

PROCEDURA OPERATIVA DEL SAGGIO IN FASE SOLIDA MEDIANTE *ALIIVIBRIO FISCHERI*

PROCEDURA OPERATIVA DEL SAGGIO IN FASE SOLIDA MEDIANTE ALIVIBRIO FISCHERI

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132. Le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo quaderno.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Quaderni Laboratorio 4/2021
ISBN 978-88-448-1076-4

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

Grafica di copertina:

Alessia Marinelli - ISPRA – Area Comunicazione Uff.Grafica

Foto di copertina: Gianluca Chiaretti

ISPRA – ECO CN-LAB

Coordinamento pubblicazione online:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

13/10/2021

Autori

Fulvio ONORATI (ISPRA), Gianluca CHIARETTI (ISPRA), Cristina Martone (ISPRA), Sabrina Barbizzi (ISPRA), Paolo de Zorzi (ISPRA)

COLLABORATORI

Raffaela CARDENTE (Ecotox L.d.s.), Marta ULTRE (Ecotox L.d.s.),
Alessandra ARIZZINOVELLI (ARTA Abruzzo), Fabrizio PERIN
(CONSULA AMBIENTE), Giuseppe D'ERRICO (UNIV. POL. MARCHE),
Veronica PIAZZA (IAS-CNR)

INDICE

INTRODUZIONE	6
1. STUDIO DI PREVALIDAZIONE DEL PROTOCOLLO OPERATIVO	7
1.1 ORGANIZZAZIONE DELLO STUDIO DI PREVALIDAZIONE	7
1.2 MATERIALI E METODI IMPIEGATI NELLO STUDIO DI PREVALIDAZIONE.....	8
1.3 RISULTATI DELLO STUDIO DI PREVALIDAZIONE	9
2. STUDIO COLLABORATIVO SCO09.....	10
2.1 ORGANIZZAZIONE DELLO STUDIO COLLABORATIVO.....	10
2.2 MATERIALI E METODI IMPIEGATI NELLO STUDIO COLLABORATIVO.....	12
2.3 RISULTATI DELLO STUDIO COLLABORATIVO	13
3. PROTOCOLLO OPERATIVO PER LA CONDUZIONE DEL SAGGIO IN FASE SOLIDA.....	16
3.1 DESCRIZIONE DELLO STRUMENTO.....	16
3.2 MATERIALE DI CONSUMO.....	16
3.3 STRUMENTAZIONE	17
3.4 SOLUZIONI E REAGENTI	17
3.5 ATTIVAZIONE DEI BATTERI (FREEZE-DRIED BACTERIA)	17
3.6 VERIFICA PARAMETRI PROTOCOLLO DI LAVORO.....	18
3.7 ALLESTIMENTO DEL SAGGIO.....	19
3.8 ESECUZIONE DEL SAGGIO E LETTURA DEI DATI	20
3.10 CORREZIONE PESO SECCO	21
ALLEGATI.....	23
PREPARAZIONE DELL'ACQUA MARINA ARTIFICIALE (ASW) ISO 10253/2016.....	23

INTRODUZIONE

di Fulvio Onorati e Gianluca Chiaretti

Il DM 15 luglio 2016, n. 173 recante le “*modalità e i criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo dei fondali marini*” disciplina l'impiego e l'applicazione dei saggi biologici per la stima della qualità dei sedimenti marini da sottoporre a movimentazione. In particolare, nella tabella 2.3 dell'Allegato tecnico è annoverato tra i saggi biologici della cosiddetta 1° tipologia il test in fase solida mediante il batterio marino *Aliivibrio fischeri*.

Il test in fase solida con *A. fischeri* è certamente uno dei più versatili, veloci ed economici test ecotossicologici applicabile a matrici solide quali sedimenti di ambienti marini e dulciacquicoli, suoli e terreni ed ha il pregio di consentire un contatto diretto tra gli individui e la parte solida della matrice da saggiare. Per ciò che concerne i protocolli analitici, al di là delle procedure fornite dalle case produttrici, attualmente è disponibile il solo metodo ISO 21338:2010 (*Water quality. Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment and other solids and colour containing samples on the light emission of Vibrio fischeri (Kinetic luminescent bacteria test)*), che tuttavia prevede l'utilizzo di una soluzione di NaCl come correttore osmotico anche per campioni marini, anziché acqua di mare sintetica (Onorati e Mecozzi, 2004) e non tiene conto della granulometria del campione. È noto, infatti, che specialmente con sedimenti argillosi i batteri tendono ad essere “persi” per adesione alle particelle (Ringwood et al., 1997). Tuttavia, alcune varianti metodologiche per il *solid-phase test* (Onorati et al., 1998; Volpi Ghirardini et al., 2009), seppur con approcci diversi e riferiti ad ambienti diversi, compensano tale perdita di batteri e permettono di aumentare l'affidabilità del test tenendo conto di altri confounding factors, come la variazione di pH nella diluizione del campione di sedimento.

Alla luce di questo quadro generale, l'esigenza da parte di laboratori privati, Agenzie per l'Ambiente Regionali e Istituti di ricerca, di disporre di un metodo validato, anche ai fini del processo di accreditamento ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 e in piena applicazione delle normative nazionali quali il DM 173/2016 appare evidente.

Il presente Quaderno, facente parte della specifica collana di pubblicazioni ISPRA, vuole fornire un contributo in tal senso, descrivendo il percorso effettuato in collaborazione con altre Agenzie del SNPA, con Istituti di ricerca, Università e laboratori privati per la stesura di un protocollo operativo condiviso per l'esecuzione del test in fase solida mediante il batterio marino *Aliivibrio fischeri*.

Il percorso ha previsto essenzialmente due fasi: una prima fase di prevalidazione, circoscritta a 6 soggetti e finalizzata alla stesura di un testo procedurale condiviso; una seconda fase, in cui tale testo è stato oggetto di uno studio collaborativo, esteso a tutti i soggetti (pubblici o privati) che hanno espresso volontà di partecipazione.

1. STUDIO DI PREVALIDAZIONE DEL PROTOCOLLO OPERATIVO

di Fulvio Onorati

1.1 Organizzazione dello studio di prevalidazione

In occasione della "1° Giornata di Ecotossicologia" tenuta a Livorno il 21 novembre 2019, sono stati organizzati diversi Gruppi di Lavoro (GdL) per raccogliere e sistematizzare le esigenze operative e metodologiche in campo ecotossicologico provenienti dal mondo produttivo e di ricerca, promuovendo azioni concrete per lo sviluppo dei saggi biologici nei vari campi applicativi.

Uno di questi gruppi, costituito da 17 soggetti e coordinato da ISPRA assieme a Ecotox L.d.s. (Tabella 1.1), è stato dedicato alla organizzazione di un percorso operativo finalizzato alla definizione di un protocollo metodologico validato per l'esecuzione del saggio biologico in fase solida mediante *Alivibrio fischeri*.

Tabella 1.1 - Referenti e affiliazioni dei componenti del GdL su *A. fischeri* costituito durante la 1° Giornata di Ecotossicologia (Livorno, novembre 2019)

n.	Referenti e affiliazioni dei componenti del GdL	
	Affiliazione	Referente
1	ARTA - Abruzzo	Arizzi Novelli Alessandra
2	ARPAE - Emilia Romagna	Riccardi Elena
3		Pellegrino Cinzia
4		Martini Paola
5	ARPA - Lombardia	Romano Emanuela
6	ARPA - Puglia	Cirillo Fedelia
7	ARPAT - Toscana	Vigna Guidi Francesco
8		Terranova Giovanna
9	Bioscience Research Center	Renzi Monia
10	CIBM	Polese Sonia
11	CNR-IAMC	Donati Enrica
12	CNR-IAS	Piazza Veronica
13	Ecotox L.d.s.	Cardente M. Raffaella
14	CNR-IRSA	Mariani Livia
15	ISPRA	Bellaria Vanessa
16		Chiaretti Gianluca
17		Onorati Fulvio
18	Shoreline	Francesco Marco
19	Università Politecnica delle Marche	D'Errico Giuseppe

Il percorso concordato ha previsto due fasi essenziali. In accordo con la procedura ASTM E691 specifico per la conduzione di confronti interlaboratorio, la prima fase di prevalidazione del testo della procedura operativa (ovvero il “*pilot run*”) è stata circoscritta a un numero limitato di soggetti esperti, al fine di definire un testo condiviso che sarebbe stato successivamente oggetto di uno studio collaborativo (“*full scale*”) nella seconda fase del percorso.

I soggetti che hanno partecipato alla fase di prevalidazione sono elencati nella tabella 1.2.

Tabella 1.2 – Soggetti che hanno partecipato alla fase di prevalidazione del protocollo operativo.

REFERENTI E AFFILIAZIONI PARTECIPANTI AL PILOT RUN
<i>ARTA Abruzzo</i> <i>Consula Ambiente</i> <i>Ecotox L.d.s</i> <i>ISPRA</i> <i>Univ. Pol. Marche</i> <i>CNR-IAS</i>

1.2 Materiali e metodi impiegati nello studio di prevalidazione

Sono state utilizzate due diverse tipologie di materiali di prova: il materiale di riferimento ISPRA RMO75 e un secondo materiale denominato “*Micro Sand*”, messo a disposizione dal laboratorio accreditato Consula Ambiente (<http://www.consula.it>).

Il materiale di riferimento ISPRA RMO75, preparato dall’Area di Metrologia del Centro Nazionale per la Rete dei Laboratori dell’ISPRA, consiste in un sedimento fluviale omogeneo naturalmente contaminato, con una granulometria < 90 µm, caratterizzato per il contenuto di alcuni elementi in tracce (As, Co, Cu, Mn, Ni).

Il materiale di prova *Microsand* è costituito da sabbia fine ben calibrata (SFBC) di tipo siliceo, la cui porzione di prova è stata contaminata prima dell’esecuzione dei test mediante l’aggiunta di una soluzione di ZnSO₄ 1 g/L in modo da avere una concentrazione finale pari a 25 mg/L.

ISPRA ha provveduto alla consegna ai laboratori dei materiali di prova durante i lavori del GdL svolto in occasione della citata giornata di ecotossicologia.

Ciascun laboratorio ha ripetuto 3 volte il test sia su ISPRA RMO75, sia su *Microsand*, per un totale di 6 prove.

I laboratori hanno partecipato su base volontaria e con proprie attrezzature e risorse.

Dato il numero ridotto dei partecipanti, come parametro di riferimento per la misura della ripetibilità del metodo è stato considerato semplicemente il

coefficiente di variazione (CV %), quale rapporto tra lo scarto tipo e la media delle 3 prove eseguite su ciascun materiale di prova.

Il testo del protocollo operativo è stato sottoposto a minime revisioni di natura prevalentemente lessicale e formale al termine delle prove e dopo condivisione è stato sottoposto come testo di riferimento per lo svolgimento del successivo studio collaborativo.

1.3 Risultati dello studio di prevalidazione

I risultati delle prove effettuate sono stati espressi in due modalità differenti: come Concentrazione Efficace (EC50), ovvero la concentrazione in grado di determinare un effetto del 50 % rispetto all'end-point considerato e come Unità Tossiche che consentono di esprimere l'effetto come relazione diretta tra dose e risposta, risultanti dal rapporto $TU = 100/EC50$.

Nelle tabelle 1.3 e 1.4 sono riassunti i risultati dello studio di prevalidazione riferiti a ISPRA RMO75 e **Microsand**, rispettivamente.

Tabella 1.3 – Risultati dello studio di prevalidazione con 6 soggetti ottenuti su tre prove ripetute mediante ISPRA RMO75.

Studio di prevalidazione su RMO75						
	EC50 (%) media*	Scarto tipo (%)	CV (%)	TUmedia**	Scarto tipo (%)	CV (%)
Ripetibilità media interlaboratorio	-	-	13	-	-	10
Riproducibilità intralaboratorio	0,63	0,23	36	178	45	25

*Riferito al peso umido;

**Riferito al peso secco

Tabella 1.4 – Risultati dello studio di prevalidazione con 6 soggetti ottenuti su tre prove ripetute mediante Microsand.

Studio di prevalidazione su Microsand						
	EC50 (%) media*	Scarto tipo (%)	CV (%)	TUmedia**	Scarto tipo (%)	CV (%)
Ripetibilità media interlaboratorio	-	-	19	-	-	17
Riproducibilità intralaboratorio	15,94	9,40	59	10,4	4,0	38

*Riferito al peso umido;

**Riferito al peso secco

I risultati ottenuti dallo studio di prevalidazione ("pilot run") hanno dimostrato una facile interpretazione e applicabilità della prima versione del testo del protocollo operativo, ma con migliori termini prestazionali per il materiale

di prova ISPRA RMO75, caratterizzato da una maggiore omogeneità, frutto del processo di preparazione, e esente da variabili connesse alla tossificazione prevista invece per *Microsand*.

Conseguentemente è stato necessario apportare solo delle minime revisioni del testo originale alla base del protocollo definitivo riportato nel Cap. 3 del presente quaderno.

2. STUDIO COLLABORATIVO SCO09

di Cristina Martone, Sabrina Barbizzi, Paolo de Zorzi, Fulvio onorati, Gianluca Chiaretti

2.1 Organizzazione dello studio collaborativo

Lo studio collaborativo, denominato ISPRA-SCO09 "*Saggio ecotossicologico con *Aliivibrio fischeri* su matrice solida*" rappresenta la seconda fase del percorso di stesura di un testo procedurale condiviso per l'esecuzione dello specifico test in fase solida ed è stato finalizzato a porre a confronto i risultati di misure ecotossicologiche eseguite su materiali di prova dai laboratori partecipanti e alla validazione di un metodo per la conduzione del saggio biologico con *Aliivibrio fischeri*.

Lo Studio, rientrando nella pianificazione SNPA nel periodo 2020-21 di confronti interlaboratorio e studi collaborativi approvata dalla Rete dei Referenti RR-TEM IV/O1 "*Confronti Interlaboratorio*", ha avuto carattere sperimentale ed è stato organizzato al fine di agevolare l'applicazione di quanto previsto dall'Allegato tecnico al D.M. 173/2016 (*Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini*), nell'ambito dell'applicazione dei saggi biologici a sedimenti marini, sulla base delle esigenze condivise emerse in occasione della "*1a Giornata di ecotossicologia applicata*" (Livorno, novembre 2019).

A tale iniziativa, organizzata dall'Area Metrologia Ambientale e dall'Area Ecotossicologia del Centro Nazionale per la rete Nazionale dei Laboratori ISPRA, hanno partecipato laboratori di istituzioni pubbliche (ISPRA, ARPA/APPA, Università e altri Istituti di Ricerca) e private (Tabella 2.1).

*Tabella 2.1- Partecipanti allo Studio collaborativo "Saggio ecotossicologico con *Aliivibrio fischeri* su matrice solida"*

Istituzione-Servizio	Nominativo Referente
ARPA Sicilia	G. Marino
Bioscience Research Center - Lab Ecotossicologia	Francesca Provenza
ARPAE Emilia Romagna - Laboratorio Multisito Ravenna	Fabrizio Bandini

ARPAM Dipartimento di Macerata	Tristano Leoni
ARPA FVG - LABORATORIO UNCO REGIONALE – UDINE	Chiara Suraci
ARPAT - U.O. BIOLOGIA AVL PISA	Gioia Benedettini
ARPA Calabria - CRSM – Centro Regionale Strategia Marina	Cellini Emilio/Stefanizzi Francesca
ENEA - SSPT PROTER	Sonia Manzo
Istituto Superiore di Sanità - Reparto Ecosistemi e Salute	Camilla Puccinelli, Stefania Marcheggiani
Consula Sas di Perin Fabrizio & C.	Fabrizio Perin
Università degli Studi di Napoli Federico II – Dip. di Biologia	Marco Guida, Giovanni Libralato, Antonietta Siciliano
NATURA SRL	Carlo Ferone
CADA Chimica Applicata depurazione Acque	Di Leonardo Vita Alessandra
C.I.B.M. - Ecotossicologia	Ludmila Kozinkova
APPA Bolzano, Laboratorio biologico	Maddalena Casera
ARPA PUGLIA - DAP BARI	Marina Mariani
Università Politecnica delle Marche Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente	Francesco Regoli, Giuseppe d'Errico
Biochemie Lab S.r.l.	Paolo Fastelli
Agrolab Italia SRL	Asnicar Samuele
L.A.V. S.R.L.	Cristiana Montanari
Gruppo CSA S.p.A	Roberto Giani
ARPAE- Struttura oceanografica DAPHNE	Paola Martini
ARPA Veneto - Dipartimento Regionale Laboratori – Venezia- Mestre	Stefano Comin, Chiara Zacchello
ARPAB - CRM	Teresa Trabace, Annunziata Marraudino, Giovanna Filippo
Shoreline Trieste	Marco Francese
Thetis SPA Venezia	Rita Lorè
ARTA Abruzzo	Alessandra Arizzi Novelli
ECOTOX	Roberta Miroglio
CNR IAS Genova	Veronica Piazza
ISPRA	Gianluca Chiaretti

Lo studio ha previsto la determinazione dell'inibizione della bioluminescenza del batterio *Aliivibrio fischeri* esposto ad un materiale di riferimento denominato ISPRA RMO75 (Figura 2.1).



Figura 2.1 – Unità di materiale di riferimento ISPRRA RMO7

Dallo studio sono state acquisite informazioni circa il grado di dispersione dei risultati forniti dai laboratori coinvolti.

2.2 Materiali e metodi impiegati nello studio collaborativo

Materiale di prova e proprietà di interesse

Come materiale di prova per l'esecuzione dei saggi ecotossicologici con *Allivibrio fischeri* è stato utilizzato un materiale solido naturalmente contaminato, denominato ISPRRA RMO75.

Lo studio ha previsto la determinazione di alcuni parametri necessari alla valutazione delle caratteristiche di prestazione del saggio e alla verifica delle modalità di esecuzione dello stesso. Nello specifico:

- valore di EC50 a 10 minuti, espresso in percentuale; il valore dei relativi limiti fiduciali e del coefficiente R2;
- valore di TU50 con i relativi limiti fiduciali;
- rapporto PS/PU (peso secco/peso umido).

In particolare, i valori di EC50 forniti dai laboratori sono stati elaborati al fine di ottenere valutazioni di ripetibilità e riproducibilità del metodo.

Esecuzione del saggio

I saggi ecotossicologici sono stati eseguiti dai laboratori sulla base delle indicazioni riportate dal protocollo dello studio collaborativo ISPRRA SC009, fornito dagli organizzatori all'atto dell'adesione.

Per l'esecuzione del saggio i partecipanti hanno seguito le indicazioni riportate nell'Allegato al protocollo dello studio collaborativo, denominato "*Procedura operativa per l'esecuzione del saggio biologico su matrice solida con il batterio Allivibrio fischeri (Solid-Phase Test)*" (Cap. 3).

I laboratori hanno eseguito complessivamente sei (6) prove, suddivise in due gruppi di 3 saggi ciascuno, secondo le seguenti specifiche:

- esecuzione del saggio in successione per 3 volte su 7 g di campione di prova in 35 mL di acqua di mare sintetica;
- ripetizione dell'operazione come sopra su una seconda aliquota di 7 g di campione di prova in 35 mL di acqua di mare sintetica.

I dati sperimentali, unitamente ad alcune informazioni relative alle modalità di esecuzione e ai criteri di validità dei saggi, sono stati restituiti all'organizzatore dai laboratori partecipanti mediante la "Scheda Risultati" entro i termini temporali definiti nel calendario delle attività riportato nel protocollo dello studio.

Elaborazione statistica

L'elaborazione statistica dei risultati di EC50 (%) forniti dai laboratori partecipanti è stata effettuata utilizzando modelli appropriati ai saggi ecotossicologici ed in conformità alla Norma UNI ISO 5725-2:2004.

Per la valutazione dei parametri prestazionali di ripetibilità e riproducibilità del metodo analitico sono state calcolate, secondo la Norma citata, le seguenti statistiche:

- s_L^2 stima della varianza tra laboratori;
- s_W^2 stima della varianza intralaboratorio;
- s_r^2 media aritmetica delle varianze intralaboratorio (escludendo eventuali outlier);
- s_R^2 stima della varianza di riproducibilità: $s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$

Per verificare la coerenza dei dati sono state utilizzate le statistiche h e k di Mandel: la prima (h) valuta la variabilità tra i laboratori e la seconda (k) valuta la variabilità all'interno dei singoli laboratori. I valori critici della statistica h dipendono dal numero di laboratori partecipanti allo studio, mentre i valori critici della statistica k dipendono dal numero di laboratori e dal numero di repliche effettuate da ogni laboratorio.

I valori di EC50 sono stati sottoposti al test per la verifica della normalità (Kernel density, KDE).

Inoltre, è stato applicato sull'intera popolazione di risultati il test di Grubb, con procedimento iterativo, per identificare la presenza di valori anomali come gli "straggler" e gli "outlier". Infine, è stato applicato il test di Cochran per la verifica dell'omogeneità della varianza all'interno dei laboratori partecipanti.

2.3 Risultati dello studio collaborativo

In tabella 2.2 si riportano i risultati dell'elaborazione statistica effettuata sui dati di EC50 (%) forniti dai laboratori partecipanti relativi ai valori espressi in termini di peso secco (PS).

Tabella 2.2 – Quadro riepilogativo dei risultati delle elaborazioni statistiche effettuate sui dati di EC50 (%) trasmessi dai laboratori partecipanti.

RISULTATI ELABORAZIONI STATISTICHE	
Numero di laboratori partecipanti	28
Numero di repliche per ciascun laboratorio	6
s _r % (ripetibilità intralaboratorio)	16,5
s _R % (riproducibilità)	24,9

Nelle figure 1 e 2 si riportano i grafici dei risultati dei laboratori partecipanti relativi ai valori espressi in termini di peso secco. In figura 3 viene riportata in forma grafica la distribuzione dei valori di EC₅₀(%) forniti dai laboratori con le relative barre di incertezza associata.

Figura 2.1 - Statistica h con valore critico del 5 % (linea blu) e valore critico del 1 % (linea rossa)

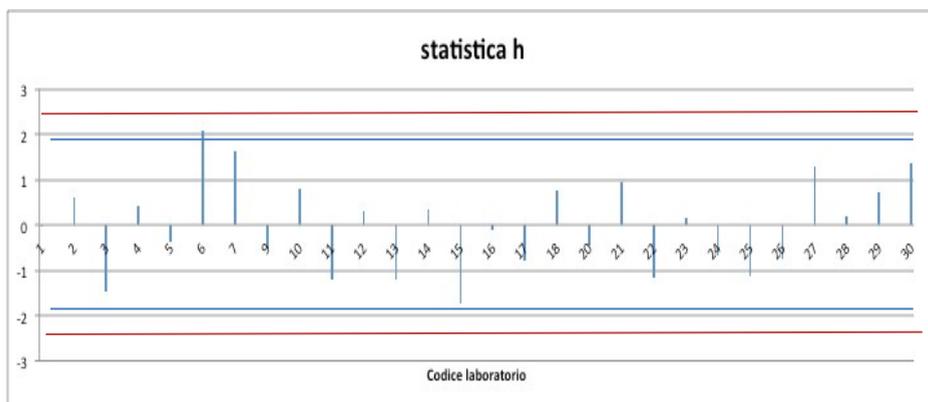


Figura 2.2 - Statistica k con valore critico del 5 % (linea blu) e valore critico del 1 % (linea rossa)

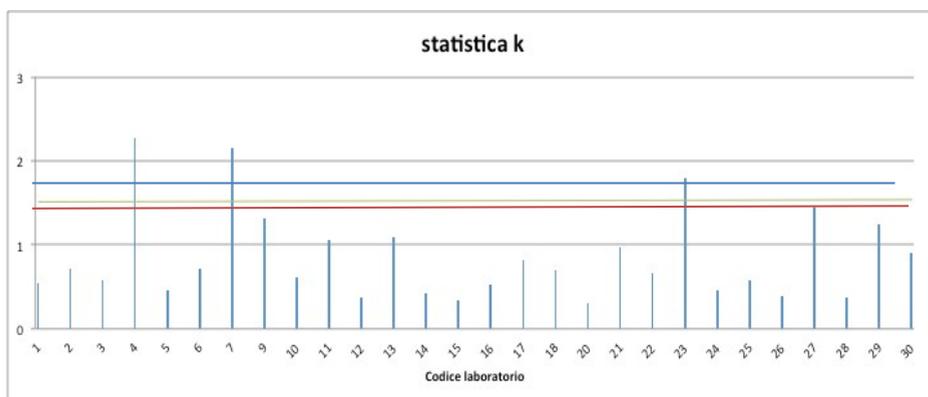
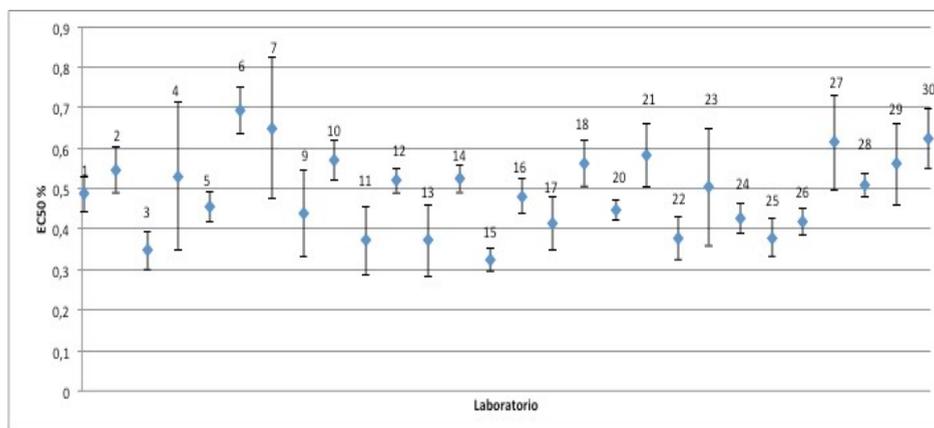


Figura 3: Grafico dei valori di EC50(%) dei laboratori con le relative barre corrispondenti allo scarto tipo su 6 misure.



L'esito dello studio collaborativo ha evidenziato caratteristiche positive di prestazione della procedura sottoposta a studio, con valori di ripetibilità prossimi al 16 % e di riproducibilità inferiori al 25 %.

I valori di ripetibilità e riproducibilità, in particolare considerando il complesso ambito delle misure in campo biologico, hanno mostrato una buona capacità dei laboratori nel replicare le misure su un materiale con caratteristiche intrinseche di omogeneità, legata anche alla granulometria inferiore a 90 μm .

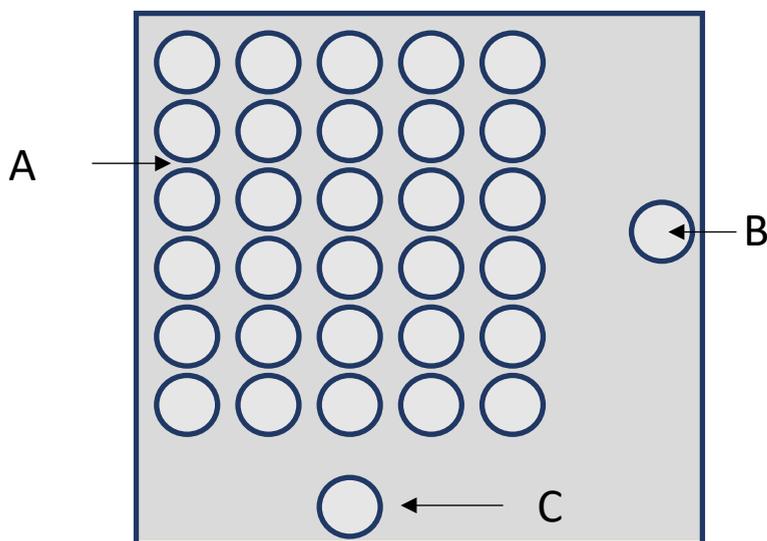
Lo studio collaborativo ha quindi dimostrato le buone prestazioni della procedura operativa utilizzata per la conduzione del saggio con *A. fischeri* per l'analisi della matrice solida, confermando che tale procedura può essere impiegata efficacemente in applicazione dell'Allegato tecnico al DM 173/2016, pur tenendo conto della eventuale procedura di "normalizzazione pelitica" necessaria in campioni con presenza di una frazione granulometrica > 1 mm.

3. PROTOCOLLO OPERATIVO PER LA CONDUZIONE DEL SAGGIO IN FASE SOLIDA

di Fulvio Onorati e Gianluca Chiaretti

3. MODALITÀ OPERATIVE PER IL TEST SPT

3.1 Descrizione dello strumento



L'analizzatore deve disporre di:

- un incubatore con almeno 30 pozzi termostatati a $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (A);
- un pozzetto termostatato a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per il reagente (B - pozzetto "reagent");
- un pozzetto di lettura termostatato a $15^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ (C - pozzetto "read");
- un sistema di autocalibrazione o tasto di settaggio "SET";
- indicatori di stato ed auto diagnosi;
- filtro/i e sistemi di raffreddamento;
- SW dedicato

3.2 Materiale di consumo

Per l'utilizzo dello strumento non è previsto l'uso di vetreria particolare.

Per la lettura del campione devono essere utilizzate cuvette in vetro ottico con fondo piatto, generalmente con diametro non superiore a 11 mm ed

una lunghezza di 50 mm, o comunque con caratteristiche idonee all'uso dello specifico luminometro in questa applicazione.

Per l'allestimento del saggio per l'analisi di un campione è necessario disporre di un beaker di vetro di dimensioni approssimative di 5 cm (diametro) per 9 cm (altezza) e 1 ancoretta magnetica (circa 3,5 centimetri).

Sono inoltre necessari:

- puntali monouso per micro-pipette a volume fisso o variabile in grado di prelevare volumi di 20 μL , 500 μL , 1000 μL e 1500 μL ;
- porta tubi per test in fase solida;
- sistemi tubi-filtro specifici per test in fase solida;
- spatole per pesata;
- materiale per predisporre pesate (es. fogli di alluminio, navicelle, ecc.) finalizzate al calcolo del rapporto PS/PU.

3.3 Strumentazione

Per l'esecuzione dei saggi è necessario prevedere l'uso dei seguenti strumenti:

- luminometro termostato specifico all'uso per questa applicazione;
- bagno termostato, incubatore o frigo-termostato settato a 15 °C \pm 1,0 °C;
- agitatore magnetico;
- bilancia tecnica;
- frigorifero;
- congelatore;
- stufa;
- rifrattometro/salinometro/conduktivmetro (per la verifica della salinità).

3.4 Soluzioni e reagenti

Le soluzioni e i reagenti previsti per il saggio in fase solida sono:

1. Reagent (liofilizzato batterico conservato a -20 ± 3 °C);
2. Soluzione Ricostituente per la ricostituzione dei batteri;
3. acqua marina artificiale preparata secondo la norma UNI EN ISO 11348-3:2019 al 31 ‰ almeno 24 ore prima della esecuzione del test, secondo quanto riportato in Appendice A;
4. sali per la ricostituzione dell'acqua di mare artificiale (Appendice A).

3.5 Attivazione dei batteri (freeze-dried bacteria)

1. Prima di riattivare i batteri è necessario accendere il Luminometro in modo tale che i pozzetti si stabilizzino alla temperatura di esercizio (in genere sono sufficienti 15^{min}). Il raggiungimento della temperatura di esercizio viene normalmente segnalato dallo strumento; tuttavia, è buona norma attendere almeno 30 min.

2. Prelevare 1.000 μL di soluzione ricostituente con micropipetta idonea e inserirla in una cuvetta di vetro, quindi porre la cuvetta nel pozzetto a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e attendere circa 15 min.
3. Prendere una fiala di batteri liofilizzati dal congelatore a -20°C (verificare la data di scadenza del lotto); aprire la fiala tenendola dalla parte superiore con due dita, manipolandola il meno possibile, al fine di evitare un eccessivo riscaldamento del pellet batterico.
4. Agitare delicatamente la fiala per favorire una completa omogeneizzazione del pellet batterico presente sul fondo del contenitore. I batteri sono conservati sottovuoto e il mantenimento di tale condizione è indice di buona conservazione. Non utilizzare la fiala se non sottovuoto.
5. Prendere la cuvetta con la soluzione ricostituente preraffreddata a 5°C (punto 2) e versare con movimento rapido il contenuto della cuvetta nella fiala.
6. Agitare delicatamente per circa 30 sec.
7. Versare con movimento rapido la sospensione batterica nella cuvetta. Non utilizzare mai la micropipetta per effettuare questa operazione.
8. Posizionare la cuvetta nel pozzetto a 5°C e lasciare condizionare per 30 min.

NB: la sospensione batterica deve essere utilizzata entro il tempo indicato dal produttore.

3.6 Verifica parametri protocollo di lavoro

All'interno del SW di interfaccia dello strumento, configurare il protocollo di lavoro Solid-Phase Test (SPT) secondo i seguenti parametri:

Test Setup

Number of controls	3
Control replicates	1
Number of samples	1
Sample replicates	1

1. Dilutions

Number of dilutions	9
Initial concentrations	19,737
Dilution factor	2
Concentration units	%

2. Times

Time 1	10 min.
Time 2	0
Time 3	0

Sotto la voce "*Option*" selezionare "*Calculation option*" e togliere la spunta al comando "*Use auto calc*".

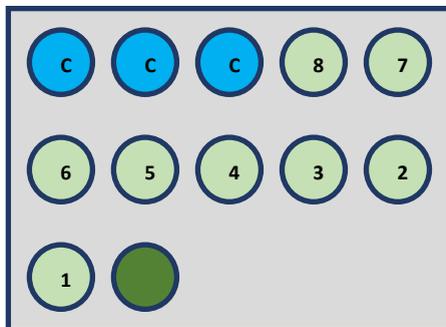
3.7 Allestimento del saggio

1. Mescolare accuratamente il campione di prova al fine di renderlo omogeneo.
2. Aggiungere 7 grammi del campione di prova all'interno di un beaker di vetro di dimensioni approssimative di circa 5 cm (diametro) per 9 cm (altezza) nel quale era stata precedentemente inserita una ancoretta magnetica (circa 3,5 centimetri).
3. Aggiungere 35 ml di acqua di mare artificiale ISO al 31 ‰ (preparata il giorno prima secondo le indicazioni dell'Appendice A) e porre ad agitare il campione così costituito per circa 20 minuti su piastra magnetica a temperatura ambiente. La velocità di rotazione dell'ancoretta deve essere tale da creare un vortice con un cono di profondità pari a circa la metà dell'altezza totale del volume del campione in agitazione.

La presente procedura prevede una configurazione del saggio con 3 controlli e 9 diluizioni.

Disporre nei pozzetti del luminometro le cuvette in vetro per la lettura come mostrato in figura 3.1.

Figura 3.1. Rappresentazione schematica della disposizione delle cuvette all'interno dei pozzetti del luminometro.



Le cuvette di colore azzurro (C) rappresentano i controlli, le cuvette di colore verde chiaro (1-8) rappresentano le diluizioni, quella di colore verde scuro il campione (tal quale) alla medesima concentrazione del campione presente nel beaker (7 g in 35 ml di acqua di mare ISO al 31 ‰).

Scansione diluizioni

1. Disporre 12 provette (quelle del sistema tubi-filtro da 10 mL) in un rack porta provette, seguendo la medesima disposizione delle cuvette nel luminometro, come da figura 3.1.
2. Inserire in tutte le provette, ad eccezione di quella contrassegnata con il colore verde scuro (campione tal quale), 1,5 ml di acqua di mare artificiale ISO al 31 ‰.

3. Prelevare 1,5 ml del campione da testare posto in agitazione nel beaker, immergendo il puntale della pipetta in prossimità del bordo esterno, a circa metà della profondità del liquido, e trasferirlo nella provetta del tal quale (colore verde scuro);
4. Successivamente e con le stesse modalità, prelevare una seconda aliquota di campione (sempre da 1,5 ml) ed inserirla nella provetta corrispondente alla posizione 1 (figura 3.1).
5. Procedere con la diluizione seriale, trasferendo 1,5 ml di campione diluito dalla provetta 1 alla 2, poi dalla 2 alla 3 e così via, fino alla provetta contrassegnata con il numero 8, scartando l'aliquota rimanente al termine del processo ed avendo cura di miscelare il contenuto di ciascuna provetta con almeno 5 pipettate in rapida successione;
6. Porre in termostato o bagno termostato a 15 °C il rack di provette per 5 minuti.

3.8 Esecuzione del saggio e lettura dei dati

1. Estrarre la cuvetta dal pozzetto reagente contenente la sospensione batterica e, delicatamente, agitarla per pochi secondi, avendo cura di non scaldarla eccessivamente con le dita della mano.
2. Con una micropipetta settata a 20 µl, prelevare la sospensione batterica ed inocularla appena sotto il pelo dell'acqua, senza immergere completamente il puntale in ciascuna provetta (del sistema tubi-filtro), cominciando dal primo controllo e procedendo verso la concentrazione maggiore.

In questa delicata fase fare attenzione a:

- non inserire completamente il puntale nella cuvetta del reagente per evitare contaminazioni;
 - sostituire il puntale tra un inoculo e l'altro;
 - immergere il puntale in ogni tubo sotto il pelo del liquido;
3. Inserire in ogni provetta un tubo-filtro fino a metà corsa; scuotere vigorosamente le provette (agitare per circa 10 volte), possibilmente tutte insieme, in modo da agitare sia la parte liquida che la parte solida; porre il rack con il set di provette+tubi-filtro in incubatore o bagno termostato a 15 °C ± 1,0 °C per 20 min.
 4. Terminata l'incubazione, spingere delicatamente i tubi-filtro in fondo alla provetta, fino alla immediata vicinanza della superficie della parte solida eventualmente decantata, assicurandosi in tal modo il passaggio all'interno del tubo-filtro della sola parte di sospensione liquida.
 5. Avviare il test tramite il software dedicato (settato in precedenza secondo la configurazione con 3 controlli e 8 diluizioni (Par. 3.6);
 6. Contemporaneamente e con regolarità iniziare a trasferire 500 µl del contenuto delle provette nelle corrispondenti cuvette di vetro per la lettura (già disposte nei pozzetti del luminometro e termostatate, come indicato in figura 3.1), a partire dal primo controllo;

7. Una volta completato il trasferimento, avviare il SW e attendere la scadenza del conto alla rovescia.
8. Alla scadenza dei 10 min. se richiesto, fare il settaggio dello strumento ed effettuare le letture secondo le indicazioni del software, partendo dalla prima provetta in alto a sinistra (prima provetta di controllo) e procedendo verso la provetta contenente il campione tale quale (in verde scuro nella fig. 3.1).
9. Completata la lettura di tutte le cuvette, effettuare il salvataggio dei dati.

3.9 Risultati

Al termine della lettura di tutte le cuvette procedere con la stima della EC_{50} e delle TU_{50} (con i relativi limiti fiduciali) e del coefficiente R^2 .

3.10 Correzione peso secco

Per la correzione dei risultati ottenuti rispetto al contenuto di acqua, pesare in un contenitore idoneo una aliquota omogenea di campione di prova di almeno circa 5 gr ma possibilmente di 15 gr ed incubare in stufa a 105 °C per 24 h.

Calcolare il rapporto Peso secco/peso umido (PS/PU) al netto della tara del contenitore:

$PS/PU = (\text{peso lordo secco} - \text{peso contenitore}) / (\text{peso lordo umido} - \text{peso contenitore})$

BIBLIOGRAFIA

ASTM E691 – 20. Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method.

ONORATI F., PELLEGRINI D., AUSILI A., 1998. Sediment toxicity assessment with *Photobacterium phosphoreum*: a preliminary evaluation of natural matrix effect. *Fresenius Environ. Bull.*, 7: 596-604.

ONORATI F., MECOZZI M., 2004. Effects of two diluents in the Microtox® toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere*, 54: 679 – 687.

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.

VOLPI GHIRARDINI A., MARCHETTO D., PANTANI C. (2009). *Microtox® Solid Phase Test: Effect of diluent used in toxicity test* in ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, vol. 72, pp. 851-861.

ALLEGATI

PREPARAZIONE DELL'ACQUA MARINA ARTIFICIALE (ASW) ISO 10253/2016

Come indicato anche in ISO 11348-3:2019

L'acqua marina artificiale alla salinità del 31‰ P/V prevede l'utilizzo di sette sali da aggiungere all'acqua deionizzata nell'ordine in cui sono riportati nella tabella sottostante:

	Sale	g/L
1	NaCl	22,00
2	MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,70
3	Na ₂ SO ₄ anidro	3,70
4	CaCl ₂ anidro	1,00
5	KCl	0,65
6	NaHCO ₃	0,20
7	H ₃ BO ₃	0,023

Di seguito sono riportate le fasi di preparazione per 1 Litro di acqua:

- aggiungere una prima quantità di acqua deionizzata (es: circa 500 mL) in un matraccio;
- porre il contenitore su un agitatore inserendo un'ancoretta magnetica;
- far sciogliere i sali mantenendo costantemente la soluzione in agitazione, avendo cura che ciascun sale sia sciolto prima di aggiungere il successivo;
- disciolto l'ultimo sale, portare a volume (1 litro);
- porre la soluzione ottenuta ad aerare per una notte al buio;
- verificare la salinità con l'uso del rifrattometro;
- verificare conducibilità e pH.

