

EDITORIALE

L'emanazione del decreto legislativo n.626/94 riguardante il miglioramento della sicurezza e delle condizioni dei lavoratori sul luogo di lavoro ha reso prioritaria ed indifferibile l'esigenza di predisporre metodi analitici caratterizzati da un basso impatto ambientale, tali da consentire da un lato di salvaguardare la sicurezza degli addetti, dall'altro di minimizzare la produzione di rifiuti derivanti dalle attività analitiche.

L'IRSA si è già da alcuni anni orientato in questa direzione lavorando alla standardizzazione di metodologie di tipo strumentale, caratterizzate appunto da una minima manipolazione del campione e da un limitato utilizzo di reattivi pericolosi. La pubblicazione di tre protocolli analitici basati sull'impiego di tecniche strumentali (cromatografia ionica per la determinazione di anioni e cationi, analisi elementare per la determinazione del carbonio organico disciolto) per l'analisi di acque naturali e di scarico testimonia lo sforzo in tal senso.

Più recentemente, numerose segnalazioni pervenute da parte di laboratori di controllo e di enti di ricerca interessati ad attività di monitoraggio hanno richiamato l'attenzione sull'opportunità di avviare una verifica sull'affidabilità dei kit analitici. Questi, se da un lato soddisfano l'esigenza degli operatori addetti al controllo di poter disporre di metodi veloci da utilizzare anche direttamente sul luogo del prelievo, dall'altro, per i piccoli volumi richiesti, potrebbero fornire un valido contributo alla messa a punto di strumenti di controllo di minore impatto rispetto alle procedure analitiche tradizionali. Poiché rimane in alcuni settori una certa perplessità, se non addirittura un rifiuto pregiudiziale, verso l'impiego di questi dispositivi di analisi, si ritiene opportuno operare una raccolta delle informazioni disponibili (livello di utilizzo dei kit, analiti e tipo di matrici più comunemente analizzati, tipi di kit commerciali impiegati) propedeutica alla definizione di un programma sperimentale volto a valutare secondo criteri scientifici le prestazioni offerte dai kit rispetto alle metodiche messe a punto dall'IRSA.

A questo scopo è stata predisposta una lettera circolare inviata ai Direttori Tecnici delle Agenzie Regionali di Protezione Ambientale, il cui testo integrale è riportato all'interno del Notiziario al fine di consentire una più ampia diffusione tra gli operatori del settore.

Prof. Roberto Passino
Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, febbraio 2000

DETERMINAZIONE DI ANIONI (CLORURO, NITRATO, SOLFATO, BROMURO, FLUORURO, FOSFATO E NITRITO) MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA^(*)

a cura di M. Camusso e S. Polesello, IRSA-CNR, Brugherio

RIASSUNTO

Viene descritto un metodo per la determinazione di specie anioniche (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Br^- , F^- , PO_4^{3-} , NO_2^-) in campioni di acque superficiali, sotterranee e di scarico mediante cromatografia ionica. Nell'articolo vengono riportate la procedura del metodo e la relativa validazione.

SUMMARY

A method is described for the determination of the dissolved anions Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Br^- , F^- , PO_4^{3-} , NO_2^-

INDICE

DETERMINAZIONE DI ANIONI (CLORURO, NITRATO, SOLFATO, BROMURO, FLUORURO, FOSFATO E NITRITO) MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA	1
DETERMINAZIONE DI CATIONI (SODIO, AMMONIO, POTASSIO, MAGNESIO E CALCIO) MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA	8
DETERMINAZIONE DEL CARBONIO ORGANICO DISCIOLTO IN ACQUE NATURALI E DI SCARICO	14
METODI PER IL RILEVAMENTO DI CISTI E OOCISTI DI PROTOZOI PATOGENI NELLE ACQUE	20
NOTA	26
INFORMAZIONI	27

(*) Il metodo è stato discusso e approvato dal gruppo di lavoro "Anioni in cromatografia ionica" composto da: Achilli M. (ENEL-Segrate), Camiel A. e Cirillo R. (PMP-Pordenone), Camusso M. (IRSA-Brugherio), Cristofori M.C. (Ambiente ENI-Ferrara), Davi M.L. (ARPA-Ferrara), Dell'Andrea E. e Martini G. (ARPAV-Venezia), Forese A. (ARPAV-Padova), Marani D. e Braguglia C. (IRSA-Roma), Petruzzelli D. e Ciannarella R. (IRSA-Bari), Polesello S. (IRSA-Brugherio), Spezia S. e Bettinelli M. (ENEL-Piacenza), Tartari G. A. (III-CNR, Verbania-Pallanza), Torcini S. (ENEA-Roma).

in fresh waters (surface, ground, mineral, meteoric), effluents and wastewaters by ion chromatography. The validation procedure for the method is also reported.

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è basato sulla determinazione simultanea di specie anioniche mediante cromatografia ionica. Questa tecnica si basa sulla separazione degli analiti mediante colonna di scambio anionico in base alla loro affinità per la fase stazionaria. L'eluente, contenente gli analiti separati, passa poi attraverso un dispositivo di derivatizzazione chimica post-colonna detto soppressore che scambiando protoni con la fase mobile ha lo scopo di abbassare la conducibilità di fondo dell'eluente, per formazione dell'acido debole coniugato, e di esaltare il segnale dell'analita, che viene rivelato mediante un conduttimetro in linea.

Il riconoscimento degli analiti viene effettuato confrontando il tempo di ritenzione dei picchi del campione con il tempo di ritenzione di standard. La concentrazione viene determinata confrontando l'area del picco con la curva di calibrazione dell'analita costruita mediante una serie di standard a diverse concentrazioni.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile alle acque dolci naturali (superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche), alle acque trattate e agli scarichi domestici ed industriali. Il campo di applicazione, utilizzando un volume di iniezione da 25 μL , è compreso tra 0,1 e 100 mg/L per cloruro, nitrato e solfato; tra 0,1 e 10 mg/L per bromuro e nitrito; tra 0,2-20 mg/L per fluoruro e fosfato.

Campioni, che presentano concentrazioni più elevate, possono essere analizzati dopo un'opportuna diluizione. Campioni aventi concentrazione inferiore al limite di applicabilità possono essere analizzati aumentando il volume di iniezione fino a 200 μL .

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Sostanze con tempi di ritenzione simili a quelli degli analiti di interesse possono interferire con la determinazione, specie se presenti in elevate quantità. Questo tipo di interferenza, facilmente individuabile nei cromatogrammi per la presenza di picchi parzialmente sovrapposti, è dipendente dalla fase stazionaria e dalla forza dell'eluente. Ogni qual volta si verifichi un evento del genere, è necessario modificare la forza dell'eluente oppure cambiare il tipo di colonna, secondo le indicazioni delle case produttrici. In questo paragrafo vengono descritte le più comuni interferenze riscontrabili nelle analisi effettuate con i modelli più diffusi di colonne a scambio anionico.

L'acqua contenuta nel campione iniettato dà luogo ad un picco negativo all'inizio del cromatogramma, in quanto la sua conducibilità è inferiore a quella dell'eluente. Questo picco negativo interferisce con la determinazione degli anioni meno ritenuti, come il fluoruro, e rende meno accurata la determinazione del cloruro, quando presente in concentrazioni inferiori a 0,5 mg/L. Questa interferenza può essere eliminata aggiungendo al campione una piccola aliquota di eluente concentrato (100 μL di eluente concentrato 100 volte per 10 mL di campione). In tal caso, un'analoga procedura deve essere utilizzata anche nella preparazione delle soluzioni standard.

Acidi organici poco ritenuti (ad esempio acido acetico e formico) ed elevate quantità di cationi interferiscono con il fluoruro; gli acidi organici, se presenti in concentrazione superiore a 100 mg/L, possono interferire con il cloruro. In questo caso, per determinare il fluoruro è necessario utilizzare una fase stazionaria con maggiore capacità di ritenzione, oppure utilizzare un eluente con una minore forza ionica. Nel caso si utilizzi un eluente a minore forza ionica non è possibile determinare simultaneamente gli anioni più ritenuti (bromuro, nitrato, fosfato e solfato).

In generale i picchi cromatografici delle coppie cloruro/nitrito e bromuro/nitrato possono presentare una non completa risoluzione in funzione delle concentrazioni relative. In questo caso è necessario ottimizzare la separazione per ottenere un fattore di risoluzione, $R > 1$.

I clorati, presenti in genere solo in acque trattate in processi ossidativi, interferiscono parzialmente, in alcune colonne, con il nitrato. A seconda della fase stazionaria utilizzata, la presenza di acidi organici poliprotici, in particolare l'acido tartarico, può interferire con la determinazione del solfato. L'interferenza si manifesta o come incompleta risoluzione del picco cromatografico del solfato, oppure come peggioramento nella ripetibilità dell'area integrata del picco stesso.

In caso di presenza di sostanze organiche con elevata affinità per resine scambiatrici ioniche a base aromatica, come polifenoli, tensioattivi, acidi umici, può essere necessario purificare il campione mediante filtrazione su cartucce, a base di polivinilpirrolidone polimerizzato, resine macroporose di divinilbenzene o equivalenti, in grado di trattenere selettivamente questo tipo di sostanze. La presenza di queste sostanze si evidenzia sul cromatogramma come disturbi o picchi molto allargati sulla linea di base, a carattere non periodico.

L'analisi frequente di campioni contenenti metalli disciolti può portare col tempo alla perdita delle caratteristiche di efficienza e risoluzione della colonna: è consigliabile purificare questo tipo di campioni mediante filtrazione su cartucce in grado di sequestrare metalli, disponibili commercialmente.

Per campioni contenenti particolato sospeso, si consiglia la filtrazione a 0,45 μm prima dell'iniezione.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il prelievo del campione dovrà essere effettuato in accordo con quanto previsto nel capitolo "Metodi di Campionamento". A causa dei piccoli volumi analizzati, si deve prestare particolare cura nella manipolazione dei campioni al fine di non introdurre contaminazione negli stessi.

Cloruro, bromuro e fluoruro sono stabili in soluzione. La concentrazione di nitrato, nitrito e fosfato può essere affetta dall'attività biologica del campione, che può essere limitata filtrando a 0,2 µm. La concentrazione di fosfato può essere modificata da reazioni di idrolisi delle forme polimeriche eventualmente presenti nel campione. L'ossidazione di nitrito e solfito, eventualmente presenti, può dar luogo a misure in eccesso rispettivamente di nitrato e solfato. Di conseguenza i campioni devono essere analizzati nel minor tempo possibile dopo il prelievo (al più tardi entro 24 h per il nitrito, ed entro 48 h per gli altri anioni), mantenendo gli stessi fino al momento dell'analisi a 4°C e al riparo dalla luce.

5 - APPARECCHIATURA

5.1 - Vetreria di laboratorio di classe A

5.2 - Cromatografo ionico

Costituito da: pompa isocratica capace di fornire un flusso da 0,5 a 2,5 mL/min; soppressore chimico od elettrochimico; rivelatore a conducibilità con compensazione della temperatura. Loop di iniezione con volume da 20 a 200 µL.

5.3 - Colonna di separazione a scambio anionico

Colonna impaccata con resine pellicolari a bassa capacità, funzionalizzate con gruppi ammoniaci quaternari, supportate su polimero a base aromatica, con relativa precolonna di fase analoga, in grado di dare una separazione efficiente dei picchi degli analiti. La colonna scelta deve essere in grado di fornire un'adeguata efficienza e risoluzione nella separazione dei picchi degli analiti: i valori accettabili dei parametri cromatografici (ad una concentrazione di 1 mg/L per ciascun analita) sono i seguenti:

- ✓ fattore di capacità: $0,5 < k < 12$
- ✓ efficienza: $N > 3000$ piatti teorici
- ✓ fattore di risoluzione: $R > 1$
- ✓ fattore di asimmetria: $0 < A_s < 4$

Il calcolo di tutti i parametri cromatografici della colonna deve essere effettuato almeno due volte l'anno; per matrici più complesse la verifica deve essere più frequente. Nel caso in cui la colonna non presenti più i requisiti cromatografici sufficienti, si deve procedere al lavaggio e rigenerazione della

colonna secondo le istruzioni della casa costruttrice, o alla sostituzione della medesima.

5.4 - Sistema di acquisizione dati

Mediante personal computer o integratore

6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. Le soluzioni devono essere preparate con acqua ad elevata purezza, caratterizzata da conducibilità specifica $< 0,1 \mu\text{S/cm}$ e filtrata su membrana da 0,2 µm.

6.1 - Carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3)

6.2 - Idrogenocarbonato di sodio (NaHCO_3)

6.3 - Acido solforico concentrato

(Se necessario) (H_2SO_4 ; $d = 1,84 \text{ g/L}$).

6.4 - Bromuro di sodio (NaBr)

6.5 - Cloruro di sodio (NaCl)

6.6 - Fluoruro di sodio (NaF)

6.7 - Fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4)

6.8 - Nitrato di sodio (NaNO_3)

6.9 - Nitrito di sodio (NaNO_2)

6.10 - Solfato di potassio (K_2SO_4)

6.11 - Soluzione eluente

($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$): la molarità deve essere scelta secondo le indicazioni della casa produttrice della colonna.

Ad esempio, per una soluzione 1,8 mM Na_2CO_3 / 1,7 mM NaHCO_3 : preparare una soluzione concentrata, sciogliendo 19,078 g di Na_2CO_3 e 14,282 g di NaHCO_3 in 1 L di acqua. Diluire 100 volte questa soluzione (10 mL in 1 L) in un matraccio tarato. La soluzione concentrata è stabile per sei mesi in bottiglia di polietilene, polipropilene o vetro. L'eluente deve essere preparato fresco ogni qual volta si inizi una sessione di analisi.

6.12 - Rigenerante

(Per i soppressori chimici) soluzione di H_2SO_4 : la molarità deve essere scelta secondo le indicazioni della casa produttrice della colonna.

Ad esempio, per una soluzione 12,5 mM: portare a 4 L con acqua in matraccio tarato 2,8 mL di H_2SO_4 concentrato.

6.13 - Preparazione delle soluzioni standard concentrate

Preparare una serie di soluzioni concentrate di 1000 mg/L di analita, pesando i rispettivi sali conservati in essiccatore e precedentemente essiccati in stufa per almeno 30 min a 105°C. Queste soluzioni, conservate a 4°C al buio in bottiglie di polietilene o polipropilene, sono stabili 6 mesi, eccetto la soluzione standard del nitrito che è stabile un mese.

6.13.1 --Soluzione standard concentrata di bromuro (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,288 g di bromuro di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.2 --Soluzione standard concentrata di cloruro (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,648 g di cloruro di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.3 - Soluzione standard concentrata di fluoruro (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 2,210 g di fluoruro di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.4 - Soluzione standard concentrata di fosfato (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 4,394 g di fosfato di potassio monobasico in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.5 - Soluzione standard concentrata di nitrato (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,371 g di nitrato di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.6 - Soluzione standard concentrata di nitrito (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,500 g di nitrito di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.7 - Soluzione standard concentrata di solfato (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,814 g di solfato di potassio anidro in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

In sostituzione delle precedenti, si possono usare soluzioni commerciali di opportuna concentrazione, purché in corso di validità e accompagnate da un certificato di analisi che consenta la riferibilità della misura a standard primari.

6.14 - Modalità di calibrazione

La scelta delle modalità di calibrazione dipende dall'intervallo di concentrazioni che si vuole analizzare con una singola calibrazione. Per intervalli di concentrazioni fino ad un ordine di grandezza è possibile utilizzare curve di calibrazione lineari con tre punti, mentre per intervalli di concentrazioni fino a due ordini di grandezza bisogna utilizzare curve di calibrazione quadratiche o, in alternativa, regressioni lineari pesate, calcolate con almeno cinque livelli di concentrazione.

Per le calibrazioni lineari non superiori ad un ordine di grandezza è necessario preparare tre standard a concentrazioni corrispondenti ai due estremi ed al centro dell'intervallo di misura. Ad esempio è possibile dividere l'intervallo di misura definito dall'intero campo di applicabilità del metodo (0,1-100 mg/L) in tre intervalli (0,1-1; 1-10; 10-100 mg/L); per ciascuno dei tre intervalli si devono preparare ed iniettare tre standard (per l'intervallo 1-10 gli standard devono essere 1; 5; 10 mg/L). A seconda della tipologia dei campioni può essere necessario coprire l'intervallo di misura con due o più rette di calibrazione.

Se si evidenzia un discostamento dalla linearità ($R^2 < 0,999$, oppure variazione dei valori dei fattori di risposta⁽¹⁾, RF, più elevata del $\pm 5\%$ attorno al valore medio di RF), è consigliabile interpolare i punti degli standard con una curva di calibrazione quadratica.

Per le determinazioni su due ordini di grandezza con una sola calibrazione, è indispensabile ricorrere ad una regressione quadratica o, in alternativa, ad una regressione lineare pesata, calcolate con almeno cinque punti. Gli standard di calibrazione vanno scelti in corrispondenza del valore minimo, massimo, del 5, 10 e 50% dell'intervallo di misura (ad esempio per l'intervallo 0,1-10 mg/L gli standard consigliati sono 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/L).

La preparazione degli standard di calibrazione multielemento deve essere eseguita aggiungendo accuratamente, in funzione della concentrazione degli analiti desiderati, volumi misurati di soluzioni concentrate in matracci tarati, portando a volume con acqua.

Le soluzioni di calibrazione a concentrazione bassa (0,1-1 mg/L) devono essere preparate giornalmente mentre quelle a concentrazione più elevata (1-100 mg/L) possono essere utilizzate per una settimana,

⁽¹⁾ Il fattore di risposta RF può essere facilmente calcolato per ogni concentrazione di standard come:
$$RF = \frac{\text{Area del picco}}{\text{concentrazione dello standard}}$$

In caso di perfetta linearità della curva di calibrazione e di intercetta nulla i valori di RF sono uguali per ogni valore di concentrazione.

eccetto quelle che contengono nitrito che devono essere preparate giornalmente.

7 - PROCEDIMENTO

Portare tutti gli standard, i campioni, l'eluente e l'eventuale rigenerante a temperatura ambiente prima di iniziare ogni analisi. Poiché la temperatura influenza i parametri cromatografici, è preferibile mantenere la temperatura del laboratorio controllata durante lo svolgimento della calibrazione e delle successive analisi.

Accendere il cromatografo, impostare le condizioni strumentali di lavoro, lasciare stabilizzare il sistema per almeno 30 minuti e controllare che la conducibilità sia stabile.

7.1 - Condizioni cromatografiche

Le condizioni strumentali da controllare sono: il volume d'iniezione; la composizione dell'eluente; il flusso dell'eluente; la conducibilità di fondo; la pressione del sistema. E' inoltre importante verificare che sia impostato sul rivelatore il fattore di compensazione della temperatura.

Nel caso di un soppressore chimico a membrana si deve definire e controllare anche il flusso del rigenerante (tipicamente H_2SO_4 12,5 mM a 4-5 mL/min)

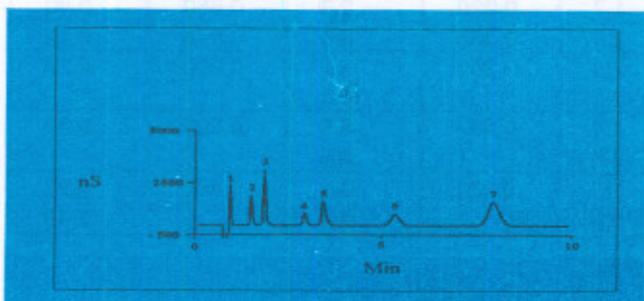


Fig.1 -Cromatogramma di uno standard multiplo: 1. F^- (0,5 mg/L), 2. Cl^- (0,5 mg/L), 3. NO_2^- (1,0 mg/L), 4. Br^- (1,0 mg/L), 5. NO_3^- (2,0 mg/L), 6. PO_4^{3-} (3,0 mg/L), 7. SO_4^{2-} (3,5 mg/L)
Volume di iniezione : 50 μ L eluente : 1,8 mM Na_2CO_3 /1,7 mM $NaHCO_3$, flusso dell'eluente: 2 mL/min, fattore di compensazione della temperatura 1,7%/°C, colonna: Dionex IonPac AS4A; precolonna Dionex IonPac AG4A.

7.2 - Verifica della funzionalità strumentale

Raggiunte le condizioni d'analisi, deve essere verificata la perfetta funzionalità strumentale mediante l'iniezione di uno standard, a scelta all'interno dell'intervallo di lavoro. Bisogna verificare la risoluzione tra i picchi e la riproducibilità dei tempi di ritenzione (massimo discostamento ammissibile

rispetto all'ultimo controllo dell'efficienza: $\pm 5\%$) dei singoli analiti. E' necessario, inoltre, verificare mediante l'iniezione di un campione d'acqua ad elevata purezza (considerato come bianco) la presenza di eventuali interferenti dovuti al sistema.

7.3 - Calibrazione

7.3.1 - A partire dalle soluzioni concentrate da 1000 mg/L, preparare le soluzioni multicomponenti di calibrazione (vedi par. 6.14).

7.3.2 - Iniettare una aliquota della prima soluzione standard ed acquisire il cromatogramma. Il volume di iniezione deve essere uguale per standard e campioni. Quando si usa un sistema di iniezione con "loop", esso deve essere condizionato con almeno 3 volumi di campione prima dell'iniezione. L'iniezione può essere effettuata con una siringa o un autocampionatore. Nel caso si usi una siringa di plastica, questa deve essere risciacquata con acqua deionizzata ed avvinata due volte con la soluzione d'analisi prima dell'iniezione. La stessa procedura deve essere adottata per le fiale dell'autocampionatore.

Ripetere l'operazione per le altre soluzioni in modo da costruire una curva di calibrazione. Verificare la curva di calibrazione, almeno ogni 25 campioni e alla fine della sessione di analisi, mediante l'iniezione di uno standard di controllo di concentrazione compresa nell'intervallo di lavoro

Se il valore dell'area dello standard di controllo iniettato si discosta per $\pm 5\%$ dal valore dell'area dello stesso standard utilizzato per la curva di calibrazione, è necessario ripetere la calibrazione.

7.4 - Determinazione

Iniettare una aliquota del campione ed acquisire il cromatogramma. Per l'iniezione dei campioni bisogna attenersi alle stesse condizioni descritte per gli standard al paragrafo 7.3.2.

Il riconoscimento qualitativo degli anioni viene effettuato per confronto con i tempi di ritenzione delle soluzioni standard di calibrazione. Nei casi dubbi è necessario assicurarsi della corretta attribuzione effettuando un'aggiunta nota dell'analita al campione e verificando che vi sia un aumento dell'altezza del picco cromatografico relativo.

Completata l'identificazione qualitativa dei picchi, si procede all'analisi quantitativa ricavando le concentrazioni dalla curva di calibrazione.

Nel caso la concentrazione del campione oltrepassasse il limite superiore della calibrazione, utilizzare delle soluzioni di calibrazione a maggiore concentrazione nei limiti imposti dal campo di applicazione del metodo (vedi par. 2). Per concentrazioni superiori si deve diluire il campione.

Campioni aventi concentrazione inferiore al limite di applicabilità possono essere analizzati aumentando il volume di iniezione fino a 200 μ L. La preparazione

degli standard e la calibrazione in questo intervallo di concentrazioni è però molto delicata; si consiglia, perciò, di preparare gli standard con la soluzione eluente e di calibrare con cinque standard nell'intervallo 0,05-0,5 mg/L

8 - CALCOLI

La concentrazione degli anioni nel campione si ricava dalla curva di calibrazione costruita per ciascun analita.

9 - PRECISIONE E ACCURATEZZA

Il metodo è stato validato per gli anioni più frequentemente analizzati (cloruro, nitrato e solfato) mediante un esercizio di intercalibrazione condotto da 11 laboratori italiani qualificati appartenenti ad enti pubblici e privati. Questo esercizio è stato effettuato analizzando due campioni multicomponenti sintetici,

Tab. 1 - Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: ripetibilità e riproducibilità. Media (X), deviazione standard della ripetibilità (s_r), deviazione standard della riproducibilità (s_R), limite di ripetibilità (r); limite di riproducibilità (R) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725.

	n lab	n campioni	X	s_r	CV	s_R	CV	r^a	R^b
cloruro	7	2	0,26	0,030	11,5	0,047	18,1	0,080	0,13
			0,43		7,0		19,9		
	7	1	1,05	0,038	3,6	0,040	3,8	0,110	0,11
nitrato	6	1	13,8	0,230	1,7	0,320	2,3	0,650	0,90
			7,09		2,5		0,036		
	7	2	7,09	0,180	2,5	0,260	3,7	0,500	0,73
solfato	7	2	1,63	0,072	4,4	0,097	5,9	0,200	0,27
			2,76		2,6		3,5		
	6	2	10,80	0,170	1,6	0,330	3,1	0,490	0,92
			13,80		1,2		2,4		2,40

^a $r = 2,8 s_r$; ^b $R = 2,8 s_R$

Tab. 2 - Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: accuratezza. Media (X), intervallo di confidenza (CI), valore certificato (μ) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725.

	n lab	X	CI^a	μ
cloruro	7	0,26	0,26±0,08	(0,24)*
	7	1,05	1,05±0,11	(1,0)*
nitrato	7	7,09	7,09±0,50	7,06±0,15
solfato	7	2,76	2,76±0,20	2,75±0,05
	6	10,80	10,8±0,49	10,9±0,20

^a $CI = X \pm r$; * valori indicativi non certificati

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1992): "Standard test method for anions in water by chemically suppressed ion chromatography", D4327, *Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.01 Water, Philadelphia.

preparati per lo scopo, e due campioni certificati (acqua di pioggia artificiale SRM 2694-I e 2694-II) forniti dal National Institute of Standards (NIST)

Dall'analisi ANOVA dei dati ottenuti dai laboratori, dopo eliminazione degli outlier secondo procedure standardizzate (Youden and Steiner, 1975; ISO 1994; IUPAC, 1995), si è ricavato la ripetibilità e la riproducibilità del metodo alle concentrazioni in esame in matrici sintetiche (Tab. 1).

Dati di ripetibilità e riproducibilità relativi agli anioni fluoruro, bromuro, fosfato e nitrito, e ulteriori dati per cloruro, nitrato e solfato, ottenuti per intervalli diversi di concentrazione e matrici diverse, sono riportati nei metodi ufficiali di organizzazioni internazionali (ASTM 1992, ISO, 1992 e 1995).

L'accuratezza del metodo è stata dimostrata confrontando i valori medi di concentrazione per i tre analiti, ottenuti nell'esercizio di intercalibrazione, coi valori certificati dei materiali di riferimento (Tab. 2)

CAMUSSO M., POLESELLO S. (1999): "Determinazione di cloruro, nitrato, solfato mediante cromatografia ionica", *Notiziario dei metodi analitici per le acque IRSA-CNR*, settembre, 1999

ISO (1992): "Water quality. Determination of dissolved fluoride, chloride, nitrite, orthophosphate, bromide, nitrate and sulfate ions, using liquid chromatography of ions. Part 1: Method for water with low contamination", Method 10304-1 ISO, Geneva.

ISO (1994): "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results", Method 5725, ISO, Geneva.

ISO (1995): "Water quality. Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions. Part 2: Determination of bromide, chloride, nitrate, nitrite, orthophosphate and sulfate in waste water", Method 10304-2, ISO, Geneva.

IUPAC (1995): "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 331-343.

YOUNDEN, W. J., STEINER E. H. (1975): "Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists", AOAC, Arlington, VA.

APPENDICE

1 - VALUTAZIONE DEI PARAMETRI CROMATO- GRAFICI DI UNA SEPARAZIONE

1.1 - Valutazione del fattore di capacità k

Definendo un tempo di ritenzione corretto

$$t'_r = t_r - t_m$$

ove t_r è il tempo di ritenzione dell'analita e t_m il tempo necessario alla fase mobile per arrivare al rivelatore, si può calcolare il fattore di capacità:

$$k = t'_r / t_m$$

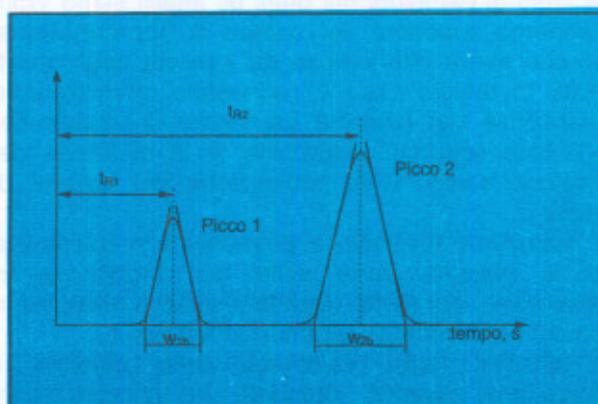


Fig. A.1 - Rappresentazione grafica del calcolo della risoluzione R tra due picchi

1.2 - Valutazione del fattore di risoluzione R

La risoluzione R tra due picchi si calcola, in accordo con la Farmacopea statunitense (USP), secondo la seguente equazione:

$$R_{2,1} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{2b} + w_{1b})}$$

ove

$R_{2,1}$ è la risoluzione tra la coppia di picchi 2,1

t_{R1} è il tempo di ritenzione, in secondi, del primo dei due picchi

t_{R2} è il tempo di ritenzione, in secondi, del secondo picco

w_{1b} è l'ampiezza alla base del primo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi

w_{2b} è l'ampiezza alla base del secondo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi

W_{1b} , W_{2b} sono le ampiezze alla base del triangolo isoscele costruito sul picco Gaussiano, generato tracciando le tangenti ai punti di flesso (Fig. A.1).

1.3 - Valutazione dell'efficienza

L'efficienza della colonna può essere espressa in numero di piatti teorici, N , calcolati secondo la seguente equazione:

$$N = 16 (t_r / w_b)^2$$

1.4 - Valutazione del fattore di asimmetria A_S

La simmetria dei picchi viene espressa, quantitativamente, dall'equazione:

$$A_S = b/a$$

ove b e a sono le distanze della curva dalla verticale nel punto di massimo, misurate al livello del 10% dell'altezza del picco, rispettivamente dopo e prima del punto di massimo (Fig. A.2).

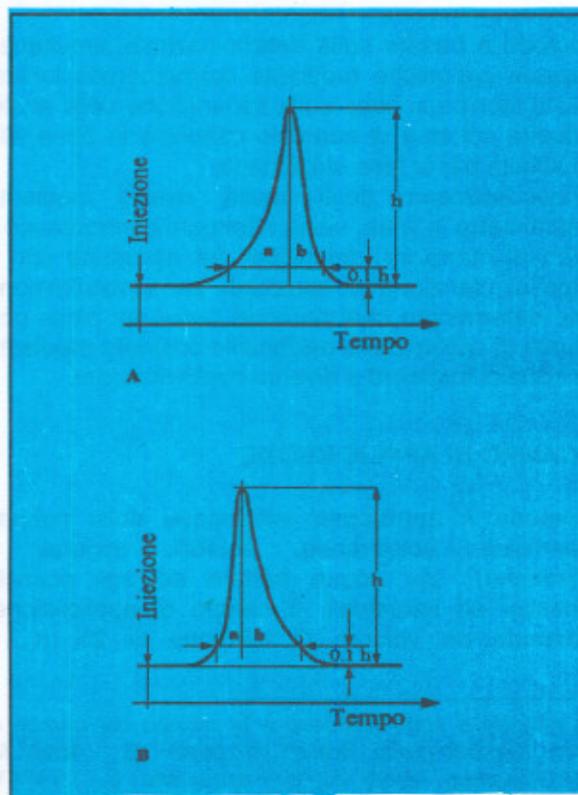


Fig. A.2 - Rappresentazione grafica del calcolo del fattore di asimmetria.

DETERMINAZIONE DI CATIONI (SODIO, AMMONIO, POTASSIO, MAGNESIO E CALCIO) MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA^(*)

A cura di M. Camusso e S. Polesello, *Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR, Brugherio*

RIASSUNTO

Viene descritto un metodo per la determinazione di specie cationiche (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) in campioni di acque superficiali, sotterranee e di scarico mediante cromatografia ionica. Nell'articolo vengono riportate la procedura del metodo e la relativa validazione.

SUMMARY

A method is described for the determination of the dissolved cations Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} in fresh water (surface, ground, mineral, meteoric), effluents and wastewaters by ion chromatography. The validation procedure for the method is also reported.

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è basato sulla determinazione simultanea di specie cationiche mediante cromatografia ionica. Questa tecnica si basa sulla separazione degli analiti mediante colonna di scambio cationico in base alla loro affinità per la fase stazionaria.

Il riconoscimento degli analiti, rivelati mediante conduttimetro in linea, viene effettuato confrontando il tempo di ritenzione dei picchi del campione con il tempo di ritenzione di standard. La concentrazione viene determinata confrontando l'area del picco con la curva di calibrazione dell'analita costruita mediante una serie di standard a diverse concentrazioni.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile alle acque dolci naturali (superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche), alle acque trattate ed agli scarichi domestici ed industriali. Il campo di applicazione, utilizzando un volume di iniezione di 25 μL , è

compreso tra 0,1 e 100 mg/L per calcio, tra 0,1 e 50 mg/L per magnesio, tra 0,1 e 30 mg/L per sodio e potassio, e tra 0,1 e 10 mg/L per ammonio.

Campioni, che presentano concentrazioni più elevate, possono essere analizzati dopo un'opportuna diluizione. Campioni aventi concentrazione inferiore al limite di applicabilità (0,1 mg/L) possono essere analizzati aumentando il loop di iniezione fino a 200 μL .

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Sostanze con tempi di ritenzione simili a quelli degli analiti di interesse possono interferire con la determinazione, specie se presenti in elevate quantità. Questo tipo di interferenza, facilmente individuabile nei cromatogrammi per la presenza di picchi parzialmente sovrapposti, è dipendente dalla fase stazionaria e dalla forza dell'eluente. Ogni qual volta si verifichi un evento del genere, è necessario modificare la forza dell'eluente oppure cambiare il tipo di colonna, secondo le indicazioni delle case produttrici. In questo paragrafo vengono descritte le più comuni interferenze riscontrabili nelle analisi effettuate con i modelli più diffusi di colonne a scambio cationico.

Nel caso di campioni nei quali gli analiti siano vicini all'estremo superiore del campo di applicabilità, si possono avere interferenze tra i picchi degli analiti stessi. In questo caso è necessario ottimizzare la separazione per ottenere un fattore di risoluzione, $R > 1$. Una soluzione alternativa è la diluizione del campione stesso o la diminuzione del volume di iniezione.

La risoluzione tra sodio e ammonio è problematica per la maggior parte delle fasi stazionarie in commercio, soprattutto quando il sodio è presente in quantità notevolmente superiori all'ammonio.

In funzione della selettività della colonna il manganese, quando presente in concentrazioni dell'ordine di mg/L, può interferire col picco di magnesio e calcio. Questa situazione si può verificare ad esempio in acque lacustri anossiche o in acque di scarico.

In caso di presenza di sostanze organiche con elevata affinità per resine scambiatrici ioniche a base aromatica, come polifenoli, tensioattivi, acidi umici, può essere necessario purificare il campione mediante filtrazione su cartucce, a base di polivinilpirrolidone polimerizzato, resine macroporose di divinilbenzene o equivalenti, in grado di trattenere selettivamente questo tipo di sostanze. La presenza di queste sostanze si evidenzia sul cromatogramma come disturbi o picchi molto allargati sulla linea di base, a carattere non periodico.

L'analisi frequente di campioni contenenti metalli disciolti può portare col tempo alla perdita delle caratteristiche di efficienza e risoluzione della colonna: è consigliabile purificare questo tipo di campioni mediante filtrazione su cartucce in grado di sequestrare metalli, disponibili commercialmente.

^(*) Il metodo è stato discusso e approvato dal gruppo di lavoro "Cromatografia ionica" composto da: Achilli M. (ENEL-Segrate), Aimò E. e Pasqualetto C. (ARPAV-Venezia), Bortolussi A. e Cirillo R. (PMP, Pordenone), Camusso M. (IRSA-Brugherio), Cristofori M.C. (Ambiente ENI, Ferrara), Davi M.L. (ARPA-Ferrara), Decet F. (ARPAV-Belluno), Forese A. (ARPAV-Padova), Marani D. e Braguglia C. (IRSA-Roma), Petruzzelli D. e Ciannarella R. (IRSA-Bari), Polesello S. (IRSA-Brugherio), Spezia S. (ENEL-Piacenza), Tartari G. A. (III-CNR, Verbania-Pallanza).

Per campioni contenenti particolato sospeso, si consiglia la filtrazione attraverso 0,45 µm prima dell'iniezione.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il prelievo del campione dovrà essere effettuato in accordo con quanto previsto nel capitolo "Metodi di Campionamento". A causa dei piccoli volumi analizzati, si deve prestare particolare cura nella manipolazione dei campioni al fine di non introdurre contaminazione negli stessi.

Sodio e potassio sono stabili in soluzione. Calcio e magnesio possono precipitare come carbonati. La concentrazione di ammonio può essere affetta dall'attività biologica del campione. Pertanto per conservare il campione è necessario acidificare con acido nitrico intorno a pH 3. I campioni devono essere analizzati nel minor tempo possibile dopo il prelievo (al più tardi entro 48 h per l'ammonio), mantenendo gli stessi fino al momento dell'analisi a 4°C. I recipienti utilizzati per la conservazione dei campioni devono essere necessariamente in materiale plastico, quali ad es. polietilene

5 - APPARECCHIATURA

5.1 - Vetreria di laboratorio di classe A

5.2 - Cromatografo ionico

Costituito da: pompa isocratica capace di fornire un flusso da 0,5 a 2,5 mL/min; rivelatore a conducibilità con compensazione della temperatura. Loop di iniezione da 20 a 200 µL.

5.3 - Colonna di separazione a scambio cationico

Colonna impaccata con resine pellicolari a bassa capacità, funzionalizzate con gruppi solfonici o carbossilici, supportate su polimero a base aromatica, con relativa precolonna di fase analoga, in grado di dare una separazione efficiente dei picchi degli analiti. La colonna scelta deve essere in grado di fornire un'adeguata efficienza e risoluzione nella separazione dei picchi degli analiti: i valori accettabili dei parametri cromatografici (ad una concentrazione di 1 mg/L per ciascun analita) sono i seguenti:

- ✓ fattore di capacità: $0,5 < k < 12$
- ✓ efficienza: $N > 2000$ piatti teorici
- ✓ fattore di risoluzione: $R > 1$
- ✓ fattore di asimmetria: $0 < A_s < 4$

Il calcolo di tutti i parametri cromatografici della colonna deve essere effettuato almeno due volte l'anno; per matrici più complesse la verifica deve essere più frequente. Nel caso in cui la colonna non presenti più i requisiti cromatografici sufficienti, si

deve procedere al lavaggio e rigenerazione della colonna secondo le istruzioni della casa costruttrice, o alla sostituzione della medesima.

5.4 - Sistema di acquisizione dati

Mediante personal computer o integratore.

6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. Le soluzioni devono essere preparate con acqua ad elevata purezza, caratterizzata da conducibilità specifica $< 0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$ e filtrata su membrana da 0,2 µm.

6.1 - Acido metansolfonico ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$), >99%

6.2 - Nitrato di calcio tetraidrato ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

6.3 - Nitrato di magnesio esaidrato ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

6.4 - Nitrato di potassio (KNO_3)

6.5 - Nitrato di sodio (NaNO_3)

6.6 - Solfato di ammonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

6.7 - Acido nitrico concentrato (HNO_3)

6.8 - Soluzione eluente:

deve essere scelta secondo le indicazioni della casa produttrice della colonna. Ad esempio, per una soluzione di acido metansolfonico 20 mM: aggiungere 1,3 mL di acido metansolfonico (6.1) in un matraccio da 1 L e portare a volume con acqua. E' consigliabile degasare l'eluente durante l'analisi. L'eluente deve essere preparato fresco ogni qual volta si inizi una sessione di analisi.

6.9 - Preparazione delle soluzioni standard concentrate

Preparare una serie di soluzioni concentrate di 1000 mg/L di analita, pesando i rispettivi sali conservati in essiccatore. Queste soluzioni, acidificate a pH 3 con acido nitrico e conservate a 4°C al buio in bottiglie di polietilene o polipropilene, sono stabili 6 mesi.

6.9.1 --Soluzione standard concentrata di ammonio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 3,667 g di solfato di ammonio (6.6), precedentemente essiccato in stufa per almeno 30 min a 105°C, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.2 - Soluzione standard concentrata di calcio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 5,892 g di nitrato di calcio tetraidrato (6.2) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.3 - Soluzione standard concentrata di magnesio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 10,549 g di nitrato di magnesio esaidrato (6.3) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.4 - Soluzione standard concentrata di potassio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 2,586 g di nitrato di potassio (6.4), precedentemente essiccato in stufa per almeno 30 min a 105°C, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.5 - Soluzione standard concentrata di sodio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 3,698 g di nitrato di sodio (6.5), precedentemente essiccato in stufa per almeno 30 min a 105°C, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

In sostituzione delle precedenti, si possono usare soluzioni commerciali di opportuna concentrazione, purché in corso di validità e accompagnate da un certificato di analisi che consenta la riferibilità della misura a standard primari.

6.10 - Modalità di calibrazione e preparazione delle soluzioni standard

La scelta delle modalità di calibrazione dipende dall'intervallo di concentrazioni che si vuole analizzare con una singola calibrazione. Nel caso di sodio, potassio, calcio e magnesio, per intervalli di concentrazioni fino a due ordini di grandezza è possibile utilizzare curve di calibrazione lineari con almeno tre punti. A seconda della tipologia dei campioni può essere necessario coprire l'intervallo di misura con due rette di calibrazione.

Se si evidenzia un discostamento dalla linearità ($R^2 < 0,999$, oppure variazione dei valori dei fattori di risposta⁽¹⁾, RF, più elevata del $\pm 5\%$ attorno al valore medio di RF), è consigliabile interpolare i punti degli standard con una curva di calibrazione quadratica. Nel caso dell'ammonio, il discostamento dalla linearità è più evidente e si consiglia quindi l'utilizzo di una regressione quadratica.

⁽¹⁾ Il fattore di risposta RF può essere facilmente calcolato per ogni concentrazione di standard come:

$$\text{RF} = \frac{\text{Area del picco}}{\text{concentrazione dello standard}}$$

In caso di perfetta linearità della curva di calibrazione e di intercetta nulla i valori di RF sono uguali per ogni valore di concentrazione.

Per le calibrazioni lineari è necessario preparare tre standard a concentrazioni corrispondenti ai due estremi ed al centro dell'intervallo di misura. Ad esempio per sodio e potassio è possibile dividere l'intervallo di misura definito dall'intero campo di applicabilità del metodo (0,1-30 mg/L) in due intervalli (0,1-1; 0,5-30 mg/L); per ciascuno dei due intervalli si devono preparare ed iniettare tre standard (per l'intervallo 0,1-1 gli standard devono essere 0,1; 0,5; 1 mg/L). Ad esempio per magnesio è possibile dividere l'intervallo di misura (0,1-50 mg/L) in due intervalli (0,1-1; 0,5-50 mg/L); per ciascuno dei due intervalli si devono preparare ed iniettare tre standard (per l'intervallo 0,5-50 gli standard devono essere 0,5; 25; 50 mg/L). Ad esempio per calcio è possibile dividere l'intervallo di misura (0,1-100 mg/L) in due intervalli (0,1-1; 1-100 mg/L); per ciascuno dei due intervalli si devono preparare ed iniettare tre standard (per l'intervallo 1-100 gli standard devono essere 1; 50; 100 mg/L).

Per l'ammonio sono accettabili curve di calibrazione lineari solo per un ordine di grandezza, dividendo l'intero campo di applicabilità del metodo (0,1-10 mg/L) in due intervalli (0,1-1; 1-10 mg/L); per ciascuno dei due intervalli si devono preparare ed iniettare tre standard (per l'intervallo 0,1-1 gli standard devono essere 0,1; 0,5; 1 mg/L). Per le determinazioni su due ordini di grandezza con una sola calibrazione, è indispensabile ricorrere ad una regressione quadratica, calcolata con almeno cinque punti. Gli standard di calibrazione vanno scelti in corrispondenza del valore minimo, massimo, del 5, 10 e 50% dell'intervallo di misura (ad esempio per l'intervallo 0,1-10 mg/L gli standard consigliati sono 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mg/L).

La preparazione degli standard di calibrazione multielemento deve essere eseguita aggiungendo accuratamente, in funzione della concentrazione degli analiti desiderati, volumi misurati di soluzioni concentrate in matracci tarati, portando a volume con acqua.

Le soluzioni di calibrazione a concentrazione bassa (≤ 1 mg/L) devono essere preparate giornalmente mentre quelle a concentrazione più elevata (> 1 mg/L) possono essere utilizzate per due settimane.

7 - PROCEDIMENTO

Portare tutti gli standard, i campioni, l'eluente e l'eventuale rigenerante a temperatura ambiente prima di iniziare ogni analisi. Poiché la temperatura influenza i parametri cromatografici, è preferibile mantenere la temperatura del laboratorio controllata durante lo svolgimento della calibrazione e delle successive analisi.

Accendere il cromatografo, impostare le condizioni strumentali di lavoro, lasciare stabilizzare il sistema per almeno 30 minuti, e controllare che la conducibilità sia stabile.

7.1 - Condizioni cromatografiche

Le condizioni strumentali da controllare sono: il volume d'iniezione; la composizione dell'eluente; il flusso dell'eluente; la conducibilità di fondo; la pressione del sistema. E' inoltre importante verificare che sia impostato sul rivelatore il fattore di compensazione della temperatura.

Nel caso di un soppressore chimico si deve definire e controllare anche il flusso del rigenerante.

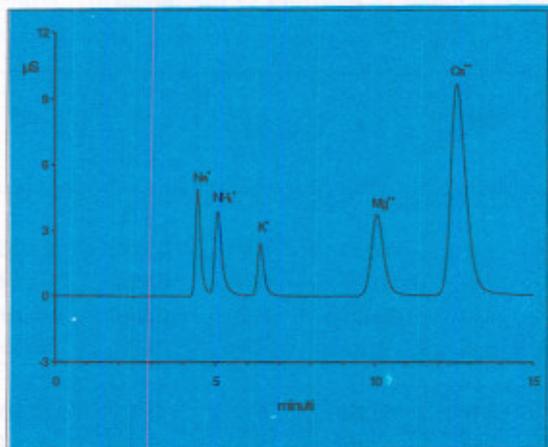


Fig. 1 - Cromatogramma di uno standard multiplo: sodio, ammonio, potassio e magnesio 2 mg/L, calcio 10 mg/L. Volume di iniezione 50 µL; eluente 20 mM acido metansolfonico; flusso 1 mL/min; colonna Dionex IonPac CS12A Analytical Column (4 mm); soppressore Cation Self-Regenerating Suppressor II.

7.2 - Verifica della funzionalità strumentale

Raggiunte le condizioni d'analisi, deve essere verificata la perfetta funzionalità strumentale mediante l'iniezione di uno standard, a scelta all'interno dell'intervallo di lavoro. Bisogna verificare la risoluzione tra i picchi e la riproducibilità dei tempi di ritenzione (massimo discostamento ammissibile rispetto all'ultimo controllo dell'efficienza: $\pm 5\%$) dei singoli analiti. E' necessario, inoltre, verificare mediante l'iniezione di un campione d'acqua ad elevata purezza (considerato come bianco) la presenza di eventuali interferenti dovuti al sistema.

7.3 - Calibrazione

7.3.1 - A partire dalle soluzioni concentrate da 1000 mg/L, preparare le soluzioni multicomponenti di calibrazione (vedi par. 6.10).

7.3.2 - Iniettare una aliquota della prima soluzione standard ed acquisire il cromatogramma. Il volume di iniezione deve essere uguale per standard e campioni. Quando si usa un sistema di iniezione con "loop", esso deve essere condizionato con almeno 3 volumi di campione prima dell'iniezione. L'iniezione

può essere effettuata con una siringa o un autocampionatore. Nel caso si usi una siringa di plastica, questa deve essere risciacquata con acqua deionizzata ed avvinata 2 volte con la soluzione d'analisi prima dell'iniezione. La stessa procedura deve essere adottata per le fiale dell'autocampionatore.

Ripetere 14

l'operazione per le altre soluzioni in modo da costruire una curva di calibrazione. Verificare la curva di calibrazione, almeno ogni 25 campioni e alla fine della sessione di analisi, mediante l'iniezione di uno standard di controllo di concentrazione compresa nell'intervallo di lavoro

Se il valore dell'area dello standard di controllo iniettato si discosta per $\pm 5\%$ dal valore dell'area dello stesso standard utilizzato per la curva di calibrazione, è necessario ripetere la calibrazione.

7.4 - Determinazione

Iniettare una aliquota del campione ed acquisire il cromatogramma. Per l'iniezione dei campioni bisogna attenersi alle stesse condizioni descritte per gli standard al paragrafo 7.3.2.

Il riconoscimento qualitativo dei cationi viene effettuato per confronto con i tempi di ritenzione delle soluzioni standard di calibrazione. Nei casi dubbi è necessario assicurarsi della corretta attribuzione effettuando un'aggiunta nota dell'analita al campione e verificando che vi sia un aumento dell'altezza del picco cromatografico relativo.

Completata l'identificazione qualitativa dei picchi, si procede all'analisi quantitativa ricavando le concentrazioni dalla curva di calibrazione.

Nel caso la concentrazione del campione oltrepassasse il limite superiore della calibrazione, utilizzare delle soluzioni di calibrazione a maggiore concentrazione nei limiti imposti dal campo di applicazione del metodo (vedi par. 2). Per concentrazioni superiori si deve diluire il campione.

Campioni aventi concentrazione inferiore al limite di applicabilità (0,1 mg/L) possono essere analizzati aumentando il loop di iniezione fino a 200 µL. La preparazione degli standard e la calibrazione in questo intervallo di concentrazioni è però molto delicata; si consiglia di calibrare con cinque standard nell'intervallo 0,01-0,1 mg/L

8 - CALCOLI

La concentrazione dei cationi nel campione si ricava dalla curva di calibrazione costruita per ciascun analita.

9 - PRECISIONE E ACCURATEZZA

Il metodo è stato validato per i cationi mediante un esercizio di intercalibrazione condotto da 11 laboratori italiani qualificati appartenenti ad enti pubblici e privati. Questo esercizio è stato effettuato

analizzando tre campioni multicomponenti sintetici di acque di pioggia e acque superficiali, utilizzati in precedenti esercizi di intercalibrazione (RIDEP-92, AQUACON-A97, AQUACON-B97), e un campione certificato (acqua di pioggia artificiale NBS2694-II) fornito dal National Institute of Standards (NIST). Dall'analisi ANOVA dei dati ottenuti dai laboratori, dopo eliminazione degli outlier secondo procedure

standardizzate (Youden and Steiner, 1975; ISO 1994; IUPAC, 1995), si è ricavato la ripetibilità e la riproducibilità del metodo alle concentrazioni in esame in matrici sintetiche (Tab.1).

L'accuratezza del metodo è stata dimostrata confrontando i valori medi di concentrazione per gli analiti, ottenuti nell'esercizio di intercalibrazione, coi valori attesi o certificati dei campioni (Tab. 2).

Tab.1 - Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: ripetibilità e riproducibilità. Media (\bar{X}), deviazione standard della ripetibilità (σ_r), deviazione standard della riproducibilità (σ_R), limite di ripetibilità (r); limite di riproducibilità (R) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725

	n lab	n lab senza outlier	% outlier	\bar{X}	σ_r	CV	σ_R	CV	r^a	R^b
Sodio										
NBS-II	7	6	14,3	0,40	0,015	3,8	0,021	5,3	0,042	0,059
RIDEP92	9	9	0,0	0,17	0,013	7,6	0,020	11,8	0,036	0,056
AQUACON-A97	7	5	28,6	2,19	0,032	1,5	0,069	3,2	0,090	0,19
AQUACON-B97	9	9	0,0	4,1	0,10	2,4	0,20	4,9	0,28	0,56
Ammonio										
NBS-II	6	6	0,0	0,91	0,045	4,9	0,063	6,9	0,13	0,18
RIDEP92	7	6	14,3	0,44	0,022	5,0	0,025	5,7	0,062	0,070
Potassio										
NBS-II	7	6	14,3	0,11	0,025	22,7	0,032	29,1	0,07	0,090
RIDEP92	9	7	22,2	0,24	0,014	5,8	0,023	9,6	0,039	0,064
AQUACON-A97	7	6	14,3	1,97	0,050	2,5	0,11	5,4	0,14	0,30
AQUACON-B97	9	9	0,0	2,3	0,17	7,3	0,18	7,9	0,48	0,52
Magnesio										
NBS-II	6	5	16,7	0,052	0,004	8,3	0,005	10,4	0,012	0,015
RIDEP92	8	7	12,5	0,10	0,007	7,0	0,010	10,0	0,020	0,028
AQUACON-A97	6	5	16,7	2,23	0,066	3,0	0,083	3,7	0,18	0,23
AQUACON-B97	9	9	0,0	5,2	0,16	3,1	0,20	3,8	0,45	0,56
Calcio										
NBS-II	5	5	0,0	0,067	0,022	32,8	0,037	55,2	0,062	0,10
RIDEP92	8	8	0,0	0,19	0,019	10,0	0,055	28,9	0,053	0,15
AQUACON-A97	7	7	0,0	23,6	0,77	3,3	0,83	3,5	2,2	2,3
AQUACON-B97	9	9	0,0	41,8	0,92	2,2	1,3	3,2	2,6	3,7

$$^a r = 2,8 \cdot \sigma_r; \quad ^b R = 2,8 \cdot \sigma_R$$

BIBLIOGRAFIA

ISO (1994): "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results", Method 5725, ISO, Geneva.

ISO (1998): "Water quality. Determination of dissolved Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} using ion chromatography - Method for water and waste water", Proposal for method ISO/DIS 14911, Geneva.

IUPAC (1995): "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 331-343.

MOSELLO, R., BIANCHI M., GEISS H.,

MARCHETTO A., MORSELLI L., MUNTAU H., SERRINI G., SERRINI LANZA G., TARTARI G. A., (1993): "Italian network for the chemistry of atmospheric deposition, n. 10, Intercomparison 1/92", *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.*, **40**, 49 pp.

MOSELLO, R., BIANCHI M., GEISS H., MARCHETTO A., SERRINI G., SERRINI LANZA G., TARTARI G. A., MUNTAU H., (1998): "AQUACON-MedBas Project, Subproject N°5 Freshwater analysis, Intercomparison 1/97", Joint Res, Centre European Commission, *Rep, EUR 18075 EN*, 66 pp.

YOU DEN, W. J., STEINER E. H. (1975): "Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists", AOAC, Arlington, VA.

Tab. 2 - Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: accuratezza. Confronto tra l'intervallo di confidenza ($CI = X \pm r$), col valore certificato o atteso ($\mu \pm \bullet$) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725

	X	r	valore atteso	•
Sodio				
NBS-II	0,40	0,042	0,419	0,0015
RIDEP92	0,17	0,036	0,20	0,01
AQUACON-A97	2,19	0,090	2,2	0,1
AQUACON-B97	4,1	0,28	4,1	0,1
Ammonio				
NBS-II	0,91	0,13	1,0*	-
RIDEP92	0,44	0,062	0,49	0,02
Potassio				
NBS-II	0,11	0,07	0,106	0,008
RIDEP92	0,24	0,039	0,29	0,01
AQUACON-A97	1,97	0,14	2,0	0,1
AQUACON-B97	2,3	0,48	2,4	0,1
Magnesio				
NBS-II	0,052	0,012	0,051	0,003
RIDEP92	0,10	0,020	0,10	0,01
AQUACON-A97	2,2	0,18	2,3	0,1
AQUACON-B97	5,2	0,45	5,1	0,1
Calcio				
NBS-II	0,067	0,062	0,049	0,011
RIDEP92	0,19	0,053	0,20	0,02
AQUACON-A97	23,6	2,2	24,0	0,4
AQUACON-B97	41,8	2,6	41,6	0,7

* valori indicativi non certificati

APPENDICE

1 - VALUTAZIONE DEI PARAMETRI CROMATO- GRAFICI DI UNA SEPARAZIONE

1.1 - Valutazione del fattore di capacità k

Definendo un tempo di ritenzione corretto

$$t'_r = t_r - t_m$$

-necessario alla fase mobile per arrivare al rivelatore, si può calcolare il fattore di capacità:

$$k = t'_r / t_m$$

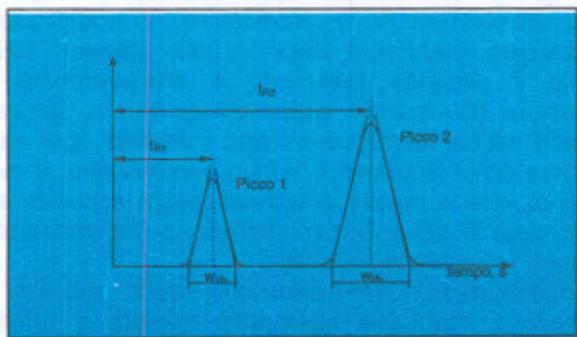


Fig. 1A - Rappresentazione grafica del calcolo della risoluzione R tra due picchi

1.2 - Valutazione del fattore di risoluzione R

La risoluzione R tra due picchi si calcola secondo la seguente equazione:

$$R_{2,1} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{2b} + w_{1b})}$$

ove

$R_{2,1}$ è la risoluzione tra la coppia di picchi 2,1

t_{R1} è il tempo di ritenzione, in secondi, del primo dei due picchi

t_{R2} è il tempo di ritenzione, in secondi, del secondo picco

w_{1b} è l'ampiezza alla base del primo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi

w_{2b} è l'ampiezza alla base del secondo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi

W_{1b} , W_{2b} sono le ampiezze alla base del triangolo isoscele costruito sul picco Gaussiano, generato tracciando le tangenti ai punti di flesso (Fig. 1).

1.3 - Valutazione dell'efficienza

L'efficienza della colonna può essere espressa in numero di piatti teorici, N , calcolati secondo la seguente equazione:

$$N = 16 (t_r / w_b)^2$$

1.4 - Valutazione del fattore di asimmetria A_S

La simmetria dei picchi viene espressa, quantitativamente, dall'equazione:

$$A_S = b/a$$

ove b e a sono le distanze della curva dalla verticale nel punto di massimo, misurate al livello del 10% dell'altezza del picco, rispettivamente dopo e prima del punto di massimo (Fig. 2).

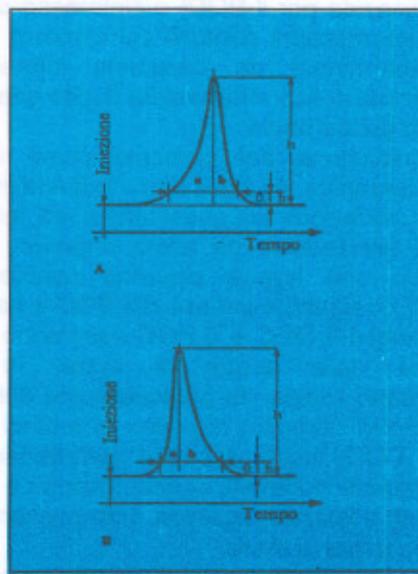


Fig. 2A - Rappresentazione grafica del calcolo del fattore di asimmetria

DETERMINAZIONE DEL CARBONIO ORGANICO DISCIOLTO IN ACQUE NATURALI E DI SCARICO

a cura di L. Patrolecco, M. Pettine e S. Capri, *Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR, Roma*

INTRODUZIONE

Il carbonio può essere presente nelle acque sotto forma di specie inorganiche (carbonati, bicarbonati e anidride carbonica) e di composti organici che si distribuiscono tra fase disciolta e sospesa. Il carbonio complessivo risultante dalla somma del carbonio inorganico e di quello organico presente nelle due fasi costituisce il carbonio totale (TC). Il carbonio organico disciolto (DOC) rappresenta la frazione organica di carbonio che passa attraverso una membrana filtrante da $\sim 1 \mu\text{m}$, mentre il carbonio organico sospeso o particolato (POC) rappresenta la frazione trattenuta dalla membrana. La somma di queste due frazioni dà il carbonio organico totale (TOC).

La determinazione della sostanza organica nelle acque è stata spesso effettuata, in attività di monitoraggio di corpi idrici e di controllo di qualità degli effluenti, facendo ricorso a parametri di tipo aspecifico quali la richiesta chimica di ossigeno (COD) e la richiesta biologica di ossigeno (BOD). La diffusione di questo tipo di misure, che fa riferimento all'effetto prodotto dal carico organico sul bilancio di ossigeno del sistema, è stata favorita dalla semplicità e dal basso costo delle apparecchiature richieste. Tuttavia, la necessità di avere in tempi rapidi risposte sul contenuto di sostanza organica, l'opportunità di ridurre la produzione di rifiuti tossici derivanti dall'attività analitica (Hg, Ag e Cr(VI) nel caso del COD; sodioazide per il BOD) e l'interesse scientifico ad avere informazioni puntuali sul carbonio organico hanno determinato un crescente interesse per determinazioni di tipo strumentale rivolte direttamente alla misura del carbonio.

La determinazione del carbonio come indice di sostanza organica è, tra l'altro, indipendente dallo stato di ossidazione di quest'ultima ed inoltre non risente di interferenze da azoto organico e specie inorganiche che invece possono contribuire alla richiesta di ossigeno espressa dal BOD e dal COD. Il TOC, o meglio il DOC e il POC assumono notevole importanza nelle acque di mare, in quanto rappresentano l'unica via praticabile per determinare il contenuto di carbonio organico in matrici saline. Il BOD e il COD, infatti, a causa dell'interferenza dei cloruri (presenti in elevate concentrazioni) e dei bassi contenuti di sostanza organica, non possono essere utilizzati in acque di mare.

Sono state sviluppate varie tecniche per analizzare il carbonio organico disciolto (DOC). Queste si differenziano in funzione della procedura seguita per l'ossidazione della sostanza organica: ossidazione

chimica in fase umida (Menzel e Vaccaro, 1964), ossidazione fotochimica con radiazioni UV (Williams, 1969) e combustione ad alta temperatura (MacKinnon, 1978). Wangersky (1975), circa venti anni fa, ha confrontato le efficienze delle tecniche di ossidazione in fase umida (WCO = wet chemical oxidation) e di combustione ad alta temperatura (HTO = high temperature oxidation), riscontrando solo modesti incrementi nel caso della procedura HTO. Più recentemente, Sugimura e Suzuki (1988), utilizzando il metodo HTO e facendo avvenire la combustione in presenza di un catalizzatore a base di platino, hanno ottenuto valori di carbonio organico disciolto significativamente più alti di quelli forniti da altre procedure. Questo fatto ha acceso una vivace controversia sul piano scientifico e stimolato approfondimenti sperimentali tesi a confermare o smentire i risultati di Sugimura e Suzuki ed eventualmente spiegare le differenze riscontrate.

Benner ed Hedges (1993) hanno confrontato i risultati forniti dal metodo HTO utilizzato da Sugimura e Suzuki in presenza di un catalizzatore di platino supportato su allumina (3% Pt su Al_2O_3) con quelli ottenuti sia con un analizzatore elementare, che in seguito ad ossidazione in fase umida con persolfato coadiuvata da irraggiamento UV. Il confronto è stato effettuato su materiale organico ad alto peso molecolare (quello più difficile da ossidare), concentrato con sistemi di ultrafiltrazione. Nel caso del metodo HTO e di quello basato sull'ossidazione con persolfato e radiazioni UV l'analisi è stata effettuata direttamente su aliquote del campione acquoso, mentre nel caso dell'analizzatore elementare sul campione essiccato. Le diverse procedure seguite hanno fornito risultati analoghi, smentendo gli incrementi osservati da Sugimura e Suzuki.

Successivi lavori sperimentali (Sharp et al., 1995; Peltzer et al., 1996) hanno confermato un buon accordo dei risultati forniti da procedure e apparecchiature diverse ed evidenziato che il problema chiave da affrontare per una corretta determinazione del carbonio organico è quello del bianco. In analisi strumentali di questo tipo il bianco risulta da due diversi contributi, quello dell'acqua ultrapura utilizzata per la calibrazione dello strumento e quello strumentale connesso con il tipo di apparecchiatura e, in particolare, di catalizzatore impiegato (Benner e Strom, 1993; Cauwet, 1994). Solo il secondo contributo è effettivamente da sottrarre alle misure sperimentali, ma in pratica è molto difficile distinguere i due contributi, per cui si finisce con il sottrarre il bianco complessivo; è ovvio quindi, che le misure potranno essere accurate solo nel caso in cui il bianco dell'acqua sia trascurabile rispetto a quello strumentale.

La delicatezza nell'esecuzione delle misure del bianco si manifesta soprattutto qualora si operi in acque marine ove i livelli di DOC sono in genere nell'intervallo $100\text{-}200 \mu\text{M}$. In altre matrici ove le concentrazioni di carbonio organico sono maggiori le

incertezze sul bianco influenzano in misura minore l'accuratezza delle misure.

Il parametro TOC è inserito per memoria nel DPR 236 concernente le caratteristiche di qualità delle acque destinate al consumo umano, in quanto le sostanze organiche contenute in un'acqua possono reagire con i reattivi utilizzati nei processi di disinfezione e dar luogo a composti potenzialmente tossici o cancerogeni.

In un'acqua potabile i valori tipici di carbonio organico sono in genere inferiori a 1 mg/L mentre nelle acque di scarico si riscontrano livelli molto elevati di composti organici (> 100 mg/L).

PARTE SPERIMENTALE

La determinazione del carbonio organico, trattandosi di una misura diretta di tipo strumentale, prevede una minima manipolazione del campione. Alcuni aspetti della procedura analitica (scelta dei contenitori per il campionamento, del sistema di filtrazione - se richiesta - stima del bianco) risultano, tuttavia, particolarmente critici, soprattutto per quelle matrici quali acque oceaniche che possono essere caratterizzate da valori molto bassi di carbonio organico (50-100 μM).

Scelta dei contenitori per il campionamento

L'utilizzo di recipienti in vetro, come comunemente riportato nei manuali di metodi analitici standard (IRSA, 1994; Standard Methods, 1998), è stato inizialmente raccomandato come il più idoneo per la conservazione di campioni destinati alle misure del carbonio, anche perché il vetro è facilmente pulito con trattamento in muffola. Il formato più sicuro del recipiente è quello della fiala che può essere sigillata alla fiamma in corrente di azoto; l'operazione di chiusura comporta anch'essa rischi di contaminazione. Altri recipienti dotati di tappo a vite con guarnizione di teflon si sono dimostrati più problematici nell'uso, proprio per le difficoltà connesse con la pulizia dei tappi.

Sulla base delle indicazioni della letteratura più recente (Miller e Moran, 1997; Donahue et al., 1998), contenitori di materiale plastico diverso (polietilene ad alta densità, polipropilene, policarbonato) si sono dimostrati altrettanto idonei per la conservazione dei campioni, presentando, peraltro, il vantaggio di un più agevole trasporto. In recenti indagini effettuate dall'IRSA nell'ambito del progetto PRISMA 2 promosso dal MURST si sono utilizzati contenitori di polietilene ad alta densità HDPE (25 mL), precedentemente trattati con HNO_3 1,5 M in stufa a 50° C per un'ora, quindi sciacquati più volte con acqua ultrapura. Seguendo questa procedura di decontaminazione i bianchi analitici sono risultati ampiamente soddisfacenti con valori complessivi di 10-15 μM di carbonio organico, in gran parte attribuibili a bianco di tipo strumentale.

Scelta del sistema filtrante

Oggetto di attenta valutazione deve essere l'eventuale rilascio di carbonio organico dal filtro. Filtri in fibra di vetro, aventi una porosità nominale di 0,7 μm , sono stati adottati in protocolli analitici standard per l'analisi del DOC in acque di mare (Strickland e Parsons, 1968) e in acque dolci (Wetzel e Likens, 1991); questi hanno il vantaggio di poter essere trattati in muffola per l'eliminazione di eventuali residui di carbonio organico e di non rilasciare carbonio organico in fase di filtrazione.

In altri protocolli analitici sviluppati dall'EPA (Malcom e McKinley, 1972) e dall'U.S. Geological Survey (Kaufmann, 1988), sono stati proposti filtri in polisulfone o in argento da 0,45 μm , rispettivamente; tuttavia questo tipo di filtri non ha trovato ampia diffusione nella determinazione del DOC in quanto è molto difficile rimuovere tracce di carbonio organico nel caso di filtri costituiti da una matrice organica (polisulfone, nylon, polivinilidene difluoruro) e per il costo decisamente proibitivo nel caso dei filtri in argento.

I filtri in fibra di vetro (GF/F, diametro 25 mm), sono in genere precombusti in muffola a 480 °C per quattro ore. In alternativa ai GF/F si è fatto ricorso in lavori recenti di letteratura a filtri in policarbonato da 0,4 μm pretrattati in ambiente acido che si sono dimostrati ugualmente validi. Indipendentemente dal tipo di filtro usato, si raccomanda di effettuare la filtrazione esercitando una pressione non troppo elevata per non rischiare di alterare il contenuto di DOC a seguito di rilascio di composti organici da fenomeni di lisi cellulare.

Conservazione del campione

Diversi autori hanno approfondito il problema dell'influenza delle modalità di conservazione del campione sull'accuratezza delle misure di DOC. Tupas et al. (1994) hanno confrontato tre diverse procedure di conservazione (acidificazione, congelamento, refrigerazione a 4 °C). Valori di DOC molto simili tra loro e molto simili a quelli degli stessi campioni analizzati immediatamente dopo il prelievo sono stati ottenuti per i campioni acidificati e per quelli congelati, mentre i campioni refrigerati a 4 °C, sia filtrati che non filtrati, hanno fornito valori significativamente più bassi anche se conservati in fiale chiuse alla fiamma e al buio. I campioni congelati, analizzati dopo cinque mesi, mantenevano praticamente inalterato il valore di DOC iniziale.

Kaplan (1994) ha osservato, invece, una diminuzione dei valori di DOC su campioni acidificati. L'aggiunta di H_3PO_4 o di H_2SO_4 comportava una riduzione del DOC di circa il 10 % dopo due settimane, mentre con HNO_3 si arrivava a circa un 30% di riduzione. Riduzioni più contenute, inferiori al 10%, sono state osservate con altri stabilizzanti, HgCl_2 e NaN_3 . Con la sodio azide, in particolare, la diminuzione del DOC

era solo di pochi punti percentuali e non era statisticamente significativa.

E' opinione largamente condivisa tra gli addetti ai lavori che l'analisi immediata dei campioni sia sempre preferibile e che non esista, ad eccezione del congelamento, una procedura ideale di conservazione. Gli errori associati alle operazioni di stabilizzazione del campione costituiscono la più importante fonte di inaccuratezza nelle misure di DOC.

Il cloruro mercurico presenta altri svantaggi connessi con la possibilità di avvelenare il catalizzatore al platino impiegato nella reazione di combustione alla base del funzionamento degli analizzatori del carbonio e con lo smaltimento finale dei campioni.

In occasione delle ricerche svolte nell'ambito del progetto PRISMA 2 si è adottata la procedura di conservazione basata sul congelamento rapido dei campioni di acqua di mare alla temperatura di -20°C . Allo scopo sono stati utilizzati dei portacampioni costituiti da blocchi forati di alluminio, realizzati in laboratorio, che consentivano un congelamento quasi immediato del campione.

Stima del bianco

I fattori che possono influenzare in maggior misura l'accuratezza nella misura del DOC sono la completezza della rimozione dell'interferenza dovuta al carbonio inorganico (IC) e la misura del bianco strumentale e del bianco dei reagenti.

Il carbonio inorganico è presente nelle acque naturali in concentrazioni 10-20 volte superiori al valore del DOC; per ridurre l'interferenza a circa $1\ \mu\text{mole/L}$ è necessario rimuovere più del 99,95% del carbonio inorganico (Peltzer e Brewer, 1993). La rimozione del carbonio inorganico viene realizzata acidificando il campione a un pH di circa 2,5 ed eliminando la CO_2 risultante insufflando un gas (azoto o ossigeno) assolutamente privo di carbonio (CO , CO_2 , idrocarburi). Per eliminare completamente l'interferenza si deve assicurare un'adeguata velocità di flusso del gas.

La misura del bianco dei reagenti è essenzialmente legata al bianco dell'acqua utilizzata per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la calibrazione; l'acido e i gas utilizzati per l'allontanamento della CO_2 rappresentano, infatti, gli unici reagenti aggiunti al campione prima dell'analisi ed il loro contributo al DOC è trascurabile, purchè si tratti di reattivi di elevata purezza.

La determinazione del bianco strumentale e del bianco dell'acqua impiegata nelle soluzioni di calibrazione è un passaggio estremamente critico nella misura del DOC in acque di mare, soprattutto nel caso di acque oceaniche profonde caratterizzate da valori di carbonio organico estremamente bassi, intorno a $50\ \mu\text{M}$. Tale criticità risulta evidente se si pensa che i valori del bianco totale (costituito dalla somma del bianco strumentale e del bianco dell'acqua) si aggirano sulle 10-20 μM in condizioni di lavoro ottimali.

Alcuni analizzatori di carbonio organico consentono di misurare il bianco strumentale mediante un dispositivo completamente isolato da agenti esterni, in cui un'acqua ultrapura viene ulteriormente purificata attraverso un trattamento di pirolisi e successiva condensazione con raccolta in una trappola di vetro. Il dispositivo consente, attraverso il riciclo di quest'acqua, la ripetizione della suddetta procedura di purificazione fino ad ottenere un bianco di valore basso e costante (intorno a $10\ \mu\text{M}$), attribuibile al solo bianco strumentale.

Al bianco strumentale contribuiscono il tubo di combustione, il tipo e lo stato di usura del catalizzatore e la natura del supporto impiegato. Se su un piano teorico il bianco strumentale dovrebbe essere misurato ogni giorno in quanto varia nel tempo in funzione delle prestazioni del catalizzatore, su un piano pratico è spesso complicato, se non impossibile per molti strumenti analitici, distinguere tra bianco complessivo e bianco strumentale, per cui in molti casi si sottrae dalle misure il bianco complessivo. Qualora questo sia ragionevolmente basso ($< 20\ \mu\text{M}$) si può ritenere che sia attribuibile in gran parte allo strumento e non all'acqua o ai reattivi. La concentrazione del carbonio organico si può ricavare, attraverso la curva di calibrazione, dal valore dell'area del picco del campione corretto del contributo del bianco. Ovviamente, le misure saranno tanto più accurate quanto più è trascurabile il bianco dell'acqua rispetto al bianco strumentale.

Alla luce delle considerazioni svolte, frutto di un esame della letteratura più aggiornata e di una serie di verifiche sperimentali condotte nei nostri laboratori, si propone una procedura ottimizzata per l'analisi del carbonio organico in acque naturali e di scarico.

DETERMINAZIONE DEL CARBONIO ORGANICO DISCIOLTO IN ACQUE NATURALI E DI SCARICO

1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il carbonio organico viene determinato mediante ossidazione catalitica ad alta temperatura (HTO) di una idonea quantità di campione. Il catalizzatore impiegato è costituito da platino supportato su una matrice inorganica (es. allumina, quarzo). Il campione di acqua viene, se necessario, diluito e ben omogeneizzato, quindi iniettato manualmente o mediante autocampionatore in corrente di ossigeno o di aria purificata nel tubo di combustione dove l'acqua viene vaporizzata e il carbonio organico ossidato a CO_2 e H_2O . La CO_2 gassosa viene determinata all'uscita del tubo mediante un rivelatore all'infrarosso.

Il metodo consente di impiegare un microcampione di acqua (50-200 μL) e di eseguire il dosaggio con rapidità e possibilità di automazione.

Dalla misura dell'area del picco di assorbimento IR della CO_2 prodotta, corretta del contributo del bianco, si ricava la concentrazione del carbonio organico

mediante confronto con una curva di calibrazione ottenuta con soluzioni a concentrazione nota comprese nel campo di indagine analitica.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è in grado di determinare le concentrazioni comunemente riscontrate in diverse matrici acquose (acque di scarico, superficiali e di mare). L'intervallo di concentrazioni misurabile è variabile in funzione delle condizioni sperimentali (tipo di apparecchiatura impiegata, aliquota di campione dosata), per cui non si ritiene opportuno specificare un campo di applicazione.

3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Le operazioni di omogeneizzazione del campione, soprattutto in presenza di un innalzamento della temperatura, possono determinare una perdita di sostanze organiche volatili. L'eliminazione del carbonio inorganico mediante acidificazione e allontanamento della CO_2 con un gas inerte può provocare un'ulteriore perdita di sostanze organiche volatili. In questo caso la misura del carbonio organico si riferisce alla sola frazione non volatile (not purgeable organic carbon, NPOC). Nel caso in cui si voglia tenere conto anche della frazione volatile si procede alla misura separata del carbonio totale e del carbonio inorganico, ricavando, poi, per differenza il carbonio organico totale (DOC). Il carbonio totale viene determinato iniettando il campione nel tubo di ossidazione senza procedere alla preventiva acidificazione del campione e all'allontanamento della CO_2 prodotta, mentre il solo carbonio inorganico viene dosato (quando lo strumento lo consenta) introducendo il campione in un recipiente di reazione dove viene fatto reagire con un acido (HCl) a temperatura ambiente. In questo modo è possibile trasformare in CO_2 solo i carbonati e bicarbonati senza decomporre le sostanze organiche. Tuttavia, in molte acque superficiali e sotterranee la frazione volatile fornisce un contributo trascurabile al carbonio organico totale.

La filtrazione del campione, operazione necessaria per eliminare il materiale sospeso, può comportare un aumento o una diminuzione del DOC, in funzione delle proprietà fisiche dei composti del carbonio e dell'eventuale adsorbimento o desorbimento di materiale carbonioso. E' opportuno valutare il contributo al DOC dovuto al filtro analizzando un bianco di filtrazione.

Fonti di contaminazione possono derivare dai reagenti, dalla vetreria, dai materiali plastici utilizzati. Tutto il materiale dovrà essere opportunamente testato prima dell'uso.

4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

In base a quanto detto in precedenza è possibile conservare i campioni di acqua in bottiglie di vetro scuro, dotate di tappi con guarnizioni in teflon o in contenitori di polietilene ad alta densità. Nel primo caso le bottiglie vanno lavate con acido e trattate in muffola a $550\text{ }^\circ\text{C}$ per 3-4 ore. Nel secondo caso è consigliabile una procedura di decontaminazione mediante trattamento con HNO_3 1,5 M in stufa a $50\text{ }^\circ\text{C}$ per un'ora, seguito da risciacqui abbondanti con acqua ultrapura. Contenitori di altro materiale plastico possono essere utilizzati dopo aver attentamente verificato che non rilascino sostanze contenenti carbonio.

Procedure di pulizia meno rigorose sono consentite se le concentrazioni di carbonio organico da determinare sono relativamente alte.

Per la determinazione del carbonio organico disciolto (DOC) i campioni di acqua vengono filtrati immediatamente dopo il prelievo su filtri in fibra di vetro precombusti in muffola a $480\text{ }^\circ\text{C}$ per quattro ore. Per la filtrazione di piccoli volumi (fino a 100 mL) si possono utilizzare filtri montati su un sistema filtrante costituito da una siringa in PVC con portafiltri in policarbonato, un dispositivo che limita le possibilità di contaminazione del campione. Per la filtrazione di volumi più elevati (1-2 litri) si può ricorrere ad un sistema filtrante in vetro borosilicato, preliminarmente trattato in muffola, collegato ad una pompa da vuoto per facilitare la filtrazione. Tra il prelievo del campione e l'analisi deve intercorrere il minor tempo possibile. I campioni debbono essere conservati a bassa temperatura, al riparo della luce e dell'aria, onde prevenire fenomeni di decomposizione batterica e di ossidazione. Nel caso in cui non sia possibile analizzare immediatamente il campione si consiglia di congelarlo a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

5 - APPARECCHIATURE

5.1 - Normale attrezzatura da laboratorio

Tutta la vetreria e i contenitori di materiale plastico dovranno essere preventivamente trattati secondo le modalità indicate al punto 4 "Campionamento e conservazione del campione".

5.2 - Miscelatore a sbattimento o omogeneizzatore

5.3 - Agitatore magnetico dotato di ancorette in teflon

5.4 - Microsiringhe per iniettare volumi fino a $1000\text{ }\mu\text{L}$

5.5 - Analizzatore di carbonio organico totale

Utilizza la tecnica della combustione ed è dotato di un sistema di rivelazione all'infrarosso non dispersivo (Fig. 1). In alternativa, esistono in commercio strumenti dotati di rivelatori a ionizzazione di fiamma

in grado di determinare il metano prodotto dalla reazione di conversione della CO_2 .

5.6 - pH-metro, completo di elettrodo indicatore e di riferimento

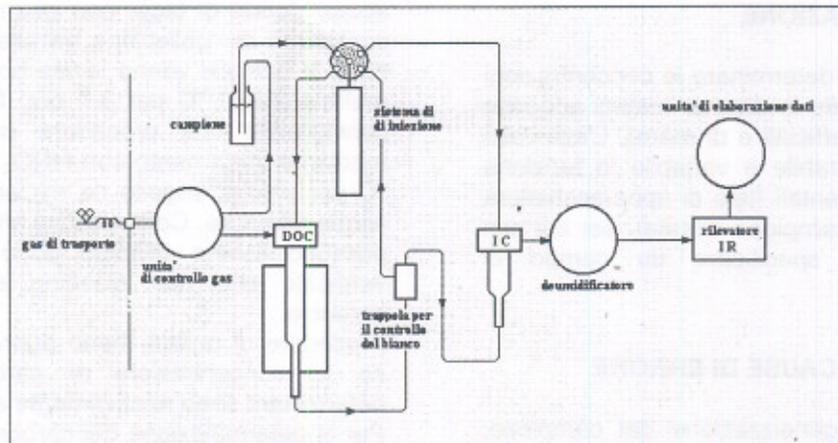


Fig. 1 - Schema di analizzatore di carbonio organico

6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro per analisi in tracce.

6.1 - Acqua ultrapura

Utilizzare l'acqua, esente da CO_2 per la preparazione dei bianchi, delle soluzioni di riferimento e di lavoro e per il risciacquo finale della vetreria, avendo cura di evitare al massimo il contatto con l'aria.

6.2 - Acido cloridrico concentrato HCl ($d=1,19$)

6.4 - Soluzione concentrata di riferimento contenente 1000 mg/L di carbonio organico

Sciogliere 0,2125 g di ftalato acido di potassio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) in acqua (6.1) e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL. Acidificare con HCl (6.2) fino a $\text{pH}=2$ e conservare in recipiente ben chiuso, al buio e a 4°C . La soluzione è stabile per circa due mesi.

6.5 - Soluzione concentrata di riferimento contenente 1000 mg/L di carbonio inorganico

Sciogliere 0,3497 g di idrogeno carbonato di sodio, NaHCO_3 , e 0,4418 g di carbonato di sodio anidro, Na_2CO_3 , in acqua (6.1) e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL. Conservare la soluzione in un recipiente ben chiuso.

6.6 - Materiale per il riempimento dei tubi per lo sviluppo di CO_2 .

Il materiale e le modalità di riempimento devono essere quelli consigliati dalla ditta costruttrice dell'apparecchio analizzatore (5.5).

6.7 - Aria purissima, esente da CO_2 e idrocarburi.

Il controllo della linea di base strumentale consente di verificare la purezza dell'aria.

7 - PROCEDIMENTO

Le differenze tra le varie apparecchiature (5.5) disponibili non consentono una codificazione dettagliata di istruzioni adatte ad ogni tipo di strumento. Quindi, per l'attivazione e la predisposizione dell'apparecchio al funzionamento attenersi alle indicazioni riportate nel manuale dello strumento che indica, di norma, anche le condizioni più appropriate per l'esecuzione delle analisi.

Il volume di campione da iniettare nel tubo di combustione è variabile a seconda della capacità del tubo stesso e della quantità di carbonio da dosare.

Il campione viene iniettato quando l'apparecchio è già stato portato a regime per quello che riguarda il flusso di aria, la temperatura dei tubi di combustione, la parte elettronica, ecc.

7.1 - Calibrazione

Costruire la curva di calibrazione all'inizio di ogni ciclo analitico utilizzando soluzioni di lavoro in numero sufficiente a garantire una corretta interpolazione delle concentrazioni misurate. Le concentrazioni delle soluzioni di lavoro saranno scelte all'interno del campo di linearità dello strumento, nell'intervallo di valori atteso per i campioni.

Verificare ad intervalli regolari la validità della curva di calibrazione inserendo, in una serie di campioni, l'analisi di un bianco e di una soluzione di lavoro.

7.1.1 - Carbonio totale e organico

Per la preparazione delle soluzioni di lavoro, diluire opportunamente con acqua (6.1) la soluzione concentrata di riferimento (6.4). Iniettare a turno un'aliquota delle soluzioni di lavoro nel tubo di combustione e registrare l'area del picco di assorbimento IR della CO₂ prodotta. Effettuare almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare. Costruire la curva di calibrazione riportando in ascissa le concentrazioni di carbonio organico in mg/L e in ordinata le aree dei picchi corrette del valore ottenuto da un bianco di acqua (6.1) sottoposta alla stessa procedura delle soluzioni di lavoro.

La curva di calibrazione può essere ottenuta direttamente se si dispone di un sistema di elaborazione dati collegato all'apparecchio analizzatore.

7.1.2 - Carbonio inorganico

Per la preparazione delle soluzioni di lavoro, diluire opportunamente con acqua (6.1) la soluzione concentrata di riferimento (6.5). Iniettare a turno un'aliquota delle soluzioni di lavoro nel recipiente di reazione per il carbonio inorganico nel caso di uso di strumenti che prevedono questa possibilità; la CO₂ prodotta viene trasferita dal gas di trasporto al rivelatore IR ed ivi misurata. Effettuare, anche in questo caso, almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare. Per la costruzione della curva di calibrazione procedere come descritto nel par. 7.1.1.

7.2 - Dosaggio del campione

Se il campione contiene sostanze oleose in superficie e/o sostanze colloidali, dibattere per 10 minuti nell'apposito miscelatore (5.1) circa 250 mL di campione in modo da favorirne la dispersione. Per campioni che presentano tenori elevati di acidi, basi e sali è opportuno procedere ad una preventiva diluizione del campione per migliorare la precisione delle misure ed evitare un rapido deterioramento del catalizzatore e la corrosione di parti strumentali.

Iniettare il campione nel tubo di combustione adottando le stesse condizioni operative utilizzate per la curva di calibrazione. Ripetere le iniezioni più volte fino ad avere una ripetibilità su tre letture consecutive entro il ± 2%.

Per ricavare dal carbonio totale la concentrazione del carbonio organico (DOC), il carbonio inorganico deve essere determinato separatamente o allontanato mediante acidificazione del campione sotto flusso di gas inerte. La misura del carbonio inorganico, quando lo strumento lo consenta, viene effettuata seguendo le modalità indicate al punto 7.1.2 per la costruzione della relativa curva di calibrazione. La

determinazione del carbonio organico può essere effettuata soltanto nel caso in cui le frazioni organica ed inorganica siano confrontabili. Nel caso di differenze marcate (ad es. qualora la frazione organica sia molto piccola), c'è il rischio che le incertezze associate alle misure del carbonio totale e della frazione inorganica producano errori elevati sulla stima per differenza.

Se, invece, si ricorre all'eliminazione del carbonio inorganico prima dell'analisi, trasferire un'aliquota di campione rappresentativa (20-50 mL) in un recipiente e aggiungere acido cloridrico concentrato (6.2) per avere un pH inferiore a 2. In queste condizioni i carbonati e i bicarbonati vengono trasformati in CO₂ che viene allontanato dalla soluzione facendo gorgogliare un gas, aria purissima (6.7) o altro gas esente da CO₂ e idrocarburi, per 10 minuti. Iniettare quindi il campione nel tubo di combustione seguendo le modalità indicate per il carbonio totale. In questo caso, la frazione volatile del carbonio organico viene eliminata insieme al carbonio inorganico e si ottiene il NPOC, "not purgeable organic carbon", per distinguerlo dal DOC indicato in precedenza.

8 - CALCOLI

8.1 - Carbonio totale disciolto

Il valore medio dell'area del picco, corretto del valore del solo bianco strumentale o del bianco complessivo (bianco dell'acqua + bianco strumentale) qualora non sia possibile distinguere tra i due contributi e comunque nel caso in cui il valore complessivo sia inferiore alle 15-20 µM e quindi possa essere attribuito in gran parte al bianco strumentale, consente di ricavare dalla curva di calibrazione (7.1.1) i mg/L di carbonio totale disciolto (DC) nel campione in esame.

8.2 - Carbonio inorganico disciolto

Dal valore medio dell'area del picco, corretto del valore del bianco strumentale (in questo caso la procedura di acidificazione e insufflazione con azoto o aria ultrapura consente di avere un'acqua esente da CO₂), ricavare mediante la curva di calibrazione (7.1.2) i mg/L di carbonio inorganico disciolto (IC) nel campione in esame.

8.3 - Carbonio organico disciolto

Il carbonio organico disciolto si ottiene dalla differenza:

$$\text{DOC (mg/L)} = \text{DC} - \text{IC}$$

Se il carbonio inorganico viene rimosso prima dell'analisi del campione, ricavare dalla curva di calibrazione 7.1.1 i mg/L di NPOC.

9 - PRECISIONE E ACCURATEZZA

Con gli analizzatori di carbonio attualmente disponibili è possibile ottenere una precisione, espressa come coefficiente di variazione, dell'1-2%. Misure di DOC effettuate da 59 laboratori su due campioni di acqua di mare, uno tal quale, l'altro addizionato con glucosio ad una concentrazione di 50 µmoli/L di C hanno fornito un'accuratezza del ± 10% (Sharp, 1997).

BIBLIOGRAFIA

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

Benner R. e Hedges J. I. (1993): "A test of the accuracy of freshwater DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation and UV-promoted persulfate oxidation", *Mar. Chem.*, **41**, 161-165.

Benner R. e Strom M. (1993): "A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation", *Mar. Chem.*, **41**, 153-160.

Cauwet G. (1994): "HTCO method for dissolved organic carbon analysis in seawater: influence of catalyst on blank estimation", *Mar. Chem.*, **47**, 55-64.

Donahue W. F., Schindler D. W., Page S. J. e Stainton M. P. (1998): "Acid-induced changes in DOC quality in an experimental whole lake manipulation", *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2954-2960.

IRSA (1994): "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, n. 100, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato.

Kaplan L. A. (1994): "A field and laboratory procedure to collect, process and preserve freshwaters samples for dissolved organic carbon analysis", *Limnol. Oceanogr.*, **39** (6), 1470-1476.

Kaufmann P. R. (1988): "Chemical characteristics of streams in the Mid-Atlantic and South eastern United States, V. 1: Population descriptions and physico-chemical relationships", EPA/600/3-88/021a. U. S. Environ. Protect. Agency, Washington.

MacKinnon M. D. (1978): "A dry oxidation method for the analysis of the TOC in seawater", *Mar. Chem.*, **7**, 17-37.

Malcom R. L. e McKinley P. W. (1972): "Collection and preservation of water samples for carbon analysis", in P. F. Goerlitz e E. Brown eds, *Methods for analysis of organic substances in water*. U. S. Geol. Surv. Tech. Water Resour. Inventory, 1-6.

Menzel D. W. e Vaccaro R. F. (1964): "The measurements of dissolved organic and particulate carbon in seawater", *Limnol. Oceanogr.*, **9**, 138-142.

Miller W. L. e Moran M. A. (1997): "Interaction of photochemical and microbial process in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment", *Limnol. Oceanogr.*, **42** (6), 1317-1324.

Peltzer E. T. e Brewer P. G. (1993): "Some practical aspects of measuring DOC: sampling artifacts and analytical problems with marine samples", *Mar. Chem.*, **41**, 243-252.

Peltzer E. T., Fry B., Doering P. H., McHenna J. H., Norman B. e Zweifel U. L. (1996): "A comparison of methods for the measurements of dissolved organic carbon in natural waters", *Mar. Chem.*, **54**, 85-96.

Sharp J. H. (1997): "Marine dissolved organic carbon: are the older values correct?", *Mar. Chem.*, **56**, 265-277.

Sharp J. H., Benner R., Bennett L., Carlson C. A., Fitzwater S. E., Peltzer E.T. e Tupas L. M. (1995): "Analyses of dissolved organic carbon in seawater: the JGOFS EqPac methods comparison", *Mar. Chem.*, **48**, 91-108.

Strickland J. D. H. e Parsons T. R. (1968): "A practical handbook of seawater analysis", *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 167.

Sugimura Y. e Suzuki Y. (1988): "A high-temperature catalytic oxidation method for the determination of non-volatile dissolved organic carbon in seawater by direct injection of a liquid sample", *Mar. Chem.*, **24**, 105-131.

Tupas L. M., Popp B. N. e David M. K. (1994): "Dissolved organic carbon in oligotrophic waters: experiments on sample preservation, storage and analysis", *Mar. Chem.*, **45**, 207-216.

Wangersky P. J. (1975): "The measurement of organic carbon in sea water", *Adv. Chem. Ser.*, **147**, 148-162.

Wetzel R. G. e Likens G. E. (1991): "Limnological analyses", Springer.

Williams P. M. (1969): "The determination of dissolved organic carbon in seawater: a comparison of two methods", *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 297-298.

METODI PER IL RILEVAMENTO DI CISTI E OOCISTI DI PROTOZOI PATOGENI NELLE ACQUE

R. Briancesco e L. Bonadonna - *Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità - Roma*

RIASSUNTO

Cryptosporidium e *Giardia* sono protozoi parassiti responsabili di gravi forme di gastroenterite nell'uomo

e in particolare negli individui immunocompromessi e nei bambini. Poiché l'acqua è ritenuta essere il principale veicolo di infezione, il controllo della diffusione dei due parassiti nei corpi idrici, pone come prioritaria la necessità di disporre di metodi di analisi facilmente applicabili ed efficienti. Attraverso fasi di filtrazione e di concentrazione, i metodi di seguito proposti consentono la determinazione quantitativa, a livello di genere, di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* nelle acque.

SUMMARY

Cryptosporidium and *Giardia* have been recognized as etiological agents of gastrointestinal illness in humans with severe consequences on children and immunocompromised individuals. Water seems to be the main vehicle of infection. In last years many efforts have been done to evaluate a method to enumerate oocysts of *Cryptosporidium* and cysts of *Giardia* in water. Throughout filtration and concentration steps, the two procedures proposed allow to enumerate oocysts and cysts belonging to the two genera of protozoa.

1 - INTRODUZIONE

1.1 - Generalità

Il protozoo coccide *Cryptosporidium parvum* ed il protozoo flagellato *Giardia lamblia* sono agenti eziologici di forme acute di gastroenterite nell'uomo. Entrambe le infezioni sono trasmesse per via fecale-orale attraverso l'ingestione di oocisti nel caso di *Cryptosporidium* e di cisti nel caso di *Giardia*. Infezioni da *Cryptosporidium* e da *Giardia* sono state ampiamente segnalate, con una prevalenza nei paesi industrializzati dell'1-3% per il primo e del 2-5% per il secondo. Nei paesi in via di sviluppo la prevalenza delle infezioni aumenta del 5-10% per *Cryptosporidium* e del 20-30% per *Giardia*. I dati più recenti hanno dimostrato che le oocisti e le cisti possono essere ritrovate in acque superficiali e profonde, in acque potabili marine e reflue. L'acqua è stata pertanto riconosciuta come il principale veicolo di infezione. La scarsa specificità d'ospite favorisce la diffusione dei parassiti nell'ambiente come anche l'elevato numero di cisti ed oocisti emesse dagli animali infetti e la loro straordinaria resistenza alla disinfezione ed alle avverse condizioni ambientali. Le acque di superficie possono essere contaminate sia direttamente dall'apporto di feci eliminate da animali infetti, sia attraverso acque di dilavamento di suoli adibiti a pascolo di animali infetti, acque di scarico e percolati. Nelle acque superficiali il valore di concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* può variare da 0 a $10^2/L$.

In considerazione della potenziale diffusione nell'ambiente dei due parassiti e del ruolo che essi possono svolgere in relazione alla salute umana, si pone la necessità di definire metodi idonei alla loro

ricerca nelle acque anche in funzione della loro capacità di resistenza ai trattamenti di disinfezione.

1.2 - Obiettivo

I metodi consentono di valutare la concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* in un volume noto di un campione di acqua.

2 - PRINCIPIO DEL METODO: METODO 1

Volumi noti del campione da analizzare sono filtrati attraverso un filtro a capsula; si procede quindi all'eluizione delle cisti ed delle oocisti dal filtro a cui segue la concentrazione e la purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e flottazione. Infine, mediante immunofluorescenza diretta, si procede alla determinazione e al conteggio al microscopio delle cisti ed oocisti.

2.1 - Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento. Tuttavia la metodica non consente la determinazione dei parassiti a livello di specie, né permette di valutarne l'infettività e la vitalità.

2.2 - Possibili interferenze

Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo (20-35% per le oocisti di *Cryptosporidium* e 45-95% per le cisti di *Giardia*, prima della flottazione). Campioni particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi possono nascondere la presenza di cisti ed oocisti.

3 - REAGENTI

3.1 - Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

La soluzione viene preparata sciogliendo in 800 mL di acqua distillata i seguenti composti:

✓ - Na_2HPO_4	0,76g
✓ - NaH_2PO_4	0,02g

Adottando le dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica aggiungere 100 mL di Formaldeide e portare ad 1 L con acqua distillata.

3.2 - Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

La soluzione viene preparata sciogliendo in 800 mL di acqua distillata i seguenti composti:

- ✓ - NaCl 80g
- ✓ - KH_2PO_4 2g
- ✓ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 29g
- ✓ - KCl 2g

Aggiustare il pH a $7,4 \pm 0,2$ con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave per 15 min a 121°C .

3.3 - Soluzione di Percoll-Saccarosio

La soluzione si prepara mescolando i seguenti componenti:

- ✓ - Percoll (densità=1,13) 45mL
- ✓ - Saccarosio 2,5 M 10mL
- ✓ - Acqua distillata 45mL

Mescolare e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro.

Nel corso della procedura mantenere i reattivi a circa $+4^\circ\text{C}$.

3.4 - Soluzione di Saccarosio 2,5 M

La soluzione viene preparata sciogliendo in 400 mL di acqua distillata preriscaldata 855,8 g di saccarosio. Attendere che la soluzione si raffreddi, quindi portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.5 - Tampone per eluizione

La soluzione viene preparata sciogliendo 1 g di Laureth-12 in un beaker di vetro pirex e aggiungendo 100 mL di acqua distillata.

Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth-12 di sciogliersi.

La soluzione viene quindi trasferita in un matraccio da 1 L, il beaker sciacquato numerose volte con acqua distillata ed i liquidi di risciacquo raccolti nel matraccio stesso. Aggiungere quindi i seguenti reattivi:

- ✓ - Tris 1M, pH 7,4 10mL
- ✓ - EDTA, 2Na 0,5 M, pH 8 2mL
- ✓ - Antischiuma A 150 μL

Portare ad 1 L con acqua distillata.

3.6 - Tris 1 M, pH 7,4

La soluzione viene preparata sciogliendo 121,1 g di Tris in 700 mL acqua distillata. Portare a pH $7,4 \pm 0,2$ con HCl o NaOH 1 N.

Portare a 1 L con acqua distillata.

Sterilizzare con un filtro a membrana da $0,22 \mu\text{m}$; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

3.7 - EDTA, 2Na • 2H₂O, 0,5 M, pH 8,0

La soluzione viene preparata sciogliendo 186,1 g di acido Etilendiaminotetracetico disodico, diidrato (EDTA 2 Na • 2 H₂O) in acqua distillata.

Portare a pH $8 \pm 0,2$ con HCl o NaOH 1 N.

Portare a 1 L con acqua distillata.

3.8 - Soluzione di lavaggio A

La soluzione viene preparata sciogliendo 1 g di Sodio Dodecil Solfato (SDS) in 300 mL di acqua distillata.

Aggiungere poi i seguenti componenti:

- ✓ - PBS 10x 100mL
- ✓ - Tween-80 1mL
- ✓ - Antischiuma A 500 μL

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.9 - Soluzione di lavaggio B

La soluzione viene preparata aggiungendo 0,5 mL di Tween 20 a 100 mL di PBS 10 x e portando a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.10 -Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta.

I kit presenti in commercio sono composti da:

- ✓ Anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC).
- ✓ Controllo positivo;
- ✓ Controllo negativo;
- ✓ Tampone di lavaggio;
- ✓ Soluzione di montaggio (Mounting Medium).

4 - STRUMENTAZIONE E VETRERIA

Per lo svolgimento dell'analisi è necessario disporre di:

- ✓ agitatore con braccetti;
- ✓ apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- ✓ camera umida;
- ✓ centrifuga refrigerata ($+4^\circ\text{C}$) a rotore basculante per contenitori da 50-250 mL;
- ✓ contaltri;
- ✓ contenitori da centrifuga da 250 mL con fondo conico o tipo bottiglia;
- ✓ contenitori da centrifuga disposable da 50 e 15 mL con fondo conico;
- ✓ filtro a capsula in polietersulfone, ($1 \mu\text{m}$ di porosità, 6 cm di diametro, 12 cm di lunghezza, 1300 cm^2 di superficie);
- ✓ incubatore settabile a 37°C ;

- ✓ membrane di policarbonato, 1,2 μm , 25 mm di diametro;
- ✓ microscopio ad epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. E' necessario disporre del contrasto di fase e qualora possibile del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- ✓ pipette da 1, 10, 25 mL;
- ✓ pipettrici automatici;
- ✓ pompa peristaltica;
- ✓ regolatore di flusso;
- ✓ tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- ✓ vetrini a pozzetto (compresi nel kit per l'immunofluorescenza);
- ✓ vortex.

5 - PROCEDURA

5.1 - Campionamento e filtrazione

Questo metodo consente di campionare volumi variabili d'acqua (10-700 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più cartucce per filtrare il volume appropriato.

La filtrazione deve avvenire con un flusso non superiore a 2 L/min.

5.2 - Eluizione della capsula

Per l'eluizione di una capsula si utilizzano 240 mL di tampone per eluizione (3.5).

Con un cilindro graduato aggiungere 120 mL di tampone per eluizione attraverso l'estremità di entrata della capsula. La capsula viene quindi posta nello shaker in modo che la valvola di sfiato posta sulla sua estremità di ingresso sia posizionata a ore 12. Si procede all'agitazione per 5 minuti a 600 rpm. L'eluato viene raccolto in un tubo da centrifuga.

Aggiungere altri 120 mL di tampone per eluizione nella capsula e procedere ad una seconda agitazione per 5 minuti a 600 rpm, posizionando il lato di ingresso della capsula in modo tale che la valvola di sfiato sia ad ore 9. Aggiungere l'eluato ottenuto al precedente nel tubo da centrifuga. Centrifugare a 1100 x g per 10 minuti e decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare il supernatante con l'accortezza di non disturbare il pellet. Misurare il volume del campione concentrato (1-10 mL).

La procedura può essere interrotta in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di soluzione tamponata di formaldeide al 10% (3.7).

Si può procedere direttamente all'analisi del campione per immunofluorescenza o, nel caso l'eccessiva torbidità del campione non lo consentisse, chiarificare il campione per flottazione.

5.3 - Chiarificazione per flottazione

A 19,5 mL di soluzione di lavaggio A (3.8) si aggiungono 0,5 mL di campione concentrato, utilizzando una provetta da 50 mL. Miscelare ed iniettare, con una siringa provvista di cannula, 30 mL di soluzione di Percoll-Saccarosio (3.3) al di sotto della sospensione, con l'accortezza di non arrecare danno all'interfaccia tra le due soluzioni. Centrifugare a 1050 x g per 10 min a circa +4°C accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione.

Prelevare il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di Percoll-Saccarosio e raccoglierlo in una provetta da 50 mL. Portare a 50 mL con la soluzione di lavaggio B (3.9), mescolare con vortex e centrifugare a 1050 x g per 15 min. Scartare il supernatante fino ad ottenere un pellet di 1-5 mL.

5.4 - Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Si usano anticorpi monoclonali anti-cisti di *Giardia* e anti-ocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC (3.10), che si legano ad antigeni presenti sulle pareti.

Se l'analisi viene effettuata su vetrino a pozzetto, si trasferiscono 10-30 μL di campione in un pozzetto, 10 μL di controllo positivo in un altro pozzetto e 10 μL di controllo negativo in un altro ancora; si lascia asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a circa 37°C. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del kit. Mettere 20-50 μL del reagente contenente anticorpi fluoresceinati su ciascun pozzetto ed incubare il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Lavare delicatamente il vetrino con PBS 1x o con tampone di lavaggio e far asciugare all'aria. Porre una goccia di soluzione di montaggio su ciascun pozzetto e farvi aderire un vetrino coprioggetto, facendo attenzione a non formare bolle.

Se l'immunofluorescenza viene condotta su filtro, porre la membrana (porosità 1,2 μm , in policarbonato, di diametro 25 mm), sul supporto di filtrazione, bagnarla con PBS 1x e filtrare 1 mL di campione. Aggiungere una goccia del reagente contenente anticorpi fluoresceinati. Incubare per 30 min a temperatura ambiente al buio. Filtrare, quindi lavare per tre volte la membrana aggiungendo 3 mL di PBS 1 x o di tampone di lavaggio e filtrando di volta in volta. Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione. Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, e montare su questa il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

5.5 - Esame microscopico

Osservare l'intera superficie di ogni pozzetto a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio ad epifluorescenza ed individuare le strutture

fluorescenti verde mela con forma e dimensioni caratteristiche delle cisti di *Giardia* (lunghezza 8-12 μm e larghezza 7-10 μm) e oocisti di *Cryptosporidium* (3,5-6,5 μm). Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti ed effettuare l'osservazione delle stesse strutture in epifluorescenza a 1000 ingrandimenti in immersione, quindi passare sull'obiettivo con il contrasto di fase o con il contrasto ad interferenza differenziale (DIC). L'osservazione a contrasto di fase consente di distinguere le cisti ed oocisti piene da quelle vuote fornendo in tal modo indicazioni sulla presunta vitalità delle cisti ed oocisti piene. L'osservazione a contrasto interferenziale permette invece di valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoi e granuli residui nel *Cryptosporidium*), fornendo sia una ulteriore conferma alla determinazione, sia l'opportunità di distinguere tra cisti ed oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate.

Annotare il numero totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium* ed eventualmente quelle che si presentano piene o vuote e con o senza strutture interne.

5.6 - Interpretazione dei risultati

La presenza di strutture conformi per fluorescenza, forma e dimensioni a cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* permette di considerare il campione presuntivamente positivo.

Alcuni organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti alla stessa lunghezza d'onda del FITC possono essere registrati come falsi positivi ed interferire nei risultati dell'analisi.

L'impiego di disinfettanti può dar luogo ad interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti ed oocisti perché può causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe difficilmente riconoscibili.

6 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di cisti ed oocisti contate sull'intera superficie di ciascun pozzetto si riferisce al volume di campione ivi deposto; tale numero viene quindi rapportato al volume di pellet chiarificato (0,5 mL) e moltiplicato per il volume dell'eluato (1-10 mL). Il risultato viene infine rapportato al numero di litri di campione filtrati.

7 - RESOCONTO DI PROVA

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8 - PRINCIPIO DEL METODO: METODO 2

Prevede la filtrazione di campioni di acqua su membrana di porosità nominale 1,2 μm , la dissoluzione della membrana in un solvente, la concentrazione dell'emulsione mediante centrifugazione, il lavaggio del pellet con solventi, la determinazione ed la conta al microscopio delle cisti ed oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

8.1 - Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento. Tuttavia la metodica non consente la determinazione dei parassiti a livello di specie, né permette di valutarne l'infettività e la vitalità.

8.2 - Possibili interferenze

Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo (25-40% per le oocisti di *Cryptosporidium* e 50-60% per le cisti di *Giardia*, prima della flottazione). Campioni particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi possono nascondere la presenza di cisti ed oocisti.

9 - REAGENTI

9.1 - Acetone

9.2 - Etanolo

9.3 - Etanolo al 70%

Aggiungere a 700 mL di Etanolo 300 mL di acqua distillata e mescolare i due componenti.

9.4 - Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

La soluzione viene preparata sciogliendo in 800 mL di acqua distillata i seguenti composti:

- ✓ - Na_2HPO_4 0,76g
- ✓ - NaH_2PO_4 0,02g

Adottando le dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica aggiungere 100 mL di Formaldeide e portare ad 1L con acqua distillata.

9.5 - Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

La soluzione viene preparata sciogliendo in 800 mL di acqua distillata i seguenti composti:

- ✓ - NaCl 80g
- ✓ - KH_2PO_4 2g
- ✓ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29g
- ✓ - KCl 2g

Aggiustare il pH a $7,4 \pm 0,2$ con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave per 15 min a 121°C .

9.6 - Soluzione di Percoll-Saccarosio

La soluzione si prepara mescolando i seguenti componenti:

- ✓ - Percoll (densità=1,13) 45mL
- ✓ - Saccarosio 2,5 M 10mL
- ✓ - Acqua distillata 45mL

Mescolare e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro.

Nel corso della procedura mantenere i reattivi a circa $+4^\circ\text{C}$.

9.7 - Soluzione di Saccarosio 2,5 M

La soluzione viene preparata sciogliendo in 400 mL di acqua distillata preriscaldata 855,8 g di saccarosio. Attendere che la soluzione si raffreddi, quindi portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.8 - Soluzione di lavaggio A

La soluzione viene preparata sciogliendo 1 g di Sodio Dodecil Solfato (SDS) in 300 mL di acqua distillata. Aggiungere poi i seguenti componenti:

- ✓ - PBS 10x 100mL
- ✓ - Tween-80 1mL
- ✓ - Antischiuma A 500 μL

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.9 - Soluzione di lavaggio B

La soluzione viene preparata aggiungendo 0,5 mL di Tween 20 a 100 mL di PBS 10 x e portando a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.10 - Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta.

I kit presenti in commercio sono composti da:

- ✓ Anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC).
- ✓ Controllo positivo;
- ✓ Controllo negativo;
- ✓ Tampone di lavaggio;
- ✓ Soluzione di montaggio (Mounting Medium).

10 - STRUMENTAZIONE E VETTERIA

Per lo svolgimento dell'analisi è necessario disporre di:

- ✓ apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- ✓ camera umida;
- ✓ centrifuga refrigerata ($+4^\circ\text{C}$) a rotore basculante per contenitori da 50-500 mL;
- ✓ contalitri;
- ✓ contenitori da centrifuga in polipropilene (PP) o in etilene propilene fluorato (teflon-FEP), da 50 mL con fondo conico;
- ✓ filtro a membrana in acetato di cellulosa con porosità nominale $1,2 \mu\text{m}$, diametro 142 mm;
- ✓ membrane in policarbonato, di porosità $1,2 \mu\text{m}$ e di diametro 25 mm;
- ✓ microscopio a epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. E' necessario disporre del contrasto di fase o, meglio del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- ✓ regolatore di flusso;
- ✓ supporto per filtro a membrana da 142 mm;
- ✓ tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette.

11 - PROCEDURA

11.1 - Campionamento e filtrazione

Il metodo consente di analizzare volumi variabili d'acqua (5-400 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più membrane per filtrare il volume appropriato.

La pompa aspirante è connessa al supporto per il filtro a membrana mediante tubo semirigido e un prefiltro (porosità 100-300 μm) è interposto tra la pompa ed il supporto stesso. Nella filtrazione si consiglia di non superare la pressione di circa 2 bar. Rimuovere la membrana dal supporto mediante pinzette e porla in una provetta da centrifuga da 50 mL. Durante il trasporto mantenere le provette alla temperatura di circa $+4^\circ\text{C}$. Conservare alla stessa temperatura se non si procede subito alla dissoluzione. Si consiglia di trattare il campione entro 24-48 ore dal prelievo.

11.2 - Dissoluzione della membrana

Riempire la provetta con acetone (9.1) fino a portarlo a 50 mL. Agitare mediante vortex per 2-3 min, fino alla completa dissoluzione della membrana.

Centrifugare a $7000 \times g$ per 15 min e attendere che il rotore si fermi senza usare il freno. Scartare il supernatante facendo attenzione a non disturbare il pellet (arrestandosi a 2 cm dal fondo). Riempire nuovamente la provetta con acetone e risospendere il

pellet agitando mediante vortex o eventualmente con l'aiuto di una pipetta. Centrifugare a 7000 x g per 15 min. Eliminare il supernatante come sopra indicato.

11.3 - Lavaggi del pellet

Portare il pellet a 50 mL con etanolo (9.2) e risospenderlo mediante vortex. Centrifugare a 7000 x g per 15 min, aspirare il supernatante e sospendere nuovamente il pellet portandolo a 50 mL con etanolo al 70% (9.3) ed agitando. Centrifugare a 7000 x g per 15 min, scartare il supernatante e risospendere il pellet con la soluzione di lavaggio A (9.8), sempre portandolo a 50 mL. Agitare mediante vortex. Centrifugare a 7000 x g per 15 min, scartare il supernatante e risospendere il pellet in PBS 1x (volume finale del campione circa 1-5 mL). Misurare il volume. Il trattamento può essere sospeso in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di soluzione tamponata di formaldeide al 10% (9.4). Qualora il procedimento di concentrazione avesse portato ad un campione finale di eccessiva torbidità per un'analisi diretta al microscopio a fluorescenza, si procede alla chiarificazione del campione.

11.4 - Chiarificazione per flottazione

Procedere come al punto 5.3.

11.5 - Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Procedere come al punto 5.4.

11.6 - Esame microscopico

Procedere come al punto 5.5.

11.7 - Interpretazione dei risultati

Procedere come al punto 5.6.

12 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Procedere come al punto 6.

13 - RESOCONTO DI PROVA

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

Aldom J.E. and A.H. Chagla (1995): "Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane

filter dissolution method", *Appl. Environ. Microbiol.*, **20**, 186-187.

Graczyk T.K., M.R. Cranfield and R. Fayer (1997): "Recovery of waterborne oocysts of *Cryptosporidium* from water samples by the membrane-filter dissolution method", *Parasitol. Res.*, **83**, 121-125.

Graczyk T.K., R. Fayer, M.R. Cranfield and R.Owens (1997): "*Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane dissolution method retain their infectivity", *J. Parasitol.*, **83** (1), 111-114.

NOTA

DETERMINAZIONE DEL MERCURIO PER MEZZO DI UN SENSORE A CELLULE DI LIEVITO

a cura di L. Campanella e F. Vanni, *Dip. di Chimica - Università "La Sapienza", Roma*

In questo lavoro si è messo a punto un nuovo dispositivo per la determinazione del mercurio in tracce.

E' stato utilizzato un biosensore a cellule di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) immobilizzate, basato sulla misurazione dell'attività respiratoria dei microrganismi e sulla perturbazione della stessa ad opera di un inquinante di natura chimica, nella fattispecie il mercurio. Il trasduttore utilizzato è un elettrodo amperometrico a diffusione gassosa per la determinazione dell'ossigeno (elettrodo di Clark). Sono state sperimentate due diverse modalità operative. La prima prevede la stabilizzazione del biosensore nella soluzione isotonica seguita dall'aggiunta del substrato prescelto (glucosio), dalla diminuzione della concentrazione di ossigeno in soluzione fino al raggiungimento di un terzo stato stazionario. Un opportuno algoritmo permette il calcolo dell'indice di tossicità. Con questa modalità si sono ottenuti risultati soltanto per i valori di concentrazione di mercurio più elevati tra quelli investigati (fino a 1,0 ppm); essa, però, non si è rivelata idonea per i valori di concentrazione minimi (0,05 ppm), previsti dalla normativa europea.

Anche nella seconda modalità operativa il biosensore viene posto a stabilizzare nella soluzione isotonica; raggiunto il plateau, si aggiunge il substrato e si registra una diminuzione dell'ossigeno in soluzione dovuta ad un aumento dell'attività respiratoria. Raggiunto il secondo plateau, dalla differenza dei valori corrispondenti ai due stati stazionari, si può calcolare il consumo totale di ossigeno, ($\Delta\text{ppm O}_2$)_B. Successivamente viene registrata una analoga curva respirometrica in presenza del tossico; in questo caso il consumo totale di ossigeno è definito ($\Delta\text{ppm O}_2$)_C. Viene definito un indice di tossicità percentuale come

$$\text{Ittox}\% = \left\{ \frac{(\Delta\text{ppm O}_2)_B - (\Delta\text{ppm O}_2)_C}{(\Delta\text{ppm O}_2)_B} \right\} \times 100$$

Per questa modalità operativa, sono stati studiati diversi tempi di incubazione delle cellule con il tossico, al fine di ottimizzare la procedura di lavoro. I risultati ottenuti sono stati confrontati sulla base della sensibilità della risposta a varie concentrazioni di mercurio e rispetto alla riproducibilità delle misure. Selezionate le condizioni operative, si è definito un protocollo di misura. La modalità operativa definitiva prevede, nel nostro lavoro, un tempo di incubazione di 5 ore (anche se si può optare per una analisi più breve, con un intervallo di 2 ore, a scapito della precisione della misura), un pretrattamento del campione al fine di isolare il mercurio dagli interferenti, la registrazione di tre curve respirometriche (una in presenza e due in assenza del tossico), il loro confronto ed il calcolo dell'indice di tossicità col l'algoritmo precedentemente definito. La metodica che limita a due ore il tempo di incubazione può essere impiegata quando si deve analizzare un campione di cui sia noto l'intervallo di concentrazione in cui cade la quantità di mercurio eventualmente presente; se tale concentrazione non è in tracce, ma

dell'ordine delle centinaia di ppm, è possibile lavorare con questa metodica.

Per risolvere il problema dell'aspecificità della risposta del biosensore, (caratteristica peculiare peraltro utilissima nel caso dei test di tossicità integrale), si è studiato un trattamento preliminare, al quale sottoporre il campione, per separare il mercurio da altre sostanze tossiche, eventualmente presenti, in una matrice anche reale. L'indice di tossicità, ottenuto con la soluzione trattata, risulta correlabile esclusivamente alla concentrazione di mercurio presente.

Misure effettuate dopo il trattamento attestano buoni margini di riproducibilità, requisito fondamentale per un'analisi.

Considerati i vantaggi offerti in termini di economicità, il metodo è potenzialmente utilizzabile per inquinanti di vario tipo; la verifica dell'effetto di inibizione sull'attività respiratoria e la successiva messa a punto di un appropriato trattamento preliminare, lo renderebbero idoneo, caso per caso, per il tossico considerato.

INFORMAZIONI

L'impiego di kit analitici in attività di controllo e monitoraggio ambientale sta diventando una pratica diffusa, come testimoniano le numerose segnalazioni trasmesse a questo istituto da laboratori di controllo pubblici ed enti di ricerca.

Rimane, tuttavia, in alcuni settori una certa perplessità sull'affidabilità dei risultati offerti da questi dispositivi analitici e sui relativi ambiti di applicazione (livelli di concentrazione, tipo di matrici analizzate). Allo scopo di acquisire le informazioni necessarie a pianificare una sperimentazione finalizzata alla validazione di protocolli analitici basati sull'impiego dei kit è stata predisposta la seguente lettera circolare, che è stata inviata ai Direttori Tecnici delle Agenzie Regionali di Protezione Ambientale.

Egregio Direttore,

la problematica relativa all'utilizzo di kit analitici nelle operazioni di controllo ambientale sta diventando di grande attualità come testimoniano le numerose segnalazioni pervenute a questo istituto, non solo, come è ovvio, dalle ditte che producono e commercializzano questi dispositivi, ma anche dai responsabili di laboratori di controllo pubblici (tra gli altri l'ARPA-Toscana) e da enti di ricerca interessati ad attività di monitoraggio.

L'impiego dei kit, qualora validati, potrebbe costituire un valido strumento sia per limitare la quantità di rifiuti prodotti dall'attività analitica, con conseguente riduzione dei costi connessi al loro smaltimento, sia per minimizzare gli eventuali rischi legati alla manipolazione di sostanze pericolose.

Rimane diffusa, comunque, in alcuni settori una sorta di rifiuto pregiudiziale verso l'impiego di questi sistemi di analisi. Si ritiene a questo punto opportuno, al fine di valutare secondo criteri scientifici le prestazioni offerte, avviare un serio confronto con le procedure tradizionali messe a punto dall'IRSA. A tale scopo si invitano i laboratori in indirizzo a trasmettere a questo istituto informazioni relative al livello di utilizzo dei kit analitici nell'ambito delle attività di controllo attinenti le proprie responsabilità istituzionali. Perché l'informazione possa essere utile dovrà specificare analiti e tipo di matrice (acqua di scarico, superficiale, potabile) più comunemente analizzati e tipo di kit commerciale impiegato.

Le informazioni raccolte serviranno a selezionare i parametri di interesse sui quali concentrare un'attività sperimentale prioritaria avente l'obiettivo di validare i protocolli analitici basati sull'impiego dei kit. La sperimentazione, la cui articolazione verrà precisata in dettaglio non appena le informazioni richieste saranno disponibili, verrà condotta, inizialmente, su campioni preparati all'interno dei singoli laboratori per passare poi all'analisi di materiali certificati inviati ai laboratori che vorranno partecipare all'iniziativa.

Ringraziando vivamente per la collaborazione, si inviano i più cordiali saluti.

Prof. Roberto Passino

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, R. Pagnotta e M. Pettine
 Segreteria di redazione: C. M. Blundo
 Stampato in proprio
 Grafica: P. Fusco
 Disegni: M. Ronda
 Allestimento e stampa: C. Pastore

NOTIZIARIO DEL METODI ANALITICI
Istituto di ricerca sulle acque - CNR

Il presente notiziario ha lo scopo di fornire ai lettori informazioni sulle attività di ricerca e sui risultati ottenuti nell'ambito del progetto "Metodi analitici per la valutazione della qualità delle acque".

Le attività di ricerca sono state svolte in collaborazione con i seguenti istituti e centri di ricerca:

- Istituto di Ricerca sulle Acque (CNR)
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Leucemie, Linfomi e Mieloma
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Fegato
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Rene
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Cuore
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Cancro
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Nervoso
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Circolatorio
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Immunitario
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Endocrino
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Muscolare
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Integumentario
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Sensoriale
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Reproductive
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Geriatrico
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Gerontologico
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Geriatrico e Gerontologico

Le attività di ricerca sono state svolte in collaborazione con i seguenti istituti e centri di ricerca:

- Istituto di Ricerca sulle Acque (CNR)
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Leucemie, Linfomi e Mieloma
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Fegato
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Rene
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Cuore
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Cancro
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Nervoso
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Circolatorio
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Immunitario
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Endocrino
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Muscolare
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Integumentario
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Sensoriale
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Reproductive
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Geriatrico
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Gerontologico
- Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Malattie del Sistema Geriatrico e Gerontologico