

EDITORIALE

Il progressivo recepimento delle Direttive Europee in materia di gestione, trattamento e qualità delle acque naturali e reflue impongono l'aggiornamento dei metodi analitici mediante l'introduzione di tecniche avanzate a maggiore carattere strumentale.

Con riferimento alle determinazioni di specie metalliche ed inorganiche in genere, i metodi si basano, essenzialmente: (a) su tecniche spettroscopiche nell'UV-Visibile (UV-Vis) e l'uso di reattivi "cromofori" che portano alla formazione di "addotti" con l'analita che assorbono nell'intervallo delle lunghezze d'onda indicate; (b) tecniche spettroscopiche di emissione in fiamma (FES) o di assorbimento atomico in fiamma (FAA) o in fornetto di grafite (GFAA); (c) tecniche spettroscopiche di emissione in sorgente plasma ottico (ICP-OES) o di emissione in plasma accoppiato a spettrometria di massa (ICP-MS).

Le tecniche analitiche di cui ai punti (a) e (b), già estensivamente adottate in ambito nazionale, costituiscono la struttura portante dei metodi per la determinazione dei metalli, riportate nel volume di riferimento normativo nazionale: "Metodi Analitici per le Acque", della serie Quaderni n.100, edito da questo Istituto per i tipi dell'Istituto Poligrafico dello Stato.

L'introduzione di nuovi metodi impone, da un lato, lo sforzo di modernizzazione, mentre dall'altra si rileva la difficoltà giurisprudenziale legata alla proliferazione degli stessi, ed ancora, la necessità di non renderli troppo "sostanziosi" da tagliare fuori i piccoli operatori in campo analitico.

Altri Paesi dell'Unione hanno già introdotto metodi basati sull'uso dell'ICP ottico e tendono ad eliminare progressivamente i metodi UV-Vis che si basano, nella maggioranza dei casi, sull'uso di reattivi già inseriti o in via di inserimento nella lista dei prodotti chimici di particolare impatto ambientale.

Gli operatori giuridici (magistratura) rigettano, a ragione, ogni forma di proliferazione di "metodi analitici ufficiali" in quanto ciò costituisce oggetto di confusione e indeterminazioni normative che offrono il fianco a "scappatoie e vie di fuga giuridiche".

Al fine di mediare tutte le citate esigenze il gruppo di esperti per la determinazione delle specie metalliche, incaricato da questo Istituto, ha ritenuto opportuno iniziare a lavorare in questo ambito mediante la proposta di un metodo per la determinazione

simultanea o sequenziale di 33 specie metalliche basato sull'uso del plasma ottico. Il metodo non ha carattere di ufficialità ed è essenzialmente volto alla raccolta di commenti e suggerimenti in vista di una successiva ufficializzazione. In questo numero viene presentato, inoltre, un contributo che esamina le problematiche inerenti gli aspetti igienico-sanitari e tecnici dei fanghi di depurazione, con particolare attenzione al patogeno Salmonella. La sua ricerca nei fanghi ha di recente acquisito importanza in seguito all'inserimento di detto parametro nel Decreto Legislativo del 27 gennaio 1992 n.99, che detta le norme relative all'impiego dei fanghi in agricoltura. Il metodo proposto potrebbe costituire uno strumento applicativo utile alla unificazione delle procedure analitiche per la ricerca di Salmonella nei fanghi di depurazione. Infine, viene riproposto un questionario conoscitivo, già inviato alla gran parte degli operatori nazionali, volto alla individuazione dello stato di acquisizione delle tecniche analitiche strumentali nelle strutture pubbliche e private. Si invita la comunità scientifica e gli addetti ai lavori a farci pervenire le informazioni richieste a stretto giro di posta.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, ottobre 1998

INDICE

DETERMINAZIONE DI SPECIE METALLICHE IN ACQUE NATURALI E REFLUE MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE IN SORGENTE AL PLASMA (ICP-OES)	2
SALMONELLA NEI FANGHI DI RISULTA: ASPETTI IGIENICO-SANITARI E TECNICI.	18
INFORMAZIONI	25
QUESTIONARIO	26

DETERMINAZIONE DI SPECIE METALLICHE IN ACQUE NATURALI E REFLUE MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE IN SORGENTE AL PLASMA (ICP-OES)*.

A cura di Petruzzelli D.*, Bettinelli M.** , Mastroianni D.***, Spezia S.** , Capri S.*** , Pettine M.***

* Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR, Bari.

** ENEL UML, Piacenza.

*** Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR, Roma.

RIASSUNTO

Viene descritto un metodo per la determinazione multielementare di 33 elementi in campioni liquidi basato sull'uso del plasma ottico. In questo metodo si misura l'intensità della radiazione elettromagnetica emessa dagli atomi e ioni eccitati delle specie presenti nel campione.

SUMMARY

A method is described for multielement determination of 33 elements in liquid samples by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). In this method the intensity of the light emitted at specific wavelengths from excited atoms and ions of a sample is measured and used to determine the concentrations of the elements of interest.

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo descrive il protocollo per la determinazione multielementare delle frazioni disciolta, particolata e totale di elementi chimici in campioni liquidi di diversa natura e origine. La base del metodo consiste nella misura delle intensità delle radiazioni elettromagnetiche emesse dagli atomi e ioni eccitati delle specie presenti nel campione, mediante tecniche spettrometriche in sorgente al plasma. La sorgente al plasma è un gas altamente ionizzato, prodotto per induzione elettromagnetica generata da un campo di radiofrequenze. Le più comuni radiofrequenze usate sono dell'ordine di 27 o 40 Mhz. Il campione e le soluzioni di calibrazione vengono opportunamente nebulizzate e l'aerosol viene trasportato nel plasma, dove, in seguito a fenomeni di eccitazione, avviene la produzione dello spettro di

emissione composto da linee caratteristiche degli elementi presenti. Le righe componenti lo spettro dopo essere state disperse mediante un sistema di dispersione (generalmente un monocromatore) vengono inviate su un rivelatore (fotomoltiplicatore o serie di diodi allo stato solido) che produce un segnale elettrico la cui intensità è proporzionale all'intensità delle righe di emissione (Martin *et al.*, 1991; Boumans, 1987; Moore, 1989; Garbarino and Taylor, 1979; U.S.EPA, 1992). Le intensità di emissione vengono rilevate simultaneamente o in sequenza e la concentrazione di analita presente nel campione viene determinata per confronto con una soluzione di riferimento a concentrazione nota. I processi che hanno permesso di sfruttare questa tecnica analitica sono schematicamente rappresentati in Fig.1 e Fig. 2 (Boss e Fredeen, 1997).

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile all'analisi delle acque naturali, di superficie e di falda, alle acque di scarico e a campioni solidi precedentemente sottoposti ad un trattamento di mineralizzazione. La Tab. 1 riporta l'elenco degli elementi per i quali il metodo è applicabile, le principali lunghezze d'onda analitiche ed i limiti di rivelabilità "tipici" ottenibili per ciascun elemento. Le indicazioni di Tab. 1 sono riportate a scopo puramente orientativo, in quanto dipendono strettamente dalle caratteristiche tecniche della apparecchiatura utilizzata. Si possono utilizzare altre lunghezze d'onda, se queste garantiscono la sensibilità analitica sufficiente al soddisfacimento delle richieste analitiche e soprattutto la possibilità di minimizzare le eventuali interferenze spettrali presenti.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

La spettroscopia di emissione in sorgente a plasma (come tutte le procedure analitiche generalmente utilizzate) rappresenta una tecnica analitica "relativa" con la quale è possibile determinare la concentrazione degli analiti solo se essi vengono confrontati con soluzioni di riferimento a concentrazione nota. Qualsiasi caratteristica del campione che provoca una variazione dell'ampiezza del segnale di emissione rispetto ai campioni di riferimento, genera un disturbo. L'insieme di tutti i potenziali disturbi che conducono ad errori di misura viene definito "interferenza". In considerazione poi dell'origine del disturbo, si parla di interferenze chimiche, fisiche, di fondo e spettrali. L'insieme delle interferenze menzionate (che possono essere potenzialmente presenti), se non adeguatamente corrette, producono variazioni dell'intercetta sull'asse Y della retta di calibrazione (effetto di tipo additivo) oppure variazione del coefficiente angolare della retta

Il metodo è stato discusso e approvato dal gruppo di lavoro Metalli composto da: Campanella L. (UNI-Roma), Bettinelli M. (ENEL UML-Piacenza), Camusso M. (IRSA-Brugherio), Capri S. (IRSA-Roma), Falciani R. (CSM-Roma), Mastroianni D. (IRSA-Roma), Muccioli G. (ENICHEM-Ravenna), Perdicaro R. (Laboratorio Centrale di Idrobiologia-Roma), Petruzzelli D. (IRSA-Bari), Pettine M. (IRSA-Roma), Spezia S. (ENEL UML-Piacenza), Torcini S. (ENEA-Roma).

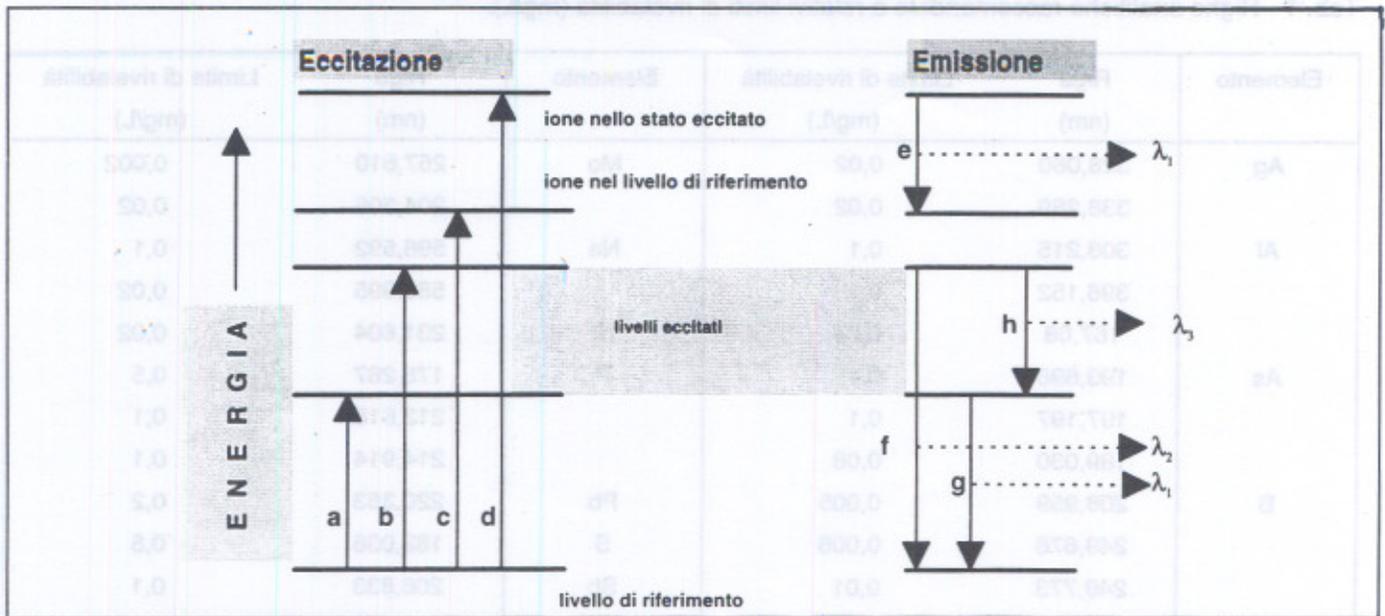


Fig.1 - Diagramma schematico delle transizioni energetiche nella fase di emissione al plasma; a e b rappresentano l'eccitazione, c la ionizzazione, d la ionizzazione/eccitazione, e l'emissione dello ione ed f, g e h rappresentano l'emissione degli atomi (Boss e Fredeen, 1997).

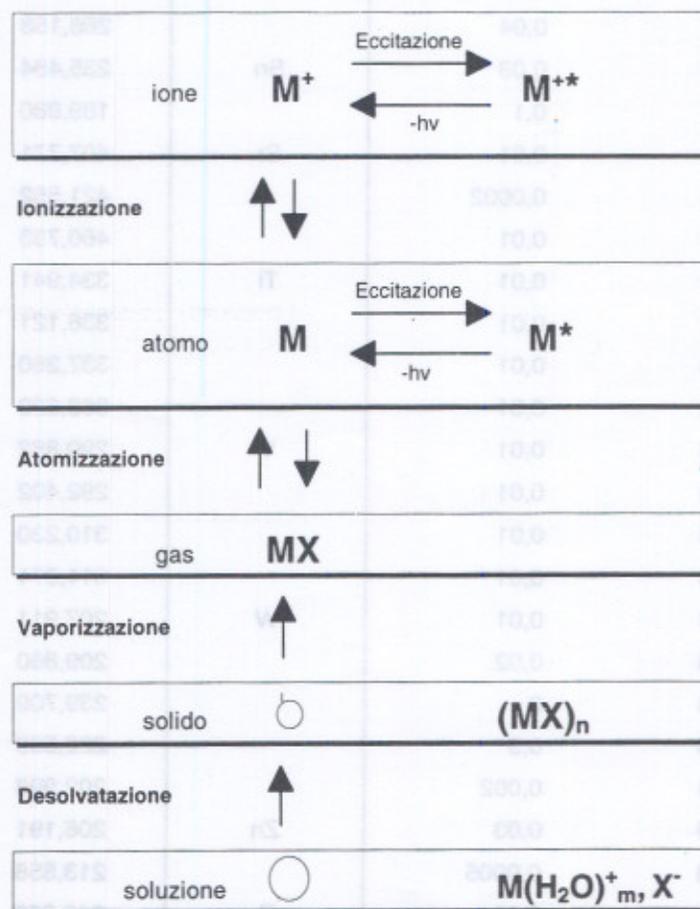


Fig. 2 - Descrizione dei principali processi che si verificano quando una soluzione viene trasferita nella sorgente al plasma (Boss and Fredeen, 1997).

Tab. 1 - Righe analitiche raccomandate e relativi limiti di rivelabilità (mg/L).

Elemento	Riga (nm)	Limite di rivelabilità (mg/L)	Elemento	Riga (nm)	Limite di rivelabilità (mg/L)
Ag	328,060	0,02	Mo	257,610	0,002
	338,289	0,02		204,306	0,02
Al	308,215	0,1	Na	598,592	0,1
	396,152	0,1		588,995	0,02
As	167,08	0,04	Nj	231,604	0,02
	193,696	0,1		P	178,287
	197,197	0,1	213,618	0,1	
B	189,030	0,08	214,914	0,1	
	208,959	0,005	Pb	220,353	0,2
	249,678	0,006	S	182,036	0,5
Ba	249,773	0,01	Sb	206,833	0,1
	233,527	0,004		217,581	0,1
Be	455,403	0,002	Se	196,026	0,1
	493,409	0,003		203,985	0,1
	313,042	0,002	Si	251,611	0,02
Bi	234,861	0,005	212,412	0,02	
	223,061	0,04	288,158	0,03	
Ca	306,772	0,08	Sn	235,484	0,1
	315,887	0,1		189,980	0,1
	317,933	0,01	Sr	407,771	0,0005
Cd	393,366	0,0002	421,552	0,01	
	214,438	0,01	460,733	0,1	
	226,502	0,01	Ti	334,941	0,005
Co	228,802	0,01	336,121	0,01	
	228,616	0,01	337,280	0,01	
Cr	205,552	0,01	368,520	0,01	
	267,716	0,01	V	290,882	0,01
	283,563	0,01		292,402	0,01
Cu	284,325	0,01	310,230	0,01	
	324,754	0,01	311,071	0,01	
Fe	327,396	0,01	W	207,911	0,03
	259,940	0,02		209,860	0,06
K	766,490	2	239,709	0,06	
Li	460,286	0,9	222,589	0,06	
	670,784	0,002	202,998	0,06	
Mg	279,079	0,03	Zn	206,191	0,01
	279,553	0,0005		213,856	0,005
	285,213	0,001	Zr	343,823	0,01
Mn	257,610	0,002	354,262	0,05	
	293,306	0,001			

(effetto di tipo moltiplicativo). L'effetto di tipo additivo è riconducibile ad interferenze di fondo o spettrali mentre l'effetto di tipo moltiplicativo è riconducibile ad interferenze di natura chimica e/o fisica che alterano i processi di trasporto alla torcia producendo modificazioni nei vari stadi del processo, (desolvatazione, atomizzazione, eccitazione e ionizzazione). La presenza di substrati chelanti (EDTA), substrati proteici (peptone) o complessanti (acidi umico e fulvico) in rappresentanza di potenziali inquinanti organici presenti nelle acque di scarico, sino a valori di concentrazioni medie 500 volte superiori a quelle degli analiti, non sembrano comportare sensibili problemi operativi.

3.1 - Interferenze di fondo

Le interferenze di fondo possono essere sia negative che positive e sono causate da uno o più componenti della matrice che, direttamente o indirettamente, provocano uno dei seguenti fenomeni: variazione di temperatura della sorgente (con conseguente variazione del "continuo" emesso dalla sorgente), bande di emissione molecolari, "luce diffusa", ricombinazioni ioni-elettroni.

L'entità di queste interferenze varia con le condizioni operative adottate e solo nel caso della "luce diffusa", alcune soluzioni strumentali (reticolo olografico, doppio monocromatore ecc.) possono ridurre sensibilmente il problema. La misura della differenza tra i due segnali di emissione e di fondo, necessaria per la correzione dell'interferenza, viene comunemente eseguita ai lati della riga analitica. La zona spettrale in cui viene effettuata la misura dipende dalla complessità dello spettro intorno alla riga analitica prefissata. E' possibile effettuare una correzione del fondo da uno o da entrambi i lati della riga analitica ed è necessario che la differenza tra i due segnali di fondo a monte e a valle della riga di emissione sia rappresentativa di quella che si verifica al centro della riga analitica. Conoscendo il tipo di sostanza interferente, la sua concentrazione e ammettendo che sia costante nei diversi campioni è possibile effettuare la correzione di questa interferenza anche ricorrendo al metodo della matrice simulata.

3.2 - Interferenze di riga o spettrali

Le interferenze di riga si verificano per sovrapposizione tra la riga analitica e la riga di un altro elemento. La sovrapposizione può essere "virtuale" in quanto dovuta a scarsa risoluzione dello spettrometro, o reale, ossia la riga interferente cade entro la larghezza della riga analitica. La correzione delle interferenze dovute a sovrapposizione di riga non è sempre possibile e comporta comunque un peggioramento della precisione analitica, nonché un allungamento dei tempi di analisi. Per tali motivi è sempre conveniente impiegare un'altra riga analitica esente da interferenze se disponibile, avente un adeguato potere di rivelabilità. La possibilità di correggere questo tipo di interferenze dipende dal

grado di sovrapposizione e dal rapporto di intensità tra le due righe (Thompson and Walsh, 1983). In alcuni casi, infatti, la riga analitica è totalmente "nascosta" dalla riga interferente e pertanto non esiste alcuna possibilità di impiegare tale riga per effettuare la misura analitica (se non quella di separare chimicamente l'analita dall'interferente). Nel caso, invece, di sovrapposizioni meno marcate è possibile effettuare interventi di correzione. Attualmente, questi si basano sul calcolo del valore di intensità di emissione prodotto dall'elemento interferente in corrispondenza del picco analitico, valore che viene sottratto al segnale di emissione totale per ottenere il segnale "pulito" dovuto all'analita. Il calcolo di questo valore può essere effettuato con diverse procedure di interpolazione matematica. Esistono diversi atlanti e procedure "software" per l'individuazione e la correzione di interferenze spettrali, ma non di rado ci si trova di fronte ad interferenze "non previste". Rimane pertanto la necessità di effettuare uno studio sperimentale ogni qualvolta si analizza una nuova tipologia di matrice (o comunque con differenti rapporti interelementari), allo scopo di evidenziare la presenza di interferenze spettrali.

3.3 - Interferenze di tipo chimico e/o fisico

Le interferenze di tipo moltiplicativo si manifestano come modificazioni del segnale analitico e sono prodotte dalla matrice che produce alterazioni nei processi di trasporto alla torcia, desolvatazione, atomizzazione, eccitazione e ionizzazione. Le interferenze durante il processo di trasporto e desolvatazione sono principalmente riferibili a variazioni di densità, viscosità e tensione superficiale della soluzione. Variazione dell'efficienza del meccanismo di trasporto possono anche essere dovute a una distribuzione non omogenea di matrice e analita nelle particelle di aerosol nebulizzate. I processi di atomizzazione ed eccitazione dell'analita molto raramente risultano interferiti dalla matrice. Per taluni elementi possono a volte verificarsi interferenze dovute a modifiche dell'equilibrio di ionizzazione dell'analita. L'effetto positivo o negativo sulla sensibilità analitica è da porre in relazione all'origine ionica o atomica della riga analitica. Le interferenze che producono un effetto di tipo moltiplicativo sulla sensibilità analitica possono essere corrette soddisfacentemente adottando opportune procedure di calibrazione quali il metodo delle aggiunte standard, il metodo della soluzione standard simulata e il metodo dello standard interno di riferimento. La Tab. 2 fornisce una lista delle interferenze spettrali più comuni per i vari elementi analizzati. Nel caso di strumenti simultanei in cui è possibile analizzare contemporaneamente lo stesso analita a più lunghezze d'onda è particolarmente agevole verificare la presenza di interferenze spettrali confrontando la risposta strumentale tra due o più righe analitiche e rigettando quella che fornisce

Tab. 2 - Righe analitiche raccomandate e interferenze spettrali.

Elemento	Riga (nm)	Interferenze spettrali	Elemento	Riga (nm)	Interferenze spettrali	
Ag	328,060		Mo	257,610		
	338,289	Cr		204,306		
Al	308,215	Mn, V, Fe	Na	598,592	Ar	
	396,152	Mo, Cu		588,995		
	167,080	Fe	Ni	231,604	Co	
As	193,696	Fe, Al		P	178,287	
	197,197	Fe, Al			213,618	Cu, Fe, Mo, Zn
	189,030	Fe	214,914		Cu, Al, Mg	
B	208,959	Al, Mo	Pb	220,353	Al, Co, Ti	
	249,678	Fe, Cr		S	182,036	Cr, Mo
	249,773	Fe	Sb	206,833	Cr, Mg, Co, Mn	
Ba	233,527	Fe, V			217,581	
	455,403		Se	196,026		
	493,409			203,985		
Be	313,042	V	Si	251,611		
	234,861	Fe		212,412		
Bi	223,061	Cu		288,158		
	306,772	Fe, V	Sn	235,484	Mo, Co	
Ca	315,887	Co			189,980	
	317,933	Fe, V	Sr	407,771		
	393,366			421,552		
Cd	214,438	Fe		460,733		
	226,502	Fe	Ti	334,941	Ca, Cr, Si	
	228,802	As, Co		336,121		
Co	228,616	Ti		337,280		
	Cr	205,552	Fe, Mo	368,520	Co, Cr	
267,716		Mn, V	V	290,882	Fe, Mo	
283,563		Fe, Mo		292,402	Fe, Mo, Cr	
284,325	Fe	310,230				
Cu	324,754	Ti		311,071	Fe, Mn, Ti, Cr	
	327,396		W	207,911		
Fe	259,940				209,860	
	K	766,490	Mg		239,709	
Li		460,286	Fe		222,589	Cu
	670,784			202,998		
Mg	279,079		Zn	206,191	Cr	
	279,553			213,856	Cu, Ni, Fe	
	285,213	Fe	Zr	343,823		
Mn	257,610	Fe, Mo, Cr		354,262		
	293,306	Al, Fe				

risultati anomali. Nel caso di strumentazione sequenziale è possibile rendersi conto di eventuali interferenze analizzando il campione tal quale e dopo opportuna diluizione; se per il campione corretto dalla diluizione si ottengono valori insoddisfacenti o comunque oltre i valori di accuratezza accettabili, si può essere in presenza di interferenze di natura chimica e/o fisica non meglio identificate di cui è necessario individuare le cause. Un altro possibile metodo per accertare la presenza di interferenze fa riferimento alle aggiunte note; se anche l'aggiunta di analita nell'ordine di concentrazioni comprese fra 10-100 volte il limite di rivelabilità porta a risultati al di fuori dei limiti dell'accuratezza del metodo si è probabilmente in presenza di sensibili effetti matrice.

4 - NORME DI SICUREZZA

Lo spettrometro a emissione al plasma non è considerato uno strumento a rischio per l'operatore e tuttavia va utilizzato con le dovute precauzioni onde evitare possibili effetti nocivi dovuti ai fumi, al calore ed alle radiazioni ultraviolette emesse. Le sorgenti al plasma emettono infatti radiofrequenze e una intensa radiazione ultravioletta che deve essere opportunamente schermata. I fumi che accompagnano la decomposizione della soluzione iniettata nel plasma e le piccole quantità di ozono generate dalla radiazione ultravioletta devono essere rimossi dall'atmosfera del laboratorio installando sopra la zona di lavoro un opportuno sistema di aspirazione. E' inoltre consigliabile schermare la torcia dal lato dell'operatore in quanto le radiazioni ultraviolette emesse dal plasma possono essere dannose per la pelle e per gli occhi. In assenza di precisi accertamenti della pericolosità delle radiofrequenze in gioco, è sempre consigliabile mantenere a livelli quanto più bassi possibili le radiazioni emesse dal generatore e la potenza riflessa. Particolare cura è necessaria nella manipolazione di campioni di acque reflue o comunque biologicamente attive a causa della potenziale presenza di agenti patogeni. Si raccomanda l'adozione di comuni norme antinfortunistiche, nonché l'uso di guanti, occhiali e ausili di protezione personale.

5 - STRUMENTI ED APPARECCHIATURE

5.1 - Plasma

Il plasma è un particolare stato di aggregazione della materia in cui un sistema altamente ionizzato composto da ioni, elettroni e particelle neutre ad alta energia è caratterizzato dalla sua tendenza alla neutralità elettrica rispetto all'ambiente circostante. Il plasma viene di solito prodotto applicando energia ad un comune gas rarefatto (gas plasmageno) sino ad

ottenere la ionizzazione degli atomi. La ionizzazione può essere ottenuta mediante l'azione di un forte campo elettrico generato direttamente oppure per mezzo di induzione elettrica o magnetica. Sono stati studiati diversi tipi di sorgente di plasma ed alcune di queste sono state prese in considerazione come possibili sorgenti di eccitazione per la spettrometria atomica di emissione (AES) e precisamente:

- plasma generato da corrente continua (DCP);
- plasma accoppiato capacitivamente con microonde (CMP);
- plasma accoppiato induttivamente con radiofrequenza (ICP);
- plasma indotto a microonde (MIP).

Negli spettrometri per uso analitico viene utilizzata principalmente la sorgente ICP mentre altre sorgenti vengono usate per applicazioni particolari quali ad esempio la rivelazione in gas cromatografia (sorgente MIP). Nei sistemi ICP, il campo magnetico variabile viene ottenuto applicando una corrente ad elevata frequenza ad una bobina di induzione entro la quale fluisce il gas ionizzato. Il campo elettrico viene generato dalla oscillazione periodica del flusso di induzione magnetica ed è diretto lungo linee di forza circolari giacenti in un piano perpendicolare alla direzione di flusso del campo magnetico. Come gas plasmageno vengono frequentemente utilizzati azoto e gas nobili, quali l'argon. Il gas ionizzato fluisce attraverso un tubo di quarzo, o di altro materiale refrattario trasparente ad un ampio spettro di radiazioni emesse, la cui estremità superiore è inserita nella bobina connessa al generatore ad alta frequenza. Il processo di ionizzazione viene innescato disperdendo nel gas di sostentamento degli elettroni liberi prodotti per effetto termoelettrico da una piccola asta di grafite inserita nel campo elettrico o mediante una scarica Tesla. Gli elettroni e gli ioni formati vengono quindi accelerati dal campo magnetico indotto con conseguente riscaldamento per effetto Joule dovuto alla resistenza del gas di supporto. Una volta innescato, la sorgente plasma si autosostiene assumendo la forma di una fiamma luminosa emergente dalla parte superiore della bobina. La temperatura del plasma si mantiene mediamente sui 6000°K e localmente può raggiungere anche i 10.000°K. La regione utile per scopi analitici è però la "coda" tra i 5000 e i 6000°K; in questa zona è immessa la soluzione del campione da analizzare nebulizzata generalmente in argon.

Lo spettrometro ICP-AES risulta costituito dalle seguenti parti principali:

- a) sistema di atomizzazione ed eccitazione;
- b) sistema dispersivo (monocromatore o policromatore);
- c) rivelatore (fotomoltiplicatore);
- d) sistema di controllo, acquisizione ed elaborazione dei dati.

5.2 - Sistema di atomizzazione ed eccitazione

Il sistema di atomizzazione ed eccitazione ICP è costituito principalmente da un generatore di radiofrequenza, un circuito adattatore d'impedenza, una bobina e torcia, una unità di introduzione e trasporto del campione alla torcia stessa. Il generatore di radiofrequenza fornisce la corrente ad alta frequenza alla bobina e comprende un oscillatore a frequenza libera o fissa. Nei generatori a frequenza libera la frequenza di oscillazione varia in funzione dell'impedenza del plasma, mentre in quelli a frequenza fissa controllata a quarzo, la frequenza è mantenuta costante da un cristallo piezoelettrico. Tutti i generatori a radiofrequenza vengono schermati a norma di legge. Il campo delle frequenze utilizzabili è compreso tra 1,6 e 60 MHz. La maggior parte degli spettrometri commerciali a frequenza stabilizzata opera sulla frequenza di 27,12 o di 40,7 MHz anche per ottemperare alle norme di legge. La potenza in uscita può variare da 0,5 a 7 kW, anche se per la maggior parte degli spettrometri commerciali è compresa tra 1 - 2 kW. Con i solventi organici è necessario adottare valori di potenza più elevati rispetto a quelli delle soluzioni acquose mentre l'uso di gas poliatomici (ad es. azoto), quale gas di supporto richiede potenze superiori rispetto a quelle richieste dai gas nobili. Esistono diversi tipi di torce che si differenziano tra di loro per forma, dimensioni e numero di camere coassiali. In genere, la torcia è costituita da uno o più tubi concentrici (di solito tre) in materiale refrattario non conduttore (quarzo o allumina): il gas plasmageno fluisce nel condotto più esterno con portate che dipendono dalle dimensioni della torcia. Il gas entra nel condotto tangenzialmente; in tal modo assume una traiettoria a spirale entro la quale transita longitudinalmente il gas di trasporto del campione. Il gas che fluisce nel condotto più esterno è anche chiamato gas di raffreddamento del plasma, mentre il gas più interno viene chiamato gas di trasporto. L'unità di trasporto del campione alla torcia è generalmente costituita, nel caso di campioni liquidi, da un nebulizzatore per la formazione dell'aerosol e da una camera (analoga alla camera di premiscelazione degli atomizzatori in fiamma impiegati nella spettrometria di assorbimento atomico) che trattiene le goccioline di maggiori dimensioni prima che l'aerosol entri nella torcia. Il nebulizzatore può essere di tipo pneumatico, (con flussi concentrici o tangenziali), microconcentrico, ad ultrasuoni o di tipo Babington. Quest'ultimo viene usato per le soluzioni viscosi ad elevato contenuto di sali e per le sospensioni. Tali nebulizzatori sono molto simili a quelli utilizzati per la spettroscopia di assorbimento (AAS) ma differiscono da questi per quanto riguarda la portata del gas. Infatti mentre nel caso della AAS, la portata è di circa 10 L min^{-1} per l'ICP è mantenuta a circa 1 L min^{-1} . Di conseguenza il sistema di nebulizzazione dell'ICP richiede, rispetto al sistema AAS, tempi più lunghi per la stabilizzazione, possiede una minore efficienza ed è più soggetto a problemi di intasamento. La soluzione

da analizzare viene introdotta nel nebulizzatore mediante una pompa peristaltica. Per la determinazione di elementi volatili o che liberano idruri volatili (As, Sb, Se e Te), si può utilizzare, analogamente a quanto avviene per la spettrometria di assorbimento atomico, una speciale unità per la formazione ed il trasferimento dell'idruro.

5.3 - Sistema ottico dispersivo

Tale sistema consente il trasferimento, la dispersione e la selezione delle radiazioni elettromagnetiche emesse ed in genere comprende:

- 1) un sistema di lenti e/o specchi
- 2) un monocromatore.

Tra la torcia ed il monocromatore viene generalmente posta una lente biconvessa la quale ha la funzione di focalizzare l'immagine sulla fenditura d'ingresso del monocromatore. Quest'ultimo che costituisce il cuore del sistema di dispersione delle radiazioni emesse, è costituito da: una fenditura di ingresso delle radiazioni emesse, un collimatore, un elemento disperdente ed una fenditura di uscita che permette di selezionare le bande spettrali analitiche della radiazione elettromagnetica emessa. Il sistema disperdente può anche essere costituito da un policromatore capace di selezionare più di una banda spettrale alla volta per mezzo di fenditure fisse opportunamente posizionate, in rapporto alla geometria dell'insieme, in modo da intercettare e selezionare le lunghezze d'onda d'interesse. La larghezza e l'altezza della fenditura possono essere variate con continuità o per passi discreti in modo da stabilire la larghezza della banda passante ed il fattore spettrale di trasmissione. Il collimatore produce un fascio parallelo di radiazioni uscenti dalla fenditura d'ingresso. Con il monocromatore è possibile selezionare una banda di lunghezze d'onda alla volta e, pertanto, l'esame dell'intero spettro viene effettuato variando l'angolo dell'elemento disperdente rispetto alla radiazione incidente; ciò è realizzato con un controllo motorizzato a passi oppure continuo (spettrometro sequenziale). Con il policromatore è possibile esaminare più bande spettrali alla volta e quindi analizzare più elementi contemporaneamente (spettrometro simultaneo). Molti spettrometri sono muniti di entrambi i sistemi. Quando si opera nella banda spettrale al di sotto della lunghezza d'onda a cui interferisce l'ossigeno atmosferico (ca. 190 nm), occorre collocare il sistema ottico sotto vuoto o in flusso di gas inerte (ad es. azoto). Indipendentemente dal tipo di spettrometro utilizzato, simultaneo o sequenziale, il sistema ottico deve sempre essere caratterizzato da un elevato potere risolvente (0,01-0,02 nm) e da una ridotta luce diffusa.

5.4 - Rivelatore delle radiazioni

Come rivelatore viene solitamente impiegato un fotomoltiplicatore che converte le intensità delle radiazioni elettromagnetiche emesse in segnale elettrico. Esso è costituito da una cellula fotoelettrica e da un sistema di amplificazione racchiusi in un tubo di vetro in cui si è praticato un vuoto molto spinto. La regione spettrale di lavoro del fotomoltiplicatore è determinata dallo strato fotosensibile applicato sul catodo e dal materiale costitutivo della finestra della fotocellula. I principali parametri di qualità del fotomoltiplicatore sono la sensibilità e la corrente di buio. La sensibilità globale di un fotomoltiplicatore dipende da fattori quali il materiale di cui è composto il catodo, la geometria, il numero di salti (dinodi), la tensione applicata e la frequenza (energia) dei fotoni incidenti. In genere la sensibilità è molto elevata e tipicamente può raggiungere i 100-200 ampere/lumen. Per corrente di buio si intende la corrente che fluisce verso l'anodo in assenza di illuminazione del catodo. Questa è principalmente dovuta all'emissione termoionica di elettroni e quindi dipende dalla temperatura e dal potenziale di estrazione di elettroni dal fotocatodo. Nei moderni spettrometri di tipo simultaneo vengono utilizzati rivelatori allo stato solido. Questi rivelatori sono formati da numero notevole di chip fotosensibili di silicio in grado ciascuno di coprire una zona spettrale dell'ampiezza di circa 0,4 nm.

5.5 - Sistema di acquisizione ed elaborazione dati

Il sistema di acquisizione ed elaborazione dati è in genere costituito da un'unità gestita da elaboratore il quale controlla anche i parametri dello spettrometro e in certe configurazioni anche quelli della torcia, del generatore e dell'unità di introduzione. Il sistema provvede alla calibrazione automatica dello strumento, alla acquisizione ed elaborazione dei valori misurati dal rivelatore, all'esame delle interferenze spettrali, alla correzione delle misure a causa di tali effetti interferenti o per il verificarsi di variazioni della funzione di calibrazione, nonché alla memorizzazione di tutti i dati e delle variabili operative.

6 - REATTIVI

Reagenti puri per analisi ed acqua demineralizzata ad elevata purezza (> 10 MΩ/cm).

6.1 - Soluzioni di riferimento

Utilizzare soluzioni di riferimento a titolo noto (es. 1000 mg/L) e possibilmente certificate. Esistono in commercio soluzioni di riferimento multielementari che possono essere convenientemente utilizzate per

l'analisi di più analiti. In alternativa si possono preparare tali soluzioni partendo da sali ad elevata purezza, solubilizzando le opportune quantità esattamente pesate in acqua demineralizzata con 1% di HNO₃ concentrato. Preparare per diluizione delle soluzioni madre le soluzioni di riferimento alla concentrazione desiderata, avendo cura di aggiungere 1mL di HNO₃ 1:1 prima di portare a volume con acqua demineralizzata (>10MΩ/cm) in matracci tarati da 100 mL. Queste soluzioni sono stabili per parecchie settimane. In funzione delle esigenze analitiche è possibile utilizzare soluzioni di calibrazione monoelementari o multielementari. In quest'ultimo caso verificare che la miscelazione degli elementi considerati non dia luogo a interferenze di tipo spettrale o chimico (es. coprecipitazione). Alcuni esempi di possibili soluzioni di riferimento multielementari che tengono conto delle compatibilità interelementari sono riportate in Tab. 3 (APFA, 1995). Come bianco per la calibrazione si utilizza una soluzione di acqua demineralizzata all'1% di HNO₃. Per la conservazione delle soluzioni di riferimento e dei campioni da analizzare si consiglia l'uso di recipienti in plastica (policarbonato, polietilene), teflon o altro materiale caratterizzato da una scarsa capacità di cessione ed adsorbimento di metalli, precedentemente trattati con HNO₃ 1 M per una notte e successivamente neutralizzati con acqua ad elevato grado di purezza. Nei campioni da sottoporre ad analisi le concentrazioni dei vari analiti presenti possono variare sensibilmente nel tempo, a causa di fenomeni di co-precipitazione e adsorbimento sulle pareti dei contenitori; si consiglia pertanto di condurre le determinazioni nel più breve tempo possibile dal campionamento.

6.2 - Soluzioni per la verifica e l'ottimizzazione delle condizioni strumentali

- 6.2.1 Soluzione standard di Na (1000 mg/L) per la verifica del flusso di aspirazione al nebulizzatore
- 6.2.2 Soluzione di Mn (10 mg/L all' 1% HNO₃) o in alternativa
- 6.2.3 Soluzione di As, Ba, Mn, Sr e Zn (10 mg/L all'1% HNO₃) per la verifica della concentrazione equivalente al fondo (BEC), del limite di rivelabilità (LR) e della precisione delle determinazioni (CV%).
- 6.2.4 Soluzione standard di Al (1000 mg/L) per la verifica della linearità della curva di taratura. In funzione di esigenze analitiche specifiche, è sempre possibile utilizzare una soluzione multielementare contenente gli analiti di interesse ad una concentrazione almeno 100 volte maggiore del limite di rivelabilità tipico per quell'elemento.

Tab. 3 - Preparazione delle soluzioni di calibrazione multielementari (500 mL)

Soluzione mista 1			
Analita	Soluz. madre (mg/L)	Aliquota (mL)	Conc. (mg/L)
Ag	250	1,0	0,5
As	1000	5,0	10,0
B	1000	1,0	2,0
Ba	500	1,0	1,0
Ca	1000	5,0	10,0
Cd	1000	1,0	2,0
Cu	1000	1,0	2,0
Mn	1000	1,0	2,0
Sb	500	5,0	5,0
Se	500	5,0	5,0

Soluzione mista 2			
Analita	Soluz. madre (mg/L)	Aliquota (mL)	Conc. (mg/L)
K	1000	10,0	20,0
Li	500	5,0	5,0
Mo	1000	5,0	10,0
Na	1000	5,0	10,0
Sr	500	1,0	1,0

Soluzione mista 3			
Analita	Soluz. madre (mg/L)	Aliquota (mL)	Conc. (mg/L)
Co	1000	1,0	2,0
V	1000	1,0	2,0
P	1000	5,0	10,0

Soluzione mista 4			
Analita	Soluz. madre (mg/L)	Aliquota (mL)	Conc. (mg/L)
Al	1000	5,0	10,0
Cr	500	5,0	5,0
Hg	500	2,0	2,0
SiO ₂	1000	5,0	10,0
Sn	1000	2,0	4,0
Zn	500	5,0	5,0

Soluzione mista 5			
Analita	Soluz. madre (mg/L)	Aliquota (mL)	Conc. (mg/L)
Be	500	1,0	1,0
Fe	1000	5,0	10,0
Mg	1000	5,0	10,0
Ni	1000	1,0	2,0
Pb	1000	5,0	10,0
Tl	500	5,0	5,0

7 - CAMPIONAMENTO, TRATTAMENTI PRELIMINARI E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Prima di prelevare i campioni analitici è necessario conoscere in dettaglio il tipo di determinazioni richieste (es., metalli totali o disciolti) in modo tale da adottare le precauzioni più opportune ai fini della conservazione del campione e/o di eventuali trattamenti preliminari che dovessero rendersi necessari (es., filtrazione, condizionamento con acidi e mineralizzazione). Il campionamento deve essere effettuato in accordo a quanto previsto dalla sezione 1030 "Metodi di campionamento" riportata nel quaderno IRSA "Metodi analitici per le acque". In accordo a quanto descritto in questa sezione, per la determinazione delle specie disciolte è necessario filtrare i campioni attraverso filtri da 0,45 µm e acidificare la soluzione con 3 mL di HNO₃ 1:1 per litro di campione. Questo trattamento fornisce una stima del metallo totale. Analisi più accurate possono essere effettuate dopo filtrazione (0,45 µm) del campione e determinazioni dirette in fase liquida e indiretta in fase solida dopo digestione. La concentrazione di metallo totale può essere determinata come somma del metallo in soluzione più il metallo presente nella fase particolata, o misurando la concentrazione di analita presente dopo digestione acida del campione tal quale (ad es. mineralizzazione in forno a microonde).

8 - CRITERI DI VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI STRUMENTALI

Prima di iniziare le procedure analitiche è consigliabile (Bettinelli *et al.*, 1993) controllare l'efficienza operativa della strumentazione ICP-AES verificando alcune caratteristiche analitiche quali: il limite di rivelabilità (LR), la concentrazione equivalente al fondo (BEC), la precisione a breve termine (RSD) e l'andamento della curva di calibrazione (cioè l'intervallo di concentrazione dell'analita entro il quale l'andamento è di tipo lineare). La misura di tali parametri permette di stabilire se lo strumento funziona correttamente e di verificare l'accurata messa a punto del metodo analitico che si intende utilizzare. Per ottenere le migliori prestazioni occorre procedere alla misura delle caratteristiche analitiche dopo almeno 1 h dall'inizio della generazione del plasma, onde evitare eventuali transitori non trascurabili del rumore di fondo e della sensibilità analitica. I valori di consenso relativi ai parametri analitici (LR, BEC, RSD_{max}) possono essere prescritti dai metodi di riferimento oppure venire stabiliti sulla base dei risultati ottenuti mediante conduzioni di una serie di prove sperimentali in loco o effettuate nell'ambito di prove di intercalibrazione tra diversi laboratori accreditati.

8.1 - Limite di rivelabilità (LR)

Si definisce come limite di rivelabilità (LR) la concentrazione minima rivelabile di un determinato elemento, cioè la concentrazione minima per la quale si ottiene un segnale distinguibile dal rumore di fondo. I limiti di rivelabilità riportati in letteratura per ICP-AES risultano anche molto diversi e ciò può dipendere sia dai diversi metodi con cui tali valori sono stati determinati sia dalle differenti prestazioni analitiche della strumentazione utilizzata. Secondo la IUPAC, si definisce limite di rivelabilità (LR) quella concentrazione di analita che, alla lunghezza d'onda selezionata, produce un segnale d'intensità di emissione chiaro e distinto di ampiezza pari a due o tre volte lo scarto tipo delle fluttuazioni d'intensità del segnale di fondo. Col termine "segnale di fondo" si intende il segnale ottenuto per concentrazioni dell'analita pari a zero. Il valore del limite di rivelabilità, dipende pertanto, sia dal potere di rivelabilità strumentale che dall'intensità e stabilità del segnale di fondo. Esso viene spesso utilizzato per valutare le prestazioni strumentali. In condizioni sperimentali ideali, la più bassa concentrazione di analita misurabile in una data matrice non deve essere inferiore a dieci volte il valore del limite di rivelabilità (LR).

8.2 - Concentrazione equivalente di fondo (BEC)

Si definisce concentrazione equivalente al fondo (BEC, Background Equivalent Concentration) quella concentrazione d'analita che, alla lunghezza d'onda selezionata, produce un segnale d'ampiezza pari a quella del segnale di fondo. Il BEC dipende dal potere di rivelabilità dello strumento (coefficiente angolare della curva di calibrazione) e dall'intensità del segnale di fondo. Esso rappresenta quindi un parametro rapido di determinazione delle prestazioni strumentali. Informazioni analoghe sulla qualità delle prestazioni strumentali viene fornito dalla misura del rapporto segnale/fondo (SBR, Signal Background Ratio), ovvero del rapporto tra il segnale netto dell'intensità di emissione prodotto ad una determinata lunghezza d'onda da una soluzione standard dell'elemento in esame ed il corrispondente segnale di fondo. Il parametro SBR, contrariamente al BEC, viene riferito ad una determinata concentrazione di analita (generalmente 1 oppure 10 mg L^{-1}).

8.3 - Precisione a breve termine (RSD)

Uno dei parametri più importanti per valutare se lo spettrometro sia in grado di effettuare una determinata misura, è la precisione a breve termine del segnale emesso durante tale misura, intesa come l'accordo tra misure dello stesso tipo, effettuate ripetutamente ed a breve distanza l'una dall'altra sul

medesimo campione. La precisione a breve termine (RSD, Relative Standard Deviation) viene determinata calcolando lo scarto tipo delle misure ripetute ed è espressa come percentuale del valore medio. La precisione massima si ottiene quando la concentrazione dell'analita è compresa tra 100 e 1000 volte il valore del limite di rivelabilità. In tali condizioni ed assumendo un tempo di integrazione di 3 s, il valore RSD risulta compreso tra 0,2 e 0,5%. Per concentrazioni minori e comprese tra 10 e 100 volte il limite di rivelabilità, l'RSD deve risultare inferiore o uguale al 5%. Per concentrazioni pari al limite di rivelabilità, l'RSD risulta dell'ordine del 50%. Il livello di precisione a breve termine dello strumento, considerato accettabile per un determinato metodo analitico, viene definito con due valori RSD massimi ammissibili da accertare in corrispondenza del limite inferiore e del limite superiore del campo delle determinazioni analitiche. Tali valori possono variare in funzione del tipo di campione utilizzato, della concentrazione dell'elemento in esame e delle condizioni sperimentali, ma dovranno comunque essere compresi nell'intervallo tra il 5 e il 15% in corrispondenza del limite analitico inferiore e tra 1 e 2% in corrispondenza del limite analitico superiore delle determinazioni analitiche.

8.4 - Precisione a lungo termine

Per verificare la stabilità nel tempo del segnale di emissione si determina lo scarto tipo di una serie di misure effettuate sullo stesso campione in un arco temporale esteso. Esso consente di controllare la validità delle determinazioni effettuate a tempi diversi, senza ricalibrazioni successive fra una serie di misure e l'altra. La mancata stabilità strumentale in intervalli di tempo prolungati può essere risolta mediante verifica e correzione periodica delle procedure di calibrazione strumentale.

8.5 - Linearità della curva di calibrazione

Le curve di calibrazione hanno un andamento lineare su un ampio intervallo di concentrazione che si estende dal valore del limite di rivelabilità sino a concentrazioni superiori di quattro o cinque ordini di grandezza. Per la maggior parte degli elementi la linearità della curva è soddisfacente sino a valori di concentrazione dell'analita pari a 1000 mg L^{-1} . Una buona linearità delle curve di calibrazione rende il metodo più rapido perchè riduce al minimo le operazioni di diluizione dei campioni e, conseguentemente, il volume delle soluzioni occorrente per la calibrazione.

9 - OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI STRUMENTALI

Per migliorare le prestazioni analitiche della apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, in particolare quando si devono determinare elementi presenti a livelli di traccia, è indispensabile procedere alla ottimizzazione dei parametri strumentali. Nelle normali condizioni operative si tende infatti a raggiungere un compromesso tra i vari parametri allo scopo di assicurare un adeguato potere di rivelabilità per tutti gli analiti che devono essere determinati nel campione in esame. I parametri dello strumento sui quali è possibile intervenire sono quelli relativi alla sorgente, all'unità per l'introduzione del campione, allo spettrometro ed all'interfaccia torcia/spettrometro. I citati parametri vengono ottimizzati uno alla volta allo scopo di ottenere il miglior rapporto segnale analitico/segnale di fondo.

9.1 - Sorgente

I parametri operativi caratteristici della sorgente plasma sono i seguenti:

- a) potenza di uscita del generatore;
- b) tipo e flusso del gas plasmageno;
- c) flusso del gas ausiliario.

Una maggior temperatura comporta un aumento del segnale di fondo e una variazione di sensibilità che dipende dalle caratteristiche della transizione in esame. Pertanto anche mediante tale parametro è possibile ottimizzare il rapporto segnale/fondo. Regolando opportunamente la potenza applicata e il flusso di gas plasmageno è possibile esercitare un controllo sul rapporto segnale/rumore di fondo e su alcuni tipi di interferenza. La potenza d'uscita del generatore insieme al flusso di gas plasmageno determinano la temperatura del plasma e pertanto questi due parametri influenzano significativamente sia il segnale analitico che il segnale di fondo. L'aumento di temperatura della sorgente plasma favorisce i processi di atomizzazione, di eccitazione e di ionizzazione delle specie atomiche, anche in relazione alle caratteristiche della transizione atomica o ionica e, quindi, porta ad un aumento della sensibilità analitica. Quando ad esempio si misura l'intensità di una riga di emissione atomica un aumento troppo elevato della potenza applicata può causare, in particolare per elementi a basso potenziale di ionizzazione, lo spopolamento del livello di partenza della transizione con conseguente diminuzione di sensibilità. Poiché il segnale di fondo aumenta comunque all'aumentare della temperatura del plasma, un aumento della potenza applicata può portare ad un peggioramento effettivo del rapporto segnale/fondo. L'aumento del flusso di gas plasmageno determina una maggiore "diluizione" dell'analita nel campione immesso nella sorgente con conseguente riduzione della sensibilità analitica. Il

gas ausiliario viene utilizzato per sollevare il plasma dall'orlo superiore della torcia e impedire così la formazione e deposizione di sali, specie quando si analizzano matrici organiche.

9.2 - Unità di introduzione del campione

I parametri relativi all'unità di introduzione del campione variano a seconda del meccanismo di trasporto utilizzato. Nel caso in cui venga impiegato un nebulizzatore pneumatico la pressione e il flusso del gas di trasporto comportano una variazione della velocità e della portata del gas. Aumentando il flusso del gas di trasporto, aumenta la concentrazione dell'analita nella torcia con relative maggiori sensibilità analitiche. Aumentando la velocità del gas di trasporto, peraltro, si facilita la deposizione dell'analita nel nucleo ad alta temperatura del plasma ma si riduce il tempo di permanenza con conseguente riduzione della sensibilità, in particolare per quegli elementi con alto potenziale di eccitazione. Questi due parametri determinano anche la quantità di solvente introdotto nella torcia e quindi anche la temperatura e la concentrazione delle specie che danno luogo al segnale di fondo (ad es. le specie ossidrilie). Il miglior compromesso tra sensibilità e precisione si ottiene generalmente con velocità di aspirazione dell'ordine di 1 mL/min per soluzioni acquose e di 0,4 - 0,6 mL/min per solventi organici. Il sistema di drenaggio deve essere mantenuto efficiente in modo da ridurre al minimo le oscillazioni di pressione della camera di nebulizzazione.

9.3 - Torcia ed interfaccia ottica

I parametri di regolazione della torcia e dell'interfaccia ottica si identificano con l'altezza d'osservazione in torcia e con l'atmosfera circostante la stessa. Poiché la temperatura del plasma diminuisce all'aumentare della distanza dal nucleo della torcia, variando l'altezza di osservazione rispetto al bordo della torcia stessa è possibile esaminare zone del plasma a temperature diverse aventi diverse distribuzioni della densità di popolazione atomica e quindi di sensibilità. Il controllo dell'atmosfera circostante la sorgente plasma, nonché di tutto il banco ottico, si rende necessario in caso di determinazioni analitiche a lunghezza d'onda inferiore a 190 nm. Questa esigenza può determinarsi sia per l'assenza di righe analitiche sfruttabili a lunghezza d'onda superiore, sia per la presenza di interferenze spettrali molto sensibili a lunghezza d'onda superiori. Come è noto, la trasmissione delle radiazioni elettromagnetiche a lunghezze d'onda inferiori a 190 nm è ostacolata dall'assorbimento delle bande dell'ossigeno atmosferico, che va, pertanto, rimosso dal sistema ottico e dalle aree circostanti la sorgente plasma mediante un flusso di gas inerte (azoto, argon) oppure operando sottovuoto.

9.4 - Spettrometro

I parametri di regolazione dello spettrometro risultano i seguenti:

- geometria delle fenditure;
- angolo di incidenza della radiazione sul reticolo;
- tensione applicata al fotomoltiplicatore.

L'altezza della fenditura determina l'altezza dell'immagine osservata e pertanto influisce sul rapporto segnale/rumore di fondo. A tal fine sono preferite altezze ridotte, compatibilmente con l'ottenimento di una adeguata sensibilità strumentale. La larghezza della fenditura determina sia l'ampiezza spettrale trasmessa (banda passante) sia la larghezza dell'immagine osservata. Pertanto, una diminuzione della larghezza della fenditura, sebbene provochi una generale riduzione della sensibilità dello strumento, comporta d'altro canto, un netto miglioramento del rapporto segnale/rumore di fondo. La selezione della lunghezza d'onda analitica viene condotta mediante la rotazione del reticolo disperdente che modifica così l'angolo di incidenza della radiazione emessa. Compatibilmente con la presenza di eventuali interferenze, e tranne i casi in cui la concentrazione dell'elemento da analizzare è così elevata da consigliare l'uso di lunghezze d'onda meno sensibili, è sempre consigliabile selezionare la lunghezza d'onda più sensibile e se, necessario, diluire il campione. L'alimentazione del fotomoltiplicatore è regolata in funzione del tipo e dell'intensità della banda analitica. Variando la tensione applicata al fotomoltiplicatore, si influisce sia sulla precisione della misura che sul rapporto segnale/rumore di fondo. In linea di principio è consigliabile utilizzare tensioni elevate avendo però cura di evitare fenomeni di saturazione elettronica. La tensione applicata al fotomoltiplicatore non deve comunque superare l'80 % della tensione massima ammissibile.

10 - MESSA A PUNTO DELL'APPARECCHIATURA

Avviare lo strumento e attendere un tempo di riscaldamento e di stabilizzazione della apparecchiatura di almeno 30 min prima di iniziare qualsiasi operazione di taratura. La Tab. 4 fornisce una base di riferimento generale per le condizioni strumentali. A causa di differenze costruttive delle apparecchiature disponibili e delle loro diverse caratteristiche e potenzialità, l'operatore dovrà attenersi alle condizioni specifiche consigliate dai manuali operativi forniti a corredo dell'apparecchiatura.

10.1 - Flusso di aspirazione al nebulizzatore

Aspirare una soluzione standard di sodio a 1000 mg/L, (6.2.1) attendere circa trenta secondi quindi seguendo le condizioni riportate nel manuale

operativo regolare il flusso dell'aerosol del nebulizzatore sino ad ottenere una ben definita regione di emissione gialla nella sorgente al plasma che si estende fra 5 e 20 mm al di sopra della spirale in rame della radiofrequenza. Registrare il flusso di aspirazione del nebulizzatore, lavare con il bianco di calibrazione per almeno 3-4 minuti e misurare il volume di soluzione aspirata nell'unità di tempo (mL/min).

Tab. 4 - Condizioni operative orientative per gli spettrometri di emissione in sorgente plasma

Potenza della radiofrequenza	1.100 W
Pressione argon	275 kPa
Potenza della radiofrequenza riflessa	< 5 W
Flusso argon raffreddamento	20 L/min
Altezza di osservazione sopra l'avvolgimento per radiofrequenza	15 mm
Flusso argon trasporto	600 mL/min
Flusso argon sostentamento	300 mL/min
Diametro iniettore	< 1 mm
Flusso aspirazione	1 - 2 mL/min
Alimentazione gas argon	liquido o bombole

10.2 - Rapporto segnale/rumore

Aspirare la soluzione (6.2.3) e registrare le intensità massime di emissione a diverse altezze lungo la sorgente plasma (da 14 a 18 mm sopra l'avvolgimento in rame). Le lunghezze d'onda alle quali effettuare le letture sono rispettivamente 193,696 nm per As, 213,856 nm per Zn, 257,610 nm per Mn, 421,552 nm per Sr e 455,403 nm per Ba. Ripetere l'operazione con il bianco di calibrazione. Determinare gli andamenti dei rapporti segnale/rumore e scegliere la posizione per cui il citato rapporto risulta massimo per ciascun elemento. Nel caso di determinazioni simultanee mediare la posizione ottimale di osservazione per i diversi elementi.

10.3 - Flusso di alimentazione della soluzione

Aspirare con flussi variabili crescenti la soluzione (6.2.3) e registrare le intensità di emissione dei vari analiti, alle righe analitiche prescelte, ogni 25 mL/min, nell'intervallo da 500 a 800 mL/min. Condurre almeno tre determinazioni successive e quindi ripetere l'operazione con il bianco di calibrazione. Dopo sottrazione dei valori del bianco da quelli di emissione si ottengono le intensità di emissione nette alle diverse velocità di flusso. Si riporta in grafico e si seleziona il valore di flusso al nebulizzatore per cui si ottiene la massima intensità del segnale.

10.4 - Determinazione del BEC, della stabilità a breve termine (CV%), del limite di rivelabilità (LR)

Costruire la curva di taratura, per un solo livello di concentrazione, leggendo in sequenza il bianco e la soluzione multielementare (6.2.3). Effettuare dieci repliche su entrambe le soluzioni e registrare i risultati relativi alla soluzione multielementare. I coefficienti di variazione (CV%) relativi ai vari analiti considerati rappresentano la stabilità delle determinazioni a breve termine espressa in termini percentuali (precisione).

E' possibile, a questo punto, calcolare il valore della concentrazione equivalente al fondo (BEC) in base alla seguente espressione:

$$BEC = \left(\frac{X_b}{X_s} \right) * C_s$$

dove:

- X_b = intensita' media di emissione del bianco.
- X_s = intensita' media di emissione netta della soluzione multielementare contenente As, Zn, Mn, Sr e Ba
- C_s = concentrazione della soluzione in mg/L

Rileggere la prova in bianco come campione incognito; calcolare il limite di rivelabilità dell'elemento considerato in accordo con la seguente espressione:

$$LR = 3 * S_1 \left(\frac{C_s}{X_n} \right)$$

dove :

- S_1 = scarto tipo delle intensita' misurate per la soluzione del bianco.
- X_n = intensita' media netta della soluzione multielementare contenente As, Zn, Mn, Sr e Ba
- C_s = concentrazione della soluzione in mg/L.

Si tenga presente che i limiti di rivelabilità calcolati in questo modo hanno un ampio margine di errore (50% e più) dovuto al limitato numero di misure effettuate. Tutte le verifiche sopra riportate possono essere condotte, in funzione delle necessità analitiche, con elementi diversi da quelli qui indicati. Si consideri che in spettrometria di emissione al plasma l'elemento di riferimento solitamente considerato è il manganese e per tale motivo i controlli del BEC, precisione e LR possono essere effettuati utilizzando la soluzione (6.2.2). Nel caso si volessero determinare i valori di precisione a breve termine in funzione della

concentrazione di analita si possono ripetere le misure fatte in precedenza per la soluzione multielementare contenente As, Zn, Mn, Sr e Ba considerando due livelli di concentrazione (rispettivamente il più basso ed il più alto) tra quelli che verranno utilizzati per la taratura dello spettrometro.

10.5 - Linearità della curva di taratura

Preparare delle soluzioni alla concentrazione di 1, 10, 20, 50 e 100 mg/L di Al a partire dalla soluzione (6.2.4) per diluizione con acqua deionizzata. Costruire la curva di taratura aspirando ed analizzando le soluzioni di taratura e il bianco. Effettuare le letture alle seguenti righe analitiche dell'alluminio: 308,215 nm, 309,271 nm, 394,401 nm, 396,152 nm. Visualizzare le curve di taratura e valutare la bontà della linearità calcolando il coefficiente di correlazione, ($R^2 > 0,999$), o mediante la stima dei residui della regressione.

10.6 - Frequenza dei controlli

I parametri strumentali individuati devono essere controllati e verificati nel tempo con una frequenza che sarà funzione sia dell'utilizzo dello strumento che dello specifico parametro considerato. A titolo di esempio, per livelli di utilizzo medi di circa 3-4 giorni per settimana, la concentrazione equivalente al fondo e la ripetibilità a breve termine vanno controllati giornalmente (ogni volta che si utilizza lo strumento) mentre la ripetibilità a lungo termine va verificata solo per determinazioni che si protraggono per diverse ore. Il limite di rivelabilità e la linearità della curva di calibrazione devono essere verificate solo in fase di messa a punto / validazione del metodo analitico o quando si analizza per la prima volta una data tipologia di matrice. I controlli più operativi quali la verifica dei flussi al nebulizzatore o l'altezza di osservazione in torcia dovranno essere effettuati in occasione di qualche modifica della configurazione strumentale o quando i valori sperimentali di BEC, precisione e LR non soddisfano i valori di riferimento. In assenza di definiti valori a cui fare riferimento per il controllo di BEC, CV% e LR si dovrà seguire l'andamento di tali parametri nel tempo, riportando i valori assoluti misurati in funzione del tempo e intervenendo con azioni correttive qualora si verificino brusche variazioni dei valori determinati.

10.7 - Calibrazione

Dopo aver effettuato la taratura dello strumento come descritto in precedenza costruire le rispettive curve di calibrazione degli analiti utilizzando le soluzioni di riferimento descritte in (6.1). Introdurre le varie soluzioni multielementari di calibrazione ad una portata costante per almeno 30 s ed attendere il

raggiungimento delle condizioni di equilibrio prima di iniziare l'integrazione del segnale. Tra una determinazione e l'altra effettuare lavaggi prolungati in modo da minimizzare eventuali effetti memoria. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento almeno tre volte ed effettuare la media. Lavare il sistema con la soluzione di lavaggio tra un campione e l'altro. Al termine della calibrazione verificare la linearità della risposta strumentale esaminando il coefficiente di correlazione della regressione lineare o valutando la bontà della interpolazione attraverso l'analisi dei residui. Ripetere l'analisi di almeno una soluzione utilizzata per la calibrazione verificando che le concentrazioni riscontrate siano comprese tra il 95% e il 105% dei valori attesi, in caso contrario ripetere la calibrazione.

11 - ANALISI DEI CAMPIONI

Prima di eseguire l'analisi dei campioni impostare tutti i parametri strumentali seguendo quanto riportato nel manuale operativo dello strumento. Si consiglia di leggere i campioni alternando ad essi delle soluzioni di riferimento (ad es. cinque campioni seguiti dalle soluzioni di riferimento). L'analisi dei campioni deve essere eseguita nell'intervallo coperto dalla retta di calibrazione e sia i campioni che le soluzioni di lavoro devono essere analizzati nelle stesse condizioni strumentali ed effettuando almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare. Se il valore riscontrato nella misura di un campione risulta superiore a quello corrispondente alla soluzione di calibrazione con la maggiore concentrazione, ripetere l'analisi dopo opportuna diluizione del campione stesso. Alcuni problemi analitici sono associabili alla deposizione e/o alla ritenzione per adsorbimento dell'analita sulle superfici costitutive del sistema di introduzione del campione. Lavaggi ragionevolmente protratti fra un campione e l'altro, possono minimizzare o risolvere il problema solo nel caso di ritenzione reversibile o labile. Nel caso di analisi di componenti presenti a basse concentrazioni si raccomandano, pertanto, tempi medi di lavaggio dell'ordine di qualche decina di secondi e quando possibile, l'introduzione dei campioni in ordine crescente di concentrazione.

12 - CONTROLLO DI QUALITÀ

Secondo le norme internazionali più recenti ogni laboratorio è tenuto ad operare dei programmi di controllo formale della qualità dei dati in esso prodotti (USEPA, 1979). Il laboratorio, pertanto, deve disporre di reattivi "bianchi" e soluzioni di riferimento di opportune caratteristiche al fine di dimostrare periodicamente le proprie prestazioni. Inoltre si consiglia di analizzare ad intervalli di tre mesi dei campioni (solidi o liquidi) certificati (ad es. materiali BCR o CRM). E' interesse primario del laboratorio esibire e stilare rapporti periodici della propria attività e capacità operative.

13 - CALCOLI

La maggior parte delle apparecchiature disponibili in commercio risultano completamente assistite da mezzi informatici molto sofisticati, pertanto, è possibile condurre le operazioni analitiche (calibrazione e analisi) in completa automazione, secondo programmi di elaborazione molto versatili. Si rimanda ai manuali operativi delle apparecchiature per ogni dettaglio in merito. I dati analitici vengono espressi in mg/L mediante confronto con le curve di calibrazione, tenendo conto delle eventuali diluizioni effettuate. Non riportare valori di concentrazione inferiori ai limiti di rivelabilità del metodo.

14 - PRECISIONE ED ACCURATEZZA

Le Tabb. 5a, 5b, 5c riportano, a titolo di esempio, i dati ottenuti in riferimento a campioni di acque naturali, potabili e di scarico primarie (Martin *et al.*, 1991). Per ciascuna matrice sono state campionate cinque aliquote, sottoposte ad analisi e le medie delle cinque determinazioni sono state acquisite per la valutazione delle concentrazioni di fondo per ciascun analita. Si riporta, inoltre, per ciascun analita, la concentrazione di fondo, la media del recupero percentuale, nonché la deviazione standard del recupero percentuale.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1995): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 19th edition, Washington

Bettinelli M., Del Monte M.G. e Zappa G. (1993): "Impiego dell'ICP-AES nel Laboratorio Chimico: Criteri per la stesura di metodi normalizzati, in C. Minoia, M. Bettinelli, E. Sabbioni, "Applicazioni dell'ICP-AES nel laboratorio chimico e tossicologico", Vol.1 Analisi industriali e alimentari, Morgan Edizioni Tecniche, Milano.

Boss C.B. and Fredeen K.J. (1997): "Concept, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry", Second Edition Perkin Elmer, USA.

Boumans P.W.J.M. (1987): "Inductively coupled plasma emission spectroscopy. Part 1: Methodology instrumentation and performance", Chapter 6, 343-357, J.Wiley e Sons, New York.

Garbarino J.R. and Taylor H.E. (1979): "An inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy method for routine water quality testing", *Appl. Spectroscopy*, 33 - 39.

IRSA (1994): "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, 100, 342 pp.

Martin T.D, Brockof L.A., Creed J.T. and Lang S. E. (1991): "Determination of trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma- atomic emission spectroscopy", U.S. EPA Method 200.7.

Moore G.L. (1989): "Introduction to Inductively Coupled Plasma Spettrometry", Elsevier Science Publisher, New York.

Thompson M. and Walsh J.N. A (1983): "Handbook of Inductively Coupled Plasma Spettrometry", Blackie e Sone Ltd., London.

U.S. EPA (1979): "Handbook for analytical quality control in water and wastewater laboratories". 600/4-79-019.

U.S.EPA (1992): "Methods for determination of metals in environmental sample", CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Tab. 5a - Esempio di determinazioni analitiche in acque naturali mediante spettroscopia plasma (Martin *et al.*, 1991)

Analita	Conc. iniziale (mg/L)	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio %	ScartoTipo	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio %	Scarto Tipo
Ag	< LR	0,05	97	0,7	0,2	96	0,2
Al	0,036	0,05	107	7,8	0,2	101	1,1
As	< LR	0,05	107	0,7	0,2	104	0,4
B	0,063	0,1	97	0,6	0,4	98	0,8
Ba	0,102	0,05	102	3,0	0,2	99	0,9
Be	< LR	0,01	100	0,0	0,1	100	0,0
Ca	93,8	5,0	*	*	20,0	100	4,1
Cd	0,002	0,01	90	0,0	0,1	98	0,0
Co	< LR	0,02	94	0,4	0,2	94	0,4
Cr	< LR	0,01	100	7,1	0,1	100	0,4
Cu	0,005	0,02	100	1,1	0,2	96	0,5
Fe	0,042	0,1	99	2,3	0,4	97	1,4
Hg	< LR	0,05	94	2,8	0,2	93	1,2
K	8,21	5,0	96	3,4	20,0	101	1,2
Li	0,001	0,02	100	7,6	0,2	104	1,0
Mg	24,5	5,0	95	5,6	20,0	96	1,6
Mn	2,76	0,01	*	*	0,1	*	*
Mo	< LR	0,02	108	1,8	0,2	101	0,2
Na	95,0	5,0	101	11,4	20,0	100	3,1
Ni	< LR	0,02	112	1,8	0,2	96	0,2
P	0,197	0,1	95	12,7	0,4	93	3,4
Pb	< LR	0,05	97	4,9	0,2	95	0,2
Sb	< LR	0,05	98	2,8	0,2	99	1,4
Se	< LR	0,1	102	0,4	0,4	94	1,1
Si	13,1	5,0	93	4,8	20,0	99	0,8
Sn	< LR	0,03	98	2,8	0,2	94	0,2
Sr	0,274	0,1	94	5,3	0,4	95	1,7
Tl	< LR	0,1	92	0,4	0,4	95	1,1
V	< LR	0,05	98	0,0	0,4	99	0,4
Zn	0,508	0,05	*	*	0,2	99	2,5

< LR = concentrazione inferiore al limite di rilevabilità

* =concentrazione dell'aggiunta inferiore al 10% della concentrazione di fondo del campione

Tab 5b - Esempio di determinazioni analitiche in acque potabili mediante spettroscopia plasma (Martin *et al.*, 1991)

Analita	Conc. iniziale	Conc. aggiunta	Recupero medio	Scarto	Conc. aggiunta	Recupero medio	Scarto
	(mg/L)	(mg/L)	%	Tipo	(mg/L)	%	Tipo
Ag	< LR	0,05	95	0,7	0,2	98	0,0
Al	0,185	0,05	98	8,8	0,2	105	3,0
As	< LR	0,05	108	1,4	0,2	101	0,7
B	0,023	0,1	98	0,2	0,4	98	0,2
Ba	0,042	0,05	102	1,6	0,2	98	0,4
Be	< LR	0,01	100	0,0	0,1	99	0,0
Ca	35,2	5,0	101	8,8	20,0	103	2,0
Cd	< LR	0,01	105	3,5	0,1	98	0,0
Co	< LR	0,02	100	0,0	0,2	99	0,5
Cr	< LR	0,01	110	0,0	0,1	102	0,0
Cu	< LR	0,02	103	1,8	0,2	101	1,2
Fe	0,008	0,1	106	1,0	0,4	105	0,3
Hg	< LR	0,05	103	0,7	0,2	100	0,4
K	1,98	5,0	109	1,4	20,0	107	0,7
Li	0,008	0,02	103	6,9	0,2	110	1,9
Mg	9,08	5,0	104	2,2	20,0	100	0,7
Mn	< LR	0,01	100	0,0	0,1	99	0,0
Mo	< LR	0,02	95	3,5	0,2	108	0,5
Na	10,3	5,0	99	3,0	20,0	108	1,0
Ni	< LR	0,02	108	1,8	0,2	104	1,1
P	0,045	0,1	102	13,1	0,4	104	3,2
Pb	< LR	0,05	95	0,7	0,2	100	0,2
Sb	< LR	0,05	99	0,7	0,2	102	0,3
Se	< LR	0,1	87	1,1	0,4	99	0,8
Si	0,5	5,0	104	3,3	20,0	98	1,1
Sn	< LR	0,05	103	2,1	0,2	101	1,8
Sr	0,181	0,1	102	0,3	0,4	105	0,8
Tl	< LR	0,1	101	0,9	0,4	101	0,1
V	< LR	0,05	101	0,7	0,2	99	0,2
Zn	0,005	0,05	101	0,7	0,2	98	0,9

* =concentrazione dell'aggiunta inferiore al 10% della concentrazione di fondo del campione

< LR = concentrazione inferiore al limite di rilevabilità

Tab. 5c - Esempio di determinazioni analitiche in acque di scarico (a) mediante spettroscopia plasma (Martin *et al.*, 1991)

Analita	Conc. iniziale (mg/L)	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio %	Scarto Tipo	Conc.aggiunta (mg/L)	Recupero medio %	Scarto Tipo
Ag	0,009	0,05	92	1,5	0,2	95	0,1
Al	1,19	0,05	*	*	0,2	113	12,4
As	< LR	0,05	99	2,1	0,2	93	2,1
B	0,228	0,1	217	16,3	0,4	119	13,1
Ba	0,189	0,05	90	6,8	0,2	99	1,6
Be	< LR	0,01	94	0,4	0,1	100	0,4
Ca	87,9	5,0	*	*	20,0	101	3,7
Cd	0,009	0,01	89	2,6	0,1	97	0,4
Co	0,018	0,02	95	3,1	0,2	93	0,4
Cr	0,128	0,01	*	*	0,1	97	2,4
Cu	0,174	0,02	98	33,1	0,2	98	3,0
Fe	1,28	0,1	*	*	0,4	111	7,0
Hg	< LR	0,05	102	1,4	0,2	98	0,6
K	10,8	5,0	104	2,8	20,0	101	0,6
Li	0,011	0,02	103	8,5	0,2	105	0,8
Mg	22,7	5,0	100	4,4	20,0	92	1,1
Mn	0,199	0,01	*	*	0,1	104	1,9
Mo	0,125	0,02	110	21,2	0,2	102	1,3
Na	218	5,0	*	*	20,0	*	*
Ni	0,087	0,02	122	107	0,2	98	0,8
P	4,71	0,1	*	*	0,4	*	*
Pb	0,015	0,06	91	3,5	0,2	98	1,3
Sb	< LR	0,09	97	0,7	0,2	103	1,1
Se	< LR	0,1	108	5,9	0,4	101	2,8
Si	18,7	5,0	124	4,0	20,0	108	1,1
Sn	0,016	0,05	90	3,8	0,2	95	1,0
Sr	0,515	0,1	103	6,4	0,4	96	1,8
Tl	< LR	0,1	105	0,4	0,4	95	0,0
V	0,003	0,05	93	0,8	0,2	97	0,2
Zn	0,180	0,05	98	3,3	0,2	101	1,0

* = concentrazione dell'aggiunta inferiore al 10% della concentrazione di fondo del campione

< LR = concentrazione al limite di rilevabilità

(a) = effluenti primari da impianti di trattamento

SALMONELLA NEI FANGHI DI RISULTA: ASPETTI IGIENICO-SANITARI E METODOLOGIA DI ANALISI

Lucia Bonadonna, Istituto Superiore di Sanità, Roma

RIASSUNTO

Vengono prese in considerazione le problematiche relative agli aspetti igienico-sanitari e tecnici dei fanghi di depurazione da impianti di trattamento di acque reflue rivolgendo particolare attenzione al patogeno *Salmonella*. La sua ricerca nei fanghi di

risultato ha di recente acquisito importanza in seguito all'inserimento del parametro nella normativa relativa all'utilizzazione dei fanghi in agricoltura che ne richiede il rilevamento quantitativo.

SUMMARY

This review is intended to give an overview on the hygienic and technical aspects of sludges from treatment plants of wastewater. Most interest is addressed to the pathogen *Salmonella* in view of its quantitative enumeration requested in the Italian legislation on the use of sludge in agriculture.

INTRODUZIONE

I fanghi, quali prodotti di risulta derivati dai processi di trattamento dei liquami, costituiscono il concentrato di tutti gli inquinanti presenti nei reflui: sostanze organiche, composti inorganici anche difficilmente biodegradabili, metalli pesanti e microrganismi.

I fanghi mostrano un'ampia variabilità delle loro caratteristiche fisiche, chimiche, biologiche e tecnologiche che dipendono dalla loro origine, dal tipo di trattamento subito dai reflui, dal fango stesso, dalla durata dello stoccaggio, ecc. A tutt'oggi non vi è univocità nella comunità scientifica nel definire quali siano le proprietà dei fanghi più significative, i metodi per misurarle e le unità di misura da adottare per definirne i requisiti (Ravalli, 1989). Vale inoltre ricordare che la maggior parte degli studi sono indirizzati principalmente alla caratterizzazione e valutazione di parametri tecnologici, chimici e fisici. Ciò non di meno, se si tiene conto oltretutto che il numero dei microrganismi concentrati nei fanghi supera quello presente nelle acque grezze, bisogna considerare, come altrettanto rilevante, lo studio delle caratteristiche microbiologiche, soprattutto nel caso i fanghi vengano utilizzati a scopo agricolo (Kowal, 1985).

L'efficacia dei processi di trattamento cui possono essere sottoposti i fanghi si dimostra, se considerata sulla base della qualità microbica, relativamente elevata. Nei processi a fanghi attivi condotti su liquame chiarificato ed operanti in condizioni ottimali, l'abbattimento di batteri patogeni, agenti eziologici di malattie a circuito fecale-orale (es. *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*) unitamente a quello di altri batteri responsabili di patologie per l'uomo (micobatteri, brucelle, leptospire, ecc.) può raggiungere livelli compresi tra il 95 e il 98%, mentre contemporaneamente la riduzione degli indicatori di contaminazione fecale (coliformi e streptococchi) può toccare il 99% (Bonadonna *et al.*, 1994).

Il problema di rendere igienicamente innocui i fanghi si pone soprattutto, e in modo prioritario, qualora essi vengano sparsi sul terreno. Essi possono sostanzialmente esercitare un effetto fertilizzante sui suoli migliorandone la struttura e, esaltandone i processi biologici, favorire la crescita della vegetazione (Rovere Massarani, 1981). Tuttavia, la presenza di batteri, virus e parassiti (protozoi e metazoi), conglomerati nei fanghi, può rappresentare un rischio sanitario e una limitazione per questa pratica di recupero. Il rischio è legato alla contaminazione di colture vegetali che possono, attraverso la catena alimentare, essere veicolo di trasmissione di malattie (Fradkin, 1988; Havelaar *et al.*, 1983).

Se il rischio può essere correlato più facilmente alla presenza delle forme di vita più resistenti (uova e cisti di metazoi e protozoi, spore batteriche), tuttavia anche le forme vegetative batteriche possono trovare condizioni favorevoli per la loro sopravvivenza e moltiplicazione. Infatti, benché tutti i patogeni più comuni possano essere ritrovati nei fanghi, solo

alcuni vi si trovano con una frequenza significativa. In particolare, microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* possono raggiungere nei fanghi elevate concentrazioni (Ottaviani *et al.*, 1992). Tra i patogeni compresi in questa famiglia, *Salmonella*, per la sua potenziale maggiore diffusione nella popolazione e per la disponibilità di metodiche analitiche sperimentate e applicabili, ha ricevuto più attenzione rispetto ad altri patogeni ed è stata inserita, quale parametro da ricercare, nel Decreto Legislativo del 27 gennaio 1992 n° 99, recepimento della Direttiva 86/278/CEE (Commission of European Communities, 1986).

Il decreto stabilisce le norme relative all'impiego dei fanghi in agricoltura allo scopo di disciplinarne l'uso per evitare effetti nocivi sul suolo, sulla vegetazione, sugli animali e sull'uomo. Le condizioni di utilizzo devono prendere in esame sia le caratteristiche del fango, sia quelle del suolo ricettore, specificandone possibilità d'uso e divieti. Dalla considerazione di ciò, la normativa ha tenuto conto sia della potenzialità fertilizzante dei fanghi, sia di quella inquinante ed ha stabilito quando e in che termini questa ultima deve diventare limitante per la prima.

Dal punto di vista microbiologico la normativa fissa il limite di concentrazione nei fanghi per il solo parametro *Salmonella* la cui concentrazione, nei reflui e conseguentemente nei fanghi derivati, può risultare maggiore rispetto a quella di altri patogeni in quanto legata anche alla possibilità di diffusione da parte di portatori sani; la sua presenza potrebbe rappresentare in un certo qual modo un indice della presenza di altri patogeni batterici.

Per quanto riguarda ad esempio *S. typhi*, non sempre rilevabile in campioni ambientali, è riconosciuto che essa sia molto più diffusa nella popolazione di quanto si possa desumere in base ai dati di incidenza della malattia clinicamente accertata. E' stato calcolato che in una popolazione esposta ad alto grado di infezione, soltanto una piccola porzione sviluppa la malattia (meno del 20% degli infettati).

Diversi studi hanno messo in evidenza che la diffusione di *Salmonella* nell'ambiente può essere favorita dall'uso, come fertilizzanti, di fanghi non trattati; indagini svolte dove questa pratica è applicata comunemente hanno messo in evidenza che nel fango non igienizzato è possibile rilevare concentrazioni variabili tra 2 e 5 milioni di salmonelle per litro con il 97% dei campioni positivo per questo patogeno (Breer, 1985).

I processi di trattamento del fango sono comunque in grado di ridurre il numero di salmonelle, come di tutti i microrganismi presenti. Tuttavia i diversi trattamenti possono produrre differenti risultati. A questo proposito è stato rilevato che la digestione anaerobica mesofila non è in grado di fornire un fango con sufficienti garanzie igieniche: le concentrazioni di *Salmonella* si possono ridurre da 10^5 a 10^3 per litro. Risultati migliori si ottengono con la digestione aerobica mesofila che permette di ridurre di tre unità logaritmiche il numero di *Salmonella*. Nondimeno è da sottolineare come il fattore che

maggiormente influenza la sopravvivenza dei microrganismi durante la digestione del fango sia la temperatura. Pertanto si verifica che con la sola digestione aerobica a freddo la concentrazione di *Salmonella* venga ridotta di un solo fattore (Bonadonna, 1995).

La temperatura influenza anche i processi biologici che si svolgono nel terreno. I microrganismi apportati al suolo con i fanghi vengono ad inserirsi in un equilibrio preesistente non sempre ad essi favorevole e il fattore temperatura interviene in misura prevalente nel contribuire o meno alla loro sopravvivenza nell'ambiente, e nel suolo in particolare.

I tempi di sopravvivenza sono in genere maggiori in terreni neutri o alcalini e comunque umidi. Inoltre, i periodi piovosi e le basse temperature possono costituire parametri a favore del mantenimento della vitalità batterica. E' stato ripetutamente osservato che ad alte temperature, in un ambito in cui i valori massimi non sono letali, i tempi di sopravvivenza sono nettamente inferiori, probabilmente in funzione dell'aumento della competizione con la flora autoctona antagonista. In particolare, la capacità di sopravvivenza di *Salmonella*, in suoli trattati con fanghi, dipende in modo prevalente da fattori climatici: nel periodo invernale il tempo di sopravvivenza è stato calcolato tra i 12 e i 60 giorni. Tuttavia, si riscontrano differenze nei tempi in funzione dei diversi sierotipi: sono stati segnalati tempi variabili tra i 30 giorni e un anno.

Indagini svolte su diversi grandi impianti a fanghi attivi di trattamento di acque reflue urbane hanno messo in evidenza la possibilità di ottenere risultati diversi quando gli stessi campioni vengono contemporaneamente analizzati con metodiche diverse per la ricerca di *Salmonella* (IRSA, 1983). I risultati ottenuti hanno fornito percentuali elevate di positività e concentrazioni variabili del patogeno in funzione del tipo di trattamento subito dal fango; inoltre tutti i campioni esaminati hanno fornito valori elevati di concentrazione, in alcuni casi superando il limite stabilito per *Salmonella* dalla normativa italiana relativa all'impiego dei fanghi in agricoltura (10^3 MPN/g_{ss}), (Bonadonna *et al.*, 1994).

Nel corso delle indagini sopra menzionate, svolte in un arco di tempo di quattro anni, è stato evidenziato come la caratteristica strutturale dei fanghi possa influenzare i risultati di analisi volte al rilevamento dei microrganismi in essi presenti. Infatti, sono state osservate differenze significative nelle medie dei valori ottenuti ($P < 0,05$) se, preventivamente, sul campione veniva o meno praticato un pretrattamento prima dell'analisi. Infatti, le particelle di cui è composto il fango possono costituire, oltre che un fattore di sostentamento e protezione, anche un sito di adesione per i microrganismi che vengono in esse segregati. Mezzi diversamente energici, quali agitazione meccanica, omogeneizzazione e sonicazione possono permettere la disaggregazione delle particelle di fango con conseguente rilascio in misura diversa dei microrganismi in esse aggregati.

Le difficoltà che si incontrano nell'analisi dei fanghi derivano in misura elevata dalla stretta associazione tra particelle e microrganismi e tra questi reciprocamente tra loro; per rilevarli è necessario pertanto separare, liberandoli dall'aggregazione, i singoli microrganismi. Infatti, l'eventualità che aderiscano tra loro può produrre errori di valutazione sul numero di microrganismi realmente presenti anche se molteplici possono essere comunque i meccanismi in grado di interferire sul loro isolamento: meccanismi di competizione biologica e presenza di cellule che hanno subito stress ambientale intervengono in misura prioritaria. In questo caso, l'analisi della varianza, ha evidenziato che la differenza tra le medie dei valori ottenuti con i diversi metodi di pretrattamento era statisticamente significativa ($P < 0,05$). Di seguito verrà indicato uno tra i metodi analitici utilizzati nell'indagine sopra menzionata che, da considerarsi di riferimento a fronte di una indicazione di carattere tecnico dettata dalla legislazione italiana, può essere anche uno strumento applicativo utile alla pianificazione e alla unificazione delle procedure analitiche per la ricerca di *Salmonella* nei fanghi di depurazione.

SALMONELLA: PROCEDURA DI ANALISI

Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per l'analisi di fanghi di depurazione.

Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la concentrazione di *Salmonella* nei fanghi con il metodo dei tubi multipli. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive così suddivise:

- Pretrattamento del campione
- Prearricchimento
- Arricchimento
- Isolamento
- Conferma e Identificazione

Controllo di qualità

E' opportuno procedere allo svolgimento di un controllo di qualità mediante prove atte a valutare l'efficienza del metodo eseguito dal laboratorio utilizzando standard specifici contenenti una densità nota di microrganismi.

Pretrattamento

Permette la disaggregazione delle particelle di fango con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei clusters microbici.

Procedura

Pesare 20 g di fango e risospenderli in 180 mL di acqua fisiologica tamponata (K_2HPO_4 3g/L, KH_2PO_4 1 g/L, NaCl 8,5 g/L; pH 7,2±0,2). Lasciare agitare per alcuni minuti la sospensione su piastra magnetica o tramite Stomacher per rendere la sospensione omogenea.

Sottoporre il campione, per circa 15 secondi, a omogeneizzazione meccanica con omogeneizzatore elettrico, del tipo "per coltura di tessuti" con regolatore di velocità da 1000 a 10000 g/m e pestello in teflon, mantenendo la sospensione in un bagno di ghiaccio. Prima dell'omogeneizzazione è possibile, eventualmente aggiungere Tween 80 ad una concentrazione finale di 0,01% (v/v).

Prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo la cui formulazione è riportata di seguito.

Acqua Peptonata Tamponata

Composizione per 1 L di terreno:

Peptone	10 g
Sodio cloruro	5 g
Sodio fosfato monoacido	3,5 g
Potassio fosfato biacido	1,5 g

pH 7,2 ± 0,2

Il terreno si prepara a partire dai singoli ingredienti. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Preparare il brodo a concentrazione tale che l'inoculo non diluisca la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard. Distribuire in tubi e sterilizzare a 121°C per 15 min. Conservare il terreno a circa +4°C per non più di due settimane.

Procedura

Inoculare diluizioni scalari della sospensione di fango trattata, in triplice, in almeno 3 serie di tubi ciascuna contenenti Acqua Peptonata Tamponata. La scelta delle aliquote da inoculare si basa anche sulla qualità del fango da esaminare in considerazione che a maggiori volumi di inoculo può corrispondere un mancato rilevamento di *Salmonella* la cui presenza è facilmente schermata da elevate concentrazioni di flora batterica interferente. Volumi indicativi, dettati dall'esperienza e dalle caratteristiche dei fanghi, variano tra 10 e 0,1 mL. Incubare a 36±1°C per 18-24 ore.

Arricchimento

Esistono in commercio diversi substrati usati per la prova di arricchimento di *Salmonella* che garantiscono buoni risultati in fase analitica anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutti i sierotipi di *Salmonella* presenti. Di seguito si riporta la formulazione del Brodo Rappaport Vassiliadis.

Brodo Rappaport Vassiliadis (Rappaport Vassiliadis Broth)

Composizione per 1 L di terreno:

Peptone di soia	5 g
Sodio cloruro	8 g
Potassio diidrogeno fosfato	1,6 g
Magnesio cloruro esaidrato	40 g
Verde malachite	40 mg

pH 5,2 ± 0,2

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in tubi e sterilizzare a 116°C per 15 min. Conservare a circa +4°C per non più di una settimana. L'aggiunta al brodo di arricchimento di 10 µg/mL di sodio novobiocina può migliorare il recupero di *Salmonella*.

Procedura

Da ciascun tubo del brodo di prearricchimento eseguire, in altrettanti tubi di Brodo Rappaport Vassiliadis, l'inoculo di una stessa aliquota della brodocoltura (es. 1 mL).

Incubare a 42±0,5°C per 24+24 ore. A questa temperatura e per la presenza in questo terreno di verde malachite tuttavia *S. typhi* non cresce. La sua ricerca attualmente viene ancora effettuata in brodi alla selenite, il cui uso richiede particolare attenzione e l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

Isolamento

Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento di *Salmonella* che garantiscono buoni risultati in fase analitica. Di seguito si riporta la formulazione dell'Hektoen Enteric Agar.

Hektoen Enteric Agar

Composizione per 1 L di terreno:

Peptone	12	g
Estratto di lievito	3	g
Sali biliari	9	g
Lattosio	12	g
Saccarosio	12	g
Salicina	2	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio iposolfito	5	g
Citrato ferrico ammoniacale	1,5	g
Agar	13,5	g
Blu di bromotimolo	64	mg
Fucsina acida	40	mg
pH 7,6 ± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di tre settimane.

Procedura

Da ciascuno dei tubi del brodo di arricchimento eseguire, prelevando un'ansata, 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento: la prima dopo 24 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ore. Incubare le piastre a 36±1°C per 24 ore.

Su Hektoen Enteric Agar le colonie sospette di *Salmonella* si presentano verdi con margini netti con o senza centro nero. Il riconoscimento delle colonie di *Salmonella* è in larga parte dovuto all'esperienza, in quanto il loro aspetto può essere vario, non solo tra specie diverse, ma anche in rapporto ad un lotto di terreno rispetto ad un altro. Pertanto è comunque necessario effettuare prove di controllo di qualità intralaboratoriale con ceppi puri di riferimento per verificare la fertilità e la selettività del terreno.

Conferma

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Salmonella*, è necessario eseguire, sulle colonie rilevate, la prova della fermentazione dei carboidrati ed eventualmente la prova della decarbossilazione della lisina.

In alternativa si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio per l'individuazione dell'appartenenza al genere *Salmonella*.

Prima di effettuare ciascuna prova è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su idoneo terreno di crescita non selettivo

ed eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo. Il terreno colturale da utilizzare è quello la cui formulazione è riportata di seguito.

Tryptone Soia Agar (Tryptic Soy Agar)

Composizione per 1 L di terreno:

Tryptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
pH 7,3 ± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare a 121°C per 15 min. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.

Procedura

Isolare le colonie da sottoporre a conferma sul terreno Tryptone Soia Agar e incubare a 36±1°C per 24 ore.

Prova della fermentazione dei carboidrati

Le colonie sospette si trasferiscono, per evidenziare le reazioni per la fermentazione dei carboidrati, su Agar al ferro di Kligler la cui formulazione viene riportata di seguito.

Agar al ferro di Kligler (Kligler Iron Agar)

Composizione per 1 L di terreno:

Estratto di carne	3	g
Estratto di lievito	3	g
Peptone	20	g
Sodio cloruro	5	g
Lattosio	10	g
Glucosio	1	g
Ferro citrato	0,3	g
Sodio tiosolfato	0,3	g
Agar	12	g
Rosso fenolo	50	mg
pH 7,4 ± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione

degli ingredienti. Distribuire in provette e dopo sterilizzazione a 121°C per 15 min lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.

Procedura

Prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno solidificato in provetta. Incubare a 36±1°C per 18-24 ore. E' essenziale che i risultati vengano registrati dopo 18-24 ore di incubazione. Per la interpretazione dei risultati si devono annotare le reazioni di seguito indicate, anche se è da ricordare che quando si isola una delle rare salmonelle lattosio-positivo, anche la superficie inclinata del terreno appare gialla:

Utilizzazione dei carboidrati su Kligler Iron Agar

- Reazione sulla superficie inclinata	Acidità:	colore giallo
	Alcalinità:	colore rosso
- Reazione di profondità	Acidità:	colore giallo
	Alcalinità:	colore rosso
- Produzione di gas	Presente:	bolle o rottura dell'agar
	Assente	
- Produzione di H ₂ S:	Presente:	annerimento del terreno
	Assente	

Le reazioni dopo 18-24 ore di incubazione a 36 ± 1°C per le salmonelle sono le seguenti:

Microrganismo	Superficie	Profondità	Gas	H ₂ S
<i>Salmonella</i> spp.	Rosso	Giallo	+	+
<i>S. typhi</i>	Rosso	Giallo	-	+
<i>S. paratyphi</i>	Rosso	Giallo	-	-

Prova della decarbossilazione della lisina

Le colonie sospette si trasferiscono, per evidenziare le reazioni per la decarbossilazione della lisina, su Agar al ferro e lisina la cui formulazione viene riportata di seguito.

Agar al ferro e lisina (*Lysine Iron Agar*)

Composizione per 1 L di terreno:

Casitone	5	g
Estratto di lievito	3	g
Destrosio	1	g
L-lisina	10	g
Ferro ammonio citrato	0,5	g
Agar	13,5	g
Sodio tiosolfato	40	mg
Porpora bromocresolo	20	mg

pH 6,7 ± 0,1

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provette e dopo sterilizzazione a 121°C per 12 min lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.

Procedura

Prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno solidificato in provetta. Incubare a 36±1°C per 16-20 ore.

Tutte le salmonelle producono una colorazione violetta sia del becco, sia del cilindro con produzione (annerimento) di idrogeno solforato.

Identificazione

Per l'identificazione si effettuano prove sierologiche di sierotipizzazione eseguite con antisieri specifici polivalenti e monovalenti.

Espressione dei risultati

Il numero di salmonelle presenti in ciascun campione di fango è calcolato in base alla tabella dell'indice MPN (Tab. 1), riportando il valore all'unità di grammo di sostanza secca.

Ricostruire il numero caratteristico a tre cifre corrispondente a un valore dell'indice MPN della tabella in base alle positività riscontrate almeno dopo la fase di conferma. Leggere il valore dell'indice ricavato e moltiplicare per l'inverso del valore di diluizione (es. 10 se la prima serie di tubi considerata per ricostruire il numero caratteristico era stata inoculata con 1, 0,1 e 0,01 mL). Procedere al calcolo del peso secco del fango analizzato. Dal valore ottenuto dell'indice MPN calcolare il numero di salmonelle per grammo di sostanza secca di fango con la seguente formula:

$$N \times \frac{100}{\% \text{ SS}} = \text{Salmonelle / g}_{\text{SS}}$$

Tab. 1 - Indice MPN e limite di fiducia al 95% per varie combinazioni di risultati positivi, quando i tubi vengono inoculati con le diluizioni di 10 mL, 1 mL e 0,1 mL.

Combinazioni positive	Diluizioni nei tubi		
	3		
	MPN index / 100 mL	Limite di fiducia al 95%	
Limite inferiore		Limite superiore	
0-0-0	< 3		
0-0-1	3	< 0,5	9
0-1-0	3	< 0,5	13
0-2-0	-		
1-0-0	4	< 0,5	20
1-0-1	7	1	21
1-1-0	7	1	23
1-1-1	11	3	36
1-2-0	11	3	36
2-0-0	9	1	36
2-0-1	14	3	37
2-1-0	15	3	44
2-1-1	20	7	89
2-2-0	21	4	47
2-2-1	28	10	150
2-3-0	-		
3-0-0	23	4	120
3-0-1	39	7	130
3-0-2	64	15	380
3-1-0	43	7	210
3-1-1	75	14	230
3-1-2	120	30	380
3-2-0	93	15	380
3-2-1	150	30	440
3-2-2	210	35	470
3-3-0	240	36	1300
3-3-1	460	71	2400
3-3-2	1100	150	4800
3-3-3	≥ 2400		

BIBLIOGRAFIA

Bonadonna L. (1995): "La componente batterica". In: Aspetti tecnico-economici, agronomici, pedologici, igienico-sanitari e normativi dei fanghi di depurazione civili. *Rapporti ISTISAN*, **38**, 233 pp.

Bonadonna L., M. Latini, I. Di Girolamo, M. Ottaviani (1994): "Valutazione della contaminazione microbiologica di fanghi di depurazione di reflui civili: problemi legati alle metodiche di analisi". *Rapporti ISTISAN*, **17**, 84 pp.

Breer C. (1985): "Environmental contamination with Salmonellae by the spread of animal waste and sewage sludge", *Experientia*, **41**,: 533-537.

Commission of the European Communities (1986): "Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture", *Official Journal of the European Communities*, L 181/6 - 181/12 of 04/07/1986.

D. L. 27 gennaio 1992, n° 99. Attuazione della direttiva 86/278/CEE concernente la protezione dell'ambiente, in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n° 38 del 15 febbraio 1992.

Fradkin L. (1988): "Development of a qualitative pathogen risk assessment methodology for municipal sludge land filling", EPA Report, 600-S/6-88-006.

Havelaar A., Oosterom, S. Notermans and F. van Knapen (1983): "Hygienic aspects of the application of sewage sludge to land". In: *International Symposium on Biological reclamation and land utilization of urban wastes*, Napoli, 11-14 October, 1983.

IRSA-CNR (1983): "Metodi analitici per i fanghi", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **64**, Roma.

Kowal E.N. (1985): "Health effects of land application of municipal sludge", EPA Report 600/1-85/015.

Ottaviani M., L. Bonadonna, L. Mancini, E. Veschetti, M. Gasbarro, G. Lulli, A. Zanobini, M. Divizia, L. Gabrieli, D. Donia, A. Panà. (1992): "Aspetti chimici e biologici delle acque e dei fanghi di risulta da un impianto di depurazione", *Ing. Amb.*, **21**, 639-647.

Ravalli M. (1989): "Caratteristiche e confronto dei fanghi provenienti da impianti biologici di acque reflue urbane suscettibili di recupero in agricoltura", *Inform. Recupero*, **10**, 21-24.

Rovere Massarani E. (1981): "Proprietà chimiche, fisico-chimiche, biologiche e biochimiche dei fanghi di depurazione", *Ing. Amb.*, **10**, 110-115.

INFORMAZIONI

ATTIVITA' DELLE UNITA' OPERATIVE AFFERENTI ALLA COMMISSIONE "METODI ANALITICI PER LE ACQUE"

La Commissione "Metodi Analitici per le Acque", insediata presso l'IRSA nel luglio '96, ha provveduto alla costituzione di quattro nuove unità operative (Campionamento, Qualità del dato analitico, Cromatografia ionica e Microinquinanti organici) che si sono andate ad affiancare alle due già da tempo operanti nel settore della standardizzazione di metodi analitici per i metalli e per gli indici biologici.

L'obiettivo primario dell'attività sperimentale svolta dalle suddette unità è la pubblicazione di una nuova edizione del manuale di metodi, prevista per la tarda primavera del 1999. Per quanto concerne i metodi già pubblicati nel Quaderno IRSA n.100 del 1995 che non necessitano di alcuna revisione del protocollo analitico è stata avviata l'operazione di correzione per emendare il testo da lacune, imprecisioni ed errori tipografici, autonomamente evidenziati o gentilmente segnalati dagli addetti ai lavori in questi anni.

Ringraziando fin d'ora quanti hanno fornito o vorranno fornire la loro preziosa collaborazione si invitano gli addetti ai lavori a far pervenire all'Istituto di Ricerca sulle Acque - Commissione dei Metodi Analitici - Via Reno, 1, 00198 Roma, commenti, segnalazioni, precisazioni e quant'altro ritenuto utile per migliorare il testo dei metodi già proposti.

Nel seguito viene riportato un resoconto sullo stato di avanzamento dei lavori delle singole unità operative.

CAMPIONAMENTO

L'unità sta provvedendo ad una sostanziale revisione della sezione 1040 "Metodi di campionamento" del manuale IRSA. In particolare verrà esteso l'ambito di applicazione delle procedure di campionamento anche ai corpi idrici superficiali (laghi, fiumi) in accordo con il disposto del D.L. 130/92 inerente le caratteristiche di qualità delle acque idonee alla vita dei pesci e del D.L. 133/92 sugli scarichi di sostanze pericolose, e saranno meglio precisate le modalità di trasporto, pretrattamento e conservazione dei campioni.

QUALITÀ DEL DATO ANALITICO

Anche in questo caso l'obiettivo primario dell'unità operativa è costituito dalla rielaborazione della sezione "Elaborazione dei risultati" del manuale. La sezione, che attualmente si limita ad introdurre concetti elementari di statistica parametrica, verrà ampliata con l'introduzione dei concetti relativi alla qualità del dato analitico e alle procedure utili al

conseguimento e alla validazione dei metodi proposti. Verranno inoltre presentati elementi della cosiddetta statistica robusta ed altri concetti di statistica non parametrica.

CROMATOGRAFIA IONICA

E' stato da poco realizzato un esercizio di intercalibrazione riguardante la determinazione di cloruri, nitrati e solfati mediante cromatografia ionica in acque superficiali e di scarico a cui hanno partecipato i componenti dell'unità operativa per un totale di 8 laboratori coinvolti. E' stato utilizzato un protocollo analitico derivante dalla sintesi delle procedure normalmente impiegate dai singoli laboratori; il metodo sarà pronto nella sua versione definitiva per la fine del 1998. L'unità ha dedicato la sua attenzione a Cl^- , NO_3^- e SO_4^{2-} , che vanno ad aggiungersi al solfito, per il quale è già previsto nel manuale IRSA un metodo in cromatografia ionica; tali metodi cromatografici si affiancheranno a quelli più tradizionali già disponibili. Successivamente verranno presi in considerazione altri anioni (fluoruri, bromuri, fosfati) mentre per i cationi metallici (metalli alcalini e alcalino-terrosi) e per lo ione ammonio si prevede l'avvio della relativa sperimentazione solo dopo aver esaurito gli anioni di interesse poichè le metodologie disponibili (assorbimento in fiamma e colorimetria) risultano tuttora soddisfacenti.

MICROINQUINANTI ORGANICI

L'unità operativa ha provveduto all'individuazione, sulla base di una serie di criteri (esigenze normative, assenza di metodologie IRSA per alcuni parametri, diffusione nell'ambiente, tossicità), di un primo gruppo di inquinanti di interesse prioritario:

1. Fenoli
2. Solventi organici aromatici
3. Solventi clorurati
4. Idrocarburi policiclici aromatici
5. Policlorobifenili
6. Pesticidi

Si è deciso di strutturare l'unità in un numero di sottogruppi, idoneo a coprire le tipologie di inquinanti considerati, definendo per ciascun sottogruppo un coordinatore e lasciando la possibilità di ricorrere alla cooptazione di nuovi membri, soprattutto nella fase di verifica dei protocolli analitici scelti.

Per quanto concerne fenoli, solventi organici aromatici e solventi clorurati sono pronte le bozze di metodo che verranno validate attraverso esercizi di intercalibrazione da effettuarsi nei prossimi mesi. Per

i pesticidi, dato il gran numero di principi attivi commercializzati è stato proposto un criterio di classificazione basato sulla tecnica analitica impiegata per la loro determinazione (gas cromatografia in via diretta, gas cromatografia dopo derivatizzazione e HPLC). Considerato il grado di copertura assicurato dai metodi IRSA (pesticidi clorurati, fosforati, erbicidi triazinici) l'interesse si concentrerà su feniluree e sulfoniluree. Delle prime è in fase di valutazione la relativa bozza di metodo. I metodi saranno pronti nella versione definitiva agli inizi del 1999.

METALLI

I componenti dell'unità operativa "Metalli" hanno completato la stesura della bozza di metodo per l'analisi dell'argento in assorbimento atomico con fornetto di grafite (iniezione diretta), mentre si stanno esaminando i risultati di un esercizio di intercalibrazione riguardante la determinazione dello stesso metallo dopo preconcentrazione mediante formazione del complesso con pirrolidinditiocarbammato e successiva estrazione con cloroformio. Si stanno ultimando i test di validazione su un metodo per l'analisi di ultratracce di mercurio mediante formazione di idruri e amalgama su oro.

I componenti dell'unità operativa hanno evidenziato la necessità di provvedere in tempi rapidi alla messa a punto di metodi in assorbimento atomico al fornetto di grafite per iniezione diretta, per tutti quei metalli per i quali le metodiche IRSA prevedono l'utilizzo solo della fiamma. Sono state rapidamente predisposte, a cura dell'IRSA di Roma, le bozze di metodo per l'analisi di cinque metalli (Cd, Cr, Cu, Ni e Pb). Le procedure proposte sono state oggetto di esercizi di intercalibrazione da parte dei seguenti laboratori.

ENEL/PC; UNI/Roma; IRSA/Roma; IRSA/BA; ENEA Casaccia/Roma; CSM/Roma; ARPA/FI; ARPA/RE; ENICHEM/RA; ACOSEA/FE; Laboratorio Consorzio Valle del Biferno/CB. L'elaborazione statistica dei risultati ottenuti e le indicazioni fornite dai laboratori partecipanti contribuiranno alla stesura delle versioni definitive dei metodi, corredandole di valutazioni su precisione, accuratezza, sensibilità.

METODI BIOLOGICI

L'unità operativa ha già provveduto alla definizione dei protocolli per l'analisi dei seguenti indici biologici:

- Metodo per la determinazione dell'indice biotico esteso (EBI)
- Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti
- Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*
- Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia*
- Saggio di tossicità acuta con *Artemia* sp.
- Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Cyprinodon variegatus*
- Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Oncorhynchus mykiss*
- Metodo per la valutazione della tossicità cronica con *Ceriodaphnia dubia*
- Metodo per la valutazione della tossicità cronica con *Mysidopsis bahia*
- Metodo per la valutazione della tossicità cronica con *Cyprinodon variegatus*
- Saggio di tossicità prolungata con trota iridea

Questi metodi sono stati pubblicati sul Notiziario dei Metodi Analitici per le Acque del luglio '95, giugno '96, settembre '96 e maggio '98.

QUESTIONARIO

Si invitano gli operatori a compilare il presente questionario apponendo una crocetta in corrispondenza della metodologia più comunemente seguita per la determinazione dei vari inquinanti, tenendo presente non soltanto le attività inerenti il controllo degli effluenti, per le quali i metodi IRSA costituiscono un vincolo normativo, ma anche tutte le altre attività di controllo (piani di monitoraggio regionali, controllo di qualità delle acque di balneazione etc.) attinenti le proprie responsabilità istituzionali.

Nella casella indicata dalla voce altro inserire eventuali tecniche non elencate nel questionario accompagnandole da una breve descrizione del protocollo operativo seguito. Si ringrazia vivamente per la collaborazione.

METALLI E SPECIE METALLICHE

Metodo \ Metallo	Al	As	Ba	Be	B	Cd	Ca	Cr	Fe	Li	Mg	Mn	Hg	Ni	Pb	K	Cu	Se	Na	Sn	Tl	Te	Zn	
Colorimetria																								
AAS																								
GFAAS																								
Idruri																								
ICP-AES																								
IC																								
Metodi Elettrochimici																								
Altro																								

IC = cromatografia ionica

AAS = assorbimento atomico in fiamma

GFAAS = assorbimento atomico al fornello di grafite

ICP-AES = spettrometria di emissione chimica con sorgente a plasma

COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI

Metodo \ Metallo	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	CO ₂	CN ⁻	Cl ₂	Cl ⁻	F ⁻	P-PO ₄	O ₂	SiO ₂	SO ₄ ²⁻	SO ₃ ²⁻	H ₂ S
Colorimetria														
IC														
Titrimetria														
Potenziometria														
Gravimetria														
Turbidimetria														
Altro														

IC = cromatografia ionica

COSTITUENTI ORGANICI

Metodo \ Costituente	R-CHO	R-NH ₂	N-org	C-org	Erb.azot.	PhOH	Pest. clor.	Pest. fosf.	PCB PCT	BOD	COD	Solv. arom.	Solv. clor.	Sost. oleose	Tens. anion.	Tens. non ionici
Colorimetria																
Potenziometria																
Gravimetria																

segue tabella

segue tabella

Metodo	As	Al	Ca	Co	Cu	Hg	K	Mn	Ni	Pb	Se	Sn	V	Zn
Titrimetria														
GC														
HPLC														
GC-MS														
HPLC-MS														
Altro														

GC = gas-cromatografia
 HPLC = cromatografia liquida ad alta prestazione
 MS = spettrometria di massa
 PhOH = fenoli
 R-CHO = aldeidi alifatiche
 R-NH₂ = ammine alifatiche

Metodo	As	Al	Ca	Co	Cu	Hg	K	Mn	Ni	Pb	Se	Sn	V	Zn

istituto di ricerca sulle acque - cnr
NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Supplemento a Quaderni, 100 (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)

Publicazione 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: C. M. Blundo

Stampato in proprio

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda

Allestimento e stampa: C. Pastore