

EDITORIALE

In questo numero viene presentato un protocollo per la valutazione della tossicità di acque di scarico e superficiali mediante test di inibizione algale con *Selenastrum capricornutum* o *Pseudokirchneriella subcapitata*, come richiesto dal D.Lgs. 152/99.

Questo metodo, insieme con altri metodi ecotossicologici, già inseriti nel manuale APAT-IRSA "Metodi Analitici per le Acque" di recente pubblicazione, concorre ad ampliare lo spettro degli strumenti operativi utilizzabili nella valutazione della tossicità acuta e cronica di effluenti ed acque superficiali, recependo le indicazioni del citato decreto e della direttiva 2000/60.

Come è tradizione del Notiziario, accanto a protocolli analitici più maturi, ampiamente sperimentati a livello nazionale ed internazionale, come è il caso del test di inibizione algale precedentemente citato, viene dato spazio anche a proposte di metodo e nuove procedure desunte dalla letteratura scientifica.

Il secondo contributo riguarda appunto la descrizione di un metodo basato sulla determinazione dell'attività dell'enzima propionilcolinesterasi di un organismo eucariote unicellulare, come risposta alla presenza di fitofarmaci neurotossici nell'ambiente. A differenza di organismi più complessi e costosi, gli organismi eucarioti unicellulari si possono riprodurre in laboratorio in condizioni molto simili a quelle naturali ed inoltre, avendo cicli riproduttivi molto rapidi, consentono di valutare in tempi brevi gli effetti di una sostanza.

Infine l'ultimo contributo costituisce un "upgrade" dei protocolli APAT-IRSA 5140 e 5150, pubblicati nel manuale citato in precedenza, in quanto prevede l'impiego del rivelatore a spettrometria di massa invece dei tradizionali rivelatori a ionizzazione di fiamma e a cattura di elettroni. La procedura proposta, che consente di fondere in unico protocollo la determinazione di solventi organici aromatici (APAT-IRSA 5140) e solventi clorurati (APAT-IRSA 5150), è stata applicata ad un più ampio spettro di composti che comprende, tra gli altri, clorobenzene, dicloro e triclorobenzene e clorotoluene, per i quali il D.M. 367/03 fissa standard di qualità per l'ambiente acquatico da conseguire entro il 2008 ed entro il 2015.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, marzo 2005

TEST DI INIBIZIONE ALGALE CON *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* O *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

METODO SPETTROFOTOMETRICO

a cura di Passarelli P.* e Sbalchiero A.**

**Biologa*

***APAT, Servizio di Metrologia Ambientale, Castel Romano, Roma*

RIASSUNTO

Viene presentata la messa a punto di un test d'inibizione algale con *Selenastrum capricornutum* o *Pseudokirchneriella subcapitata* per valutare la tossicità di acque di scarico e superficiali. Dopo 72 ore di incubazione viene misurata la densità algale mediante lettura dell'assorbanza a 663 nm. Il protocollo descritto rispetta lo standard ISO 8692 e propone alcuni accorgimenti utili al miglioramento della metodica, come previsto da norme ISO correlate.

SUMMARY

A test procedure for evaluating the toxicity of surface waters and wastewaters using *Selenastrum capricornutum* o *Pseudokirchneriella subcapitata* is described. After 72 h of incubation algal density was determined by measuring the absorbance of the test solutions at 663 nm.

INDICE

TEST DI INIBIZIONE ALGALE CON <i>SELENASTRUM CAPRICORNUTUM</i> O <i>PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA</i>	1
VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA DELLA PRESENZA DI FITOFARMACI NEUROTOSSICI NELLE ACQUE UTILIZZANDO <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i> (PROTISTI)	8
IMPIEGO DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA NELLA DETERMINAZIONE DI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI (VOC) IN MATRICI ACQUOSE	16

INTRODUZIONE

Le alghe rappresentano una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici: l'ossigeno prodotto mediante il processo fotosintetico è indispensabile per la sopravvivenza delle specie animali. Esse contribuiscono all'attività autopurificatrice dei corsi d'acqua, dei laghi e delle acque costiere e sono alla base dell'alimentazione degli organismi consumatori.

La modificazione della comunità fitoplanctonica causata da effetti tossici può alterare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema.

Elevate concentrazioni di sostanze nutritive (come sono i composti del fosforo e dell'azoto), in presenza di condizioni climatiche caratterizzate da un elevato irraggiamento solare e miti temperature, possono favorire crescite algali di notevole intensità tali da modificare gli ambienti acquatici alterandone profondamente le normali oscillazioni della concentrazione d'ossigeno disciolto e favorendo lo sviluppo di metaboliti tossici per numerose specie animali.

L'eutrofizzazione risulta un fenomeno generalizzato, anche se gli effetti più evidenti si osservano nelle acque lacustri e nelle lagune costiere dove, in alcuni casi, essi assumono le dimensioni di vere e proprie crisi distrofiche.

Il saggio algale, eseguito con alghe verdi monocellulari, è un valido strumento d'indagine capace di fornire risposte utili nell'attività di monitoraggio ambientale e nella previsione dell'impatto sui recettori da parte degli scarichi idrici.

Principali caratteristiche del saggio

La crescita algale

La crescita di popolazioni di alghe monocellulari, poste nel mezzo di coltura liquido segue, di norma, una cinetica di 1° ordine:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

dove:

X = parametro che indica la crescita algale (biomassa, densità cellulare, ecc.);

μ = tasso specifico di crescita.

Il tasso specifico di crescita μ è influenzato da importanti fattori quali la luce, la temperatura, la disponibilità dei nutrienti e del biossido di carbonio.

Illuminazione

La crescita delle colture algali tende ad aumentare con l'intensità luminosa fino ad un livello di saturazione che dipende dalla specie algale, dalla temperatura, dalla disponibilità dei nutrienti e della CO_2 .

Nel saggio algale le condizioni d'illuminazione devono essere tali da consentire una crescita esponenziale.

Temperatura

La crescita delle colture algali tende ad aumentare con la temperatura fino a raggiungere quella ottimale oltre la quale la crescita decresce rapidamente.

Le colture algali devono essere incubate (indicare T e grado di umidità) in camera termostata o frigotermostata a temperatura costante; va controllato l'incremento di temperatura dovuto alla sorgente luminosa.

Nutrienti

La crescita algale dipende dalle concentrazioni intracellulari dei nutrienti mentre non risulta legata alle concentrazioni degli stessi nutrienti nel mezzo.

Nelle colture algali dove l'illuminazione e la disponibilità di CO_2 sono tali da non limitare la crescita algale, quest'ultima presenta un andamento esponenziale sino a quando vi sia una disponibilità bilanciata dei nutrienti nel mezzo di coltura.

Dopo l'esaurimento di uno dei nutrienti (fosforo o azoto) nel mezzo di coltura la crescita algale continuerà grazie all'apporto delle riserve intracellulari ma tenderà via via a declinare man mano che la concentrazione intracellulare tenderà a ridursi.

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il test d'inibizione algale studia l'effetto tossico di una sostanza chimica sulle diverse generazioni di un clone algale.

Il clone algale viene coltivato in un mezzo definito costituito da una serie di concentrazioni della matrice da analizzare alle quali sono state aggiunte opportune quantità di nutrienti. Le soluzioni d'analizzare sono poste in incubazione per 72 ore al termine delle quali viene misurata la densità algale in ognuna di esse mediante lettura dell'assorbanza a 663 nm.

2 - CAMPO D'APPLICAZIONE

Il test può essere eseguito su acque di scarico, sia industriali sia civili, che si immettono in corpi idrici non salmastri, su acque superficiali e su estratti organici di sedimenti. Il test può essere utilizzato per sostanze che sono solubili in acqua e che non si degradano, in modo significativo, durante l'esecuzione del test.

3 - PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Nel seguito sono descritte le modalità di preparazione e conservazione dei campioni da sottoporre al test. Esse si rifanno fondamentalmente alle norme ISO 5667-16 ed ISO 14442.

I campioni da testare sono conservati a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ al buio.

Il test preliminare ("screening") è allestito entro le 72 ore.

Il campione non viene congelato e, di norma, non viene manipolato in alcun modo (filtrazione, centrifugazione, variazione di pH) poiché sono poco controllabili gli effetti e le alterazioni che ne derivano. Inoltre, è bene ricordare che il pH non deve essere considerato solo un parametro chimico ma anche la possibile "causa di tossicità" di un campione.

Quando necessario (campioni molto torbidi, ricchi di particolato) è preferibile lasciar sedimentare il materiale. Se la filtrazione risulta necessaria, è bene utilizzare filtri con pori con diametro superiore a $50\ \mu\text{m}$ in modo tale da rimuovere le sole particelle grossolane e non componenti attivi.

Prima di utilizzare un campione, è buona norma osservare un'aliquota del campione al microscopio per evidenziare la presenza di batteri che possono interferire con la crescita algale. Metodi di sterilizzazione (UV o filtri con pori da $0,2\ \mu\text{m}$ di diametro) sono potenziali cause di alterazioni di un campione. Per tale motivo, se è stata verificata la presenza di batteri, in generale, è meglio ricorrere ad una centrifugazione del campione per dieci minuti a $4500\ \text{g} \pm 1500\ \text{g}$.

4 - APPARECCHIATURE

4.1 - Incubatore termostato, con apparato di illuminazione a luce bianca continua fluorescente d'intensità pari a 8000 lux per incubare le micropiastre (per il test è accettabile un intervallo di 6000-10000 lux).

4.2 - Spettrofotometro per misure nel campo del visibile, munito di celle aventi cammino ottico di 5 cm.

La norma ISO 8692/89 indica la possibilità d'utilizzare un metodo indiretto di conta cellulare tramite l'uso di uno spettrofotometro con sensibilità sufficiente. Quest'ultima deve essere stabilita tramite una correlazione accettabile tra la concentrazione cellulare effettiva e quella misurata tramite lo strumento. Lo strumento deve consentire di misurare, con precisione, la concentrazione cellulare minima di 10^4 cellule per millilitro.

4.3 - Filtri, diametro medio dei pori $0,2\ \mu\text{m}$.

4.4 - Autoclave

4.5 - pH-metro

4.6 - Lampade fluorescenti "Cool-White"

4.7 - Luminometro

4.8 - Microscopio ottico con camera di conta (Fuchs-Rosenthal o Burkner)

4.9 - Provette per colture

4.10 - Vetreria sterile

4.11 - Piastre per colture cellulari (Fig.1)

La norma ISO 8692/89 prevede l'allestimento del test in "recipienti" senza specificarne il tipo e il materiale. La metodica proposta in questo protocollo prevede l'utilizzo di piastre per colture sterili e monouso, rigide, in polistirene, con 6 pozzetti a fondo piatto (capacità approssimativa di 15 mL per pozzetto) con coperchio per limitare l'evaporazione.

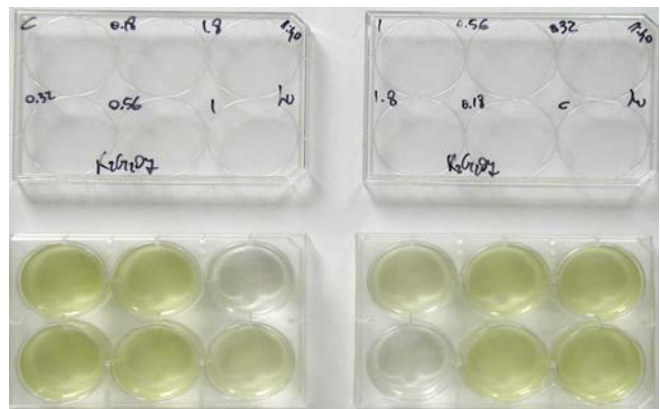


Fig. 1 – Piastre per colture cellulari; test standard con dicromato di potassio a 72 ore.

5 - REATTIVI

5.1 - Acqua di diluizione

Tutta l'acqua utilizzata deve essere ultrapura ed avere perciò una conducibilità minore di $1\ \mu\text{S}/\text{cm}$.

Devono essere evitate contaminazioni da parte di sostanze inorganiche ed organiche e di organismi (es. batteri).

L'acqua utilizzata deve essere aerata per 30 minuti per mezzo di un sistema di aerazione artificiale (con filtro) o per una notte intera se esposta all'aria.

5.2 - Organismi per i saggi

Pseudokirchneriella subcapitata (o *Selenastrum capricornutum*) ha la forma di mezza luna (40 a $70\ \mu\text{m}^3$), appartiene alla famiglia delle *Chlorophyceae* ed

è ubiquitaria in molte acque dolci. Quest'alga può essere facilmente coltivata in laboratorio ed è facilmente reperibile in commercio. Inoltre la crescita è piuttosto rapida (si può misurare accuratamente già dopo 72-96 ore di incubazione) e la specie è moderatamente sensibile alle sostanze tossiche. A differenza di altre alghe che hanno una struttura molto complessa adatta a formare colonie o catene, queste specie non possiedono strutture complesse. Per tutti questi motivi si prestano molto bene ad essere impiegate in test di tossicità.

5.3 – Soluzioni madre

Preparare quattro soluzioni madre, in acqua ultrapura, come indicato nella norma ISO 8692/89 e riportato in Tab. 1.

Tutti i nutrienti impiegati nella preparazione delle soluzioni madre devono essere di grado analitico.

Le soluzioni 1; 2; 3; vengono autoclavate 15 minuti a $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, mentre la soluzione 4 viene filtrata (0,2 μm).

Conservare le soluzioni a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, al buio.

Tab. 1 – Composizione delle soluzioni madre

Nutrienti	Conc. nella soluzione madre	Conc. finale nel test
<i>sol. 1</i>	<i>g/L</i>	<i>mg/L</i>
NH ₄ Cl	1,5	15
Mg Cl ₂ ·6H ₂ O	1,2	12
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8	18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	15
KH ₂ PO ₄	0,16	1,6
<i>sol. 2</i>	<i>mg/L</i>	<i>$\mu\text{g/L}$</i>
FeCl ₃ ·6H ₂ O	80	80
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100	100
<i>sol. 3</i>	<i>mg/L</i>	<i>$\mu\text{g/L}$</i>
H ₃ BO ₃	185	185
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415	415
ZnCl ₂	3	3
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5	1,5
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01	0,01
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7	7
<i>sol. 4</i>	<i>g/L</i>	<i>mg/L</i>
NaHCO ₃	50	50

5.4 – Terreno di coltura

Il terreno di coltura deve essere preparato fresco ogni volta che si deve allestire un test o si deve preparare una precoltura. A 20 mL di soluzione madre 1 si aggiungono 2 mL delle soluzioni 2, 3 e 4 e si porta il

volume finale ad 200 mL con acqua ultrapura. Il pH deve essere pari a $8,3 \pm 0,2$.

In questo modo si ottiene una soluzione intermedia nella quale la concentrazione dei nutrienti risulta essere 10X rispetto alla concentrazione che si deve ottenere nella precoltura. Ciò significa che bisognerà aggiungere un decimo di tale soluzione rispetto al volume finale costituente la precoltura. L'inoculo algale per l'allestimento del test deve essere prelevato da una sospensione algale madre in fase esponenziale di crescita. A tal fine, ogni 72-96 ore, è allestita una precoltura nel modo seguente.

A 50 mL della soluzione intermedia di nutrienti descritta si aggiungono una quantità di alghe tale da ottenere una concentrazione iniziale di 10^4 alghe/mL ed acqua fino a raggiungere un volume finale di 500 mL.

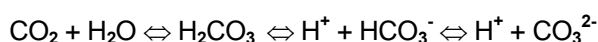
Tale precoltura deve essere mantenuta per 72-96 ore a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sotto luce continua (6000-10000 lux) e sottoposta ad aerazione ed agitazione continua.

Ogni 72-96 ore, la precoltura viene centrifugata a 1300 rpm per 10 minuti.

Il surnatante viene eliminato e il "pellet" risospeso in terreno fresco (contenente una quantità finale di nutrienti 1X) e centrifugato nuovamente per effettuare un lavaggio. Tale operazione è condotta per due volte.

Al termine dei lavaggi, il "pellet" viene risospeso in terreno fresco e si esegue una conta al microscopio per determinare la densità algale e per verificare la morfologia delle alghe. Determinata la densità algale si eseguono i calcoli per ottenere una concentrazione iniziale di 10^4 alghe/mL nella precoltura. A questo punto si ricostituisce la precoltura e si mantiene 72-96 ore nelle condizioni descritte.

La riduzione della quantità di alghe inoculate al tempo zero è consigliata dalle Norme Internazionali ISO 5667-16 ed ISO 14442 al fine di ridurre le variazioni di pH. L'incremento di tale parametro è infatti correlato con la fotosintesi:



La sottrazione di CO₂ determina lo spostamento dei carbonati e, quindi, lo spostamento del pH verso valori più alcalini.

Infatti, l'incremento del pH è difficilmente controllabile nel controllo e nelle soluzioni di tossico che presentano una inibizione della crescita inferiore ed una densità algale simile a quella del controllo.

La quantità di inoculo iniziale può essere ridotta a patto che lo strumento possa rilevare anche concentrazioni inferiori a 10^4 alghe/mL.

Tale riduzione di inoculo permette di controllare le variazioni di pH e permette di non agitare le piastre durante l'incubazione.

6 - PROCEDIMENTO

6.1 - Preparazione del saggio

Al fine di testare percentuali di campione il più vicine

possibile al campione tal quale è stata la preparata una soluzione di nutrienti più concentrata. D'altra parte l'ISO 8692 precisa quale deve essere la concentrazione finale di nutrienti nel campione da testare e perciò non è una modifica sostanziale, ma un modo alternativo di pervenire allo stesso risultato. Da prove di laboratorio è risultato che l'utilizzo di tale soluzione non altera i risultati ottenuti. Si prepara una soluzione intermedia di nutrienti più concentrata (100X). Per preparare una soluzione 100X è necessario preparare la Soluzione madre 1 modificata, aggiungere a 125 mL di quest'ultima 25 mL delle soluzioni 2, 3 e 4 e portare a un volume finale di 250 mL con acqua ultrapura. Tale soluzione intermedia permette di testare circa il 99% di campione.

Soluzione madre 1 modificata

Nutrienti	Concentrazione nella soluzione. madre
<i>sol. 1</i>	<i>g/L</i>
NH ₄ Cl	3,0
Mg Cl ₂ ·6H ₂ O	2,4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,0
KH ₂ PO ₄	0,32

Tale soluzione deve essere autoclavata 15 minuti a 120°C±2°C e conservata a 4°C al buio.

I test sono preparati in concomitanza con l'allestimento della precoltura in modo tale da utilizzare sempre, come inoculo iniziale, una sospensione algale in fase esponenziale. Il test preliminare è allestito con almeno due diluizioni scalari del campione (es. 90% e 45%). E' meglio allestire almeno cinque dosi nell'intento di trovare più facilmente l'intervallo di dosi necessarie ad allestire il test definitivo nel minor tempo possibile dal momento del campionamento. Inoltre, se le concentrazioni scelte forniscono una buona retta di regressione, lo screening condotto con cinque diluizioni può essere utilizzato come definitivo. Come indicato nello Standard ISO 8692, è bene scegliere un intervallo di concentrazioni tali da poter testare un intervallo compreso tra il 10% e il 90% d'inibizione algale.

Ogni soluzione testata, compreso il controllo, deve essere allestita almeno in duplice replica (meglio 3) ed ogni replica deve essere posizionata nelle piastre in modo tale d'ottenere una buona randomizzazione dei risultati. L'inoculo ed il terreno di coltura devono essere preparati freschi, di volta in volta, poco tempo prima dell'esecuzione del test. In ogni pozzetto devono essere presenti le stesse quantità d'alghe (10⁴/mL o anche meno se lo strumento è in grado di misurarle accuratamente) e di nutrienti.

Per ottenere una concentrazione di 10⁴ alghe/mL, inoculare in ogni pozzetto una quantità di sospensione algale compresa tra i 20 ed i 50 µL in

modo tale da non diluire troppo il campione e quindi testare una concentrazione massima il più vicino possibile al 100%.

A seconda della quantità di inoculo algale aggiunta si valutano le dosi testate.

6.2 - Valutazione delle concentrazioni testate

Per comodità e per ridurre gli errori, viene prelevato un volume di campione al 100% e da esso si ottengono diluizioni scalari (es. fattore di diluizione 2) utilizzando come acqua di diluizione l'acqua ultrapura come indicato in Fig. 2.

Dopo aver preparato le diluizioni, si introducono 10 mL di ognuna di queste diluizioni del campione nei pozzetti delle piastre. A questo punto si aggiungono 100 µL di nutrienti (soluzione intermedia 100X) e 50 µL di inoculo algale. Si ottiene una concentrazione massima testabile pari al 98,5% del campione.

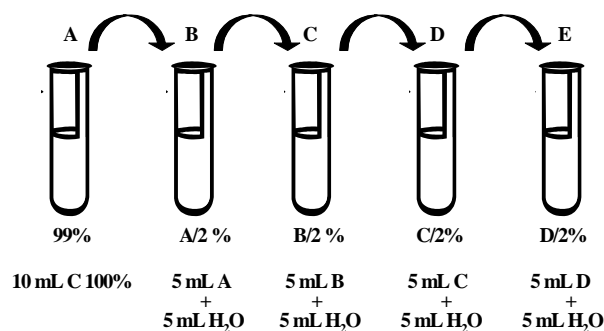


Fig. 2 – Modalità di preparazione delle diluizioni

Vi sono vari modi di preparare le diluizioni di un campione e questi variano da operatore ad operatore. L'esempio qui riportato ha il solo scopo di ricordare che è opportuno preparare le diluizioni tenendo conto di tutti i fattori che portano ad un errore o ad una valutazione errata della concentrazione effettivamente testata. E' buona norma tenere presente che ridurre troppo il volume di inoculo o di sostanze nutrienti, nell'intento di non diluire troppo il campione di partenza, può comportare degli errori che conducono a risultati non realistici.

Per ogni campione testato vengono allestiti almeno due controlli. E' preferibile allestire controlli e campioni in piastre separate per evitare gli effetti di "crossing" del tossico da un pozzetto a quello vicino ed evitare quindi l'inibizione della crescita anche nel controllo e l'individuazione di falsi positivi.

Come riportato in letteratura, la quantità di nutrienti può mascherare l'effetto di un tossico. A tal fine si possono eseguire analisi preventive per stabilire la quantità di nutrienti già presenti nel campione. Per motivi pratici, si può, in alternativa alle analisi preliminari del campione, allestire anche un pozzetto contenente 10 mL di

campione al 100% e l'inoculo algale previsto ma senza nutrienti. Se i due campioni al 100% con e senza nutrienti danno risultati diversi (non tossico e tossico, rispettivamente) la spiegazione può essere duplice:

o la quantità di nutrienti era scarsa, nel campione dove non sono stati aggiunti, e tale è stato il fattore limitante della crescita; o la quantità di nutrienti ha raggiunto, nel campione dove sono stati aggiunti, valori tali da mascherare l'effetto del tossico.

A questo punto si possono eseguire analisi chimiche sul campione che possano identificare la vera causa di tossicità.

6.3 – Allestimento periodico di un controllo positivo e aggiornamento della carta dei controlli

6.3.1 - Test standard ($K_2Cr_2O_7$).

Preparare il medium alghe 10X, mettere ad aerare 1 litro di acqua deionizzata e preparare le soluzioni di dicromato di potassio a partire da soluzioni di riferimento aventi opportune concentrazioni.

Soluzione A (1 g/L)

Sciogliere 100 mg di dicromato di potassio in 100 mL di acqua deionizzata. La soluzione deve essere conservata a 4°C al buio per non più di un mese.

Soluzione B (10 mg/L)

Prelevare 1 mL di soluzione A e portare a volume a 100 mL con acqua deionizzata.

Soluzione C (1 mg/L)

Prelevare 20 mL di soluzione B e portare a volume a 200 mL con acqua deionizzata.

Le soluzioni per il test vengono preparate nel modo seguente:

Soluzioni test	
1,8	18 mL di soluzione B + 10 mL medium (10X) + acqua fino a 100 mL
1	10 mL di soluzione B + 10 mL medium (10X) + acqua fino a 100 mL
0,56	56 mL di soluzione C + 10 mL medium (10X) + acqua fino a 100 mL
0,32	32 mL di soluzione C + 10 mL medium (10X) + acqua fino a 100 mL
0,18	18 mL di soluzione C + 10 mL medium (10X) + acqua fino a 100 mL

Le piastre vengono allestite prelevando 10 mL delle soluzioni di dicromato di potassio (1,8-0,18 mg/L) preparate secondo le modalità descritte in tabella più una piastra di controllo, costituita da 1 mL di medium (10X) + 9 mL di acqua aerata.

Misurare sempre il pH all'inizio e alla fine del test.

Le piastre vengono incubate per 72-96 ore a 23°C ± 2°C sotto luce continua di intensità pari a circa 8000 lux. L'incubazione può essere effettuata introducendo un fotoperiodo (16 ore luce + 8 ore buio; meglio se con un periodo di transizione di 15-30 minuti a luce intermedia tra una fase e l'altra). L'introduzione del fotoperiodo simula con maggiore efficienza la realtà ambientale nella quale l'alternanza giorno-notte si verifica costantemente e apporta un miglioramento alle condizioni di svolgimento del test in quanto gli incrementi di pH, di temperatura e di crescita algale sono minori e gli scambi gassosi sono ottimali. L'introduzione di un fotoperiodo è un'alternativa consentita dalle norme ISO 5667-16 ed ISO 14442 per controllare le variazioni di pH e ridurre le interferenze con la crescita algale ed è fondamentale se si tiene conto del fatto che molte sostanze chimiche hanno un effetto tossico superiore a pH non fortemente alcalini [es. Cr (VI), Cd (II)].

6.4 - Analisi

Al termine delle 72 ore, la densità algale delle soluzioni provenienti da ogni pozzetto viene determinata indirettamente come quantità di "clorofilla a" presente nel campione. A tale fine, la misura è eseguita ad una lunghezza d'onda pari a 663 nm (picco di assorbimento di tale fotopigmento). Prima della lettura, lo strumento viene "azzerato" con la soluzione del controllo. Nel caso di campioni colorati, vengono preparate aliquote di diluizioni del campione pari a quelle testate senza l'aggiunta di alghe. Queste soluzioni costituiranno il bianco d'ogni campione.

La lettura al tempo zero non è necessaria in quanto il risultato finale varia significativamente soltanto in caso di errore grossolano da parte dell'operatore al momento dell'introduzione delle alghe nelle soluzioni da testare.

7 – Calcoli

L'inibizione percentuale può essere calcolata nel modo seguente:

$$I\% = \frac{C - S}{C} \times 100$$

C = Abs o concentrazione del Controllo

S = Abs o concentrazione della diluizione di campione testata.

I dati ottenuti (Abs, concentrazione algale) possono essere utilizzati per calcolare il valore di EC₅₀ o di EC₈₀ in

diversi modi: Metodo dei "probit"; "Litchfield – Wilcoxon"; Curva di crescita.

I dati sono riportati su un grafico ponendo sull'asse delle ascisse le concentrazioni testate (mg/L, ln, ecc) e sull'asse delle ordinate il valore corrispondente all'effetto causato da ogni concentrazione testata (Inibizione %, Probit, ecc.).

Dalla retta di regressione ottenuta si possono ottenere molte informazioni (es. se l'intervallo di concentrazioni scelto è adatto oppure no, se la correlazione tra dose ed effetto è buona oppure no, ecc.).

Di norma, dal calcolo dell'EC₅₀ è bene scartare le concentrazioni che hanno dato una inibizione della crescita inferiore al 10% e superiore al 90% perché tali valori sono quelli che statisticamente comportano una maggiore imprecisione nella determinazione dei dati (ai limiti estremi, infatti, la retta di regressione non è più lineare come si desidera "idealmente" ottenere). I campioni che alla massima dose testabile, presentano un'inibizione della crescita inferiore o uguale al 10% possono essere considerati negativi.

7.1 - Criteri di validità del test

- 1) La densità cellulare del controllo deve aumentare di almeno sedici volte al termine del test (72-96 ore).
- 2) Il pH non deve variare più di 1,5 unità al termine del test.
- 3) Le varie repliche del controllo eseguite in presenza o assenza di EDTA non devono differire tra di loro più del 20%.

7.2 - Risposte del saggio

L'effetto esercitato da un campione nei confronti di una coltura algale può produrre le seguenti risposte:

- 1) Stimolazione della crescita algale (ormesi e/o eutrofizzazione);
- 2) Inibizione della crescita algale;
- 3) Non effetto sulla crescita algale.

8 - ELABORAZIONE DEI DATI

I dati devono essere espressi come valori di l% e come EC₅₀/EC₈₀ approssimando i valori alla seconda cifra decimale (ISO 8692).

9 - VALUTAZIONE

Il campione è considerato negativo per un'inibizione % pari ed inferiore al 10%.

Il campione è considerato positivo per un'inibizione % pari o superiore al 10%.

I dati inerenti ad una % di inibizione superiori al 90% ed inferiori al 10% non devono essere considerati al fine della valutazione dell'EC₅₀/EC₈₀.

GLOSSARIO

Concentrazione cellulare: numero d'alghe per unità di volume.

Crescita: aumento della concentrazione cellulare.

Precoltura: sospensione algale in fase esponenziale di crescita.

Acqua di diluizione: acqua ultrapura utilizzata per preparare il terreno di coltura e le diverse concentrazioni da testare a partire dal campione tal quale.

Terreno di coltura: miscela di acqua ultrapura e sostanze nutritive utilizzata per il mantenimento del clone algale in una precoltura o nel sistema che costituisce il test.

Soluzioni test: miscele d'acqua, terreno di coltura e sostanze da testare all'interno delle quali sono inoculate le alghe.

Controllo: miscela di acqua e terreno di coltura all'interno della quale vengono inoculate le alghe.

EC₅₀: (Effective Concentration 50 o concentrazione efficace mediana) rappresenta la concentrazione della sostanza chimica che produce, nel 50% degli organismi testati, un effetto diverso dalla morte (immobilizzazione, arresto della crescita, ecc.). Tale valore è utile per quanto concerne gli scarichi in acqua superficiale o di acque reflue urbane ed industriali che recapitano sul suolo in quanto il D.Lgs 152/1999 nella Tabella 3 dell'Allegato 5 ritiene accettabile quello scarico che causa un "effetto" (in questo caso l'inibizione della crescita algale) inferiore al 50%.

EC₈₀: rappresenta la concentrazione della sostanza chimica che produce nell'80% degli organismi testati un effetto diverso dalla morte. Tale valore è utile nel caso di scarichi in pubblica fognatura in quanto il D.Lgs 152/1999 nella Tabella 3 dell'Allegato 5 ritiene accettabile quello scarico che causa un "effetto" (in questo caso l'inibizione della crescita algale) inferiore all'80%.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1998): "Standard Practice for Algal Growth Potential Testing with *Selenastrum capricornutum*", D3978-80, 1-5 (Philadelphia).

Bimbi B., Bocalini S., Pistoleri F., Sbrilli G. (2002): "Prova di tossicità con alghe monocellulari. Confronto tra due sistemi di misura della crescita algale: il conteggio cellulare e la determinazione della clorofilla "a" in vivo", *Biologi Italiani*, 10/2002.

- EN ISO 3696 (1995): "Water for Analytical laboratory use Specification and test methods".
- EPA (1980): "Ambient water quality criteria for chromium", 440/5-80/006.
- EPA (1980): "Ambient water quality criteria for cadmium", 440/5-80/025.
- EPA (1984): "Ambient water quality criteria for chromium", 440/5-84/029.
- EPA (1989): "Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms", 600/400-89/001.
- EPA (1985): "Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms", 600/4-85/014.
- EPA (1991): "Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving Waters to freshwater and marine organisms", 600/4-90/027.
- EPA (1994): "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms", 600/4-91/002 (3rd Ed.).
- EPA (2001): "2001 Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium", 22-R-01-001.
- EPS (1992): "Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum*", 1/RM/25.
- Geis S. ; Fleming K. (2000): "Modification to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay", *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 36-41.
- ISO 5667-16 (1998): "Water quality-Sampling-Part 16: Guidance on biotesting of samples", 1-32.
- ISO 8692 (1989). *Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum**, 1-8.
- ISO 14442 (1999): "Water quality-Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water", 1-14.
- OECD (1984): "Guidelines for testing of chemicals - "Algal Growth Inhibition Test", 1-14.
- Passarelli P., Giansanti P., Marangon D., D'Agostino A.M., Garrou E. (2003): "Metodo spettrofotometrico per il test di inibizione algale", *Acqua e Aria*, giugno-luglio, 116-119.
- Puddu A. (1989): "Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei probits", *Notiziario IRSA Metodi Analitici per le Acque*, **9** (2), 19-37.
- Sbrilli G. (1998): "Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico", ARPAT-CEDIF, Serie Ricerche e Formazione, Quaderno 8, Firenze.
- Sbrilli G. et al. (2003): "Effects of Nutrients and Salinity on the Algal Assay Using *P. subcapitata* (Korshikov) Hindak", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **71**, 609-616.
- UNI CEI ENV 13005 (1999): *Guide to the expression of uncertainty in measurement*, 1-132.
- UNI EN ISO 3696 (1995): *Water for analytical laboratory use-Specification and test methods* .
- USEPA (1997): *In vitro determination of chlorophylls a, b, c1+c2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry* , Method 446.0, 0-26.
- USEPA (1997): *Determination of chlorophylls a and b and identification of other pigments of interest in marine and freshwater algae using high performance liquid chromatography with visible wavelength detection* , Method 447.0, 0-20.

VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA DELLA PRESENZA DI FITOFARMACI NEUROTOSSICI NELLE ACQUE, UTILIZZANDO *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* (PROTISTI)

a cura di Amaroli A.*, Trielli F.*, Falugi C.** e Corrado M.U.*

*Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse (DIP.TE.RIS.), Università degli Studi, Genova

**Dipartimento di Biologia Sperimentale, Ambientale, Applicata (DI.BI.S.A.A.), Università degli Studi, Genova

RIASSUNTO

Viene presentato un metodo basato sulla misura dell'attività dell'enzima PrChE (propionilcolinesterasi) di *Dictyostelium discoideum*, utilizzato come saggio biologico sensibile alla presenza di fitofarmaci neurotossici nell'ambiente. L'individuazione di questo organismo modello eucariote unicellulare, semplice e alternativo a organismi più complessi e costosi, permette di ottimizzare le analisi con il minimo di prove sperimentali e di usufruire di uno strumento biologico di indagine di rapido utilizzo, di costo limitato e preliminare all'indagine chimica sulla presenza di composti xenobiotici in matrici ambientali.

INTRODUZIONE

L'uso intensivo di fitofarmaci neurotossici, quali i composti organofosfati e carbammati, è causa di una varietà di problemi ecotossicologici che vanno dall'intossicazione degli operatori, all'avvelenamento degli organismi sia del suolo che delle acque interne e costiere. Si ritiene quindi che queste sostanze possano essere responsabili di una serie di danni all'ambiente, inteso come comunità dei viventi che lo popolano. La tossicità principale dei fitofarmaci neurotossici è dovuta all'inibizione dell'attività di acetilcolinesterasi (AChE), l'enzima litico del sistema neurotrasmettitore colinergico. I fitofarmaci ad azione neurotossica sono largamente usati nelle zone agricole della Liguria. In questi siti, più che altrove, è importante disporre di uno strumento rapido di valutazione della qualità dell'ambiente, date le caratteristiche peculiari del territorio ligure, dove la terra coltivabile è stretta fra il mare e i monti, e la coltivazione in fasce si insinua tra le abitazioni civili e i ricoveri per gli animali di allevamento.

Allo scopo di aumentare il pannello di marcatori ambientali, una notevole attenzione è stata recentemente rivolta all'individuazione di sistemi sperimentali semplici e alternativi all'utilizzo di vertebrati e macroinvertebrati.

Sotto questo profilo, numerose specie di protisti, organismi eucarioti unicellulari, si configurano come sistemi di eccellenza, in quanto il loro allevamento si può riprodurre in laboratorio in condizioni molto simili a quelle naturali e questo aspetto conferisce alle loro risposte una più generale applicabilità. Inoltre, avendo cicli riproduttivi molto rapidi (da 2 a 3 generazioni nelle 24 ore), permettono di valutare in tempi brevi l'effetto di una sostanza su popolazioni ampie e geneticamente omogenee. Un altro aspetto di rilievo deriva dalla loro stessa natura di organismo-cellula. Infatti, come organismi sono in grado di interagire direttamente con l'ambiente al pari di un animale ma, in quanto cellule isolate che espongono i recettori direttamente all'esterno, sono più sensibili alle variazioni ambientali rispetto alle cellule di un organismo superiore, che si sono differenziate e organizzate in strutture complesse quali organi e apparati e, pertanto, danno risposte mediate dalla loro diversa funzione. Infine, un ulteriore pregio è rappresentato dal fatto che l'allevamento di colture di protisti comporta costi esigui, in termini di risorse umane e tecniche.

GENERALITÀ

Agenti anticolinesterasici, quali i composti organofosfati e carbammati, sono largamente utilizzati per il controllo di infestazioni da insetti. Studi su invertebrati, quali *Lepomis macrochirus* (Dutta et al., 1997), *Channa punctatus* (Ghosh e Bhattacharya, 1992), *Carcinus maenas* (Lundebyu et al., 1997), *Mytilus galloprovincialis* e *Corbicula fluminea* (Mora et

al., 1999), hanno evidenziato i significativi effetti inibitori degli organofosfati sull'attività delle colinesterasi (ChE) e come queste rappresentino un valido "biomarker" dell'esposizione a tali composti.

L'inibizione delle ChE rappresenta un indice di stress specifico della presenza di composti organofosfati e carbammati nell'ambiente; di conseguenza, la misura di ali attività enzimatiche costituisce uno strumento stremamente valido per la valutazione del rischio connesso all'utilizzo di insetticidi (Kennedy, 1991).

Il sistema colinergico è stato ampiamente studiato ed è noto che nelle sinapsi neuromuscolari le molecole colinergiche ricoprono il ruolo di trasmettitori specializzati degli impulsi nervosi. Questo sistema neurotrasmettitore comprende la molecola segnale acetilcolina (ACh) in grado di legarsi ai suoi recettori nicotinici e muscarinici presenti sulla superficie delle cellule bersaglio. L'enzima AChE rimuove rapidamente l'ACh dal recettore, idrolizzandola a colina e gruppo acetato, in modo da rendere il recettore disponibile a una nuova stimolazione. Più in generale, per ChE si intendono gli enzimi capaci di idrolizzare l'ACh o altri esteri della colina nelle sue componenti: colina e gruppo acetato, o gruppo butirrato, o gruppo propionato (Stedman e Easson, 1932). Sono stati individuati diversi tipi di ChE, distinte in base al substrato su cui agiscono e alla loro sensibilità a inibitori specifici (Mendel e Rudney, 1943; Talesa et al., 1990).

Colinesterasi vera o acetilcolinesterasi (AChE, E.C. 3.1.1.7), idrolizza l'ACh e il substrato ioduro di acetil- β -metiltiocolina (AcTChI). E' inibita da eserina e, in modo specifico, da BW 284c51.

Pseudocolinesterasi: butirrilcolinesterasi (BChE, E.C. 3.1.1.8) e *propionilcolinesterasi* (PrChE), idrolizzano rispettivamente i substrati ioduro di butiriltiocolina (BTChI) e ioduro di propioniltiocolina (PrTChI), oltre ad altri esteri della colina. Sono inibite da eserina e, in modo specifico, da iso-OMPA.

I fitofarmaci ad attività neurotossica maggiormente utilizzati in agricoltura sono composti organofosfati e carbammati. Gli organofosfati sono esteri o tioli derivati dell'acido fosforico, fosfonico, fosfinico e fosforamidico. La loro struttura chimica di base è rappresentata in Fig. 1A..

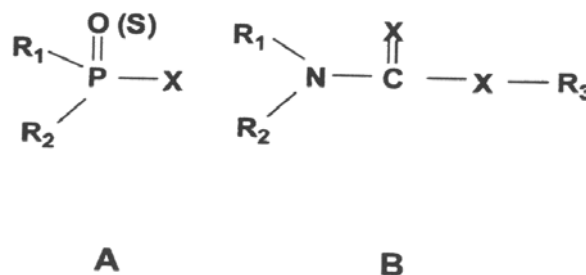


Fig. 1. Struttura chimica di composti organofosfati (A) e carbammati (B).

Generalmente, R_1 e R_2 sono gruppi arilici o alchilici, mentre X si riferisce a un ampio "range" di gruppi: alogeno, alifatico, aromatico ed eterocidico. I composti organofosfati distruggono l'attività colinesterasica attraverso la fosforilazione di una serina specifica situata nel sito catalitico dell'enzima, con produzione di O,O-dialchilfosfoserina. Occorre sottolineare che solo la serina del sito attivo è fosforilata dagli organofosfati e che, in questa forma, l'enzima non è in grado di idrolizzare la colina.

I composti carbammati sono derivati dell'acido carbammico. La loro struttura chimica di base è rappresentata nella Fig. 1B. Generalmente R_1 e R_2 sono radicali organici o atomi di H, mentre X può essere O_2 o S, e R_3 un radicale organico o un metallo. I carbammati presentano attività insetticida quando R_2 è un H e R_1 un metile; attività erbicida, quando R_1 è un gruppo aromatico; attività fungicida, quando R_1 è una componente del benzimidazolo. Al pari degli organofosfati, i carbammati agiscono sulla serina specifica del sito catalitico dell'enzima, attraverso una reazione di carbammilazione ma, a differenza degli organofosfati, l'inibizione di AChE da parte dei carbammati è spontaneamente reversibile (Kuhr e Dorough, 1976).

Gli effetti tossici acuti degli organofosfati e dei carbammati sono fondamentalmente simili: entrambi colpiscono il sistema nervoso centrale, le terminazioni parasimpatiche, le sinapsi pre-gangliari e le placche neuromuscolari. L'intossicazione acuta può causare morte per insufficienza respiratoria. Questa ampia conoscenza è in relazione con l'origine della loro applicazione a scopo bellico durante le due guerre mondiali, in quanto costituenti dei gas nervini.

Nel Laboratorio di Protistologia del DIP.TE.RIS., Università degli Studi di Genova, è stata recentemente individuata l'attività di enzimi ChE nei protisti *Dictyostelium* e *Paramecium* (Trielli et al., 1997; Delmonte Corrado et al., 1999; 2001; 2002; Falugi et al., 2002; Amaroli et al., 2003). In particolare, in *D. discoideum* è stata evidenziata attività di PrChE capace di idrolizzare il substrato PrTChI e sensibile a iso-OMPA, inibitore classico dell'attività di enzimi pseudocolinesterasi. L'attività di PrChE di *D. discoideum* viene inibita almeno del 50% da un ampio spettro di composti organofosfati, quali basudin, diazinone, cidal, e carbammati, quali carbaril e pirimicarb, usati alla bassa concentrazione di circa 10 $\mu\text{g/L}$. Questi risultati hanno suggerito di proporre la seguente procedura per la valutazione tossicologica della presenza di fitofarmaci neurotossici nelle acque.

1 - PRINCIPIO DEL METODO

La misura spettrofotometrica dell'attività di ChE si basa sul metodo di Ellman et al. (1961) modificato. La tiocolina, formata dall'idrolisi del substrato PrTChI per

attività dell'enzima PrChE, reagisce rapidamente con 5,5'-ditio-bis-(2-acido nitrobenzoico) (DTNB), rilasciando l'anione 5-tio-2-acido nitrobenzoico, di colore giallo. I vantaggi di questo metodo sono rappresentati dalla sua semplicità, dall'aumento continuo dell'intensità del colore in funzione del tempo di incubazione, dalla precisione e dal costo esiguo.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo è in grado di accertare la presenza di fitofarmaci neurotossici in acque superficiali e di falda.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Nel caso di utilizzo di macroinvertebrati e di vertebrati, quali saggi biologici della presenza di fitofarmaci neurotossici nell'ambiente, è fondamentale ricordare che numerosi fattori non contaminanti possono a loro volta modificare l'attività del biomarker considerato, ossia l'attività di ChE. Le fonti naturali di tali modificazioni sono riconducibili a: tipo di tessuto, specie, variazione genetica, età, ritmo circadiano e stagionale, sesso, stato riproduttivo, regolazione endocrina (Rattner e Fairbrother, 1991).

Al contrario, questi fattori di interferenza sono esclusi nel caso dell'utilizzo di *D. discoideum*, in quanto organismo unicellulare con riproduzione asessuale da cui originano linee cellulari fenotipicamente e genotipicamente omogenee.

I fattori di stress che possono interferire con l'attività di PrChE nel caso di *D. discoideum* sono riconducibili allo stato nutrizionale e fisiologico della coltura e alla temperatura di allevamento. Questi fattori di interferenza sono del tutto eliminati dalle condizioni standard alle quali viene effettuato l'allevamento in laboratorio.

Per quanto riguarda il metodo di Ellman et al. (1961), possibili fonti di variazione si riferiscono alla:

- (1) preparazione e conservazione del campione;
- (2) temperatura, pH e durata della reazione enzima/substrato;
- (3) reazione tiocolina/DTNB;
- (4) sensibilità dello spettrofotometro.

Per eliminare i fattori di variazione (1) e (2), al "pellet" di cellule ottenuto per centrifugazione vanno aggiunti leupeptina e fluoruro di fenilmetilsulfonil (PMS)F, entrambi inibitori delle proteasi che esercitano azione litica sull'attività dell'enzima PrChE. Poiché l'attività di PrChE è sensibile a variazioni di temperatura e di pH, si deve aver cura di far avvenire la reazione enzima/substrato alla temperatura di $(25\pm 1)^\circ\text{C}$, a pH $8,0\pm 0,05$ e per un tempo standard di 10 minuti ± 1 secondo. Una possibile interferenza riguarda la reazione tiocolina/DTNB (3), in quanto gruppi SH presenti nel campione potrebbero reagire con DTNB (Rakonczay, 1986). Circa le variazioni dovute alla sensibilità dello spettrofotometro (4), è necessario che per il suo funzionamento ottimale siano soddisfatte le seguenti condizioni: temperatura $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ e umidità relativa $60\%\pm 1\%$.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il campionamento deve essere eseguito secondo quanto descritto nel Quaderno APAT-IRSA 2003 o nel Manuale UNICHIM N. 157 (1997).

Prelevare un campione di circa 250 mL di acqua ed esaminarlo preferibilmente entro 24 ore dalla raccolta, conservandolo in frigorifero alla temperatura di $(4\pm 1)^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'analisi.

Un'eventuale torbidità del campione va rimossa per filtrazione utilizzando filtri Whatman 42 o similari.

Si procede quindi alla regolazione della temperatura del campione a $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$.

5 - APPARECCHIATURE

5.1 - Vetreria e normale attrezzatura da laboratorio

Il metodo comporta l'impiego di normale attrezzatura e vetreria da laboratorio appartenente alle classi A e B, trattate secondo quanto descritto nel Metodo UNICHIM N. 1006 (2000). In particolare: ansa a L in vetro; ansa sterilizzabile alla fiamma; becco bunsen; becker mL 500; bottiglie pyrex mL 1000; capsule Petri \varnothing cm 9; cuvette mL 1; Eppendorf mL 1,5; Falcon mL 50; Filtri (Whatman 42 o similari); Gilson P200 con puntali; Parafilm; vetrino contaglobuli.

5.2 - Autoclave tipo FUS-1 (Fedegari Autoclavi)

5.3 - Bagno scuotitore termostato (tipo pbi international)

5.4 - Cappa sterile a raggi UV (tipo GELSIRE Isminsl air flow CLASS 100, Gelman Instruments)

5.5 - Centrifuga per Eppendorf (tipo Biofuge 13, Heraeus Sepatech)

5.6 - Frigorifero e freezer

5.7 - Microscopio ottico

5.8 - pHmetro (tipo HANNA Instrument)

5.9 - Spettrofotometro (tipo UVIKON 930, Kontron Instruments)

6 - REATTIVI

Il metodo prevede l'impiego di reattivi puri per analisi, che vengono distinti in chimici e biologici, conservati a $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ se non altrimenti indicato.

Reagenti chimici

6.1 - Acqua pura

Vedere norma UNI EN ISI 3696.

6.2 - HNO_3 65% (Fluka cod. 84378)

6.3 - Na_2HPO_4 (Sigma cod. S 7907)

6.4 - KH_2PO_4 (Sigma cod. P 5379)

6.5 - NaCl (Sigma cod. S 9625)

6.6 - NH_4OH (Sigma cod. A 6899)

6.7 - NaOH (Fluka cod. 71687)

6.8 - NaH_2PO_4 (Sigma cod. S 0751)

Reagenti biologici

6.9 - Agar (Fluka cod. 05040)

6.10 - 5,5'-ditio-bis-(2-acido nitrobenzoico) (DTNB) (Sigma cod. D 8130)

6.11 - Biorad protein assay (Bio-Rad cod. 500-0001)

6.12 - Etanolo 95% (Sigma cod. E 7148)

6.13 - Glicerolo (Sigma cod. G 2025)

6.14 - Glucosio (Fluka cod. 49140)

6.15 - Ioduro di acetil- β -metiltiocolina (Sigma cod. A 5751). Conservare a $(-20\pm 1)^{\circ}\text{C}$.

6.16 - Ioduro di propioniltiocolina (Sigma cod. P 2080). Conservare a $(-20\pm 1)^{\circ}\text{C}$.

6.17 - Lievito (Yeast extract) (Fluka cod. 70161)

6.18 - Maltosio (Sigma cod. M 9171)

6.19 - Peptone (Sigma cod. P 5905)

6.20 - Soluzione di riferimento di Tetraciclina (Sigma cod. T 3258)

Avvertenze. L'analisi biologica comporta, talvolta, l'utilizzo e la manipolazione di sostanze che possono individuare uno specifico rischio per l'operatore. E' pertanto responsabilità dell'utilizzatore della presente norma adottare tutte le precauzioni operative necessarie in base a quanto riportato sulle confezioni dei prodotti e a quanto previsto dalla legislazione vigente. Attenersi alle norme vigenti per lo smaltimento dei rifiuti.

7 - PROCEDIMENTO

La prima fase del metodo consiste nella preparazione del mezzo e del terreno di coltura, rispettivamente, per *D. discoideum* e per *Escherichia coli*, nonché nell'allevamento di *E. coli*.

La seconda fase del metodo consiste nell'induzione della fase moltiplicativa e differenziativa di *D. discoideum*.

La terza fase del metodo consiste nell'analisi biochimica e quantitativa dell'attività di PrChE di *D. discoideum*.

7.1 - Allevamento e conservazione delle colture di *D. discoideum*

Il ciclo di sviluppo di *D. discoideum* comprende due fasi successive entrambe inducibili in laboratorio.

Nella prima fase, indicata come moltiplicativa, cellule isolate definite amebe (Fig. 2) si fanno accrescere in mezzo di coltura axenico denominato AX-2 (vedi 7.2) dove si riproducono asessualmente per scissione binaria.

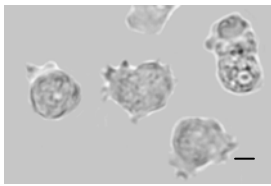


Fig. 2 - Amebe in fase moltiplicativa. (Barra = 3µm)

Le amebe in fase moltiplicativa (vedi 7.5) rappresentano i campioni ai quali applicare il metodo. L'induzione della seconda fase, indicata come differenziativa (vedi 7.6), permette di conservare le colture di *D. discoideum* in laboratorio. Le amebe che si accrescono in mezzo AX-2, vanno seminate su piastre di agar-N (vedi 7.3) che contengono un monostrato di batteri *E. coli* ceppo B2 (vedi 7.4). Esaurite le risorse alimentari, le amebe migrano verso un centro di aggregazione e formano, al termine del processo di differenziamento, un aggregato cellulare, il corpo fruttifero (Fig. 3), costituito da cellule dello stelo destinate a morire e da cellule che conservano la capacità riproduttiva, le spore.

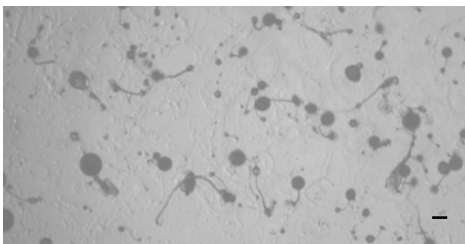


Fig. 3 - Corpi fruttiferi (Barra = 300µm)

Per mantenere *D. discoideum* in laboratorio, le piastre contenenti i corpi fruttiferi vanno conservate in frigorifero alla temperatura di (4±1)°C. Per indurre la fase moltiplicativa, i corpi fruttiferi vanno trasferiti in mezzo AX-2 (vedi 7.5).

7.2 - Preparazione del mezzo di coltura AX-2 per *D. discoideum*

Per ottenere 1000 mL di mezzo di coltura, si trasferiscono in due bottiglie pyrex da 1000 mL i seguenti reattivi:

peptone di carne gr. 7,150
 estratto di lievito gr. 3,575
 Na₂HPO₄ anidro gr. 0,246
 KH₂PO₄ gr. 0,243
 maltosio gr. 9,000
 acqua pura 500 mL

Agitare fino a completo dissolvimento. Le soluzioni ottenute vanno aggiustate a pH 6,7±0,05, autoclavate a (121±1)°C per 20 minuti ± 30 secondi e conservate in frigorifero a (4±1)°C (Watts e Ashworth, 1970; Schwab e Roth, 1970).

7.3 - Preparazione del terreno agar-N per *E. coli*

Per ottenere 1000 mL di terreno agar-N (Swan et al., 1977, modificato), si trasferiscono in due bottiglie pyrex da 1000 mL i seguenti reattivi:

glucosio gr. 0,5
 peptone gr. 0,5
 agar gr. 10
 tampone Sorensen 1x, 17 mM, pH 6,0±0,05, 500 mL
 Il tampone Sorensen 1x viene preparato diluendo in 980 mL di acqua pura, 20 mL di soluzione Sorensen 50x (KH₂PO₄ gr. 24,965, Na₂HPO₄ gr. 3,550, acqua pura fino a 250 mL). Conservare in frigorifero a (4±1)°C.

Le soluzioni ottenute vanno autoclavate a (121±1)°C per 20 minuti ± 30 secondi, lasciate raffreddare fino alla temperatura di (45±1)°C, quindi distribuite in capsule Petri nella quantità di 20 mL per capsula. Per evitare inquinamenti, è necessario che il trasferimento delle soluzioni in capsule avvenga sotto cappa sterile a raggi UV. Dopo raffreddamento, le capsule vanno chiuse con parafilm e conservate in frigorifero a (4±1)°C.

7.4 - Allevamento di *E. coli* ceppo B2

Il ceppo B2 di *E. coli*, accresciuto in provetta Falcon sterile contenente mezzo di coltura LB, va conservato in freezer, alla temperatura di (-20±1)°C, dopo aggiunta di 150 µL di glicerolo ogni 800 µL di coltura batterica.

Preparazione del mezzo di coltura LB: in due bottiglie pyrex da mL 1000, diluire in mL 500 di acqua pura, gr. 5 di peptone, gr. 2,5 di estratto di lievito e gr. 5 di NaCl. Autoclavare per 20 minuti ± 30 secondi a (121±1)°C e conservare in frigorifero a (4±1)°C.

Per indurre la riproduzione batterica, si preleva sotto cappa sterile un'ansata dallo stock batterico congelato che va inoculata in una Falcon sterile contenente 3 mL di mezzo di coltura LB.

Avvenuto il trasferimento, si pone la Falcon a $(21\pm 1)^\circ\text{C}$ per una notte. La coltura viene quindi distribuita su piastre (capsule Petri) di terreno agar-N (vedi 7.3) nella quantità di 30 μL per piastra, lavorando sotto cappa sterile. Mediante ansa a L di vetro sterilizzata alla fiamma, i batteri vanno distribuiti sul substrato in modo da ottenere, dopo una notte alla temperatura di $(23\pm 1)^\circ\text{C}$, un monostrato batterico. Al termine dell'incubazione, le piastre vanno chiuse con parafilm e conservate capovolte in frigorifero alla temperatura di $(4\pm 1)^\circ\text{C}$.

La formazione di un monostrato uniforme è molto importante, in quanto solo in tal modo la crescita di *D. discoideum* risulta omogenea e gli ottavi di piastra da seminare in mezzo di coltura AX-2 sono tra loro equivalenti (vedi 7.6).

7.5 - Induzione della fase moltiplicativa di *D. discoideum* (amebe, Fig. 2)

Le colture di *D. discoideum*, nella fase di corpi fruttiferi accresciuti su piastre agar-N (vedi 7.6), vanno conservate in frigorifero a $(4\pm 1)^\circ\text{C}$. Per indurre la fase moltiplicativa di amebe isolate, 1/8 dei corpi fruttiferi presenti sulla piastra va prelevato con ansa sterile, sotto cappa sterile, e trasferito in Falcon sterile contenente 15 mL di mezzo di coltura AX-2 e 30 μL di soluzione di tetraciclina (mg. 5 di tetraciclina in 1 mL di etanolo 95%) che previene eventuali inquinamenti senza interferire con il ciclo riproduttivo delle amebe, secondo il metodo modificato di Watts e Ashworth (1970) e di Swan et al. (1977).

Le colture vanno trasferite in bagno scudatore termostato e mantenute in agitazione alla temperatura di $(21\pm 1)^\circ\text{C}$. La crescita delle amebe risulta favorita da una certa areazione che si ottiene svitando leggermente il tappo delle Falcon.

Dopo 72 ore \pm 5 ore, va eseguito il monitoraggio della crescita delle colture, prelevando da ciascuna Falcon 10 μL di coltura e contando al microscopio ottico il numero di amebe presenti su un vetrino contaglobuli. Le amebe misurano mediamente 10 μm di diametro e, per una migliore identificazione, vanno osservate ad ingrandimento finale non inferiore a 400x.

La crescita va considerata ottimale se la densità delle amebe è pari a circa $2\cdot 3\cdot 10^6$ cellule/mL. A tale densità della coltura vanno prelevati i campioni di amebe per il saggio spettrofotometrico. Al fine di verificare la vitalità delle cellule, va osservato al microscopio ottico se il loro aspetto è ameboide. La coltura accresciuta in Falcon può essere mantenuta a densità ottimale trasferendo metà del contenuto in una nuova Falcon sterile e aggiungendo a entrambe mezzo AX-2, fino al volume di 15 mL, e 30 μL di tetraciclina.

7.6 - Induzione della fase differenziativa di *D. discoideum* (corpi fruttiferi, Fig. 3)

Per conservare in laboratorio le colture di *D. discoideum*, è necessario indurre la fase differenziativa in modo da ottenere i corpi fruttiferi.

Dalle Falcon contenenti una coltura di amebe a densità ottimale in mezzo AX-2, vanno prelevate sotto cappa sterile 8 gocce di coltura, ciascuna da 10 μL , e trasferite su piastra agar-N contenente un monostrato di *E. coli*. Le piastre così seminate vanno incubate in camera umida alla temperatura di $(21\pm 1)^\circ\text{C}$ per almeno 72 ore \pm 5 ore. Al termine del differenziamento, riscontrabile dal totale consumo della componente batterica e dalla presenza di uno strato uniforme di corpi fruttiferi, visibili a occhio nudo, le piastre vanno chiuse con parafilm e conservate capovolte in frigorifero a $(4\pm 1)^\circ\text{C}$.

7.7 - Metodo biochimico quantitativo dell'attività di PrChE

La coltura di amebe accresciute alla densità ottimale in mezzo AX-2 (vedi 7.5) va concentrata per centrifugazione e il pellet trasferito in Eppendorf, suddividendolo in due aliquote, di cui una rappresenta il campione controllo e l'altra il campione sperimentale, entrambi da sottoporre ad analisi. Il campione controllo e il campione sperimentale vanno esposti, rispettivamente, ad acqua pura e all'acqua da analizzare per la presenza di fitofarmaci neurotossici (vedi 7.8).

Il campione sperimentale e quello controllo vanno centrifugati e i pellet risospesi in tampone fosfato (PB) al quale va aggiunto DTNB (vedi 7.9). Entrambi i campioni contenuti in Eppendorf vanno trasferiti nelle celle per l'analisi spettrofotometrica. Alle celle va aggiunto il substrato PrTChI e immediatamente dopo va eseguita la prima lettura dell'attività di PrChE presente nel campione sperimentale e nel controllo. Trascorsi 10 minuti, si esegue la seconda lettura. L'attività di PrChE viene espressa come unità di ChE e viene misurata almeno 3 volte nei campioni sperimentali e nei controlli, calcolandone il valore medio e la deviazione standard che vengono elaborati utilizzando un test statistico (vedi 8).

7.8 - Preparazione e trattamento dei campioni

Almeno 30 mL di coltura di amebe accresciute alla densità ottimale in mezzo AX-2 vanno concentrate mediante centrifugazione per 10 minuti a 5100 rpm a $(4\pm 1)^\circ\text{C}$, al fine di ottenere un pellet di almeno 20 μL . Tale pellet va trasferito in Eppendorf, suddividendolo in due aliquote di 10 μL ciascuna, di cui una rappresenta il campione controllo e l'altra il campione sperimentale, entrambi da sottoporre ad analisi. Il campione controllo e il campione sperimentale vanno esposti, rispettivamente, a 1 mL di acqua pura e a 1 mL di acqua da analizzare, per 15 minuti \pm 30 secondi a $(25\pm 1)^\circ\text{C}$.

7.9 - Reazione enzima/substrato e lettura dell'attività allo spettrofotometro

Il campione sperimentale e quello controllo vanno centrifugati per 10 minuti a 5100 rpm a $(4\pm 1)^\circ\text{C}$ e i pellet risospesi in 400 μL di PB 0,2 M, pH $8,0\pm 0,05$, al quale vanno aggiunti 200 μL di DTNB 6,3 mM in PB, pH

7,0±0,05. Entrambi i campioni contenuti in Eppendorf vanno trasferiti nelle celle per l'analisi spettrofotometrica. Alle celle vanno aggiunti 400 µL del substrato PrTChI 0,025 M in PB, pH 8,0±0,05, e immediatamente dopo, ossia al tempo 0 (t₀), va eseguita la prima lettura, alla lunghezza d'onda di 412±0,1 nm e alla temperatura di (25±1)°C, dell'attività di PrChE presente nel campione sperimentale e nel controllo.

Preparazione di 100 mL di PB 0,2 M a pH 8,0±0,05: aggiungere a 5,3 mL di Na₂HPO₄ 0,2 M (soluzione A), 94,7 mL di NaH₂PO₄ 0,2 M (soluzione B).

La seconda lettura va eseguita dopo 10 minuti ± 1 secondo ed è riferita come t₁₀.

Il tempo 10 minuti è considerato tempo standard, in quanto nei controlli si è osservato che alla temperatura di (25±1)°C e a pH 8,0±0,05, dopo 10 minuti dall'aggiunta del substrato l'attività di PrChE non raggiunge il valore *plateau* che renderebbe errata la valutazione dell'attività enzimatica.

8 - CALCOLI

L'attività di PrChE, espressa come Unità di PrChE (UPrChE), corrisponde alla differenza tra il valore della Densità Ottica (DO) rilevato a t₁₀ e quello rilevato a t₀ moltiplicata per il valore del coefficiente di Ellman et al. (1961) pari a 13,6. Il prodotto va diviso per il valore delle proteine totali (PT) espresse in µg/µL, calcolato seguendo le istruzioni allegate al kit Biorad protein assay (vedi 6.11).

$$\text{UPrChE} = \frac{(\text{DO}_{10} - \text{DO}_0) \cdot 13,6}{\text{PT}}$$

L'attività dell'enzima va misurata almeno 3 volte nei campioni sperimentali e nei controlli. I dati vanno elaborati calcolando il valore medio (V_m) e la deviazione standard (d.s.). Per confrontare l'attività enzimatica media del campione sperimentale con quella del controllo, può essere applicato il test-*t* di Student utilizzando il software DOS Primer.exe. Il test è positivo se il valore medio del campione sperimentale risulta significativamente inferiore a quello del controllo (P<0,05).

9 - QUALITÀ DEL DATO ANALITICO

A esemplificazione del metodo, consideriamo il caso in cui il pellet di amebe venga esposto, per 15 minuti ± 30 secondi a (25±1)°C (vedi 7.8), a composti organofosfati, quali basudin, o carbammati, quali carbaril, in soluzione acquosa alla concentrazione di 10 µg/L, pH 8,0±0,05. I valori dell'attività di PrChE, misurati nei campioni sperimentali e nel controllo (vedi 7.9) ed elaborati secondo quanto descritto precedentemente (vedi 8), sono riportati nelle seguenti tabelle (Tabb.1-2).

Tab. 1

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	V _m ± d.s.	t	P
Basudin	0,85	0,81	0,89	0,85±0,04	31,5	<0,001
Controllo	1,80	1,76	1,74	1,76±0,03		

Tab. 2

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	V _m ± d.s.	t	P
Carbaril	0,76	0,71	0,78	0,75±0,04	34,9	<0,001
Controllo	1,80	1,76	1,74	1,76±0,03		

Il confronto delle medie di 3 esperimenti evidenzia diminuzione significativa (P<0,001) dell'attività media di PrChE in presenza di basudin (Tab. 1) o di carbaril (Tab. 2), rispetto al controllo.

9.1 - Precisione

La precisione del metodo dipende dalla precisione dello spettrofotometro utilizzato. Nel caso dello spettrofotometro UVIKON 930, il range di precisione è di 0,1 nm.

9.2 – Ripetibilità

I valori esigui delle deviazioni standard riportati in Tabb.1-2 rappresentano un indice apprezzabile della buona ripetibilità del metodo.

9.3 - Riproducibilità

Allo stato attuale non sono disponibili i dati riguardanti la riproducibilità del metodo, in quanto non è stato eseguito in laboratori differenti.

10 - RAPPORTO DI PROVA

Il resoconto di prova dovrà contenere le seguenti indicazioni:

- il riferimento al metodo impiegato;
- i dati per l'identificazione del campione;
- il risultato e il modo di espressione usato;
- ogni altra informazione relativa ai dettagli operativi che possono avere influenzato il risultato.

Ringraziamenti

Gli Autori desiderano ringraziare il Dott. Franco Leoncini per i suoi preziosi suggerimenti e consigli nella stesura di questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

Amaroli A., Gallus L., Passalacqua M., Falugi C., Viarengo A. e Delmonte Corrado M.U. (2003): "Detection of cholinesterase activities and acetylcholine receptors during the developmental cycle of *Dictyostelium discoideum*", *Europ. J. Protistol.*, **39**, 213-222.

Delmonte Corrado M.U., Ognibene M., Trielli F., Politi H., Passalacqua M. e Falugi C. (2002): "Detection of molecules related to the GABAergic system in a single-cell eukaryote, *Paramecium primaurelia*", *Neurosci. Letters*, **329**, 65-68.

Delmonte Corrado M.U., Politi H., Ognibene M., Angelini C., Trielli F., Ballarini P. e Falugi C. (2001): "Synthesis of the signal molecule acetylcholine during the developmental cycle of *Paramecium primaurelia* (Protista, Ciliophora) and its possible role in conjugation", *J. Exp. Biol.*, **204**, 1901-1907.

Delmonte Corrado M.U., Politi H., Trielli F., Angelini C. e Falugi C. (1999): "Evidence for the presence of a mammalian-like cholinesterase in *Paramecium primaurelia* (Protista, Ciliophora) developmental cycle", *J. Exp. Zool.*, **283**, 102-105.

Dutta H., Marcelino J. e Richmonds C. (1997): "Brain AChE activity and optomotor behavior in bluegills *Lepomis macrochirus* exposed to different concentrations of diazinon", *Arch. Intern. Physiol. Biochim. Biophys.*, **100**, 331-334.

Ellman G.L., Curtney K.D., Andres V. e Featherstone R.M. (1961): "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95.

Falugi C., Amaroli A., Evangelisti V., Viarengo A. e Delmonte Corrado M.U. (2002): "Cholinesterase activity and effects of its inhibition by neurotoxic drugs in *Dictyostelium discoideum*", *Chemosphere*, **48**, 407-414.

Ghosh P. e Bhattacharya S. (1992): "In vivo and in vitro AChE inhibition by metacid-50 and carbaryl in *Channa punctatus* under natural field conditions", *Biomed. Environ. Sci.*, **5**, 18-24.

Kennedy S.W. (1991): "The mechanism of organophosphate inhibition of cholinesterase. Proposal for a new approach to measuring inhibition", in: *Cholinesterase-inhibiting Insecticides: their Impact on Wildlife and the Environment. Chemicals in Agriculture*, Vol. 2. P. Mineau (ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 74-87.

Kuhr R.J. e Dorrough H.W. (1976): "Mode of action", in: *Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*, R.J. Kuhr, H.W. Dorrough (ed.), CRC Press, Cleveland, OH, pp. 41-70.

Lundebuy A.K., Curtis T.M., Braven J. e Depledge M.H. (1997): "Effects of the O.P. pesticide, dimethoate on cardiac and AChE activity in the shore crab, *Carcinus maenas*", *Aquatic Toxicol.*, **40**, 23-36.

Mendel B. e Rudney H. (1943): "Studies on cholinesterase and pseudo-cholinesterase", *Biochem. J.*, **37**, 59-64.

Mora P., Fournier D. e Narbonne J.F. (1999): "Cholinesterase from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller", *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **122**, 353-361.

Rakonczay Z. (1986): "Mammalian brain acetylcholinesterase", in: *Neuromethods. Neurotransmitter Enzymes*, Vol. 5. A.A. Boulton, G.B. Baker, P.H. Yu (ed.), Humana Press, Clifton, NJ, pp. 319-360.

Rattner B.A. e Fairbrother A. (1991): "Biological variability and the influence of stress on cholinesterase activity", in: *Cholinesterase-inhibiting Insecticides: their Impact on Wildlife and the Environment. Chemicals in Agriculture*, Vol. 2. P. Mineau (ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 90-107.

Schwalb M. e Roth R. (1970): "Axenic growth and development of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*", *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 283-286.

Stedman A. e Easson L.H. (1932): "Cholinesterase: an enzyme present in blood serum of horse", *Biochem. J.*, **26**, 2056-2064.

Swan P., Garrod D.R. e Morris D. (1977): "An inhibitor of cell cohesion from axenically grown cells of the slime mould *Dictyostelium discoideum*", *J. Cell Sci.*, **28**, 107-116.

Talesa V., Contenti S., Mangiabene C., Pascolini R., Rosi G. e Principato G.B. (1990): "Propionylcholinesterase from *Murex brandaris*: comparison with other invertebrate cholinesterases", *Comp. Biochem. Physiol.*, **96C**, 39-43.

Trielli F., Politi H., Falugi C. e Delmonte Corrado M.U. (1997): "Presence of molecules related to the cholinergic system in *Paramecium primaurelia* (Protista, Ciliophora) and possible role in mating pair formation: an experimental study", *J. Exp. Zool.*, **279**, 633-638.

Watts D.J. e Ashworth J.M. (1970): "Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture", *Biochem. J.*, **119**, 171-174.

IMPIEGO DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA NELLA DETERMINAZIONE DI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI (VOC) IN MATRICI ACQUOSE

a cura di Passarino G.*, Radeschi M.*. Bertero S.* e Capri S.**

*ARPA Piemonte, Dipartimento di Torino, Presidio di Grugliasco

**IRSA-CNR, Roma

RIASSUNTO

Viene presentato un protocollo analitico per la determinazione di 54 composti organici volatili, o VOC, (38 composti organoalogenati e 16 idrocarburi aromatici), in matrici acquose. La determinazione viene effettuata mediante analisi gascromatografica applicata allo spazio di testa dinamico accoppiata alla spettrometria di massa.

INTRODUZIONE

Nel volume II dei "Metodi analitici per le acque" APAT-IRSA CNR 29/2003 sono stati pubblicati i metodi 5140 e 5150 ove sono contemplate separatamente le determinazioni, rispettivamente, dei solventi organici aromatici e dei solventi clorurati in campioni acquosi, con metodo gascromatografico applicato allo spazio di testa statico (metodo A) e dinamico (metodo B).

Per quanto riguarda il metodo B è previsto in entrambi i casi l'utilizzo di un gascromatografo con rivelatori specifici (PID per i solventi organici aromatici e ECD oppure Hall per i solventi clorurati). Limitatamente ai solventi clorurati si cita la possibilità di utilizzo di un rivelatore di massa.

In questo lavoro viene presentato un protocollo analitico per la determinazione di composti organici volatili (composti organoalogenati e idrocarburi aromatici), in un'ampia gamma di matrici acquose. La determinazione viene effettuata mediante analisi gascromatografica con spazio di testa dinamico (Purge and trap) e rivelatore di massa, il quale consente, tra l'altro, una più sicura identificazione

degli analiti. Sono stati altresì calcolati i limiti di rivelabilità ed i limiti di quantificazione per i 54 analiti testati e la precisione del metodo.

1 – PRINCIPIO DEL METODO

Gli analiti vengono dapprima estratti dalla matrice acquosa mediante il gorgogliamento di un gas inerte in un determinato volume di campione, quindi intrappolati in un apposito materiale adsorbente. Terminata l'estrazione, la trappola viene riscaldata e gli analiti sono trascinati da un flusso di gas inerte in testa alla colonna cromatografica, separati e quindi rivelati mediante spettrometria di massa.

2 – CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo consente la determinazione dei composti organici volatili, elencati in Tab. 1a-1b, in acque superficiali, sotterranee, destinate al consumo umano o alla produzione di acqua potabile, minerali, di dialisi. Il campo di applicazione dipende dalle prestazioni strumentali, dai volumi impiegati e dai requisiti normativi richiesti; con la strumentazione e le matrici descritte nel presente lavoro esso risulta compreso tra 0,1 e 10 µg/L per i composti organoalogenati e il benzene e tra 0,5 e 10 µg/L per gli altri idrocarburi aromatici.

Tab. 1a – Composti organoalogenati volatili analizzabili con il presente metodo

1,1-Dicloroetilene	1,3-Dicloropropano
Diclorometano	Tetracloroetilene
trans-1,2-Dicloroetilene	Dibromoclorometano
1,1-Dicloroetano	1,2-Dibromoetano
2,2-Dicloropropano	Clorobenzene
cis-1,2-Dicloroetilene	1,1,1,2-Tetracloroetano
Bromoclorometano	Bromoformio
Cloroformio	1,1,2,2-Tetracloroetano
1,1,1-Tricloroetano	1,2,3-Tricloropropano
1,1-Dicloropropene	Bromobenzene
Tetraclorometano	2-Clorotoluene
1,2-Dicloroetano	4-Clorotoluene
Tricloroetilene	1,3-Diclorobenzene
1,2-Dicloropropano	1,4-Diclorobenzene
Dibromometano	1,2-Diclorobenzene
Bromodiclorometano	1,2-Dibromo-3-Cloropropano
cis-1,3-Dicloropropene	1,2,4-Triclorobenzene
trans-1,3-Dicloropropene	Esaclorobutadiene
1,1,2-Tricloroetano	1,2,3-Triclorobenzene

Tab. 1b – Idrocarburi aromatici volatili analizzabili con il presente metodo

Benzene	1,3,5-Trimetilbenzene
Toluene	terz-Butilbenzene
Etilbenzene	sec-Butilbenzene
m,p-Xilene	1,2,4-Trimetilbenzene
o-Xilene	4-Isopropiltoluene

Stirene	n-Butilbenzene
Isopropilbenzene	Naftalene
n-Propilbenzene	

Qualora se ne renda necessaria la determinazione, la gamma degli analiti ricercati può essere implementata con altri composti organici volatili, quali: Cloruro di vinile, Diclorodifluorometano, Clorometano, Bromoetano, Cloroetano, Triclorotrifluoroetano, Metilterbutiletere.

3 – INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Composti organici aventi tempi di ritenzione coincidenti con quelli degli analiti in esame possono essere considerati interferenti; l'utilizzo di un rivelatore selettivo come il rivelatore di massa consente di evitare o ridurre i loro effetti.

Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro possono essere causa di artefatti ed elevate linee di base che possono determinare errori nell'interpretazione dei dati cromatografici. Si deve dimostrare che tutti i materiali non diano interferenze nelle condizioni di analisi adottate con l'utilizzo di prove in bianco.

La presenza di composti altobollenti parzialmente coestratti può creare difficoltà durante l'analisi allungandone sensibilmente i tempi. Per rimuovere detti composti è necessario elevare la temperatura della colonna cromatografica fino al massimo valore consentito dalla fase stazionaria impiegata e attendere che la linea di base si stabilizzi prima di passare al raffreddamento del forno e all'introduzione del campione successivo.

La presenza di cloro libero residuo nelle acque, proveniente da trattamenti di disinfezione, può alterare sensibilmente i risultati analitici a causa della possibile formazione di trialometani. In presenza di cloro si possono aggiungere piccole quantità di un riducente al momento del campionamento (ad esempio tiosolfato di sodio), previo controllo della purezza del riducente stesso.

4 – CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il campionamento viene effettuato in bottiglie da 250 mL con tappo a vite senza spazio di testa, possibilmente allestendo il bianco reagente di campo (contenitore riempito in laboratorio con acqua ultrapura esente da composti volatili e condotto attraverso tutte le fasi del campionamento e trasporto). Il trasporto deve avvenire in condizioni refrigerate.

Il campione, dal momento del ricevimento, viene conservato in frigorifero ad una temperatura di $4 \pm 3^\circ\text{C}$. L'inizio dell'analisi è tassativamente fissato entro 48 ore, considerando come inizio analisi il momento in cui viene riempito il vial di lavoro. Il campione è

analizzato entro le successive 24 ore. Esulano da questi vincoli le acque minerali in bottiglie ad uso commerciale.

5 – APPARECCHIATURE

5.1 - Bottiglie di vetro per la raccolta del campione con tappo a vite (capacità almeno 100 mL).

5.2 - Cappa chimica e dispositivi di protezione individuali per manipolazione di riferimenti e campioni.

5.3 - Flaconcini di vetro (vials) di adeguato volume, con tappo con ghiera di alluminio e guarnizione in silicone teflonata, a chiusura ermetica.

5.4 - Matracci o palloni tarati di classe A di vario volume, per la preparazione e la diluizione delle soluzioni a concentrazione nota dei diversi VOC e per la preparazione delle soluzioni di taratura.

5.5 - Pipette tarate di vario volume, a doppia tacca, classe A.

5.6 - Spatola di acciaio per pesate di sostanze solide.

5.7 - Microsiringhe tarate per liquidi di vari volumi (10, 50, 250 μL).

5.8 - Siringhe monouso di volume adeguato.

5.9 - Pinze per chiusura ed apertura vials.

5.10 - Bilancia tecnica – risoluzione 0,1 g.

5.11 - Bilancia analitica – risoluzione 0,1 mg.

5.12 - Sistema “Purge and trap”.

5.13 - Gascromatografo, dotato di autocampionatore (eventuale) e di rivelatore di massa.

5.14 - Colonna cromatografica: capillare di vetro o silice fusa con fase stazionaria di media polarità, di opportuna lunghezza e diametro interno.

5.15 - Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici

5.16 - Dispositivo per l'erogazione di elio o idrogeno puro per gascromatografia. Il gas di trasporto viene eventualmente fatto passare attraverso una trappola a carbone attivo e una trappola a setacci molecolari tipo 5A; un'ulteriore purificazione può essere fatta tramite passaggio in una trappola per l'eliminazione delle tracce d'ossigeno.

La vetreria e i materiali impiegati devono essere riservati alla procedura analitica in oggetto. La vetreria di cui ai

punti 5.1, 5.3, 5.4 dopo il lavaggio va trattata a 180-200°C per almeno 3 ore e raffreddata prima dell'uso; i tappi e le guarnizioni lavati in n-pentano e asciugati in stufa a 90°C. Le fiale, o vials, devono essere trattate a 200°C per almeno 3 ore; nel caso rivelino la presenza di composti altobollenti, le fiale andranno trattate a temperature superiori, anche 400°C, ed eventualmente con miscela cromica.

6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua da utilizzare per il bianco, per le soluzioni di riferimento nonché per le eventuali diluizioni dei campioni, dovrà essere esente dai contaminanti oggetto dell'analisi. La verifica del bianco, per ogni "batch" di analisi, viene effettuata, ad esempio, analizzando due aliquote all'inizio della sequenza analitica e un'altra aliquota immediatamente dopo le soluzioni di taratura e di controllo. Le concentrazioni degli analiti eventualmente riscontrati dovranno essere inferiori al livello minimo di quantificazione.

6.1 - Carbone attivo per l'eliminazione delle impurezze gassose o allo stato di vapore; va conservato in modo da proteggerlo dall'adsorbimento di impurezze presenti nell'ambiente del laboratorio.

6.2- Setacci molecolari tipo 5 A attivati a 350°C per alcune ore in corrente di gas inerte.

6.3 - Metanolo (CH₃OH)

6.4 - Tiosolfato di sodio (Na₂S₂O₃)

6.5 - Composti organici volatili di elevata purezza, certificata, per la preparazione delle soluzioni di taratura. Verificare che ogni composto dia un solo picco cromatografico nelle condizioni di lavoro previste per le soluzioni di taratura. In considerazione della composizione molto variabile dei campioni d'acqua da analizzare, è opportuno disporre anche di soluzioni di taratura dei singoli composti oltre che delle miscele.

6.5.1 - Soluzioni concentrate (2000 mg/L)

Allestire le soluzioni concentrate (2000 mg/L) dei singoli composti, o loro miscele, a partire dai riferimenti certificati. Trasferire con una microsiringa un'aliquota di ciascun riferimento certificato in altrettanti recipienti tarati contenenti alcuni millilitri di metanolo (6.3), in modo da limitare l'evaporazione dei composti, pesare e portare a volume con lo stesso solvente, mescolando con cura. Il volume dell'aliquota da prelevare si può calcolare dal valore

della densità del riferimento utilizzato. Con le stesse modalità può essere preparata direttamente una miscela di più componenti a partire dai singoli riferimenti certificati e usando un unico recipiente tarato. Queste soluzioni, tenute chiuse in congelatore a -18±3, sono stabili almeno un anno dal momento della preparazione. In alternativa si possono usare soluzioni commerciali certificate contenenti i composti di interesse, singoli o in miscele di vario tipo, a concentrazione nota in metanolo.

L'utilizzo di tali soluzioni è consigliabile nel caso del cloruro di vinile, per evitare di applicare complesse procedure nella preparazione in condizioni di sicurezza della soluzione concentrata a partire dal prodotto puro (il cloruro di vinile è un gas classificato R45, cancerogeno).

6.5.2 - Soluzioni di riferimento (200 mg/L)

Preparare le soluzioni di riferimento diluendo opportunamente in metanolo le soluzioni 6.5.1. Queste soluzioni, tenute chiuse in congelatore a -18±3°C, sono stabili un anno dal momento della preparazione. Tale stabilità appare sufficientemente cautelativa considerando che per soluzioni di pari concentrazione (200 mg/L in metanolo) disponibili in commercio vengono riportati intervalli di stabilità di almeno 2 anni. Le soluzioni 6.5.2, conservate in congelatore a -18±3 °C, hanno validità di 1 mese dalla data di apertura.

Preparare, giornalmente, soluzioni di riferimento diluite da impiegare per la costruzione delle curve di taratura, diluendo opportunamente in acqua le soluzioni 6.5.2.

7 – PROCEDIMENTO

7.1 - Taratura

All'inizio di ogni ciclo analitico costruire le curve di taratura per i diversi analiti utilizzando soluzioni di riferimento diluite in numero sufficiente a garantire una corretta interpolazione delle concentrazioni misurate. Tre soluzioni aventi concentrazioni comprese tra il livello minimo di quantificazione e 2,5 µg/L per le acque minerali oppure 10 µg/L per le altre matrici acquose sono generalmente sufficienti.

La curva è accettabile quando fornisce un $R^2 \geq 0,99$. La sua stabilità è verificata per mezzo di soluzioni di controllo scelte all'interno del campo di prova, inserite nel ciclo analitico, ad esempio, ogni 10 campioni e comunque alla fine del ciclo stesso (controllo di batch).

La concentrazione degli analiti, letta sulla retta di taratura, non deve scostarsi più del 30% dal valore nominale.

7.2 – Condizioni strumentali

Nel seguito sono riportate a titolo esemplificativo la strumentazione utilizzata (Tab.2a) e le condizioni

operative tipiche adottate per l'analisi (Tab. 2b).

Tab.2a – Strumentazione utilizzata

"Purge and trap"	Tekmar 3000*
Autocampionatore	Archon con bagno refrigerante
Gascromatografo	Varian mod. 3400
Rivelatore di massa Ion trap	MS Saturn Varian 2200

* Il sistema Purge and trap Tekmar Velocity XPT consente di ottenere analoghe prestazioni, operando con volumi di 5 mL per tutte le matrici e senza dover ricorrere al condizionamento iniziale della trappola a 25°C.

Tab. 2b – Condizioni operative strumentali

Gas di trasporto	He
Flusso in colonna	1,2 mL/min
Tipo di trappola	VOCARB 4000-I: l=30 cm, diam. int. 3 mm
T iniziale trappola	25°C
Tempo e flusso di purge	10 min ; 40 mL/min
Tempo di dry purge	4 min
Tempo e T riscaldamento campione	2 min ; 40°C
T desorb preheat	225°C
Tempo e T di desorb	4 min ; 235°C
Tempo e T di bake	10 min ; 250°C
Tipo di colonna	DB 624: 60 m, 0,25 mm; 1,4 µm
Programma di temperatura	35°C, isoterma 8 min, rate 10°C/min; 160°C, isoterma 12 min, rate 20°C/min; 200°C, isoterma 7,5 min
Rivelatore	rivelatore di massa, ionizzazione a impatto elettronico; trappola ionica, energia 70 eV (nominali)
T trappola ionica	190°C
T Manifold	80°C
T Transferline	150°C
Scansioni	da 40 a 260 amu con scansioni inferiori a ogni 2 sec
Ione Primario m/z	Vedi Tab. 4
Autotune con perfluorotributilammina (PFTA)	frequenza minimo settimanale ogniqualvolta si renda necessario.
Temperatura iniettore	200°C
Split ratio	10

7.3 - Analisi

Introdurre manualmente, o mediante autocampionatore, le soluzioni di taratura e i campioni acquosi nel dispositivo "Purge and trap". Generalmente vengono utilizzati volumi pari a 5 mL.

Per le acque minerali e tutti quei casi in cui viene richiesta una maggiore sensibilità, ad esempio la ricerca del cloruro di vinile, si usano 25 mL. Diluire eventualmente il campione qualora le concentrazioni degli analiti riscontrate superino il valore massimo riportato dalla curva di taratura.

Le misure vengono effettuate con la tecnica del riferimento esterno. Qualora si voglia adottare la tecnica del riferimento interno si possono utilizzare il Trifluorobenzene, oppure l'1-Cloro-2-Fluorobenzene, oppure altro composto idoneo.

8 - CALCOLI

8.1 - Metodo di taratura diretta o con riferimento esterno

Costruire le rette di taratura per i singoli analiti, riportando in grafico l'area del picco di ogni composto in funzione della concentrazione e interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare e l'intercetta della retta di taratura. Calcolare la concentrazione incognita di ogni composto, espressa in µg/L.

8.2 - Metodo con riferimento interno

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, riportare in grafico il rapporto area picco composto/area picco riferimento interno in funzione della concentrazione del composto stesso.

9 - QUALITA' DEL DATO ANALITICO

9.1 - Precisione

In Tab. 3a-3b sono riportati i risultati ottenuti da prove di ripetibilità eseguite per i vari analiti (tranne l'1,2-Dibromo-3-Cloropropano), su 5 livelli di concentrazione con volume di campione pari a 5 mL e 6 repliche per ogni livello.

9.2 - Limite di rivelabilità

Sono stati determinati i valori MDL (limite di rivelabilità del metodo) secondo la procedura 1030 C APHA (1998) con volume di campione pari a 25 mL; i valori per i vari analiti, insieme con i tempi di ritenzione e i valori m/z dello ione primario, sono riportati in Tab. 4.

BIBLIOGRAFIA

APAT-IRSA (2003): "Metodi analitici per le acque", Manuali e Linee guida 29/2003.

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard methods for the examination of water and wastewater", XX Ed., (APHA, Washington).

U.S. Environmental Protection Agency (1995): Method

524.2: "Measurement of purgeable organic compounds in water by capillary column gas chromatography/mass spectrometry" U.S. EPA, National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio.

Rapporti ISTISAN 04/xxx "Determinazione del benzene: metodo gascromatografico applicato allo spazio di testa statico e allo spazio di testa dinamico", pubblicato sul sito www.iss.it.

Tab. 3a - Risultati prove di ripetibilità composti organoalogenati

Analita	0,1 µg/L		0,5 µg/L		2,0 µg/L		5,0 µg/L		10 µg/L	
	CV%	scarto tipo	CV%	scarto tipo	CV%	scarto tipo	CV%	scarto tipo	CV%	scarto tipo
COMPOSTI ORGANOALOGENATI										
1,1-Dicloroetilene	5,3	0,005	9,9	0,05	14,0	0,23	6,4	0,30	5,5	0,57
Diclorometano (Cloruro di metilene)			10,2	0,05	16,3	0,29	6,4	0,31	4,5	0,40
trans-1,2-Dicloroetilene			6,2	0,03	14,0	0,24	6,1	0,28	2,6	0,25
1,1 Dicloroetano			8,2	0,04	13,2	0,24	6,0	0,29	5,8	0,52
cis-1,2-Dicloroetilene			8,6	0,04	13,8	0,26	6,1	0,28	4,5	0,43
2,2-Dicloropropano			8,0	0,04	12,0	0,22	5,0	0,23	2,1	0,24
Bromoclorometano			7,9	0,04	13,1	0,24	6,5	0,30	8,3	0,73
Triclorometano (Cloroformio)	13,2	0,012	6,8	0,03	4,2	0,08	6,7	0,31	6,1	0,59
1,1,1-Tricloroetano			10,5	0,05	12,7	0,24	6,2	0,29	6,3	0,62
1,1-Dicloropropene			9,2	0,04	7,3	0,15	3,8	0,18	4,8	0,49
Tetraclorometano (Tetracloruro di carbonio)			13,0	0,07	5,8	0,12	6,0	0,28	6,5	0,69
1,2-Dicloroetano	6,3	0,006	10,2	0,04	5,2	0,10	5,2	0,25	5,6	0,51
Tricloroetilene (Trielina)	9,9	0,009	7,9	0,04	14,9	0,27	6,4	0,29	5,1	0,51
1,2-Dicloropropano	7,9	0,008	10,0	0,04	7,6	0,14	5,8	0,27	5,4	0,49
Dibromometano			8,1	0,04	13,2	0,25	6,2	0,28	6,0	0,55
Bromodiclorometano	11,0	0,010	9,5	0,04	13,4	0,26	5,8	0,27	5,9	0,58
cis-1,3-Dicloropropene			13,2	0,06	5,1	0,10	4,7	0,22	4,0	0,41
trans-1,3-Dicloropropene			5,2	0,03	7,1	0,14	4,0	0,19	4,8	0,54
1,1,2-Tricloroetano	11,5	0,012	5,5	0,03	9,3	0,19	3,2	0,16	4,5	0,44
1,3-Dicloropropano			5,1	0,03	8,4	0,16	3,8	0,18	7,2	0,69
Tetracloroetilene (Percloroetilene)	15,8	0,014	8,6	0,04	9,2	0,18	4,4	0,21	4,8	0,51
Dibromoclorometano	7,7	0,008	3,7	0,02	8,0	0,17	1,6	0,07	5,0	0,52
1,2-Dibromoetano	5,5	0,005	4,9	0,03	7,9	0,16	4,8	0,23	4,7	0,46
Clorobenzene			7,9	0,04	10,9	0,20	2,9	0,14	4,9	0,49
1,1,1,2-Tetracloroetano			9,8	0,05	4,0	0,07	1,7	0,08	4,1	0,44
Tribromometano (Bromoformio)	23,2	0,020	8,5	0,04	4,9	0,10	5,1	0,24	3,6	0,38
1,1,2,2-Tetracloroetano	8,4	0,008	12,5	0,06	6,4	0,13	5,7	0,28	5,6	0,54
1,2,3-Tricloropropano	9,2	0,008	10,1	0,05	2,1	0,23	4,6	0,21	5,6	0,54
Bromobenzene			6,9	0,03	4,4	0,08	4,8	0,22	5,7	0,56
2-Clorotoluene			8,9	0,04	6,7	0,13	5,6	0,27	4,6	0,49
4-Clorotoluene			4,9	0,02	4,1	0,08	5,7	0,26	4,2	0,43
1,3-Diclorobenzene			6,0	0,03	5,7	0,11	12,5	0,52	3,8	0,38
1,4-Diclorobenzene			5,7	0,03	5,3	0,10	8,9	0,41	4,9	0,49
1,2-Diclorobenzene			7,0	0,03	5,5	0,11	5,4	0,25	3,6	0,37
1,2,4-Triclorobenzene			13,8	0,07	8,0	0,16	4,2	0,20	4,2	0,44
Esaclorobutadiene	18,7	0,018	7,5	0,04	7,2	0,14	4,4	0,21	5,9	0,61
1,2,3-Triclorobenzene			13,0	0,07	7,7	0,16	3,9	0,19	4,2	0,44

Nota: per i composti organoalogenati con livello di concentrazione 2,0 µg/L sono state eseguite 5 repliche anziché 6.

Tab. 3b - Risultati prove di ripetibilità idrocarburi aromatici

IDROCARBURI AROMATICI										
Benzene	11,0	0,011	9,4	0,04	9,4	0,18	5,5	0,27	1,8	0,18
Toluene			4,8	0,02	9,1	0,17	6,2	0,29	5,1	0,52
Etilbenzene			9,9	0,04	9,0	0,16	2,6	0,12	4,5	0,46
m,p-Xilene			8,2	0,07	8,4	0,29	2,4	0,22	3,4	0,82
o-Xilene			6,2	0,03	12,6	0,24	2,8	0,13	2,5	0,26
Stirene			6,5	0,03	10,7	0,20	3,7	0,18	3,6	0,38
Isopropilbenzene			4,9	0,02	10,9	0,20	5,4	0,25	5,4	0,58
n-Propilbenzene			6,2	0,03	11,6	0,21	5,4	0,25	6,3	0,67
1,3,5-Trimetilbenzene			7,7	0,04	9,6	0,18	4,6	0,21	5,4	0,56
terz-Butilbenzene			7,0	0,03	10,5	0,20	5,3	0,24	4,7	0,53
sec-Butilbenzene			6,6	0,03	11,4	0,21	4,2	0,19	5,2	0,59
1,2,4-Trimetilbenzene			7,5	0,04	10,6	0,20	4,5	0,21	4,3	0,45
4-Isopropiltoluene			8,9	0,04	9,0	0,17	5,4	0,24	4,8	0,53
n-Butilbenzene			8,1	0,04	9,6	0,18	4,1	0,19	3,2	0,38
Naftalene			14,1	0,09	12,1	0,27	4,4	0,22	5,9	0,66

Tab. 4 - Limiti di rivelabilità (MDL), Tempi di ritenzione (T.R.), Ione Primario m/z.

Analita	MDL (µg/L)	T.R. (min)	Ione Primario m/z
COMPOSTI ORGANOALOGENATI			
1,1-Dicloroetilene	0,011	10,23	96
Diclorometano (Cloruro di metilene)	0,018	11,60	49
trans-1,2-Dicloroetilene	0,008	12,55	96
1,1-Dicloroetano	0,014	13,21	63
2,2-Dicloropropano	0,025	14,37	77
cis-1,2-Dicloroetilene	0,010	14,38	96
Bromoclorometano	0,012	14,85	128
Triclorometano (Cloroformio)	0,017	14,98	83
1,1,1-Tricloroetano	0,014	15,32	97
1,1-Dicloropropene	0,014	15,61	75
Tetraclorometano (Tetracloruro di carbonio)	0,015	15,63	117
1,2-Dicloroetano	0,014	16,01	62
Tricloroetilene (Trielina)	0,016	17,06	95
1,2-Dicloropropano	0,014	17,43	63
Dibromometano	0,013	17,65	93
Bromodiclorometano	0,034	17,87	83
cis-1,3-Dicloropropene	0,016	18,56	75
trans-1,3-Dicloropropene	0,005	19,39	75
1,1,2-Tricloroetano	0,006	19,70	83
1,3-Dicloropropano	0,026	19,97	76
Tetracloroetilene (Percloroetilene)	0,008	19,98	166
Dibromoclorometano	0,002	20,36	129
1,2-Dibromoetano	0,008	20,58	107

Clorobenzene	0,013	21,34	112
1,1,1,2-Tetracloroetano	0,011	21,44	131
Tribromometano (Bromoformio)	0,023	22,83	173
1,1,2,2-Tetracloroetano	0,020	23,62	83
1,2,3-Tricloropropano	0,021	23,77	75
Bromobenzene	0,036	23,81	156
2-Clorotoluene	0,025	24,19	126
4-Clorotoluene	0,010	24,42	126
1,3-Diclorobenzene	0,016	26,09	146
1,4-Diclorobenzene	0,013	26,33	146
1,2-Diclorobenzene	0,015	27,50	146
1,2-Dibromo-3-cloropropano	n.d.	30,44	75
1,2,4-Triclorobenzene	0,015	34,07	180
Esaclorobutadiene	0,010	34,58	225
1,2,3-Triclorobenzene	0,014	35,70	182
IDROCARBURI AROMATICI			
Benzene	0,030	15,99	78
Toluene	0,030	19,10	91
Etilbenzene	0,017	21,46	91
m,p-Xilene	0,030	21,64	91
o-Xilene	0,034	22,37	91
Stirene	0,017	22,39	104
Isopropilbenzene	0,022	23,04	105
n-Propilbenzene	0,031	23,90	91
1,3,5-Trimetilbenzene	0,027	24,26	105
terz-Butilbenzene	0,019	25,08	119
sec-Butilbenzene	0,015	25,65	105
1,2,4-Trimetilbenzene	0,025	25,20	105
4-Isopropiltoluene	0,013	26,00	119
n-Butilbenzene	0,006	27,24	91
Naftalene	0,013	34,88	128

Supplemento a Quaderni, (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)

Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque. Via Reno, 1 - 00198 Roma

Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861

Direttore responsabile: R. Passino

Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta

Segreteria di redazione: G. Barbiero

Stampato in proprio e distribuito "on-line": www.irsa.rm.cnr.it/Notiziario

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda

Allestimento e stampa: A. Priori