESCO Press, Paris, 337 pp.
- Utermöhl H. (1958) *Zur vervollkommnung der qualitativen Phytoplankton metodik*. Mitt. Int. Verein. Limnol., 9, 1-38.
- Zingone, A., Honsell, G., Marino, D., Montresor, M., Socal, G. (1990) *Metodi nell'Ecologia del Plancton Marino: Fitoplancton*. Nova Thalassia, 11, 184-187.

ALCUNI MANUALI CONSIGLIATI PER L'IDENTIFICAZIONE DEL FITOPLANCTON MARINO

- Chrétiennot-Dinet M. J. (1990) *Atlas du Phytoplankton Marin. Volume III: Chlorarachniophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglenophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnesiophycées, Rhodophycées et Tribophycées*. Edition du CNRS, pp. 261.
- Dodge D. J. (1975) *The Prorocentrales (Dinophyceae)*. II.



- Revision of the taxonomy within the genus Prorocentrum.*
Bot. J. Linn. Soc., 71, 103-125.
- Dodge D. J. (1982) *Marine Dinoflagellates of the British Isles*. London: Her Majesty's Stationery Office, pp. 303.
 - Drebes G. (1974) *Marines Phytoplankton*. Georg Thieme Verlag Ed., Stuttgart, pp.186.
 - Hustedt F. (1930-59-61) *Die Kieselalgen Deutschlands, Osterreich und der Schweiz mit Berucksichtigung der ubrigen Lander Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete*. In: L. Rabenhorst Kriptogamen Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz, 7 (1, 2, 3,), 920, 845, 816 pp.
 - Kofoed A. C., Swezy O. (1921) *The Free-Living Unarmored Dinoflagellata*. Otto Koeltz Sciene Publisher D-624 Koenigstein 1974.
 - Rampi L., Bernhard M. (1978) *Key for the determination of Mediterranean pelagic diatoms*. C.N.E.N. RT/BIO (78) 1, 1-71.
 - Rampi L., Bernhard M. (1980) *Chiave per la determinazione delle peridinee pelagiche mediterranee*. C.N.E.N. RT/BIO (80) 8, 1-193.
 - ⓧ Ricard M. (1987) *Atlas du Phytoplankton Marin. Volume II: Diatomophycées*. Edition du CNRS, pp. 297.
 - Schiller J. (1933-1937) *Dinoflagellatae (Peridinae), I-II*. In: L. Rabenhorst Kriptogamen Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz, Leipzig, Akad. Verlag., vol. 10 (3), Teil 1, 1-617 (1931-33); Teil 2, 1-590 (1935-37).
 - ⓧ Sournia A. (1986) *Atlas du Phytoplankton Marin. Volume I: Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidophycées*. Edition du CNRS, pp. 219.
 - ⓧ Tomas R C. (1993) *Marine Phytoplankton. A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids*. Academic Press, pp. 263.
 - ⓧ Tomas R C. (1996) *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, pp. 597.
 - ⓧ Tomas R C. (1997) *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, pp.858.
 - Trégouboff G., Rose M. (1957) *Manuel de Planctonologie Méditerranéenne*. Tome I, C.N.R.S., 587-219.
 - Zingone A., Honsell G., Marino D., Montresor M., Socal G. (1990) *Fitoplancton*. In: Metodi nell'ecologia del plancton marino. Nova Thalassia 11, 183-198.
 - ⓧ Sarebbe opportuno che tutte le Unità Operative utilizzassero almeno i testi così contrassegnati.

modifiche a cura di

Erika MACALETTI (ICRAM, Roma)

Anna GHETTI (ARPA Emilia Romagna, Struttura Oceanografica Daphne-Cesenatico)

Marina CABRINI (Laboratorio di Biologia Marina, Trieste)

Marinella POMPEI (Centro Ricerche Marine, Cesenatico)



Analisi delle comunità bentoniche di fondi mobili in ambiente marino

→ INTRODUZIONE

L'analisi delle comunità bentoniche di fondi mobili è parte integrante della valutazione delle caratteristiche dell'ambiente marino. La composizione e la struttura delle comunità bentoniche di fondi mobili può essere utilizzata per caratterizzare le condizioni ambientali di aree da indagare e classificare l'estensione di eventuali impatti ambientali.

La caratterizzazione delle condizioni ambientali generalmente è basata su metodi quantitativi, mettendo in relazione il numero di specie e di individui prelevati con un'area di fondale conosciuta.

Per una precisa interpretazione dei dati è fondamentale, anche, avere a disposizione informazioni sulle caratteristiche fisico-chimiche della colonna d'acqua e sulla composizione del sedimento del fondale indagato.

È, inoltre, essenziale, per ottenere dati qualitativamente utilizzabili, che le operazioni di campionamento e di analisi siano comparabili temporalmente, spazialmente e tra diversi operatori.

→ SCOPO DEL PRESENTE DOCUMENTO

Il presente documento fornisce le linee guida per l'esecuzione di indagini quantitative sulle biocenosi di fondi mobili sublitorali costieri e lungo la piattaforma continentale. A tal proposito, i fondi mobili vengono definiti come quelle aree di fondale marino dove è possibile campionare il sedimento mediante benna o box-corer.

Il presente documento riguarda solo il campionamento e l'analisi della macrofauna, cioè di quegli organismi che vengono trattenuti da setacci con maglie di diametro maggiore o uguale a 0,5 mm.

Il presente documento affronta i seguenti punti:

- scelta delle stazioni di campionamento;
- strumentazione per il campionamento;
- campionamento e trattamento dei campioni sul campo;
- smistamento ed identificazione delle specie;
- conservazione del materiale analizzato.

→ STAZIONI DI CAMPIONAMENTO

Le stazioni di campionamento dovrebbero essere posizionate in aree di fondale omogenee.

→ IMBARCAZIONE DI APPOGGIO

L'imbarcazione, per effettuare i campionamenti di sedimento, deve avere un'ampia area di lavoro a poppa e il seguente equipaggiamento:

- verricello con braccio meccanico o archetto sufficientemente elevato da consentire l'utilizzo di strumenti campionatori;
- cavo di acciaio di diametro variabile tra 5 e 8 mm;
- verricello elettrico che consenta di variare la velocità di discesa e risalita a seconda delle operazioni da effettuare;
- ecoscandaglio;
- DGPS (GPS differenziale) per una precisa localizzazione dei punti di campionamento. La posizione delle stazioni deve essere fornita in coordinate geografiche con sistema di riferimento UTM fuso 32 o 33.

→ STRUMENTAZIONE PER IL CAMPIONAMENTO

Il campionamento deve essere eseguito utilizzando una benna, preferibilmente Van Veen (vedi SEDI-MENTI, Scheda 1: Campionamento).

È necessario assicurarsi che lo strumento sia chiuso completamente quando inizia la risalita verso la superficie affinché non ci sia perdita di materiale lungo la colonna d'acqua e conseguente disturbo del campione.

Dovrà essere utilizzata una benna con una superficie di presa di circa 0,1 m².

→ PROCEDURE DI CAMPIONAMENTO

Dovranno essere eseguite 3 repliche per ogni stazione di campionamento, ognuna con un volume di 18 litri.

È necessario prestare attenzione che l'imbarcazione sia ferma nella posizione della stazione di campionamento e che il cavo sia sempre disposto perpendicolare rispetto alla superficie del mare. La benna deve essere calata verticalmente sul fondale ad una velocità variabile tra 1m/s e 1,5 m/s. Quando la benna si trova a distanza di circa 5-10 m dal fondo, la velocità di calata deve essere ridotta, per minimizzare la turbolenza dell'acqua in prossimità dello strumento.

Dopo il contatto con il fondo, lo strumento deve essere lentamente richiamato fino a circa 10 m dal fondo stesso e poi portato in superficie a velocità superiore (circa 1,5 m/s).

Una volta che lo strumento è a bordo, deve essere compilata la scheda di campionamento con la denominazione della stazione e le sue coordinate, la campagna di indagine e la descrizione visiva del sedimento campionato.

→ SETACCIATURA DEL SEDIMENTO IN CAMPO

I campioni prelevati devono essere sottoposti a setacciatura per eliminare il sedimento e raccogliere gli organismi.

Dovranno essere utilizzati setacci con maglie da 0,5 mm.

I campioni dovranno essere setacciati e lavati con acqua di mare.

Durante la setacciatura, il setaccio deve essere agitato lentamente, avendo cura di toccare il meno possibile gli organismi.

Il materiale che rimane dopo la setacciatura deve essere trasferito in appropriati contenitori (plastici) opportunamente contrassegnati con le informazioni del campionamento (nome della campagna, codice della stazione, numero della replica ecc.).

Gli organismi più fragili devono essere lavati con molta attenzione e prelevati con pinzette per evitare eventuali danneggiamenti.

Il setaccio deve essere lavato accuratamente tra un campione e l'altro per evitare il trasferimento di organismi tra campioni diversi.

→ PREPARAZIONE DEI CAMPIONI IN CAMPO

I campioni devono essere fissati in una soluzione al 5% di formaldeide e acqua di mare.

In caso di campioni con elevata presenza di materia organica (ad esempio resti di vegetali), la concentrazione di formalina deve essere aumentata fino al 30%.

I campioni possono essere sottoposti a colorazione per incrementare l'efficienza del successivo smistamento (sorting), ma talvolta tale operazione può alterare il materiale da sottoporre a riconoscimento tassonomico. Si raccomanda nell'eventualità l'utilizzo del rosa bengala: un cucchiaino del prodotto in polvere in 10 litri di formalina concentrata.

→ SMISTAMENTO (SORTING) DEI CAMPIONI IN LABORATORIO

Il campione deve essere lavato con acqua corrente per eliminare la formalina. Il lavaggio deve essere effettuato su un setaccio di maglia uguale o inferiore a quella utilizzata in campo (0,5 mm). Per campioni contenenti una grande quantità di organismi con scheletri calcarei o conchiglie, la formalina deve essere asportata il più presto possibile ed il materiale conservato in etanolo al 75-80%.

Anche i campioni che devono essere conservati per più di uno o due mesi prima di effettuare il sorting devono essere lavati e conservati in etanolo al 75-80%.

Il materiale deve essere smistato allo stereomicroscopio, che deve avere un ingrandimento da 3 a 6 volte.

Gli organismi devono essere divisi nei principali taxa animali, separandoli in differenti contenitori. Ogni contenitore deve essere contrassegnato da un'etichetta con le seguenti specifiche:



- stazione di campionamento;
- numero della replica;
- data del campionamento;
- taxa animale.

→ IDENTIFICAZIONE DEI TAXA

La fauna bentonica deve essere identificata a livello di specie, quando possibile. La nomenclatura delle specie dovrebbe essere in accordo con le recenti edizioni di cataloghi aggiornati per il riconoscimento delle specie. Per la nomenclatura specifica si può far riferimento ai volumi pubblicati da Minelli *et al.* (1995) e in particolare ai fascicoli: 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 108, 109.

Nel caso in cui alcuni laboratori non fossero in grado di riconoscere gli organismi sarà necessario inviare i campioni a degli specialisti.

Per ogni specie dovrà essere indicata l'appartenenza alle biocenosi-tipo mediterranee in base alla standardizzazione di Pérès e Picard (1964).

→ QUANTIFICAZIONE

Per ogni campione deve essere determinato il numero delle specie ed il numero degli individui. Nel caso di organismi frammentati, possono essere inclusi nel conteggio solo quelli che hanno parti del corpo identificabili con certezza (ad esempio il capo).

→ COLLEZIONE DI RIFERIMENTO

Possono essere create collezioni delle specie identificate. Almeno un individuo di ogni specie deve essere posto in un contenitore e conservato in etanolo al 75-80%.

La collezione dovrebbe avere almeno le seguenti informazioni:

- nome della specie ed autore;
- luogo di campionamento e nome della stazione;
- data;
- nome dello specialista che ha classificato l'organismo.

La collezione dovrà essere integrata continuamente.

→ TRATTAMENTO DEI DATI

Per ogni campione analizzato dovrà essere fornita la lista specie completa.

Le forme coloniali (poriferi, cnidari e briozoi), i foraminiferi, i platelminti, i nemertini, i nematodi, gli oligocheti e gli emicordati possono non essere quantitativamente rappresentati nel campione; sono comunque riportati nella lista specie ma esclusi dall'analisi statistica.

È necessario fornire un inquadramento biocenotico, in altre parole esplicitare, quando è possibile, la presenza di biocenosi-tipo (Pérès e Picard, 1964) nelle aree indagate.

Dovrà essere elaborata la matrice quantitativa dei dati su cui calcolare, per ogni stazione, i seguenti parametri strutturali della comunità:

- numero di specie
- numero di individui
- indice di diversità specifica (Shannon e Weaver, 1949)
- indice di ricchezza specifica (Margalef, 1958)
- indice di equiripartizione o "evenness" (Pielou, 1966)
- indice di dominanza (Simpson, 1949)

Si tratta di parametri indicatori del grado di complessità delle biocenosi studiate, che prescindono, però, dalle caratteristiche e dalle esigenze delle singole specie che le compongono.

L'indice di diversità specifica risulta compreso tra 0 e, teoricamente, + ∞ e tiene conto sia del numero di specie presenti che del modo in cui gli individui sono distribuiti fra le diverse specie.

Viene calcolato con la seguente formula:

$$H^{\circ} = - \sum_{i=1}^N n_i \log_2 n_i$$



dove N è il numero di specie ed n_i rappresenta il rapporto tra il numero di individui della specie e il numero di individui totali del campione.

L'indice di ricchezza specifica prende in considerazione il rapporto tra il numero di specie totali e il numero totale di individui in una comunità. Quante più specie sono presenti nel campione, tanto più alto sarà tale indice. Viene calcolato con la seguente formula:

$$D = (S-1) / \log N$$

dove S è il numero totale di specie della comunità ed N il numero totale di individui.

L'indice di "evenness" risulta compreso tra 0 e 1 e prende in considerazione la distribuzione degli individui nell'ambito delle varie specie che compongono una comunità. Tale indice presenta il valore massimo nel caso teorico in cui tutte le specie siano presenti con la stessa abbondanza, mentre presenta un valore basso nel caso in cui ci sia una sola specie abbondante e numerose specie rare. Viene calcolato con la seguente formula:

$$J = H' / \log_2 S$$

dove H' è il valore dell'indice di Shannon-Weaver per quella comunità ed S il numero delle specie.

L'indice di dominanza misura la prevalenza di poche specie nella comunità ed ha un andamento inverso rispetto all'indice di "evenness". Un'elevata dominanza significa che una o poche specie hanno il monopolio delle risorse. Viene calcolato con la seguente formula:

$$c = \sum_{i=1}^S (n_i / N)^2$$

dove n_i è il valore di importanza di ogni specie ed N il numero totale dei valori di importanza (individui).

BIBLIOGRAFIA

- Holme N.A., Mc Intyre A.D., (1984) *Methods for the study of marine benthos*. Blackwell Scientific Publications, ISBN 0-623-00894-6.
- ISO/NP 16665 (2001) *Water quality - Guidelines for quantitative investigations of marine soft-bottom benthic fauna in the marine environment NS9423*. (CD febbraio 2001).
- Margalef R. (1958) *Information theory in ecology*. Gen. Syst., 3, 36-71.
- Minelli A., Ruffo S., La Posta S. (Eds.) (1995) *Checklist delle specie della fauna italiana*. Calderini, Bologna.
- Pérès J.M., Picard J. (1964) *Nouveau manuel de bionomie benthique de la Mer Méditerranée*. Rec. Trav. Stat. Mar. Endoume, 31 (47), 5-137.
- Pielou E.C. (1966) *The measurement of diversity in different types of biological collections*. J. Theor. Biol., 13, 131-144.
- Shannon C.E., Weaver W. (1949) *The mathematical theory of communication*. Urbana, Univ. Illinois Press.
- Simpson E.H. (1949) *Measurement of diversity*. Nature, 163, 688.

a cura di

Claudia VIRNO LAMBERTI, David PELLEGRINI, Marina PULCINI (ICRAM, Roma)

Andrea VALENTINI (Università di Modena e Reggio Emilia)



Monitoraggio del limite inferiore delle praterie di *Posidonia oceanica*

→ INTRODUZIONE

La *Posidonia oceanica*, per la sua sensibilità alle variazioni delle condizioni ambientali, è considerata un buon indicatore biologico della qualità delle acque e, attraverso lo studio delle praterie, è possibile ottenere un quadro della situazione ecologica dell'area costiera. Lo studio delle variazioni spazio-temporali della struttura delle praterie permette di diagnosticarne le tendenze evolutive e di predirne eventuali cambiamenti futuri. A tale scopo è necessario sottoporre a sorveglianza siti prescelti, fissando punti di riferimento permanenti, sulla base dei quali seguire, nel tempo, la dinamica della prateria e contemporaneamente l'evoluzione della sua vitalità. Generalmente viene sottoposto a monitoraggio il limite inferiore della prateria, il quale, essendo ecologicamente più fragile di quello superiore, testimonia sinteticamente la dinamica dell'intera prateria. La tecnica usata, comunemente definita "balisage", prevede l'utilizzo di corpi morti da collocare sul fondo e la rilevazione di una serie di descrittori.

La densità e il ricoprimento

La densità della vegetazione, intesa come numero di fasci fogliari per m² (Giraud, 1977a), rappresenta uno dei principali descrittori sintetici dello stato di salute delle praterie.

La stima della densità si effettua mediante la conta diretta, in immersione, dei fasci fogliari in cinque quadrati (40x40 cm) per ogni stazione; i risultati della conta si estrapolano al metro quadro e si mediano. In immersione si effettua anche una valutazione percentuale della superficie del fondo marino ricoperta dalla prateria come media dei valori attribuiti da due operatori distinti. La densità relativa viene stimata correggendo la densità assoluta misurata nei quadrati per il fattore percentuale di ricoprimento del substrato.

A seconda del risultato la prateria si inserisce in una delle 5 classi di densità proposte da Giraud (1977a) (v. tabella a fianco).

Classe	Numero fasci	Stima di densità
I	oltre 700 fasci/m ²	Prateria molto densa
II	da 400 a 700 fasci/m ²	Prateria densa
III	da 300 a 400 fasci/m ²	Prateria rada
IV	da 150 a 300 fasci/m ²	Prateria molto rada
V	da 50 a 150 fasci/m ²	Semiprateria

La fenologia (Giraud, 1977b; 1979)

Lo studio delle caratteristiche fenologiche della pianta permette di calcolare un certo numero di parametri: *il numero medio di foglie per ciuffo*, *l'indice fogliare* e *il coefficiente "A"*. Tali parametri permettono di descrivere lo stato di vitalità delle piante che costituiscono la prateria.

In immersione vengono prelevati 14 fasci fogliari (di cui ne vengono analizzati 10) ad una distanza di circa 50-100 cm l'uno dall'altro, evitando i fasci dicotomici; i fasci vengono conservati in formalina al 4 %.

In laboratorio ciascun fascio viene scomposto nelle singole foglie, rispettando l'ordine distico di inserzione. Le foglie vengono numerate dal centro del fascio verso l'esterno con numerazione progressiva e vengono separate in *giovani* (le più interne, lunghe meno di 50 mm), *intermedie* (lunghe più di 50 mm e senza ligula) ed *adulte* (le più esterne, provviste di ligula).

Per ciascuna foglia giovanile vengono misurate:

- larghezza, misurata al punto medio della foglia;
- lunghezza, misurata dal punto d'inserzione della base sul rizoma all'apice del lembo.

Per ciascuna foglia intermedia vengono misurate:

- larghezza, misurata al punto medio della foglia;



- lunghezza totale, misurata dal punto d'inserzione della base sul rizoma all'apice del lembo;
- lunghezza del tessuto verde, misurata dalla base della concavità della ligula fino alla fine del tessuto verde;
- lunghezza del tessuto bruno, quando presente;
- lunghezza del tessuto bianco, quando presente;
- stato dell'apice.

Per ciascuna foglia adulta vengono misurate le stesse grandezze viste per le foglie intermedie, con in più:

- lunghezza della base, misura che va dal punto d'inserzione sul rizoma al centro della concavità della ligula.

Queste misure permettono la stima dei seguenti *parametri fenologici* relativi alle sole foglie adulte e intermedie.

- *Numero medio di foglie per ciuffo*: si ricava dalle misurazioni dirette effettuate sull'apparato fogliare.
- *Indice fogliare (L.A.I.)*: superficie di lembo fogliare per fascio e per m², considerando una sola faccia per convenzione secondo il seguente calcolo:

L.A.I. adulte = lunghezza media adulte x larghezza media adulte x numero medio adulte

L.A.I. interm. = lunghezza media interm. x larghezza media interm. x numero medio interm.

L.A.I. totale = L.A.I. adulte + L.A.I. interm.

L'indice fogliare per metro quadro si ottiene moltiplicando l'indice totale per il valore di densità media (fasci/m²).

- *Coefficiente "A"*: percentuale di apici rotti sul numero totale di foglie. Questo parametro può essere usato come indice dell'impatto dell'ambiente naturale sulle foglie più lunghe; il risultato è funzione dello stress idrodinamico e del grazing a cui la pianta è sottoposta. Il calcolo per il parametro è il seguente:

Coef. "A" adulte = numero adulte con apice eroso/numero totale adulte

Coef. "A" interm. = numero interm. con apice eroso/numero totale interm.

Coef. "A" totale = Coef. "A" adulte + Coef. "A" interm.

La lepidocronologia (Pergent et al., 1982; Pergent, 1987)

La produzione di una prateria può essere valutata in maniera indiretta, determinando l'età delle parti terminali dei rizomi. I punti di inserimento delle foglie sul rizoma, infatti, sono riconoscibili dalle scaglie che permangono sul rizoma dopo che il lembo fogliare è caduto. È stato dimostrato che lo spessore delle scaglie procedendo lungo un rizoma, a partire dall'ultima foglia vivente, presenta variazioni cicliche approssimativamente riconducibili al ciclo pluriennale di crescita della pianta. Dall'esame dello spessore delle scaglie di *Posidonia*, è possibile stimare la biomassa prodotta, e quindi è possibile valutare la produzione di una prateria sia come misura integrata su un intervallo temporale standardizzato sia su base annuale. Una ricostruzione pluriennale di un numero significativo di rizomi in una prateria può darci conto delle variazioni prodotte da stress ambientali a cui l'ecosistema è andato incontro nel corso degli anni.

I rizomi vengono prelevati in immersione, scegliendo quelli ortotropi (a crescita verticale) e distanti tra loro almeno 50-100 cm, in modo da raccogliere rizomi ortotropi appartenenti ad individui differenti. Successivamente tali rizomi vengono conservati immediatamente in alcool a 95°; tale metodo di fissazione permette di reidratarli in laboratorio e di lavorare su materiale molto simile al fresco. Dopo la reidratazione, le scaglie vengono staccate a partire da quella più distante dall'ultima foglia viva e successivamente numerate; quando le scaglie sono complete si prende la misura della loro lunghezza dal punto di inserzione sul rizoma al punto mediano dell'apice (ligula). Lo spessore delle scaglie viene misurato su sezioni delle medesime (al centro di ogni scaglia, vicino al fascio cribro-legnoso) e ogni volta che raggiunge un minimo, il rizoma viene tagliato a livello dell'inserzione della scaglia con minimo di spessore. Si ottengono così una serie di segmenti corrispondenti ai vari anni, delimitati dai punti di inserzione di due scaglie con spessore minimo, per i quali si misura la lunghezza. Questi segmenti annuali vengono poi messi in stufa (70°C per 72 ore) e quindi pesati per determinarne il peso secco. Vengono, inoltre, prese le misure biometriche della foglia adulta più vecchia e quindi viene messa in stufa per calcolare il peso secco (base e lembo separatamente) dopo averla ripulita dagli epifiti.

La presenza di correlazioni morfometriche tra la lunghezza della scaglia e la lunghezza totale della foglia permette di stimare la lunghezza media delle foglie che hanno vissuto in un dato ciclo annuale. Calcolando la retta di regressione tra la lunghezza della scaglia e la lunghezza totale della foglia adulta più vecchia con apice ancora integro si può stimare la lunghezza media delle foglie per anno e quindi la produzione fogliare di una prateria.

La produzione primaria fogliare per fascio (P) viene calcolata con la seguente formula:

$$P = N \cdot L \cdot D$$

dove:

N = numero medio di foglie per fascio e per anno, stimato mediante il calcolo della media del numero di scaglie presenti per ciclo annuale

L = lunghezza media annuale delle foglie, stimata mediante la retta di regressione tra la lunghezza media della foglia più vecchia (con apice integro) e la lunghezza media della sua scaglia. Questo valore viene moltiplicato per il fattore di conversione ($C = 1.6$) che tiene conto della profondità della prateria e permette di estrapolare il dato su scala annuale

D = densità media annuale delle foglie più vecchie (mg/cm), corrispondente al rapporto del peso secco della foglia più vecchia per la sua lunghezza.

La produzione fogliare è espressa in mg/fascio all'anno, moltiplicando poi questo valore per la densità media della prateria (numero fasci/m²) si ottiene la produzione espressa in mg/m² all'anno.

La produzione del rizoma, espressa in mg/fascio/anno, è data dalla media dei valori di produzione dei segmenti annuali di rizoma.

Il balisage (Bertrand et al., 1986)

Dopo la selezione dei siti da sottoporre a sorveglianza, è necessario impiantare dei punti di riferimento permanenti sulla base dei quali seguire nel tempo la dinamica del limite inferiore della prateria, il quale, essendo ecologicamente più fragile rispetto a quello superiore, testimonia sinteticamente la dinamica dell'intera prateria.

Per tali fini si utilizza come modello il protocollo adottato dal *Reseau de Surveillance Posidonies* (Bertrand *et al.*, 1986). Questo protocollo prevede l'uso di corpi morti (*balises*) da collocare sul fondo.

Ciascun corpo morto (di forma tronco-conica e con caratteristiche standard) è munito di un anello centrale per l'installazione di un galleggiante numerato e di tre fori che ne permettono il fissaggio al fondo, e reca alla sommità un'etichetta con il relativo numero e data di impianto.

In ciascun sito vengono installati 10 corpi morti, secondo la procedura di seguito descritta:

- identificazione del limite inferiore della prateria;
- marcatura con un picchetto del punto centrale scelto;
- posizionamento geografico del punto centrale con la migliore precisione possibile.

I corpi morti vengono disposti a 5 metri di distanza l'uno dall'altro e a stretto contatto con il limite inferiore. A circa 1,5 metri da ciascun corpo morto, a valle rispetto al limite della prateria, viene installato un picchetto testimone che servirà da appoggio per le riprese fotografiche successive. Queste ultime si realizzano in tre fasi, una centrata sul corpo morto e altre due rispettivamente a destra e a sinistra di questo. Le riprese si effettuano in orizzontale, ad un'altezza di 0,5 metri rispetto al fondo con obiettivo da 35 mm.

In ogni sito, in una banda di 10 metri di larghezza a monte del limite lungo la linea dei corpi morti, vengono rilevati i seguenti dati:

- profondità;
- tipo di limite (netto, progressivo, erosivo, regressivo);
- verifica dello stato di continuità della prateria a monte del limite;
- stima del ricoprimento della prateria;
- stima della densità dei fasci fogliari;
- portamento predominante dei rizomi (% rizomi plagiotropi);
- stima della percentuale di scalzamento della prateria;
- valutazione litologica della natura del fondale a valle dei corpi morti (roccia, ghiaia, sabbia, fango);
- prelievo dei campioni di *Posidonia* per le analisi biologiche.

In corrispondenza di uno o due corpi morti si esegue poi il prelievo di sedimento per le analisi granulometriche.

Su ciascun sito vengono compiute osservazioni annuali.

Sulla scheda di campo verranno riportate le indicazioni relative allo stato del litorale prospiciente la prateria studiata (presenza di opere portuali, insediamenti urbani e/o agricoli, foci di fiumi, presenza di banchette ecc.).



BIBLIOGRAFIA

- Bertrand M.C., Boudouresque C.F., Foret P., Lefevre J.R., Meinesz A. (1986) *Réseau de surveillance Posidonies*. Rapport. 1985. Conseil Reg. PACA, GIS Posidonie. CIPALM, CAPVAR, CELCOP, GIS Posidonie Edit., Marseille, Fr., 1-61.
- Giraud G. (1977a) *Essai de classement des herbiers de Posidonia oceanica (Linné) Delile*. Botanica Marina, 20 (8), 487-491.
- Giraud G. (1977b) *Contribution à la description et à la phénologie quantitative des herbiers à Posidonia oceanica (L.) Delile*. Thèse doctorat 3eme cycle, Univ. Aix-Marseille II, France, 150 pp.
- Giraud G. (1979) *Sur une methode de mesure et de comptage des structures foliaires de Posidonia oceanica (Linnaeus) Delile*. Bull. Mus. Hist. nat. Marseille, 39, 33-39.
- Pergent G. (1987) *Recherches lépidochronologiques chez Posidonia oceanica (Potamogetonaceae). Fluctuations des paramètres anatomiques et morphologiques des écailles des rhizomes*. Thèse Doct. Océanol., Univ. Aix-Marseille II, Fr.
- Pergent G., Boudouresque C.F., Crouzet A. (1982) *Mise en évidence de variations cycliques dans les écailles de Posidonia oceanica*. Lab. Ecol. Benthos, Fac. Sci. Marseille-Luminy et Parc National Port-Cros édit.



Utilizzo dei molluschi bivalvi nel programma di monitoraggio dell'ambiente costiero (*Protocollo Mussel Watch*)

→ INTRODUZIONE

L'impiego dei molluschi bivalvi nel monitoraggio della contaminazione chimica degli ambienti costieri è, da decenni, utilizzato sia negli Stati Uniti sia in numerosi Paesi europei in programmi internazionali di Mussel Watch.

La caratteristica più importante, che la specie scelta come bioindicatore deve presentare, è la mancanza di meccanismi biochimici o fisiologici in grado di regolare le concentrazioni tissutali dei contaminanti. In questo modo, infatti, l'organismo concentra queste sostanze nei propri tessuti in maniera proporzionale al loro livello ambientale.

I principali vantaggi offerti da un programma di monitoraggio condotto mediante l'utilizzo di bioindicatori si possono riassumere nei seguenti punti:

- valutazione del grado di contaminazione dell'area costiera secondo una misura "integrata nel tempo" e non riferibile, quindi, al solo momento in cui è stato effettuato il prelievo;
- possibilità di evidenziare facilmente gradienti di inquinamento sia in senso spaziale che temporale, nonché di effettuare confronti tra aree geograficamente distanti;
- stima della "biodisponibilità" delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente marino e valutazione del rischio legato al trasferimento di questi elementi attraverso le catene alimentari.

Tuttavia, il corretto utilizzo di organismi bioindicatori in programmi di biomonitoraggio non può prescindere dalla conoscenza che alcune variabili biologiche sono note influenzare l'accumulo dei contaminanti negli organismi. L'effetto di queste variabili deve dunque essere attentamente considerato sia per una impostazione rigorosa del programma di monitoraggio che per una corretta interpretazione dei risultati ottenuti.

Vengono di seguito riportate alcune indicazioni di carattere generale.

→ ORGANISMI DA CAMPIONARE

Esistono alcuni requisiti considerati indispensabili affinché una specie possa essere utilizzata come bioindicatore. Tra questi, l'assenza di meccanismi di regolazione delle concentrazioni tissutali di contaminanti, la sessilità, le abitudini alimentari preferibilmente di tipo filtratorio, facilità di raccolta, ampia diffusione geografica ed infine, ma non per questo meno importante, la conoscenza del ciclo biologico.

La specie sicuramente più utilizzata a livello mondiale per questo tipo di studi è il mitilo comune, per il quale la letteratura internazionale offre numerosi dati di riferimento ed indicazioni sulle principali variabili biologiche da considerare nell'interpretazione dei dati.

Si raccomanda pertanto che il presente programma sia effettuato esclusivamente mediante l'utilizzo del mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis*.

→ UTILIZZO DI INDIVIDUI APPARTENENTI A POPOLAZIONI NATURALI

In questo caso i mitili da analizzare sono quelli provenienti da popolazioni naturali, comprese quelle che si trovano su strutture artificiali come piloni, catene sospese, pali ecc., ma comunque non soggette ad esposizione all'aria (come ad esempio nelle pozze di scogliera). Per quelle Regioni in cui possa essere difficile il reperimento di organismi naturali, lo studio di biomonitoraggio potrà essere effettuato mediante l'utilizzo di organismi "trapiantati" secondo quanto verrà descritto in seguito.

I mitili provenienti da popolazioni naturali dovranno essere campionati in modo tale da selezionare almeno 150 individui di taglia approssimativamente compresa tra il 70-90% della media delle taglie massime osservate. Se non si raggiunge il numero di 150 individui, procedere come descritto nel paragrafo "Utilizzo di individui trapiantati".

Il periodo di esposizione dovrà coincidere con il periodo di massima maturazione presunta, in quanto variabile geograficamente.

I periodi di campionamento dovranno fissarsi in relazione ai periodi di minore e maggiore accrescimento gonadico. Tali periodi variano a seconda delle caratteristiche idrologiche dei bacini e vanno perciò fissati in sede locale in base alle indicazioni fornite dalla letteratura e dagli operatori del settore della mitilocoltura, tenendosi comunque negli intervalli, rispettivamente, di gennaio-marzo e di agosto-ottobre.

I due periodi di campionamento sono stati selezionati al fine di acquisire informazioni riguardo l'influenza che lo stato di maturazione sessuale esplica sulla capacità di bioaccumulo dell'organismo.

Negli organismi destinati alle analisi dovranno essere misurati i principali parametri biometrici secondo quanto indicato nell'apposito protocollo.

→ UTILIZZO DI INDIVIDUI TRAPIANTATI

In quelle aree in cui vi siano difficoltà reali nel reperimento di mitili naturali, l'indagine di monitoraggio potrà essere effettuata secondo la tecnica degli organismi trapiantati.

In questo caso i mitili dovranno essere raccolti da una popolazione naturale proveniente da un sito di controllo o di allevamento e traslocati per un periodo di 4 settimane nelle aree da monitorare prive di organismi nativi (compresa almeno un'area di bianco, anche se la medesima del sito di prelievo), senza alcuna stabulazione e con uguale procedura di trattamento per tutti i campioni utilizzati.

Gli organismi da trapiantare dovranno essere in numero compreso tra 200 e 300 individui, di taglia omogenea approssimativamente compresa tra il 70 e il 90% delle dimensioni massime della popolazione da cui sono raccolti.

Il trapianto sarà effettuato mantenendo gli organismi in reti di nylon, strutture plastiche o di acciaio inossidabile da fissare nella stazione da monitorare, ad una profondità compresa tra 1 e 5 metri e ad almeno 1 metro dal fondo.

Il periodo di esposizione dovrà coincidere con il periodo di massima maturazione presunta, in quanto variabile geograficamente.

Trascorse 4 settimane, gli organismi traslocati verranno recuperati e conservati fino al momento dell'analisi.

Anche per questi individui dovranno essere accuratamente misurati tutti i parametri morfometrici secondo quanto già indicato per le popolazioni naturali.

Si sottolinea l'importanza della misura accurata dei parametri indicati, che renderà possibile valutare l'effetto delle variazioni ponderali degli organismi (legate ad es. al ciclo riproduttivo) sulle fluttuazioni stagionali delle concentrazioni dei contaminanti. Sarà oltremodo possibile stabilire se (ed in che misura) eventuali differenze tra stazioni diverse possano essere legate a variazioni nelle condizioni metaboliche degli organismi utilizzati, piuttosto che a diversi livelli ambientali dei contaminanti.

→ CONSERVAZIONE NEL TRASPORTO

Dopo il prelievo, i campioni destinati allo studio del bioaccumulo possono essere congelati a -20°C o mantenuti refrigerati a circa 4°C in ambiente umido, ma non immersi, fino a 24 ore dal momento del prelievo.

Qualora si intenda estendere lo studio ad altre indagini che prevedono una migliore conservazione (ad es. analisi dei biomarker), i campioni dovranno essere posti e mantenuti in azoto liquido.

BIBLIOGRAFIA

- Lobel P.B., Bajdik C.D., Belkhole S.P., Jackson S.E., Longerich H.P. (1991) *Improved protocol for collecting Mussel Watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 409-411.
- Phillips D.J.H., Segar D.A. (1986) *Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives*. Marine Pollution Bulletin, 1, 10-17.

- Regoli F., Orlando E. (1993) *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses. *Science of Total Environment Supplement*, 2, 1283-1292.
- Regoli F., Orlando E. (1994) *Seasonal variation of trace metal concentrations (Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) in the digestive gland of Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis: comparison between a polluted and a non polluted site*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(1), 36-43.
- Regoli F., Orlando E. (1994) *Bioavailability of "Biologically detoxified" lead: risks arising from consumption of polluted mussels*. *Environmental Health Perspectives*, 102, Supplement 3, 335-338.
- Regoli F., Orlando E. (1994) *Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) in the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis during a field transplant experiment*. *Marine Pollution Bulletin*, 28, 592-600.

a cura di

David PELLEGRINI, Claudia VIRNO LAMBERTI (ICRAM, Roma)

Francesco REGOLI (Istituto Biologia e Genetica, Università di Ancona)

Silvano FOCARDI (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena)



Raccolta e preparazione dei molluschi

Tratto e modificato da: UNEP/FAO/IAEA (1984) *Sampling of selected marine organisms and sample preparation for the analysis of chlorinated hydrocarbons*. Reference Methods for Marine Pollution Studies n. 12 Rev. 1, UNEP

→ PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Come già indicato nella scheda precedente, che riporta il protocollo del *Mussel Watch*, dopo il prelievo, i campioni destinati allo studio del bioaccumulo possono essere mantenuti refrigerati a circa 4°C, in ambiente umido ma non immersi in acqua, fino a un massimo di 24 ore dal momento del prelievo; ovvero essi possono essere congelati a -20°C. Qualora si intenda estendere lo studio ad altre indagini che prevedono una migliore conservazione (ad es. analisi dei biomarker), i campioni dovranno essere posti e mantenuti in azoto liquido.

Gli organismi selezionati dovranno essere di taglia omogenea. Si raccomanda che questa sia approssimativamente compresa tra il 70 e il 90% della taglia massima della popolazione. Va raccolta la parte molle di almeno 30 organismi (suddivisi in almeno 3 replicati), ciascun replicato contenente i tessuti di 10 animali.

Deve essere usata la massima cura nell'evitare la contaminazione del campione durante la fase di manipolazione del materiale da analizzare; pertanto gli organismi dovranno essere maneggiati con le dovute cautele al fine di ridurre i rischi di contaminazione.

Analisi di composti organici

È importante evitare il contatto dei campioni con materiale plastico.

Va utilizzato materiale di pyrex o di porcellana o di plastica rivestita di alluminio decontaminato, bisturi, pinzette, coltelli in acciaio inossidabile decontaminati.

Tutto il materiale deve essere ben lavato con detergente, risciacquato con acqua distillata e con acetone.

Analisi dei metalli in tracce

Va utilizzato materiale da dissezione (coltelli, scalpelli, bisturi, pinzette e forbici) in acciaio inossidabile o teflon.

→ PROCEDIMENTO

- Annotare i parametri biometrici (peso delle carni, lunghezza e peso delle conchiglie) degli organismi destinati alle analisi.
- Ripulire tali organismi da eventuali incrostazioni presenti sulle valve, rimuovendo il materiale estraneo con un coltello pulito.
- Lavare ciascun esemplare con acqua distillata o con acqua di mare pulita.
- Estrarre il bisso dalle valve chiuse.
- Usare un secondo coltello pulito: inserirlo fra le valve dove estrude il bisso ed aprirle con delicatezza tagliando il muscolo adduttore posteriore (Fig. 1).
- Assicurarsi che il bisso sia stato eliminato completamente.

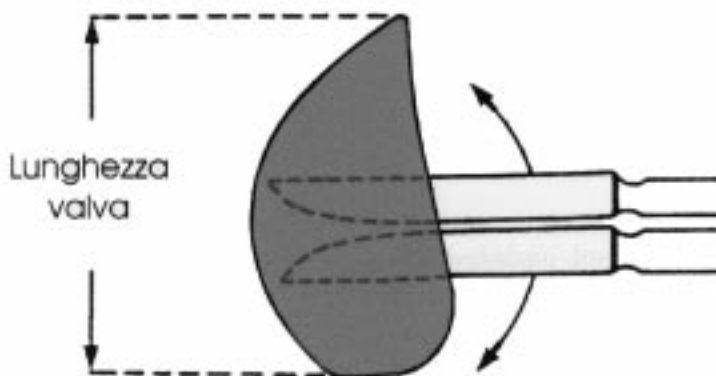


Fig. 1- Apertura del mitilo.



- Lavare il tessuto molle del mitilo con acqua distillata.
- Prelevarlo con pinzette pulite e sgocciolarlo.
- Raccogliere la parte molle.
- Annotare il peso composito delle parti molli considerate, che sarà registrato come *peso del pool campione*.
- Le parti molli raccolte vanno chiuse in fogli di alluminio decontaminato (nel caso dell'analisi di composti organici) o in idonei contenitori – buste di plastica – (nel caso dell'analisi di metalli in traccia) ed analizzate. Se i campioni non vengono analizzati subito, è possibile congelarli a -20°C, dopo averli posti in contenitori etichettati.
- Per l'analisi di metalli in tracce, i campioni essiccati che non vengono sottoposti immediatamente al ciclo di mineralizzazione devono essere conservati in essiccatore.

Per ogni pool-campione deve essere predisposta una scheda recante le specifiche del campionamento e la registrazione dei parametri, quali il numero di organismi considerato, la lunghezza media delle valve ed il peso del pool-campione.

→ **NOTA**

Ricordare che:

- per i mitili la lunghezza totale delle valve va misurata come indicato nella figura 1;
- per peso dell'organismo ci si riferisce al peso fresco dell'intero mitilo;
- per peso del campione ci si riferisce al peso totale dei tessuti molli (pool-campione);
- le lunghezze medie ed i pesi medi si riferiscono alla media aritmetica dei pesi e delle lunghezze di singoli individui;
- calcolare sempre le deviazioni standard.



Analisi dei composti organoclorurati

→ ANALISI

Le analisi del campione vanno condotte in ambiente pulito e secondo le norme di buona pratica di laboratorio per l'analisi di composti organici in tracce.

Tutta la vetreria usata deve essere ben lavata e decontaminata e i reagenti usati devono essere di grado RPE (puri per analisi di pesticidi).

→ PRINCIPIO DEL METODO

- Estrazione con miscela acetone + etere di petrolio (1:1).
- Ripartizione in fase solida e colonna cromatografica di Florisil.
- Determinazione con Gascromatografia capillare e Rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

→ ESTRAZIONE

25-30 g di campione vengono omogenizzati con miscela acetone-etere di petrolio (1 : 1, v : v) (1 x 100 ml e 2 x 50 ml) con omogenizzatore UltraTurrax. Il solvente derivante dalle estrazioni viene prelevato e passato su colonna di 25 g di sodio solfato anidro (200 x 20 mm d.i.).

Lavare la colonna di sodio solfato con 4 x 5 ml di etere di petrolio.

Raccogliere gli eluati e concentrarli a secco con evaporatore rotante (40°C; pressione ridotta).

Pesare il residuo oleoso e trasferire 1 g di olio in 2,5 ml di n-esano su colonna pronta all'uso Extrelut 3 (Merck). Attendere 10 minuti poi eluire con 4 x 5 ml di CH₃CN.

Trasferire l'eluato su una colonna impaccata con 0,72 g di miscela 1+1 di Extrelut 3+ C₁₈.

Eluire la colonna con 3 x 10 ml di etere di petrolio.

Raccogliere gli eluati, concentrarli a secco con rotavapor e riprendere con 1 ml di etere di petrolio.

→ PURIFICAZIONE

Preparare a secco una colonna cromatografica (vetro 300 x 10 mm d.i., con rubinetto in PTFE) con 2,5 g di Florisil (60-100 mesh, attivato a 130°C per una notte) ricoperto con uno strato di 1 cm di sodio solfato anidro.

Lavare la colonna con 3 x 5 ml di etere di petrolio e scartare i lavaggi.

Trasferire quantitativamente sulla colonna l'estratto grezzo effettuando la-

vaggi della beuta con 3 x 1 ml di etere di petrolio 40-60°.

Eluire la colonna con:

- 1) 30 ml di n-esano;
- 2) 25 ml di n-esano:toluene (80:20);
- 3) 30 ml di n-esano:toluene:etile acetato (80:19:1)

Raccogliere i 3 eluati in 3 beute da 100 ml.

Nel primo eluato si troveranno PCBs, DDE, Aldrin, HCB, Clordano, Mirex.

Nel secondo eluato si troveranno DDT, DDD, HCHs, clordano.

Nel terzo eluato si troveranno Dieldrin, Endrin e Metossicloro.



Concentrare ciascun eluato a piccolo volume con rotavapor e poi a secco per rotazione manuale. Riprendere con 1 ml di isoottano. Iniettare.

→ DETERMINAZIONE GAS-CROMATOGRAFICA

Viene condotta con Gascromatografo equipaggiato con Rivelatore a cattura di elettroni (ECD) e colonne capillari di idonea fase stazionaria.

È consigliabile, per la conferma, utilizzare due diverse colonne. Si citano ad esempio:

DB1 (15 m x 0.53 mm d.i. x 1,5 µm di spessore)

DB 1701 (15 m x 0.53 mm d.i. x 1 µm di spessore)

L'identificazione viene condotta per confronto con i tempi di ritenzione ottenuti iniettando, nelle stesse condizioni, soluzioni standard dei composti (ossia soluzioni a titolo noto).

Determinare la concentrazione dei composti identificati, confrontando le altezze o le aree con quelle dei picchi ottenuti iniettando quantità note dei composti standard e tenendo conto delle diluizioni effettuate.

Devono essere condotte prove in bianco con i reattivi.

Devono essere condotte prove di recupero dell'intera procedura con le soluzioni standard al fine di verificare le prestazioni del metodo.

Allo stesso scopo devono, infine, essere condotte prove di confronto con materiali di riferimento certificati.

→ RAPPRESENTAZIONE DEL DATO

Le concentrazioni dei composti considerati devono essere *espresse in µg/kg per unità di peso secco*.

Nella stessa unità di misura deve essere indicato il limite di quantificabilità analitica. Per questo metodo il limite di determinazione è pari a 0,01 µg/kg.

BIBLIOGRAFIA

- Di Muccio A., Stefanelli P., Funari E., Pelosi P., Generali T., Amendola G. (1999) *Levels of contamination by chlorobiphenyls in edible fishes in Adriatic sea during 1997*. Society Of Environmental Toxicology And Chemistry (SETAC)-Europe, 25-29 May 1999, Leipzig, Germany, p.120.
- Di Muccio A., Stefanelli P., Funari E., Pelosi P., Generali T., Amendola G. (2000) *Levels of contamination by chlorobiphenyls in the edible portion of fishes, shellfishes and crustaceans from Adriatic sea during 1997*. 3rd European Pesticide Residue Workshop (EPRW 2000), York (UK), 3-5 July 2000.



Analisi di tributilstagno (TBT), dibutilstagno (DBT) e monobutilstagno (MBT)

→ ANALISI

I campioni devono essere conservati in contenitori di ceramica lavati con acetone e n-esano e conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento delle analisi.

→ ESTRAZIONE

Omogenizzare il campione (5 g) con 40 ml di una soluzione tropolone/acetone 0,1%* e 10 ml di una soluzione di HCl 1N** in UltraTurrax (velocità 80 rpm x 100 per 50 secondi seguiti da 1 minuto di pausa per 4 volte, 200 secondi complessivi).

Lasciare il campione nella provetta per 12 ore per la digestione.

→ SEPARAZIONE

Agitare per 10 minuti il campione con 500 ml di H₂O e 50 ml di una soluzione tropolone/toluene 0,1%***. Se necessario, aggiungere 5 g di CaCl₂ per facilitare la formazione dell'emulsione durante l'estrazione. Filtrare il campione attraverso un imbuto con setto inerte e lavare con 40 ml di acetone/tropolone.

Dopo la separazione (circa 30 minuti), raccogliere la fase apolare contenente il campione in un imbuto separatore da 300 ml, filtrando attraverso un imbuto con setto e lavando con la soluzione tropolone/acetone.

Agitare nuovamente la fase polare e 50 ml di soluzione tropolone/toluene in un imbuto separatore per 10 minuti e lasciare separare per 1 ora.

A separazione avvenuta, scartare la fase polare.

Filtrare la fase apolare attraverso l'imbuto con setto e aggiungere all'altra, precedentemente raccolta, nell'imbuto separatore da 300 ml.

→ PURIFICAZIONE DEL CAMPIONE

Impaccare una colonna con 35 g di Na₂SO₄, essiccato in stufa a 105°C per 1 ora.

Eluire il campione e raccogliere in un pallone per evaporatore rotante.

Concentrare a 2-3 ml.

→ ANALISI SPETTROFOTOMETRICA DEL TBT

Portare il campione a secco con l'evaporatore rotante.

Il residuo viene ripreso con 4 ml di esano, tre di questi vengono posti in provette di vetro.

Alla soluzione si aggiungono 3 ml di NaOH al 3% (v/v) per eliminare lo stagno inorganico e le forme mono- e di-alchilstagno.

Si prelevano 2 ml di esano e si trasferiscono in provette da 5 ml per evaporarli a secco sotto azoto.

Il residuo viene digerito con 1 ml di HNO₃ al 69% per 1 ora a 120°C.

Si fa evaporare l'acido innalzando la temperatura a 150°C con le provette aperte.

Il residuo viene ripreso con 2 ml di soluzione satura di acido borico con l'1% di HCl.

* La soluzione è stata ottenuta miscelando 0,39 g di tropolone in 500 ml di acetone (tropolone: 2,3,5-trifeniltretazolo cloridrato).

** La soluzione è stata ottenuta miscelando 2,2 g di HCl in 60 ml di H₂O.

*** La soluzione è stata ottenuta miscelando 0,56 g di tropolone in 650 ml di toluene.



Lo stagno viene analizzato allo Spettrofotometro con la tecnica HGA-AS.

Le concentrazioni sono espresse in ng/g rispetto al peso fresco.

Il limite di determinazione del metodo è di 5 ng/g.

→ **ANALISI GASCROMATOGRAFICA**
(SEPARAZIONE DELLE VARIE FORME DI ALCHIL-STAGNO)

Derivatizzazione

Trasferire il campione in una provetta da 20 ml e concentrare a volume finale 5 ml (in toluene).

Aggiungere 5 ml di n-propil magnesio bromuro (reattivo di Grignard $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{MgBr}$; 2 mol/L circa).

Agitare le provette in acqua fredda e lasciare a 40°C per 30 minuti. Eliminare il reattivo di Grignard aggiungendo 20 ml di una soluzione di H_2SO_4 1N*.

Aggiungere il contenuto di ciascuna provetta a 40 ml di H_2O e 10 ml di una soluzione toluene/n-esano 10%.

Agitare di nuovo la fase polare con 10 ml della soluzione toluene/n-esano 10% (10 minuti) e lasciar separare.

Concentrare le due fasi apolari ottenute a 5 ml con evaporatore rotante.

Scartare la fase polare.

Purificazione del campione

Impaccare la colonna con 20 g di Florisil non attivato.

Dopo aver trasferito il campione in colonna, evaporare sotto N_2 a flusso lento per circa 2-3 ore.

Eluire con 120 ml di acetonitrile e 30 ml H_2O , raccogliendo in un imbuto separatore contenente 600 ml di H_2O e 100 ml di n-esano.

Agitare la soluzione contenente il campione per 10 minuti e lasciar separare.

Separare ancora la fase polare con 100 ml di soluzione toluene/n-esano 10%.

Scartare la fase polare.

Concentrare le due fasi apolari a 5 ml in evaporatore rotante e trasferire in una provetta da 20 ml.

Impaccare le colonne con 6 g di Florisil essiccato in stufa (130°C per 12 ore).

Eluire il campione con 40 ml di n-esano.

Concentrare l'eluato ad un volume finale esatto di 5 ml.

→ **ANALISI GASCROMATOGRAFICA**

Utilizzare un gascromatografo con rivelatore fotometrico a fiamma (FPD), dotato di un filtro per emissioni di stagno regolato su 610 nm e colonna capillare di silice fusa a fase legata del tipo SBP-5, lunghezza 30 m, spessore del film 0,25 μm , diametro interno 0,2 mm.

Le concentrazioni sono espresse in ng/g rispetto al peso fresco.

Il limite di determinazione del metodo è di 5 ng/g per ciascuna delle forme di alchil-stagno determinate (MBT, DBT e TBT).

* La soluzione è stata ottenuta miscelando 4,9 g di H_2SO_4 in 100 ml di H_2O .



Analisi di idrocarburi policiclici aromatici

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo prevede una saponificazione seguita da una estrazione con una soluzione di cicloesano e metanolo. La purificazione viene eseguita su gel di silice.

La determinazione quali-quantitativa viene eseguita mediante cromatografo liquido (HPLC) con rivelatore spettrofotometrico a fluorescenza o di assorbimento nell'UV.

In alternativa al cromatografo liquido (HPLC), ove le concentrazioni lo permettano, può essere utilizzata la gas-cromatografia con colonna capillare, con rivelatore FID o accoppiato con uno spettrometro di massa. Indipendentemente dalle apparecchiature utilizzate per le misure, nel rapporto di analisi devono essere specificati il limite di rilevabilità della metodica utilizzata e le percentuali di recupero dei singoli elementi (accuratezza) rispetto a matrici organiche certificate.

→ PROCEDIMENTO

Si pesano g 10 di tessuto in un pallone da 100 ml con collo smerigliato e si aggiungono 30 ml di potassa alcolica (KOH 2N in metanolo). Si omogeneizza con UltraTurrax per 5 minuti e si mette a refluire su di un bagno ad acqua a 80°C per due ore.

Si trasferisce il contenuto in un provettone da centrifuga e si effettua la prima estrazione aggiungendo 40 ml di cicloesano e 20 ml di una miscela composta da metanolo:acqua estratta 4:1. Si mette su agitatore per 15 minuti e si centrifuga a 1200 giri per altri 15 minuti.

Si preleva il surnatante e si passa su di una colonna (20 mm di diametro) riempita con solfato di sodio (circa 20 g) raccogliendo l'eluato in una beuta da 150 ml. Si effettuano altre tre estrazioni con 25 ml di cicloesano.

Dopo aver concentrato a piccolo volume si trasferisce quantitativamente su una colonna cromatografica (10 mm di diametro con rubinetto in teflon e serbatoio) in cui vengono caricati 5 g gel di silice (disattivato al 15%) e si eluisce con 75 ml di n-esano. Si porta con cautela a secco e si riprende con 2 ml di acetonitrile.

La determinazione viene condotta su di HPLC con rivelatore a fluorescenza. La fase della colonna è una C18 (25 cm x 4,6 mm i.d.). L'eluizione avviene mediante un gradiente binario acqua/acetonitrile (60-100% in 30 minuti) ad un flusso di 1,5 ml/min.

La determinazione qualitativa viene effettuata sulla base del tempo di ritenzione, cioè del tempo di ritenzione relativo o dell'indice di ritenzione.

La determinazione quantitativa viene effettuata mediante l'uso di curve di calibrazione utilizzando preferibilmente la tecnica dello standard interno, altrimenti quello esterno.

Le concentrazioni sono espresse in mg/kg rispetto al peso secco.

Il limite di determinazione è di 0,001 mg/kg per singolo idrocarburo.

Apparecchiature e reagenti:

- vetreria da laboratorio in uso comune (opportunamente decontaminata)
- Ultraturax T25
- centrifuga
- agitatore
- rotavapor
- bagno ad acqua termostato
- cromatografo liquido (HPLC) con rivelatore spettrofotometrico a fluorescenza o di assorbimento nell'UV
- metanolo
- cicloesano
- n-esano
- acetonitrile
- idrossido di potassio
- acqua estratta con diclorometano
- gel di silice
- solfato di sodio (una notte in muffola a 600°C)



Analisi del contenuto di alcuni elementi chimici in *Mytilus galloprovincialis* (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Zn)

→ INTRODUZIONE ALLA METODICA

Il metodo prevede la digestione dei campioni con opportune soluzioni acide mediante sistema chiuso, a microonde o sistema a reflusso.

Il contenuto dei metalli è determinato per spettrofotometria ad assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma o termoelettrica. Per il mercurio si utilizza la tecnica dello strippaggio a vapori freddi previa riduzione del mercurio con cloruro stannoso.

In alternativa all'assorbimento atomico, ove le concentrazioni lo permettano, può essere utilizzata la spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES) o altre tecniche ugualmente valide in accordo con la letteratura corrente.

Indipendentemente dalle metodologie ed apparecchiature utilizzate per la mineralizzazione dei campioni e la determinazione degli elementi, nel rapporto di analisi devono essere specificati il limite di rilevabilità della metodica utilizzata e le percentuali di recupero dei singoli elementi (accuratezza) rispetto a matrici organiche certificate.

→ PROCEDIMENTO

Preparazione della soluzione per la mineralizzazione con forno a microonde

Trasferire circa 0,3 g di campione (sostanza secca) nell'apposito contenitore.

Aggiungere 7 ml di HNO₃ e 1 ml di H₂O₂.

Lasciare riposare dopo l'aggiunta dei reattivi per 15/20 minuti.

Impostare il ciclo operativo riportato a fianco.

È estremamente importante attenersi alle quantità di reattivi ed alle potenze indicate.

La prova in bianco viene effettuata con le stesse modalità operative sulla soluzione composta da 7 ml di HNO₃ e 1 ml di H₂O₂.

Altri sistemi di digestione (esempio reflusso per 4-6 ore) possono prevedere l'impiego di altre miscele acide (es. HCl:HNO₃ 3:1).

Dopo raffreddamento trasferire la sospensione in contenitore tarato, dopo eventuale filtrazione, e portare a volume noto (V) con acqua ultrapura.

Lettura analitica

I diversi elementi saranno misurati con differente metodologia a seconda delle concentrazioni attese e del tipo di elemento. Tale informazione dovrà essere riportata nella descrizione della metodica utilizzata.

Tutte le procedure di digestione ed analisi dovranno essere ripetute su campioni certificati.

Espressione dei risultati

Per il calcolo è utilizzata la seguente espressione:

Apparecchiature e reagenti:

- mineralizzatore a microonde dotato di contenitori a pressione
- spettrofotometro ad assorbimento atomico a fiamma ed elettroforne
- sistema generatore di idruri
- acido nitrico (HNO₃) 65%
- acqua ossigenata (H₂O₂) 30%
- acido cloridrico (HCl) 37%
- acqua ultrapura

Step	Tempo (min.)	Potenza (Watt)
1	1	250
2	1	0
3	5	250
4	5	400
5	5	650

$$C = A \cdot D \cdot V/M$$

dove:

C = contenuto del metallo nella matrice, espresso in mg/kg

A = concentrazione del metallo nella soluzione del campione, espressa in mg/L

D = fattore di diluizione (D = 1 se la soluzione in esame non è stata diluita)

V = volume finale espresso in millilitri

M = massa del campione espressa in grammi

I risultati finali vanno espressi in mg/kg peso secco.*

→ **LIMITE DI DETERMINAZIONE**

La metodica analitica deve essere in grado di rilevare concentrazioni nel campione di sedimento secco (mg/kg p.s.) almeno fino a:

Metallo	mg/kg p.s.
Al	5
As	0,5
Cd	0,1
Cr	0,2
Cu	1
Fe	1
Hg	0,05
Ni	0,1
Pb	0,2
V	1
Zn	1

* Per l'inserimento dei dati nel Si.Di.Mar. i risultati analitici devono essere convertiti in µg/kg p.s. moltiplicando il risultato espresso in mg/kg per il fattore di conversione 1000.

a cura di

David PELLEGRINI (ICRAM, Roma)

Barbara SALIVA (CIBM, Livorno)

Francesco REGOLI (Istituto Biologia e Genetica, Università di Ancona)



Campionamento

Lo studio dei fondali marini e l'analisi delle caratteristiche chimiche e fisiche dei sedimenti riveste una notevole importanza nella valutazione dell'ambiente marino. I sedimenti, infatti, possono svolgere un ruolo di trasporto diretto dei contaminanti e possono inoltre fungere da ricettacolo transitorio e definitivo degli stessi. Inoltre i livelli sedimentari più superficiali sono sede di un complesso sistema ecologico, quali le comunità bentoniche e le praterie a *Posidonia oceanica*, utili per caratterizzare le condizioni ambientali di aree marine e costiere. La notevole variazione spaziale e temporale dei parametri chimicofisici dei sedimenti e l'obiettivo dell'indagine richiedono una strumentazione opportuna in funzione del livello sedimentario da investigare (livello superficiale o livelli profondi).

→ IL CAMPIONAMENTO

Il campionamento di sedimenti superficiali viene effettuato con strumenti meccanici (benna o box corer), calati nella stazione di campionamento mediante un verricello. Nel momento in cui lo strumento arriva sul fondo marino l'operatore deve segnare le coordinate geografiche o chilometriche visualizzate sul monitor del DGPS.

I campioni, prelevati dallo strumento con una spatola di acciaio al fine di evitare un'eventuale contaminazione, devono essere omogeneizzati e successivamente conservati in appositi barattoli, etichettati e datati.

Per ogni stazione di campionamento deve essere compilata una scheda dove riportare i dati inerenti il punto di campionamento (nome stazione, data, ora, coordinate teoriche e reali, strumentazione utilizzata ecc.), il nome dell'operatore e dell'imbarcazione, il numero e la sigla dei campioni prelevati ed infine la descrizione macroscopica del campione (caratteristiche fisiche, colore, odore, grado di idratazione, presenza di resti vegetali o frammenti conchigliari, eventuali variazioni cromatiche e dimensionali).

Benna Van Veen o benna Shipek

La benna preleva una porzione del sedimento superficiale.

Durante il campionamento, la benna Van Veen e la Shipek arrecano al sedimento un disturbo comparabile, funzione del volume dello strumento e delle caratteristiche granulometriche del campione. La benna Van Veen durante la sua apertura arreca un maggiore disturbo al campione rendendo più difficile il prelievo del livello superficiale (0-3 cm); a tale problema si può ovviare utilizzando il modello dotato di sportellini superiori. Entrambi i tipi di benna, sia Van Veen che Shipek, non consentono di apprezzare le variazioni verticali delle caratteristiche fisiche del materiale recuperato né di campionare i livelli profondi.

Box corer

Il box corer permette di ottenere un ampio volume di sedimento con una profondità di penetrazione di circa 30 cm. Si tratta di una "scatola" a base quadrata o rettangolare, zavorrata e in grado di penetrare il fondale; il recupero del sedimento è assicurato da una chiusura basale. Date le modalità di campionamento e di recupero, il campione, ed in particolare la sua parte centrale, può essere considerato indisturbato.

Tale strumento consente sia il campionamento del livello superficiale (0-3 cm) sia quello di livelli più profondi; permette inoltre di effettuare una accurata descrizione del sedimento (variazioni fisiche e cromatiche laterali e verticali, strutture sedimentarie ecc.) lungo tutto lo spessore recuperato.



→ CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DI SEDIMENTO

I campioni di sedimento devono essere conservati in contenitori appositi in funzione delle analisi a cui devono essere sottoposti; si deve prelevare un campione omogeneo e rappresentativo del livello indagato.

Analisi del contenuto d'acqua

I campioni, raccolti in barattoli di polietilene puliti e pre-pesati, devono essere immediatamente congelati a -20°.

Caratteristiche granulometriche

I campioni devono essere conservati in contenitori di plastica o vetro a temperatura ambiente fino all'arrivo in laboratorio, dove devono essere conservati a +4°C.

Analisi di Carbonio totale ed organico

I campioni, raccolti in barattoli di polietilene puliti e pre-pesati, devono essere immediatamente congelati a -20°.

Analisi di spore di clostridi

Il sedimento destinato all'esame microbiologico deve essere conservato in recipienti puliti e sterili e conservato refrigerato durante il trasporto e fino al momento dell'analisi, che deve essere svolta entro 24 ore dal momento del prelievo.

Analisi di TBT

I campioni, raccolti in barattoli di polietilene decontaminati, devono essere immediatamente congelati a -20°.

Analisi di composti organoclorurati

Si prelevano campioni omogenei, che devono essere conservati entro fogli di alluminio decontaminati alla temperatura di -20°C.

Analisi di idrocarburi policiclici aromatici

I campioni devono essere conservati alla temperatura di -20°C in barattoli di polietilene decontaminati.

Analisi di metalli

I campioni devono essere conservati ad una temperatura inferiore a 4°C in barattoli di polietilene decontaminati.

Saggi biologici

Si preleva uno spessore di circa 3 cm di sedimento superficiale. Il sedimento dovrà essere riposto in contenitori di materiale plastico (polietilene) o di vetro opportunamente decontaminati tramite miscela diluita di HCl e HNO₃, avendo cura di riempire totalmente il recipiente.

BIBLIOGRAFIA

- Larson R., Morang A., Gorman L. (1997) *Monitoring the coastal environment; part II: sediment sampling and geotechnical methods*. J. Coastal Research, 13, 2, 308-330.
- Weaver P.P.E., Schultheiss P.J. (1990) *Current methods for obtaining, logging and splitting marine sediment cores*. Marine Geophysical Researches, 12, 85-100.



Analisi del contenuto d'acqua

Tratto da: Allegato A del Rapporto *Progetto per le Attività di Ricerca e Sperimentazione per la Salvaguardia del Mare Adriatico: Sviluppo di sistemi conoscitivi per la gestione dei problemi ambientali dell'ecosistema Adriatico. Rapporto Intermedio. Marzo 1996.*

→ PROCEDURA ANALITICA

I campioni, una volta scongelati, vengono pesati e successivamente seccati in stufa a 40°C, raffreddati e pesati di nuovo. La percentuale d'acqua contenuta nel sedimento si ricava dal rapporto fra il peso del sedimento umido e il peso di quello secco, moltiplicato per 100.

Analisi delle caratteristiche granulometriche

→ PROCEDIMENTO

Per la determinazione delle caratteristiche granulometriche dei sedimenti marini si consiglia la seguente metodica.

Trattare ogni campione con una soluzione di perossido di idrogeno ed acqua distillata (2:8) per 48 ore a temperatura ambiente per facilitare la separazione dei granuli.

In seguito, separare il sedimento su maglia da 63 μm in umido con acqua distillata; le due frazioni ottenute vanno essiccate in stufa a 60°C e successivamente pesate.

Vagliare la frazione > 63 μm (sabbia e ghiaia) con pile di setacci da -1 a 4 phi con un intervallo di 0,5 phi (phi = $-\log_2$ del valore in mm) della serie ASTM; pesare il sedimento corrispondente a ciascun intervallo ed al termine delle operazioni calcolare il peso dell'intera frazione.

Le unità in possesso di strumentazione idonea alla determinazione della frazione fine o pelitica (< 63 μm) devono operare così che la frazione:

- sia quartata per ottenere la massima distribuzione casuale dei granuli;
- sia mantenuta in sospensione per 24 ore in una soluzione di acqua distillata ed esametafosfato di sodio (0,05%) in ragione di 2,5 g di campione per 100 ml di soluzione;
- infine, sia trattata con ultrasuoni ed analizzata mediante sedigrafo a raggi X o granulometro laser.

→ RAPPRESENTAZIONE DEI RISULTATI ANALITICI

I risultati analitici, espressi *in percentuale* (come rapporto tra il peso della frazione granulometrica ed il peso del campione totale), vanno rappresentati sotto forma tabellare, suddividendo il campione nelle classi granulometriche ghiaia, sabbia, silt e argilla, secondo le classi dimensionali riportate in tabella.

Il sedimento può essere, eventualmente, classificato secondo il diagramma triangolare proposto da Shepard (1954).

	Ghiaia	> 2 mm
	Sabbia	2 mm > x > 0,063 mm
Pelite	Silt	0,063 mm > x > 0,004 mm
	Argilla	< 0,004 mm

BIBLIOGRAFIA

Shepard F.P. (1954) *Nomenclature based on sand, silt, clay ratios*. Journal Sedimentary Petrology, 24, 151-158.



Analisi di carbonio totale e organico (Metodo Analizzatore Elementare)

Tratto da: Allegato A del Rapporto *Progetto per le Attività di Ricerca e Sperimentazione per la Salvaguardia del Mare Adriatico: Sviluppo di sistemi conoscitivi per la gestione dei problemi ambientali dell'ecosistema Adriatico. Rapporto Intermedio. Marzo 1996.*

CARBONIO TOTALE

→ CONSERVAZIONE E TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

I campioni conservati a -20° vengono scongelati e, dopo aver rimosso eventuali frammenti di alghe, gusci di conchiglie od altri residui macroscopici, vengono macinati con un mulino a palle in agata e liofilizzati. Si pesano circa 10-20 mg di sedimento liofilizzato direttamente in capsule di stagno con una microbilancia analitica. Le capsule vengono lavate prima con tetracloruro di carbonio e quindi con acetone, utilizzando reagenti di grado analitico, ed asciugate per una notte a 110°C .

→ PROCEDURA ANALITICA

Per il carbonio totale si procede direttamente alla determinazione mediante un analizzatore di carbonio ed azoto (tipo Fisons mod. EA1108 o mod. NA1500 o NA2000 o Perkin Elmer 2400). Quale standard si usa l'acetanilide. Periodicamente vengono effettuate determinazioni di controllo su un sedimento marino di riferimento (BCSS-1) il cui contenuto di carbonio totale è certificato dal *Canadian National Research Council*.

La calibrazione iniziale viene effettuata giornalmente con 4 standard di acetanilide e due capsule vuote. Ogni 12 campioni vengono analizzati due standard di acetanilide per ricalcolare il fattore di calibrazione ed un bianco (capsula di stagno pulita) il cui valore viene sottratto al valore determinato su ogni singolo campione.

Come gas di trasporto viene utilizzato l'elio, mentre per l'ossidazione si utilizza ossigeno. La colonna di ossidazione è costituita da cromo triossido, da argento ed ossido cobaltico-cobaltoso, mentre la colonna di riduzione è formata da ossido di rame e rame in granuli (Pella e Colombo, 1973). La combustione viene effettuata ad una temperatura di circa 1040°C . La separazione gas cromatografica dell'azoto e dell'anidride carbonica viene ottenuta con una colonna Porapak QS di 2 m a 65°C con rivelatore a conducibilità termica.

La concentrazione di carbonio totale presente nel sedimento viene espressa come percentuale in peso dell'elemento sul peso secco.

Il limite di determinazione è di $100 \mu\text{g/g}$.

CARBONIO ORGANICO

→ CONSERVAZIONE E TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

I campioni conservati a -20° vengono scongelati e, dopo aver rimosso eventuali frammenti di alghe, gusci di conchiglie od altri residui macroscopici, vengono macinati con un mulino a palle in agata e liofilizzati. Si pesano circa 10 mg di sedimento liofilizzato direttamente in capsule di argento con una microbilancia analitica. Le capsule vengono lavate prima con tetracloruro di carbonio e quindi con acetone, utilizzando reagenti di grado analitico, ed asciugate per una notte a 110°C .

→ PROCEDURA ANALITICA

Per la determinazione del carbonio organico si eliminano i carbonati mediante trattamento con acido cloridrico (Hedges e Stern, 1984) ultrapuro utilizzando una metodica simile a quella proposta da Nieuwenhuize *et al.* (1994). Il trattamento va ottimizzato in funzione del contenuto di carbonati nel sedimento.

Nel dettaglio operativo vengono di seguito riportate le procedure analitiche adottate nel *Progetto per*



le Attività di Ricerca e Sperimentazione per la Salvaguardia del Mare Adriatico: Sviluppo di sistemi conoscitivi per la gestione dei problemi ambientali dell'ecosistema Adriatico. Rapporto Intermedio (Marzo 1996):

- si aggiungono in ogni capsula 20 µl di HCl 1N e, dopo 10 minuti a temperatura ambiente, si pongono le capsule per 15 minuti in stufa a 70°C; successivamente si aggiungono 20 µl di HCl al 18%, si lascia reagire per 10 minuti, si aggiungono altri 20 µl di HCl al 25% e si lascia reagire per 10 minuti; se si nota effervescenza si ripete nuovamente il trattamento, in caso contrario si essiccano i campioni in stufa a 70°C per 2 ore.
- si effettuano aggiunte successive di 10 µl di HCl al 18% ed essiccamento a 50°C per 30 minuti fino a scomparsa dell'effervescenza (in genere sono sufficienti 3 fasi).

La strumentazione analitica e le condizioni strumentali sono le stesse di quelle descritte per la determinazione del carbonio totale.

Periodicamente vengono effettuate determinazioni di controllo su un sedimento marino di riferimento (BCSS-1) il cui contenuto di carbonio organico è stato determinato da Nieuwenhuize *et al.* (1994).

Le concentrazioni di carbonio organico nel sedimento vengono espresse come percentuale in peso dell'elemento sul peso secco.

Il limite di determinazione del metodo è di 100 µg/g.

BIBLIOGRAFIA

- Hedges, J.I., Stern J.H. (1984) *Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids*. Limnol. Oceanogr., 29, 657-663.
- Nieuwenhuize J., Maas Y.E.M., Middleburg J.J. (1994) *Rapid analysis of organic carbon and nitrogen in particulate materials*. Mar. Chem., 45, 217-224.
- Pella, E., Colombo B. (1973) *Study of carbon, hydrogen and nitrogen determination by combustion-gas chromatography*. Mikrochim. Acta, 697-719.



Analisi della sostanza organica

→ PREMESSA

Il metodo IRSA, qui di seguito riportato, per la determinazione della sostanza organica nei fanghi mediante ossidazione per via umida con dicromato di potassio può presentare delle interferenze dovute all'ossidazione dei cloruri.

Alcuni autori sostengono che l'errore indotto dall'ossidazione dei cloruri rientri, in realtà, nell'errore complessivo della titolazione e, pertanto, sia accettabile almeno per sedimenti costieri con un contenuto di sostanza organica non trascurabile. Nel lavoro sotto citato, ad esempio, si descrive un metodo, simile a quello IRSA, applicato con successo anche a sedimenti marini (Gaudette e Flight, 1974).

Resta tuttavia inteso che, per il metodo IRSA in questione, andrebbero fatti dei test di confronto rispetto al metodo di determinazione del carbonio organico mediante combustione e separazione gascromatografica (CHN Analyzer) su sedimenti marini a diverso contenuto di sostanza organica, così da definire meglio l'intervallo di applicabilità del metodo.

METODO IRSA

Tratto da: *Quad. Ist. Ric. Acque, 64. Metodi Analitici per i Fanghi. Vol. A. Parametri chimico fisici, Febbraio 1988*

→ GENERALITÀ

Il carbonio può essere presente nei fanghi sia in forma inorganica (carbonati, bicarbonati e CO₂ libera) che in forma organica (composti organici). La sostanza organica totale è costituita da tutti i composti che contengono carbonio in forma organica.

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consiste nell'ossidazione della sostanza organica contenuta nel fango con una soluzione di bicromato di potassio alla temperatura di 160°C ± 2°C in ambiente acido per acido solforico. L'eccesso di bicromato viene successivamente titolato con soluzione di solfato ferroso ammonico.

→ INTERFERENZE

Le sostanze ossidabili nelle condizioni di operatività descritte, tipo ferro ridotto, urea, cloruri, costituiscono interferenza.

L'interferenza dovuta ai cloruri, quando presenti in quantità non rilevanti, può essere eliminata mediante aggiunta di solfato di argento. L'operazione di essiccamento può provocare perdita di sostanze organiche volatili.

→ PROCEDIMENTO

Il campione di fango o una sua aliquota viene preventivamente essiccato in stufa a 150°C, macinato e omogeneizzato. Si pesa con la precisione del mg una quantità di campione contenente non più di 80 mg di carbonio (200-300 mg circa di fango) e si introduce in un pallone da 200 ml. Si aggiunge del solfato di argento solido nella quantità di 4,4 mg per ogni mg di cloruro presente nel campione pesato. Con una buretta si aggiungono 20 ml di K₂Cr₂O₇ 2N e 20 ml di acido solforico.

Si inserisce il termometro e si riscalda su bunsen sino alla temperatura di 160°C per 20 minuti sotto agitazione. Si raffredda a temperatura ambiente e si porta la soluzione a volume con acqua bidistillata. Si

lascia eventualmente sedimentare. Si prelevano 10 ml della soluzione limpida in una beuta da 200 ml cui si aggiungono, mediante buretta, 25 ml di solfato ferroso, 2 ml della miscela fosfosolforica e 5-6 gocce di indicatore. L'eccesso di solfato ferroso si titola con soluzione di bicromato di potassio fino a viraggio del colore dal blu verde al bruno-rosso.

→ ANALISI DEL BIANCO

Va fatta un'analisi del bianco impiegando gli stessi reagenti e le stesse quantità impiegate nel metodo omettendo naturalmente la presa campione.

→ CALCOLI

$$\text{Carbonio organico in \%} = \frac{(V_c - V_b) \cdot N \cdot 3 \cdot 20}{10 \cdot p}$$

dove:

V_c = ml di soluzione di dicromato di potassio 0,1 N impiegati per titolare il campione

V_b = ml di soluzione di dicromato di potassio 0,1 N impiegati per titolare il bianco

N = normalità della soluzione di dicromato di potassio

3 = peso equivalente del Carbonio (valore medio statistico)

p = peso in grammi del campione prelevato

20 = fattore di diluizione (10 ml da 200 ml pari a 1/20)

10 = fattore per esprimere il contenuto di carbonio in %

Apparecchiature e reagenti:

- materiale corrente di laboratorio
- stufa ad aria termostatica
- pallone tarato da 200 ml a fondo piatto
- termometro a scala 150-200°C divisione 1°C
- acido solforico (H_2SO_4) $d = 1,84$
- solfato di argento (Ag_2SO_4) solido
- bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) 2N: porre 98,08 g di bicromato di potassio polverizzato ed essiccato per 1 ora a 130-140°C in un bicchiere da 1000 ml ed aggiungere circa 800 ml di acqua bidistillata. Agitare sino a dissoluzione completa, trasferire con acqua in un pallone tarato da 1000 ml, portare a volume ed omogeneizzare.
- miscela fosfo-solforica: porre in un matraccio tarato da 1000 ml circa 500 ml di acqua bidistillata ed aggiungere 150 ml di acido fosforico a densità 1,71 e lentamente sotto agitazione 150 ml di acido solforico. Raffreddare, portare a volume con acqua bidistillata ed omogeneizzare.
- solfato ferroso 0,1 N: porre 39,2 g di $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ esaidrato in un bicchiere da 100 ml ed aggiungere circa 100 ml di acqua bidistillata preventivamente bollita. Agitare fino a dissoluzione completa, aggiungere 15 ml di acido solforico, raffreddare la soluzione, trasferire con acqua bidistillata preventivamente bollita in un matraccio tarato da 1000 ml, portare a volume ed omogeneizzare.
- bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) 0,1 N: porre 4,904 g di $K_2Cr_2O_7$ essiccato in un becker da 1000 ml, aggiungere circa 500 ml di acqua, agitare fino a dissoluzione completa, trasferire con acqua bidistillata in un matraccio tarato da 1000 ml, portare a volume ed omogeneizzare.
- indicatore: porre 1,485 g di 1-10 fenantrolina monoidrato in un matraccio da 100 ml, aggiungere 0,695 g di $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e portare a volume con acqua bidistillata.

BIBLIOGRAFIA

- APHA, AWWA, WPCF (1980) *Simplified laboratory procedures for wastewater examination*.
- Eckenfelder, Ww. Jr. (1986) *Industrial water pollution control*. New York, Mc Graw-Hill Book Company.
- Gaudette, H. E., W. R. Flight (1974) *An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments*. Jour. of Sedimentary Petrology, 44, 249-253.
- Springer, U. (1954) *Dung Bodenkd*, 1-26 Z. Pianza.
- Komova A. (1986) *Soil organic matter*. New York, Pergamon Press, 395-398.



Analisi di spore di clostridi solfito-riduttori

→ GENERALITÀ E DEFINIZIONI

I clostridi sono microrganismi anaerobi obbligati: bacilli gram-positivi, in gran parte mobili per flagelli peritrichi e raramente capsulati. Riducono il solfito con produzione di solfuro e producono spore termoresistenti a localizzazione terminale o subterminale. Le spore, resistenti a condizioni ambientali sfavorevoli, non si riproducono nell'ambiente e, sopravvivendo a lungo, possono dare indicazioni su condizioni di contaminazione pregressa. Alcune specie sono saprofiti e vivono negli strati superficiali del suolo e dei sedimenti, altre sono patogene e causano sindromi particolarmente gravi. Alcune specie vivono anche nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo. Il loro numero nelle feci umane, rispetto ai coliformi e agli streptococchi, è inferiore, in rapporto rispettivamente di circa 1/100 e 1/10. In particolare *Clostridium perfringens*, presente nel materiale fecale dell'uomo in concentrazioni variabili tra 10^2 e 10^7 UFC/g, è considerato un utile indicatore di contaminazione in quanto specie di sicura origine fecale. Esso è presente anche nelle feci canine e suine ed è meno comune o addirittura assente nelle feci degli altri animali a sangue caldo. Nei reflui le concentrazioni del microrganismo possono raggiungere valori intorno a 10^5 UFC/100 ml e il loro abbattimento durante i trattamenti può raggiungere il 95-99%.

Nei sedimenti marini le sue concentrazioni possono oscillare ampiamente tra 10^1 e 10^4 UFC/g. Valori più elevati (10^3 - 10^5 UFC/g) possono essere registrati in sedimenti fluviali in corrispondenza di apporti di tipo organico. È importante notare che il microrganismo può essere considerato un valido indicatore di contaminazione e un supporto per la valutazione della qualità di matrici ambientali, in particolare quando si debba stimare la qualità di acque clorate, di acque superficiali e reflue, che contengono scarichi industriali letali per i microrganismi non sporigeni, e di sedimenti e matrici ambientali, che hanno ricevuto reflui contenenti virus e protozoi parassiti.

Il parametro attualmente viene ancora quantificato con metodiche adatte per l'analisi delle acque. Il metodo qui riportato modifica invece la procedura di rilevamento per adeguarla all'analisi di materiale solido, qual è il sedimento, e vuole essere uno strumento applicativo di riferimento utile alla pianificazione e all'unificazione delle procedure analitiche per le strutture che operano nel settore di controllo della qualità igienico-sanitaria ed ambientale.

→ CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura analitica può essere utilizzata per l'analisi di campioni di sedimenti.

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si basa sul conteggio diretto delle colonie utilizzando la tecnica dell'inclusione e consente di calcolare la concentrazione delle spore dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* presenti in un volume noto di campione.

La procedura consiste in una serie di fasi successive così suddivise:

- preparazione della sospensione del campione;
- pretrattamento del campione;
- insemianazione del campione con la tecnica dell'inclusione in terreno colturale agarizzato ed incubazione;
- conteggio ed identificazione delle colonie;
- eventuale conferma delle colonie;
- espressione dei risultati.

**→ CONTROLLO DI QUALITÀ**

È opportuno procedere ad un controllo di qualità, mediante prove atte a valutare l'efficienza del metodo, eseguito dal laboratorio, utilizzando standard specifici contenenti una densità nota di microrganismi.

→ STRUMENTAZIONE E VETRERIA

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione una giara con accessori per la produzione di condizioni anaerobiche.

→ REAGENTI E TERRENI DI COLTURA**Terreno di isolamento****Agar al Solfito Polimixina Solfadiazina (SPS)**

Composizione per 1 L di terreno:

• solfito di sodio	0,5 g	• citrato di ferro	0,5 g
• solfato di polimixina	0,01 g	• sodio tioglicollato	0,1 g
• sulfodiazina	0,12 g	• sorbitan monooleato	0,05 g
• triptone o peptone	15 g	• agar	15 g
• estratto di lievito	10 g	• pH 7,0 ± 0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni. Sterilizzare a 118°C per 15 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

Olio di vaselina sterile**Agar nutritivo base al sangue di coniglio**

Composizione per 1 L di terreno:

• estratto di carne	3 g	• agar	15 g
• peptone	5 g	• pH 6,8 ± 0,2	

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni e sterilizzare a 121°C per 15 minuti.

Dopo sterilizzazione, preparare, con le normali procedure, alcune piastre di terreno senza aggiunta di sangue; in altre piastre, in condizioni di asepsi, trasferire 0,5 ml di sangue defibrinato di coniglio e aggiungere circa 12-13 ml di agar nutritivo preventivamente sciolto e portato a 50-60°C in bagno termostato, miscelare e lasciar solidificare a temperatura ambiente. Il terreno colturale al sangue ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di conservarlo a +4°C per non oltre una settimana, o meglio prepararlo al momento dell'uso. Scartare eventuali piastre che presentino contaminazione.

Sangue defibrinato di coniglio

Il sangue defibrinato di coniglio è reperibile in commercio e si può conservare per circa una settimana a circa +4°C in condizioni ottimali.

Agar Columbia con 5% di sangue di montone

Composizione del terreno completo:

• bio-polytone	10 g	• cloruro di sodio	5 g
• idrolizzato di proteine animali e vegetali	10 g	• sangue di montone	50 ml
• bio-miotone	3 g	• agar	13,5 g
• amido di mais	1 g	• pH 7,3 ± 0,2	

Il terreno si trova in commercio già pronto per l'uso e preparato in piastre Petri. Ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di comprarne piccoli lotti.

Esistono in commercio diversi substrati per la crescita dei microrganismi appartenenti al genere *Clo-*

stridium. In alternativa all'Agar nutritivo al sangue di coniglio, qui viene anche riportata la composizione dell'Agar Columbia con 5% di sangue di montone.

È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di selettività, produttività ecc.

Perossido di idrogeno al 3%

Conservare al riparo della luce diretta e a circa +4°C in condizioni ottimali.

→ PROCEDURA

Preparazione della sospensione

Pesare in un contenitore sterile una massa m (almeno 10 g) del campione da analizzare. Aggiungere il diluente, preferibilmente acqua fisiologica tamponata (K_2HPO_4 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, NaCl 8,5 g/L; pH $7,2 \pm 0,2$, in misura pari a 9 ml x m). Lasciare agitare per alcuni minuti la sospensione su piastra magnetica o tramite Stomacher per rendere la sospensione omogenea.

Pretrattamento

La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei clusters microbici. Successivamente la sospensione di campione è trattata al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, favorendo contemporaneamente la germinazione delle forme sporiali.

Sottoporre la sospensione del campione, per circa 15 secondi, a omogeneizzazione meccanica con omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" con regolatore di velocità da 1000 a 10000 g/min e pestello in teflon, mantenendo la sospensione in un bagno di ghiaccio. In alternativa, sottoporre a sonicazione per circa 10 secondi. Prima dell'omogeneizzazione è possibile eventualmente anche aggiungere Tween 80 ad una concentrazione di 0,1% (v/v). Successivamente mantenere il campione per 15 minuti a $75 \pm 5^\circ C$ a partire da acqua inizialmente fredda che, con il progressivo riscaldamento, innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

Inseminazione per inclusione ed incubazione

In funzione della qualità del campione da esaminare, inoculare almeno due aliquote del campione, diluito o tal quale, in doppio per ciascuna aliquota, in tubi contenenti il terreno di isolamento Agar al Solfito Polimixina Solfadiazina (SPS).

Effettuare l'inoculo nei tubi con il terreno disciolto e mantenuto tale alla temperatura di circa $45^\circ C$, avendo cura di distribuire bene il campione nel terreno evitando la formazione di bolle d'aria. Lasciare raffreddare ed aggiungere in ogni tubo alcuni millilitri di olio di vaselina per assicurare condizioni di anaerobiosi. In alternativa, porre i tubi in giara per anaerobiosi. Incubare a $36 \pm 1^\circ C$ per 24 ± 24 ore.

Identificazione e conteggio delle colonie

Escludere i tubi che presentano colonie invasive o patine batteriche che schermano la crescita nella massa del terreno. Prendere in considerazione i tubi in cui le colonie sono ben leggibili e separate. Annotare i conteggi relativi a due diluizioni successive contando le colonie nere, circondate da un alone nerastro, di dimensioni 0,3-0,5 mm di diametro, cresciute nello spessore dell'Agar.

Conferma

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium*, è necessario eseguire, almeno sul 5% delle colonie sospette, la colorazione di gram e la prova della catalasi. Nel caso in cui tra le colonie sospette sia interesse individuare in modo specifico *Clostridium perfringens*, una identificazione presuntiva può prevedere lo svolgimento di prove relative alla verifica della motilità (negativo), dell'idrolisi della gelatina (positivo) e della fermentazione del glucosio e del lattosio (positivo).

Per una identificazione a livello di specie dei microrganismi isolati si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.

Per procedere allo svolgimento delle prove di conferma, trasferire la colonia da saggiare, prelevata con un'ansa sterile, sulla superficie di due piastre contenenti Agar nutritivo con sangue di coniglio o, in alternativa, di due piastre di Agar Columbia con 5% di sangue di montone.

Incubare una piastra a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore, l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in anaerobiosi. I microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* cresceranno unicamente sul terreno incubato in condizioni anaerobiche. Procedere allo svolgimento della prova della catalasi.

Prova della catalasi

La prova della catalasi serve per differenziare i batteri solfito-riduttori appartenenti al genere *Clostridium* (catalasi negativi) da quelli appartenenti al genere *Bacillus* (catalasi positivi).

Seminare le colonie da saggiare su agar nutritivo ed incubare a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore in anaerobiosi. Strisciare su un vetrino da microscopio la colonia in esame, quindi ricoprire con una goccia di perossido d'idrogeno.

La reazione negativa, tipica del genere *Clostridium*, è evidenziata dalla mancata formazione di bolle (liberazione di gas).

Espressione dei risultati

Riportare il numero di spore di clostridi solfito-riduttori come UFC/g di sedimento (peso umido) o ml di campione esaminato, calcolando il numero di microrganismi sulla base della seguente formula:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

dove:

$\sum C$ = somma delle colonie nei tubi considerati

V = volume in ml dell'inoculo seminato in ogni tubo (in genere 1 ml)

n_1 = numero dei tubi considerati per la prima diluizione

n_2 = numero dei tubi considerati per la seconda diluizione

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione

Arrotondare il risultato per eccesso o per difetto alle prime due cifre significative e, se uguale o superiore a 100, riportare il risultato come:

$$1,0 \div 9,9 \times 10^n \text{ UFC/g o ml}$$

dove:

UFC = Unità Formanti Colonia

10^n = inverso del fattore di diluizione

Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di spore di clostridi solfito riduttori per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

- Bonadonna L., Di Girolamo I., Liberti R. (1995) *Studio preliminare sulle acque e sui sedimenti del fiume Arrone (Roma): aspetti microbiologici*. Acqua Aria 3, 315-318.
- Davies C.M., Long J.A., Donald M., Ashbolt N.J. (1995) *Survival of fecal microorganisms in aquatic sediments of*

Sydney, Australia. Applied Environmental Microbiology 61, 1888-1896.

- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R. Jr., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. Jr. (1995) *Testo atlante di microbiologia diagnostica*. II. Ed. Delfino Editore, Roma

a cura di Lucia BONADONNA

(Laboratorio di Igiene Ambientale, Reparto di Microbiologia Ambientale – Istituto Superiore di Sanità, Roma)



Analisi del tributilstagno (TBT)

→ METODOLOGIA

5-20 g di sedimento, precedentemente essiccato in stufa a 40° per 2 giorni, vengono posti in un imbuto separatore con 10 ml di HCl 6N e 20 ml di CH₂Cl₂. Agitare per 4 ore per favorire l'estrazione. Aggiungere 5 g di NaCl per facilitare la formazione dell'emulsione durante l'estrazione.

Apparecchiature e reagenti:

- imbuti separatori da 100 ml
- ditali
- beute da 100 ml
- provette da 5 ml e 10 ml
- HCl 6N
- CH₂Cl₂
- NaCl
- NaOH 3% p/v
- HNO₃ 69%
- soluzione satura di acido borico + 1% di HCl
- esano

I campioni vengono successivamente centrifugati a 1500 rpm per 10 minuti. Si separano in questo modo tre fasi; la frazione di CH₂Cl₂ viene posta in beuta ed evaporata a secco in rotavapor a 30°C. Il residuo viene ripreso con 4 ml di esano, tre di questi vengono posti in provette di vetro. Alla soluzione si aggiungono 3 ml di NaOH al 3% (v/v) per eliminare lo stagno inorganico e le forme mono- e di-alchilstagno.

Si prelevano 2 ml di esano e si trasferiscono in provette da 5 ml per evaporarli a secco sotto azoto. Il residuo viene digerito con 1 ml di HNO₃ al 69% per 1 ora a 120°C.

Si fa evaporare l'acido innalzando la temperatura a 150°C con le provette aperte. Il residuo viene ripreso con 2 ml di soluzione satura di acido borico con l'1% di HCl.

Lo stagno viene analizzato allo Spettrofotometro con la tecnica HGA-AS.

Le concentrazioni sono espresse in µg/g rispetto al peso secco.

Il limite di determinazione del metodo è di 0,003 µg/g di Sn.



Analisi dei composti organoclorurati

→ CONSERVAZIONE

I campioni raccolti vanno chiusi in fogli di alluminio precedentemente decontaminati.

- La decontaminazione dei fogli di alluminio deve essere condotta in laboratorio, prima della fase di campionamento. Essa consiste nel lavaggio dei fogli di alluminio con esano e poi con acetone.
- Una volta racchiuso il campione nei fogli di alluminio, esso va posto in busta di plastica etichettata.
- Congelare i campioni a -20°C fino al momento dell'analisi.
- Una aliquota pesata viene utilizzata per l'analisi, mentre un'altra viene essiccata in stufa a 65°C fino a peso costante.

→ ANALISI

Le analisi del campione vanno condotte in ambiente pulito e secondo le norme di buona pratica di laboratorio per l'analisi di composti organici in tracce.

Tutta la vetreria usata deve essere ben lavata e decontaminata e i reagenti usati devono essere di grado RPE (puri per analisi di pesticidi).

→ PRINCIPIO DEL METODO

- Estrazione con miscela acetone + etere di petrolio.
- Purificazione con TBA e colonna cromatografica di Florisil.
- Determinazione con Gascromatografia capillare e Rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

→ ESTRAZIONE

10-30 g di campione essiccato vengono posti in una provetta da centrifuga da 250 ml con tappo a vite e guarnizione rivestita in PTFE.

Aggiungere 100 ml di miscela acetone + esano (1:1 v:v) e agitare per 2 minuti. Aggiungere 20 ml di acqua estratta con CH_2Cl_2 e 3 g di Na_2SO_4 ed agitare per 50 minuti.

Separare la fase organica per centrifugazione, rimuoverla e filtrarla su colonna di 25 g di sodio solfato anidro (200 x 20 mm d.i.). Raccogliere in beuta. Il sedimento viene estratto ancora con 2 x 50 ml di n-esano. Lavare la colonna di sodio solfato con 4 x 5 ml di etere di petrolio.

Raccogliere gli eluati e concentrarli a secco con rotavapor (40°C; pressione ridotta).

→ RIMOZIONE DELLO ZOLFO

Il residuo proveniente dal rotavapor e ripreso con 10 ml di esano viene addizionato con 5 ml di alcool isopropilico e 10 ml di una soluzione di tetrabuttilammonio idrogeno solfato (tale soluzione viene preparata sciogliendo 3,39 g di tetrabuttilammoniosolfato in 100 ml di acqua estratta e si estrae con 20 ml di diclorometano per tre volte; gli estratti vengono saturati con 25 g di sodio solfite).

La soluzione viene dibattuta energicamente a mano per 1 minuto. Vengono addizionati 50 ml di acqua estratta e si dibatte ancora per 3 minuti. La fase organica viene filtrata su colonna di Na_2SO_4 e raccolta in beuta; la soluzione residua viene ancora estratta con 2 x 10 ml di n-esano e le fasi organiche raccolte insieme vengono portate a secco con rotavapor.

Apparecchiature e reagenti:

- vetreria da laboratorio decontaminata
- agitatore
- centrifuga
- rotavapor
- gascromatografo con rivelatore ECD
- etere di petrolio 40°-60°
- acetone
- diclorometano
- esano
- etilacetato
- sodio solfato anidro
- tetrabuttilammonio idrogeno solfato
- alcool isopropilico
- toluene
- isoottano
- Florisil

**→ PURIFICAZIONE**

Il residuo derivante dal trattamento per la rimozione dello zolfo viene recuperato con 1 x 3 ml di n-esano e trasferito su una colonna di Florisil.

Preparare a secco una colonna cromatografica (vetro 300 x 10 mm d.i., con rubinetto in PTFE) con 2,5 g di Florisil (60-100 mesh, attivato a 130°C per una notte) ricoperto con uno strato di 1 cm di sodio solfato anidro.

Lavare la colonna con 3 x 5 ml di etere di petrolio e scartare i lavaggi.

Trasferire quantitativamente sulla colonna l'estratto grezzo effettuando lavaggi della beuta con 3 x 1 ml di etere di petrolio 40-60°.

Eluire la colonna con:

- 1) 30 ml di n-esano;
- 2) 25 ml di n-esano:toluene (80:20);
- 3) 30 ml di n-esano:toluene:etile acetato (80:19:1).

Raccogliere i tre eluati in tre beute da 100 ml.

Concentrare ciascun eluato a piccolo volume con rotavapor e poi a secco per rotazione manuale. Riprendere con 1 ml di isoottano.

Iniettare.

→ DETERMINAZIONE GAS-CROMATOGRAFICA

Viene condotta con Gascromatografo equipaggiato con Rivelatore a cattura di elettroni (ECD) e colonne capillari di idonea fase stazionaria.

È consigliabile, per la conferma, utilizzare due diversi tipi di colonne. Si citano ad esempio:

- DB1 (15 m x 0,53 mm d.i. x 1,5 µm di spessore del film);
- DB 1701 (15 m x 0,53 mm d.i. x 1 µm di spessore del film);
- OV 1 (50 m x 0,32 mm d.i. x 0,17 µm di spessore del film);
- Ultra 2 (25 m x 0,32 mm d.i.).

L'identificazione viene condotta per confronto con i tempi di ritenzione ottenuti iniettando, nelle stesse condizioni, soluzioni standard di composti (ossia soluzioni a titolo noto).

Determinare la concentrazione dei composti identificati, confrontando le altezze o le aree con quelle dei picchi ottenuti iniettando quantità note dei composti standard e tenendo conto delle diluizioni effettuate.

Devono essere condotte prove in bianco con i reattivi.

Devono essere condotte prove di recupero dell'intera procedura con le soluzioni standard al fine di verificare le prestazioni del metodo.

Allo stesso scopo devono, infine, essere condotte prove di confronto con materiali di riferimento certificati.

→ RAPPRESENTAZIONE DEL DATO

Le concentrazioni dei composti considerati devono essere espresse come µg/kg per unità di peso secco.

Nella stessa unità di misura deve essere indicato il limite di rilevabilità analitica. Per questo metodo il limite di determinazione è pari a 0,01 µg/kg.

BIBLIOGRAFIA

- Pesticidi Organoclorurati. Quad. Ist. Ric. Acque, 64. *Metodi analitici per i fanghi*. Vol. 3. Gennaio 1988.
- Composti clorurati. Quad. Ist. Ric. Acque, 64. *Metodi analitici per i fanghi*. Vol. 3. Gennaio 1988.
- Cicero A.M., Pietrantonio E., Romanelli G., Di Muccio A. (1999) *A comparison of extractive techniques for determination of PCBs in marine sediments*. Abstracts 9th Annual Meeting of Society Of Environmental Toxicology And Chemistry (SETAC)-Europe, 25-29 May 1999, Leipzig, Germany, p.120.
- Cicero A.M., Pietrantonio E., Romanelli G., Di Muccio A. (2000) *Comparison of Soxhlet, Shaking and Microwave Assisted Extraction Techniques for Determination of PCB Congeners in a Marine Sediment*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 65, 307-313.



Analisi degli idrocarburi policiclici aromatici

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo prevede una saponificazione seguita da una estrazione con una soluzione di cicloesano:metanolo. La purificazione viene eseguita su gel di silice.

La determinazione quali-quantitativa viene eseguita mediante cromatografo liquido (HPLC) con rivelatore spettrofotometrico a fluorescenza o di assorbimento nell'UV.

In alternativa al cromatografo liquido (HPLC), ove le concentrazioni lo permettano, può essere utilizzata la gas-cromatografia con colonna capillare, con rivelatore FID o accoppiato con uno spettrometro di massa. Indipendentemente dalle apparecchiature utilizzate per le misure, nel rapporto di analisi devono essere specificati il limite di rilevabilità della metodica utilizzata e le percentuali di recupero dei singoli elementi (accuratezza) rispetto a matrici certificate.

→ PROCEDIMENTO

Si pesano g 10 di sedimento in un pallone da 100 ml con collo smerigliato e si aggiungono 30 ml di potassa alcolica (KOH 2N in metanolo). Si mette ad agitare per 15 minuti e si mette a refluire su di un bagnomaria a 80°C per due ore.

Si trasferisce il contenuto in un provettone da centrifuga e si effettua la prima estrazione aggiungendo 40 ml di cicloesano con 20 ml di una miscela composta da metanolo:acqua estratta 4:1. Si mette su agitatore per 15 minuti e si centrifuga a 1200 giri per altri 15 minuti.

Si preleva il surnatante e si passa su di una colonna (20 mm di diametro) riempita con solfato di sodio (circa 20 g) raccogliendo l'eluato in una beuta da 150 ml.

Si effettuano altre tre estrazioni con 25 ml di cicloesano.

Si concentra a piccolo volume e si trasferisce in un cilindro graduato da 300 ml con tappo a smeriglio usando etere di petrolio fino ad avere un volume totale di 10 ml, aggiungere 10 ml di soluzione reagente tetrabuttilammonio solfito (il TBA solfito viene preparato sciogliendo 3,39 g di tetrabuttilammoniosolfato in 100 ml di acqua estratta e si estrae con 20 ml di diclorometano per tre volte; gli estratti vengono saturati con 25 g di sodio solfito). Si dibatte per 2 minuti, si lascia separare e si riprende il surnatante. Ripete con altre tre estrazioni con 15 ml di etere di petrolio 40°-60°.

Dopo aver concentrato a piccolo volume si trasferisce quantitativamente su una colonna cromatografica (10 mm di diametro con rubinetto in teflon e serbatoio) in cui vengono caricati 5 g di gel di silice (disattivato al 15%) e si eluisce con 75 ml di n-esano. Si porta con cautela a secco e si riprende con 2 ml di acetonitrile.

La determinazione viene condotta su di HPLC con rivelatore a fluorescenza. La fase della colonna è una C18 (25 cm x 4,6 mm i.d.). L'eluizione avviene mediante un gradiente binario acqua/acetonitrile (60-100% in 30 minuti) ad un flusso di 1,5 ml/min.

La determinazione qualitativa viene effettuata sulla base del tempo di ritenzione, cioè del tempo di ritenzione relativo o dell'indice di ritenzione.

Apparecchiature e reagenti:

- vetreria da laboratorio in uso comune (opportunamente decontaminata)
- centrifuga
- agitatore
- rotavapor
- bagno ad acqua termostata
- cromatografo liquido (HPLC) con rivelatore spettrofotometrico a fluorescenza o di assorbimento nell'UV
- metanolo
- cicloesano
- n-esano
- etere di petrolio 40°-60°
- acetonitrile
- idrossido di potassio
- TBA solfito
- acqua estratta con diclorometano
- gel di silice
- solfato di sodio (una notte in muffola a 600°C)



La determinazione quantitativa viene effettuata mediante l'uso di curve di calibrazione utilizzando preferibilmente la tecnica dello standard interno, altrimenti quello esterno.

Le concentrazioni sono espresse in mg/kg rispetto al peso secco.

Il limite di determinazione è di 0,001 mg/kg per singolo idrocarburo.



Determinazione del contenuto di alcuni elementi chimici nei sedimenti marini (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Zn)

→ PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo prevede la digestione totale del sedimento mediante mineralizzazione con miscela di acidi forti, a caldo, in un sistema chiuso, a microonde.

Il contenuto dei metalli è determinato per spettrofotometria ad assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma o termoelettrica. Per il mercurio si utilizza la tecnica dello strippaggio con vapori freddi previa riduzione del metallo con soluzione di cloruro stannoso. In alternativa all'assorbimento atomico può essere utilizzata la spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES) o altre tecniche ugualmente valide in accordo con la letteratura corrente.

Indipendentemente dalle apparecchiature utilizzate per le misure, nel rapporto di analisi devono essere specificati il limite di determinazione della metodica utilizzata e le percentuali di recupero (accuratezza) dei singoli metalli rispetto a sedimenti marini certificati.

→ CAMPIONAMENTO

Si prelevano campioni omogenei e rappresentativi dei primi centimetri del fondale.

Per il tempo intercorrente tra il prelievo e l'analisi, è opportuno conservare il campione ad una temperatura inferiore a 4°C, utilizzando contenitori di polietilene non contaminati.

→ APPARECCHIATURE CONSIGLIATE

- Mineralizzatore a microonde dotato di contenitori in grado di lavorare ad alta pressione.
- Spettrofotometro ad Assorbimento Atomico e con fornello di grafite.
- Sistema generatore di idruri.

→ LIMITE DI DETERMINAZIONE DELLA METODICA

La metodica analitica deve essere in grado di determinare concentrazioni nel campione di sedimento secco (mg/kg p.s.) almeno fino a:

Al 1000 mg/kg p.s.	Cu 1 mg/kg p.s.	Pb 1 mg/g p.s.
As 0,5 mg/kg p.s.	Fe 1000 mg/kg p.s.	V 10 mg/g p.s.
Cd 0,05 mg/kg p.s.	Hg 0,05 mg/g p.s.	Zn 1 mg/g p.s.
Cr 1 mg/kg p.s.	Ni 1 mg/g p.s.	

→ REAGENTI PRINCIPALI PER LA DIGESTIONE (acidi ultrapuri)

- Acido nitrico (HNO₃) 65%.
- Acido cloridrico (HCl) 37%.
- Acido fluoridrico (HF) 50%.
- Acido borico (H₃BO₃).
- Acqua ultrapura.

→ PROCEDIMENTO

Preparazione della soluzione per la mineralizzazione con sistema a microonde

Trasferire circa 0,5 g del campione di sedimento tal quale nell'apposito contenitore, tolti manualmente



eventuali corpi grossolani superiori a 0,5 centimetri. Aggiungere 3 ml di HCl e 9 ml di HNO₃ e lasciare riposare 15-20 minuti. Eseguire il ciclo operativo sotto riportato.

Aggiungere 2 ml di HF, lasciar riposare 15-20 minuti e ripetere il ciclo di mineralizzazione.

Ciclo operativo: vedi tabella a fianco.

Step	Tempo (min.)	Potenza (Watt)
1	3	300
2	3	600
3	5	350
4	10	250

Dopo raffreddamento aggiungere 30 ml di soluzione satura di H₃BO₃, trasferire la soluzione in contenitore tarato e portare a volume (V) con acqua ultrapura. La procedura dovrà essere eseguita in doppio per ogni campione.

La prova in bianco viene effettuata con le stesse modalità operative sulla soluzione composta da 3 ml di HCl e 9 ml di HNO₃ e 2 ml di HF.

Misura delle concentrazioni

I diversi elementi saranno misurati con differente modalità a seconda delle concentrazioni attese e del tipo di elemento. Tale informazione dovrà essere riportata nella descrizione della metodica utilizzata. Tutte le procedure di digestione ed analisi dovranno essere ripetute su campioni certificati.

→ ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Per il calcolo è utilizzata la seguente espressione:

$$C = A \cdot D \cdot V / M$$

dove:

C = contenuto del metallo nel sedimento, espresso in mg/kg peso secco

A = concentrazione del metallo nella soluzione del campione, espressa in mg/L

D = fattore di diluizione (D = 1, se la soluzione in esame non è stata diluita)

V = volume finale espresso in millilitri

M = massa del campione espressa in grammi di peso secco

I risultati finali vanno espressi in mg/kg peso secco.*

I risultati così ottenuti sono riferiti ad 1 kg di sostanza secca a 105°C, previa determinazione gravimetrica del contenuto di umidità residua, come indicato dal D.M. 185 del 13/09/99 "Approvazione dei metodi ufficiali per l'analisi chimica del suolo" (Metodo II.2). Le pesate per ottenere il valore di umidità (almeno in doppio) vanno eseguite contemporaneamente a quella per la determinazione dei metalli.

* Per l'inserimento dei dati nel Si.Di.Mar. i risultati analitici devono essere convertiti in µg/kg p.s. moltiplicando il risultato espresso in mg/kg per il fattore di conversione 1000.

a cura di

David PELLEGRINI, Fulvio ONORATI (ICRAM, Roma)

Simone LUCAROTTI (CIBM, Livorno)



Applicazione di saggi biologici su sedimenti marini

→ CRITERI GENERALI

Allo scopo di valutare la tossicità dei sedimenti relativi all'ambiente di studio sarebbe opportuno allestire una batteria di saggi biologici costituita da almeno tre specie-test, diverse per posizione filogenetica, trofia, sensibilità specifica e rilevanza ecologica.

Relativamente al monitoraggio in oggetto dovrà essere applicata una batteria di saggi costituita da *Vibrio fischeri* ed almeno un'altra specie per la quale esistano specifiche indicazioni di esecuzione. In accordo con UNICHIM vengono comunque considerate specie prioritarie l'anfipode *Corophium orientale* e il riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

Dovranno comunque essere riportate sia la metodica di riferimento che notizie relative alla sensibilità specifica nei riguardi di sostanze pure organiche ed inorganiche (LCxx o ECxx).

→ CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE

Indipendentemente dai criteri scelti per l'effettuazione del disegno di campionamento, funzione degli obiettivi che si intende raggiungere, si suggerisce di prelevare il sedimento superficiale tramite box corer o benna, raccogliendo uno spessore di circa 3 cm.

Il sedimento omogenizzato dovrà essere riposto in contenitori di materiale plastico (polietilene) o di vetro opportunamente decontaminati tramite miscela diluita di HCl e HNO₃, avendo cura di riempire totalmente il recipiente. I campioni andranno riposti immediatamente a temperatura di 4-6°C sia durante il trasporto che per la conservazione.

Si consiglia di eseguire i saggi di tossicità sul sedimento fresco nei tempi previsti dagli specifici protocolli e preferibilmente non oltre una settimana dal prelievo.

→ MATRICI DA SAGGIARE

I saggi dovranno essere applicati complessivamente a due diverse matrici tra quelle sotto indicate, prediligendo il sedimento tal quale e l'acqua interstiziale.

Sedimento tal quale

Dal campione omogenizzato eliminare manualmente le componenti naturali e antropiche di dimensioni superiori ai 5 mm.

Acqua interstiziale

Si può ottenere per centrifugazione (possibilmente refrigerata) o per filtrazione tramite il vuoto.

Elutriato

Salvo specifiche indicazioni del protocollo adottato, è ottenibile mediante energica agitazione per un'ora, possibilmente a temperatura di 15-20°C, di una specifica aliquota di sedimento umido tal quale diluito con acqua di mare sintetica o naturale "incontaminata" (utilizzata come controllo) in rapporto 1:4 (peso secco/volume acqua). Tale campione sarà successivamente centrifugato e il surnatante, secondo il protocollo adottato, utilizzato per il saggio.

Sedimento centrifugato

Salvo specifiche indicazioni del protocollo adottato, si consiglia l'applicazione di una elevata forza centri-



fuga a temperatura non superiore a 15°C, avendo cura di eliminare accuratamente l'eventuale acqua interstiziale e di riomogenizzare successivamente il campione.

→ SPECIE TEST

Poiché in ambito UNICHIM-ISO sono state considerate come prioritarie nella valutazione della tossicità di sedimenti marini in campo nazionale l'anfipode *Corophium orientale* e il riccio di mare *Paracentrotus lividus*, si ritiene utile segnalare tali specie, sulle quali è possibile trarre notizie metodologiche generali sulle seguenti pubblicazioni:

- ASTM E 1563-95 *Standard Guide for conducting static sediment toxicity tests with echinoid embryos*, 1029-1046.
- ASTM E 1367-92 *Standard Guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine Amphipods*.
- Dinnel P.A. (ASTM) (1991) *Proposed standard Exxx guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos*. Draft 1.
- ISO/NP Water quality *Determination of acute toxicity of marine sediments to Amphipods*; Draft del 31.03.1999 (CD Dicembre 2000).
- Onorati F., Bigongiari N., Pellegrini D., Giuliani S. (1999) *The suitability of Corophium orientale (Crustacea, Amphipoda) in harbour sediment toxicity bioassessment*. Aquatic Ecosystem Health and Management, 2, 465-473.
- PARCOM (Paris Commission) (1995) *Protocols on methods for the testing of chemicals used in the offshore industry*.
- Volpi Ghirardini A., Arizzi Novelli A., Pantani C., Ghetti P.F. (1996) *Test di spermiotossicità con Paracentrotus lividus LMK (Echinodermata: Echinoidea): riproducibilità e sensibilità a sostanze pure*. S. It. Atti, 17, 383-386.

Queste ed altre pubblicazioni sono disponibili anche presso l'ICRAM.

Protocolli specifici ICRAM-UNICHIM sono in corso di preparazione.

Ulteriori indicazioni metodologiche, anche su altre specie da utilizzare, saranno riportate sul quaderno ICRAM relativo agli Atti del Seminario ICRAM-SIBM "Analisi ecotossicologiche relative al D.L.vo 152/99, allegato tecnico acque marine costiere" Marzo 2001.

Per quanto riguarda il saggio con *Vibrio fischeri* dovranno essere testate:

- 1) la fase solida centrifugata (o il sedimento tal quale);
- 2) l'acqua interstiziale (ottenibile per centrifugazione) o l'elutriato (in caso di sedimenti poveri di acqua interstiziale);

secondo i protocolli standard Azur Environmental, modificati secondo l'articolo allegato in appendice:

- Onorati F., Pellegrini D., Ausili A. (1999) *Valutazione della tossicità naturale nel saggio Microtox® in fase solida: La normalizzazione pelitica*. Acqua e Aria, 6, 83-91.

In particolare per quanto riguarda l'attribuzione del livello di tossicità secondo il criterio riportato nella citata pubblicazione, si consiglia di normalizzare il risultato del test in fase solida espresso in Unità Tossiche (TU) rispetto alla seguente funzione:

$$Y = 0,28 + 3,49X$$

dove:

X = % pelite

Y = Tossicità Naturale Stimata.

a cura di

Fulvio ONORATI, David PELLEGRINI (ICRAM, Roma)

Nicola BICONCIARI (CIBM, Livorno)



Metodo per la determinazione di composti organostannici in sedimenti e matrici biologiche tramite GC-MS e GC-FPD

1. PREMESSA

Esistono in letteratura diversi metodi analitici per la determinazione dei composti butilici e fenilici dello stagno in matrici ambientali. Nella maggior parte dei casi l'analisi di questi composti è basata su una determinazione cromatografica.

Prima della determinazione cromatografica il campione deve essere sottoposto ad una serie di operazioni in sequenza tra loro, le più importanti delle quali sono l'estrazione, la derivatizzazione e la purificazione. Queste operazioni hanno lo scopo di estrarre gli analiti dal campione, di eliminare le interferenze e di trasformare i composti organostannici in una forma chimica più facilmente rivelabile dalla tecnica analitica scelta per la determinazione.

La procedura analitica descritta in questo protocollo, e riassunta schematicamente nel diagramma a flusso di seguito riportato, si basa su una determinazione gascromatografica.

Le tecniche gascromatografiche sono, a tutt'oggi, le più usate per l'analisi dei composti organostannici: infatti, vengono impiegate nel 60% dei metodi di determinazione proposti in letteratura.

I composti organostannici estratti dai campioni sono presenti generalmente sotto forma di sali, e sono, quindi, difficilmente determinabili mediante tecniche gascromatografiche, poiché poco volatili e poco stabili ad elevate temperature. Per questo motivo si rende necessaria una derivatizzazione degli analiti in forma più volatile.

Nonostante che l'introduzione di una fase di derivatizzazione aumenti la complessità della procedura di trattamento del campione, le fonti di errore e i tempi di analisi, la determinazione gascromatografica di questi composti presenta molti vantaggi:

- l'elevata risoluzione raggiunta nella determinazione simultanea dei diversi composti organostannici (derivati butilici, fenilici, cicloesilici, metilici, etilici, ottilici);
- l'elevato numero di composti organostannici determinabili;
- bassi limiti di rivelabilità;
- l'elevata flessibilità di questa tecnica nella possibilità di accoppiamento con diversi rivelatori;
- tempi di analisi cromatografica relativamente brevi (30-45 min.).

Le reazioni di derivatizzazione più eseguite sono l'alchilazione, mediante reazione con reattivi di Grignard o tetraetilborato di sodio, oppure la formazione di idruri, mediante reazione con sodioboroidruro. Il metodo di analisi qui descritto prende in considerazione una pentilazione mediante reazione con pentilmagnesio bromuro.

**Procedura analitica impiegata per l'analisi dei composti butilici e fenilici dello stagno
in matrici biologiche e nei sedimenti.**

ESTRAZIONE

(0,1-0,5 g di campione + S.I.), (15 ml tropolone in metanolo 0,03% + 1 ml HCl 37%, 15 minuti ultrasuoni) x 2, separazione degli estratti mediante centrifugazione per 10 minuti a 3000 rpm e ripartizione liquido-liquido, per due volte, con 15 ml di CH₂Cl₂ + 100 ml NaCl 5%



CAMBIAMENTO DEL SOLVENTE

Evaporazione del solvente mediante evaporatore rotante, trasferimento dell'estratto in fiala con 2 ml di diclorometano + 1 ml di isoottano, evaporazione del solvente, sino quasi a secchezza sotto un debole flusso di azoto.



DERIVATIZZAZIONE

1 ml di PeMgBr 2 M in etere dietilico, distruzione dell'eccesso del reattivo con 1 ml di acqua + 5 ml di H₂SO₄, e successiva estrazione degli analiti con 2 ml di esano. Lavaggio degli estratti con due aliquote di 3 ml di NaHCO₃ e concentrazione a 0,5 ml sotto un debole flusso di azoto.



PURIFICAZIONE

3 g di gel di silice (matrici inorganiche) o Florisil (matrici biologiche), eluizione con 8 ml di una soluzione esano-toluene 1:1.



PRECONCENTRAZIONE DEL CAMPIONE

Concentrazione del campione a circa 1 ml, per evaporazione del solvente, sotto un debole flusso di azoto.



DETERMINAZIONE ANALITICA

GC-FPD e/o GC-MS

2. VETRERIA ED ACCESSORI

- Tubi per centrifuga con tappo a vite teflonato (volume 25 ml).
- Imbuti separatori da 250 ml.
- Palloni a cuore da 100 ml.
- Imbuti (diametro 8 cm) per filtrazione su solfato di sodio.
- Tubi da reazione con tappo a vite teflonato (volume 12 ml).
- Pipette tipo Pasteur.
- Colonnine per purificazione (diametro 0,8 cm, lunghezza circa 30 cm).
- Cotone (sgrassato mediante estrazione in Soxhlet con esano/acetone 1:1).



3. SOLVENTI E REATTIVI

- Esano-per analisi residui pesticidi.
- Toluene-per analisi residui pesticidi.
- Isoottano-per analisi residui pesticidi.
- Diclorometano-per analisi residui pesticidi.
- Alcool metilico-per analisi residui pesticidi.
- Acido solforico-reattivo puro per analisi.
- Acido cloridrico-reattivo puro per analisi.
- Tropolone (1-idrossicicloeptatrienone)-per sintesi.
- Sodio bicarbonato-reattivo puro per analisi.
- Sodio solfato anidro-reattivo puro per analisi.
- Cloruro di sodio-reattivo puro per analisi.
- Pentilmagnesio bromuro (2 M in etere etilico)-per sintesi.
- Gel di silice 60 (70-230 mesh)-attivato a 180°C per 6 ore.
- Florisil (100-200 mesh)- attivato a 250° per 6 ore.

4. APPARECCHIATURE

- Bagno ad ultrasuoni.
- Centrifuga.
- Evaporatore rotante.
- Gas cromatografo con rivelatore FPD (senza filtro ottico), colonna capillare in silice fusa da 30 m di lunghezza e 0,53 mm di diametro interno con fase legata metilsiliconica e spessore del film 1,5 µm (DB-1 J&W Scientific o equivalente).
- Gas cromatografo con rivelatore MS, colonna capillare da 30 m di lunghezza, diametro interno 0,20 mm con fase legata metil-5% fenilsiliconica e spessore del film 0,25 µm (DB-5 della J&W Scientific o equivalente); rivelatore a selezione di massa a quadrupolo con ionizzazione ad impatto elettronico da 70 eV.

5. STANDARDS DEI COMPOSTI ORGANOSTANNICI

- Tripropilstagno cloruro
- Trifenilstagno cloruro
- Tributilstagno cloruro
- Difenilstagno cloruro
- Dibutilstagno cloruro
- Monofenilstagno cloruro
- Monobutilstagno cloruro

Tali composti possono essere acquistati da varie ditte, quali Alfa, Aldrich, Merck ecc, e vanno conservati a +4°C. Gli standards devono avere un grado di purezza superiore al 95% ed eventualmente essere controllati per la presenza di prodotti di degradazione.

In realtà ai fini della calibrazione sarebbe opportuno e necessario poter disporre anche di standards pentilati (per esempio pentiltributilstagno ecc.). Tali standards non sono tuttavia ancora disponibili sul mercato, anche se alcuni Istituti (per esempio la Free University di Amsterdam) li hanno sintetizzati, al fine di supportare progetti di ricerca e Programmi Europei.

5.1. Preparazione delle soluzioni calibranti

Le soluzioni standard necessarie per la calibrazione sono ottenute derivatizzando opportune miscele di composti organostannici clorurati. La reazione di derivatizzazione è una reazione di Grignard, ovvero una pentilazione con pentilmagnesioibromuro.

La derivatizzazione dei composti butilici e fenilici dello stagno deve essere condotta separatamente dalla derivatizzazione dello standard interno (tripopilcloruro).

5.1.1. Derivatizzazione dei composti butilici e fenilici dello stagno

Si prepara una soluzione concentrata di una miscela dei composti butilici e fenilici in metanolo, contenente lo 0,03% di tropolone (il tropolone, formando complessi con i composti di e monosostituiti dei com-

posti butilici e fenilici dello stagno, serve per minimizzare eventuali perdite per evaporazione di tali composti durante la fase di derivatizzazione).

Le soluzioni dei sali dei composti organostannici si degradano facilmente, per cui sarebbe opportuno prepararle sempre al momento dell'uso. Le soluzioni molto concentrate (es. 1000 ppm) possono essere conservate a + 4°C al buio non oltre i 30 giorni.

Si preleva una piccola quantità della soluzione concentrata e la si pone in un tubo di reazione.

Si aggiunge un volume di toluene pari a circa 0,5 ml e si concentra la soluzione ottenuta sino ad un volume di circa 100 µl sotto un leggerissimo flusso di azoto.

Si aggiunge 1 ml di pentilmagnesio bromuro 2 M in etere etilico, si chiude il tubo con il tappo teflonato, e si lascia procedere la reazione per 15 minuti agitando saltuariamente.

Si elimina l'eccesso di reattivo aggiungendo cautamente, goccia a goccia, dell'acqua distillata sino ad un volume massimo di 2 ml. La reazione del reattivo di Grignard con l'acqua è abbastanza violenta e porta l'etere ad ebollizione. Bisogna quindi porre molta attenzione nelle aggiunte delle gocce di acqua, e comunque si deve evitare che la soluzione vada a secchezza a causa dell'evaporazione dell'etere. A tal fine prima dell'evaporazione completa si aggiunge 1 ml di esano.

Si aggiungono 5 ml di una soluzione acquosa di acido solforico 1 M, per eliminare ogni traccia del reattivo di Grignard, e si agita per qualche minuto. Dopo un tempo sufficiente per la separazione delle fasi si recupera la fase organica, e si ripete l'estrazione della fase acquosa con un'altra aliquota di 1 ml di esano.

I due estratti riuniti vengono fatti passare attraverso una colonnina (pipetta Pasteur) riempita con solfato di sodio al fine di eliminare le tracce di acqua. La soluzione recuperata viene trasferita in un matraccio tarato e portata a volume noto. Dalla soluzione ottenuta dei composti organostannici pentilati si ottengono per opportune diluizioni le soluzioni calibranti a diversa concentrazione.

[Esempio: se si prepara una soluzione di composti organostannici clorurati a concentrazione pari a 1000 mg/L (come contenuto in stagno per ogni composto), derivatizzando 100 µl di questa soluzione (circa 100 µg per ogni composto) e portando ad un volume di 100 ml la soluzione degli standard pentilati, si ottiene una concentrazione pari a 1000 µg/L. Da questa soluzione si possono preparare diverse soluzioni calibranti con una concentrazione compresa tra i 5 µg/L e i 1000 µg/L].

1 ml di ogni soluzione calibrante a diversa concentrazione viene posto in una fiala dotata di tappo a vite teflonato. Ad ogni aliquota delle soluzioni calibranti si aggiunge la stessa quantità nota di tripropilstagno pentilato.

Le soluzioni dei composti derivatizzati ad elevate concentrazioni sono stabili per almeno 3 mesi, se conservati al buio e a bassa temperatura (+4°C). Le soluzioni calibranti devono essere conservate al buio, a bassa temperatura (+4°C) e devono essere preparate ogni due settimane.

5.1.2. Derivatizzazione del tripropilstagno cloruro

La modalità di preparazione e di conservazione del tripropilstagno è la stessa descritta per gli standard pentilati degli altri composti organostannici.

Questo composto viene utilizzato come standard interno, per cui è necessario preparare una unica soluzione di tripropilstagno. Per la scelta della concentrazione di questa soluzione bisogna tener conto che nelle aliquote di 1 ml delle soluzioni calibranti va aggiunto una quantità di tripropilstagno tale che:

- 1) si abbia una quantità di tale composto confrontabile con quella aggiunta come cloruro nei campioni da analizzare (vedi procedura analitica);
- 2) il volume aggiunto sia minimo (es. < 50 µl).

[Esempio: caso in cui si aggiunge nei campioni una quantità di tripropilstagno cloruro pari a 0,1 µg come stagno. Se si prepara una soluzione di tripropilstagno cloruro a concentrazione pari a 200 mg/L come contenuto in stagno, derivatizzando 100 µl di questa soluzione (circa 20 µg di composto) e portando ad un volume di 10 ml la soluzione dello standard pentilato, si ottiene una concentrazione pari a 2 mg/L. Aggiungendo 50 µl (circa 0,1 µg di composto) di questa soluzione alle aliquote di 1 ml delle soluzioni calibranti, si avrà in queste una concentrazione di tripropilstagno di 100 µg/L].

6. MATERIALI DI RIFERIMENTO CERTIFICATI

6.1. CRM 477

Il CRM 477 è un materiale di riferimento certificato per il contenuto dei composti butilici dello stagno nei



mitili. La concentrazione certificata di questi composti, riferita al peso secco, è riportata nella tabella a fianco.

Tributilstagno (TBT)	Dibutilstagno (DBT)	Monobutilstagno (MBT)
(2,20 ± 0,19) mg/kg	(1,54 ± 0,12) mg/kg	(1,50 ± 0,27) mg/kg

6.2. CRM 462

Il CRM 462 è un materiale di riferimento certificato per il contenuto dei composti del tributilstagno e dibutilstagno in un sedimento marino. La concentrazione certificata di questi composti, riferita al peso secco, è riportata nella tabella a fianco.

Tributilstagno (TBT)	Dibutilstagno (DBT)
(54 ± 15) µg/kg	(68 ± 12) µg/kg

I CRM elencati sopra sono disponibili presso *Institute of Reference Materials and Methods* (IRMM) della Unione Europea.

7. CONSERVAZIONE E PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE

L'elevata tendenza alla degradazione di questi composti nei campioni reali rende necessaria la conservazione del campione in opportune condizioni. L'umidità del campione e la luce sono i maggiori responsabili della degradazione dei composti organostannici. Per minimizzare tale rischio, è necessario liofilizzare, omogeneizzare e conservare i campioni al buio a -20°C immediatamente dopo il loro prelievo.

8. PROCEDURA ANALITICA

8.1. Trattamento del campione

Il trattamento del campione deve essere eseguito nel minor tempo possibile poiché i sali dei composti organostannici presenti nei campioni non sono stabili in ambiente acido e in presenza di luce. Pertanto è opportuno non interrompere la procedura prima della derivatizzazione, e comunque terminare il trattamento del campione entro una giornata lavorativa.

8.1.1. Estrazione

Una quantità da 0,1 a 0,5 g di campione viene posta in un tubo da centrifuga. Si aggiunge una quantità nota di tripropilstagno cloruro (la concentrazione di tale composto nella soluzione derivante dal trattamento del campione, su cui si effettua la determinazione analitica, deve essere simile a quella degli analiti da determinare).

Si aggiungono in sequenza 15 ml di una soluzione metanolica allo 0,03% di tropolone e 1 ml di acido cloridrico concentrato. Il campione viene posto in bagno ad ultrasuoni per 15 minuti, quindi si raccoglie l'estratto dopo centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti. Si ripete l'estrazione sul campione residuo e si riuniscono gli estratti in un imbuto separatore.

8.1.2. Cambiamento del solvente

Agli estratti si aggiungono 100 ml di una soluzione acquosa di cloruro di sodio al 5% (serve per minimizzare la possibilità che si formino delle emulsioni) e 15 ml di diclorometano. Si agita per qualche minuto (l'agitazione non deve essere violenta poiché favorisce la formazione di emulsioni, specialmente nel caso di campioni ricchi di grassi, e quindi rende difficile la separazione delle fasi) e dopo la separazione si raccoglie la fase organica in un pallone a cuore, facendola passare attraverso un filtro di solfato di sodio. Si ripete l'estrazione con un'altra aliquota di 15 ml di diclorometano. Agli estratti si aggiungono 0,5 ml di isoottano.

L'estratto viene concentrato fino ad un volume di circa 1 ml in un evaporatore rotante, ad una temperatura non superiore a 35°C e sotto vuoto moderato (si deve evitare l'ebollizione del solvente). Viene quindi trasferito quantitativamente in un tubo di reazione da 12 ml, lavando le pareti del pallone a cuore con 2 ml di diclorometano ed 1 ml di isoottano ed infine ulteriormente concentrato fino ad un volume di circa 100 µl sotto leggerissimo flusso di azoto.

8.1.3. Derivatizzazione.

Si aggiunge 1 ml di pentilmagnesio bromuro 2 M in etere etilico, si chiude il tubo con il tappo teflonato, e si lascia procedere la reazione per 15 minuti agitando saltuariamente. A questo punto si elimina l'eccesso

di reattivo aggiungendo cautamente, goccia a goccia, dell'acqua distillata sino ad un volume massimo di 2 ml. La reazione del reattivo di Grignard con l'acqua è abbastanza violenta e porta l'etere ad ebollizione. Bisogna quindi porre molta attenzione nelle aggiunte delle gocce di acqua, e comunque si deve evitare che la soluzione vada a secchezza a causa dell'evaporazione dell'etere. A tal fine prima dell'evaporazione completa si aggiunge 1 ml di esano. A questo punto si aggiungono 5 ml di una soluzione acquosa di acido solforico 1 M, per eliminare ogni traccia del reattivo di Grignard, e si agita per qualche minuto.

Dopo un tempo sufficiente per la separazione delle fasi si recupera la fase organica, e si ripete l'estrazione della fase acquosa con un'altra aliquota di 1 ml di esano.

Ai due estratti riuniti in un tubo di reazione si aggiungono 3 ml di una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio 0,1 M. Si agita, si elimina la fase acquosa e si ripete il lavaggio (tale lavaggio ha lo scopo di eliminare sostanze, come per esempio polialcoli, che interferirebbero nella fase di purificazione). La fase organica, quindi, si trasferisce in una fiala e si concentra, per evaporazione sotto un debole flusso di azoto, sino ad un volume di 0,5 ml.

8.1.4. Purificazione

a) Sedimenti

Si prepara una colonnina di purificazione riempiendola con 3 g di gel di silice, e ponendo in testa uno strato da 1 cm di solfato di sodio. Prima dell'eluizione del campione si fanno passare in colonna 2 ml della soluzione eluente, che è una miscela di esano e toluene 1:1 (tale trattamento ha lo scopo di eliminare i siti più attivi della fase adsorbente con le tracce di acqua contenute nei solventi). Successivamente l'estratto viene trasferito in testa alla colonna ed eluito prima con 3 aliquote di 1 ml della soluzione eluente con cui si è effettuato il lavaggio della fiala contenente l'estratto, e successivamente con altri 5 ml di eluente. L'eluato raccolto viene concentrato ad un volume di circa 1 ml sotto debole flusso di azoto.

b) Matrici biologiche

Si prepara una colonnina di purificazione riempiendola con 3 g di Florisil, e ponendo in testa uno strato da 1 cm di solfato di sodio. Si procede come nel caso "(a) Sedimenti".

8.2. Determinazione analitica

8.2.1. Analisi mediante GC-FPD

Per l'analisi in GC-FPD si impiega una colonna capillare in silice fusa di 30 m di lunghezza e 0,53 mm di diametro interno, con una fase legata metilsiliconica di spessore pari a 1,5 µm (megabore DB1 della J&W Scientific o equivalente). I gas utilizzati come combustibile, comburente, gas di trasporto e come make-up sono, rispettivamente, idrogeno, aria, elio e azoto. Il volume di campione da iniettare è di 2 ml, e le condizioni operative dello strumento utilizzato (Varian 3600) sono:

- **Flussi:**

- idrogeno: 130 ml/min
- aria 1: 83 ml/min
- aria 2: 173 ml/min
- carrier (elio): 20 ml/min
- carrier + make up (azoto): 33 ml/min.

- **Temperature:**

- iniettore: 240°C
- rivelatore: 240°C

- **Programma di temperatura:** temperatura iniziale di 80°C mantenuta per un minuto, innalzamento della temperatura fino a 280°C con una velocità di 10°C/min, temperatura finale 280°C mantenuta per tre minuti.

Con tali parametri l'ordine di uscita e i tempi indicativi di ritenzione dei composti organostannici sono quelli riportati nella tabella a fianco.

Composto	Tempi indicativi di ritenzione (min)
Tripopilpentilstagno	8,88
Tributilpentilstagno	11,32
Dibutildipentilstagno	12,16
Monobutiltripentilstagno	12,96
Monofeniltripentilstagno	15,10
Difenildipentilstagno	16,47
Trifenilpentilstagno	17,89

La quantità minima quantificabile è dell'ordine di 20 pg di composto (come stagno) iniettato, mentre il campo di linearità arriva sino ad una quantità iniettata pari a circa 400 pg.

L'analisi quantitativa viene eseguita con il metodo della curva di calibrazione nell'intervallo di linearità della risposta.

Le curve di calibrazione sono costruite riportando sulle ascisse la concentrazione delle soluzioni standard, impiegate per costruire le stesse curve, e sulle ordinate il rapporto tra l'altezza del picco cromatografico del composto rispetto all'altezza del picco dello standard interno.

I picchi cromatografici dei composti organici dello stagno, ottenuti mediante la determinazione con il rivelatore a fometria di fiamma, presentano la caratteristica di essere codati. Ciò è dovuto ad un effetto di "fouling" degli ossidi di stagno che si formano nella fiamma, che per la loro bassa volatilità e per la geometria del sistema non abbandonano velocemente la camera di combustione, ma aderiscono alle pareti della camera, continuando ad emettere. La codatura è tanto più pronunciata quanto maggiore è la quantità di composto analizzato. Questa caratteristica presenta da una parte un notevole vantaggio per il riconoscimento di tali composti, dall'altra presenta dei problemi per l'analisi quantitativa. L'area dei picchi cromatografici, infatti, non è linearmente correlabile con la concentrazione dei composti organostannici eluiti. Tuttavia esiste una buona correlazione con le altezze dei picchi, che quindi vengono considerati per effettuare l'analisi quantitativa.

8.2.2. Analisi mediante GC-MS

Per l'analisi in GC-MS si utilizza una colonna capillare lunga 25 m e con un diametro interno di 0,20 mm, con una fase legata metil-5% fenilsiliconica di spessore pari a 0,25 μm (DB 5 della J&W Scientific o equivalente). Il rivelatore è a selezione di massa a quadrupolo con ionizzazione ad impatto elettronico da 70 eV. La rivelazione degli analiti viene effettuata mediante monitoraggio a singolo ione (SIM). Il gas utilizzato come gas di trasporto è l'elio. Il volume di campione da iniettare è di 1 ml, e le condizioni operative dello strumento utilizzato (HP-5980, MS HP 5970) sono:

- **Pressione del gas di trasporto in testa alla colonna:** 120 KPa.
- **Temperature:**
 - iniettore (splitless): 240°C
 - "transfer line": 280°C
- **Programma di temperatura:** temperatura iniziale di 80°C mantenuta per un minuto, innalzamento della temperatura fino a 280°C con una velocità di 10°C/min, temperatura finale 280°C mantenuta per tre minuti.
- **Programma di acquisizione dati SIM (selected ions monitoring):**

Composto	Start time	m/z	Dwell time
TPrT	6.5	277, 275, 273	100
TBT	9.5	305, 303, 301	100
DBT	11	319, 317, 305	100
MBT	12	319, 317, 315	100
MPhT	15.5	339, 337, 335	100
DPhT	18	345, 343, 341	100
TPhT	20.5	351, 349, 347	100

Con tali parametri l'ordine di uscita e i tempi indicativi di ritenzione dei composti organostannici sono quelli riportati nella tabella a fianco.

La quantità minima quantificabile è dell'ordine di 3 pg di composto (come stagno) iniettato, mentre il campo di linearità arriva sino ad una quantità iniettata pari a circa 1000 pg.

Composto	Tempi indicativi di ritenzione (min)
Tripopilpentilstagno	7,09
Tributilpentilstagno	10,20
Dibutildipentilstagno	11,40
Monobutiltripentilstagno	12,59
Monofeniltripentilstagno	16,10
Difenildipentilstagno	18,50
Trifenilpentilstagno	20,95

L'analisi quantitativa viene eseguita con il metodo della curva di calibrazione nell'intervallo di linearità della risposta. Per ogni composto le curve di calibrazione sono costruite riportando sulle ascisse la concentrazione delle soluzioni standard, impiegate per costruire le stesse curve, e sulle ordinate il rapporto tra l'area del picco cromatografico del composto rispetto all'area del picco dello standard interno.

9. COMMENTI

La presente procedura analitica è stata ottimizzata nei laboratori della sezione TEIN-CHIM del C.R. ENEA Casaccia. Le attrezzature e gli strumenti utilizzati con i relativi parametri strumentali sono stati descritti nei precedenti paragrafi. Naturalmente nell'applicazione di tale metodo con altre attrezzature e strumenti analitici si potrebbero ottenere diverse performance, per cui si consiglia di ottimizzare lo stesso metodo nel proprio laboratorio.

Una volta ottimizzato il metodo in base alle peculiarità del proprio laboratorio, è opportuno procedere alla sua validazione. I mezzi più validi per validare un metodo sono:

- 1) analisi di materiali di riferimento certificati (CRM);
- 2) la partecipazione a studi interlaboratorio.

Una volta validato il metodo deve essere tenuto costantemente sotto controllo, e la sua riproducibilità a lungo termine deve essere controllata. A tal fine si consiglia di adottare carte di controllo di qualità.

LAVORI PUBBLICATI DALLA SEZIONE TEIN-CHIM DELL'ENEA

- T. Ferri, R. Morabito, A. Perini (1988) *Organotin determination by GFAAS*, in Heavy Metals in the Hydrological Cycle. Ed. M. Astruc e J.N. Lester, London p. 413-418.
- S. Chiavarini, C. Creminini, T. Ferri, R. Morabito, A. Perini (1991) *Monitoring of organotins in the La Spezia gulf - I - Analytical methods and preliminary results (summer 1989)*. Sci. Tot. Environ., 101, 217-227.
- S. Chiavarini, C. Creminini, R. Morabito (1991) *Distribution and fate of TBT and its degradation products in the La Spezia Gulf*. FAO/UNEP/IAEA MAP Technical Report Series No. 59, pp. 179-187.
- A. M. Caricchia, S. Chiavarini, C. Creminini, R. Morabito, R. Scerbo (1991) *Organotin compounds in marine mussel collected from Italian coasts*. Analytical Sciences, 7, 1193-1196.
- A. M. Caricchia, S. Chiavarini, C. Creminini, M. Fantini, R. Morabito (1992) *Monitoring of organotins in the La Spezia gulf - II. Results of the 1990 sampling campaigns and concluding remarks*. Sci. Tot. Environ., 121, 133-144.
- S. Chiavarini, C. Creminini, T. Ferri, R. Morabito, C. Ubaldi (1992) *Liquid-solid extraction of butyltin compounds from marine samples*. Appl. Organomet. Chem., 6, 147-153.
- A. M. Caricchia, S. Chiavarini, C. Creminini, R. Morabito, C. Ubaldi (1993) *Analytical methods for the determination of organotins in the marine environment*. Int. J. Env. An. Chem., 53, 37-52.
- A. M. Caricchia, S. Chiavarini, C. Creminini M. Fantini, R. Morabito, R. Scerbo, M. Vitali (1993) *Concentrations of organotins in water, sediment and mussels from Taranto harbour (Italy)*. In: Heavy Metals in the environment. R.J. Allan and J.O. Nriagu Eds., Toronto.
- A. M. Caricchia, S. Chiavarini, C. Creminini, R. Morabito, R. Scerbo (1994) *Influence of the storage conditions on the organotin determination in mussel samples*. Anal. Chim. Acta, 286, 329-334.
- Ph. Quevauviller, R. Ritsema, R. Morabito, W.M.R. Dirx, S. Chiavarini, J.M. Bayona, O.F.X. Donard (1994) *Critical Consideration with respect to the identification of tin species in the environment*. Appl. Organomet. Chem., 8, 541-549.
- T. Ferri, F. Roberti, S. Chiavarini, C. Creminini, R. Morabito (1994) *Influence of tropolone on voltammetric speciation analysis of butyltin compounds*. Appl. Organomet. Chem., 8, 587-593.
- R. Morabito, S. Chiavarini, C. Creminini (1995) *GC-MS for the speciation of organotin compounds in environmental samples*" In: Quality assurance of Environmental Analysis within the BCR-programme, B. Griepink and Ph. Quevauviller Eds., Elsevier Publ., Chapter 17, 435-464.
- R. Morabito (1995) *Speciation of organotin compounds in environmental matrices*. Microchem. J., 51, 198-206.
- Ph. Quevauviller, S. Chiavarini, C. Creminini, R. Morabito, M. Bianchi, H. Muntau (1995) *Preparation and homogeneity study of a mussel candidate reference material for the certification of organotin compounds*. Mikrochim. Acta, 120, 281-287.
- S. Chiavarini, C. Creminini, R. Morabito (1996) *Organotin compounds in marine organisms*. In: Element speciation in bioinorganic chemistry. S. Caroli Ed., J. Wiley & Sons Publ., 9, 287-329.
- Ph. Quevauviller, M. Astruc, L. Ebdon, H. Muntau, W. Cofino, R. Morabito, B. Griepink (1996) *A programme to improve the quality of butyltin determinations in environmental matrices*. Mikrochim. Acta, 123, 163-173.
- F. Pannier, A. Astruc, M. Astruc, R. Morabito (1996) *Determination of butyltin compounds in mussel samples: a comparative study of analytical procedures*. Appl.



- Organomet. Chem., 10, 471-476.
- M.B. de la Calle-Guntinàs, R. Scerbo, S. Chiavarini, Ph. Quevauviller, R. Morabito (1997) *Comparison of different derivatization methods for the determination of butyl- and phenyltin compounds in mussel by gas chromatographic methods*. Appl. Organomet. Chem., 11, 693-702.
 - Ph. Quevauviller, W. Cofino, R. Cornelis, P. Fernandez, R. Morabito, H. Van der Sloot (1997) *The EC-SM&T programme in support to the improvement of quality control of environmental analysis*. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 67, 173-184.
 - Ph. Quevauviller, R. Morabito, L. Ebdon, W. Cofino, H. Muntau, M.J. Campbell (1997) *The certification of the contents (mass fractions) of monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in mussel tissue (CRM 477)*. EU Report, EUR 17921 EN, 1-45.
 - R. Morabito, P. Soldati, M.B. de la Calle, Ph. Quevauviller (1998) *An attempt to certify phenyltin compounds in a mussel reference material*. Appl. Organomet. Chem., 12, 621-634.
 - A. Lamberty, Ph. Quevauviller, R. Morabito (1998) *The recertification of the contents (mass fractions) of tributyltin and dibutyltin in coastal sediment (CRM 462)*. EU Report, EUR 18406 EN, 1-45.
 - R. Morabito (1998) *Organotin compounds in filter-feeding organisms*. Speciation 21 Newsletter, 1st Issue.
 - R. Morabito, H. Muntau, W. Cofino, Ph. Quevauviller (1999) *Certification of monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in mussel tissue (CRM 477)*. J. Environ. Monitor., 1, 75-82.
 - R. Morabito, P. Massanisso, Ph. Quevauviller (2000) *Derivatization methods for the determination of organotin compounds in environmental samples*. TrAC, 19, 97-106.
 - C. Pellegrino, P. Massanisso, R. Morabito (2000) *Comparison of 12 selected extraction methods for the determination of butyl- and phenyl-tin compounds in mussel samples*. TrAC, 19, 86-96.
 - Ph. Quevauviller, M. Astruc, R. Morabito, F. Ariese, L. Ebdon (2000) *Collaborative evaluation of methods for tributyltin determinations in sediment and mussel tissue*. TrAC, 19, 180-188.
 - R. Morabito (2000) *Source of errors in organotin speciation analysis*. Proceedings of the Post Conference Symposium on Metal Speciation in the Environment, N. S. Thomaidis and T. D. Lekkas Eds., Global Nest Publ., 49-64.



Valutazione della tossicità naturale nel saggio Microtox® in fase solida: la normalizzazione pelitica

Tratto da: *Acqua & Aria*, 6, pp. 83-91, 1999

Parole chiave: Microtox® Solid-Phase Test, tossicità naturale, sedimento di riferimento, pelite, indice di tossicità.

Riassunto

Il saggio Microtox® in fase solida costituisce uno dei test ecotossicologici standardizzati più diffuso a livello internazionale per la valutazione della tossicità dei sedimenti. Tuttavia il suo potere discriminatorio e il livello di sensibilità sono ancora poco chiari, principalmente a causa dell'effetto matrice che tende ad indurre falsi positivi. Attraverso l'utilizzo di sedimenti naturali di riferimento, caratterizzati chimicamente e fisicamente, viene proposto un modello che, ponendo in relazione diretta la loro tossicità "naturale" con la frazione pelitica, consente di stimare la componente naturale della tossicità acuta di campioni contaminati. Tale modello, permettendo un'interpretazione più verosimile della tossicità dei sedimenti, viene quindi utilizzato per lo sviluppo di una scala di tossicità basata sul concetto RTR (Ratio To Reference) ed applicato, a titolo di esempio, a campioni portuali contaminati.

EVALUATION OF NATURAL TOXICITY ON MICROTOX® SOLID-PHASE TEST: THE PELITIC NORMALIZATION

Abstract

In sediment toxicity testing Microtox® Solid-Phase Test (SPT) is one of the most utilised and standardised bioassay. Nevertheless, its real sensitivity and discriminatory power is still unclear, because of several interferences principally related to the matrix composition. Using reference sediments, characterised with chemical and physical analysis, it was possible to find a significant relationship between their "natural" toxicity and the pelitic fraction that allows to estimate the natural component of the acute toxicity in contaminated samples. This relationship agrees a more sensitive and valid interpretation than raw data and it is utilised to develop a Sediment Toxicity Index (STI) based on Ratio To Reference (RTR) concept, applicable to harbour contaminated samples.

Keywords: Microtox® Solid-Phase Test, natural toxicity, reference sediment, pelite, Toxicity Index

→ INTRODUZIONE

Nell'ambito della valutazione del rischio ambientale di matrici solide complesse quali, ad esempio, sedimenti di origine portuale, l'ecotossicologia costituisce un valido mezzo integrativo di indagine che, affiancata al tradizionale approccio chimico, fornisce importanti informazioni circa la biodisponibilità dei contaminanti. I saggi biologici, tuttavia, misurando l'effetto su organismi-test di miscele complesse di contaminanti, non consentono di identificare l'agente responsabile della specifica risposta tossica (Jacobs *et al.*, 1993). Da qui l'esigenza dell'applicazione di un approccio multidisciplinare per la corretta valutazione della qualità dei sedimenti, ormai noto come "Sediment Quality Triad", che prevede l'integrazione di analisi di tipo chimico, biologico ed ecotossicologico (Long e Chapman, 1985; Chapman *et al.*, 1987; Chapman, 1990; Carr *et al.*, 1996; Chapman *et al.*, 1996).

Nel vasto panorama di saggi biologici standardizzati oggi disponibili il sistema Microtox® sembra essere tra i più diffusi e attendibili. Esso è basato sulla riduzione della bioluminescenza naturale di batteri della specie *Vibrio fischeri* in presenza di contaminanti, come indicazione di tossicità acuta. La curva dose-risposta consente l'individuazione della EC50 (o di qualunque altra EC compresa tra 1 e 99), ossia della

concentrazione del campione a cui corrisponde una riduzione della bioluminescenza pari al 50%.

La bibliografia relativa alla riproducibilità, al potere discriminatorio, alla sensibilità specifica nei confronti di metalli pesanti IPA, PCB e pesticidi, nonché alla comparazione con altri test ecotossicologici è ormai abbondante (Qureshi *et al.*, 1982; Greene *et al.*, 1985; Nacci *et al.*, 1986; Elnabarawy *et al.*, 1988; Becker *et al.*, 1990; Munkittrick *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1992; Ho e Quinn, 1992; Toussaint *et al.*, 1995; Salizzato *et al.*, 1998). Tuttavia, per quanto riguarda in particolare il test in fase solida (SPT) per la misura della tossicità acuta di sedimenti marini e continentali, il protocollo standard e la conseguente interpretazione del risultato mostrano ancora alcune evidenti incertezze. Il protocollo SPT, sviluppato successivamente ai test in fase acquosa (Tung *et al.*, 1990), prevede l'esposizione diretta dei batteri bioluminescenti al sedimento per 20 minuti e una successiva incubazione di 10 minuti nel luminometro (M 500 Toxicity Analyzer) delle risospensioni batteriche ottenute filtrando la serie di diluizioni del campione con apposite colonnine-filtro (Azur Environmental, 1994). Tale metodica comporta una serie di "problemi" riconducibili essenzialmente alla variabilità della matrice solida: perdita di batteri rimasti adesi alle particelle di sedimento, aumento della biodisponibilità dei contaminanti adsorbiti ad esso, interferenza ottica delle particelle rimaste in sospensione (Brouwer *et al.*, 1990; Bulich *et al.*, 1992; Benton *et al.*, 1995; Ringwood *et al.*, 1997). Tutto ciò può indurre, evidentemente, a falsi positivi e rende difficoltosa una valutazione oggettiva della reale tossicità del sedimento.

Allo scopo di distinguere la "reale" tossicità (al netto dei fattori distorsivi sopracitati) da quella "apparente" (effettivamente misurata e comprensiva dei fattori distorsivi) è stato allora proposto l'utilizzo di sedimenti di riferimento incontaminati con le stesse caratteristiche del campione (Bulich *et al.*, 1992) e, conseguentemente, la Microbics Co. (1994) ha introdotto una modifica del SW di elaborazione dati per la correzione della tossicità del campione in funzione di quella espressa dal riferimento.

Malgrado ciò, considerando l'elevata variabilità qualitativa dei sedimenti marini e il diffuso inquinamento delle coste italiane, permane la difficoltà logistica di reperire un adeguato riferimento naturale con la stessa granulometria, mineralogia, colore, sostanza organica, potenziale redox e pH, per ogni campione da testare.

Il presente lavoro non è finalizzato alla quantizzazione dei fattori distorsivi nel test in fase solida (peraltro in parte già valutati), bensì alla individuazione di un modello analitico di semplice applicabilità che descriva il comportamento della tossicità di sedimenti di riferimento naturali (o assunti come tali) di diversa tipologia (fisica, chimica, mineralogica, ecc.), quale risultante degli effetti sinergici e/o antagonistici delle numerose variabili che concorrono a determinare la tossicità di una matrice complessa come il sedimento marino. Tale modello costituisce la base per lo sviluppo di un indice di tossicità acuta basato sul rapporto tra la tossicità apparente del campione e la sua componente naturale stimata.

A titolo di esempio, infine, tale modello viene applicato ad alcuni campioni contaminati provenienti da diversi porti italiani.

→ MATERIALI E METODI

Nel corso di alcune campagne di ricerca condotte dall'Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare di Roma (ICRAM), in collaborazione con il Consorzio Interuniversitario di Biologia Marina ed Ecologia Applicata di Livorno (CIBM), nel periodo 1995-97 sono stati selezionati 28 campioni di sedimento superficiale provenienti da 4 distinte aree della piattaforma continentale con un impatto antropico relativamente basso e con differenti caratteristiche fisico-chimiche: 11 dalla costa settentrionale del Tirreno (Area A), 11 dalla costa meridionale dell'Adriatico (Area B), 3 dal Tirreno Centrale (Area C) e 3 dal Canale di Sicilia (Area D). Nello stesso periodo sono stati prelevati 11 campioni portuali, di cui 4 dal porto di Piombino, 3 dal porto di Viareggio e 4 da quello di Livorno.

Il campionamento è stato effettuato mediante una piccola benna di tipo Van Veen (2,5 L).

I campioni, dopo accurata omogeneizzazione, sono stati suddivisi nelle varie aliquote per le diverse analisi. In particolare, per le analisi fisico-chimiche si è provveduto al congelamento a -20°C, mentre per i saggi Microtox® le aliquote sono state conservate a 4°C fino all'utilizzo nei test, ultimati entro una settimana dal campionamento.

I campioni portuali non sono stati caratterizzati chimicamente.

I parametri fisici e chimici presi in considerazione per la valutazione qualitativa dei campioni e quindi per la eventuale idoneità al loro utilizzo come sedimenti di riferimento sono stati i seguenti: granulometria, sostanza organica, alcuni metalli in tracce (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn), idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e policlorobifenili (PCB).



Per quanto riguarda l'analisi granulometrica sono state considerate solo due frazioni come costituenti il 100% del sedimento: la pelite e la sabbia fino a 1 mm. Questo limite superiore è stato fissato in conseguenza della funzione di "filtro granulometrico" svolto inevitabilmente dai puntali delle micropipette durante il prelevamento delle aliquote di sedimento da utilizzare per la preparazione della serie di diluizioni del campione. L'esecuzione del test in fase solida secondo il protocollo Large Sample Procedure, infatti, prevede il prelievo mediante micropipetta di due aliquote di 1,5 ml da una sospensione di 7 g di sedimento mantenuto in agitazione in 35 ml di diluente (Azur Environmental, 1994). Tagliando la sommità del puntale fino al raggiungimento di un diametro di circa 1 mm si è innalzato il limite superiore della frazione granulometrica coinvolta nel test e con la quale i batteri entrano effettivamente in contatto.

L'aliquota di sedimento destinata all'analisi granulometrica, quindi, è stata trattata nella seguente modalità: dopo reazione per 48 ore in una soluzione di perossido di idrogeno per facilitare la separazione dei granuli di sedimento, è stata setacciata in umido su rete d'acciaio da 63 mm. Le due frazioni così ottenute sono state lavate ripetutamente con acqua distillata per allontanare i sali ed essiccate in stufa a 105°C. La sabbia è stata infine setacciata con un setaccio ASTM da 1 mm e la frazione superiore, scartata.

La sostanza organica è stata determinata per via gravimetrica dopo calcinazione in muffola a 450°C per 6 ore (Byers *et al.*, 1978).

Gli IPA sono stati analizzati secondo quanto riportato in Griest e Caton (1983) e Pinto *et al.* (1995). Sono stati ricercati i 16 IPA indicati dall'EPA come contaminanti di rilevante importanza tossicologica (USEPA, 1986).

I PCB sono stati estratti con miscela acetone/etere di petrolio 40°-60° (1:1); l'estratto grezzo è stato successivamente sottoposto a procedimento per la rimozione dello zolfo e purificato mediante acido solforico (Di Muccio *et al.*, 1990). Infine, dopo purificazione mediante cromatografia su Florisil®, si è proceduto alla determinazione mediante gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni (Amato *et al.*, 1989). Sono stati ricercati i seguenti PCB: PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180, PCB 209.

L'analisi dei metalli in tracce è stata eseguita su un'aliquota di 0,3-0,5 g di sedimento (peso umido) mediante mineralizzazione acida totale (HCl s.p. + HNO₃ s.p. + HF s.p.) in forno a microonde e successiva lettura con spettrofotometro ad assorbimento atomico (AAS) per Cd, Cu, Ni e Pb, tramite la metodica dei vapori freddi dopo riduzione con SnCl₂ per Hg.

I limiti di rilevabilità e le percentuali di recupero rispetto a standard internazionali certificati relativi alle metodiche adottate sono riportati nella tabella 1.

Parametro	Limite di rilevabilità (µg kg ⁻¹ p.s.)	Recupero (%)
IPA (singola specie)	1	70-80
PCB	0,1	85
Cd	0,08	106
Cu	0,15	102
Hg	3,01	114
Pb	3,61	93
Ni	3,01	90

Tab. 1 - Limite di rilevabilità e percentuale di recupero rispetto a standard certificati relativi alle metodiche adottate nelle analisi chimiche.

I saggi con il sistema Microtox® sono stati applicati alla fase solida e all'acqua interstiziale ottenuti per centrifugazione (8.000 rpm per 30 minuti a 4°C), senza alcun pre-trattamento chimico. Allo scopo di evitare ogni interferenza ottica l'acqua interstiziale è stata filtrata mediante filtri a siringa da 0,45 µm, rimuovendo così ogni eventuale particella rimasta in sospensione. Per aumentare la sensibilità del test sull'acqua interstiziale è stata ricercata la EC20 (concentrazione del campione corrispondente ad una inibizione della bioluminescenza pari al 20%) anziché la EC50 ed è stato protratto il tempo di incubazione fino a 45 minuti. I saggi sono stati condotti entro 24 ore e 4 giorni dalla centrifugazione, rispettivamente per la matrice liquida e solida. Sono stati applicati i protocolli standard (Azur Environmental, 1994a; 1994b), con l'eccezione dei diluenti (NaCl al 2% per matrici liquide; NaCl al 3,5% per la fase solida), sostituiti da acqua di mare sintetica al 3,3% prodotta secondo la metodica EPA indicata per i saggi tossicologici (Peltier e Weber, 1985), ma con l'esclusione dell'EDTA, evitando in tal modo possibili complessazioni degli ioni metallici.

La sostituzione dei diluenti/controlli con l'acqua di mare sintetica è stata determinata in base alle seguenti considerazioni:

- *Vibrio fischeri* è un batterio marino;
- tutti i campioni saggiati sono marini;
- l'ambiente osmotico offerto dall'acqua di mare sintetica, grazie alle sue proprietà tamponanti, risulta presumibilmente più stabile nei confronti dei batteri rispetto alla semplice soluzione di NaCl.

I risultati del saggio SPT sono espressi in Unità Tossiche, quale reciproco aritmetico della EC50, per consentire una relazione diretta tra tossicità e concentrazione del campione.

Allo scopo di individuare i parametri maggiormente coinvolti nella tossicità "naturale", ovvero nella tossicità espressa dai campioni naturali di riferimento, i dati fisico-chimici e tossicologici, preventivamente normalizzati [$\log(X + 1)$] per ridurre la multidimensionalità, sono stati sottoposti ad analisi multivariata (Principal Component Analysis), mentre la correlazione di Spearman e il test-U di Mann-Whitney (Microsoft Statistica, 5.5) sono stati utilizzati per stabilire la significatività della relazione tra la frazione pelitica e i risultati del test SPT.

→ RISULTATI E DISCUSSIONE

L'acqua interstiziale dei campioni relativi alle 4 aree esterne è risultata priva di tossicità acuta (EC20 > 90% fino a 45 minuti di incubazione).

Le caratteristiche fisiche, chimiche e tossicologiche delle presunte aree di riferimento sono riportate nelle tabelle 2-5, riferite rispettivamente al Tirreno settentrionale, Adriatico meridionale, Tirreno centrale e Canale di Sicilia. Le concentrazioni di IPA e PCB sono riferite alla sommatoria dei singoli composti ricercati.

Nella tabella 6, a titolo di esempio, vengono illustrati relativamente ai parametri considerati alcuni range riportati in letteratura (con metodiche analitiche identiche o molto simili a quelle adottate nel presente lavoro) per diverse zone delle coste settentrionali europee e del Mar Mediterraneo, con alcuni particolari riferimenti alle aree indagate. Tali range sono in buon accordo con i risultati delle analisi chimiche per quanto riguarda i metalli in tracce, anche se la concentrazione di Hg nell'area C (0,26-0,37 mg kg⁻¹ p.s.), che rientra comunque nel range per l'isola di Ustica, non è probabilmente di origine totalmente naturale. Relativamente agli IPA solo alcuni campioni (A6-A8; C3) eccedono i valori più bassi ritrovati in bibliografia, confermando la presenza di una contaminazione ormai diffusa lungo le coste tirreniche e liguri (Cannarsa *et al.*, 1989; Romano *et al.*, 1998). In particolare il benzo(a)pirene, che sembra la specie più studiata, raggiunge nel campione A6 la concentrazione di 136 ng g⁻¹ p.s., di cui solo 20 potrebbero ritenersi di origine naturale (Cannarsa *et al.*, 1989). Infine, i PCB, essendo molecole sintetiche estranee all'ambiente naturale, possiedono per definizione un background nullo. Tuttavia la loro distribuzione è così estesa da aver creato una sorta di "fondo naturale" (Cannarsa *et al.*, 1989) per il quale livelli medi di 202 ng g⁻¹ p.s. nei sedimenti superficiali possono essere considerati ormai naturali (De Simone e Massimo, 1986). Quindi sulla base di questo presupposto le concentrazioni riscontrate presentano livelli relativamente bassi (concentrazione massima: 11 ng g⁻¹ nel campione C2).

Naturalmente, tale confronto è quantomeno relativo poiché da un punto di vista geochimico la variabilità dei dati dipende anche dalla costituzione mineralogica dei sedimenti, soprattutto per ciò che concerne le specie metalliche, mentre da un punto di vista ecotossicologico essi non forniscono né informazioni sulla biodisponibilità dei contaminanti né sugli eventuali effetti sinergici e/o antagonistici di miscele di essi.

Camp.	Microtox® SPT				Granulometria (%) S.O.			Metalli (mg kg ⁻¹)					Σ IPA (mg kg ⁻¹)	Σ PCB (ng g ⁻¹)
	TU50	limiti al 95%	Slope	R ²	Sabbia*	Pelite	(%)	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb		
A1	29,730	24,442-36,166	1,500	0,994	90,95	9,05	0,5	0,15	16,7	0,03	37,9	23,00	< 0,001	< 0,1
A2	36,457	26,874-49,458	1,094	0,966	88,76	11,24	0,9	0,02	6,79	0,20	42,9	12,90	0,078	< 0,1
A3	13,841	7,485-25,596	0,788	0,922	86,96	13,04	1,5	0,06	7,07	0,04	50,2	14,9	0,004	< 0,1
A4	80,370	47,266-136,657	1,254	0,921	86,01	13,99	1,3	0,05	6,72	0,03	43,4	11,6	0,123	< 0,1
A5	32,790	24,603-43,702	1,162	0,980	66,03	33,97	1,6	0,06	9,75	0,03	37,8	18,5	0,080	0,2
A6	153,46	132,465-177,771	1,757	0,996	60,74	39,26	2,0	0,05	9,12	0,03	46,00	13,9	0,547	< 0,1
A7	135,8	113,247-162,846	1,272	0,988	48,52	51,48	2,1	0,08	20,6	0,07	54,6	27,7	0,543	< 0,1
A8	189,19	140,907-254,029	1,673	0,985	44,09	55,91	1,9	0,05	11,1	0,03	54,8	19,1	0,532	1
A9	245,63	204,611-294,864	1,885	0,996	6,53	93,47	2,6	0,11	27	0,07	67,7	20	0,040	0,1
A10	264,471	222,876-313,827	1,639	0,991	4,38	95,62	2,4	0,11	25,1	0,05	73,3	24,20	0,042	< 0,1
A11	237,203	212,668-264,561	1,342	0,996	0,39	99,61	2,7	0,09	28,7	0,12	71,4	22,2	0,095	< 0,1

Tab. 2 – Dati fisici, chimici e tossicologici dell'area A (i valori sono riferiti al peso secco). * Sabbia < 1 mm.

Camp.	Microtox® SPT				Granulometria (%) S.O.			Metalli (mg kg ⁻¹)					Σ IPA (mg kg ⁻¹)	Σ PCB (ng g ⁻¹)
	TU50	limiti al 95%	Slope	R ²	Sabbia*	Pelite	(%)	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb		
B1	1,594	0,089-28,648	1,324	0,978	100	0	1,6	0,07	4,48	0,06	3,08	6,31	0,078	< 0,1
B2	14,209	8,811-22,916	1,13	0,965	99,09	0,91	1,9	0,06	4,58	0,04	4,04	6,25	0,013	< 0,1
B3	8,795	7,898-9,793	1,242	0,999	94,53	5,47	2,7	0,08	6,35	0,05	6,94	8,38	0,015	< 0,1
B4	13,805	12,808-14,880	1,004	0,999	84,06	15,94	2,8	0,06	6,17	0,05	6,86	7,89	0,028	< 0,1
B5	154	128,026-185,246	1,06	0,987	32,45	67,55	4,7	0,09	17,4	0,07	20,7	14,3	0,057	7,5
B6	329,18	312,180-347,111	1,458	1	16,53	83,47	5	0,11	25,2	0,09	33,2	17,3	0,08	11,7
B7	169,82	137,894-209,135	1,763	0,999	13,13	86,87	3	0,1	20,8	0,08	32,1	15,6	0,064	7,4
B8	250,19	203,949-306,922	1,189	0,994	2,22	97,78	2,3	0,18	25,8	0,12	43,9	19,5	0,078	9,8
B9	238,28	164,747-344,628	1,085	0,956	0,98	99,02	4,9	0,13	32,4	0,07	54,8	18	0,026	< 0,1
B10	281,63	222,254-356,861	1,346	0,988	10,72	89,28	5	0,12	21,7	0,07	64,6	18,2	0,028	< 0,1
B11	216,06	179,290-260,363	1,322	0,999	54,93	45,07	4	0,1	20,1	0,05	51,3	9	0,014	< 0,1

Tab. 3 – Dati fisici, chimici e tossicologici dell'area B (i valori sono riferiti al peso secco). * Sabbia < 1 mm.

Camp.	Microtox® SPT				Granulometria (%) S.O.			Metalli (mg kg ⁻¹)					Σ IPA (mg kg ⁻¹)	Σ PCB (ng g ⁻¹)
	TU50	limiti al 95%	Slope	R ²	Sabbia*	Pelite	(%)	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb		
C1	12,561	9,135-17,271	1,127	0,986	75,04	24,96	1,5	0,06	6,5	0,37	32,72	14,21	0,158	< 0,1
C2	264,176	261,913-266,458	1,395	1,000	34,37	65,63	2,3	0,19	28,61	0,26	45,53	38,78	0,335	11
C3	71,158	58,413-86,682	1,048	0,997	37,34	62,63	2,1	0,08	19,35	0,28	40,52	35,7	0,485	10

Tab. 4 – Dati fisici, chimici e tossicologici dell'area C (i valori sono riferiti al peso secco). * Sabbia < 1 mm.

Camp.	Microtox® SPT				Granulometria (%) S.O.			Metalli (mg kg ⁻¹)					Σ IPA (mg kg ⁻¹)	Σ PCB (ng g ⁻¹)
	TU50	limiti al 95%	Slope	R ²	Sabbia*	Pelite	(%)	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb		
D1	62,134	49,738-77,619	1,076	0,982	64,31	35,69	3,3	0,11	6,55	0,03	9,72	10,33	< 0,001	< 0,1
D2	257,450	210,995-314,134	1,955	0,994	15,54	84,46	5,4	0,11	11,68	0,09	23,53	19,47	< 0,001	< 0,1
D3	107,353	96,970-118,847	1,321	1,000	74,85	25,15	4,4	0,74	19,92	0,08	51,69	27,1	0,002	< 0,1

Tab. 5 – Dati fisici, chimici e tossicologici dell'area D (i valori sono riferiti al peso secco). * Sabbia < 1 mm.

Parametro	Concen.	Descrizione	Riferimento bibliografico
Cd (mg kg ⁻¹ p.s.)	0,06-0,12	Background per la piattaforma pugliese	Viel et al., 1986b
	0,06-0,1	Background per la costa norvegese	AA.VV., 1992
	0,10-0,23	Range medio per l'isola di Ustica	AA.VV., 1995
	0,49-0,51	Conc. media della piattaforma ligure	Campi et al., 1989
	0,7-1,7	Background per la costa Olandese	AA.VV., 1992
	0,10-0,23	Range medio del largo per il Mediterraneo	UNEP, 1990
Cu (mg kg ⁻¹ p.s.)	0,06-0,1	Range medio per l'isola di Ustica	AA.VV., 1995
	11-24	Background per la costa Norvegese	AA.VV., 1992
	20-40	Range medio costa Kalamata (Grecia)	UNEP, 1990
	20-24	Background per la piattaforma pugliese	Viel et al., 1986b
	30-49	Background per la costa Olandese	AA.VV., 1992
Hg (mg kg ⁻¹ p.s.)	30-75	Range medio del largo per il Mediterraneo	UNEP, 1990
	0,01-0,07	Range medio per la costa del Tirreno sett.	Cosma et al., 1993
	0,06-0,08	Background per la costa Norvegese	AA.VV., 1992
	0,12-0,49	Background per la costa Olandese	AA.VV., 1992
Ni (mg kg ⁻¹ p.s.)	0,15-0,4	Range medio per l'isola di Ustica	AA.VV., 1995
	30-40	Background per la piattaforma pugliese	Viel et al., 1986b
	36-38	Background per la costa Olandese	AA.VV., 1992
Pb (mg kg ⁻¹ p.s.)	140-170	Range medio per la costa del Tirreno sett.	Cosma et al., 1993
	8-40	Range medio per Kalamata (Grecia)	UNEP, 1990
	10-28	Range medio del largo per il Mediterraneo	UNEP, 1990
	17 -35	Background per la costa Norvegese	AA.VV., 1992
	18 -29	Range medio per l'isola di Ustica	AA.VV., 1995
	30	Background per la piattaforma pugliese	Viel et al., 1986b
	34 -40	Background per la costa Olandese	AA.VV., 1992
27	Laguna Veneta prima dell'industrializz.	Marcomini et al., 1987; Pavoni et al., 1987	
Σ IPA (ng g ⁻¹ p.s.)	0-80	Range per la Baia di Carini (Sicilia)	Romano et al., 1998
	250	Valore medio della costa di Bari	De Simone e Massimino, 1986
	218-433	Range tra Tirreno sett. e Mar Ligure	Pinto et al., 1995
(BaP) (ng g ⁻¹ p.s.)	3,1	Background prima del 1825	AA.VV., 1992
	10 -20	Livello naturale di origine biologica	Cannarsa et al., 1989
Σ PCB (ng g ⁻¹ p.s.)	200	Livelli medi della costa pugliese	De Simone e Massimino, 1986

Tab. 6 – Esempi di range di riferimento relativi a zone costiere europee e del Mediterraneo.

Tutto ciò ha lo scopo di giustificare il loro utilizzo come campioni naturali di riferimento “relativamente incontaminati” per individuare la tossicità di fondo presente, mediamente, in diversi tipi di sedimenti superficiali delle coste italiane; allo stesso tempo conferma la difficoltà oggettiva di reperire sulla piattaforma continentale italiana sedimenti superficiali realmente incontaminati.

Nelle PCA delle figure 1 e 2 vengono visualizzate le relazioni tra i parametri considerati nelle aree A e B, mentre la tabella 7 riporta le percentuali di varianza spiegate da ogni variabile relativamente alle prime due componenti principali. I grafici si riferiscono a due aree mineralogicamente assai diverse. La letteratura, infatti, rivela che i sedimenti della piattaforma costiera compresa tra il Tirreno settentrionale e il Mar Ligure è costituita prevalentemente da quarzo, feldspati e calcite come minerali principali, da illite, clorite e caolinite come minerali argillosi (Leoni *et al.*, 1992; Immordino e Setti, 1993; Ferretti *et al.*, 1995); i sedimenti della piattaforma pugliese, invece, sono ricchi di calcite e aragonite di origine biologica (Galignani, 1973; Viel *et al.*, 1986a). Ciò spiega la diversa posizione relativa dei metalli, ad eccezione del nichel, probabilmente uno degli elementi più importanti nella composizione della pelite di entram-

be le zone. Nonostante tale differenza mineralogica e le diverse caratteristiche chimiche (tabelle 2 e 3), si evidenzia in entrambe le aree indagate una stretta relazione tra l'effetto sul Microtox® in fase solida e il contenuto in pelite di tali campioni assunti come riferimenti naturali. Inoltre, la correlazione altamente significativa tra questi parametri rivelata dal test di Spermann ($r = 0,900$ con $P = 0,0002$ per l'area A; $r = 0,809$ con $P = 0,002$ per l'area B), suggerisce che la frazione granulometrica < 63 mm (pelite) rappresenta, tra quelli considerati, il parametro descrittore più appropriato del comportamento della tossicità naturale nel test SPT.

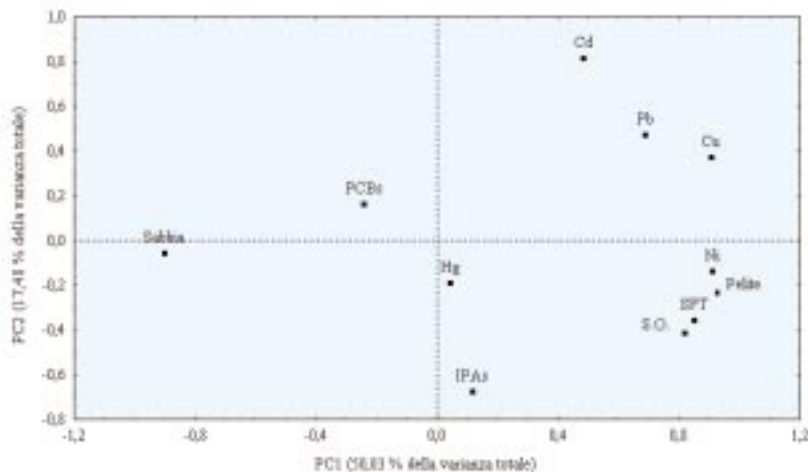


Fig. 1 - PCA relativa ai parametri considerati riferita all'Area A (Tirreno settentrionale).

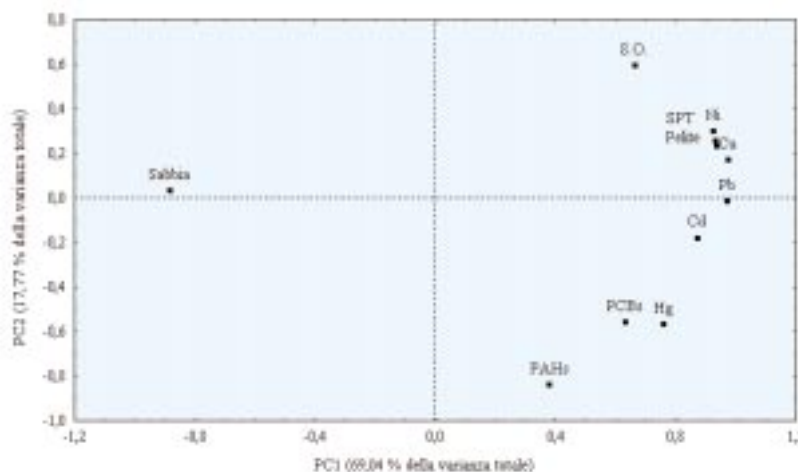


Fig. 2 - PCA relativa ai parametri considerati riferita all'Area B (Adriatico meridionale).

Variabile	AREA A		AREA B	
	PC 1 varianza (%)	PC 2 varianza (%)	PC 1 varianza (%)	PC 1 varianza (%)
Microtox®	6,588	1,155	7,896	0,610
Sabbia	7,377	0,031	7,114	0,010
Pelite	7,837	0,485	7,969	0,450
Sostanza organica	6,088	1,564	4,009	3,211
Cd	2,135	6,053	6,913	0,291
Cu	7,471	1,257	8,607	0,268
Hg	0,000	0,170	5,256	2,901
Ni	7,552	0,176	7,755	0,811
Pb	4,304	2,033	8,599	0,002
Σ IPA	0,017	4,168	1,311	6,372
Σ PCB	0,529	0,236	3,618	2,803
Totale	49,898	17,328	69,047	17,729

Tab. 7 - Percentuali di varianza spiegate da ogni variabile nell'analisi multivariata (PCA).

Questo risultato è in buon accordo con altri recenti studi circa la relazione tra la riduzione della bioluminescenza batterica e il contenuto in silt-argilla, secondo i quali essa è funzione della dimensione media dei granuli di sedimento e quindi della superficie totale offerta dalla frazione fine all'adesione dei batteri. Tali studi, tuttavia, sono riferiti a sedimenti dulciacquicoli e/o artificiali (Benton *et al.*, 1995; Ringwood *et al.*, 1997). Pertanto, considerato che la frazione < 63 μ m tende ad essere associata con i contaminanti eventualmente presenti (Allen Burton, 1991), sono state individuate le relazioni tra tossicità acuta e contenuto pelitico nei sedimenti naturali delle due principali aree di riferimento (A e B). I modelli con i relativi coefficienti di correlazione (figure 3 e 4) sono risultati molto significativi:

- $f_{(A)}$: $Y = 9,833 + 2,537 X$; con $t = 8,429$ e $P < 0,01$;
- $f_{(B)}$: $Y = 2,389 + 2,747 X$; con $t = 6,728$ e $P < 0,01$.

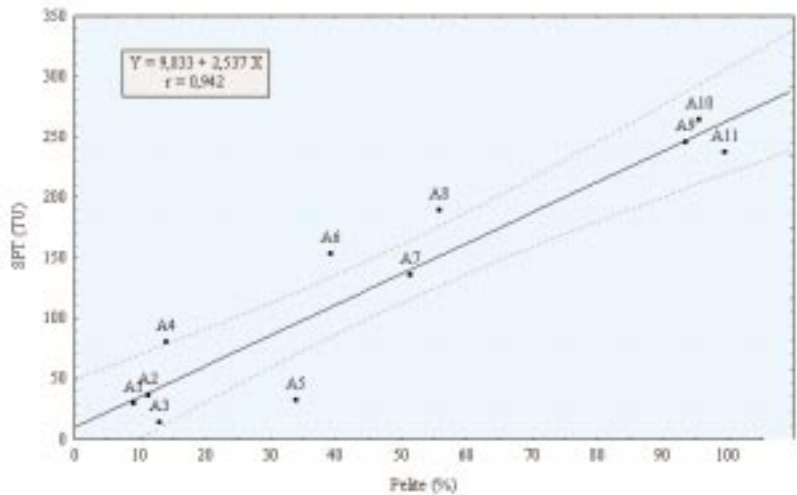


Fig. 3 - Regressione lineare con il relativo range di confidenza al 95% riferito all'Area A.

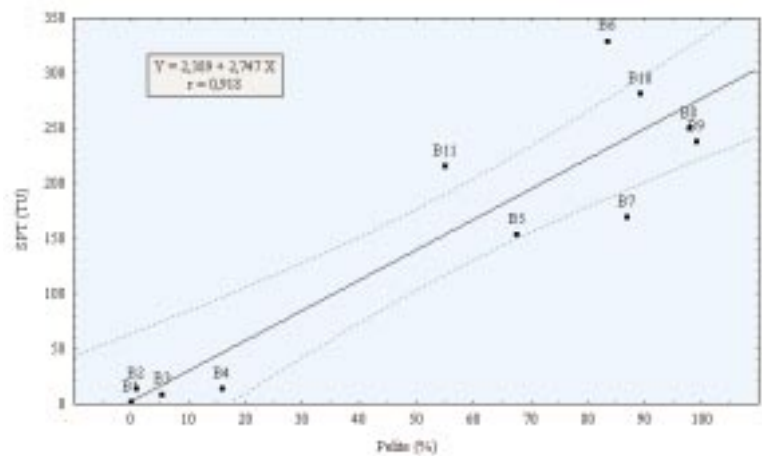


Fig. 4 - Regressione lineare con il relativo range di confidenza al 95% riferito all'Area B.

Inoltre il test U di Mann-Whitney applicato ai rapporti tra tossicità naturale e pelite nelle due aree di riferimento non ha mostrato differenze significative ($Z = 0,387$; $P = 0,699$), confermando che la relazione esistente tra questi parametri è indipendente dalla composizione mineralogica.

L'andamento sostanzialmente uguale delle due funzioni $f_{(A)}$ e $f_{(B)}$ ci permette di generalizzare la relazione tra tossicità naturale e frazione pelitica in un unico modello, comprendente anche i dati relativi alle aree C e D (figura 5).

Tale modello, altamente significativo ($f_{(C)}$: $Y = 0,285 + 2,728 X$; $t = 10,305$ con $P < 0,01$ e con un errore standard di 111,29 TU), descrive in maniera semplice e sufficientemente accurata da un punto di vista applicativo il comportamento della tossicità naturale sulla base di un unico parametro (la pelite), peraltro di facile determinazione. Ciò consente di valutare in misura più oggettiva la tossicità acuta di sedimenti presumibilmente contaminati, stimandone la "componente naturale complessiva" e avviando, così, a tutte le problematiche connesse alla quantizzazione dei singoli fattori distorsivi.

A questo punto il modello di normalizzazione pelitica ($f_{(C)}$) può essere utilizzato come criterio di base per lo sviluppo di un indice di tossicità applicato a sedimenti di origine portuale. Considerando l'errore stati-

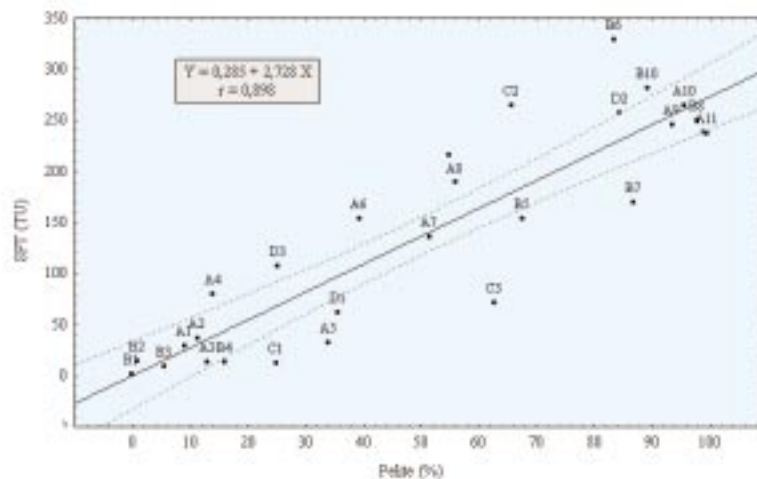


Fig. 5 – Modello generale di normalizzazione pelitica con il relativo range al 95% riferito a tutte le aree indagate.

stico, infatti, il limite superiore del range di confidenza al 95% stimato tramite il modello $f_{(C)}$ può essere assunto come soglia di tossicità. A partire dal concetto RTR (Ratio To Reference), inteso come rapporto tra tossicità del campione e tossicità del riferimento, è possibile stabilire una scala di tossicità dove al denominatore viene posta la soglia stimata tramite il modello di normalizzazione pelitica e utilizzando un criterio geometrico per la suddivisione nelle varie classi di qualità.

Campione portuale	AT				Pelite (%)	NET	
	Tossicità Apparente (TU)	Range di confidenza al 95% (TU)	Slope	R ²		Tossicità Naturale Stimata (TU)	Range di confidenza al 95% stimato (TU)
V1	1949,54	1736,28-2189,06	1,163	0,999	92,96	253,88	184,72-323,04
V2	2432,16	2332,98-2535,51	1,088	0,999	87,00	237,62	174,16-301,08
V3	873,55	859,69-887,62	1,569	1	99,72	272,32	196,31-348,33
P1	244,99	221,43-271,06	1,217	0,998	54,81	149,81	106,18-193,44
P2	2024,18	1899,19-2157,23	1,417	0,999	80,66	220,32	162,47-278,18
P3	3217,55	3022,74-3424,91	1,593	1	85,37	233,17	171,21-295,14
P4	4240,23	3978,67-4518,98	1,417	0,998	92,95	253,85	184,71-322,00
L1	1659,42	1319,57-2086,78	2,689	0,991	88,90	242,80	177,57-308,04
L2	2316,72	2118,91-2532,00	2,100	0,998	87,53	239,07	175,12-303,01
L3	4622,20	4034,44-5295,58	0,887	0,998	46,95	128,36	84,92-171,81
L4	1475,03	1240,69-1753,63	1,285	0,989	52,98	144,81	101,43-188,20

Tab. 8 (sopra) – Caratteristiche tossicologiche e tessiturali dei campioni portuali testati (V: Viareggio; P: Piombino; L: Livorno).

Tab. 9 (a destra) – Soglia di Tossicità Naturale Stimata e relativo Indice di Tossicità dei campioni portuali.

Il criterio analitico adottato per l'indice di tossicità acuta del test SPT diventa pertanto:

• STI (Sediment Toxicity Index) = $TU_{\text{campione}} / TU_{\text{soglia stimata}}$

Adottando tale criterio di valutazione i risultati tossicologici dei campioni portuali testati tramite SPT con la relativa componente naturale stimata sono riportati nella tabella 8, mentre nella tabella 9 sono illustrati i valori soglia conseguenti e l'indice di tossicità relativo (STI).

Sulla base di questi risultati gli autori propongono una scala di tossicità acuta suddivisa in 4 classi, secondo un criterio geometrico; i campioni portuali potranno, quindi, essere classificati conseguentemente (tabella 10).

Campione portuale	TT	STI
	Soglia di Tossicità (TU)	Indice di Tossicità dei Sedimenti
V1	323,04	6,03
V2	301,08	8,08
V3	348,33	2,51
P1	193,43	1,27
P2	278,18	7,28
P3	295,14	10,90
P4	323,00	13,13
L1	308,04	5,39
L2	303,01	7,65
L3	171,81	26,90
L4	188,20	7,84

Tab. 10 – Indice di Tossicità proposto per sedimenti testati tramite Microtox SPT e conseguente valutazione qualitativa dei campioni portuali.

S.T.I. (Indice di Tossicità)	Classe	Livello di Tossicità	Campione portuale
0.00-1.00	I	non tossico	-
1.01-3.00	II	lievemente tossico	P1; V3
3.01-6.00	III	mediamente tossico	L1
6.01-12.00	IV	tossico	V1; V2; P2; P3; L2; L4
> 12.00	V	molto tossico	P4; L3

Lista degli acronimi utilizzati

AT	Apparent Toxicity	EC	Effect Concentration	NET	Natural Estimated Toxicity
PCA	Principal Component Analysis	RTR	Ratio To Reference	SPT	Solid-Phase Test
STI	Sediment Toxicity Index	TT	Toxicity Threshold	TU	Toxicity Unit

→ CONCLUSIONI

Il raggiungimento di criteri oggettivi nella descrizione e valutazione sia chimica che ecotossicologica della qualità dei sedimenti necessita urgentemente dell'individuazione e caratterizzazione a livello nazionale di appropriate aree costiere da utilizzare come riferimento.

Il test Microtox® in fase solida è un saggio biologico senz'altro utilizzabile a tal fine, in quanto possiede il grande vantaggio di misurare la tossicità dell'intero sedimento e non di frazioni o estratti di esso (Brouwer *et al.*, 1990). Tuttavia, l'applicazione a sedimenti marini richiede alcune opportune modifiche del protocollo SPT che tengano conto della origine ma soprattutto della granulometria dei campioni. La frazione pelitica, infatti, indipendentemente dalla sua natura mineralogica, costituisce il più importante parametro descrittore della tossicità naturale. Il modello di normalizzazione pelitica sviluppato rappresenta un criterio semplice, fruibile e nello stesso tempo oggettivo, in quanto sostenuto da un buon supporto statistico, applicabile alla valutazione della reale tossicità acuta di campioni contaminati, in alternativa all'utilizzo del SW di correzione dei dati di riferimento. La sua applicazione potrebbe essere particolarmente vantaggiosa quando i campioni di riferimento, definiti come "... sedimenti dotati di caratteristiche simili a quelle del campione da testare ma senza contaminanti di origine antropica" (Allen Burton, 1991), non siano disponibili.

→ RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano Giuseppina Ciuffa e Francesco Mellara rispettivamente dell'ICRAM di Roma e del CIBM di Livorno per la preziosa collaborazione nelle analisi chimiche.

BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. (1992) *Background concentrations of natural compounds*. Directorate General of Public Works and Water Management, Report DGW-92.033. R.W.P.M. Laane (Eds.), The Netherlands, 84 pp.
- AA.VV. (1995) *Studio sulle caratteristiche granulometriche, la distribuzione dei metalli in traccia e l'attività batterica nei sedimenti dei fondali della riserva naturale marina Isola di Ustica*. Relazione tecnica ICRAM, 125 pp.
- Allen Burton, G. Jr. (1991) *Assessing the toxicity of freshwater sediments*. Environ. Toxicol. Chem., 10, 1585-1627.
- Amato, E., Cicero A.M., Di Muccio A., Morlino R., R. Tortora. (1989) *Contaminanti organici persistenti in foga di Weddel (Leptonichotes weddellii) - Terra Nova Bay - Antartide*. Atti del XXI Congresso della SIBM. Nova Thalass., 623-626.
- Azur Environmental (1994a) *Microtox® Acute Toxicity Solid-Phase Test Procedure*, 20 pp.
- Azur Environmental (1994b) *Microtox® Acute Toxicity Basic Test Procedures*, 63 pp.
- Becker, S., Billyard G.R., T.C. Ginn (1990) *Comparisons between sediment bioassays and alternatives of benthic macroinvertebrate assemblages at a marine superfund site, Commencement Bay, Washington*. Environ. Toxicol. Chem., 9, 669-685.
- Benton, M.J., Malott M.L., Knight S.S., Coopers C.M., Benson W.H. (1995) *Influence of sediment composition on apparent toxicity in a Solid-Phase Test using bioluminescent bacteria*.

- Environ. Toxicol. Chem., 14, 411-414.
- Brouwer, H., Murphy T., L. McArdue (1990) *A sediment-contact bioassay with Photobacterium phosphoreum*. Environ. Toxicol. Chem., 9, 1353-1358.
 - Bulich, A.A., M.W. Greene, S.R. Underwood (1992) *Measurement of soil and sediment toxicity to bioluminescent bacteria when in direct contact for a fixed time period*. Water Environment Federation, 65th Annual Conference & Exposition. 20-24 Settembre 1992, New Orleans, Louisiana, USA, 52-63.
 - Byers, S.C., Mills E.L., P.L. Stewart (1978) *A comparison of methods of determining organic carbon in marine sediments, with suggestions for a standard method*. Hydrobiol., 58, 43-47.
 - Campbell, M., Bitton G., Koopman B., Delfino J.J. (1992) *Preliminary comparison of sediment extraction procedures and exchange solvents for hydrophobic compounds based on inhibition of bioluminescence*. Environ. Toxicol. Water Qual., 7, 329-338.
 - Campi, F., Niccolai I., Tucci S., Sgorbini S. (1989) *Dispersione e geochimica dei sedimenti superficiali nel Mar Ligure (Varazze-Capo Noli)*. In: ENEA (Eds.) Studi ambientali dell'area costiera di Vado Ligure. ENEA, Roma, 61-84.
 - Cannarsa, S., Bruner T., Mangani F., Crescentini G. (1989) *Microinquinanti organici e loro distribuzione nell'areale marino di Vado Ligure*. In: ENEA (Eds.) Studi ambientali dell'area costiera di Vado Ligure. ENEA, Roma, 85-102.
 - Carr, R.S., Chapman D.C., Howard C.L., Biedenbach J.M. (1996) *Sediment quality triad assessment survey of the Galvestone Bay, Texas system*. Ecotoxicology, 5, 341-364.
 - Chapman, P.M. (1990) *The Sediment Quality Triad approach to determining pollution-induced degradation*. Sci. Tox. Environ., 97, 815-825.
 - Chapman, P.M., R.N. Dexter, E.R. Long (1987) *Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 37, 75-96.
 - Chapman, P.M., M.D. Paine, A.D. Arthur, L.A. Taylor (1996) *A triad study of sediment quality associated with a major, relatively untreated marine sewage discharge*. Mar. Pollut. Bull., 32, 47-64.
 - Cosma, B., M. Drago, M. Piccazzo, S. Tucci (1993) *Heavy metals in high Tyrrhenian Sea sediments: distribution of Cr, Cu, Ni and Mn in superficial sediments*. In: ENEA (Eds) Arcipelago toscano. Serie Studi Ambientali, 65-77.
 - De Simone, R., U. Massimino (1986) *Idrocarburi policiclici aromatici ed organoclorurati nei sedimenti superficiali della piattaforma pugliese*. In: ENEA (Eds.) Indagine Ambientale del sistema marino costiero della regione Puglia. ENEA, Centro Ricerche Energia Ambiente, S. Teresa (SP), 185-195.
 - Di Muccio, A., A. Santilio, R. Dommarco, M. Rizzica, L. Gambetti, A. Ausili, F. Vergori (1990) *Behavior of 23 persistent organochlorine compounds during sulphuric acid cleanup on solid matrix column*. J. Chromatog., 513: 333-337.
 - Elnabarawy, M.T., R.R. Robideau and S.A. Beach. 1988. *Comparison of three rapid toxicity test procedures: Microtox®, Polytox® and Activated Sludge Respiration Inhibition*. Toxicity Assess., 3: 361-370.
 - Ferretti, O., F. Immordino, F. Manfredi Frattarelli. 1995. *Carta sedimentologica dei mari toscani*. Soc. Tosc. Sc. Nat. Mem., Serie A, Suppl. 102.
 - Galignani, P. 1973. *I sedimenti della piattaforma continentale pugliese da Bari a Torre Canne*. Giornale di Geologia, 1(39): 215-231.
 - Greene, J.C., W.E. Miller, M.K. Debacon, M.A. Long and C.L. Bartels. 1985. *A comparison of three microbial assay procedures for measuring toxicity of chemical residues*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14: 659-667.
 - Griest, W.H. and S.E. Caton. 1983. *Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons for quantitative analysis*. In: Bjorseth (Eds.), Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel: 95-148.
 - Ho, K.T.Y and J.G. Quinn. 1993. *Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity, as evaluated by Microtox®*. Environ. Toxicol. Chem., 12: 615-625.
 - Immordino, F., M. Setti. 1993. *Caratterizzazione granulometrica e mineralogica dei sedimenti superficiali marini dell'alto Tirreno tra La Spezia e Livorno*. In: ENEA (Eds) Arcipelago toscano. Serie Studi Ambientali: 51-64.
 - Jacobs, M.W., J.A. Coates, J.J. Delfino, G. Bitton, W.M. Davis, K.L. Garcia. 1993. *Comparison of sediment extract Microtox® toxicity with Semi-Volatile organic priority pollutant concentrations*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 24: 461-468.
 - Leoni, L., F. Sartori, A. Batistoni, P. Cortopassi. 1992. *Contributo allo studio del trasporto e della distribuzione dei sedimenti recenti nell'alto Tirreno-Mar Ligure (Bacino compreso tra La Spezia e Livorno): dati granulometrici, mineralogici e chimici*. Atti Soc. Tosc. Sc. Nat., Mem., Serie A, 99: 109-151.
 - Long, E.R. and P.M. Chapman. 1985. *A Sediment Quality Triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound*. Mar. Pollut. Bull., 16: 495-415.
 - Marcomini, A., A. Svriso e B. Pavoni. 1987. *Variable wavelength absorption in detecting environmentally relevant PAHs by HPLC*. Mar. Chem., 21: 15-23.
 - Munkittrick, K.R., E.A. Power and G.A. Sergy. 1991. *The relative sensitivity of Microtox®, Daphnid, Rainbow Trout and Fathead Minnow acute lethality tests*. Environ. Toxicol. Water Qual., 6: 35-62.
 - Nacci, D., E. Jackim and R. Walsh. 1986. *Comparative evaluation of three rapid marine toxicity test: Sea Urchin early embryo growth test, Sea Urchin sperm cell toxicity test and Microtox®*. Environ. Toxicol. Chem., 5: 521-525.
 - Pavoni, B., A. Svriso e A. Marcomini. 1987. *Concentration and flux profiles of PCBs, DDTs and PAHs in dated sediment core from the Lagoon of Venice*. Mar. Chem., 21: 25-35.
 - Peltier, W.H. and C.I. Weber. 1985. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organism*. EPA/600/4-85/013.

- Pinto, B., D. Pellegrini, M. Gabellini and A. Ausili. 1995. *Harbour and coastal sediments chemistry and toxicity: a preliminary study in dredging activities*. J. Aquat. Ecos. Health, 4: 1-7.
- Romano, E., M. Gabellini, D. Pellegrini, A. Ausili, F. Mellara. 1998. *Metalli in tracce e contaminanti organici nei sedimenti provenienti da differenti aree marine costiere in relazione alla movimentazione dei fondali*. In: M. Piccazzo (Eds). Atti 12° Congresso dell'Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia. 18-21 settembre 1996, Isola di Vulcano, II: 473-486.
- Ringwood, A.H., M.E. DeLorenzo, P.E. Ross and A.F. Holland. 1997. *Interpretation of Microtox® Solid-Phase toxicity tests: the effect of sediment composition*. Environ. Toxicol. Chem., 16: 1135-1140.
- Qureshi, A.A., K.W. Flood, S.R. Thompson, S.M. Janhurst, C.S. Innisand and D.A. Rokosh. 1982. *Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassay for determining toxicity of pure compounds and complex effluents*. In: J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop (Eds.). Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference. ASTM STP 766: 179-195.
- Salizzato, M., V. Bertato, B. Pavoni, A. Volpi Ghirardini e P.F. Ghetti. 1998. *Sensitivity limits and EC50 values of the Vibrio fischeri test for organic micropollutants in natural and spiked extracts from sediments*. Environ. Toxicol. Chem., 17: 655-661.
- Toussant, M.W., T.R. Shedd, W.H. Van Der Schalie and G.R. Leather. 1995. *A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests*. Environ. Toxicol. Chem., 14: 907-915.
- Tung, K.K., G. Scheibner, T. Miller and A.A. Bulich. 1990. *A new method for testing soil and sediment samples*. SETAC Conference, Novembre 1990: 1-8.
- UNEP, 1990. *Stato dell'ambiente marino mediterraneo*. MAP Technical Report Series N. 28 United Nations Organization.
- U.S.E.P.A. 1986. *Test methods for evaluating solid waste (SW-846)*. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C.; Vol. 1B: pp. 125.
- Viel, M., V. Damiani, M. Setti. 1986a. *Caratteristiche granulometriche e composizione mineralogica dei sedimenti della piattaforma pugliese*. In: ENEA (Eds.). Indagine Ambientale del sistema marino costiero della regione Puglia. ENEA, Centro Ricerche Energia Ambiente, S. Teresa (SP): 127-144.
- Viel, M., V. Damiani, G. Zurlini, S. De Rosa. 1986b. *Geochimica degli elementi in traccia e forme del fosforo nei sedimenti della piattaforma pugliese*. In: ENEA (Eds.). Indagine Ambientale del sistema marino costiero della regione Puglia. ENEA, Centro Ricerche Energia Ambiente, S. Teresa (SP): 149-169.