

c.n.r. istituto di ricerca sulle acque

Metodi analitici

per le acque

notiziario

ISSN: 0392-1425

Anno 12 - N. 3

Luglio-Settembre 1992

- Test di tossicità integrale con un biosensore a cellule di lievito immobilizzate (L. Campanella, G. Favero, M. Tomassetti).
- Metodo ufficiale IRSA (D-015) per la determinazione dei solfiti.
- Indice generale del manuale sui «Metodi analitici per le acque».
- Indice generale del manuale sui «Metodi di analisi per acque di mare».

- *Overall toxicity test using an immobilized yeast cells biosensor (L. Campanella, G. Favero, M. Tomassetti).*
- *IRSA method (D-015) for the determination of sulfite.*
- *«Metodi analitici per le acque» (Handbook for Water Analysis). General Index.*
- *«Metodi di analisi per acque di mare» (Handbook for Seawater Analysis). General Index.*

La riproduzione è autorizzata a condizione che venga citata la fonte:

C.N.R. - ISTITUTO DI RICERCA SULLE ACQUE - ROMA

ISSN: 0382-1452

Luglio-Settembre 1982

Anno 12 - N. 3

Con questo Notiziario trimestrale l'Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR intende dare un contributo alla divulgazione ed al trasferimento dei risultati di studi relativi all'ammodernamento ed aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi degli inquinanti nelle acque, con riferimento allo sviluppo di nuove tecniche analitiche, alla determinazione di nuovi indici, alla definizione ed ai rimedi per nuove interferenze. In tal senso il Notiziario si rivolge ai laboratori di analisi e controllo pubblici e privati ed ai centri di ricerca specializzati nel settore dell'analisi delle acque ai quali intende fornire un utile strumento di lavoro. Le metodologie che vengono proposte per la determinazione di inquinanti non potranno, in ogni caso, essere considerati ufficiali finché non verranno recepite nel Manuale IRSA «Metodi Analitici per le acque».

NORME REDAZIONALI

1. Il Notiziario accoglie lavori originali, contributi e comunicazioni a carattere sperimentale e applicativo, reviews e informazioni su attività relative alle metodologie applicate all'analisi delle acque. Inoltre pubblica rubriche speciali dedicate a particolari argomenti di carattere ambientale ivi incluse normative nazionali e comunitarie. I lavori vengono sottoposti per l'approvazione al Comitato di Redazione che provvederà a comunicare agli autori il proprio parere in merito.
2. *I testi* dei lavori debbono pervenire in originale, dattiloscritti con interlinea due e debbono essere corredati da: 1) il titolo del lavoro; 2) i nomi completi degli Autori e dei rispettivi enti di appartenenza; 3) un breve riassunto (non più di 10 righe) in italiano e in inglese.
3. *Il materiale illustrativo* deve essere di ottima qualità e consistere in originali disegnati con inchiostro di china su carta non millimetrata, oppure copie eliografiche o fotografiche, oppure fotografie in bianco e nero, possibilmente su carta opaca. Figure (Fig.) e tabelle (Tab.) debbono avere la relativa didascalia, essere numerate progressivamente con numeri arabi e richiamate nel testo. È preferibile non appesantire le figure con scritte esplicative, che trovano migliore collocazione nella didascalia a piè pagina con numerazione di richiamo nella figura.
4. *La Bibliografia* sarà riportata alla fine del testo e dovrà essere ordinata alfabeticamente indicando, nel seguente ordine, il cognome e le iniziali del nome di tutti gli Autori, l'anno di pubblicazione, possibilmente il titolo dell'articolo, il titolo del periodico, il numero del volume, la prima e l'ultima pagina del lavoro.
La Bibliografia dovrà essere citata nel testo indicando il cognome degli Autori e l'anno di pubblicazione di ciascun lavoro.
Per l'abbreviazione dei titoli dei periodici si prega di attenersi alle norme internazionali oppure si consiglia di citarli per esteso.

TEST DI TOSSICITÀ INTEGRALE CON UN BIOSENSORE A CELLULE DI LIEVITO IMMOBILIZZATE**(Metodo non definitivo)****L. Campanella, G. Favero, M. Tomassetti**Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma
P.le Aldo Moro, 5 - 00185 Roma**Riassunto**

È stato realizzato un biosensore a cellule di lievito immobilizzate che consente la valutazione della tossicità integrale di un campione contenente più specie inquinanti; il biosensore impiega un elettrodo amperometrico a diffusione gassosa per la determinazione dell'ossigeno. Il metodo è basato sulla perturbazione della attività respiratoria del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, immobilizzato su terreno di coltura agarizzato, ad opera del tossico in esame; il substrato impiegato è il glucosio, mentre i tossici considerati sono alcuni ioni di metalli pesanti ed il fenolo.

Summary

In this note a biosensor using immobilized yeast cells for estimation of overall toxicity of water samples is presented.

1. INTRODUZIONE

La tossicità di molte sostanze chimiche viene studiata da anni facendo uso di organismi viventi come indicatori biologici¹⁻⁸; le cavie utilizzate sono in genere organismi superiori, che danno risultati spesso molto attendibili anche se con tempi di risposta piuttosto lunghi: da pochi giorni ad alcuni mesi o addirittura anni nel caso dei test di tossicità cronica. Sfruttando invece il ciclo vitale molto breve di vari microrganismi, in particolare lievito, è possibile ridurre notevolmente il tempo di analisi; inoltre, operando con opportuni sistemi biologici, quali ad esempio colonie di lievito immobilizzate, è possibile una facile applicazione del metodo anche *in situ*.

2. PARTE SPERIMENTALE**Apparecchiature**

1. Cella di misura in vetro, con camicia termostatabile per mezzo di circolazione forzata di acqua.
2. Elettrodo ORION O₂ electrode Model 97-08-99

3. Potenzimetro ORION Microprocessor ionalyzer /901
4. Registratore AMEL Model 868
5. Termostato JULABO V
6. Agitatore magnetico AMEL Model 291/LF
7. Autoclave CertoCLAV CV II/1600 (1600 W - 220 V)
8. Agitatore KÖTTERMANN Mod. 3047.

3. REATTIVI

1. Estratto di lievito per microbiologia
2. Peptone universale per microbiologia M66
3. D-(+)-Glucosio per microbiologia
4. Agar agar purissimo
5. Glicina per analisi
6. Nitrato di cadmio per analisi
7. Nitrato di piombo purissimo
8. Cloruro di mercurio (ico) per analisi
9. Nitrato di rame (ico)
10. Fenolo puro per analisi

4. CRESCITA DELLA CULTURA CELLULARE

Il terreno di coltura impiegato, per lo sviluppo delle cellule di *Saccharomyces cerevisiae*, ha la seguente composizione:

Estratto di lievito	1%
Peptone	1%
Glucosio	2%

Nel caso delle colture cellulari su agar viene aggiunto, al terreno di coltura descritto nella tabella, anche un 1% di agar.

Il ceppo utilizzato di *Saccharomyces cerevisiae* viene conservato in tubi per microbiologia, chiusi con un batuffolo di cotone grezzo, lunghi 15 cm e del diametro interno di 1,5 cm, riempiti con 10 mL di terreno agarizzato, sterilizzato in autoclave a 130°C alla pressione di 1,7 bar per 15 minuti e fatto solidificare a "becco di clarino". Sulla superficie del terreno agarizzato si inoculano le cellule mediante un filo di platino sterilizzato opportunamente sagomato ad ansa. I tubi si conservano in frigorifero a 4°C e vengono periodicamente rinnovati ogni 15-20 giorni.

Per le colture si preparano beute da 100 mL, riempite con 50 mL di terreno, sterilizzate in autoclave a 130°C alla pressione di 1,7 bar per 15 minuti e chiuse con un batuffolo di cotone grezzo; si prelevano le cellule con l'ansa di platino dai tubi in cui vengono conservate, quindi esse sono disperse nella beuta contenente il terreno; tutte le operazioni di trasferimento delle cellule sono effettuate in condizioni di sterilità.

Vengono preparate piastre di Petri sterili, in cui sono versati 10 mL di terreno agarizzato, preventivamente sterilizzato, aspettando che esso solidifichi; quindi le piastre vengono chiuse, sigillate e conservate in frigorifero.

Le colture in soluzione si fanno crescere per 30 ore a 37°C sotto agitazione, mentre quelle su agar si fanno crescere a temperatura ambiente per 48 ore.

5. METODO

Le cellule vengono immobilizzate facendole crescere su terreno di coltura agarizzato: a crescita avvenuta viene assemblato il biosensore ponendo una porzione di questo terreno, con le cellule supportate, tra la membrana gas permeabile dell'elettrodo ed una membrana da dialisi, fissando il tutto sulla testa dell'elettrodo per mezzo di un apposito O-ring. Il biosensore viene posto a stabilizzare in una cella termostata a 25°C, sotto agitazione magnetica, contenente una fissata soluzione di glicina alla concentrazione isotonica con il citoplasma cellulare, quindi si opera un'aggiunta standard di glucosio e si registra la variazione della concentrazione di ossigeno in soluzione al variare del tempo, in pratica si ottiene quella che di solito viene chiamata "curva respirometrica". Dall'esame di diverse curve respirometriche, registrate sia in condizioni normali che dopo esposizione del sistema al tossico a varie concentrazioni, si ottiene una curva di calibrazione a cui è possibile fare riferimento per definire la tossicità del campione considerato.

6. MODALITÀ OPERATIVE

Sono state sviluppate due modalità operative differenti: nella prima si aggiunge prima il substrato e poi, raggiunto lo stato stazionario, il tossico; la misura si effettua calcolando il rapporto tra le due variazioni di intensità di corrente che si registrano: la prima tra i due stati stazionari (in presenza di substrato e di tossico ed in presenza di solo substrato), la seconda tra i due stati stazionari (in presenza ed in assenza di solo substrato). Il rapporto di queste due variazioni di intensità di corrente, chiamato Δi_N , viene riportato in grafico in funzione della concentrazione del tossico impiegato.

Nella seconda modalità operativa vengono registrate due diverse curve respirometriche: la prima in presenza di solo substrato, la seconda in presenza di substrato ma previa incubazione, della durata di 8 minuti, con il tossico; a questo punto è possibile utilizzare due parametri:

a) la differenza di intensità di corrente δ , proporzionale alla "distanza" fra le due curve respirometriche, ad un tempo prefissato (30 minuti);

b) il rapporto, p_N , delle pendenze con cui le due curve respirometriche raggiungono lo stato stazionario, misurate nell'intervallo di tempo 10→25 minuti dopo l'aggiunta di glucosio, parametri che risultano correlati alla concentrazione del tossico impiegato. In tutti i casi descritti, se si riporta in grafico il parametro utilizzato per la misura, in funzione del tossico per un ampio intervallo di concentrazioni, si ottiene il tipico profilo di una curva di inibizione.

7. RISULTATI

Con entrambe le modalità operative descritte è stata analizzata una soluzione acquosa contenente nitrato di cadmio, essendo lo ione cadmio un classico inquinante inorganico; i risultati di tipiche rette di taratura sono mostrati in Figg. 1 e 2 (a, b) ed i principali dati, relativi alle rispettive equazioni sono riassunti in Tab. 1.

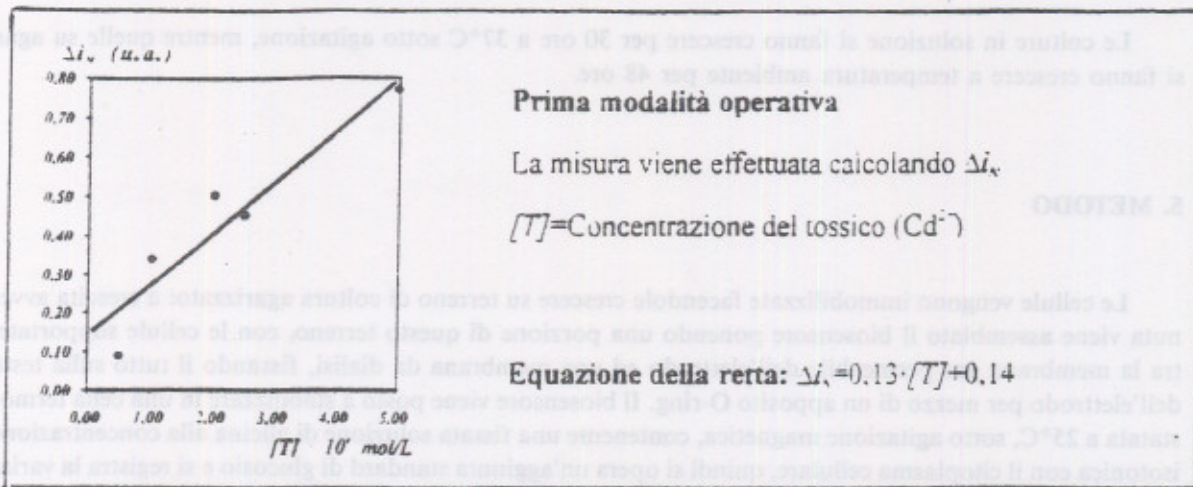


Fig. 1

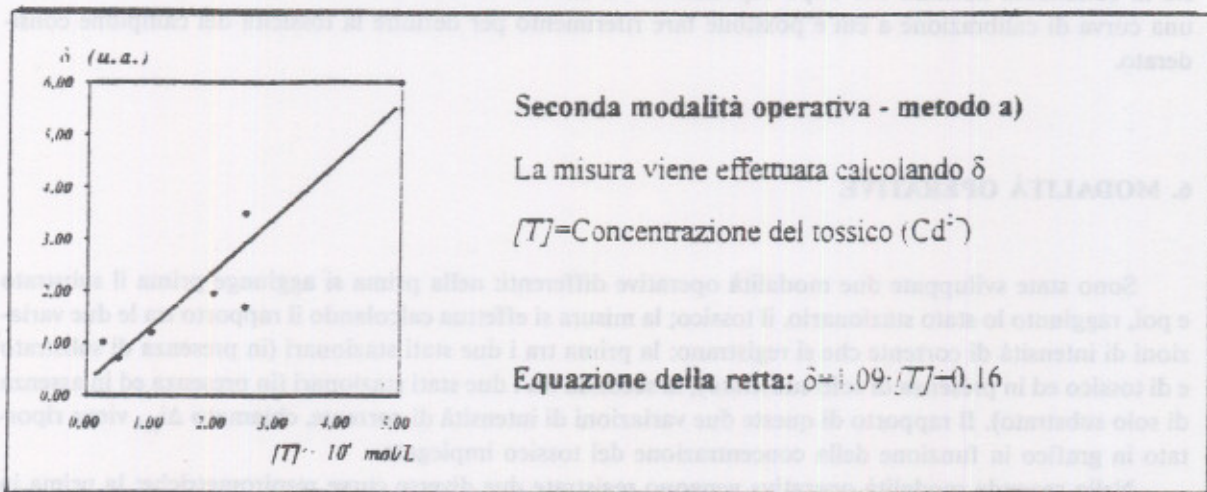


Fig. 2a

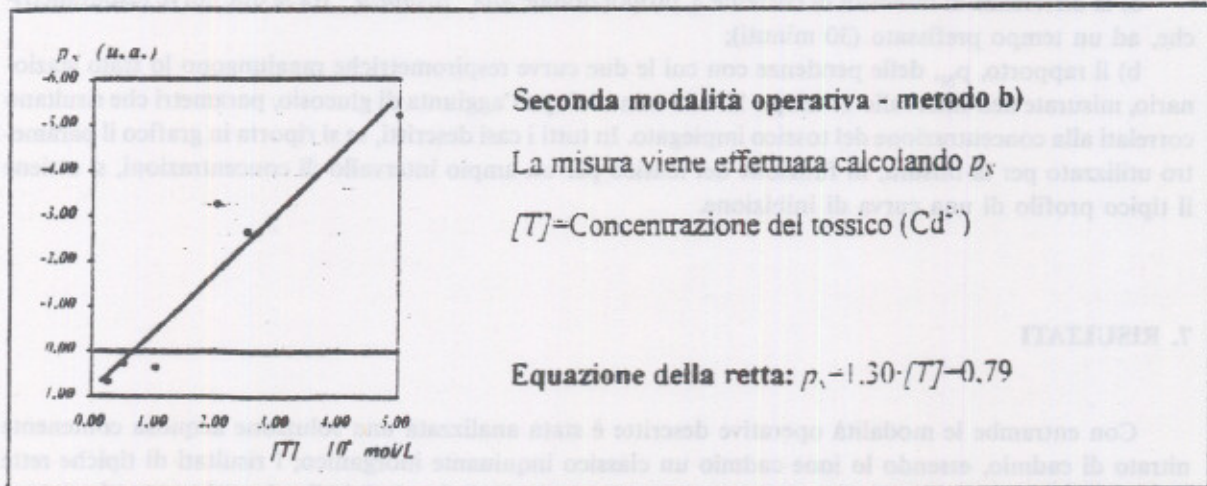


Fig. 2b

Tab. 1

Tossico	Modalità operativa	Intervallo di linearità [T]·10 ⁴ mol/L	Sensibilità (come pendenza della retta) u.a./((10 ⁴ ·mol·L ⁻¹))	Limite minimo di rivelabilità [T]·10 ⁴ mol/L
Cadmio	Prima, uso di Δi_v	0,25-5,0	0,130	0,1
Cadmio	Seconda, uso di δ	0,25-5,0	1,090	0,1
Cadmio	Seconda, uso di p_v	0,25-5,0	1,300	0,1
Pool*	Seconda, uso di p'	7,5-15	0,431	6
Fenolo	Seconda, uso di p'	1,5-6,5	0,015	1

* Il pool è costituito da una soluzione equimolare degli ioni: piombo, mercurio e rame.

Nella stessa tabella sono anche riportati analoghi dati, ottenuti analizzando un "pool di tre ioni metallici bivalenti (mercurio, piombo e rame) al fine di verificare il carattere integrale della risposta fornita dal biosensore, mentre la relativa retta di taratura è mostrata in Fig. 3.

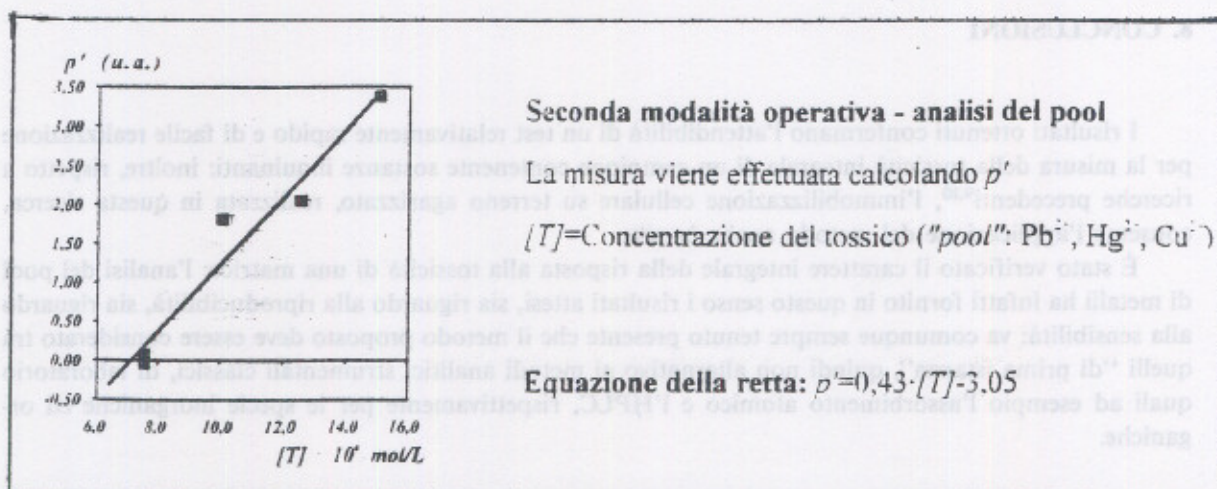


Fig. 3

Questi dati, come quelli relativi all'analisi del fenolo (tipico inquinante organico) anch'essi riportati rispettivamente in Tab. 1 ed in Fig. 4, sono stati ottenuti utilizzando la seconda modalità operativa ma impiegando come parametro analitico, anziché uno dei due precedentemente citati (vedi metodi a) e b)), la pendenza p' della curva respirometrica determinata dopo un tempo di incubazione di 8 minuti e nell'intervallo di tempo 10-25 minuti dopo l'aggiunta del glucosio, risultata anch'essa correlata, nei limiti dell'errore sperimentale, alla concentrazione del tossico.

La misura di questo solo parametro, anziché di quelli sopra descritti, permette infatti di ridurre da circa 2-3 ore a soli 40 minuti il tempo d'analisi; tuttavia esso, a differenza dei precedenti, rappresenta un dato non "normalizzato". La precisione delle misure, come RSD %, è comunque risultata sempre $\leq 10\%$ cioè dello stesso ordine di grandezza di quella ottenuta nelle precedenti esperienze in cui si è operato con dati "normalizzati".

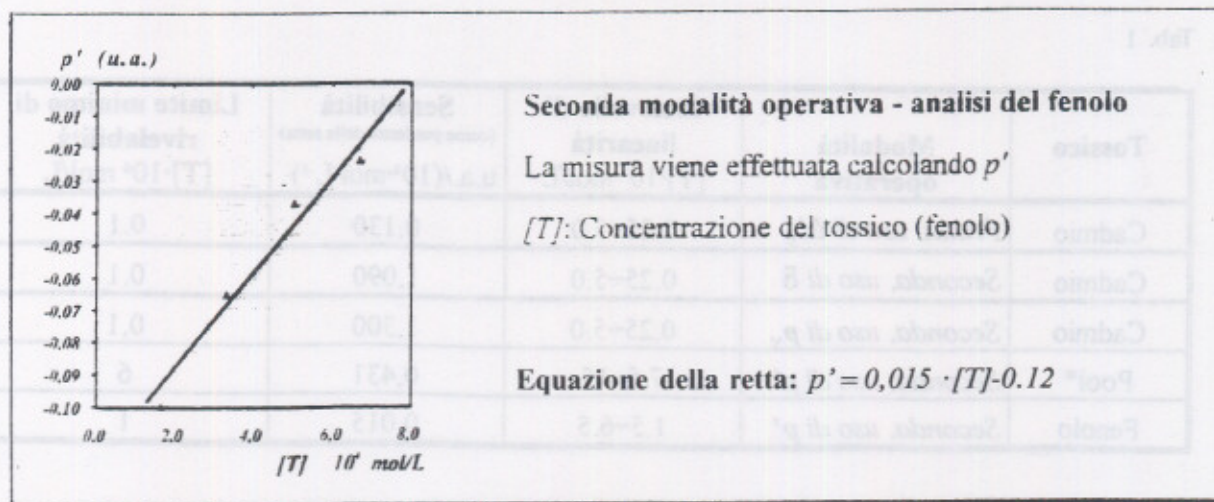


Fig. 4

8. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti confermano l'attendibilità di un test relativamente rapido e di facile realizzazione per la misura della tossicità integrale di un campione contenente sostanze inquinanti: inoltre, rispetto a ricerche precedenti^{9,10}, l'immobilizzazione cellulare su terreno agarizzato, realizzata in questa ricerca, consente l'applicazione del metodo anche *in situ*.

È stato verificato il carattere integrale della risposta alla tossicità di una matrice: l'analisi del pool di metalli ha infatti fornito in questo senso i risultati attesi, sia riguardo alla riproducibilità, sia riguardo alla sensibilità: va comunque sempre tenuto presente che il metodo proposto deve essere considerato tra quelli "di prima istanza", quindi non alternativo ai metodi analitici strumentali classici, di laboratorio quali ad esempio l'assorbimento atomico e l'HPLC, rispettivamente per le specie inorganiche ed organiche.

Ringraziamenti

Lavoro effettuato con il supporto finanziario del Consiglio Nazionale delle Ricerche (C.N.R.), Progetti Finalizzati "Biotecnologie e Biostrumentazione" e "Chimica Fine".

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] RAWSON D. (1988): "Whole cell biosensors", *International Industrial Biotechnology*, **8**, 2 (Marzo/Aprile), 18-22.
- [2] RECHNITZ G., KOBOS R., RIECHEL S. & GEBAUER C. (1977): "A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells", *Analytica Chimica Acta*, **94**, 357-365.

- [3] RIEDEL K., LIEBS P., RENNEBERG R. & SCHELLER F. (1988): "Characterization of the physiological state of microorganisms using the respiration electrode", *Analytical Letters*, **21**, 1305-1322.
- [4] KARUBE I. & SUZUKI S. (1984): "Amperometric and potentiometric determinations with immobilized enzymes and microorganisms", *Ion Selective Electrode Review*, **6**, 15-58.
- [5] THAVARUNGKUL P., HÅKANSON H. & MATTIASSON B. (1991): "Comparative study of cell-based biosensors using *Pseudomonas cepacia* for monitoring aromatic compounds", *Analytica Chimica Acta*, **249**, 17-23.
- [6] RAWSON D., WILLMER A. & TURNER A. (1989): "Whole-cell biosensors for environmental monitoring", *Biosensors*, **4**, 299-311.
- [7] CARPENTIER R., LORANGER C., CHARTRAND J. & PURCELL M. (1991): "Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements", *Analytica Chimica Acta*, **249**, 55-60.
- [8] DORWARD E. & BARLSAS B. (1984): "Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode", *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 967-972.
- [9] CAMPANELLA L., PAOLETTI A.M. & TRANCHIDA G. (1986): "Biotest di tossicità integrale", *Inquinamento*, **10**, 54-57.
- [10] CAMPANELLA L., MAZZEI F., SAMMARTINO M.P., TOMASSETTI M. & TRANCHIDA G. (1989): "Biotest e biosensori: applicazioni in campo industriale ed ambiente", (*Milano, FAST Publ.*), 25-56.

METODO UFFICIALE IRSA (D-015) PER LA DETERMINAZIONE DEI SOLFITI. RIMOZIONE DEI SOLFURI

Il metodo IRSA (D-015) per la determinazione dei solfiti, pur specificando che l'interferenza dei solfuri può essere rimossa mediante precipitazione con acetato di zinco (0,5 g/L di campione), non indica in modo esplicito a quale pH effettuare la precipitazione. Le modalità di precipitazione vengono peraltro indicate nella scheda (D-006) per la determinazione dei solfuri.

Allo scopo di evitare incertezze ed ambiguità che dovessero sorgere nell'applicazione del metodo in oggetto, si precisa che la precipitazione deve essere effettuata, stante le caratteristiche di debole acidità dell'acido solfidrico, in ambiente basico ($\text{pH} > 9$) con acetato di zinco.

Sulla base delle precedenti considerazioni, la scheda D-015 viene modificata relativamente ai paragrafi 3 e 6, il cui testo originario viene integrato con le aggiunte riportate nel seguito:

3. Interferenze e cause di errore

Sostanze riducenti, quali ad esempio solfuri e ferro (II), possono provocare valori in eccesso rispetto alla concentrazione di solfiti effettivamente presenti. L'interferenza dovuta ai solfuri può essere eliminata mediante aggiunta di 1,5 mL/L di campione di una soluzione di acetato di zinco e di 1 mL/L di campione di una soluzione di idrossido di sodio 6 M. Questi reattivi producono, infatti, a $\text{pH} > 9$ la precipitazione come ZnS dei solfuri i quali possono essere rimossi attraverso una semplice filtrazione su filtro in fibra di vetro. Sul campione filtrato si procede alla determinazione dei solfiti come descritto nel paragrafo 7.1.

Durante la filtrazione evitare di lasciare la soluzione a contatto con l'aria. È consigliabile una filtrazione sotto pressione di azoto.

L'interferenza dovuta al Fe (II) può essere eliminata aggiungendo EDTA (1 mL/100 mL di campione) al campione al momento del prelievo.

6. Reattivi

6.13 Soluzione di acetato di zinco (220 g/L)

Sciogliere 220 g di acetato di zinco diidrato ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in acqua e portare a volume in matraccio tarato da 1 litro.

6.14 Soluzione di idrossido di sodio 6 M

Sciogliere 24 g di idrossido di sodio (NaOH) in pastiglie in acqua e diluire a 100 mL.

6.15 Soluzione di sale bisodico dell'acido etilendiammino tetracetico (EDTA)

Sciogliere 2,5 g di sale bisodico dell'EDTA in acqua e portare a volume a 100 mL.

INDICE GENERALE DEL MANUALE SUI "METODI ANALITICI PER LE ACQUE" (*)

Codice	Metodo	Anno di pubbl. su volume	Anno di pubbl. su scheda
Sezione A - (Parte generale)			
• A-001	Strutture, attrezzature e reattivi di laboratorio	1984	—
• A-002	Lineamenti di tecniche analitiche	1991	—
• A-003	Metodi di campionamento	1977	—
• A-004	Elaborazione dei risultati	1983	—
Sezione B - (Determinazione di parametri fisici e chimico fisici)			
B-001	pH	1972	1981
B-002	Temperatura	1972	1979
B-003	Colore	1972	1980
B-004	Materiali sedimentabili	—	1979
B-005	Materiali in sospensione	—	1979
B-006	Conducibilità	1972	—
B-007	Salinità	—	—
B-008	Odore	1972	—
B-009	Torbidità	1972	—
Sezione C - (Determinazione di metalli e di specie metalliche)			
C-001	Alluminio	1972	1988
C-002	Argento	1972	—
C-003	Arsenico	1972	1983
C-004	Bario	1972	1980
C-005	Berillio	1972	1990
C-006	Boro	1972	1982
C-007	Cadmio	1972	1986
C-008	Calcio	1972	1986
C-009	Cromo (VI)	1972	1982
C-010	Cromo (III)	1972	1982
C-011	Ferro	1972	1980
C-012	Litio	1972	1986
C-013	Magnesio	1972	1986
C-014	Manganese	1972	1980
C-015	Mercurio	1972	1986
C-016	Molibdeno	—	—
C-017	Nichel	1972	1980
C-018	Piombo	1972	1979-1984
C-019	Potassio	1972	1986
C-020	Rame	1972	1987
C-021	Selenio	1972	1986
C-022	Sodio	1972	1986
C-023	Stagno	1972	1987
C-024	Zinco	1972	1980
C-025	Cromo totale	1972	1982
C-026	Tellurio	—	1991

(segue)

(*) I metodi analitici sono in vendita presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche - Ufficio Pubblicazioni - Servizio Vendite, Via Nizza, 128 - 00198 Roma (Tel. 8413419). La spedizione viene effettuata con pagamento contro assegno.

(•) I metodi indicati sono pubblicati in volume.

Segue: Indice generale sui «Metodi Analitici per le Acque»

Codice	Metodo	Anno di pubbl. su volume	Anno di pubbl. su scheda
Sezione D - (Determinazione di sostanze e parametri inorganici non metallici)			
D-001	Acidità e basicità	1972	
D-002	Azoto ammoniacale	1972	1981-1983
D-003	Azoto nitroso	1972	1981
D-004	Azoto nitrico	1972	1986
D-005	Biossido di carbonio	1972	
D-006	Solfuri	1972	1984
D-007	Cianuri	1972	1980
D-008	Cloro	1972	
D-009	Cloruri	1972	1979
D-010	Fluoruri	1972	1983
D-011	Fosforo	1972	1981
D-012	Ossigeno disciolto	1972	
D-013	Silice	1972	
D-014	Solfati	1972	1979
D-015	Solfiti	1972	1983
Sezione E - (Determinazione di sostanze e parametri organici)			
E-001	Azoto albuminoideo	1972	
E-002	Azoto organico	1972	
E-003	Sostanze oleose totali	1972	1984
E-004	Oli minerali	—	1984
E-005	Grassi e oli animali e vegetali	—	1984
E-006	Carbonio organico	1972	
E-007	Richiesta chimica di ossigeno (COD)	1972	1981
E-008	Richiesta biochimica di ossigeno (BOD)	1972	1982
• E-009	Pesticidi clorurati	1978	—
• E-010	Pesticidi fosforati	1982	—
• E-011	Policlorodifenili	1981	—
• E-012	Policloroterfenili	1981	—
E-013	Tensioattivi non ionici	1972	1979
E-014	Fenoli	1972	1979
E-015	Aldeidi	—	1978
E-016	Solventi aromatici	—	1984
E-017	Tensioattivi anionici	1972	1983
E-018	Solventi organici clorurati	—	1978
• E-019	Erbicidi triazinici ed altri azotati	1992	—
Sezione F - (Determinazione di parametri biologici e microbiologici)			
F-001	Saggio di tossicità	1972	
F-002	Coliformi totali	1972	
F-003	Coliformi fecali	1972	
F-004	Streptococchi fecali	1972	

(*) I metodi indicati sono pubblicati in volume.

INDICE GENERALE DEL MANUALE SUI «METODI DI ANALISI PER ACQUE DI MARE» (*)

Codice	Metodo	Anno di pubblicazione
—	Indicazioni generali	
—	Fattori di conversione e di calcolo	
—	Campionamento	
100	Caratteristiche chimico- fisiche	
110	Trasparenza	1984
120	Temperatura	
130	Colore	
140	Salinità	1983
150	Materiale in sospensione	1984
160	pH	
170	Ossigeno disciolto	
200	Specie metalliche	
210	Alluminio	
215	Argento	
220	Arsenico	
225	Cadmio	1983
230.3	Cromo	1984
235	Ferro	1983
240	Manganese	
245	Mercurio	
250	Nichel	1983
255	Piombo	1983
260	Rame	1983
265	Selenio	1983
270	Zinco	
300	Specie inorganiche non metalliche	
310	Azoto ammoniacale	1984
315	Azoto nitroso	
320	Azoto nitrico	
325	Azoto totale	
330	Fosforo ortofosfato solubile	1982
340	Fosforo totale	1982
350	Silice	1983
400	Composti organici	
410	Fenoli	
420	Oli minerali	1984
430	Tensioattivi anionici	
440	Composti organo-alogenati	
440.1	Pesticidi clorurati	1986
500	Saggi biologici e microbiologici	
510	Coliformi totali	1983
520	Coliformi fecali	1983
530	Streptococchi fecali	1983
540	Salmonelle	1984
550	Enterovirus	
560	Adenosintrifosfato (ATP)	1988
570.1	Clorofilla	1990
600	Prove di tossicità	
610	Saggio di ittiotossicità	

(*) I metodi sono pubblicati a scheda e sono in vendita, con il relativo raccoglitore, presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche - Ufficio Pubblicazioni - Servizio Vendite, Via Nizza, 128 - 00198 Roma (Tel. 8413419). La spedizione viene effettuata con pagamento contro assegno.

