

## EDITORIALE

Nell'ambito delle attività di revisione ed aggiornamento delle metodiche analitiche pubblicate dall'IRSA, il Notiziario dei Metodi Analitici propone in questo numero due metodi microbiologici, due metodi chimici in forma di proposta e i risultati di uno studio collaborativo condotto dall'ARPA Veneto riguardante la determinazione di idrocarburi in acque sotterranee mediante spettrofotometria IR.

In particolare, nel settore dei metodi microbiologici, segnaliamo un aggiornamento della scheda, pubblicata nel Quaderno IRSA n. 64 (1983), relativa all'analisi della microfauna negli impianti di trattamento delle acque di scarico. La nuova scheda propone un indice obiettivo ("Sludge Biotic Index", SBI) per la stima della qualità biologica del fango attivo di una vasca di aerazione, il cui calcolo consente di assegnare al fango una determinata classe di qualità con relativo giudizio sull'efficacia depurativa dell'impianto.

Tra i metodi chimici presentati in questo numero, la proposta di un metodo per la determinazione di polibromodifenileteri si inquadra nell'ambito delle attività dell'IRSA connesse all'implementazione della direttiva quadro sulle acque (2000/60/CE). La prossima emanazione di una direttiva europea, che istituisce standard di qualità ambientali per le sostanze prioritarie, pone l'esigenza di una messa a punto, in alcuni casi di uno sviluppo, di protocolli analitici in grado di assicurare con sufficiente confidenza il conseguimento degli standard previsti dalla direttiva, per alcuni contaminanti piuttosto severi (0,5 ng/L per i polibromodifenileteri, PBDE). In queste condizioni, garantire prestazioni accettabili in termini di precisione, accuratezza e limiti di rivelabilità risulta piuttosto complicato, soprattutto in presenza di campioni caratterizzati da elevate concentrazioni di solidi sospesi.

Per le suddette motivazioni il protocollo che qui viene presentato come proposta di metodo prevede la determinazione dei principali congeneri di PBDE sia in fase disciolta che nel particolato sospeso.

I congeneri considerati, da 3-7 atomi di bromo, sono estratti dal campione acquoso mediante SPE (Solid-Phase Extraction) su fase C<sub>18</sub>, mentre il particolato è estratto in Soxhlet con una miscela *n*-esano/acetone; entrambe le fasi sono poi analizzate in GC/MS con spettrometro di massa a trappola ionica previa purificazione su colonna di Florisil.

Roma, novembre 2007

### INDICE

ANALISI DELLA MICROFAUNA NELLA VALUTAZIONE DI EFFICIENZA DEPURATIVA DEI FANGHI ATTIVI	1-9
ENTEROCOCCHI NELLE ACQUE: METODO DI ANALISI E SIGNIFICATO SANITARIO	10-12
DETERMINAZIONE DI AMMINE AROMATICHE IN ACQUE SOTTERRANEE	13-24
STUDIO COLLABORATIVO ARPAVRING_0106: IDROCARBURI IN ACQUA SOTTERRANEA	25-32
DETERMINAZIONE DI POLIBROMODIFENILETERI NELLA FASE ACQUOSA E NEL PARTICOLATO SOSPESO DI ACQUE SUPERFICIALI	32-40

## ANALISI DELLA MICROFAUNA NELLA VALUTAZIONE DI EFFICIENZA DEPURATIVA DEI FANGHI ATTIVI

a cura di Madoni P.

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Parma

### RIASSUNTO

Viene presentato un metodo basato sull'analisi qualitativa e quantitativa della microfauna che colonizza il fango attivo, utilizzato come stima dell'efficienza di depurazione nel reattore biologico. Il metodo, denominato Sludge Biotic Index (SBI), fornisce valutazioni numeriche sulla base di analisi microscopiche tese alla identificazione delle varie unità sistematiche e alla stima della loro densità numerica. L'identificazione del gruppo dominante permette all'operatore di stimare il grado di efficienza e di avere indicazioni sulle cause di eventuali disfunzioni. Lo scrupoloso rispetto delle procedure di analisi al microscopio diventa indispensabile al fine della corretta valutazione dello SBI.

### INTRODUZIONE

L'analisi microscopica del fango attivo è un eccellente mezzo per ottenere indicazioni sulla qualità biologica di depurazione che i controlli convenzionali (osservazioni visive, determinazioni chimiche, test vari) non sempre possono fornire. L'osservazione microscopica del fiocco di fango (forma, dimensioni) e dei suoi costituenti quali i microrganismi filamentosi e la microfauna, è un utile strumento di monitoraggio, diagnosi e gestione del processo depurativo dei liquami, ormai utilizzato, per la sensibilità e l'efficacia dimostrata, nei principali paesi industrializzati. Come è noto, il ruolo della biomassa nel processo a fanghi attivi è duplice: metabolizzare la sostanza organica contenuta nei liquami e costruire dei fiocchi di fango capaci di sedimentare per gravità dall'acqua depurata all'interno del sedimentatore finale. L'efficacia di rimozione della sostanza organica è strettamente correlata alla struttura della microfauna che colonizza il fango (Madoni, 1994a). Il riconoscimento delle varie forme di protozoi che costituiscono la microfauna è di fondamentale importanza al fine della valutazione di "performance" del reattore biologico. Naturalmente, più l'osservazione è precisa e particolareggiata, più le informazioni che si ricavano sono complete e articolate.

Negli impianti di trattamento biologico dei liquami appartenenti alla tipologia del processo a fanghi attivi, l'analisi della microfauna come indicatore di efficienza depurativa è diventata quindi una pratica assai utilizzata tra le analisi di routine. In alcuni casi, la microfauna è stata utilizzata per elaborare valutazioni di performance di specifici impianti (Al-Shahwani e Horan, 1991; Esteban et al., 1991); tuttavia questi metodi non possono essere applicati direttamente ad altri impianti, anche se appartenenti alla stessa tipologia. Altri metodi invece (Drakides, 1978; Madoni, 1981), anche se applicabili a tutti gli impianti sono basati su interpretazioni soggettive e quindi mancano di precisione. Madoni (1994b) ha elaborato un indice obiettivo per la stima della qualità biologica del fango attivo nella vasca di aerazione denominato SBI (Sludge Biotic Index). Il pregio di tale indice è rappresentato dal fatto che esso è applicabile a tutti i tipi di impianti basati sul processo a fanghi attivi e fornisce valutazioni numeriche a cui corrispondono differenti classi di qualità.

### 1 - PRINCIPIO DEL METODO

L'indice biotico del fango (SBI), illustrato in Tab. 1-2, si basa sia sulla struttura che sull'abbondanza della microfauna che colonizza il fango attivo ed è stato messo a punto per il monitoraggio dell'efficienza biologica di depurazione. Questo metodo si basa su due principi:

- la dominanza dei gruppi chiave cambia in relazione alle condizioni operative e ambientali della vasca di aerazione;
- densità numerica e diversità di *taxa* diminuiscono al diminuire dell'efficienza biologica di depurazione.

L'indice biotico del fango consente all'operatore di definire la qualità biologica del fango attraverso valori convenzionali da 0 a 10 (Tab. 1) che sono raggruppati in quattro classi di qualità (Tab. 2). I gruppi che costituiscono la microfauna sono distinti in "positivi" e "negativi" a seconda del tipo di correlazione esistente tra essi e i parametri fisico-chimici e operativi dell'impianto. I gruppi positivi sono i ciliati batteriofagi mobili, i ciliati batteriofagi sessili e le amebe tectate; i gruppi negativi sono i piccoli flagellati, i ciliati batteriofagi natanti e i peritrichi *Vorticella microstoma*, *V. infusorium* e *Opercularia* spp. (Madoni, 1994b). La Tab. 1 a due entrate, inoltre, considera l'abbondanza della microfauna (escluso i piccoli flagellati) e dei piccoli flagellati.

Per la determinazione dello SBI è necessario selezionare l'ingresso orizzontale in tabella scegliendo prima la riga corrispondente al gruppo dominante e poi tenendo in considerazione la densità totale della microfauna ( $< o \geq 10^6 \cdot L^{-1}$ ). In caso di due o più gruppi co-dominanti, la scelta cadrà sul gruppo che occupa la posizione più bassa. L'ingresso verticale in tabella è determinato dal numero totale di unità sistematiche di cui è composta la microfauna e dalla densità numerica dei piccoli flagellati.

### 1.1 - Amebe tecate

Questi protisti sono molto abbondanti o dominanti nei fanghi caratterizzati da basso carico, lunga età ed elevato tenore di ossigeno disciolto nella vasca di aerazione, condizioni che favoriscono la completa nitrificazione (Poole, 1984; Madoni et al., 1993) e il raggiungimento di un'alta efficienza depurativa. Le amebe tecate crescono solo in impianti operanti con lunghe età del fango dato che essi hanno bassi tassi di crescita. Inoltre, quando il carico del fango raggiunge alti valori ( $> 1 \text{ kgBOD/kgMLSS-d}$ ) e il COD nell'effluente finale è elevato, questi protisti sono sostituiti dal peritrico *Opercularia* e dai ciliati batteriofagi natanti (Sasahara e Ogawa, 1983).

### 1.2 - Ciliati batteriofagi mobili e sessili

Questi due gruppi funzionali normalmente co-dominano la comunità dei protisti del fango attivo a seguito della loro differente nicchia ecologica che impedisce la competizione. Infatti, mentre le forme sessili si nutrono di batteri dispersi e di piccoli flagellati filtrando la fase liquida della miscela aerata, le forme mobili si spostano sul fiocco di fango aspirando o raschiando i batteri adagiati sul substrato. Tuttavia, il rapporto di abbondanza tra questi due gruppi tende a modificarsi con il carico del fango. Le forme mobili diminuiscono al crescere del carico del fango sino a ridursi in modo critico a valori superiori a  $0,6 \text{ kgBOD/kgMLSS-d}$  (Curds e Cockburn, 1970). Una eccessiva presenza di forme batteriofaghe sessili ( $> 80\%$  dell'intera microfauna), osservabile in condizioni transitorie, si accompagna ad una ridotta performance del reattore biologico (Drakides, 1978; Madoni e Antonietti, 1984). Tali condizioni transitorie sono: il discontinuo input di carico organico dall'influente e il repentino incremento del carico del fango a seguito di perdite e/o estrazioni di fango.

I ciliati sessili sono in grado di crescere sotto un ampio spettro di condizioni di carico del fango, tuttavia è tra  $0,3-0,6 \text{ kgBOD/kgMLSS-d}$  che si osserva la loro dominanza, mentre a valori più elevati ( $0,6-0,9 \text{ kgBOD/kgMLSS-d}$ ) essi co-dominano con i piccoli flagellati (Curds e Cockburn, 1970).

### 1.3 - *Opercularia* spp.

Questi ciliati peritrichi sessili sono spesso presenti a basse densità numeriche nei fanghi attivi, tuttavia la loro abbondanza aumenta quando l'impianto produce effluenti di scarsa qualità con alti valori di BOD e azoto ammoniacale (Poole, 1984; Madoni et al., 1993). *Opercularia* può sopravvivere in ambienti stressati meglio di altre forme sessili; infatti, la dominanza di questi ciliati è stata riscontrata in impianti riceventi liquami industriali contenenti sostanze tossiche (Aeschl e Foissner, 1992; Becares et al., 1994), sali metallici (Antonietti et al., 1982; Madoni et al., 1996).

### 1.4 - *Vorticella microstoma* e *V. infusioformis*

Queste due specie di peritrichi sessili sono molto simili sia dal punto di vista morfologico che ecologico e sono comunemente presenti nella vasca di aerazione durante le prime fasi di avviamento dell'impianto. Esse sono poi sostituite da altri ciliati sessili che si dimostrano più competitivi nel filtrare i batteri dispersi nella fase liquida. Tuttavia, in occasione di drastiche e prolungate riduzioni nei valori di ossigeno disciolto nella vasca di aerazione, è possibile riscontrare all'osservazione microscopica la presenza dominante di *V. microstoma* o *V. infusioformis*, a causa dell'elevata tolleranza di queste specie alla carenza di ossigeno (Madoni e Antonietti, 1984).

### 1.5 - Ciliati batteriofagi natanti

I ciliati batteriofagi natanti insieme ai piccoli flagellati sono le prime forme della microfauna a colonizzare la vasca di aerazione durante le fasi di avviamento. Essi sono poi rimpiazzati dalle forme batteriofaghe sessili a seguito della competizione per i batteri dispersi nella miscela aerata. Le forme sessili, infatti, sono filtratori assai più efficienti delle forme natanti e con il formarsi dei fiocchi di fango, indispensabili substrati su cui far aderire i loro peduncoli, incrementano le loro popolazioni sino ad escludere completamente le forme natanti.

In impianti funzionanti a regime, la presenza dominante delle forme batteriofaghe natanti si riscontra in condizioni di fanghi con età troppo breve e/o con alto carico del fango (0,6-0,9 kgBOD/kgMLSS-d) e carenza di ossigenazione (Martin-Cereceda et al., 1966). Questi ciliati, infatti, necessitano di alte concentrazioni di batteri dispersi ma possono sopravvivere meglio di altri protisti in presenza di sostanze tossiche provenienti dal liquame o in condizioni di inadeguata aerazione del fango attivo.

### 1.6 - Piccoli flagellati

Questi piccoli protisti eterotrofici entrano in continuo attraverso il liquame da depurare che ne contiene in alte concentrazioni. I flagellati si nutrono di batteri dispersi e a loro volta sono sostituiti dai ciliati batteriofagi. Nei fanghi attivi a regime, infatti, questi protisti subiscono la competizione da parte dei ciliati batteriofagi, molti dei quali sono anche loro predatori. Queste pressioni biotiche limitano la presenza dei piccoli flagellati a pochi individui. Al contrario, la presenza di grandi quantità di questi protisti in un sistema a fanghi attivi a regime è associata ad una scarsa efficienza depurativa nella vasca di aerazione, causata da determinate condizioni ambientali o operative quali la scarsa ossigenazione, il sovraccarico organico e l'ingresso di sostanze in fermentazione (Drakides, 1978; Madoni, 1986). In tali casi l'effluente finale conterrà alte concentrazioni di BOD e sarà torbido a causa dell'alta densità di piccoli flagellati in sospensione. I piccoli flagellati diventano le forme dominanti in occasione di fanghi altamente caricati ( $> 0,9$  kgBOD/kgMLSS-d) (Curds e Cockburn, 1970; Aeschl e Foissner, 1992). Flagellati di dimensioni superiori a 20-25  $\mu\text{m}$ , appartenenti ai generi *Euglena* e *Peranema*, possono colonizzare il fango attivo. Questi grandi flagellati, infrequenti e quasi mai abbondanti, sono associati a fanghi attivi ricevuti liquami con carico organico diluito (Klimowicz, 1970; Salvadò e Gracia, 1993).

### 1.7 - Densità e diversità della microfauna

Il numero di elementi della microfauna che colonizzano un normale fango attivo a regime è dell'ordine di  $10^6 \cdot \text{L}^{-1}$ , e quando la densità scende sotto  $10^5 \cdot \text{L}^{-1}$  essa indica una insufficiente depurazione (Drakides, 1980). In questo caso i batteri dispersi proliferano e rendono torbido l'effluente finale con conseguente innalzamento del BOD in uscita.

Al contrario, alte densità della microfauna ( $\geq 10^7 \cdot \text{L}^{-1}$ ) indicano una buona purificazione e un'ottima performance biologica dell'impianto. La densità della microfauna diminuisce con il decrescere del carico del fango. Nella vasca di aerazione di impianti che operano la nitrificazione, è attesa una microfauna meno abbondante rispetto ai fanghi attivi convenzionali. La microfauna di un fango attivo a regime è anche ben diversificata, composta da un alto numero di specie ( $> 10$ ); in questo caso nessuna specie è numericamente dominante sulle altre oltre ad un fattore 10. Una microfauna dominata da una specie è indice di scompensi trofici dovuti all'esistenza di fattori limitanti che impediscono lo sviluppo delle altre specie favorendo le forme più tolleranti a quei fattori.

Il numero e la diversità della microfauna cambia secondo la qualità del liquame da depurare e le condizioni operative dell'impianto (Esteban et al., 1991; Esteban e Tellez, 1992). La ricchezza in specie tende a cambiare normalmente con il carico del fango. Il più alto numero di specie è stato osservato a carichi del fango compresi tra 0,2 e 0,3 kgBOD/kgMLSS-d (Curds e Cockburn, 1970).

## 2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo è in grado di stimare la efficienza biologica di depurazione all'interno della vasca di aerazione degli impianti di trattamento ascrivibili al processo a fanghi attivi (contatto stabilizzazione, convenzionale, aerazione prolungata). La microfauna utilizzata per la determinazione dello SBI ha una distribuzione cosmopolita; è ragionevole asserire, quindi, che l'indice è applicabile ai fanghi attivi di tutti i continenti.

## 3 - CAMPIONAMENTO E TRASPORTO DEL CAMPIONE

La raccolta della miscela aerata va effettuata esclusivamente all'interno della vasca di aerazione il più lontano possibile da turbine e dalle pareti della vasca. Il campionatore deve essere immerso sufficientemente in profondità in modo da evitare la raccolta di eventuali schiume. L'analisi microscopica della microfauna non richiede grandi volumi di miscela aerata; è sufficiente, quindi, versare dal recipiente campionatore un modesto quantitativo (250-500 ml) di fango attivo in un contenitore di plastica da 1 litro. Prima di effettuare il travaso è necessario omogeneizzare (mescolando) la miscela aerata contenuta nel campionatore al fine di evitare la decantazione del fango che influirebbe negativamente sulla rappresentatività del campione.

Normalmente, l'ossigeno disciolto nella miscela aerata viene completamente utilizzato per le attività metaboliche dei microrganismi in un breve arco di tempo (20-30 minuti). Dopo tale periodo possono manifestarsi profonde alterazioni nella comunità microbica.

L'aria contenuta nella bottiglia da 1 litro, lasciata semivuota dall'esiguo campione, è più che sufficiente (se il tragitto tra impianto e laboratorio è breve) ad evitare che durante il trasporto si verifichino situazioni di anossia del fango. In caso di percorsi più lunghi è necessario tenere aerato il campione durante il trasporto utilizzando un insufflatore d'aria con setto poroso alimentato da una batteria. In quest'ultimo caso bisogna assicurarsi che l'aria insufflata in eccesso possa liberamente fuoriuscire attraverso l'imboccatura della bottiglia.

#### 4 - PROCEDIMENTO

La determinazione del valore dell'indice biotico del fango e della rispettiva classe di qualità, passa attraverso due fasi. La prima fase del metodo consiste nell'analisi della microfauna al microscopio ottico al fine di ottenere le seguenti informazioni:

- Gruppo funzionale dominante o prevalente
- Densità totale della microfauna
- Numero di taxa della microfauna
- Numero di piccoli flagellati

Le procedure da seguire per l'ottenimento delle informazioni richieste sono indicate nel successivo paragrafo 4.1.

La seconda fase del metodo richiede l'utilizzo della tabella 1.

##### 4.1 – Analisi qualitativa: identificazione della microfauna

L'identificazione dei vari taxa che compongono la microfauna e il loro successivo conteggio richiedono un sollecito esame del campione al microscopio. Queste due analisi devono essere completate nel più breve tempo possibile, comunque entro 5 ore dal prelievo per ridurre al minimo certi inconvenienti come l'alta mortalità di alcune specie o il forte incremento numerico di altre. E' indispensabile, comunque, ricreare le condizioni ambientali del campione raccolto mantenendolo ossigenato e mescolato per tutta la durata delle analisi mediante l'impiego di un aeratore a setto poroso.

Sebbene molti organismi possano più o meno frequentemente essere osservati nei fanghi attivi, alcune forme quali le amebe nude e gli organismi di *drift* (alghe, crostacei, insetti) non sono considerati in questo metodo. Gli organismi da includere nella microfauna sono:

piccoli flagellati  
grandi flagellati  
ciliati  
amebe con teca  
rotiferi  
nematodi  
gastrotrichi  
tardigradi  
oligocheti

Tutte le specie di protozoi ciliati e di amebe tecate contribuiscono alla determinazione della diversità della microfauna (ingresso verticale in Tab. 1). Per quanto riguarda gli altri gruppi, non è richiesta l'identificazione a livello di genere o specie e ciascuno di essi contribuisce con una sola unità sistematica.

Per quanto riguarda i gruppi dominanti o prevalenti (ingresso orizzontale in Tab. 1), deve essere sottolineato che solo i ciliati batteriofagi contribuiscono a formare i tre gruppi funzionali (natanti, mobili, sessili). Le specie di ciliati carnivori od onnivori contribuiscono solamente alla densità e diversità totale della microfauna a prescindere dal loro tipo di movimento. L'identificazione delle varie specie di protisti è quindi molto importante al fine di ottenere un accurato valore di SBI; a questo proposito è opportuno riferirsi a specifiche monografie per la classificazione della microfauna dei fanghi attivi (Foissner e Berger, 1996; Madoni, 2005).

Per predisporre la lista delle specie presenti nel fango in osservazione attenersi alla seguente procedura:

- versare una piccola goccia (100-200  $\mu$ L) di miscela aerata sul vetrino portaoggetti utilizzando una pipetta pasteur; coprire con un vetrino coprioggetto delle dimensioni 24x24 mm o 24x32 mm;
- osservare al microscopio ottico in campo chiaro a 100x (usare ingrandimenti superiori solo per evidenziare particolari utili all'identificazione) sino ad esplorare gradualmente tutta l'area coperta dal vetrino coprioggetto; ripetere l'osservazione con un nuovo vetrino.

Solo in casi di fanghi scarsamente colonizzati (ad esempio, impianti operanti a bassi carichi del fango e lunghe età del fango) è opportuno esplorare un terzo vetrino al fine di predisporre la lista delle specie presenti;

- inserire nella lista solo le specie di cui si sono osservati almeno 2 individui nello stesso vetrino oppure 1 individuo in ciascuno dei due vetrini analizzati. Le amebe con teca presenti nel vetrino devono essere chiaramente vive (presenza della cellula all'interno della teca). Le teche vuote non devono essere considerate né per la compilazione della lista, né per il successivo conteggio.

#### 4.2 - Quantificazione della microfauna

Due tipi di conteggi si rendono necessari:

- 1) la stima di densità della microfauna (escluso i piccoli flagellati)
- 2) la stima di abbondanza dei piccoli flagellati.

Il primo tipo di conteggio è necessario per stabilire sia la classe di abbondanza della microfauna ( $<$  oppure  $\geq 10^6 \cdot L^{-1}$ ) sia l'abbondanza relativa (%) tra gruppi e specie. Dato che la dimensione del subcampione da analizzare riveste notevole importanza ai fini di una stima attendibile, ci si è avvalsi di studi effettuati in questa direzione (Madoni, 1984) per definire il volume da analizzare e il numero di repliche richiesto in rapporto alla densità di popolazione e al grado di precisione richiesto.

Per una stima accurata della microfauna del fango attivo, essendo elevata la sua densità di popolazione in questo ambiente, è sufficiente effettuare 2 analisi su volumi di 25  $\mu L$  ciascuno. La procedura è la seguente:

- si prelevano 25  $\mu L$  di miscela aerata mediante una micropipetta automatica a pistone (a volume variabile da 0 a 25  $\mu L$  oppure da 0 a 50  $\mu L$ ) e, dopo aver posto il campione sul vetrino portaoggetto, si ricopre con coprioggetto della dimensione di 18x18 mm (la dimensione del vetrino coprioggetto riveste la massima importanza ai fini di una corretta stima; l'impiego di vetrini più larghi, infatti, determina una distribuzione del campione più laminare favorendo una più rapida evaporazione del liquido);

- dopo aver collocato il vetrino sulla piattaforma del microscopio lo si ispeziona interamente a piccolo ingrandimento (100x) contando e segnando su di un foglio gli individui delle varie specie (precedentemente identificate) che si presentano via, via all'osservazione. Il vetrino deve essere analizzato a fasce verticali partendo da una estremità sino a giungere a quella opposta; questo al fine di evitare di passare più volte nello stesso punto e di commettere, quindi, errori di stima. È necessario prestare attenzione affinché non venga esclusa dall'osservazione l'eventuale frazione di liquido che fuoriesce dal vetrino coprioggetto;
- si effettua la replica del conteggio utilizzando un nuovo vetrino. Ad analisi ultimata i dati ottenuti per ciascuna specie e gruppo vengono espressi sia in n° individui/mL e/o n° individui/litro di fango attivo, sia in rapporto percentuale sull'intera microfauna;
- quando si osservano specie coloniali (*Carchesium*, *Epistylis*, *Opercularia*, *Vaginicola*, *Zoothamnium*) tutti gli individui della colonia devono essere contati;
- le forme natanti o mobili che entrano nel campo visivo dalla parte del vetrino già ispezionata non devono essere contate;
- se in uno dei due vetrini si è verificata la presenza di una colonia particolarmente numerosa tale da creare evidenti differenze nei rapporti di densità, è necessario effettuare 2 conteggi supplementari da 25  $\mu L$  ciascuno della specie coloniale in questione. La sua stima di densità sarà data dalla media dei quattro conteggi effettuati;
- può succedere che di una specie osservata nei vetrini dedicati alla identificazione, nessun individuo sia rinvenuto durante il conteggio. E' comunque necessario considerare sia la sua presenza che la sua scarsa densità di popolazione. In questo caso si assegnerà alla specie un valore convenzionale di densità pari a 1 individuo per ogni ml di fango (1.000 individui in un litro). Al contrario, se una specie non elencata nella lista viene rinvenuta durante il conteggio, essa deve essere aggiunta alla lista e la sua densità sarà quella risultante dal conteggio.

La stima di densità dei piccoli flagellati richiede una tecnica di conteggio appropriata sia per la loro ridotta dimensione sia per la loro alta densità che spesso raggiunge  $10^7 - 10^8$  ind.  $L^{-1}$ .

A questo scopo la camera di Fuchs-Rosenthal da 3,2  $\mu L$  si è dimostrata particolarmente adatta. Questa camera ha due reticoli di dimensioni 4x4x0,2 mm ciascuno suddivisi in 256 quadrati di 250  $\mu m$  di lato. Devono essere contati i piccoli flagellati che si trovano all'interno dei 16 quadrati disposti su di una delle due diagonali del reticolo. Quando i piccoli flagellati contati lungo la diagonale del reticolo sono meno di 10, la loro presenza nel fango attivo è molto modesta e quindi trascurabile ( $< 50.000$  per mL); quando il loro numero nella diagonale è superiore a 100, essi devono essere considerati come gruppo dominante (densità di  $5 \cdot 10^8 L^{-1}$ ). La procedura è la seguente:

- Porre due gocce di miscela aerata su uno dei due reticoli della camera di Fuchs-Rosenthal e coprire con un normale vetrino coprioggetto di dimensioni 24x32 mm. Non esercitare nessuna pressione sul vetrino coprioggetto; l'eccesso di liquido scende autonomamente nelle canalette laterali di scolo.
- Porre la camera al microscopio ottico (a 100-200x in campo chiaro) ed esaminare i quadrati posti sulla diagonale partendo da un estremo per giungere all'altro.
- Ripetere l'operazione analizzando una delle due diagonali del secondo reticolo. Il numero di piccoli flagellati presenti nella diagonale sarà dato dalla media dei due conteggi.
- I flagellati posizionati sulla linea di demarcazione del quadrato in esame devono essere contati.

## 5 - RISULTATI

L'ingresso orizzontale in Tab. 1 sarà dato dal gruppo dominante o prevalente risultante dall'analisi microscopica (in caso di co-dominanza, la scelta deve cadere sul gruppo che occupa la posizione più bassa) e successivamente dalla densità della microfauna ( $\geq$  oppure  $< 10^6$  ind. $\cdot L^{-1}$ ).

L'ingresso verticale in tabella è dato dal numero di unità sistematiche di cui è costituita la microfauna e poi dal numero di piccoli flagellati  $F$  contati nella diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal ( $F < 10$  oppure  $10 < F \leq 100$ ). Va sottolineato che solo quando i piccoli flagellati risultano superiori a 100, essi diventano il gruppo dominante. In tal caso, essi determinano l'ingresso orizzontale in tabella (ultima riga in basso). Il punto di intersezione tra la riga e la colonna selezionate determinano il valore di SBI corrispondente al fango attivo analizzato.

### 5.1 – Giudizio di qualità

Il valore di SBI ricavato dalla tabella 1 permette di risalire alla classe di qualità del fango attivo, attraverso l'utilizzo della tabella 2. In questa tabella i valori di SBI sono stati raggruppati all'interno di quattro classi di qualità marcate da numeri romani. Tali classi permettono di rappresentare la qualità biologica del fango attivo attraverso quattro ordini di giudizi piuttosto ampi e quindi di valore diagnostico affidabile.

## 6 – VERIFICA DEL METODO

La stretta applicabilità del metodo è stata verificata attraverso l'analisi di oltre 300 fanghi attivi.

In ciascun campione sono stati analizzati, oltre alla microfauna, i principali parametri fisici, chimici e operativi come: rimozione del  $BOD_5$ , O.D., rimozione dell'azoto, MLSS, nitrificazione, tempo di contatto del liquame, età del fango, etc.. Tutti i test condotti hanno dato valutazioni corrette sull'efficienza biologica di depurazione.

La tabella a due entrate mostra 88 differenti situazioni potenzialmente osservabili, e questi eventi cadono all'interno delle quattro classi di qualità nella proporzione di 9, 18, 24 e 37, rispettivamente. I test effettuati, ovviamente, non sono stati in grado di verificare tutte le situazioni; tuttavia, dato che è stata verificata l'affidabilità del metodo ai valori estremi di ciascuna classe di qualità, sembra ragionevole attendersi la piena affidabilità del metodo anche ai valori intermedi di SBI.

Tab. 1 - Tabella a due entrate per il calcolo dell'indice biotico del fango SBI

Gruppi funzionali e densità della microfauna che determinano l'ingresso orizzontale in tabella		Numero totale di specie della microfauna (esclusi i piccoli flagellati) e densità dei piccoli flagellati (F) contati nella diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal (A= F<10; B= 10< F < 100)							
GRUPPO DOMINANTE O PREVALENTE	Densità (ind./L)	> 10		8 - 10		5 - 7		< 5	
		A	B	A	B	A	B	A	B
CILIATI MOBILI + SESSILI* e/o AMEBE CON TECA	$\geq 10^6$	10	8	9	7	8	6	7	5
	$< 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
CILIATI SESSILI* > 80%	$\geq 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
	$< 10^6$	8	6	7	5	6	4	5	3
<i>Opercularia</i> spp.	$\geq 10^6$	7	5	6	4	5	3	4	2
	$< 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1
<i>Vorticella microstoma</i> e/o <i>V. infusionum</i>	$\geq 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1
	$< 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
CILIATI NATANTI	$\geq 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
	$< 10^6$	4	2	3	1	2	0	1	0
PICCOLI FLAGELLATI (>100) †	$\geq 10^6$	4		3		2		1	
	$< 10^6$	3		2		1		0	

\* *Opercularia* e *V. microstoma* non prevalenti; † numero di flagellati nella diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal

Tab.2 - Conversione dei valori di SBI in classi di qualità del fango con relativo giudizio.

Valore SBI	Classe	Giudizio
8-10	I	Fango ben colonizzato e stabile, ottima attività biologica; alta efficienza depurativa.
6-7	II	Fango ben colonizzato e stabile, attività biologica sub-ottimale; discreta efficienza depurativa.
4-5	III	Insufficiente depurazione biologica dell' impianto; mediocre efficienza depurativa.
0-3	IV	Cattiva depurazione biologica dell'impianto; bassa efficienza depurativa

**BIBLIOGRAFIA**

- AESCHT E., FOISSNER W. (1992): "Biology of a high-rate activated sludge plant of a pharmaceutical company", *Arch. Hydrobiol./suppl.*, **90**, 207-251.
- AL-SHAHWANI S., HORAN N.J. (1991): "The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants", *Wat. Res.*, **25**, 633-638.
- ANTONIETTI R., BROGLIO P., MADONI P. (1982): "Valutazione di parametri biologici come indici di efficienza di depurazione in impianti a fanghi attivi", *Ingegneria Ambientale*, **11**, 472-477.
- BECARES E., ROMO S., VEGA A. (1994): "Organic pollutants and microfauna in an industrial wastewater treatment system", *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **25**, 2051-2054.
- CURDS C.R., COCKBURN A. (1970): "Protozoa in biological sewage treatment processes. II. Protozoa as indicators in the activated sludge process", *Wat. Res.*, **4**, 237-249.
- DRAKIDES C. (1978): "L'observation microscopique des boues activées appliquée à la surveillance des installations d'épuration: Technique d'étude et interpretation", *T.S.M.-L'Eau*, **73**, 85-98.
- DRAKIDES C. (1980): "La microfaune des boues activées. Etude d'une méthode d'observation et application au suivi d'un pilote en phase de demurrage", *Wat. Res.*, **14**, 1199-1207.
- ESTEBAN G., TELLEZ C., BAUTISTA L.M. (1991): "Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process", *Wat. Res.*, **25**, 967-972.
- ESTEBAN G., TELLEZ C. (1992): "The influence of detergents on the development of ciliate communities in activated sludge", *Water Air Soil Pollut.*, **61**, 185-190.
- FOISSNER W., BERGER H. (1996): "A user-friendly guide to the ciliates (protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology", *Freshwat. Biol.*, **35**, 375-482.
- KLIMOWICZ H. (1970): "Microfauna of activated sludge. Part I. Assemblage of microfauna in laboratory modes of activated sludge", *Acta Hydrobiol.*, **12**, 357-376.
- MADONI P. (1981): "I protozoi ciliati degli impianti biologici di depurazione", CNR, AQ/1/167, Roma, pp. 1-134.
- MADONI P. (1986): "Protozoa in waste treatment systems". In: F. Megusar e M. Gantar (eds.) *Perspectives in Microbial Ecology*, Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, pp. 86-90.
- MADONI P. (1994a): *La microfauna nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi*. Università di Parma, AGAC Reggio Emilia, pp. 1-48.
- MADONI P. (1994b): "A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge based on the microfauna analysis", *Wat. Res.*, **28**, 67-75.
- MADONI P. (2005): "La microfauna del fango attivo". In: P. Madoni (ed.), *Depurazione Biologica nei Fanghi Attivi*, Enia, Reggio Emilia, Università di Parma, pp. 235-288.
- MADONI P., ANTONIETTI R. (1984): "Colonization dynamics of ciliated protozoa populations in an activated sludge plant", *Atti IV Simposio di Dinamica di Popolazioni*, Parma, pp. 105-112.
- MADONI P., DAVOLI D., CHERICI E. (1993): "Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works", *Wat. Res.*, **27**, 1485-1491.
- MADONI P., DAVOLI D., GORBI G., VESCOVI L. (1996): "Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community", *Wat. Res.*, **30**, 135-141.
- MARTIN-CERECEDA M., SERRANO S., GUINEA A. (1996): "A comparative study of ciliated protozoa communities in activated-sludge plants", *FEMS Microbiol. Ecol.*, **21**, 267-276.
- POOLE J.E. (1984): "A study of the relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works", *Wat. Res.*, **18**, 281-287.
- SALVADÒ H., GRACIA M.P. (1993): "Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis", *Wat. Res.*, **27**, 891-895.
- SASAHARA T., OGAWA T. (1983): "Treatment of brewery effluent. Part VIII: Protozoa and metazoa found in the activated sludge process for brewery effluent", *Monatsschrift Brauwissenschaft*, **11**, 443-448.

## ENTEROCOCCHI NELLE ACQUE: METODO DI ANALISI E SIGNIFICATO SANITARIO

a cura di Bonadonna L.\* e Cataldo C.\*

\*Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### RIASSUNTO

Gli enterococchi sono un gruppo di microrganismi considerati validi indicatori di contaminazione fecale nelle acque. La tassonomia del gruppo è stata riorganizzata negli anni più recenti. Anche in relazione a ciò, sono stati proposti nuovi metodi di rilevamento a risposta più rapida. Viene di seguito presentato un metodo innovativo rapido, utile alla loro determinazione in vari tipi di acqua.

### SUMMARY

Enterococci are valuable indicators of faecal pollution in natural aquatic ecosystems. The taxonomy of the group has been subjected to extensive revision in recent years. New and more rapid methods are now available. A multi-well assay is proposed for their determination in water.

## 1 - INTRODUZIONE

### 1.1 - Generalità

I batteri appartenenti al genere *Enterococcus* sono cocchi Gram positivi, catalasi negativi, anaerobi facoltativi (preferiscono condizioni di microaerofilia). In coltura, raramente si presentano isolati, più frequentemente appaiono disposti a catena. Gli enterococchi sono stati originariamente classificati come cocchi enterici Gram positivi. Nel 1930, a seguito della classificazione sierologica di Lancefield (Lancefield, 1933) sono stati classificati come streptococchi di gruppo D e, con l'ultima revisione tassonomica, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridizzazione del DNA, sono stati raggruppati nel genere *Enterococcus* (Leclerc *et al.*, 1996). Il genere comprende le specie *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii* (primo gruppo); *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* e *E. malodoratus* (secondo gruppo); *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (terzo gruppo); *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. colombae* e *E. saccharolyticus*, che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo.

Per appartenere al genere, le varie specie devono soddisfare determinati requisiti che si riassumono essenzialmente nella capacità di crescere in terreni addizionati di sali biliari o con il 6,5% di NaCl, a pH 9,6, a 10°C ÷ 45°C, di idrolizzare l'esculina e scinderla in esculetina e glucosio e di tollerare l'esposizione a 60°C per 30 minuti. Le diverse specie si caratterizzano anche per la capacità di idrolizzare il substrato 4-metilumbelliferil-β-D-glucoside (sinonimo: 4-metilumbelliferil-β-D-glucopiranoside) (MUD) in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro grazie alla presenza dell'enzima β-D-glucosidasi, rilasciando il prodotto fluorogeno 4-metilumbelliferone. Inoltre, carattere peculiare è la composizione dell'antigene di Lancefield di gruppo D, costituito da acidi teicoici, nonché l'esteso spettro di resistenza ai farmaci antibatterici.

Habitat naturale degli enterococchi è il tratto intestinale degli animali a sangue caldo e dell'uomo; la loro concentrazione nelle feci è pari a 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/g. I microrganismi sono comunque anche ampiamente rappresentati nell'ambiente. In acque marine e salmastre e nel caso di acque sottoposte a trattamento di disinfezione con cloro dimostrerebbero una resistenza simile a quella degli enterovirus.

Il gruppo è storicamente considerato efficace indicatore di contaminazione fecale per gli ecosistemi acquatici. Se in passato, le specie erano considerate non patogene, negli ultimi decenni, soprattutto alcune di esse, sono state individuate come patogeni opportuniste, assumendo anche il ruolo di patogeni emergenti nelle infezioni nosocomiali. La loro virulenza è generalmente bassa. Tuttavia, risultano responsabili dell'8%-12% delle infezioni in ambienti ospedalieri. Agenti eziologici di infezioni del tratto urinario, soprattutto in pazienti portatori di catetere, batteriemie, endocarditi e meningiti, sono dotati di un ampio spettro di resistenza agli antibiotici. In particolare, tra i ceppi isolati in strutture ospedaliere, risulta elevata la resistenza alla Vancomicina (*E. faecium* 19%, *E. faecalis* 2%), anche se, in alta percentuale, presentano caratteristiche di multiresistenza (Boccia *et al.*, 2002).

L'identificazione degli enterococchi si basa sulle proprietà strutturali e fisiologiche delle diverse specie. La maggior parte delle procedure analitiche tradizionali prevede l'uso di terreni "presuntivi", seguito, per la conferma, da isolamento ed esami biochimici e, in alcuni casi, sierologici. La verifica dell'idrolisi dell'esculina, il test più comunemente usato per la conferma biochimica dell'appartenenza al gruppo, se ancora utile per distinguere gli organismi che possiedono l'antigene D dagli altri appartenenti allo stesso genere, fornisce comunque

reazione positiva anche per *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*.

Da diversi anni sono stati messi a punto e vengono proposti sistemi di rilevazione ed identificazione più rapidi, sensibili e specifici dei metodi convenzionali. In questo caso, l'uso di specifici substrati, tramite l'idrolisi enzimatica di sostanze cromofore o fluorofore, permette di selezionare i microrganismi ricercati senza necessità di svolgere ulteriori prove per la conferma dell'appartenenza al genere o alla specie. Questo comporta una maggiore rapidità nella risposta delle analisi e aggiunge alla rapidità, la semplicità di applicazione non comportando modifiche sostanziali alle normali pratiche di routine.

## 1.2 - Obiettivo

Il metodo consente di determinare, in 100 ml di acqua, la concentrazione di microrganismi appartenenti al genere *Enterococcus*.

## 1.3 - Principio del metodo

Il metodo è basato sulla tecnologia Defined Substrate Technology (DST™) e permette di rilevare i microrganismi a 41°C in 100 ml di acqua. È disponibile come tecnica di presenza/assenza o miniaturizzata MPN (Most Probable Number) a multi-pozzetto; in questa formula è commercializzata a 51 (Quanti-Tray™) o a 97 pozzetti (Quanti-Tray™/2000). I due sistemi semi-quantitativi assicurano un range di calcolo fino ad oltre 200 o 2000 MPN/100 ml, rispettivamente, con un limite di confidenza superiore al 95%. Il limite di rilevamento è di 1 organismo/100 ml di acqua.

Di seguito viene descritta la tecnica semi-quantitativa. Il risultato può essere ricavato dall'apposita tabella già predisposta. Dopo un periodo di incubazione di 24 ore a 41±1°C si procede alla lettura dei risultati. La presenza di enterococchi viene evidenziata dalla fluorescenza, visibile sotto la lampada di Wood, che appare nei pozzetti e dovuta al composto formato per idrolisi, catalizzata dall'enzima  $\beta$ -D-glucosidasi, del substrato 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucoside. Il sistema è stato approvato dall'US EPA come metodo di rilevamento degli enterococchi in acque dolci, marine, estuariali, di piscina, per acquacoltura, ad uso irriguo, industriale e destinate al consumo umano (Budnick *et al.*, 1996). È anche inserito tra i metodi proposti nel Ground Water Rule dell'EPA ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)).

## 1.4 - Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago, acque di scarico, nonché per l'analisi di acque anche disinfettate e contenenti enterococchi danneggiati.

## 2 - TECNICA DELL'MPN A MULTIPOZZETTO

### 2.1 - Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare è pari 100 mL, sia che si tratti del campione tal quale, sia che si tratti di una sua diluizione, quest'ultima da determinare comunque in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

## 3 - STRUMENTAZIONE E VETRERIA

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- Buste a multi-pozzetto Quanti-Tray™ da 51 o 97 pozzetti
- Flaconi da 100 mL di plastica con anti-schiuma
- Lampada di Wood per l'osservazione a 365 nm
- Termosigillatrice automatica Quanti-Tray™ Sealer

## 4 - TERRENO DI COLTURA

### 4.1 - Enterolert E™

#### Composizione

HEPES - Acido libero	4,480 g
HEPES - Sale di sodio	8,121 g
Bicarbonato di sodio	2,000 g
Fosfato di potassio, monobasico	1,000 g
Peptone	1,500 g
Yeast Medium	7,750 g
4-Metilumbelliferil-beta-D-glucoside	0,100 g
Riboflavina	0,002 g
Magnesio solfato, eptaidrato	0,500 g
Miscela selettiva®	0,020 g

Il terreno disidratato è distribuito in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di 100 mL di una sua diluizione. Il terreno, prodotto sotto forma granulare, si mantiene 24 mesi dalla data di produzione. Conservare le fiale a temperatura ambiente, lontano dalla luce.

Nell'esecuzione dell'analisi seguire le istruzioni della ditta produttrice e attenersi alle comuni norme di sicurezza previste per i laboratori di microbiologia. Il prodotto è certificato come non tossico.

## 5 - PROCEDURA

Aggiungere 100 mL del campione da analizzare al terreno disidratato (4.1) fornito dalla ditta produttrice. Miscelare con cura e, dopo che la polvere si è completamente sciolta, attendere qualche minuto. Versare la soluzione così ottenuta in una busta a multi-pozzetto Quanti-Tray™ o Quanti-Tray™/2000. Sigillare la busta inserendola nella termosigillatrice automatica Quanti -Tray™ Sealer. La busta viene sigillata in 15 secondi. Incubare a  $41\pm 1^\circ\text{C}$  per 24 ore. Non sono richieste prove di conferma.

### 5.1 - Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione, contare il numero di pozzetti che risultano azzurro-fluorescenti quando esposti alla lampada di Wood e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa tabella fornita con il kit di analisi.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *E. faecium* ATCC 35667 e come controllo negativo *Serratia marcescens* (gram-) ATCC 43862 o *Aerococcus viridans* (gram+) ATCC 10400; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

## 6 - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Riportare il risultato ottenuto come MPN/100 mL; considerare l'eventuale diluizione qualora il campione non sia stato analizzato tal quale. Nell'evenienza in cui non risultino pozzetti positivi (risultato ottenuto in base alla tabella:  $<1/100$  mL), l'analisi va considerata statisticamente equivalente ad un test di P/A (Presenza/Assenza). In questo caso riportare quindi il risultato come 0/100 mL. È anche da considerare che, qualora si ottenga un valore non intero, si ritiene comunque indispensabile approssimare all'unità il risultato, per difetto quando il valore della parte decimale sia uguale a 0,5, altrimenti per eccesso.

## 7 - PRESTAZIONI DEL METODO

Il calcolo della sensibilità e la specificità del metodo è stato effettuato sulla base di quanto previsto dalla norma ISO/TR 13843 (2000).

Campioni di acque superficiali:

Sensibilità = 98%  
Specificità = 97,6%  
Efficienza = 97,8%

Campioni di acque disinfettate:

Sensibilità = 100%  
Specificità = 98,7%  
Efficienza = 98,9%

## BIBLIOGRAFIA

BOCCIA D., D'ANCONA F., PANTOSTI A. (2002): "The National AR-ISS antibiotic resistance project: Preliminary data on vancomycin resistance in invasive strains of *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*", BEN, Bolletino Epidemiologico Nazionale 2002, 15.

BUDNICK G.E., HOWARD R.T., AND MAYO D.R. (1996): "Evaluation of Enterolert for enumeration of enterococchi in recreational waters", *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3881-3884.

ISO/TR 13843:2000. Water quality - Guidance on validation of microbiological methods.

LANCEFIELD R.C. (1933). "A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci", *J. Exp. Med.*, **57**: 571-595.

LECLERC H., DEVRIESE L.A. AND MOSSEL D.A.A. (1996): "Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococchi and streptococchi: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water", *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 459-466.

## DETERMINAZIONE DI AMMINE AROMATICHE IN ACQUE SOTTERRANEE

a cura di Melchionna G.\*, Passarino G.\* e Capri S.\*\*

\* ARPA-Piemonte, Attività strumentali di laboratorio del Quadrante Nord Ovest, sede Grugliasco

\*\* IRSA-CNR, Roma

### RIASSUNTO

Vengono descritti i risultati di uno studio volto ad ottimizzare il procedimento di estrazione di ammine aromatiche da matrici acquose. L'estratto, opportunamente concentrato, è stato analizzato mediante gascromatografia ad alta risoluzione-spettrometria di massa (HRGC-MS).

Sono state prese in considerazione le ammine inserite nel D.Lgs. 3 aprile 2006 n. 152 (Tabb. 1-2, all. V, parte 4) concernente la bonifica di siti contaminati (anilina, o-toluidina, p-toluidina, o-anisidina, m-anisidina, p-anisidina, difenilammina).

La sperimentazione condotta ha evidenziato la maggiore efficacia delle colonnine impaccate con N-vinilpirrolidone-divinilbenzene, rispetto a quelle contenenti stirene-divinilbenzene, nell'isolare gli analiti di interesse dalla matrice acquosa. L'estrazione in fase solida con N-vinilpirrolidone-divinilbenzene si è dimostrata più vantaggiosa rispetto alla tradizionale estrazione liquido-liquido, in quanto ha fornito percentuali di recupero dei diversi analiti paragonabili (in qualche caso addirittura superiori) mediante una procedura operativa più semplice e con un minor consumo di solventi.

### INTRODUZIONE

Le ammine aromatiche rappresentano una classe di composti di rilevanza ambientale per l'ampia diffusione, l'elevata mobilità nell'ambiente acquatico e i rischi sanitari derivanti dalle caratteristiche di tossicità (acuta e cronica) e dalle accertate proprietà mutagene e cancerogene di alcune di esse. Importanti intermedi di sintesi, trovano impiego in diversi settori industriali (produzione di farmaci, pesticidi, materie plastiche); inoltre vengono ampiamente utilizzate nella preparazione di coloranti e pigmenti impiegati nelle industrie tessili, conciarie, della gomma, delle vernici, della carta. Oltre agli effluenti industriali, un'altra possibile fonte di inquinamento per l'ambiente acquatico è costituita dai processi di degradazione biotica ed abiotica di composti nitroaromatici, azocomposti, poliuretani, alcune classi di pesticidi.

A causa dell'elevata polarità, la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) è la tecnica più utilizzata per l'analisi diretta di ammine aromatiche.

Questa tecnica, accoppiata ad un rivelatore universale come l'UV, è stata già impiegata, tra l'altro, in un protocollo IRSA (IRSA, 1994) per l'analisi di ammine aromatiche in fanghi di depurazione. Tuttavia, in matrici acquose il rivelatore UV può risultare scarsamente sensibile, specialmente quando si analizzano matrici reali in cui non è possibile utilizzare lunghezze d'onda inferiori a 230 nm a causa delle interferenze della matrice. La gascromatografia, con o senza derivatizzazione degli analiti, accoppiata alla rivelazione mediante cattura di elettroni o alla spettrometria di massa, è l'altra tecnica comunemente utilizzata per la determinazione delle ammine aromatiche (Schmidt et al., 1998).

L'elevata solubilità in acqua rende difficoltosa l'estrazione di ammine aromatiche da matrici acquose. Nel passato l'isolamento di questi composti da matrici acquose era invariabilmente effettuato mediante estrazione liquido-liquido (LLE), una tecnica lenta, che richiede una manipolazione eccessiva del campione con conseguente sua possibile contaminazione e fa uso di grandi volumi di solventi costosi, infiammabili e nocivi. Inoltre falsi positivi possono essere introdotti nell'analisi a causa delle impurezze del solvente. Tutte queste difficoltà hanno condotto alla progressiva sostituzione della LLE con l'estrazione in fase solida (SPE) per mezzo di adatti solidi adsorbenti, che consente una riduzione dei volumi dei solventi impiegati, l'attenuazione delle interferenze dovute alla matrice e una più facile automazione della procedura. Fasi solide costituite da copolimeri stirene-divinilbenzene sono state utilizzate nell'estrazione di ammine aromatiche da campioni acquosi, preliminarmente trattati con idrossido di sodio (pH = 9) (Less et al., 1998; Scholz e Palauschek, 1988).

Obiettivo di questo lavoro è stato la messa a punto di una procedura di estrazione per la determinazione di ammine aromatiche in acque sotterranee mediante HRGC/MS. Sono state selezionate le ammine riportate nel D.Lgs. 3 aprile 2006 n. 152 (Tabb. 1-2, all. V, parte 4) concernente la bonifica di siti contaminati, sia quelle inserite nella tabella delle acque sotterranee (anilina, p-toluidina, difenilammina), sia quelle inserite nelle tabelle A e B relative al suolo (o, m, p-anisidina in aggiunta alle altre tre).

## PARTE SPERIMENTALE

### Condizioni strumentali

Nella prima fase del lavoro sono state ricercate ed ottimizzate le condizioni strumentali gascromatografiche, avendo come riferimento quelle riportate nel metodo EPA 8270 D.

La soluzione di riferimento è stata iniettata in un gascromatografo-spettrometro di massa quadrupolare applicando le condizioni riportate nella tabella seguente.

Tab. 1 - Condizioni strumentali applicate

Colonna analitica	(5%-difenil-(95%-dimetilpolisilossano; L=30 m, d=0,25 mm; spessore film=0,25 µm
Programma forno	40°C per 3 min, 8°C/min fino a 80°C per 0 min., 10°C/min fino a 250°C per 15 min.
Temperatura sorgente	250°C
Temperatura quadrupolo	150°C
Flusso "carrier" elio	1,0 mL/min
Transfer line	280°C
Temperatura iniettore	250°C
Modalità iniezione	"pulsed splitless" 1,0 µL
Acquisizione	in scansione da 35 a 450 amu

In queste condizioni le ammine sono generalmente ben risolte.

Dopo aver acquisito gli spettri di massa ed individuato i tempi di ritenzione dei vari analiti si è approntato un metodo analitico in Single Ion Monitoring (SIM) con gli ioni caratteristici di ogni singola sostanza, in modo da avere la massima sensibilità necessaria per rispettare i limiti riportati in Tab. 2, all. V, parte 4 del D.Lgs. 3 aprile 2006 n. 152, soprattutto nel caso della p-toluidina che rappresenta il parametro più critico da analizzare (p-toluidina 0,35 µg/L; anilina 10 µg/L; difenilammina 910 µg/L). Le condizioni strumentali del metodo analitico in SIM sono identiche a quelle sopra riportate.

Dopo ripetute iniezioni per valutare la precisione si è deciso di utilizzare uno standard interno, il fenolo D5 che migliora ulteriormente la ripetibilità.

In condizioni ottimali, cioè con una colonna nuova e lavorando in modo estremamente pulito si ottiene un limite di quantificazione di circa 0,1 mg/L (pari a 0,1 µg/L con preconcentrazione del campione 1000:1).

Considerando la natura basica degli analiti e la loro cattura da parte di siti acidi silanolici che si formano in una colonna usata, si può ipotizzare a regime un "level of quantitation" (LOQ) di 0,2 mg/L (pari a 0,2 µg/L con preconcentrazione del campione 1000:1), che risulta comunque al di sotto del limite di legge.

La linearità della risposta è stata verificata con l'iniezione di 5 soluzioni di riferimento aventi concentrazioni comprese nell'intervallo 0,1-2 mg/L (pari a 0,1-2 µg/L con preconcentrazione 1000:1). I coefficienti di correlazione della curva di calibrazione ottenuta sono risultati per ogni analita  $\geq 0,999$ .

### Estrazione liquido-liquido

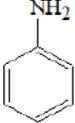
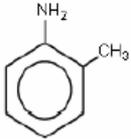
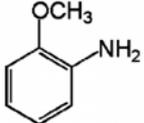
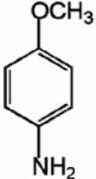
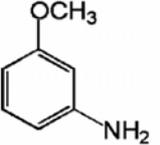
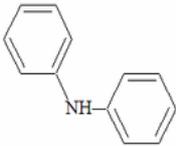
La seconda fase del lavoro ha riguardato l'individuazione e l'ottimizzazione della procedura di estrazione degli analiti di interesse dalla matrice acquosa. I dati disponibili in letteratura, riguardanti la solubilità in acqua e il log  $K_{ow}$  delle ammine considerate (Tab. 2), variano, rispettivamente, tra 7 e 35 g/L e tra 0,9 e 1,4, testimoniando la significativa polarità dei composti considerati. Solo la difenilammina, caratterizzata da un elevato valore del log  $K_{ow}$  (3,86), presenta una bassa solubilità in acqua (0,039 g/L).

Inizialmente sono state valutate le potenzialità dell'estrazione liquido-liquido, seguendo protocolli pubblicati nei manuali di metodiche standardizzate o su riviste scientifiche (EPA, 1998; EPA, 1996; Scholz e Palauschek, 1988).

A un litro di campione di acqua, di media salinità, esente da ammine aromatiche, è stata aggiunta la soluzione di riferimento delle ammine considerate, cloruro di sodio (30 g/L) e idrossido di sodio 1N fino ad un pH di circa 11; è stata effettuata quindi una tripla estrazione con diclorometano utilizzando 60 mL di solvente per ciascuna estrazione. Dopo separazione delle fasi e disidratazione dell'estratto con solfato di sodio anidro l'estratto è stato concentrato in "rotavapor" a piccolo volume (1 mL) a 35°C e 600 mBar.

Le prove sono state condotte in triplicato scegliendo una concentrazione intermedia nell'intervallo di taratura (1 µg/L per ogni analita).

Tab. 2 - Log K<sub>ow</sub> e solubilità per gli analiti considerati

Analita	Formula di struttura	Log K <sub>ow</sub>	Solubilità (g/L)
Anilina		0,90	35 <sup>a</sup>
p-toluidina		1,39-1,41	7,4 <sup>b</sup>
o-toluidina		1,40	15 <sup>c</sup>
o-anisidina		1,18	15 <sup>d</sup>
p-anisidina		0,95	21 <sup>e</sup>
m-anisidina		0,93	20,5 <sup>f</sup>
difenilammina		3,86	0,039 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> EPA, 1985; <sup>b</sup> Verschueren, 1983; <sup>c</sup> UNEP, 2004; <sup>d</sup> JRC, 2002; <sup>e</sup> www.chemblink.com; <sup>f</sup> IPCS, 2002;

<sup>g</sup> EPA, 1998.

I risultati ottenuti, riportati nella tabella seguente (Tab. 3), mostrano recuperi decisamente insufficienti per la p-anisidina (per altro non contemplata tra gli analiti regolamentati dal D.M. 471/99 nelle acque sotterranee), scadenti per m-anisidina e anilina. Inoltre, nonostante si tratti di una procedura piuttosto semplice, eseguibile con apparecchiature facilmente reperibili, comporta tuttavia l'utilizzo di grossi volumi di diclorometano con conseguente necessità di evaporazione e di lunghi tempi di esecuzione. In assenza di agitatori automatici, la ripetibilità è soggetta alle modalità di estrazione (tipo di agitazione, operatore, tempi).

Tab. 3 - Recuperi di alcune ammine aromatiche mediante estrazione liquido-liquido

	prova 1	prova 2	prova 3	media±dev. stand.
analita	% rec.	% rec.	% rec.	% rec.
anilina	68	74	69	70,3±2,6
o+p-toluidina	76	82	75	77,7±3,1
o-anisidina	89	95	90	91,3±2,6
p-anisidina	33	43	38	38,0±4,1
m-anisidina	63	71	66	66,7±3,3
difenilammina	106	101	101	102,7±2,4

Per questi motivi si è deciso di valutare le prestazioni dell'estrazione condotta mediante l'utilizzo di colonnine SPE (EPA; 1996; Schmidt et al., 1998; Less et al., 1998).

### Estrazione in fase solida

Sono state utilizzate colonnine da 6 mL e 200 mg con due differenti tipologie di riempimento: polimerico (stirene-divinilbenzene) e, considerata la natura parzialmente polare degli analiti, idrofilico e lipofilo (N-vinilpirrolidone-divinilbenzene). Un litro di campione di acqua esente da ammine aromatiche è stato portato a pH 9 con NaOH 1N, addizionato con 1 µg/L di ammine (ognuna), quindi fatto passare, a circa 10 mL/min, attraverso le colonnine SPE, precedentemente lavate e condizionate con solventi idonei (2 mL di metanolo e 2 mL di NaOH 10<sup>-5</sup> N). Infine le colonnine sono state disidratate con flusso di aria ed eluite con opportuni solventi. L'estratto è stato quindi concentrato a piccolo volume.

Nella fase di messa a punto della procedura di estrazione SPE sono state individuate le variabili analitiche critiche, che influivano in modo rilevante sui recuperi degli analiti dalla matrice acquosa (solventi di eluizione, tempo di disidratazione delle

colonnine, modalità, tempi e volumi finali di concentrazione dell'estratto). Nel seguito sono riportate le condizioni utilizzate con i relativi risultati ottenuti.

### Analisi delle variabili analitiche critiche

Una prima serie di prove è stata effettuata per individuare il solvente di eluizione ottimale. Sono stati posti a confronto il diclorometano e una miscela metanolo/acetonitrile, usati sia per l'eluizione che per la preparazione delle soluzioni di riferimento; le prove sono state effettuate in doppio, addizionando ad ogni campione 1 µg/L della soluzione mista di ammine aromatiche, con i due diversi tipi di colonnine (stirene-divinilbenzene, N-vinilpirrolidone-divinilbenzene). Le colonnine sono state eluite con 6 mL di solvente in totale, suddiviso in tre frazioni da 2 mL ciascuna.

Le prove con la miscela metanolo/acetonitrile hanno dato esito negativo nelle condizioni gascromatografiche impiegate, mentre quelle con diclorometano hanno fornito risultati migliori, ma non ancora soddisfacenti a causa dei recuperi molto bassi, soprattutto dei componenti più volatili, che venivano probabilmente perduti evaporando l'estratto ad un volume inferiore a 0,5 mL. Pertanto le prove successive sono state eseguite in condizioni meno severe, concentrando l'estratto ad un volume finale di 1 mL.

Per valutare le eventuali perdite nella fase di concentrazione dell'estratto le prove sono state effettuate con soluzioni di riferimento in diclorometano delle ammine considerate nel modo seguente:

1. soluzione di riferimento 1 mg/L in diclorometano (5 mL) evaporata a 1 mL con flusso di azoto a 35 °C;
2. soluzione di riferimento 1 mg/L in diclorometano (5 mL) + 1 mL di toluene evaporata a 1 mL con flusso di azoto a 35°C;
3. soluzione di riferimento 1 mg/L in diclorometano (5 mL) + 1 mL di toluene evaporata a 1 mL con evaporatore rotante a 35°C e 600 mbar.

Nelle prove 2 e 3 è stato aggiunto toluene come "keeper", solvente altobollente che dovrebbe limitare le perdite di analiti per evaporazione.

I risultati ottenuti, confrontati con la soluzione di riferimento tal quale preparata con gli stessi solventi, sono riportati nella seguente tabella (Tab. 4).

Tab. 4 – Recupero degli analiti nello step evaporativo

	prova 1	prova 2	prova 3
analita	% rec.	% rec.	% rec.
anilina	97	91	91
o+p-toluidina	97	93	92
o-anisidina	97	92	92
p-anisidina	97	89	91
m-anisidina	97	94	93
difenilammina	98	101	99

La prova effettuata con solo diclorometano sotto flusso di azoto (prova 1) è risultata la migliore a condizione di concentrare al massimo fino a 1 mL. La perdita dovuta ad evaporazione/strippaggio è contenuta al 2-3%, quindi più che accettabile.

Le prove con toluene, contrariamente a quanto atteso, hanno dato esiti meno soddisfacenti, in tutte e due le modalità di conduzione del processo evaporativo. Quindi per le prove successive si è deciso di utilizzare diclorometano (senza toluene) come eluente concentrando ad un volume finale di 1 mL sotto flusso d'azoto a 35°C.

Per individuare il tipo di fase stazionaria e il tempo di essiccazione ottimali delle colonnine SPE sono state eseguite alcune prove sperimentali il cui protocollo è descritto in Tab. 5. Partendo da un litro di campione acquoso e concentrando l'eluato ad un volume finale di 1 mL si è realizzato un fattore di arricchimento di 1000.

Tab. 5 – Descrizione del protocollo sperimentale

exp	matrice	colonnine SPE	solvente di eluizione	tempo di essiccazione colonnina SPE
1	Un litro di acqua di media durezza + soluzione mista di ammine (1 µg/L)	Stirene-divinilbenzene	diclorometano	5 minuti
2	Un litro di acqua di media durezza + soluzione mista di ammine (1 µg/L)	Stirene-divinilbenzene	diclorometano	30 minuti
3	Un litro di acqua di media durezza + soluzione mista di ammine (1 µg/L)	N-vinilpirrolidone-divinilbenzene	diclorometano	5 minuti
4	Un litro di acqua di media durezza + soluzione mista di ammine (1 µg/L)	N-vinilpirrolidone-divinilbenzene	diclorometano	30 minuti

I recuperi ottenuti nelle diverse prove sono riportati in Tab. 6.

Tab. 6 - Recuperi delle prove condotte secondo il protocollo di Tab. 5

	prova 1	prova 2	prova 3	prova 4
analita	% rec.	% rec.	% rec.	% rec.
anilina	46	56	60	75
o+p-toluidina	52	62	67	85
o-anisidina	58	70	70	90
p-anisidina	58	70	70	90
m-anisidina	58	71	70	91
difenilammina	79	88	84	98

Le colonnine N-vinilpirrolidone-divinilbenzene hanno offerto prestazioni decisamente migliori in termini di recupero rispetto a quelle impaccate con stirene-divinilbenzene. Con tempi di disidratazione di 30 minuti i recuperi erano pressochè quantitativi per tutti gli analiti considerati, eccezion fatta per l'anilina, il composto più solubile, il cui recupero può tuttavia essere considerato accettabile.

Nelle prove condotte con tempi di disidratazione più brevi (5 minuti) si sono riscontrati vari problemi: il più serio era la presenza nell'eluato di tracce di acqua residua, che deve essere eliminata mediante disidratazione con solfato di sodio anidro. In questo caso i recuperi, con entrambe le fasi stazionarie impiegate, sono risultati insoddisfacenti.

## VALIDAZIONE DEL METODO

Individuate come condizioni ottimali di estrazione quelle applicate nel corso dell'esperimento 4, si è proceduto alla validazione del metodo e alla stima della ripetibilità.

Come ulteriore conferma è stata allestita anche una prova con una colonnina di stirene-divinilbenzene.

Considerato l'intervallo utilizzato per la taratura (un ordine di grandezza), le prove di ripetibilità (n=6) sono state effettuate ad un solo livello di concentrazione (1 µg/L), corrispondente ad un punto intermedio dell'intervallo di taratura.

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle seguenti (Tabb. 7-8).

Tab. 7 - Recupero di ammine aromatiche mediante SPE con N-vinilpirrolidone-divinilbenzene

	prova 1	prova 2	prova 3	prova 4	prova 5	prova 6	media	CV %
analita	% rec.							
anilina	77	72	64	69	69	72	<b>71</b>	<b>6,1</b>
o+p-toluidina	87	82	74	80	80	85	<b>81</b>	<b>5,6</b>
o-anisidina	91	87	77	85	84	90	<b>86</b>	<b>5,9</b>
p-anisidina	91	87	77	85	84	90	<b>86</b>	<b>5,9</b>
m-anisidina	91	87	78	86	85	91	<b>86</b>	<b>5,6</b>
difenilammina	94	89	85	87	83	90	<b>88</b>	<b>4,4</b>

Tab. 8 - Recupero di ammine aromatiche mediante SPE con stirene-divinilbenzene

analita	% rec.
anilina	50
o+p-toluidina	59
o-anisidina	67
p-anisidina	67
m-anisidina	67
difenilammina	81

## CONCLUSIONI

Le prove effettuate hanno evidenziato la necessità di osservare rigorose procedure per ottenere buoni recuperi, le criticità sono dovute principalmente alle caratteristiche chimico-fisiche degli analiti: trattandosi di composti semipolari, relativamente solubili in acqua, una loro estrazione quantitativa dalla matrice acquosa risulta difficoltosa.

Il metodo estrattivo che fa uso di colonnine SPE si è dimostrato più pratico ed efficace del metodo con estrazione liquido-liquido: i recuperi sono confrontabili (se non mediamente superiori) e si utilizzano minori quantità di solvente.

Le colonnine da 6 mL e 200 mg di N-vinilpirrolidone-divinilbenzene come riempimento si sono dimostrate maggiormente efficaci rispetto a quelle di stirene-divinilbenzene, fornendo recuperi accettabili per tutti gli analiti (70-90%) adottando le condizioni descritte in Fig. 1.

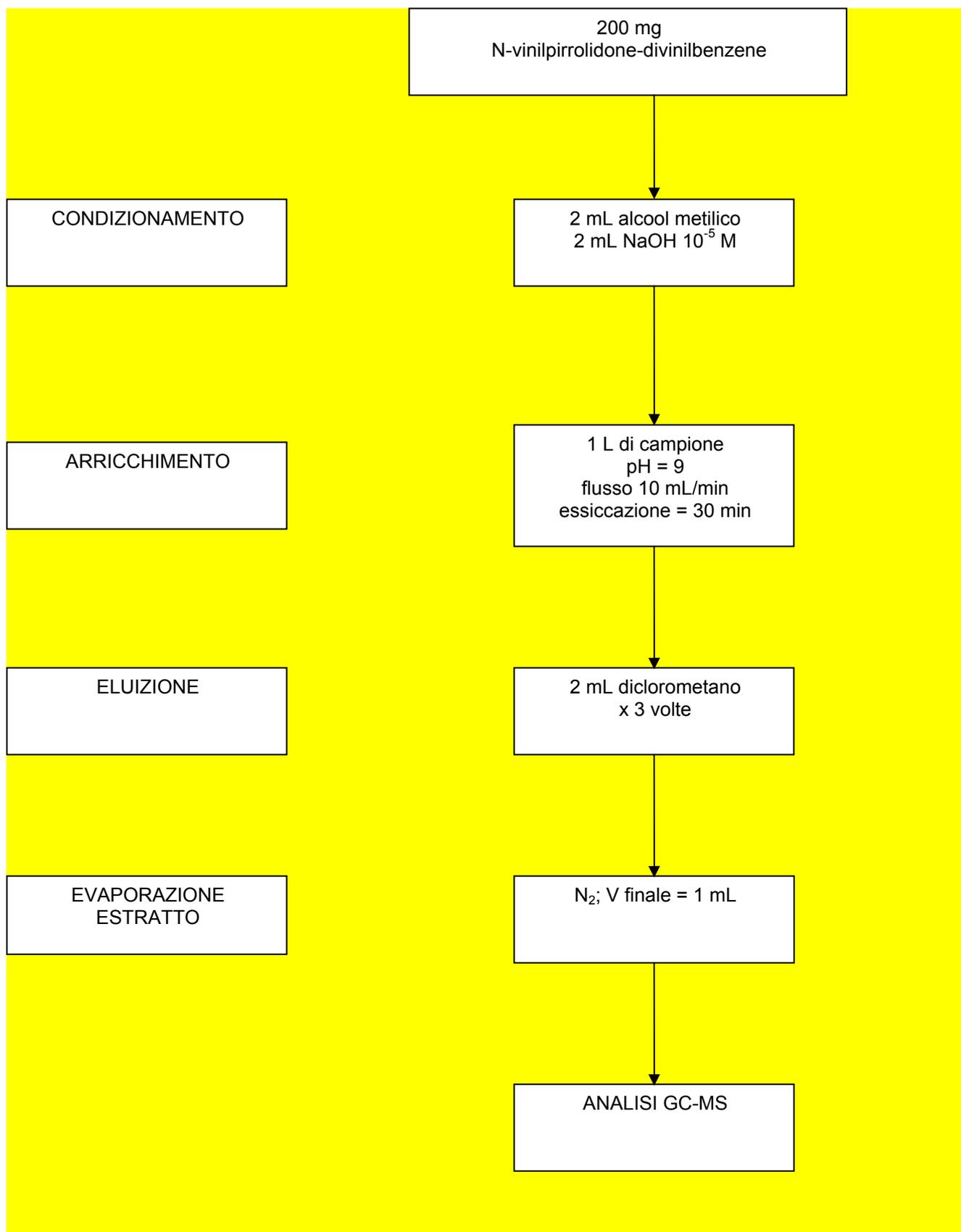


Fig. 1 – Diagramma a blocchi del protocollo proposto per la determinazione di ammine aromatiche in campioni acquosi

## APPENDICE

### Determinazione di ammine aromatiche in acque sotterranee

#### 1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo prevede la determinazione di ammine aromatiche in acque sotterranee mediante estrazione in fase solida (SPE) ed analisi in gascromatografia/spettrometria di massa. I composti vengono introdotti nell'apparecchiatura GC/MS iniettando un'opportuna aliquota dell'estratto organico in un gascromatografo dotato di colonna capillare. Gli analiti, separati dalla colonna mediante una programmata di temperatura, vengono rivelati con uno spettrometro di massa interfacciato con il gascromatografo.

L'identificazione delle singole ammine è basata sul confronto degli spettri di massa ottenuti dall'analisi dell'estratto organico del campione acquoso con quelli di idonee soluzioni di riferimento; la quantificazione degli analiti di interesse viene effettuata utilizzando le risposte dello ione principale di quantificazione del singolo analita sulla base di opportune rette di taratura di soluzioni di riferimento.

#### 2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile alle acque sotterranee e consente, partendo da un campione di 1000 mL, la determinazione delle ammine riportate in Tab. 1 nell'intervallo di concentrazione 0,1-2 µg/L. In condizioni ottimali il limite di quantificazione è pari a 0,1 µg/L. Si può ipotizzare a regime un "level of quantitation" (LOQ) di 0,2 µg/L.

Tab. 1 - Ammine aromatiche analizzabili con la procedura descritta

Anilina
p-toluidina
o-toluidina
o-anisidina
p-anisidina
m-anisidina
difenilammina

#### 3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Solventi, reagenti e vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare problemi e portare alla presenza di picchi interferenti nei cromatogrammi e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà di interpretazione e/o interpretazioni errate del tracciato cromatografico. Tutti i materiali utilizzati devono essere esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate. E' quindi buona prassi di laboratorio, all'inizio dell'indagine e periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata, per la verifica di eventuali interferenze provenienti da materiali e reagenti. Nel caso di presenza di interferenze individuarne la provenienza e procedere alla loro eliminazione. Contaminazioni dovute ad effetti memoria possono verificarsi quando campioni contenenti elevate e basse concentrazioni dei composti analizzati sono processati nella stessa sequenza analitica. Per ridurre questi inconvenienti lavare la siringa del campione con solvente prima dell'iniezione. Qualora l'analisi di un campione riveli una concentrazione insolitamente elevata, procedere all'iniezione del solvente nell'apparecchiatura GC/MS per verificare l'assenza di picchi prima di iniettare il campione successivo.

#### 4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro scuro di volume opportuno, con tappo a vite e guarnizione in teflon, allestendo possibilmente un bianco di campo (contenitore riempito con acqua ultrapura esente da ammine aromatiche e condotto attraverso tutte le fasi del campionamento e trasporto). Il trasporto deve avvenire in condizioni refrigerate.

I campioni, conservati in frigorifero ad una temperatura di 4±3°C, devono essere analizzati entro un mese.

#### 5 - APPARECCHIATURE

La vetreria ed i materiali impiegati devono essere riservati alla procedura analitica in oggetto. La vetreria di cui ai punti 5.1 e 5.3 dopo il lavaggio va trattata a 180-200°C per almeno 3 ore e raffreddata prima dell'uso; i tappi e le guarnizioni lavati in n-pentano e asciugati in stufa a 90°C.

**5.1 - Bottiglie di vetro** per la raccolta del campione con tappo a vite (capacità almeno 1000 mL).

**5.2 - Cappa chimica e dispositivi di protezione individuali** per manipolazione delle soluzioni di riferimento e dei campioni.

**5.3 - Matracci o palloni tarati di classe A** di vario tipo per la preparazione e la diluizione delle soluzioni a concentrazione nota delle ammine aromatiche e per la preparazione delle soluzioni di taratura.

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

**5.5 - Spatola di acciaio** per pesate di sostanze solide.

**5.6 - Microsiringhe** tarate per liquidi, di vari volumi (10, 50, 250  $\mu$ L).

**5.7 - Bilancia tecnica**, risoluzione 0,1 g.

**5.8 - Bilancia analitica**, risoluzione 0,1 mg.

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

**5.10 - Colonna cromatografica:** capillare di vetro o silice fusa con fase stazionaria non polare, di opportuna lunghezza e diametro interno.

**5.11 - Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici**

**5.12 - Dispositivo per l'erogazione di elio o idrogeno puro per gascromatografia.**

Il gas di trasporto viene eventualmente fatto passare attraverso una trappola a carbone attivo e una trappola a setacci molecolari tipo 5A; un'ulteriore purificazione può essere fatta tramite passaggio in una trappola per l'eliminazione delle tracce di ossigeno.

**5.13 - Adsorbenti per estrazione SPE.**

Per l'estrazione liquido-solido si consiglia di utilizzare cartucce costituite da materiale polimerico con fase stazionaria polare (es. N-vinilpirrolidone-divinilbenzene). La quantità di materiale adsorbente dipenderà dalle cartucce utilizzate. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto montando la cartuccia su una beuta da vuoto o su un sistema per estrazione liquido-solido disponibile in commercio secondo le modalità suggerite dal produttore.

## 6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua da utilizzare per il bianco, per le soluzioni di riferimento nonché per le eventuali diluizioni dei campioni, dovrà essere esente dai contaminanti oggetto dell'analisi. La verifica del bianco, per ogni gruppo di campioni, viene effettuata, ad esempio, analizzando due aliquote all'inizio della sequenza analitica ed un'altra immediatamente dopo le soluzioni di taratura e di controllo.

Le concentrazioni degli analiti eventualmente riscontrati dovranno essere inferiori al limite di quantificazione.

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

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

**6.3 - Alcool metilico (CH<sub>3</sub>OH)**

**6.4 - Diclorometano**

**6.5 - Soluzione di idrossido di sodio 0,1 M.**

Sciogliere 0,4 g di idrossido di sodio (NaOH) in pastiglie in acqua e diluire a 100 mL.

**6.6 - Soluzione di idrossido di sodio 10<sup>-5</sup> M**

Preparare la suddetta soluzione, utilizzata per il condizionamento della cartuccia SPE, diluendo opportunamente la soluzione 6.5.

**6.7 - Fenolo D5** (standard interno)

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

6.8.1 - Soluzioni concentrate (1000 mg/L)

Allestire le soluzioni concentrate (1000 mg/L) dei singoli composti, o loro miscele, a partire dai riferimenti certificati. Pesare circa 0,010 g, o trasferire un volume opportuno di ciascun riferimento certificato in un matraccio tarato da 10 mL contenente alcuni millilitri di alcool metilico e portare a volume con lo stesso solvente. Il volume dell'aliquota da prelevare si può calcolare dal valore della densità del riferimento utilizzato.

Con le stesse modalità può essere preparata direttamente una miscela di più componenti a partire dai singoli riferimenti certificati e usando un unico recipiente tarato. Queste soluzioni, conservate a 4°C, sono stabili almeno un anno dal momento della preparazione.

6.8.2 - Soluzioni di riferimento (100 mg/L)

Preparare le soluzioni di riferimento diluendo opportunamente in metanolo le soluzioni 6.8.1. Queste soluzioni, conservate a 4°C, sono stabili un anno dal momento della preparazione.

Tale stabilità appare sufficientemente cautelativa considerando che per soluzioni di pari concentrazione (100 mg/L in alcool metilico) disponibili in commercio vengono riportati intervalli di stabilità di almeno 2 anni. Le soluzioni 6.8.2, conservate a 4°C, hanno validità di 1 mese dalla data di apertura. In alternativa è possibile utilizzare soluzioni commerciali certificate contenenti i composti di interesse, singoli o in miscele di vario tipo, a concentrazione nota.

Preparare, giornalmente, soluzioni di riferimento diluite da impiegare per la costruzione delle curve di taratura, diluendo opportunamente in diclorometano le soluzioni 6.8.2.

## 7 - PROCEDIMENTO

### 7.1 - Taratura

All'inizio di ogni ciclo analitico costruire le curve di taratura per i diversi analiti utilizzando soluzioni di riferimento diluite in numero sufficiente a garantire una corretta interpolazione delle concentrazioni misurate. Tre soluzioni aventi concentrazioni comprese tra il limite minimo di quantificazione e 2 µg/L sono generalmente sufficienti. La curva è accettabile quando fornisce un  $R^2 \geq 0,99$ . La sua stabilità è verificata per mezzo di soluzioni di controllo scelte all'interno del campo di prova, inserite nel ciclo analitico, ad esempio, ogni 10 campioni e comunque alla fine del ciclo stesso.

### 7.2 - Condizioni strumentali

Nel seguito sono riportate, a titolo esemplificativo, condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi (Tab. 1) e gli ioni caratteristici di quantificazione e di conferma (Tab. 2).

Tab. 1 - Condizioni strumentali

Colonna analitica	(5%)-difenil-(95%)-dimetilpolisilossano; L=30 m, d=0,25 mm; spessore film=0,25 µm
Programma forno	40°C per 3 min, 8°C/min fino a 80°C per 0 min, 10°C/min fino a 250°C per 15 min.
Temperatura sorgente	250°C
Temperatura quadrupolo	150°C
Flusso "carrier" elio	1,0 mL/min
Transfer line	280°C
Temperatura iniettore	250°C
Modalità iniezione	"pulsed splitless" 1,0 µL
Acquisizione	"single ion monitoring" (SIM)

### 7.3 - Estrazione SPE

Assemblare il sistema di estrazione SPE, costituito da una cartuccia da 6 mL riempita con una fase solida costituita da N-vinilpirrolidone-divinilbenzene, secondo le modalità indicate al punto 5.13. Condizionare la cartuccia facendo passare 2 mL di alcool metilico e 2 mL di una soluzione di NaOH  $10^{-5}$  M nel caso di 200 mg di riempimento. Portare il pH del campione acquoso a 9 mediante aggiunta di un volume opportuno di una soluzione di NaOH 1M e farlo passare attraverso la cartuccia SPE ad un flusso di 10 mL/min. Disidratare la cartuccia con flusso di aria per 30 minuti ed eluire con 5 mL di diclorometano. Evaporare l'estratto mediante flusso di azoto a 35°C fino ad un volume finale di 1 mL.

### 7.4 - Analisi

Introdurre nel gascromatografo volumi uguali di soluzioni di taratura e di estratti ottenuti applicando la procedura descritta al punto 7.3. Le misure vengono effettuate con la tecnica del riferimento esterno. Qualora si voglia ricorrere al riferimento interno si può utilizzare il fenolo D5 oppure altro composto idoneo. La Fig. 2 riporta, a titolo esemplificativo, un cromatogramma ottenuto analizzando una soluzione di riferimento diluita contenente le ammine aromatiche considerate.

Tab. 2 - Ioni caratteristici utilizzati per l'analisi

Analita	Massa di quantificazione	Massa di conferma
Anilina	93	66
p-toluidina	106	107
o-toluidina	106	107
o-anisidina	108	123
p-anisidina	108	123

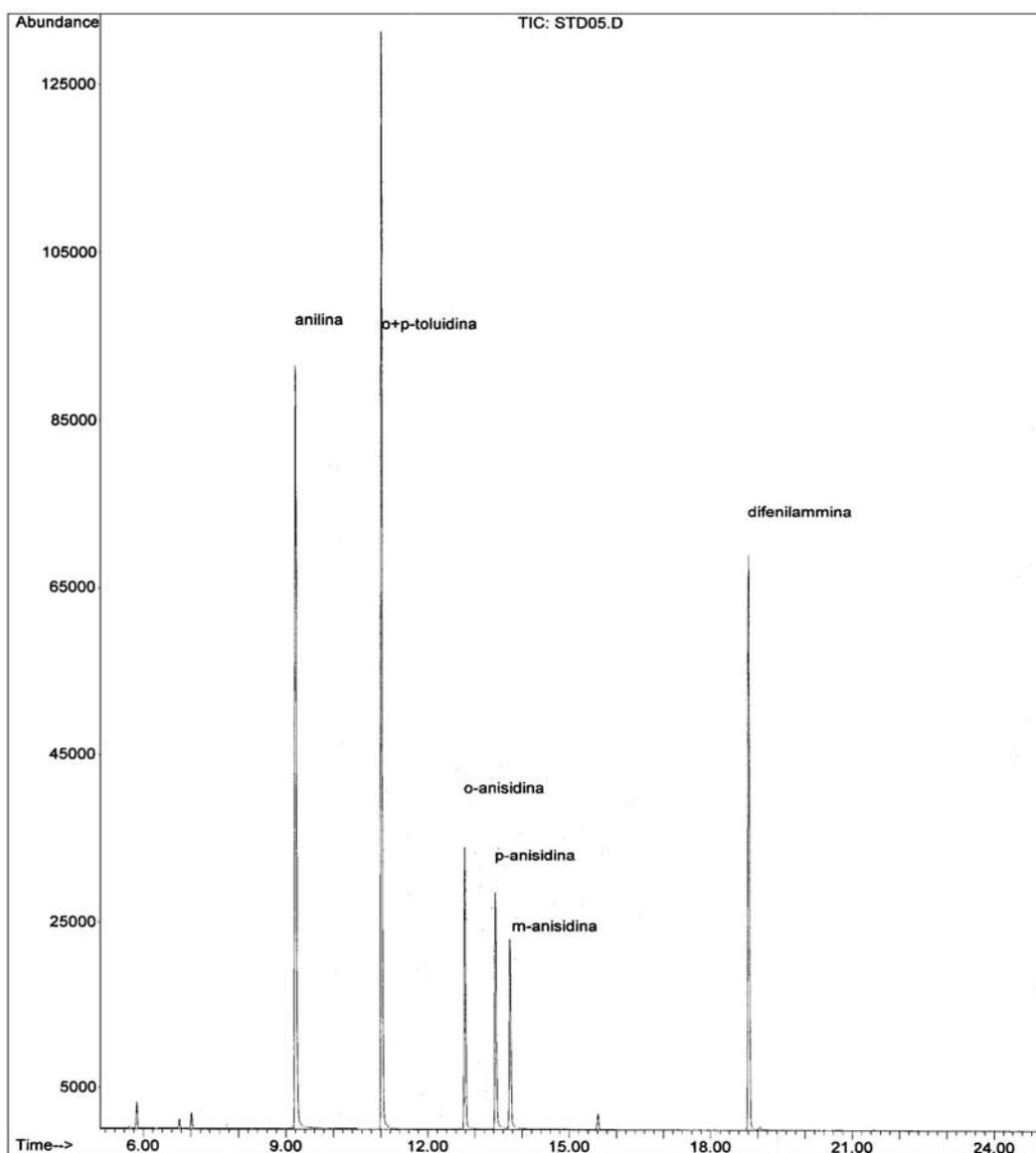


Fig. 2 - Cromatogramma di una soluzione di riferimento di ammine aromatiche (0,5 mg/L in diclorometano per ciascun analita) ottenuto applicando le condizioni strumentali descritte in Tab. 1.

## 8 - CALCOLI

### 8.1 - Metodo di taratura diretta o con riferimento esterno

Costruire le rette di taratura per i singoli analiti, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del composto (A) in funzione della concentrazione del composto stesso e interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura.

La concentrazione incognita del composto è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ( $\mu\text{g/L}$ ) di ammina aromatica;

A = area del picco di ammina nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

$V_f$  = volume (mL) dell'estratto finale;

$V_i$  = volume (mL) del campione acquoso.

### 8.2 - Metodo con riferimento interno

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, riportare in grafico il rapporto tra area del picco del composto e area del picco del riferimento interno ( $A/A_{si}$ ) in funzione della concentrazione del composto stesso.

La concentrazione incognita del composto è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ( $\mu\text{g/L}$ ) di ammina aromatica;

A = area del picco di ammina nella miscela incognita;

$A_{si}$  = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

$V_f$  = volume (mL) dell'estratto finale;

$V_i$  = volume (mL) del campione acquoso.

## 9 - Qualità del dato

Prove effettuate (n=6) su campioni di acqua sotterranea addizionata con ammine aromatiche, ciascuna alla concentrazione di  $1 \mu\text{g/L}$  corrispondente ad un punto intermedio dell'intervallo di taratura, hanno fornito una ripetibilità, espressa come coefficiente di variazione, compresa tra il 4 e il 6%. I recuperi erano compresi tra il 70 ed il 90%.

## BIBLIOGRAFIA

DECRETO LEGISLATIVO n. 152 del 3 aprile 2006. *Norme in materia ambientale*. Allegato 5, titolo V "Valori di Concentrazione soglia di contaminazione nel suolo, nel sottosuolo e nelle acque sotterranee in relazione alla specifica destinazione d'uso dei siti", G.U. 14 aprile 2006, n. 88.

EPA (1998): "Method 8270D - Semivolatile organic compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry", rev.4, Gennaio.

EPA (1996): "Method 3510C - Separatory funnel liquid-liquid extraction", rev.3, Dicembre.

EPA (1996): "Method 3535 - Solid phase extraction-SPE", rev.0, Dicembre.

IRSA (1994): "Metodi analitici per i fanghi", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **64**, Vol. 3, Parametri chimico-fisici, scheda 26a, Ammine aromatiche.

LESS M., SCHMIDT C.T., VON LOW E., STORK G. (1998): "Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine II. Enrichment", *J. Chromatogr. A*, **810**, 173-182.

SCHMIDT C.T., LESS M., HAAS R., VON LOW E., STEINBACH K. (1998): "Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine I. Derivatization", *J. Chromatogr. A*, **810**, 161-172.

SCHOLZ B., PALAUSCHEK N. (1988): "The determination of substituted aromatic amines in water and sediment samples", *Fresenius J. Anal. Chem.*, **331** (3-4), 282-289.

## STUDIO COLLABORATIVO ARPAVRING\_0106: IDROCARBURI IN ACQUA SOTTERRANEA

a cura di Sartori G\*, Stocchero G\*, Mufato R.\*,  
Perin D.\*, Dal Col M.\*\* e Dainese E.\*\*

\*ARPA Veneto: Centro Qualità Dati- Vicenza- Italy

\*\*ARPA Veneto: Dipartimento Regionale Laboratori -  
Servizio Laboratorio Provinciale VI Italy

### RIASSUNTO

Viene qui descritta la realizzazione di uno studio collaborativo tra i laboratori di ARPA Veneto, relativo ad una Procedura di Prova per la misura di idrocarburi totali in acque sotterranee. Per la realizzazione dello studio collaborativo è stato necessario preparare il materiale di prova, in quanto non sono disponibili Materiali di Riferimento Certificati in matrice (MRC). Il materiale di prova prodotto dal Centro Qualità Dati di ARPAV, testato per quanto riguarda omogeneità tra aliquote e stabilità, ha presentato potenzialmente comportamenti analitici in linea con i campioni reali. Sono state definite ripetibilità intra-laboratorio e riproducibilità interlaboratorio al fine di stimare l'intervallo fiduciale di compatibilità tra le misure erogate dai diversi centri di misura di ARPAV e di confrontare tali valori con i dati disponibili di "Qualità del dato" di un metodo di riferimento (APAT-IRSA 5160 B2). Al livello di concentrazione studiato ( $\approx 300 \mu\text{g/L}$ ) ripetibilità e riproducibilità della procedura testata sono dell'ordine rispettivamente del 12 e 14 % e la percentuale di recupero circa del 68 %.

### SUMMARY

This paper presents the results of an internal Collaborative Study "ARPAVRING\_0106" organized by CQD ARPA Veneto, which focused on the determination of hydrocarbons in groundwater. The main purpose of this exercise was to assess method performance (i.e. repeatability and reproducibility variance), described in an internal procedure in comparison to an official method APAT-IRSA 5160 B2. Due to the lack of Certified Reference Material (CRM) in matrix of hydrocarbons in water solutions, the test material, used in this exercise, was prepared by CQD ARPAV, testing it as far as concern between-bottle homogeneity and stability aspects. Test material WH0206 shows same analytical behavior for the given method as a real laboratory sample. At concentration level of  $300 \mu\text{g/L}$  the repeatability variation and reproducibility variation were around 12% and 14% and the recovery around 68%.

The determination of hydrocarbon compounds in water still poses difficult problems especially with regards to accuracy of analytical results. This paper provides a complete summary of the data collected during the collaborative study.

### INTRODUZIONE

Nella normativa italiana, il D.Lgs. 152/06 riporta in Allegato 5 al titolo V "Valori di concentrazione soglia di contaminazione nel suolo, nel sottosuolo e nelle acque sotterranee in relazione alla specifica destinazione d'uso dei siti", alla tabella 2 "Concentrazione soglia di contaminazione nelle acque sotterranee", il parametro idrocarburi totali espressi come n-esano, con valore limite di  $350 \mu\text{g/L}$ . Il suddetto decreto ingloba il vecchio decreto 471/99, che ha creato in questi anni problemi di interpretazione proprio riguardo al parametro idrocarburi totali.

Un documento elaborato da APAT nel 2005 osserva a riguardo che come «Recentemente il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio ha prescritto in diverse Conferenze dei Servizi, sia decisorie che istruttorie, per quanto riguarda il parametro idrocarburi si ricorda che "con il termine n-esano", riportato nel DM 471/99, allegato 1, tabella 2, è da intendersi "Idrocarburi totali espressi come n-esano" ed il valore limite è posto pari a  $350 \mu\text{g/L}$ , così come riportato dal DM 471/99 stesso. Detto parametro sarà riferito a tutti i composti idrocarbureici, ad esclusione delle singole sostanze per le quali il DM 471/99 definisce specifiche concentrazioni limite».

Un metodo analitico potenzialmente adatto alla determinazione di idrocarburi è il Metodo APAT-IRSA 5160 B2 – Idrocarburi Totali con alcune variazioni coerenti con quanto citato nel documento APAT e sopra riportato.

ARPA Veneto ha redatto una bozza di Procedura di Prova interna "Determinazione di idrocarburi totali in acque sotterranee" con le ipotesi di variazione individuate, da utilizzarsi nella normale attività.

Ai laboratori di ARPAV è stata proposta la partecipazione allo studio collaborativo per verificare, in termini di qualità del dato, gli effetti prodotti dalle variazioni introdotte con la procedura interna e, nel contempo, stimare l'intervallo fiduciale di compatibilità tra le misure dei diversi laboratori.

La realizzazione di studi interlaboratorio relativi alla misura di idrocarburi in acqua è fortemente condizionata dalla indisponibilità di materiali di riferimento certificati (MRC) in matrice acquosa.

La realizzabilità e la significatività delle informazioni desumibili dallo studio collaborativo risultano condizionate dalla possibilità di produrre un materiale di prova con adeguate caratteristiche di stabilità e omogeneità tra aliquote, rispetto alle attese variabilità intra ed inter-laboratorio.

Se l'obiettivo è di derivare dallo studio interlaboratorio informazioni estendibili al caso reale, è fondamentale avvalersi di materiali di prova quanto più simili ai campioni normalmente analizzati; soprattutto nel caso studiato nel quale esistono peculiarità nel sistema idrocarburi/acqua. Infatti la bassa solubilità in acqua può generare, nei campioni reali, adsorbimenti sulle superfici dei contenitori e separazioni di fase.

Il presente lavoro descrive i risultati ottenuti nello studio collaborativo e solo brevemente la preparazione dei materiali di prova (maggiori dettagli a riguardo sono in corso di pubblicazione). La struttura progettuale dello studio collaborativo è conforme alle norme ISO 5725-1, ISO 5725-2, ISO 5725-3, ISO 5725-4, ISO 5725-5, ISO 5725-6 e a protocolli armonizzati a livello internazionale (Thompson e Wood, 1993); la produzione dei materiali di prova utilizzati nello studio è stata realizzata in conformità con linee guida elaborate da organismi internazionali (LGC, 1998; ILAC, 2000; IAEA, 2003).

**PROCEDURA di PROVA**

Il metodo APAT-IRSA 5160 B2 si basa sullo schema riportato in Tab. 1.

Tab. 1 - Descrizione sintetica del metodo APAT-IRSA 5160 B2

Preparazione campione	0,5-2 litri, a pH ≤ 2 con HCl 1:1
Estrazione	20+20 mL di 1,1,2-tricloro trifluoroetano
Purificazione	0,5 g gel di silice + 0,3 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anidro
Tecnica analitica	spettrofotometria IR
Taratura	area 3015-2800 cm <sup>-1</sup> con soluzioni di miscela 1/1 di n-esadecano/ isoottano
Intervallo di misura	≥ 0,05 mg/L

La Procedura di Prova oggetto dello studio, progettata secondo quanto codificato nel metodo APAT-IRSA 5160 B2 e nel metodo APHA 5520 B (1998), introduce variazioni in accordo con quanto espresso nel documento APAT (2005) e con quanto già sperimentato in molti anni di attività nei laboratori ARPAV.

Tali variazioni hanno interessato le modalità di taratura e di purificazione degli estratti, come riepilogato in Tab. 2.

Tab. 2 - Variazioni sperimentate rispetto al metodo APAT-IRSA 5160 B2

purificazione	fluorisil
taratura	altezza del picco a 2930 cm <sup>-1</sup> con soluzioni di n-esano

**STUDIO COLLABORATIVO**

Lo studio collaborativo *ARPAVRING\_0106* è stato organizzato dal Centro Qualità Dati di ARPAV e vi hanno partecipato sette laboratori di ARPA Veneto. Lo studio collaborativo si è svolto da novembre 2005 a luglio 2006 attraverso le seguenti fasi:

- 1) studio di fattibilità per la produzione del materiale di prova;
- 2) produzione del materiale di prova;
- 3) test di omogeneità e stabilità sul materiale di prova;
- 4) invio ai laboratori di: protocollo, Procedura di Prova, scheda raccolta risultati, codice laboratorio;
- 5) invio ai laboratori del materiale di prova in condizioni refrigerate;
- 6) raccolta risultati analitici dai laboratori;
- 7) conclusione dei test di stabilità sul materiale di prova;
- 8) elaborazioni statistiche dei dati raccolti;
- 9) realizzazione Rapporto Conclusivo e invio ai laboratori;
- 10) incontro tecnico con i partecipanti.

I laboratori hanno utilizzato la stessa Procedura di Prova per determinare la concentrazione di idrocarburi totali in acque sotterranee contenenti gasolio da trazione, a un livello di concentrazione di qualche centinaio di µg/L.

Il disegno sperimentale e statistico alla base dello studio ha previsto l'invio ai laboratori di due diversi tipi di materiale di prova:

- a) tre bottiglie di acqua contaminata da idrocarburi (tre aliquote di materiale denominato WH0206) al fine di stimare ripetibilità, riproducibilità e percentuale di recupero della Procedura di Prova.
- b) tre *vials* contenenti soluzioni di idrocarburi in freon (tre aliquote di materiale denominato FH0106) al fine di individuare eventuali scostamenti sistematici legati all'utilizzo del solo n-esano nella taratura strumentale.

Il protocollo prevedeva una singola analisi per ciascuna aliquota di entrambi i tipi di materiali, in quanto l'analisi dei materiali acquosi (materiale di prova WH0206) richiede l'utilizzo dell'intera aliquota con lavaggio del contenitore. Il protocollo indicava di eseguire le 6 misure (3 aliquote WH0206 e 3 aliquote FH0106) operando in condizioni di ripetibilità ristretta.

## I MATERIALI DI PROVA

Il materiale di prova WH0206 è costituito da aliquote del volume di circa un litro di acqua sotterranea distribuita dalla rete acquedottistica cittadina, stabilizzata con 5 mL HCl 1/1 (fino a pH 2), opportunamente fortificate con idrocarburi (gasolio da trazione). Il disegno sperimentale di produzione prevede la fortificazione di ciascuna bottiglia con microquantità di gasolio. Sono state prodotte ed etichettate 50 aliquote.



Fig. 1 - Etichetta del materiale di prova WH0206

Negli studi di fattibilità del materiale, è stata riposta particolare attenzione al fatto che nel materiale di prova gli idrocarburi si trovassero potenzialmente nelle stesse condizioni dei campioni reali. Questo aspetto di similitudine con i campioni di routine risulta il presupposto fondamentale per l'estendibilità dei risultati ottenuti alle normali condizioni analitiche.

Le modalità di produzione del materiale hanno permesso di evitare la presenza di solventi potenzialmente interferenti nelle fasi di ripartizione, purificazione e lettura IR previste dalla Procedura di Prova.

Nella fase di produzione di WH0206 sono stati considerati vari aspetti:

- scelta dei contenitori,
- analisi bianco dei contenitori,
- soluzione di stabilizzazione,
- fortificazione, disegno sperimentale produzione,
- test di controllo di produzione,
- studi di omogeneità,
- studi di stabilità.

**Scelta dei contenitori:** sono stati eseguite prove su tre tipologie di contenitori (cinque flaconi per ciascun tipo), che hanno portato alla scelta, per il materiale WH0206, di flaconi da laboratorio in vetro con filettatura, con tappo filettato in PP e sottotappo in caucciù rivestito da entrambi i lati con PTFE.

**Analisi bianco dei contenitori:** tutti i 50 flaconi, destinati ad accogliere le aliquote del materiale di prova, sono stati lavati con freon e sul freon di lavaggio è stata misurata con IR la presenza di interferenti. La concentrazione media di interferenti estraibile è risultata equivalente a 4 µg/L (espressi come idrocarburi - IR) con uno scarto tipo di 1 µg/L.

**Soluzione di stabilizzazione:** la soluzione di HCl 1/1 è stata testata per quanto riguarda l'apporto di interferenti.

**Fortificazione e disegno sperimentale di produzione:** il livello di concentrazione teorico stimato per via ponderale risulta essere:

$$C_{WH0206} \pm 2 s = 285 \pm 20 \mu\text{g/L}$$

L'incertezza è stata stimata con approccio metrologico (ARPA Emilia-Romagna, 2003).

**Test di controllo di produzione:** le 50 aliquote prodotte, indicate con numero progressivo da 1 a 50, nella fase di produzione sono state opportunamente intervallate con erogazioni destinate al controllo gravimetrico ed al controllo mediante analisi IR delle quantità erogate.

I risultati di tali controlli di produzione hanno evidenziato, su 9 determinazioni gravimetriche delle erogazioni eseguite, uno scarto tipo relativo pari allo 0,4 %; parallelamente, i controlli su 9 erogazioni per spettrometria IR, hanno portato ad uno scarto tipo relativo dello 0,6 % con una media pari a 275 µg/L.

**Studio di omogeneità:** dieci aliquote prodotte di WH0206 sono state avviate alla misura di concentrazione di idrocarburi presso un unico laboratorio. Le suddette aliquote sono state scelte omogeneamente lungo tutta la produzione. Per la misura è stata utilizzata la procedura analitica oggetto dello studio collaborativo.

La concentrazione media misurata è stata di 172 µg/L con uno scarto tipo di 17 µg/L pari ad un coefficiente di variazione del 10%.

**Studio di stabilità:** una valutazione della stabilità del materiale WH0206 è stata effettuata considerando una prima serie di misure eseguite nello studio di omogeneità (tempo  $t_0 = 0$ ) e una seconda serie di misure su 3 aliquote analizzate al termine della sessione sperimentale di misura dello studio (tempo  $t_1 \approx 40$  gg ca.).

Il Test-t ( $\alpha = 0,05$ ), effettuato sulle medie delle due serie di misure, non ha evidenziato differenze significative.

Il materiale di prova FH0106 è costituito da 21 vials della capacità di 22 mL, contenenti circa 11 mL di freon fortificato con gasolio.

Il tenore di gasolio in freon era tale per cui 50 mL contengono 285 µg di gasolio (corrispondenti ad una concentrazione di 285 µg/L se riferita ad 1 litro d'acqua).

L'incertezza stimata sulla concentrazione riferita ad 1 litro d'acqua risulta equivalente a 20 µg/L ( $k=2$ ).

Le aliquote sono state consegnate ai laboratori pesate e refrigerate; il trasporto è avvenuto in borse isolate termicamente.

Per verificare eventuali variazioni di massa indotte dal trasporto i laboratori hanno eseguito, prima della misura IR, determinazioni gravimetriche delle vials con bilancia analitica. Tale controllo non ha evidenziato significative variazioni di massa dovute al trasporto.

**DISCUSSIONE TECNICA E STATISTICA DEI RISULTATI DELLO STUDIO COLLABORATIVO**

L'elaborazione dei risultati sperimentali (7 laboratori, ciascuno con una replica effettuata su ciascuna delle 3 aliquote per ognuno dei due materiali di prova) segue lo schema indicato in ISO 5725-2.

Con basse numerosità di laboratori partecipanti non sempre i test statistici di Grubbs e Cochran, proposti nella ISO 5725-2, garantiscono una sufficiente efficacia nell'individuare la presenza di outliers e ciò può condurre a sovrastima di ripetibilità e riproducibilità.

Inoltre un'eventuale esclusione degli outliers individuati, riduce ulteriormente la numerosità di dati nel set elaborato limitandone la significatività.

In questi casi, la ISO 5725-5:1998(E) ammette l'utilizzo di metodi statistici robusti, che permettono una ragionevole elaborazione dei dati sperimentali anche in presenza di outliers.

Le elaborazioni sono state quindi condotte utilizzando l'Analisi della Varianza Robusta con il software "AMC Robust Reproducibility/ANOVA" prodotto dalla Analytical Methods Committee e reso disponibile on line dalla Royal Society of Chemistry (2001).

E' stato inoltre utilizzato l'algoritmo A riportato in ISO 5725-5 e in ISO 13528:2005 per la stima dei valori robusti della media e per la stima dello scarto tipo della media dei dati.

**Elaborazione dati FH0106: idrocarburi in freon**

I risultati sperimentali delle misure condotte sul materiale di prova FH0106 (7 laboratori, 21 misure) sono riportati in Tabella 3.

I laboratori partecipanti hanno espresso i valori di concentrazione come se il parametro derivasse da un processo di estrazione di un litro di soluzione acquosa secondo la Procedura di Prova testata.

Tab. 3 - Risultati dello studio collaborativo su FH0106\* (µg/L)

lab-code	1° aliquota	2° aliquota	3° aliquota
B	283,0	294,0	311,0
C	296,0	292,0	310,0
D	260,0	280,0	283,0
E	295,9	299,6	307,1
G	225,0	233,0	265,0
I	286,0	284,0	298,0
L	306,0	298,0	301,0

\*7 laboratori ciascuno con 1 replica effettuata su 3 aliquote: 21 misure

Sulle misure sono stati eseguiti i test di Grubbs e Cochran secondo la norma ISO 5725-2; è stato individuato il laboratorio G come *straggler* secondo il test di Grubbs. Il set di dati, dal quale sono escluse le misure del laboratorio G (6 laboratori - 18 misure), presenta una distribuzione normale secondo il test di Shapiro Wilks ( $\alpha=0,05$ ), condotto secondo le modalità indicate nel documento "Update – Practical Methods for Data Analysis" (EPA, 2000).

Su questo set di dati sono state eseguite le elaborazioni secondo ISO 5725-2 stimando:

$S_r^2$ : stima della varianza di ripetibilità, corrisponde alla media aritmetica della varianza intralaboratorio (*repeatability variance*);

$S_L^2$ : stima della varianza interlaboratorio (*between-laboratory variance*);

$S_R^2$ : stima della varianza di riproducibilità (*reproducibility variance*) ( $S_R^2 = S_r^2 + S_L^2$ ).

In Tab. 4 sono presentati i risultati ottenuti.

Tab. 4 - Materiale di prova FH0106: elaborazioni secondo ISO 5725-2:1994(E) (µg/L)			
		Grande media →	293,6
$S_r^2$ →	91,82	$S_r$ →	9,58
$S_L^2$ →	78,58	$S_L$ →	8,86
$S_R^2$ →	170,39	$S_R$ →	13,05

Utilizzando ANOVA robusta (Royal Society of Chemistry, 2001) su tutte le 21 misure di Tab. 3, vengono stimate le seguenti grandezze come riportato in Tab. 5:

*Within-group repeatability SD*:  $S_r$  scarto tipo di ripetibilità

*Between-group SD*:  $S_L$  scarto tipo interlaboratorio

*Reproducibility SD*:  $S_R$  scarto tipo di riproducibilità.

Tab. 5 - Materiale di prova FH0106: output del software AMC Robust Reproducibility ANOVA (c=1,5; Convrit=0,0001).

	(µg/L)
Grand Mean	290,1
Within-group repeatability SD	10,85
Between-group SD	13,29
Reproducibility SD	17,15

Riprendendo i risultati della elaborazione secondo la statistica robusta di Tab. 5, si possono riassumere, per quanto riguarda la fase di analisi strumentale, le prestazioni riportate in Tab. 6.

Tab. 6 - Materiale di prova FH0106: risultati dello studio collaborativo - fase di analisi strumentale

	µg/L	%
Grande media	290,1	
Scarto tipo di Ripetibilità	10,85	3,7
Scarto tipo di Riproducibilità	17,15	5,9

Sul set di dati di Tab. 3 sono state anche stimate la media robusta e la deviazione standard robusta secondo l'algoritmo A riportato nella norma ISO 5725-5, paragrafo 6.2. L'incertezza della media è stata calcolata secondo la norma ISO 13528 (2005). Tali grandezze sono riportate in Tab. 7.

Tab. 7 - Materiale di prova FH0106: elaborazioni Algoritmo A ISO 5725-5 e ISO 13528:2005

	(µg/L)
Robust Mean	293,4
Robust standard deviation	9,06
Standard uncertainty ux of mean	4,21

Nel disegno sperimentale della produzione dei materiali di prova utilizzati in questo studio, le modalità di produzione di FH0106 prevedevano una concentrazione uguale, in fase di lettura in IR, all'estratto di WH0206; quindi, riferendosi ad un litro di campione acquoso, pari alla concentrazione teorica di  $285 \pm 20 \mu\text{g/L}$  ( $k=2$ ). Dallo studio collaborativo i 7 laboratori hanno fornito un valore di concentrazione medio per FH0106 pari a  $293,4 \pm 8,4 \mu\text{g/L}$  ( $k=2$ ), che confrontato con il valore teorico ( $285 \pm 20 \mu\text{g/L}$ ), non ne risulta significativamente diverso.

Non risultano quindi evidenti scostamenti sistematici legati all'utilizzo del solo n-esano nella taratura strumentale.

**Elaborazione dati WH0206: idrocarburi in acqua sotterranea**

I risultati sperimentali delle misure condotte sul materiale di prova WH0206 (7 laboratori, 21 misure) sono riportati in Tab. 8.

Tab. 8 - Risultati dello studio collaborativo su WH0206 (µg/L)

lab-code	1° aliquota	2° aliquota	3° aliquota
B	174	178	185
C	80	89	110
D	212	162	153
E	180	210	232
G	154	287	163
I	192	198	209
L	100	110	95

\*7 laboratori ciascuno con 1 replica effettuata su 3 aliquote 21 misure

Due laboratori hanno eseguito le misure con modalità non conformi al protocollo e, quindi, non omogenee con gli altri (il laboratorio C eseguiva un'unica estrazione con l'intero volume di freon e il laboratorio L dichiarava gravi e irrisolti problemi relativi al bianco) e sono stati esclusi dal set dei dati elaborati. Sul set dei dati utilizzabili (5 laboratori, 15 misure) sono stati eseguiti i test di Grubbs e Cochran secondo la norma ISO 5725-2; è stato individuato il laboratorio G come *straggler* secondo il test di Cochran. Il set di dati risultante (la misura della seconda aliquota del laboratorio G viene esclusa: 5 laboratori, 14 misure) presenta una distribuzione normale secondo il test di Shapiro Wilks ( $\alpha=0,05$ ), condotto secondo le modalità indicate nel documento "Update – Practical Methods for Data Analysis" (EPA, 2000).

Su questo set vengono stimate, secondo la norma ISO 5725-2, le grandezze riportate in Tab. 9 (trascurando la diversa numerosità di repliche del laboratorio G).

Tab. 9 - Materiale di prova WH0206: elaborazioni secondo ISO 5725-2:1994 (E) (µg/L)

Grande media → 184,0	
$S_r^2 \rightarrow 367,50$	$S_r \rightarrow 19,17$
$S_L^2 \rightarrow 261,14$	$S_L \rightarrow 16,16$
$S_R^2 \rightarrow 628,64$	$S_R \rightarrow 25,07$

Sul set dei dati di Tab. 8 esclusi i Laboratori C e L (5 laboratori, 15 misure) vengono stimate secondo ANOVA Robusta AMC (Royal Society of Chemistry, 2001) le grandezze presentate in Tab. 10.

Tab. 10 - Materiale di prova WH0206: output del software AMC Robust Reproducibility ANOVA (c=1,5: Convcrit=0,0001).

	(µg/L)
Grand Mean	185,9
Within-group repeatability $S_r$	22,44
Between-group $S_L$	13,60
Reproducibility $S_R$	26,24

Lo scarto tipo relativo di ripetibilità è pari a 12% della Grande Media e quello di riproducibilità è pari a 14%.

Sui dati elaborati secondo AMC (5 laboratori, 15 misure) sono state anche stimate la media robusta e la deviazione standard robusta secondo l'algoritmo A riportato nella norma ISO 5725-5, paragrafo 6.2. La incertezza della media è stata calcolata secondo la norma ISO 13528:2005 (E). Tali grandezze sono riportate in Tab. 11.

Tab. 11 - Materiale di prova WH0206: elaborazioni Algoritmo A ISO 5725-5 e ISO 13528:2005 (µg/L)

Robust Mean →	194,7
Robust standard deviation	12,94
Standard uncertainty $u_x$ of mean	7,11

Il recupero R viene calcolato secondo la (1):

$$R = \frac{GM}{T} \quad (1)$$

Con GM pari alla concentrazione di idrocarburi in WH0206 stimata come Grande Media dallo studio collaborativo (Tab. 11) e T pari alla concentrazione teorica di WH0206.

L'incertezza sul recupero R può essere espressa secondo la (2):

$$\frac{\partial R}{R} = \sqrt{\left(\frac{\partial GM}{GM}\right)^2 + \left(\frac{\partial T}{T}\right)^2} \quad (2)$$

Esplicitando:

	valore medio X	incertezza $\frac{\partial X}{X}$	$\left(\frac{\partial X}{X}\right)^2$
GM (µg/L)	194,7	7,1 <sup>(1)</sup>	0,00133
T (µg/L)	285	10 <sup>(2)</sup>	0,00123

(1) da Tab. 11 incertezza standard della media

(2) da § 4 incertezza valore teorico (k=1)

Da cui il  $\partial R/R$  risulta pari a 0,051.

Considerando la Grande Media come calcolata in Tab. 11, il recupero R viene stimato come 68% ± 7% (k=2).

Le stime delle caratteristiche della Procedura di Prova testata, nei limiti dell'esperimento condotto, sono riepilogate in Tab. 12.

Tab. 12 - Materiale di prova WH0206: risultati dello studio collaborativo (%)

Recupero	68
Ripetibilità	12
Riproducibilità	14

## CONCLUSIONI

Dall'analisi dei risultati dello studio collaborativo possono essere tratte le considerazioni seguenti:

- Non emerge l'evidenza di uno scostamento sistematico significativo tra le osservazioni e la presenza di gasolio da trazione dovuto alla taratura in n-esano.
- Il confronto tra le informazioni di "qualità del dato" riportate del metodo di analisi di APAT-IRSA e i risultati ottenuti, porta alle seguenti considerazioni:
- il coefficiente di variazione riportato pari al 7% (5 misure a concentrazione pari a 0,30 mg/L) risulta ragionevolmente prossimo a quello registrato nei test di omogeneità del materiale WH0206 pari al 10% riferito alla media (su 10 aliquote, con recupero stimato del 60% del teorico ponderale);
- il recupero riportato in APAT-IRSA 5160 B2 è pari al 98 % a intervalli di concentrazione compresi tra 1 e 5 mg/L. Il recupero emerso nello studio collaborativo è risultato del 68 ± 7 % (k=2) a concentrazione di 300 µg/L;
- non sono disponibili informazioni di riproducibilità del metodo.

- Da prove di fortificazione effettuate in precedenti esperimenti di laboratorio, sembra risultare un maggiore recupero medio, laddove gli idrocarburi vengono aggiunti ai campioni test già nella soluzione di freon estraente. Tale procedimento preclude probabilmente il raggiungimento, nel campione, degli equilibri di adsorbimento e separazione di fase coinvolgenti i contenitori.
- Con una disomogeneità massima residua stimata dai test di produzione pari a circa l' 1 % e nessuna evidenza di instabilità nei tempi di realizzazione dello studio collaborativo, il materiale WH0206 è risultato adeguato ad utilizzi in circuiti interlaboratorio con variabilità intra- e interlaboratorio non inferiori al 4% (ISO 13528:2005 E).

E' sembrato più opportuno stimare la presunta disomogeneità residua tra aliquote dai test di produzione piuttosto che da quelli di omogeneità. Infatti questi ultimi sono stati condotti utilizzando la stessa Procedura di Prova in esame che prevede l'analisi dell'intera aliquota. Ciò non permette la replica delle misure sulla stessa aliquota e quindi rende non possibile la disaggregazione, attraverso ANOVA, della disomogeneità tra aliquote dalla variabilità analitica.

Il materiale di prova WH0206, dato il contenuto nullo di solventi diversi, si è comportato ragionevolmente in maniera analoga ai campioni normalmente analizzati, lasciando quindi ipotizzare la possibilità di estendere le conclusioni tratte dallo studio coloborativo al caso generale della normale attività analitica.

In assenza di disponibilità di MRC in matrice, la stima del recupero percentuale in questo studio, deve essere considerata come semplice indicazione di accuratezza del metodo. Eventuali risultati ottenuti su MRC in matrici diverse da quella in oggetto, non sono traslabili (*Commutability*) date le peculiarità del metodo stesso.

La Procedura di Prova testata, con step strumentale robusto e privo di grosse deviazioni sistematiche di taratura, si è dimostrata invece sensibile ad alcuni aspetti procedurali: come qualunque altra procedura basata su tecniche analitiche intrinsecamente di modesta selettività, si è dimostrata vulnerabile a contaminazioni durante l'esecuzione analitica. Tale vulnerabilità trova immediata evidenza nella modesta ripetibilità, laddove il numero di ripetizioni non permette di evidenziare la presenza di *outlier*.

Inoltre sono emerse indicazioni per sospettare la presenza di scostamenti sistematici collegati con la non completa estrazione degli idrocarburi dal campione acquoso.

Le prestazioni della procedura di prova stimate nello studio collaborativo (idrocarburi in acqua sotterranea), alle condizioni studiate (gasolio da trazione alla concentrazione di circa 300 µg/L), possono essere così riepilogate:

Recupero %	68±7 (k =2)
Ripetibilità %	12
Riproducibilità %	14

## BIBLIOGRAFIA

ANALYTICAL METHOD COMMITTEE (AMC) (2001): "*Robust statistics: a method of coping with outliers*", Technical brief No. 6, Royal Society of Chemistry, April 2001.

APAT, IRSA-CNR (2003): "*Metodi analitici per le acque*", Manuali e Linee guida n. 29/2003, 3 volumi, 1153 pp, Metodo 5160 B2.

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed. (Washington, APHA), Method 5520 B.

ARPA EMILIA-ROMAGNA (2003): "*Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura*" - I manuali di ARPA.

DECRETO LEGISLATIVO n. 152 del 3 aprile 2006. *Norme in materia ambientale*. Allegato 5, titolo V "Valori di Concentrazione soglia di contaminazione nel suolo, nel sottosuolo e nelle acque sotterranee in relazione alla specifica destinazione d'uso dei siti", G.U. 14 aprile 2006, n. 88.

EPA (2000): "*Guidance for data quality Assessment - Practical Methods for Data Analysis*", QA/G-9 QA00 update, EPA/600/R-96/084, July 2000.

IAEA-TECDOC-1350 (2003): "*Development and use of reference materials and quality control materials*" - International Atomic Energy Agency IAEA - April 2003.

ILAC-G12:2000. "*Guidelines for the Requirements for the Competence of Reference Material Producers*".

ISO 5725-1:1994. "*Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions*".

ISO 5725-2 1994(E). "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method".

ISO 5725-3:1994(E). "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 3 Intermediate measures of the precision of a standard measurement method".

ISO 5725-4:1994(E). "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 4 Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method".

ISO 5725-5:1994(E). "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 5 Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method".

ISO 5725-6:1994(E). "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 6 Use in practice of accuracy values".

ISO 13528:2005 (E). "Statistical Methods for use in Proficiency testing by Interlaboratory Comparisons".

LABORATORY OF THE GOVERNMENT CHEMIST (LGC) (1998): "Guidelines for the In-House Production of Reference Materials", LGC/VAM/1998/040, LGC, Teddington, Middlesex, UK, July 1998.

PRIMO RAPPORTO TASK FORCE METODOLOGIE SITI CONTAMINATI (2005): Note tecniche e proposte di interpretazione e di aggiornamento del DM 471/99: APAT – Servizio Interdipartimentale per le Emergenze Ambientali – Settore Sistemi Integrati Ambientali – Revisione 0, maggio 2005.

THOMPSON M., WOOD R. (1993): "International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (chemical) Analytical Laboratories, *J. AOAC Int.*, **76**, (4), 926.

*Un ringraziamento va ai laboratori di ARPA Veneto partecipanti allo studio collaborativo. La definizione di omogeneità e di stabilità delle aliquote dei materiali di prova utilizzati nello studio ha richiesto la realizzazione di 89 misure di idrocarburi e 88 misure gravimetriche. Un cenno di ringraziamento particolare va quindi al Servizio Laboratorio Provinciale di Vicenza.*

## DETERMINAZIONE DI POLIBROMODIFENILETERI NELLA FASE ACQUOSA E NEL PARTICOLATO SOSPESO DI ACQUE SUPERFICIALI

a cura di Roscioli C.\* e Guzzella L.\*

\* IRSA-CNR, Brugherio (MI)

### RIASSUNTO

È proposto un metodo analitico per la determinazione dei principali congeneri di polibromodifenileteri (PBDE) sia in fase disciolta che nel particolato sospeso. I congeneri considerati, da 3-7 atomi di bromo, sono estratti dal campione acquoso mediante SPE (Solid-Phase Extraction) su fase C<sub>18</sub>, mentre il particolato è estratto in Soxhlet con una miscela *n*-esano/acetone; entrambe le fasi sono poi analizzate in GC/MS con spettrometro di massa a trappola ionica previa purificazione su colonna di Florisil.

### SUMMARY

An analytical method for the determination of polybrominated diphenyl ether congeners (PBDEs) is described for the analysis of water samples and particulate matter in surface waters. The congeners, from three to seven bromine substitution, are extracted from dissolved phase by solid-phase extraction using octadecyl C<sub>18</sub> extraction disk, whereas suspended particle phase is extracted by Soxhlet using a *n*-hexane/acetone mixture. The extracts are purified by Florisil column before analysis by fast gas chromatography interfaced with ion trap mass spectrometry.

### INTRODUZIONE

I polibromodifenileteri (PBDE, Fig. 1) sono una classe di ritardanti di fiamma alogenati usati come additivi in diversi polimeri organici e presenti, a partire dagli anni '70, in numerosi prodotti commerciali, quali i componenti elettrici ed elettronici (cavi elettrici, plastiche di *housing*), i materiali isolanti (schiume poliuretaniche), i tessuti (tappezzerie e tendaggi) e negli equipaggiamenti per veicoli. I PBDE sono commercializzati in miscele tecniche prodotte per bromurazione del difeniletere in presenza di un catalizzatore.

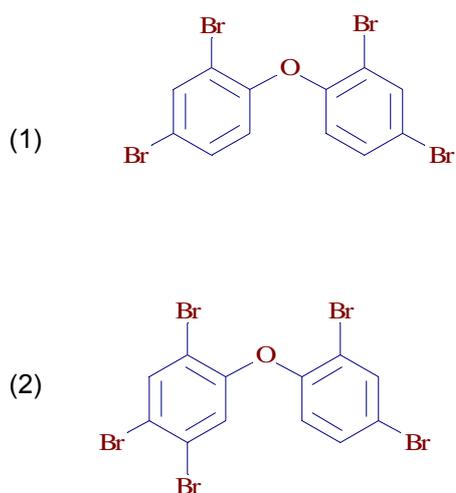


Fig. 1 - Struttura di due PBDE.

(1): 2,2',4,4'-tetrabromodifenil etere (BDE-47)

(2): 2,2',4,4',5-pentabromodifenil etere (BDE-99).

Le possibilità di sostituzione degli anelli aromatici permettono 209 diversi congeneri analogamente ai policlorobifenili (PCB), tuttavia la bromurazione produce un più limitato numero di congeneri rispetto ai PCB (Alaee et al., 2003) (circa trenta congeneri contro un centinaio dei PCB), con prevalenza degli isomeri pentabromurati, eptabromurati o decabromurati in miscele denominate commercialmente come Penta, Octa e Deca, rispettivamente (Tab. 1).

Tab. 1 - Miscele tecniche di PBDE e % delle classi isomeriche secondo la WHO/IPCS, 1994; tra parentesi l'isomero prevalente (**in grassetto**) e la % *p/p* (*in corsivo*) misurate da La Guardia et al (2006) in alcuni prodotti commerciali (Penta: Bromkal DE-71™; Octa: Bromkal DE-79™; Deca: Saytex-102E™). N.D. = non determinato.

MISCELA TECNICA	PBDE							
	Tri	Tetra	Penta	Esa	Epta	Octa	Nona	Deca
Penta	N.D. ( <b>28-</b> <i>0,3</i> )	24-38 ( <b>47-</b> <i>38,2</i> )	50-60 ( <b>99-48,6</b> )	4-8 ( <b>153-</b> <i>5,4</i> )	N.D. ( <b>183-0,1</b> )			
Octa				10-12 ( <b>153-</b> <i>8,7</i> )	43-44 ( <b>183-42</b> )	31-35 ( <b>197-</b> <i>22,2</i> )	9-11 ( <b>207-</b> <i>11,5</i> )	<1
Deca							<3 ( <b>206-</b> <i>2,2</i> )	97-98 ( <b>209-96,8</b> )

Tra i possibili congeneri, otto (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183 e 209) identificati in accordo con la numerazione sistematica di Ballschmiter e Zell) risultano di interesse primario per la frequenza di ritrovamento nel comparto abiotico e nel biota (Binelli et al., in stampa; Law et al., 2003; Law et al., 2006).

In diversi studi condotti negli ultimi 30 anni è stata dimostrata per i PBDE la possibilità di bioaccumulo in tessuti animali a diversi livelli della catena trofica, uomo compreso, a causa della loro natura lipofila e della tendenza a persistere in ambiente acquatico. Alcuni PBDE (ad es. il derivato pentabromato, CAS 32534-81-9) sono identificati come sostanze prioritarie pericolose in materia di acque e compresi nell'elenco presente nella decisione n. 2455/2001/CE conseguente la direttiva quadro 2000/60/CE. Per tali composti è stato proposto uno standard di qualità pari a 0,5 ng/L secondo la proposta di Direttiva COM (2006) n.397 relativa alle acque superficiali. Attualmente le miscele Penta e Octa di PBDE sono sotto esame per la possibilità di inclusione nella lista dei POP già individuati dalla convezione di Stoccolma nel 2001.

## 1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è stato applicato per la determinazione quantitativa di polibromodifenileteri in acque superficiali mediante estrazione in fase solida (SPE) e successiva analisi in gascromatografia/spettrometria di massa. Al fine di separare la determinazione del disciolto da quella sul particolato sospeso, quest'ultima frazione è stata separata per filtrazione, estratta con solvente mediante Soxhlet e analizzata in GC-MS. Questo accorgimento permette l'estrazione con SPE di elevati volumi d'acqua anche in campioni con un elevato contenuto di particolato sospeso, necessari per ottenere bassi limiti di rivelabilità. Per verificare i recuperi del metodo, in ogni campione sono state aggiunte come standard interni quantità note di PBDE marcati con  $^{13}\text{C}_{12}$ , almeno un congenere per ogni classe di bromurazione.

## 2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo ha consentito di quantificare nella fase acquosa i singoli congeneri 28, 47, 99, 100, 153, 154 e 183 a partire da concentrazioni di 0,05 ng/L, partendo da un volume di campione di 2,5 L (volume finale dell'estratto 100  $\mu\text{L}$ ). Nella frazione particolata sospesa è stato possibile quantificare concentrazioni a partire da 2 ng/g, estraendo 50 mg di particolato. Il metodo permette il confronto con il limite proposto dalla Direttiva di 0,5 ng/L come totale della fase disciolta + particolato per i congeneri pentabromurati e può essere esteso anche ad altri congeneri non considerati previa verifica dell'efficienza di estrazione.

## 3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Nella fase preparativa una delle cause di errore frequentemente riscontrata è la contaminazione dell'ambiente di lavoro e dei reattivi utilizzati, per cui è indispensabile effettuare regolari prove di bianco. In caso si riscontrino la presenza di tracce di congeneri, si consiglia di verificare accuratamente l'intera procedura analizzando, dove possibile, gli estratti ottenuti dai singoli passaggi (dopo estrazione, dopo concentrazione, dopo purificazione ecc.) per individuare la fonte di contaminazione. Alcuni congeneri dei PBDE, soprattutto quelli ad elevato grado di bromurazione, sono presenti nel particolato atmosferico, occorre quindi proteggere accuratamente tutta la vetreria in uso dalla polvere.

Come tutti i composti alogenati, i PBDE possono essere analizzati anche con un detector a cattura di elettroni con elevata sensibilità, tuttavia i PCB e altri composti semivolatili organoclorurati possono essere presenti in elevate concentrazioni e sono difficilmente risolvibili da alcuni tetra, penta ed esa-BDE, (una delle principali coeluzioni è data dal BDE-47 con il PCB 180) (Alaee et al., 2001). Risulta, inoltre, preclusa in GC-ECD la possibilità di usare standard interni marcati. I congeneri epta, octa, nona e il decabromodifeniletere hanno invece tempi di ritenzione più elevati dei composti semivolatili organoclorurati comunemente analizzati e in letteratura non sono riportate coeluzioni. L'uso di uno spettrometro di massa come rivelatore è consigliato e permette di evitare laboriose procedure di conferma dell'identificazione dei picchi, come l'iniezione in colonne a diversa polarità.

## 4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni sono stati prelevati in contenitori in vetro scuro trattati con un agente silanizzante allo scopo di mascherare i siti attivi polari che possono legare gli analiti. Un esempio di procedura di silanizzazione con dimetildiclorosilano è riportata in appendice. È stato evitato l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. Il campione è stato conservato a +4 °C e processato entro 48 ore dal campionamento. È stato prelevato un volume di campione pari a 10 L, seguendo i criteri e le modalità descritte nella Sezione 1030 "Metodi di campionamento" dei metodi analitici per le acque APAT-IRSA-CNR (2003).

## 5 - APPARECCHIATURE

**5.1 - Bilancia analitica**, risoluzione 0,1 mg

**5.2 - Bilancia tecnica**, risoluzione 0,1 g

**5.3 - Colonne** in vetro (1,5 x 5 cm)

**5.4 - Contenitori silanizzati**

**5.5 - Estrattore Soxhlet**

**5.6 - Microsiringhe**

**5.7 - Rampa di estrazione per SPE**

**5.8 - Rampa di filtrazione**

**5.9 - Sistema di concentrazione** sotto flusso di azoto

## 5.10 - Vetreria di laboratorio

### 6 - REATTIVI

**6.1 - Acetone** per "analisi di residui"

**6.2 - Acqua ultrapura** "HPLC grade"

**6.3 - Dischi per l'estrazione in fase solida C<sub>18</sub> Bakerbond speedisk™**, diametro 50 mm. Il disco è dotato di prefiltra e filtro per il particolato sospeso per minimizzare l'occlusione della fase estraente.

**6.4 - Etilacetato** per "analisi di residui"

**6.5 - Filtri in fibra di vetro**, 0,7 µm di porosità nominale

**6.6 - Florisil® 100-200 mesh** per cromatografia, condizionato a 650 °C prima dell'uso.

**6.7 - Isottano** per "analisi di residui"

**6.8 - Metanolo** per "analisi di residui"

**6.9 - n-Esano** per "analisi di residui"

**6.10 - Solfato di sodio anidro in polvere**, essiccato per alcune ore a 350°C e conservato in essiccatore.

### 6.11 - Soluzioni di riferimento

6.11.1 - Soluzione contenente gli standard interni marcati [<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]PBDE. Soluzione di riferimento a 0,05 ng/µL in metanolo, contenente i congeneri 28, 47, 99, 153, 154, 183. Ad ogni campione è stata aggiunta un'aliquota tale da raggiungere una concentrazione di 0,1 ng/L per ogni singolo congenere.

6.11.2 - Soluzione di riferimento per la calibrazione del GC/MS 1,0-2,0-5,0-7,5-10 µg/L, in isottano, contenenti i congeneri nativi di interesse primario 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183 e i congeneri marcati (6.11.1).

## 7 - PROCEDIMENTO

### 7.1 - Trattamento preliminare

#### 7.1.1 - Separazione della frazione particolata

La filtrazione è stata effettuata su filtro in fibra di vetro (6.5), impiegando vetreria silanizzata anche per la rampa di filtrazione in previsione dell'utilizzo del filtrato per l'estrazione della frazione disciolta. La determinazione quantitativa del particolato sospeso è stata effettuata su un'aliquota separata di campione. Il volume di campione filtrato è stato tale da poter raccogliere almeno 50 mg di particolato sospeso. Il filtro è stato posto in essiccatore per circa 24 ore a temperatura ambiente e al riparo dalla luce prima della successiva estrazione con solvente.

Per ulteriori informazioni sui metodi di separazione della frazione solida sospesa consultare la sezione 1030 "Metodi di campionamento" del manuale dei Metodi Analitici per le Acque (APAT-IRSA, 2003).

### 7.2 - Estrazione dalla fase acquosa

Ad un'aliquota di campione (fino a 2,5 L) è stato addizionato il volume della soluzione contenente gli standard di recupero marcati (6.11.1) diluiti in un 1 mL di metanolo. Il disco di estrazione è stato condizionato prima con 10 mL della miscela *n*-esano/etilacetato 9:1 (v/v), poi con 10 mL di metanolo (consentendo un tempo di contatto di almeno 1 minuto), infine con 5 mL di acqua ultrapura, evitando in ogni passaggio l'essiccamento della fase. Il campione è stato processato regolando il vuoto in modo da ottenere un flusso approssimativo di 25 mL/min. Alla fine dell'estrazione il disco è stato prima lavato con 10 mL di acqua ultrapura. Prima del completo essiccamento della fase, il contenitore di estrazione è stato lavato con 3 mL di metanolo, flussati poi a vuoto moderato attraverso il disco. La rimozione dell'acqua è stata completata flussando aria per altri 10 minuti a vuoto più spinto. Gli analiti sono stati eluiti raccogliendo 20 mL di *n*-esano/etilacetato 9:1 (v/v). L'eluato è infine stato concentrato sotto moderato flusso di azoto fino ad un volume di 0,5 mL, e sottoposto a purificazione (7.4).

### 7.3 - Estrazione dal particolato sospeso

I filtri impiegati nella separazione della frazione particolata sono stati trasferiti all'interno di un ditale in fibra di vetro per Soxhlet insieme a 2 g di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed estratti utilizzando circa 75 mL di una miscela *n*-esano/acetone 3:1 (v/v). Prima dell'inizio dell'estrazione sono stati addizionati 10 µL della soluzione di PBDE marcati (6.11.1) direttamente nel solvente estraente. L'estrazione è stata protratta in modo da realizzare complessivamente 20 cicli. Al termine dell'estrazione il solvente è stato concentrato a 0,5 mL sotto moderato flusso di N<sub>2</sub>, quindi sottoposto a purificazione (7.4).

Ogni serie di estrazioni è stata accompagnata da una prova di bianco comprendente i filtri, il solfato di sodio anidro e i PBDE marcati.

### 7.4 - Purificazione su Florisil

L'estratto proveniente dalla concentrazione in SPE o da Soxhlet è stato purificato per passaggio su Florisil nel seguente modo: la colonna di vetro (5.3) è stata impaccata con 1 g di Florisil e condizionata con 3 mL di *n*-esano/etilacetato 9:1 (v/v), successivamente l'estratto è stato posto in testa alla colonna ed eluito raccogliendo 5 mL di *n*-esano/etilacetato 9:1 (v/v). Dopo l'aggiunta di 2 mL di isottano, l'eluato è stato concentrato sotto moderato flusso di azoto fino ad un volume di 100 µL in *vial* a fondo conico per l'analisi gascromatografica.

### 7.5 - Analisi dell'estratto mediante gascromatografia e spettrometria di massa

Di seguito è riportato il metodo strumentale adottato per l'analisi gascromatografica dei PBDE nel presente metodo, tuttavia in letteratura è possibile reperire dettagliate informazioni su condizioni cromatografiche adattabili al proprio sistema analitico. L'elevato punto di ebollizione e peso molecolare caratterizzano il comportamento cromatografico dei PBDE che hanno tempi di ritenzione elevati rispetto ad altri microinquinanti organoalogenati comunemente analizzati in gascromatografia. Il miglior tipo di iniettore utilizzabile per questa classe di composti è l'*on-column*, seguito dal *programmable temperature vaporizer* (PTV). L'iniettore split/splitless a temperatura costante non consente di raggiungere elevate efficienze di trasferimento in colonna per i congeneri con 7-10 atomi di bromo, anche a causa di fenomeni di decomposizione termica e adsorbimento sulle superfici dell'iniettore (Binelli et al., 2006; USEPA, 2005); l'uso di liner accuratamente disattivati può minimizzare questi problemi. Nel caso si usino colonne capillari con diametro interno "standard" di 0,32 o 0,25 mm e spessore della fase stazionaria 0,10-0,25  $\mu\text{m}$ , si consiglia di non superare la lunghezza di 30 m per l'analisi dei congeneri mono-eptabromurati, mentre per gli octa, nona e deca è consigliabile non superare i 15 m per evitare eccessivi tempi di ritenzione e conseguenti fenomeni di decomposizione dell'analita nella colonna capillare. L'uso di colonne per fast-GC (0,10-0,20 mm I.D., lunghezza 5-15 m) consente di minimizzare i fenomeni descritti, mantenendo una buona risoluzione. La maggior parte delle fasi stazionarie apolari o moderatamente polari (per es. la 5% fenil, 95% metilpolisilossano) sono adatte a risolvere i congeneri considerati ed eventuali possibili coeluzioni (come tra il BDE-28 e BDE-33) sono riportate in letteratura (Korytar et al., 2005). I PBDE possono essere analizzati sia in spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) (USEPA, 2003) che a bassa risoluzione (LRMS) (USEPA, 2005) con analizzatori quadrupolari (anche in configurazione a trappola ionica), anche se solo quest'ultimi sono ampiamente diffusi nei laboratori e sono comunque caratterizzati da buone sensibilità strumentali. Particolare attenzione deve essere posta nel verificare l'accuratezza dello spettrometro di massa nell'attribuire le masse nella parte "alta" dello spettro. Per i quadrupoli lineari la tecnica d'acquisizione più sensibile è la ionizzazione chimica (principalmente con metano come gas reagente) con acquisizione di ioni negativi (NCI, Negative Chemical Ionization); per la configurazione a trappola ionica è possibile impiegare la massa-massa (MS/MS).

In quest'ultimo caso la tecnica prevede l'intrappolamento e la frammentazione di uno ione parentale e la successiva acquisizione di uno spettro di "frammentazione" caratteristico della molecola: nel caso dei PBDE le perdite caratteristiche sono 2Br e COBr. Queste due tecniche di acquisizione consentono di ottenere sensibilità inferiori al  $\mu\text{g/L}$  con un'adeguata selettività. Se si sceglie di operare in SIM (Selected Ion Monitoring) occorre acquisire almeno 2 valori di  $m/z$  per ogni composto e verificarne le abbondanze relative per confermare l'identificazione del picco. Il metodo strumentale dovrebbe essere in grado di acquisire contemporaneamente sia i composti nativi che i marcati con isotopi stabili aggiunti come standard interni.

In Tab. 2-3 sono riportate le condizioni operative utilizzate nel presente metodo per l'analisi gascromatografica dei PBDE contenenti da 3 a 7 atomi di bromo e i tempi di ritenzione relativi al BDE-99 ottenuti nelle stesse condizioni. In Tab. 4 sono riportati i parametri strumentali impostati per l'acquisizione in MS/MS nello spettrometro di massa a trappola ionica impiegato (PolarisQ, Thermo Fisher Scientific, USA).

Tab. 2 - Condizioni gascromatografiche per l'analisi dei tri/epta-BDE

Colonna		
Restek Rxi <sup>TM</sup> -5MS, 10 mx 0,18 mm x 0,18 $\mu\text{m}$		
<b>INIETTORE PTV</b>		
Temperatura iniziale	°C	60
Flusso iniziale	mL/min	0,6
Tempo iniziale	sec	6
Rampa	°C/sec	5
Temperatura finale	°C	320
Tempo finale	sec	120
Tempo di splitless	sec	60
Volume iniettato	$\mu\text{L}$	2
<b>FORNO</b>		
Temperatura iniziale	°C	125
Tempo iniziale	min	0,5
Rampa	°C/min	20
Temperatura finale	°C	320
Tempo	min	0,5
<b>CARRIER GAS</b>		
He, flusso costante	mL/min	0,6
<b>SPETTROMETRO DI MASSA</b>		
Temperatura transfer line	°C	300
Temperatura sorgente	°C	260
Damping gas	mL/min	1,0

Tab. 3 - Tempi di ritenzione relativi al BDE-99 nelle condizioni cromatografiche riportate in Tab. 2.

CONGENERE	RITENZIONE RELATIVA (BDE-99 = 1)
BDE-28/[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-28	0,74
BDE-47/[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-47	0,87
BDE-100	0,97
<b>BDE-99/[<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]BDE-99</b>	<b>1,00 (7,74 min)</b>
BDE-154/[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-154	1,08
BDE-153/[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-153	1,11
BDE-183/[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-183	1,22

Tab. 4 - Impostazioni adottate per l'acquisizione in MS/MS dei PBDE nativi e marcati. Per le condizioni gascromatografiche vedi Tab. 2.

CONGENERE	SOSTITUZIONE	PRECURSORE (m/z) (M = IONE MOLECOLARE)	ENERGIA DI FRAMMENTAZIONE (V)	FRAMMENTI PER LA QUANTIFICAZIONE (m/z)
BDE-28	2,4,4'	405,8 [M+2] <sup>+</sup>	2,70	246,0 + 248,0
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-28	2,4,4'	417,8 [M+2] <sup>+</sup>	2,70	258,0 + 260,0
BDE-47	2,2',4,4'	485,7 [M+4] <sup>+</sup>	2,80	323,9 + 325,9 + 327,9
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-47	2,2',4,4'	497,8 [M+4] <sup>+</sup>	2,80	335,9 + 337,9 + 339,9
BDE-99	2,2',4,4',5	565,6 [M+6] <sup>+</sup>	3,10	403,8 + 405,8 + 407,8
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-99	2,2',4,4',5	577,7 [M+6] <sup>+</sup>	3,10	415,8 + 417,8 + 419,8
BDE-100	2,2',4,4',6	565,6 [M+6] <sup>+</sup>	3,10	403,8 + 405,8 + 407,8
BDE-153	2,2',4,4',5,5'	483,7 [M+4-2Br] <sup>+</sup>	4,40	374,8 + 376,8 + 402,8 + 404,8
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-153	2,2',4,4',5,5'	495,7 [M+4-2Br] <sup>+</sup>	4,40	335,9 + 385,8 + 387,8 + 414,8 + 416,8
BDE-154	2,2',4,4',5,6'	483,7 [M+4-2Br] <sup>+</sup>	4,40	374,8 + 376,8 + 402,8 + 404,8
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-154	2,2',4,4',5,6'	495,7 [M+4-2Br] <sup>+</sup>	4,40	335,9 + 385,8 + 387,8 + 414,8 + 416,8
BDE-183	2,2',3,4,4',5',6	563,6 [M+6-2Br] <sup>+</sup>	4,20	454,7 + 456,7 + 482,7 + 484,7
[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]BDE-183	2,2',3,4,4',5',6	575,6 [M+6-2Br] <sup>+</sup>	4,20	465,7 + 467,7 + 494,7 + 496,7

**8 - CALCOLI**

La calibrazione multi-livello è stata effettuata mediante standard esterno, iniettando soluzioni di calibrazione in un intervallo di concentrazione compreso tra i 1 µg/L e i 10 µg/L contenenti sia i nativi che i marcati, dopo aver verificato l'intervallo di linearità del rivelatore. I dati di concentrazione sono stati calcolati attraverso il software di acquisizione.

La % di recupero di ogni singolo congenere di PBDE <sup>13</sup>C<sub>12</sub> (R<sub>ids</sub>) dalla fase acquosa è stata calcolata nel seguente modo:

$$\%R_{ids} = \frac{C_{ids} \cdot V_{fds}}{C_T \cdot V_{agg}} \cdot 100$$

dove:

C<sub>ids</sub>=Concentrazione (µg/L) del congenere R<sub>i</sub> nell'estratto

V<sub>fds</sub>= Volume finale (mL) dell'estratto

C<sub>r</sub> =Concentrazione (ng/µL) della soluzione di riferimento (6.11.1)

V<sub>agg</sub> = Volume (µL) della soluzione C<sub>r</sub> aggiunto

Con limite di accettabilità fissato nell'intervallo 60-110 %.

La % di recupero di ogni singolo congenere di PBDE <sup>13</sup>C<sub>12</sub> (R<sub>spm</sub>) dal particolato sospeso è stata ottenuta nel seguente modo:

$$\%R_{spm} = \frac{C_{ispm} \cdot V_{fspm}}{C_T \cdot V_{agg}} \cdot 100$$

C<sub>ispm</sub>=Concentrazione (µg/L) del congenere R<sub>i</sub> nell'estratto

V<sub>fspm</sub> = Volume finale (mL) dell'estratto

C<sub>r</sub> =Concentrazione (ng/µL) della soluzione di riferimento (6.11.1)

V<sub>agg</sub>= Volume (µL) della soluzione C<sub>r</sub> aggiunto

Con limite di accettabilità fissato nell'intervallo 60-110 %.

Per ogni singolo congenere la concentrazione finale in ng/L (C<sub>i</sub>) nel campione è stata calcolata nel seguente modo:

$$C_i = \frac{C_{ds} \cdot V_{fds}}{V_{cds}} + \frac{C_{spm} \cdot V_{fspm}}{V_{cspm}}$$

C<sub>ds</sub>= Concentrazione (µg/L) del congenere R<sub>i</sub> nell'estratto dalla fase acquosa

C<sub>spm</sub>= Concentrazione (µg/L) del congenere R<sub>i</sub> nell'estratto dalla fase particolata

V<sub>cds</sub> = Volume di campione (L) estratto (fase acquosa)

V<sub>cspm</sub>= Volume di campione (L) filtrato per il particolato

V<sub>fds</sub> = Volume finale dell'estratto (mL) dalla fase acquosa

V<sub>fspm</sub>= Volume finale dell'estratto (mL) dalla fase particolata

**9 - QUALITÀ DEL DATO**

In Fig. 2 sono riportate le percentuali di recupero dei PBDE nativi dalla fase acquosa (partire da prove di aggiunta di acqua ultrapura a 0,05 e 5,0 ng/L) e di [<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]PBDE aggiunti al particolato sospeso < 0,7 µm di campioni reali (5 ng/g). Per la frazione disciolta i recuperi medi sono risultati compresi tra il 63 e il 90% (il recupero dei corrispondenti marcati è stato compreso tra il 62 e il 99%) con deviazioni standard relative (RSD) sempre inferiori al 20%, mentre per la frazione particolata sono risultati compresi tra il 62 e il 93% con RSD comprese tra 7 e 18%.

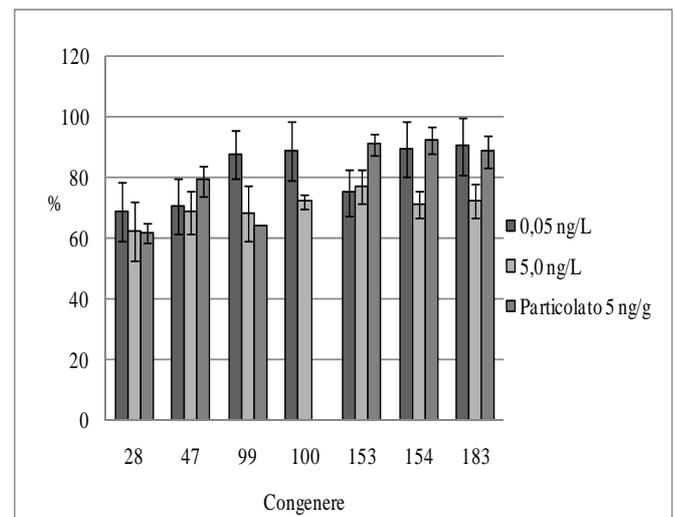


Fig. 2 - Percentuali di recupero degli analiti in fase disciolta e dal particolato. Disciolto: prove di aggiunta di PBDE nativi (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183) ad acqua ultrapura, ad una concentrazione nominale di 0,05 ng/L (volume iniziale 2,5 L) e 5,0 ng/L (volume iniziale 200 mL). Barre di errore = RSD (n = 4). Particolato: aggiunta di PBDE marcati (<sup>13</sup>C<sub>12</sub>) BDE-28, 47, 99, 153, 154, 183) al particolato sospeso di acqua di fiume, ad una concentrazione nominale di 5 ng/g. Barre di errore = RSD (n = 4).

La ripetibilità del metodo è stata stimata su repliche di campioni di acqua di fiume (Tab. 5) analizzando separatamente il disciolto e il particolato sospeso. La ripetibilità è risultata accettabile anche a valori prossimi al limite di rilevabilità stabilito per il metodo.

Tab. 5 - Concentrazioni medie e RSD di alcuni PBDE in acqua di fiume (Lambro, Mi). Volume iniziale di 2,5 L,  $n = 4$ .

CONGENERE	DISCIOLTO		PARTICOLATO	
	ng/L	RSD	ng/L	RSD
BDE-47	0,16	22	0,21	21
BDE-99	0,12	19	0,29	16
BDE-100	0,06	15	0,10	21
BDE-153	0,06	20	0,08	17

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Verificare la disponibilità in commercio di materiali con concentrazioni certificate di PBDE. Per maggiori informazioni sugli organismi che li producono è possibile consultare la sezione 1040 "qualità del dato analitico" dei Metodi analitici per le acque. I necessari controlli di qualità possono essere attuati con analisi periodiche di materiali certificati o costruendo carte di controllo utilizzando materiali non certificati precedentemente confrontati con materiali di riferimento. Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio e incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure periodiche condotte in parallelo con l'insieme dei campioni da determinare.

## BIBLIOGRAFIA

- ALAE M., ARIAS P., SJÖDIN A., BERGMAN Å. (2003): "An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release", *Environment International*, **29**, 683– 689.
- BALLSCHMITER K., ZELL M., FRESSENIUS Z. (1980): "Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography - Composition of technical aroclor- and Clophen-PCB mixtures. *Anal. Chem.*, **302**, 20-31.
- BINELLI A., GUZZELLA L., ROSCIOLI C.: "Levels and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Zebra mussels (*D. polymorpha*) from Lake Maggiore (Italy). *Environ. Pollut.*, in press.
- LAW R.J., ALAE M., ALLCHIN C.R., BOON J.P., LEBEUF M., LEPOM P., STERN G.A. (2003): "Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife, *Environment International*, **29**, 757–770.
- LAW R.J., ALLCHIN C. R., DE BOER J., COVACI A., HERZKE D., LEPOM P., MORRIS S., TRONCZYNSKI J., DE WIT C.A. (2006): "Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment", *Chemosphere*, **64**, 187–208.
- WHO/IPCS (1994): "*Environmental Health Criteria 162: Polybrominated Diphenyl Ethers*", World Health Organization, Geneva.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc162.htm>
- LA GUARDIA M.J., HALE R. C., HARVEY E. (2006): "Detailed Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Congener Composition of the Widely Used Penta-, Octa-, and Deca-PBDE Technical Flame-retardant Mixtures", *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 6247-6254.
- ALAE M., BACKUS S., CANNON C. (2001): "Potential interference of PBDEs in the determination of PCBs and other organochlorine contaminants using electron capture detection", *J. Sep. Science*, **24**, 465–469.
- APAT, IRSA-CNR. (2003): "*Metodi analitici per le acque*", APAT, Manuali e Linee guida n. 29/2003, 3 volumi, 1153 pp.
- BINELLI A., ROSCIOLI C., GUZZELLA L. (2006): "Improvements in the analysis of decabromodiphenyl ether using on-column injection and electron-capture detection", *J. Chromatogr. A*, **1136**, 243–247.
- USEPA (2005): "*Method 527. Determination of selected pesticides and flame retardants in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS)*", April.  
<http://www.epa.gov/safewater/methods/pdfs/met527.pdf>
- KORYTÁR P., COVACI A., DE BOER J., GELBIN A., BRINKMAN U.A.TH. (2005): "Retention-time database of 126 polybrominated diphenyl ether congeners and two Bromkal technical mixtures on seven capillary gas chromatographic columns", *J. Chromatogr. A*, **1065**, 239–249.
- USEPA (2003): "*Draft Method 1614. Brominated diphenyl ethers in water, soil, sediment, and tissue by HRGC/HRMS*, August.

**APPENDICE****PROCEDURA DI SILANIZZAZIONE****1 - REATTIVI**

**1.1 - Soluzione di Dimetildiclorosilano (DMDCS) al 5% in toluene**

**1.2 - Toluene** per "analisi di residui"

**1.3 - Metanolo** per "analisi di residui"

**1.4 - Acetone** per "analisi di residui"

**2 – PROCEDIMENTO**

Lavare la vetreria da trattare, sciacquarla con acetone e lasciarla in stufa a 40°C fino a completo asciugamento. Lavorando sotto cappa, trasferire la soluzione di DMDCS nel contenitore da silanizzare (circa 200 mL per una bottiglia da 2,5 L) e agitare per almeno 5 minuti, avendo cura di trattare tutta la superficie. Togliere il silanizzante (che può essere recuperato per trattamenti successivi) ed effettuare 2 lavaggi con toluene e successivi 2 lavaggi con metanolo, quindi lavare nuovamente con acqua ultrapura.

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

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

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

Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861

Direttore responsabile: R. Passino

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

Segreteria di redazione: G. Barbiero

Stampato in proprio e distribuito "on-line": [www.irsam.rm.cnr.it/Notiziario](http://www.irsam.rm.cnr.it/Notiziario)

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda

Allestimento e stampa: A. Priori