



PORTI
di ROMA
e del LAZIO

AUTORITA' PORTUALE DI
CIVITAVECCHIA, FIUMICINO E GAETA

OPERE STRATEGICHE PER IL PORTO DI CIVITAVECCHIA

1° LOTTO FUNZIONALE:
PROLUNGAMENTO ANTEMURALE C. COLOMBO
DARSENE SERVIZI E TRAGHETTI

PROGETTO DEFINITIVO

VERIFICA DI ATTUAZIONE

(ai sensi art. 185 comma 6 e 7 D.Lgs. 163 / 06)

DELLE PRESCRIZIONI CONTENUTE NEL PARERE DEL MINISTERO DELL'AMBIENTE E
DELLA TUTELA DEL TERRITORIO E DEL MARE

(prot.DSA_2006_0021173 del 08-08-2008)

ALL. 6.2

MONITORAGGIO AMBIENTE MARINO
FASE DI CANTIERE

Committente:

Autorità Portuale di Civitavecchia, Fiumicino e Gaeta

IL RESPONSABILE DEL PROCEDIMENTO

Dott. Ing. Maurizio Ievolella

IL DIRIGENTE DELL'UFFICIO AMBIENTE

Dott. Ing. Calogero G. Burgio



Prof. Marco Marcelli

COMMESSA			CATEGORIA	LIVELLO	REV	
9	3	5	0	1	1	
			M	A		
				P	E	
					ALL.6	0
	NOV/2011	0	PRIMA EMISSIONE			
Rif. Dis.	Data	Rev.	DESCRIZIONE			

1. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ

Il Comitato Interministeriale per la Programmazione Economica (C.I.P.E.) con Deliberazioni del 21.12.2007 e del 25.01.2008 ha approvato, ai sensi e per gli effetti dell'art. 166 del D.lgs. 163/2006, con le prescrizioni e le raccomandazioni proposte dal Ministero delle Infrastrutture, il progetto definitivo del "Potenziamento hub portuale di Civitavecchia – Primo lotto interventi funzionali (I° stralcio): prolungamento antemurale Cristoforo Colombo, realizzazione darsena traghetti e servizi".

Unitamente ai progetti definitivi delle opere marittime, sono stati approvati i progetti definitivi delle opere di compensazione ambientale oggetto delle prescrizioni di seguito riportate: *"I progetti esecutivi dovranno contenere in forma chiara ed esplicita tutti gli accorgimenti previsti affinché non si superino, durante le fasi di cantiere e di esercizio, i limiti di legge previsti per ciascun agente impattante, verificandoli mediante il monitoraggio ambientale. La verifica di ottemperanza è a cura del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM)"*.

Il monitoraggio dell'ambiente marino, come prescritto e come descritto nei capitoli successivi, prevede lo svolgimento delle seguenti attività:

- ripristino e potenziamento della stazione di zero;
- gestione delle stazioni di monitoraggio fisse;
- monitoraggio della colonna d'acqua durante la fase di cantiere;
- monitoraggio dei fondali marini durante la fase di cantiere;
- monitoraggio della qualità dei materiali dragati e refluiti in colmata.

2. MONITORAGGIO DELLA COLONNA D'ACQUA

Questa fase del monitoraggio di cantiere verrà effettuato attraverso due diverse tipologie di acquisizione dati:

- ÷ utilizzando la rete di monitoraggio fissa installata nell'ambito del Decreto VIA 2935/1997;
- ÷ procedendo ad acquisizione dei dati della colonna d'acqua in punti di particolare significatività attraverso campagne in situ che verranno effettuate secondo le modalità indicate nel "Manuale delle attività operative" approvato dal Ministero dell'Ambiente.

Queste attività verranno effettuate nel rispetto della seguente cronologia:

- ÷ ripristino della stazione di zero;
- ÷ installazione della stazione di zero;
- ÷ monitoraggio attraverso le stazioni fisse;
- ÷ monitoraggio attraverso campionamenti in situ.

L'acquisizione dei dati avverrà attraverso pacchi strumentali che saranno oggetto di attività di manutenzione e calibrazione che si protrarranno per tutta la durata del cantiere, stimata in quattro anni:

ATTIVITA'	FREQUENZA OPERAZIONI	DURATA
Stazione fissa Banchina n.26	quindicinale	4 anni
Stazione fissa Boa Oceanografica	quindicinale	4 anni

2.1. Ripristino della stazione di zero

L'Autorità Portuale di Civitavecchia ha posto in essere una rete di monitoraggio per la misura in continuo dei principali parametri fisico-chimico-biologici ai sensi del Dec. Di V.I.A. 2935/1997, composta da due stazioni di misura fisse: una posizionata all'interno del Porto, ed una in mare aperto nelle immediate vicinanze del porto di Civitavecchia. Quest'ultima era costituita da una boa oceanografica dotata di strumentazione oceanografica per il monitoraggio dei parametri chimico-fisico-biologici delle acque.

In data 28.07.2009 è stato riscontrato il disormeggio della sopracitata boa, che

successivamente è stata ritrovata, ma danneggiata irreparabilmente e priva dei pacchi strumentali.

Al fine di ripristinare la rete di monitoraggio di controllo della qualità delle acque marine, il Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina del Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche (DEB) dell'Università degli Studi della Tuscia ha messo a disposizione dell'Autorità Portuale di Civitavecchia una boa oceanografica, che potrà essere riposizionata come da autorizzazione del Ministero delle Infrastrutture e dei Trasporti - Capitaneria di Porto del Compartimento Marittimo di Civitavecchia - Sezione Tecnica Sicurezza e Difesa portuale, ORDINANZA n° 64/2009, nel punto di coordinate geografiche Latitudine 42°04,983' Nord e Longitudine 011° 46,685' Est (ad una profondità di circa 39 m).



Fig.2.1-1 Boa oceanografica

La boa oceanografica è stata trasportata al Porto di Civitavecchia per essere ormeggiata nel punto sopra citato.

Una volta in opera la boa oceanografica verrà utilizzata per l'acquisizione in continuo dei seguenti parametri: pressione, temperatura, conducibilità, salinità, densità, pH, ossigeno disciolto, torbidità, fluorescenza della clorofilla *a*.

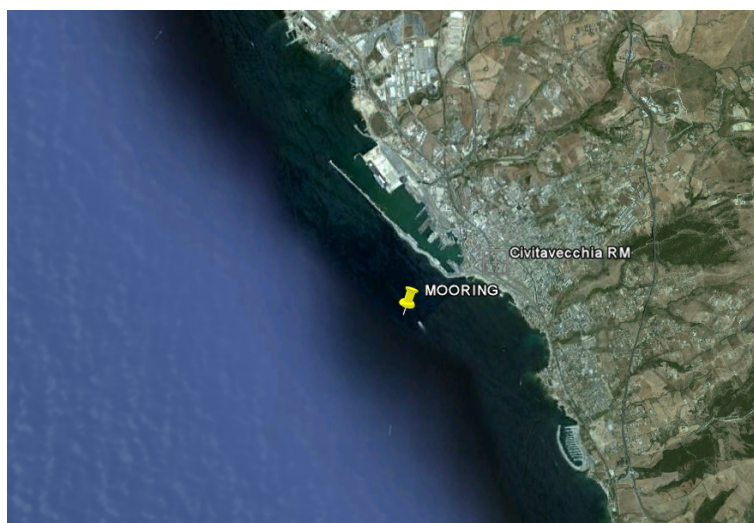


Fig.2.1-2 Punto di ormeggio della boa oceanografica

La boa oceanografica che verrà installata come stazione di zero rappresenta una piattaforma di misura indispensabile per la raccolta di serie temporali di dati per l'analisi delle variabili fisico-chimico-biologiche a lungo termine.

Lo studio delle dinamiche oceanografiche necessita di misure in continuo al fine di poter comprendere le scale spaziali e temporali dei processi ad essi legati, in particolar modo in ambiente costiero, dove i processi sono molto veloci ed influenzati dalle condizioni meteomarine e dalla morfologia della costa.

Per questo motivo la presenza di una rete di monitoraggio, composta da stazioni di misura fisse, è di fondamentale importanza per la comprensione dei sistemi ecologici ed oceanografici.

Il Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina del DEB, attraverso l'installazione e la gestione di questa stazione di misura, avrà la possibilità di integrare la strumentazione oggetto del presente monitoraggio con strumentazione che permetterà di studiare fenomeni quali la propagazione della luce lungo la colonna d'acqua ed i flussi energetici nell'interfaccia aria-acqua.

Questa stazione di misura fissa rappresenterà inoltre un punto di calibrazione fondamentale per la calibrazione dei modelli numerici di simulazione della propagazione di sostanze conservative e non conservative, nonché di simulazione delle principali dinamiche oceanografiche. Le attività di ricerca potranno portare alla pubblicazione di articoli scientifici in riviste di rilievo nazionale ed internazionale.

2.2. Installazione della stazione di zero

Al fine del corretto dimensionamento delle strutture di ancoraggio della boa oceanografica sono stati effettuati degli studi approfonditi sul regime idrodinamico e del moto ondoso.

2.2.1 Studio del paraggio

Ponendosi a largo di Civitavecchia su fondali di circa 50 m ove è posizionato l'ondametro direzionale di Torre Valdaliga gestito da ENEL, ad una distanza di circa 4 Km dalla costa, il paraggio è esposto al mare aperto per un ampio settore di traversia, delimitato a Nord Ovest dal promontorio del Monte Argentario e dall'Isola d'Elba (300° - 320° N), a Est dall'isola della Corsica (280° - 260° N), a Sud-Ovest dall'isola della Sardegna (250° - 210° N), a Sud dall'isola della Sicilia (145° - 170° N) a una distanza di circa 500 Km e a Sud-Est da Capo Anzio, dall'isola di Ponza e dalla costa calabrese (135° - 145° N). Per il tratto di costa dell'alto Lazio a fronte di un fetch geografico massimo dell'ordine di 500 Km si ha un fetch efficace massimo pari a circa 310 Km circa ed è riferibile al settore Sud (170° - 190° N, Mezzogiorno). Per quanto riguarda la correlazione tra la direzione del vento e direzione del mare si può notare che venti di Maestrale (paralleli alla costa da Nord-Ovest), generano moti ondosi provenienti da 290° - 280° N (Ponente) con uno sfasamento di circa 30° e venti di Scirocco (paralleli alla costa Sud-Est) generano moti ondosi provenienti da 150° - 60° N (Mezzogiorno) con uno sfasamento di 25° .

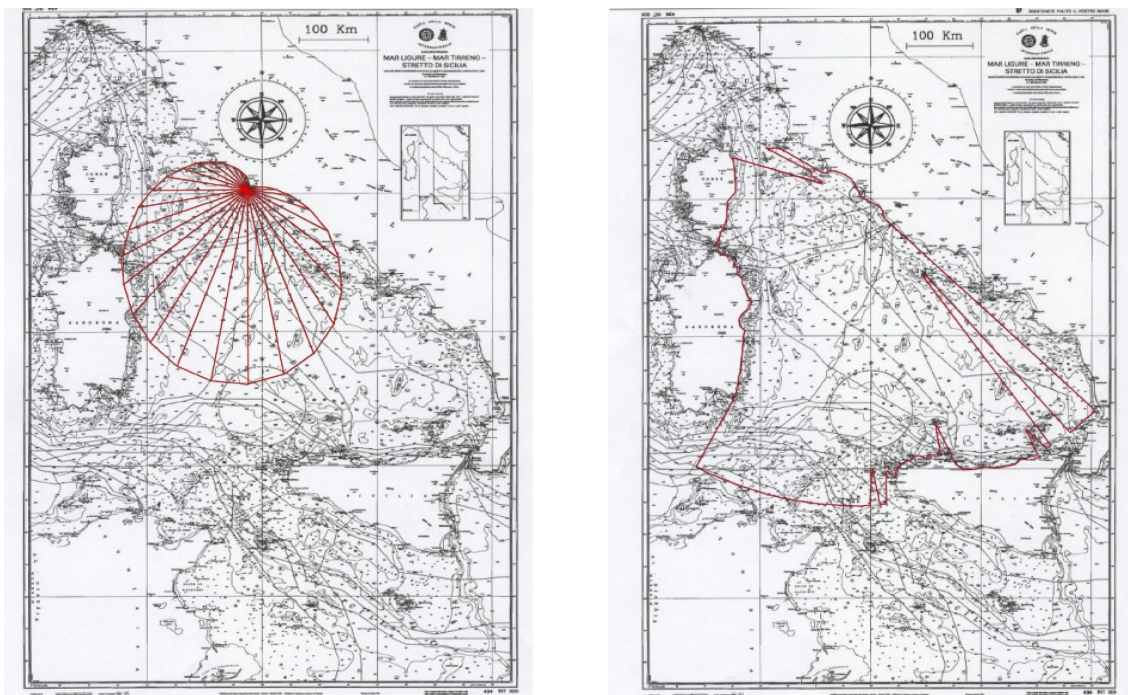


Fig. 2.2.1-1 Fetch geografico ed efficace a largo di Civitavecchia

2.2.2 Studio ondametrico

Nella figura che segue sono rappresentate le distribuzioni del numero di eventi di moto ondoso suddivisi per classi di altezza (H_s) e direzione di provenienza ($^{\circ}N$) registrate nell'area costiera di Civitavecchia.

Dall'analisi di queste si nota che:

il 50 % circa degli eventi (corrispondente ad una durata di 6 mesi) ha un'altezza significativa superiore ai 0.5 m;

- gli eventi con maggiore frequenza di accadimento sono relativi al settore di libeccio (il 44.09 % degli eventi provengono dal settore 220-250 $^{\circ}N$), e al settore di scirocco (il 35.96 % degli eventi provengono dal settore 180-200 $^{\circ}N$);

÷ gli eventi con maggiore intensità ($H_s > 2$ m) provengono prevalentemente da 240 $^{\circ}N$ (3.1 % - 11 giorni/anno).

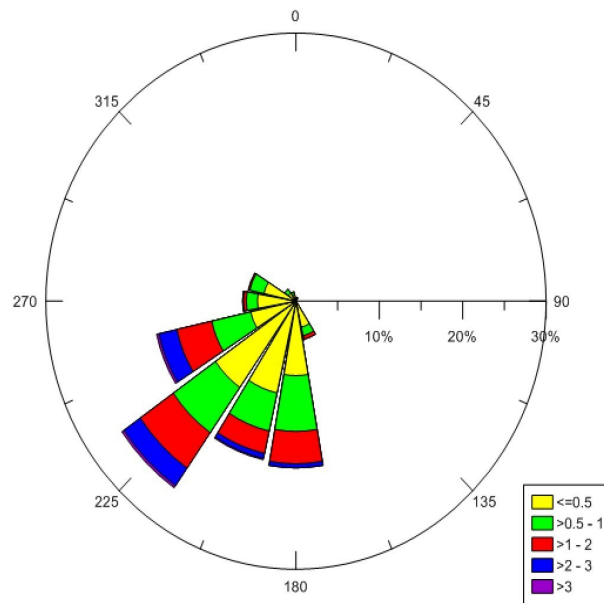


Fig. 2.2.2-1 Clima ondoso misurato da un ondometro direzionale a largo di Civitavecchia

2.2.3 Simulazioni delle correnti marine

Modello bidimensionale ADCIRC

Per quanto riguarda le correnti marine indotte dal vento sono stati presi in considerazione quattro scenari di simulazione che riproducono in prossimità del punto di ancoraggio le seguenti condizioni:

1. vento di Libeccio (225 °N) con intensità di 10 m/s;
2. vento di Maestrale (315 °N) con intensità di 10 m/s;
3. clima anemometrico tipico di una settimana estiva;
4. clima anemometrico tipico di una settimana invernale.

Le simulazioni sono state effettuate con il modello idrodinamico bidimensionale agli elementi finiti ADCIRC e le condizioni sono state scelte sulla base dei dati e delle rose dei venti analizzate in precedenza.

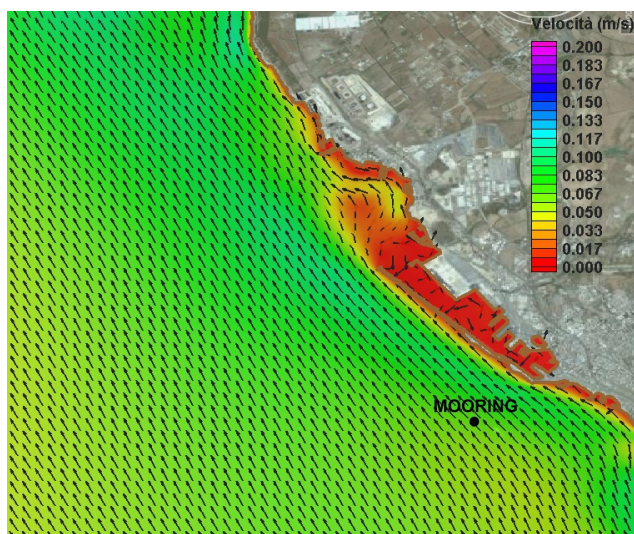


Fig. 2.2.3-1 Rappresentazione del campo idrodinamico soggetto ad un vento di Libeccio (225 °N -10 m/s)

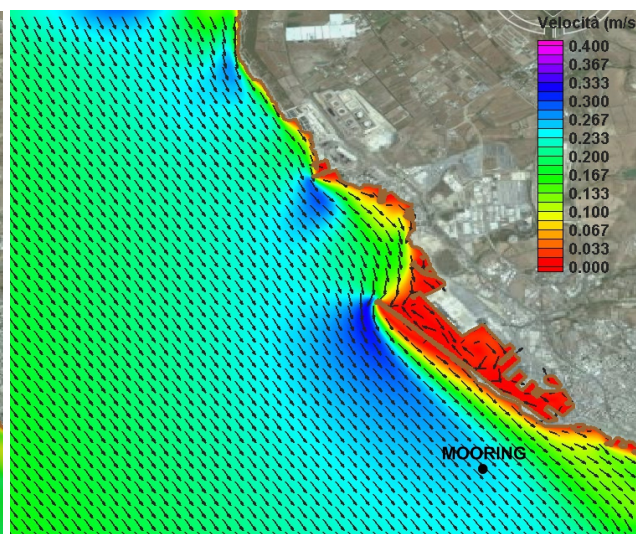


Fig. 2.2.3-2 Rappresentazione del campo idrodinamico soggetto ad un vento di Maestrale (315 °N -10 m/s)

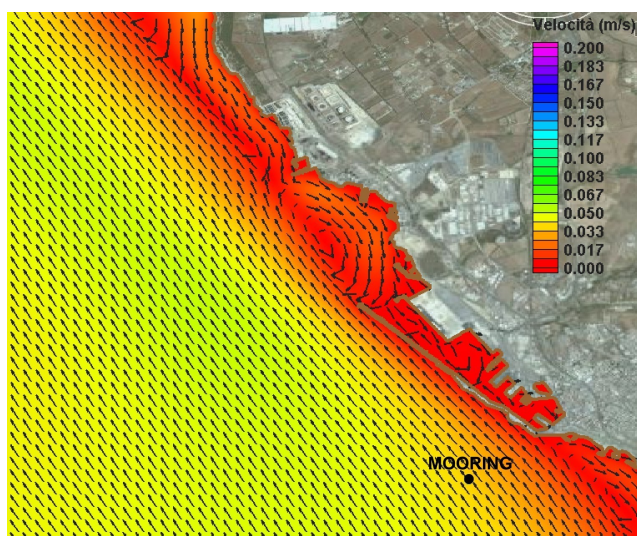


Fig. 2.2.3-3 Rappresentazione del campo idrodinamico sottoposto ad un clima anemometrico tipico di una settimana estiva.

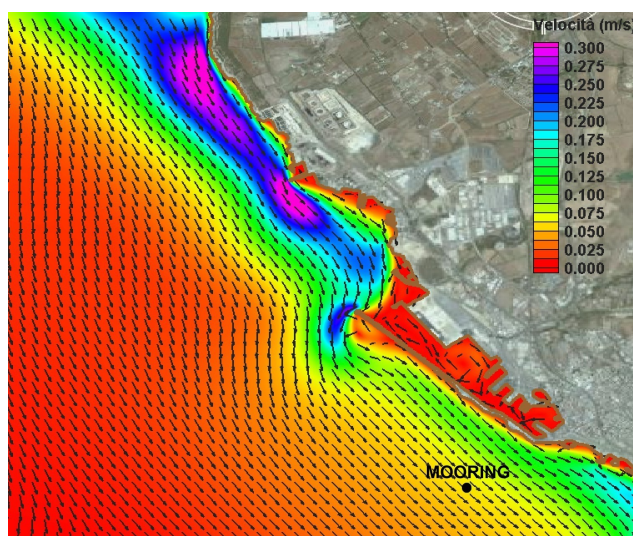


Fig. 2.2.3-4 Rappresentazione del campo idrodinamico ad un clima anemometrico tipico di una settimana invernale.

2.2.4 Simulazione della propagazione del moto ondoso

Per conoscere la variazione del livello del mare dovuta al moto ondoso nel punto di ancoraggio del mooring sono state effettuate delle simulazioni attraverso il modello STWAVE che descrive la propagazione dell'onda verso le aree costiere.

Modello STWAVE

Con il modello STWAVE sono stati simulati i seguenti scenari:

1. onda proveniente da libeccio con altezza di 3 m;
2. onda proveniente da maestrale con altezza di 2 m.

La scelta degli scenari è stata effettuata sulla base della tabella altezza d'onda-direzione e del clima d'onda analizzato in precedenza.

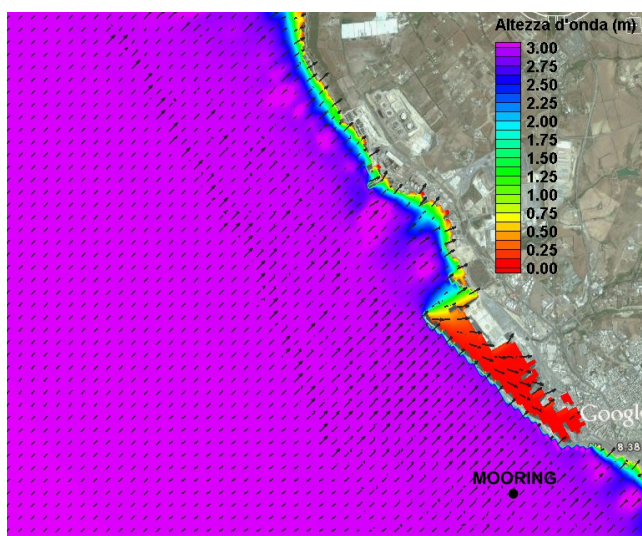


Fig. 2.2.4-1 Rappresentazione del campo di moto ondoso da caratterizzato da un'onda proveniente da 225 °N e con altezza di 3 m

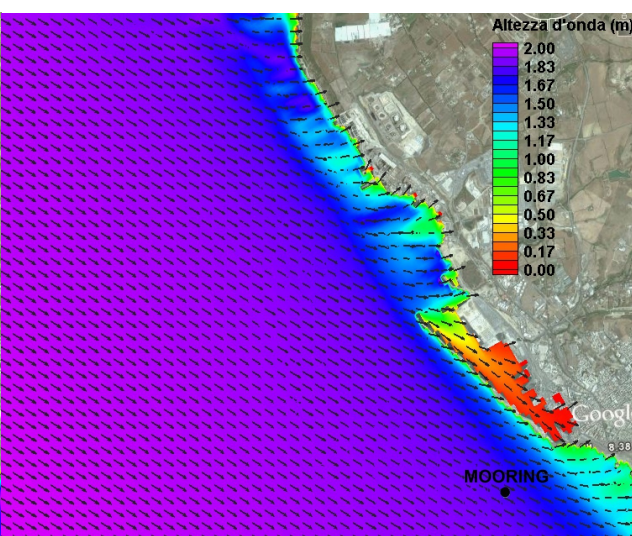


Fig. 2.2.4-2 Rappresentazione del campo di moto ondoso caratterizzato da un'onda proveniente da 315 °N e con altezza di 2 m

Le figure sopra mostrate mettono in luce che la posizione dell'ancoraggio del mooring, che si trova ad una profondità di circa 40 m, non è soggetta all'azione dell'onda sul fondale (l'altezza d'onda nella zona offshore si conserva nel punto previsto per il posizionamento della boa). Ai fini di una corretta installazione della boa dovremo quindi considerare solo le altezze d'onda registrate dall'ondametro locale che si trova a circa 1 km a nord rispetto al punto di ancoraggio.

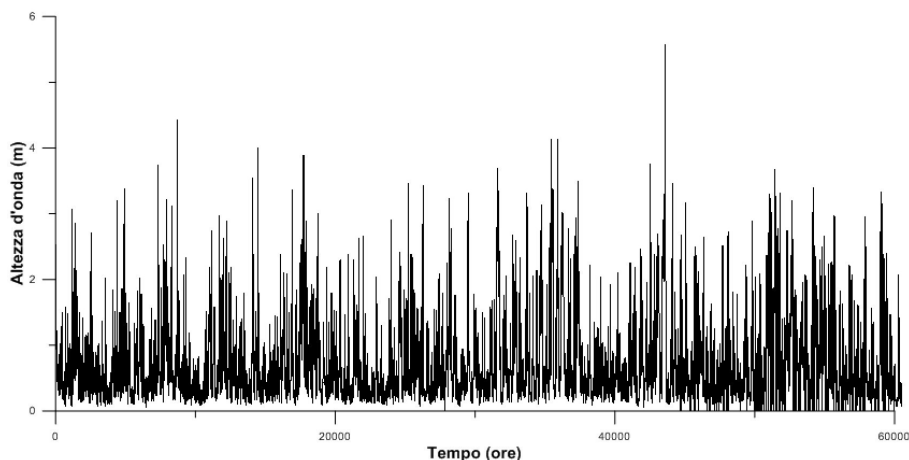


Fig. 2.2.4-3 Profilo delle altezze d'onda misurate nell'area costiera di Civitavecchia

Dall'analisi dei dati ondametrici nel tempo relativi all'altezza d'onda si evince che le altezze massime registrate sono localizzate nei periodi invernali.

Per quanto attiene il riposizionamento della boa oceanografica, le attività seguiranno il seguente iter:

- a) survey preliminare con ROV nell'area precedentemente utilizzata per l'ormeggio della boa oceanografica disormeggiata, con intervento di sommozzatori OTS e di un tecnico per la georeferenziazione;
- b) studio per l'ormeggio della boa e realizzazione delle componenti meccaniche necessarie per l'ancoraggio; costruzione dei corpi morti e acquisizione del materiale necessario alle operazioni di posa;
- c) posa e messa in sicurezza della boa oceanografica; certificazione di conformità del Sistema di Ancoraggio da parte di Ente tecnico.

2.3 Monitoraggio attraverso le stazioni fisse

Nell'ambito della creazione della rete informatica prevista dal Decreto di V.I.A. n.2935 del 22.12.1997 l'Autorità Portuale di Civitavecchia ha previsto l'istallazione di due stazioni fisse che in tempo reale acquisiscono alcuni parametri di significativa importanza in merito alle conseguenze degli interventi previsti dal "I° stralcio", che sulla scorta dell'esperienza acquisita saranno

posizionate in due diversi punti:

- la stazione di prossimità: presso la banchina n.26, in posizione baricentrica rispetto ai confini portuali;
- la stazione di zero: ubicata al largo del porto, sull'area oggetto della concessione demaniale rilasciata dalla Regione Lazio.

La stazione di zero è stata installata, come già detto, secondo quanto indicato nel “Manuale delle attività operative” di cui al Decreto di V.I.A. n.2935/1997, ed è stata oggetto di ripetuti atti vandalici, del furto dei pacchi strumentali, e da ultimo dal suo disormeggio e distruzione. Il Laboratorio di Oceanologia del DEB dell'Università degli Studi della Tuscia ha messo a disposizione gratuita dell'Autorità Portuale di Civitavecchia una boa oceanografica per la creazione di una nuova stazione di zero.

Tale boa ha dimensioni e caratteristiche di maggiore solidità rispetto a quelle della precedente ed è stata oggetto di approfondita revisione elettromeccanica atta a potenziare la pannellatura fotovoltaica, la strumentazione ed a garantire una migliore funzionalità delle operazioni di monitoraggio al largo.

Essa verrà posizionata nella medesima posizione della precedente boa, secondo quanto indicato nella relativa concessione demaniale rilasciata dalla Regione Lazio.

Su entrambe le stazioni di misura fisse verranno installati dei pacchi strumentali, alcuni dei quali sono stati realizzati dal Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina del DEB della Tuscia nell'ambito di progetti di ricerca nazionali ed internazionali.

Si provvederà quindi alla sostituzione dei pacchi strumentali presenti in banchina n.26 ed in boa a largo del porto di Civitavecchia. Al fine di semplificare le operazioni di manutenzione e calibratura le misure verranno acquisite in numero doppio (una di rispetto all'altra): in occasione delle operazioni di manutenzione si provvederà alla rimozione del pacco strumentale installato che verrà sostituito in loco con il pacco strumentale di rispetto; una volta smontato e sostituito, il pacco strumentale verrà trasferito nel Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina (DEB-Università degli Studi della Tuscia) per le attività di calibrazione e manutenzione.

La boa oceanografica che verrà installata come stazione di zero, come la stazione di prossimità, rappresenta una piattaforma di misura indispensabile per la raccolta di serie temporali di dati per l'analisi delle variabili fisico-chimico-biologiche a lungo termine.

2.3.1 Stazione di prossimità

La stazione di prossimità ha una struttura di supporto in acciaio inox (AISII 316) ancorata presso la banchina 26 del porto di Civitavecchia, banchina che risulta essere prospiciente ai fondali interessati dagli interventi previsti dal “I° stralcio”; tale stazione è dotata delle seguenti componentistiche:

- acquisitore dati;
- sistema di trasmissione dati;
- sonda multiparametrica (pressione, conducibilità, salinità, temperatura, densità, ossigeno disciolto, pH, torbidità e fluorescenza della clorofilla *a*).



Fig. 2.3.1-1 Stazione di prossimità

La sonda multiparametrica integra sensori per la misura della qualità chimico-fisico-biologica delle acque di ultima generazione, alcuni dei quali sviluppati presso il Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina (DEB-Università della Toscana).

I sensori sono connessi ad un datalogger che acquisisce le misure eseguite dalla

strumentazione, le trasforma in grandezze fisiche e le memorizza nella propria memoria di massa. I dati acquisiti, a mezzo del sistema GSM Wavecom, sono trasmessi al Laboratorio di Oceanologia Sperimentale, che provvederà all'elaborazione ed al processamento, al fine di inviarli al Centro Elaborazione Dati dell'Autorità Portuale di Civitavecchia.

2.3.2 Stazione di zero

Sulla stazione di zero sono installati sensori per la misura delle stesse variabili misurate dalla stazione di prossimità.



Fig. 2.3.2-1 Stazione di zero

2.3.3 Parametri oggetto del monitoraggio marino attraverso le stazioni fisse

Le attrezzature descritte nei precedenti capitoli verranno utilizzati al fine di acquisire parametri di significativa importanza.

Tali misure saranno utili per la definizione delle potenziali influenze delle opere che costituiscono il primo lotto degli interventi funzionali di potenziamento dell'hub portuale di Civitavecchia (1° stralcio) sulla qualità dell'ambiente marino.

Temperatura

La temperatura insieme ad altri fattori come la salinità è molto importante nella

determinazione dei movimenti delle masse di acqua del mare, che a loro volta influiscono direttamente sui processi di riossigenazione delle acque e sulla rimessa in circolo dei nutrienti. Inoltre la temperatura influenza altri parametri come la densità, la viscosità, l'ossigeno ed pH dell'acqua di mare. La parte più superficiale del Mediterraneo è interessata da una variazione termica stagionale con temperature invernali di 14-16°C e temperature estive di 24-27°C mentre nella parte più profonda al di sotto di questo sottile strato (oscillante fra i 25 e i 40 m) le acque presentano una temperatura quasi costante di circa 13-14°C. Lo scalino che separa lo strato superficiale più caldo dalla massa d'acqua sottostante più fredda prende nome di termoclino. La temperatura, è fondamentale per il calcolo di altre variabili e grandezze (es. densità, pH, salinità, ossigeno) che sono influenzate dalla temperatura stessa. La temperatura inoltre influenza i processi vitali degli organismi degli ecosistemi marini condizionandone i processi metabolici e la distribuzione spaziale. Poiché ciascun organismo tollera un campo di temperatura, la presenza di variazioni di temperatura anomale può alterare i processi metabolici portando, in casi limite, l'organismo alla morte. L'osservazione della variazione della temperatura superficiale serve anche per definire la diffusione di masse d'acqua a caratteristiche fisiche differenti nel corpo recettore, e quindi ci consente di controllare l'inquinamento di tipo fisico che si verifica quando processi industriali utilizzano acqua di mare per raffreddare gli impianti produttivi.

Conducibilità

La conducibilità è una misura del movimento delle cariche elettriche in un corpo solido, liquido o gassoso sottoposto a un campo elettrico. Nei liquidi che contengono elettroliti (sali, acidi, basi) dissociati in soluzione, le cariche sono rappresentate da ioni. I liquidi puri come l'acqua distillata hanno una conducibilità molto bassa, mentre l'acqua di mare essendo una soluzione di acqua e sali disciolti, ha una conducibilità piuttosto elevata. L'unità di misura di tale variabile è il microsiemens che equivale a 10^{-6} siemens. La misurazione della conducibilità dell'acqua di mare è molto importante, perché su di essa si basa la determinazione del valore di salinità. La salinità infatti è legata principalmente alla temperatura ed alla conducibilità. Per misurare la salinità si utilizzano quindi sensori di conducibilità che sfruttano la proprietà di conduttore di elettricità dell'acqua di mare ed attraverso i quali si possono apprezzare variazioni anche piccole di salinità.

Salinità

La salinità esprime la quantità in grammi di sali contenuti in un chilogrammo di acqua di mare. La misura si fornisce in per mille (‰) e si riferisce ad acqua di mare filtrata per eliminare ogni tipo di sospensione. Il Mediterraneo presenta dei valori che variano dal 37‰ nella parte occidentale, al 39‰ nella parte orientale. Questi valori sono piuttosto alti se confrontati con quelli registrati nell'oceano Atlantico con cui il Mediterraneo comunica per mezzo dello Stretto di Gibilterra. Ciò è dovuto allo scarso ricambio delle sue acque ed alla forte evaporazione cui è soggetto. La salinità è determinata da un numero relativamente piccolo di costituenti, i quali ad eccezione degli ioni carbonico e bicarbonato, mantengono costante il loro rapporto con il cloro, pertanto la salinità può essere collegata alla clorinità, attraverso la relazione: $S = 1,80655Cl^-$. La determinazione della salinità si può fare misurando per via chimica il contenuto in Cl e risalendo da questa alla salinità. Il metodo più usato per misurare la salinità è però quello basato sulla conducibilità elettrica. La salinità è un fattore molto importante per la vita degli organismi marini e per la loro distribuzione, in quanto ogni organismo può tollerare variazioni di questo parametro solo entro certi limiti. Da ciò risulta che ogni forma di inquinamento che alteri questo parametro produrrà modificazioni sulla composizione faunistica e floristica dell'area interessata.

La misurazione della salinità è molto importante, infatti attraverso la sua misurazione possono essere evidenziati scarichi di acqua dolce a causa della stratificazione che si verrà a creare tra le masse di acqua aventi densità differente.

Ossigeno disciolto

L'ossigeno è un gas fondamentale per la vita in quanto è il gas indispensabile per la respirazione. La massima quantità di O_2 si trova presso la superficie e diminuisce andando in profondità. Ciò è dovuto all'equilibrio tra produzione di O_2 per attività fotosintetica e consumo di O_2 per la respirazione. In superficie prevale la produzione, mentre in profondità non c'è più produzione ma solo consumo. La profondità a cui l' O_2 prodotta è uguale a quella consumata è detta profondità di compensazione. La quantità di O_2 contenuta nell' H_2O aumenta al diminuire della temperatura e con il diminuire della salinità. Considerando che la concentrazione massima (livello di saturazione) di un gas in un liquido è determinata principalmente dalla temperatura (oltre che dalla salinità e pressione) è molto più utile che il dato di concentrazione venga espresso anche in percentuale di saturazione. In presenza di fenomeni di eutrofizzazione si ha inizialmente una forte

produzione di O_2 , seguita da un rapido consumo di O_2 , in particolare negli strati più profondi dove si possono avere situazioni di anossia. Una forte diminuzione del valore di O_2 si ha anche nei casi di inquinamento da idrocarburi, a causa sia dell'intensa attività batterica che comporta consumo di O_2 sia per la presenza dello strato di petrolio che impedisce lo scambio di O_2 tra aria ed acqua.

Diminuzioni del valore di O_2 avvengono anche nei casi di inquinamento organico a causa dell'attività batterica. Da ciò risulta come la misura di questo parametro sia molto importante per la caratterizzazione dello stato di trofia del mare e nelle valutazioni di alterazioni a carico dell'ambiente marino.

Concentrazione idrogenionica (pH)

Misura l'acidità o basicità del mezzo. Nell'acqua di mare il valore del pH si aggira fra 7.5 ed 8.4 ed i valori massimi si trovano in superficie dove la CO_2 viene continuamente rimossa dai vegetali per la fotosintesi. Il pH è influenzato dalla temperatura, pressione e salinità. L'aumento di temperatura e pressione determinano una leggera diminuzione del pH. L'acqua di mare comunque ha una notevole capacità tampone e pertanto contiene le oscillazioni di pH in limiti relativamente ristretti. Questo fa sì che significative differenze dei valori di questo parametro si hanno solo in presenza di particolari situazioni di alterazione ambientale, come nei casi di inquinamento chimico o nelle zone dove sono presenti immissioni di acqua dolce. In questi casi infatti si possono avere delle modificazioni delle concentrazioni di sostanze chimiche, o variazioni della densità tali da modificare in maniera più o meno marcata i valori del pH.

Torbidità

La radiazione luminosa principale che si propaga dalla superficie del mare è quella proveniente dal sole e produce oltre all'effetto termico diretto, le reazioni fotochimiche indispensabili per la vita degli organismi autotrofi.

Nell'ambiente acquatico la luce subisce notevoli modificazioni sia nell'intensità, che nella composizione spettrale. Le radiazioni più assorbite sono quelle al di sopra di 620 nm e al di sotto di 400 nm. Il materiale sospeso non solo fa diminuire l'intensità luminosa complessiva condizionando la trasparenza dell'acqua, ma fa anche variare l'assorbimento delle singole componenti.

L'assorbimento varia in funzione della trasparenza delle acque; in acque costiere poco trasparenti la luce è ridotta all'1% del suo valore di superficie a circa 25 m di profondità, mentre nelle acque

trasparenti della platea continentale tale valore è raggiunto a -60 m. Nel Mediterraneo in media (anche se le differenze possono essere molto marcate a seconda del luogo, delle stagioni e delle condizioni meteorologiche) a circa 5-7 m. di profondità la luminosità è ridotta del 50% di quella registrata in superficie ed a 40-50 m. si riduce a poco più dell'1%.

La luce ha numerosi effetti biologici; infatti la produzione primaria è legata alla penetrazione della luce e quindi è limitata agli strati superficiali che costituiscono la zona eufotica (sino a 100-150 m.) al di sotto della quale si trova la zona afotica dove la luce penetra molto poco e che non consente quindi lo sviluppo della vita vegetale. La conoscenza della profondità di penetrazione della luce rappresenta un dato molto utile per individuare il grado di trofia di un ambiente al momento della misura. Insieme ad altri elementi consente la conoscenza delle potenzialità produttive dell'ambiente marino. L'osservazione della torbidità dell'acqua di mare permette di valutare l'intorbidimento dell'acqua stessa, che può dipendere da fenomeni di eutrofizzazione collegati ad inquinamento di tipo organico.

Fluorescenza della Clorofilla *a*

In ambienti acquatici la misura della clorofilla *a* è utilizzata come indicatore di biomassa autotrofa in quanto rappresenta il pigmento indispensabile per il processo di fotosintesi per tutti gli organismi autotrofi. La clorofilla *a* costituisce l'1-2% del peso secco della sostanza organica delle alghe. Dalla misura della clorofilla è così possibile risalire al contenuto di sostanza organica utilizzando fattori di conversione. Il rapporto tra carbonio organico e clorofilla varia tra le specie, in funzione delle diverse condizioni fisiologiche ed ambientali. I metodi generalmente utilizzati per l'analisi della clorofilla sono quello spettrofotometrico e quello fluorimetrico. I metodi spettrofotometrico e fluorimetrico sono largamente utilizzati per indagini di campo. La tecnica fluorimetrica, fino a 50 volte più sensibile di quella spettrofotometrica, consente l'utilizzo di volumi ridotti di campione e la misura della clorofilla in vivo.

2.3.4 Attività di manutenzione e calibrazione

Le attività di manutenzione e calibrazione verranno effettuate con le modalità di seguito descritte.

Attrezzatura

Al fine di assicurare il corretto funzionamento della strumentazione installata nelle stazioni di misura fisse in banchina n.26 ed in boa oceanografica, il personale del Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina del DEB effettuerà una serie di attività finalizzate alla calibrazione della strumentazione installata. Con cadenza quindicinale i pacchi strumentali verranno sostituiti con pacchi strumentali calibrati e la strumentazione sostituita verrà portata presso il Laboratorio per poter essere calibrata e manutenzionata. Durante le operazioni verranno effettuati dei profili verticali lungo la colonna d'acqua con la sonda multiparametrica Idronaut 316/317, munita di sensori di pressione, temperatura, conducibilità, pH, ossigeno disciolto e fluorescenza della clorofilla *a*. I dati acquisiti serviranno come controcalibrazione rispetto alla strumentazione installata sulle stazioni di misura fisse (banchina n.26 e boa oceanografica).

Modalità di campionamento

Durante le operazioni di sostituzione dei pacchi strumentali verranno raccolti dei campioni di acqua al fine di calibrare la strumentazione: in particolare verranno raccolti campioni per l'analisi della clorofilla *a* per la corretta calibrazione dei fluorimetri, campioni per l'analisi del solido sospeso per la corretta calibrazione dei sensori di torbidità e campioni per l'analisi dell'ossigeno disciolto per la corretta calibrazione dei sensori di ossigeno. I campioni verranno prelevati per mezzo di bottiglia Niskin a differenti quote lungo la colonna d'acqua.

Torbidità

Il campione d'acqua, che servirà per la calibrazione del sensore di torbidità e per avere la stima della quantità di solido sospeso, verrà prelevato dalla bottiglia di campionamento e travasato in bottiglie di plastica da 2L. E' necessario avvinare le bottiglie due volte prima della raccolta del campione.

Ossigeno disciolto

Il prelievo per la determinazione dell'ossigeno disciolto viene effettuato ponendo il tubo della bottiglia Niskin alla base di una bottiglia di pyrex da 60-90 ml con tappo smerigliato a becco di flauto o a terminazione troncoconica arrotondata. E' necessario avvinare due volte la bottiglia prima della raccolta del campione e riempire la bottiglia completamente evitando di far rimanere aria

all'interno.

Clorofilla a

Il campione d'acqua da prelevare per la determinazione della concentrazione di clorofilla *a* viene travasato dalla bottiglia di campionamento in una bottiglia di plastica scura da 5L, interponendo il retino da plancton in modo da trattenere lo zooplancton e le macroalghe eventualmente presenti. E' necessario avvinare la bottiglia due volte prima della raccolta del campione.

2.3.5 Operazioni di calibrazione in laboratorio

Una volta trasferiti i pacchi strumentali delle due stazioni di misura fisse (banchina n.26 e boa oceanografica) si procederà alla pulizia e calibrazione dei sensori in essi installati, al fine di preparare i pacchi strumentali per il successivo periodo operativo.

Il Laboratorio è provvisto di sensori standard ad elevata risoluzione e di una vasca per la calibrazione dei pacchi strumentali. Una volta sostituiti i liquidi e le parti consumabili di ciascun sensore, i pacchi strumentali subiranno un processo di calibrazione in vasca.

I dati acquisiti verranno confrontati con i dati acquisiti dai sensori standard e con i dati acquisiti per mezzo delle analisi dei campioni d'acqua raccolti in situ.

Di seguito si riportano le attività di laboratorio ed i metodi di riferimento adottati per l'analisi dei parametri indicati

Torbidità

Apparecchiature

- Stufa a convezione naturale, munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura entro $\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Essiccatore
- Bilancia analitica di 200 g di capacità con risoluzione di 0,1 mg.
- Apparecchio per filtrazione sotto vuoto, adeguato al tipo di filtro prescelto.
- Membrane filtranti con pori di diametro medio di 0,45 μm .

Procedura analitica

Porre il filtro per 1 ora in stufa alla temperatura di 105°C; lasciarlo raffreddare in essiccatore per 30 minuti e pesarlo al decimo di milligrammo. Collocare il filtro nell'apparecchio di filtrazione. Prelevare un'opportuna aliquota del campione da analizzare e, dopo preventiva omogeneizzazione, effettuare la filtrazione sotto vuoto, avendo cura di lavare il dispositivo di prelievo (cilindro graduato o altro) con il liquido filtrato. Per campioni a bassa torbidità il volume prelevato deve essere almeno di un litro, mentre per valori di torbidità più elevati deve essere tale da fornire da 20 a 100 mg di solidi sospesi. Lavare per tre volte il filtro con acqua deionizzata (10 mL per volta) e, a filtrazione completata, mantenere il vuoto per tre minuti.

Ultimata la filtrazione, trasferire il filtro con il suo contenuto in una stufa alla temperatura di 105°C. Dopo 1 ora lasciar raffreddare il filtro in essiccatore per 30 minuti e pesare.

Calcoli

Il contenuto di solidi totali disciolti alla temperatura scelta è dato da:

$$\text{Solidi totali disciolti (mg/L)} = \frac{(M_1 - M_0) \cdot 1000}{V}$$

dove:

M1 = peso (mg) del filtro e del residuo dopo essiccamento;

M0 = peso (mg) del filtro;

V = volume (mL) di campione sottoposto a filtrazione.

Ossigeno disciolto

Apparecchiature

- Matracci tarati da 1 L
- Microburetta di vetro o a pistone da 1 ml o da 5 ml
- 5 bottiglie di pyrex dello stesso tipo di quelle adoperate per il campionamento
- Micropipetta di precisione da 0,500 ml; micropipetta da 0,200 ml
- Agitatore magnetico
- Ancorette magnetiche
- 2 dispenser o micropipette automatiche o siringhe di polietilene con tacche ogni 0,5 ml (per

reattivi ossigeno)

- Dispenser da 1 ml (per l'acido solforico concentrato).

Procedura analitica

Preparazione dei reagenti

a. Solfato di manganese:

Sciogliere 365 g di solfato di manganese monoidrato $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in acqua distillata e portare il volume ad 1L

b. Soluzione alcalina ioduro:

Sciogliere 500g di idrossido di sodio in 500 ml di acqua distillata.

Sciogliere 300g di potassio ioduro in 450ml di acqua distillata e mescolare le due soluzioni.

c. Soluzione standard di tiosolfato 0.01N

d. Soluzione di amido solubile

Sospendere 2g di amido solubile in 300-400 ml di acqua. Aggiungere una soluzione di idrossido di sodio 20% in modo vigoroso. Aggiungere acido cloridrico fino a che la soluzione è acida alla cartina tornasole e dopo aggiungi 2ml di acido acetico. Alla fine diluire la soluzione a 1 litro di acqua distillata. Escludere la soluzione quando il colore finale non è più lungo di un blu e tende al verde.

Analisi dei campioni

1. Rimuovere il tappo dalla bottiglia Pyrex ed aggiungere 1 ml di solfato manganese, ponendo la pipetta giusto al di sotto del livello del campione. Subito dopo aggiungere 1ml di soluzione alcalina iodata. Richiudere immediatamente la bottiglia e mescolare il contenuto fino a che il precipitato idrossido manganese-manganico non risulta disperso in modo uniforme.

2. Quando il precipitato si è depositato (in 2-3 minuti) agitare nuovamente fino a che la parte solida risulta ben separata dalla soluzione. Lasciare il campione fino a quando il precipitato non si deposita completamente lasciando una soluzione supernatante chiara.

3. Aggiungere 1 ml di acido solforico concentrato, richiudere la bottiglia e mescolare così da sciogliere tutto il precipitato senza far entrare aria nella bottiglia.

4. Ad un'ora dall'acidificazione trasferire 50 ml di soluzione in un flacone conico colorato attraverso una pipetta. Titolare con una soluzione standard di tiosolfato 0.01N fino a quando non rimane un colore paglia molto pallido. Aggiungere 5 ml dell'amido indicatore e terminare la

titolazione.

Calcoli

Sottrarre la correzione del bianco alla titolazione per ottenere la corretta titolazione, V ml, e calcolare il contenuto di ossigeno del campione dalla formula:

$$\text{mg-atomo O}_2/\text{L} = 0.1006 * f * V$$

nel caso in cui venga prelevata un'aliquota di 50 ml, oppure

$$\text{mg-atomo O}_2/\text{L} = (Y/Y-2) * 5.00/X * f * V$$

quando una aliquota X ml viene prelevata da una bottiglia Y -ml.

I millilitri di ossigeno presenti in un litro di acqua può essere calcolato come segue:

$$\text{ml O}_2(\text{NTP})/\text{L} = 11.20 * \text{mg-atomo O}_2/\text{L}$$

$$\text{mg O}_2/\text{L} = 16.00 * \text{mg-atomo O}_2/\text{L}$$

Calcolo del fattore f

Riempire una bottiglia Pyrex con acqua di mare o acqua distillata ed aggiungere 1ml di acido solforico concentrato, 1ml di soluzione iodata alcalina e mescolare. Alla fine aggiungere 1ml di solfato di manganese e mescolare di nuovo. Porre circa 50ml all'interno del contenitore per la titolazione e titolare con 0.1N tiosolfato sodico o 0.001 tiosolfato sodico.

Fare 3 o 5 repliche e calcolare il valore di f come:

$$f = 5.00/v$$

Clorofilla a

Apparecchiature

Apparato per la filtrazione

- Pompa da vuoto
- Filtri in fibra di vetro Whatman GF/F 25 mm
- Provette da centrifuga da 10 ml
- Cilindri graduati da 1L
- Spettrofotometro

Procedura analitica

Preparazione dei reagenti

a. Acetone neutralizzato

Aggiungere all'acetone puro carbonato di sodio anidro in eccesso ed agitare vigorosamente. Filtrare, dopo almeno 24 ore, su carta da filtro e travasare nella spruzzetta.

b. Acetone neutro al 90 %

Mescolare 100ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone.

c. Acetone neutro all'80%

Mescolare 200ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone.

d. Acido cloridrico 0.66 mol/L

Versare lentamente e sotto agitazione 55 ml di acido cloridrico concentrato in 950 ml di acqua grado reagente.

Analisi dei campioni

Filtrare un volume noto (da 1 a 4L) di un campione d'acqua su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F (25 mm di diametro). Utilizzare una pompa da vuoto assicurandosi che la pressione sia di circa 150 mmHg, per evitare la rottura delle cellule vegetali ed il conseguente passaggio dei pigmenti attraverso il filtro.

Conservare i filtri in provette da 10 mL in 5mL di Acetone disidratato 100% (inibisce le clorofillasi) al buio ad una temperatura di -20°C (i pigmenti sono fotolabili e termolabili) se si desidera posticipare il dosaggio spettrofotometrico. Nel caso in cui questo venga effettuato subito dopo la filtrazione riporre le provette a 4°C.

Triturare i filtri con un pestello ed aggiungere un volume di Acetone 80% pari al volume di Acetone 100% con lo scopo di ottenere un estratto al 90%. Riporre i campioni ad una temperatura di circa 4°C per 24h per completare l'estrazione. Nel caso in cui il dosaggio spettrofotometrico venga effettuato subito dopo la filtrazione, riporre a 4°C per un'ora.

Centrifugare le provette chiuse per 15 minuti a 4000 giri/min in modo da separare il filtro dalla soluzione. Prelevare il sopranatante mediante pipetta e riempire la cuvette per la lettura allo spettrofotometro.

Procedere con la lettura dell'estratto allo spettrofotometro.

Calcoli

Tre sono i metodi più ampiamente utilizzati per la stima dei pigmenti fotosintetici:

- metodo della stima della clorofilla a (con feopigmenti) (Jeffrey & Humphrey, 1975);
- metodo per la stima delle clorofille a,b e c (Lorenzen & Jeffrey, 1980);
- metodo per la stima separata della clorofilla a e dei feopigmenti (Lorenzen, 1967).

2.3.6 Trattamento e restituzione dei dati

Il Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina del DEB provvederà a gestire e fornire i dati inviati dalle stazioni di misura fisse, garantendo un controllo di qualità preliminare e continuo prima della trasmissione dei dati stessi al CED dell'Autorità Portuale, che successivamente li inserirà all'interno di un Portale Informatico per la visualizzazione delle serie temporali.

Al termine di ogni operazione, per ogni stazione di misura fissa, verrà elaborato un report tecnico-scientifico inerente le attività effettuate in mare ed in laboratorio, nonché il processamento, l'elaborazione e la rappresentazione dei dati provenienti dalla stazione di misura.

2.4. Monitoraggio attraverso campagne di acquisizione in situ

Le attività oggetto del presente capitolo sono relative alla realizzazione di campagne *in situ* per la raccolta di campioni di acqua al fine di monitorare gli eventuali inquinanti e la torbidità nella colonna d'acqua relativi alle attività di dragaggio.

A tal fine verranno effettuate, nelle tre stazioni del transetto in Fig.2.4-1, 6 campagne di campionamento per un totale di 18 campioni prima della messa in opera dei dragaggi e 18 campagne di campionamento con cadenza quindicinale per un totale di 54 campioni durante la fase di dragaggio, per un totale di 72 campioni d'acqua, sui quali saranno effettuate le analisi dei seguenti parametri: coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali, salmonella, spore di clostridi solfito riduttori, enterovirus, idrocarburi totali, IPA, PCB, pesticidi organoclorurati, azoto totale; fosforo totale, alluminio, mercurio, cadmio, antimonio, arsenico, berillio, cromo, nichel, piombo, rame, selenio, vanadio, zinco, cianuri, composti organostannici, torbidità, ossigeno disciolto, clorofilla a.

Le procedure che verranno adottate per l'analisi dei parametri sopra indicati sono conformi ai

metodi riportati nei Manuali e Linee Guida APAT/CNR IRSA n. 29/2003 e successivi aggiornamenti, nei Quaderni IRSA e in 'Metodologie Analitiche di Riferimento-Programma di Monitoraggio per il controllo dell'Ambiente marino costiero/Triennio 2001.2003', MATTM, ICRAM, Roma 2001 e successivi aggiornamenti.



Fig.2.4-1 Piano di campionamento

Ad integrazione delle attività di campionamento previste dal presente monitoraggio, verranno effettuati dei profili verticali mediante sonde multiparametriche dotate, tra l'altro, di sensore di torbidità, al fine di misurare le caratteristiche fisico-chimico-biologiche della colonna d'acqua.

Verranno inoltre utilizzati dei modelli matematici di simulazione numerica al fine di evidenziare la propagazione di sostanze conservative e non conservative presenti nella colonna d'acqua, in modo da analizzare in maniera quasi sinottica i fenomeni che avvengono nel sistema costiero. I dati raccolti durante il monitoraggio dei dragaggi verranno utilizzati nell'ambito di specifiche indagini scientifiche finalizzate allo studio dell'interazione tra i processi chimico-fisici e quelli biologici in ambiente marino costiero. La localizzazione del transetto su cui verranno effettuati i campionamenti permetterà un'efficace analisi quali-quantitativa della distribuzione verticale e orizzontale delle variabili oceanografiche lungo un gradiente costa-largo. Le attività di ricerca potranno portare alla pubblicazione di articoli scientifici in riviste di rilievo nazionale ed internazionale.

2.4.1 Modalità di campionamento

Le modalità di campionamento vengono di seguito descritte in funzione delle tipologie dei parametri oggetto dell'analisi:

- parametri microbiologici (coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali, salmonella, spore di clostridi solfito riduttori, enterovirus): il prelievo dei campioni d'acqua verrà effettuato utilizzando contenitori sterili monouso; i campioni saranno prelevati nello strato d'acqua superficiale (come da normativa vigente per le acque di balneazione);
- parametri organici (idrocarburi totali, IPA, PCB, pesticidi organoclorurati, composti organostannici): il prelievo dei campioni d'acqua verrà effettuato utilizzando una bottiglia in vetro; i campioni saranno prelevati nello strato d'acqua superficiale;
- azoto totale e fosforo totale: il prelievo dei campioni d'acqua verrà effettuato utilizzando una bottiglia Niskin; i campioni saranno prelevati nello strato d'acqua superficiale ;
- metalli pesanti e composti inorganici (alluminio, mercurio, cadmio, antimonio, arsenico, berillio, cromo, nichel, piombo, rame, selenio, vanadio, zinco, cianuri): il prelievo dei campioni d'acqua verrà effettuato utilizzando una bottiglia Niskin; il campione ottenuto sarà dato da una media di più prelievi effettuati lungo la colonna d'acqua;
- clorofilla a, solido sospeso, ossigeno disciolto: questi parametri consentiranno anche di calibrare la sonda multiparametrica e quindi verranno prelevati dei campioni ad una quota fissa, tramite bottiglia Niskin.

Di seguito si riportano le procedure analitiche che verranno adottate per l'analisi dei parametri indicati nel capitolo 1.

Coliformi totali

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 100 ml all'interno di un recipiente sterile.

Coliformi fecali

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 100 ml all'interno di un recipiente sterile.

Streptococchi fecali

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 100 ml all'interno di un recipiente sterile.

Salmonella

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 1000 ml all'interno di un recipiente sterile.

Spore di clostridi solfito-riduttori

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di 100 ml all'interno di un recipiente sterile.

Enterovirus

Il campionamento dell'acqua va effettuato attraverso l'immersione di bottiglie sterili, incartate prima della sterilizzazione (al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una

pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti). Estrarre quindi per l'analisi un campione di acqua del Volume di almeno 10 L all'interno di un recipiente sterile. Per campioni di tali dimensioni si può provvedere ad una concentrazione preliminare direttamente su campo (concentrazione primaria) e trasportare in laboratorio, in condizioni refrigerate, la membrana o cartuccia utilizzata che va successivamente eluita in laboratorio (concentrazione secondaria).

Idrocarburi totali

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline. I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro a collo e tappo smerigliato.

IPA

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti rispettando le norme generali riportate nella sezione "Metodi di Campionamento" dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA. Il campionamento deve essere effettuato in bottiglie di vetro della capacità 1-2 L. Le bottiglie e i tappi (possibilmente con sotto-tappi in teflon) devono essere risciacquati con acetone e seccati prima dell'uso.

PCB

I campioni devono essere prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1L, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Prima del riempimento, le bottiglie (precedentemente lavate in laboratorio con acqua distillata e quindi con esano ed acetone) devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. Occorre evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma campionare almeno due aliquote per ciascun campione.

Pesticidi organoclorurati

I campioni vanno prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1 L con chiusura a smeriglio oppure a vite. Prima del riempimento le bottiglie devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. Evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in

plastica. È buona norma prelevare due aliquote per ciascun campione.

Azoto e fosforo totali

Tutti i contenitori per il campionamento dell'Azoto e del Fosforo totali devono essere lavati accuratamente, trattati con acido cloridrico diluito (10%) e risciacquati con acqua grado reagente prima dell'uso. Il campione viene raccolto direttamente dalla bottiglia primaria di campionamento ed introdotto in contenitori plastici in polietilene ad alta densità (HDPE), in teflon o borosilicato con tappo a tenuta e di volume di 200 ml. Prima della raccolta del campione i contenitori vengono avvinati 2-3 volte con il campione stesso.

Metalli pesanti

Per l'analisi dei metalli pesanti il campionamento viene eseguito rispettando le norme generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA, in base alla procedura indicata per ciascun analita.

Cianuri

Il prelievo e la conservazione dei campioni per l'analisi dei cianuri vengono effettuati in accordo con quanto riportato nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA.

Composti organostannici

La raccolta dei campioni in campo va effettuata attraverso l'utilizzo di bottiglie di vetro da 3 o 4 L che dovranno poi essere sigillate con parafilm.

Torbidità

Il campione d'acqua per la determinazione dei solidi sospesi viene prelevato dalla bottiglia di campionamento e travasato in bottiglie di plastica da 2L. E' necessario avvinare le bottiglie due volte prima della raccolta del campione.

Ossigeno disciolto

Il prelievo per la determinazione dell'ossigeno disciolto viene effettuato ponendo il tubo della

bottiglia Niskin alla base di una bottiglia di pyrex da 60-90 ml con tappo smerigliato a becco di flauto o a terminazione troncoconica arrotondata. E' necessario avvinare due volte la bottiglia prima della raccolta del campione e riempire la bottiglia completamente evitando di far rimanere aria all'interno.

Clorofilla a

Il campione d'acqua da prelevare per la determinazione della concentrazione di *Clorofilla a* viene travasato dalla bottiglia di campionamento in una bottiglia di plastica scura da 5L, interponendo il retino da plancton in modo da trattenere lo zooplancton e le macroalghe eventualmente presenti. E' necessario avvinare la bottiglia due volte prima della raccolta del campione.

2.4.2 Conservazione dei campioni

Di seguito si riportano le modalità di conservazione dei campioni, che verranno adottate per l'analisi dei parametri indicati nel capitolo 1.

Coliformi totali

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni prelevati per l'analisi dei coliformi totali siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi dei Coliformi dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Coliformi fecali

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni per l'analisi dei coliformi fecali siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi dei Coliformi dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Streptococchi fecali

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni per l'analisi degli streptococchi fecali siano

mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi degli Streptococchi dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Salmonella

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi di Salmonella dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Spore di clostridi solfito-riduttori

Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C.

Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 48 ore dal prelievo (tempo massimo consigliato per l'analisi dei batteri e spore di Clostridi solfito-riduttori dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Enterovirus

Il trasporto della membrana o cartuccia utilizzata per la concentrazione del campione deve avvenire nel più breve tempo possibile e in condizioni refrigerate. Il campione deve essere concentrato al suo arrivo in laboratorio o conservato a circa +4°C sino al momento dell'esame (massimo 24 ore, tempo massimo consigliato per l'analisi di Enterovirus dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003).

Idrocarburi totali

Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con Acido Cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a +4°C.

IPA

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti rispettando le norme

generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA. I campioni vanno conservati al buio ed in frigorifero a +4°C fino al momento delle operazioni di estrazione, le quali devono essere effettuate il più presto possibile e comunque non oltre 48 ore.

PCB

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti rispettando le norme generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” (Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA). I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana; eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall’aggiunta di acido cloridrico concentrato (1 mL/L di campione).

Pesticidi organoclorurati

I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana. Eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall’aggiunta di acido cloridrico concentrato (1 mL/L di campione); è comunque necessario accertare in via preliminare che l’aggiunta di acido cloridrico non causi alterazioni quali-quantitative di altri composti eventualmente contenuti nel campione da analizzare.

Azoto e Fosforo Totali

Tutti i contenitori e le attrezzature da laboratorio utilizzate per il campionamento dell’Azoto e del Fosforo totali devono essere lavati accuratamente, trattati con acido cloridrico diluito (10%) e risciacquati con acqua grado reagente prima dell’uso. Una volta raccolti, i campioni vengono congelati immediatamente a –20°C, fino all’analisi in laboratorio. La loro conservazione può protrarsi anche per diversi mesi senza causare alterazione dei risultati.

Metalli pesanti

La conservazione dei campioni per l’analisi dei metalli pesanti viene eseguita rispettando le norme generali riportate nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA, in base alla procedura indicata per ciascun analita.

Cianuri

Il prelievo e la conservazione del campione per l'analisi dei cianuri devono essere effettuati in accordo con quanto riportato nella sezione “Metodi di Campionamento” dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA. La conservazione del campione viene effettuata aggiungendo al campione una soluzione concentrata di NaOH (10 M) fino a $\text{pH} \approx 12$. È bene conservare il campione in bottiglia ben chiusa e in luogo fresco e buio.

Composti organostannici

L'elevata tendenza alla degradazione dei composti organostannici rende necessaria la conservazione del campione in opportune condizioni. Per minimizzare tale rischio è necessario conservare i campioni a $+4^{\circ}\text{C}$ immediatamente dopo il loro prelievo ed analizzarli entro 24 ore.

Torbidità

I campioni d'acqua prelevati dalla bottiglia di campionamento vengono riposti in contenitori di plastica da 2L. E' necessario analizzare i campioni nel più breve tempo possibile al fine di ridurre al minimo la possibilità di variazioni chimiche o fisiche o biologiche durante la conservazione.

Ossigeno disciolto

L'analisi per la determinazione della concentrazione dell'ossigeno disciolto dovrà essere effettuata entro un'ora dal campionamento. Nel caso in cui si renda necessaria una posticipazione delle attività di laboratorio i campioni prelevati in situ verranno fissati mediante l'aggiunta di manganese solfato e potassio iodato.

Clorofilla a

La conservazione dei campioni prelevati per la determinazione della concentrazione di *Clorofilla a* viene effettuata ponendo le bottiglie di raccolta del campione al fresco, lontano dai raggi solari, fino al momento della filtrazione, che dovrà avvenire non oltre le 6-8 ore successive alla raccolta del campione.

2.4.3 Operazioni in laboratorio

Di seguito si riportano le attività di laboratorio ed i metodi di riferimento adottati per l'analisi dei parametri indicati.

Coliformi totali

La tecnica utilizzata per l'analisi dei coliformi totali è quella del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) riportata nei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Tale metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, permette di calcolare la densità dei coliformi totali in campioni di acqua tramite una stima statistica, determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- reattivi e terreni di coltura:
- brodo Lattosato (per la prova presuntiva);
- brodo Lattosato Bile Verde Brillante (per la prova di conferma).

Procedura analitica

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua. Si articola in due prove, una “presuntiva” e una “di conferma”.

Prova presuntiva

- Agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua.
- Seminare aliquote scalari del campione (e/o sue diluizioni) in più serie di matracci o tubi multipli contenenti terreno colturale liquido (Brodo Lattosato).
- Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ entro 30 minuti.
- Dopo 24 ± 2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed

eventualmente reincubare per altre 24 ore.

- Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo.
- La produzione di gas entro le 48 ± 3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva: sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

Prova di conferma

- Prelevare sterilmente 0.1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo della prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo Lattosato Bile Verde Brillante per la prova di conferma.
- Incubare i tubi a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24+24 ore.
- Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi totali. Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi.

Calcoli

Sulla base delle combinazioni ottenute, il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$MPN / 100 \text{ ml} = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{ml di campione nei tubi negativi} \cdot \text{ml di campione in tutti i tubi}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, consultando la tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemminati con l'acqua in esame.

Il risultato ottenuto va riportato come valore MPN/100 mL di campione (numero più probabile di

microrganismi per volume di campione).

Coliformi fecali

La tecnica utilizzata per l'analisi dei coliformi fecali è quella del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) riportata nei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Tale metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, permette di calcolare la densità dei coliformi fecali in campioni di acqua tramite una stima statistica, determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- reattivi e terreni di coltura:
- brodo Lattosato (per la prova presuntiva);
- EC Medium (per la prova di conferma).

Procedura analitica

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua. Si articola in due prove, una “presuntiva” e una “di conferma”.

Prova presuntiva

Agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Seminare aliquote scalari del campione (e/o sue diluizioni) in più serie di matracci o tubi multipli contenenti terreno colturale liquido (Brodo Lattosato).

Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ entro 30 minuti. Dopo 24 ± 2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48 ± 3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva: sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

Prova di conferma

Prelevare sterilmente 0.1 mL di brodo-coltura dai tubi positivi del brodo della prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il brodo per la prova di conferma (EC-Medium). Incubare i tubi a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi fecali. Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi. Sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003, calcolare, considerando l’eventuale diluizione, il valore dell’indice MPN.

Calcoli

Sulla base delle combinazioni ottenute, il risultato si ottiene calcolando il valore dell’indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$MPN/100\text{ ml} = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{ml di campione nei tubi negativi} \cdot \text{ml di campione in tutti i tubi}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, dalla tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Essa riporta il valore dell’indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemenzati con l’acqua in esame.

Il risultato ottenuto va riportato come valore MPN/100 ml di campione (numero più probabile di microrganismi per volume di campione).

Streptococchi fecali

La tecnica utilizzata per l'analisi degli streptococchi fecali è quella del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) riportata nei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Con questo metodo è calcolata la densità degli streptococchi/enterococchi in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- reattivi e terreni di coltura;
- brodo all’Azide Destrosio (per la prova presuntiva);
- brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio (per la prova di conferma).

Procedura analitica

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua. Si articola in due prove, una “presuntiva” e una “di conferma”.

Prova presuntiva

Agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell’acqua. Seminare aliquote scalari del campione (e/o sue diluizioni) in più serie di matracci o tubi multipli contenenti terreno colturale liquido (Brodo all’Azide Destrosio). Dopo l’inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all’incubazione in termostato a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ entro 30 minuti per 48 ± 3 ore. Dopo incubazione, agitare ciascun tubo per verificare la presenza di torbidità (risultato positivo). Quindi registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano intorbidimento del brodo e sottoporre i tubi positivi alla prova di conferma.

Prova di conferma

Prelevare sterilmente 0.1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo della prova presuntiva (torbidità entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio per la prova di conferma. Incubare i tubi a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per $24+24 (\pm 3)$ ore.

Alla fine del periodo di incubazione, considerare positivi i tubi che presentano intorbidimento accompagnato da un deposito grigio-violetto sul fondo del tubo. Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la tabella 1 riportata nella Sezione 6020 dei Metodi Analitici per le Acque CNR-IRSA, calcolare il valore dell'indice MP.

Calcoli

Sulla base delle combinazioni ottenute, il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$MPN/100\,ml = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{ml di campione nei tubi negativi} \cdot \text{ml di campione in tutti i tubi}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, dalla tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemminati con l'acqua in esame. Il risultato ottenuto va riportato come valore MPN/100 ml di campione (numero più probabile di microrganismi per volume di campione).

Salmonella

Il metodo che verrà adottato per l'analisi della concentrazione di batteri del genere *Salmonella* è quello riportato nel Manuale APAT – IRSA/CNR 29/2003 “Metodi Analitici per le acque”. La tecnica utilizzata consente di valutare la Presenza/Assenza di microorganismi appartenenti al genere *Salmonella* in un determinato volume noto di acqua. Consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere prearricchimento, arricchimento, isolamento ed eventualmente, conferma biochimica e conferma sierologica.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio
- Reattivi e terreni di coltura:
- Substrato di prearricchimento: Acqua Peptonata Tamponata;
- Substrato di arricchimento → Scegliere tra:
 - Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis;
 - Brodo di base al Tetrationato ;
- Substrati di isolamento → Scegliere tra:
 - Hektoen Enteric Agar;
 - Xilosio Lisina Desossicolato;
 - Rambach Agar;
- Substrato di crescita: Triptone Soia Agar (Prova citocromossidasi);
 - Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato:
 - Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%;
- Substrato per la prova della fermentazione dei carboidrati:
 - Agar al ferro di Kligler;
- Substrato per la prova della decarbossilazione della lisina;
 - Agar al ferro e lisina.

Procedura analitica

Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo; è una fase che può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.

- Filtrare 1000 mL di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 μ m) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se è necessario per presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane.
- Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua Peptonata Tamponata contenuta in beuta e incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

Fase di arricchimento

- Eseguire l'inoculo di un'aliquota del campione in Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis;
- Incubare il Brodo di Rappaport Vassiliadis a $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24+24 ore.

Fase di isolamento ed identificazione delle colonie

- Dal brodo di arricchimento eseguire, prelevando un'ansata, 2 subcolture per strisci multipli sui terreni di isolamento: la prima dopo 24 ± 2 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ± 2 ore.
- Incubare le piastre a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore.
- Su Hektoen Enteric Agar le colonie sospette di Salmonella si presenteranno verdi con margini netti con o senza centro nero, su Xilosio Lisina Desossicolato le colonie sospette di Salmonella si presenteranno rosse con centro nero, lucide, convesse e con margini netti, su Rambach Agar il 97-99% delle colonie di Salmonella si presentano rosse (*S. paratyphi* e *S. typhi* cresceranno invece come colonie incolori. Alcuni stipiti di Pseudomonas possono crescere come colonie rosse; tuttavia la loro presenza può essere messa in evidenza con la prova della citocromossidasi).

Conferma biochimica

Qualora si ritenga opportuno, è possibile procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere Salmonella delle colonie sospette eseguendo la prova della citocromossidasi, della fermentazione dei carboidrati e della decarbossilazione della lisina (metodi APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003).

Successivamente l'identificazione biochimica può essere completata con i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.

Prima di effettuare ciascuna prova è opportuno, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Tryptone Soia Agar e incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

a. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere Salmonella da quelli appartenenti al genere Pseudomonas che possono produrre colonie simili sul terreno di isolamento. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

Dal terreno Tryptone Soia Agar prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la

colonia cresciuta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro 10 secondi una colorazione blu-violetto.

b. Prova della fermentazione dei carboidrati

Dal terreno Triptone Soia Agar prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kligler. Incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo 18-24 ore di incubazione. Per la interpretazione dei risultati si devono annotare le reazioni riportate nel metodo 7080 del manuale APAT – IRSA/CNR – 29/2003 “Metodi Analitici per le Acque”.

c. Prova della decarbossilazione della lisina

Dal terreno Triptone Soia Agar prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro e lisina. Incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

I microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* producono una reazione alcalina (violetta) sia del becco, sia del cilindro; una colorazione gialla (acida) indica una reazione negativa. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno.

Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica.

Calcoli

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella*, Assente o Presente nel volume esaminato e, se del caso, il sierotipo individuato.

Spore di clostridi solfito riduttori

La tecnica che verrà adottata per la determinazione delle spore di clostridi solfito-riduttori è quella del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) riportata nel manuale APAT – IRSA/CNR “Metodi Analitici per le acque” – 29/2003. Il metodo consente di valutare la

concentrazione delle spore dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* presenti in campioni d'acqua preventivamente trattati al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, favorendo contemporaneamente la germinazione delle forme sporali. La stima statistica è determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- Giara per anaerobiosi;
- Reattivi e terreni di coltura: 1 a scelta tra
 - Agar al Triptone Solfito e Neomicina;
 - Olio di vaselina sterile;
 - Agar nutritivo base al sangue di coniglio;
 - Sangue defibrinato di coniglio;
 - Agar Columbia con 5% di sangue di montone;
 - Perossido di idrogeno 3%.

Procedura analitica

Pretrattamento del campione

- Mantenere il campione per 15 ± 1 minuti a $75 \pm 5^\circ\text{C}$ in bagno termostato per l'inattivazione delle forme vegetative;
- Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

Isolamento

- Inoculare aliquote del campione in concentrazioni scalari in tubi contenenti il terreno;
- Effettuare l'inoculo nei tubi con il terreno disciolto e mantenuto tale alla temperatura di circa 45°C , avendo cura di distribuire bene il campione nel terreno evitando la formazione di bolle d'aria;
- Lasciar raffreddare ed aggiungere in ogni tubo alcuni millilitri di olio di vaselina;
- Incubare a $46 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

Conteggio ed identificazione delle colonie

- Considerare positivi i tubi con crescita di colonie nello spessore dell'agar che provocano

annerimento del terreno.

Conferma

- Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium*, è necessario eseguire sulle colonie rilevate la colorazione di Gram e la prova della catalasi (metodi APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003).

Calcoli

Sulla base delle combinazioni ottenute, il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$MPN/100\,ml = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{ml di campione nei tubi negativi} \cdot \text{ml di campione in tutti i tubi}}}$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, dalla tabella riportata nella sezione “Metodi Microbiologici - Parte generale” al capitolo 6020 “Lineamenti di tecniche analitiche” dei “Metodi Analitici per le acque” APAT – IRSA/CNR, Manuali e linee guida – 29/2003. Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemminati con l'acqua in esame.

Il risultato ottenuto va riportato come valore MPN/100 ml di campione (numero più probabile di microrganismi per volume di campione).

Dal numero di colonie caratteristiche contate e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di spore di clostridi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula :

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t}$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

Vt = volume (mL) di campione analizzato;

Vs = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

Enterovirus

Il metodo che verrà adottato per la determinazione degli Enterovirus è il metodo 7120 del Manuale APAT – IRSA/CNR– 29/2003, “Metodi Analitici per le acque”.

Apparecchiature

- Normale strumentazione e vetreria di laboratorio;
- apparecchi per la produzione di acqua ultrapura;
- apparecchio per la produzione di acqua ultrapura per colture cellulari;
- bagnomaria;
- cappe a flusso laminare tipo “biohazard”;
- centrifughe refrigerate a 6.000 rpm e 20.000 rpm;
- congelatori -20°C e -80°C ;
- contenitori per azoto liquido;
- microscopio rovesciato;
- sistema di filtrazione per membrane piane di diverso diametro e relativa pompa da vuoto;
- sistema di ultrafiltrazione;
- termostati.
- Reattivi e terreni di coltura:
 - Sodio tiosolfato;
 - Estratto di carne al 3% pH 7,2 (2.2a) e pH 9,5 (2.2b);
 - Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,1M;
 - Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,1M;

- Soluzione di Formaldeide allo 0,1%;
- Soluzione salina fosfatata con o senza Calcio e Magnesio (PBS);
- Soluzione fosfato di sodio bibasico anidro (Na_2HPO_4) allo 0,15 M pH 7,2;
- Soluzione di polietilenglicol 6000 (PEG) al 50% (p/v);
- Agar all'1,8%;
- Soluzione di Rosso neutro all'1%;
- "Pool" di antibiotici;
- Terreni per colture cellulari.

Procedura analitica

Procedura di filtrazione e concentrazione del campione

Filtrazione su membrane piane o cartuccia a carica superficiale elettropositiva (operano in un campo di pH estremamente ampio, non necessitano di preacidificazione ed aggiunta di sali, e possono essere collegate ad una pompa per la filtrazione del campione direttamente su campo).

a. Procedura di concentrazione primaria

Fase in campo

Montare la cartuccia e/o membrana a carica superficiale elettropositiva nell'apposito supporto e collegare direttamente il contenitore al rubinetto di prelievo o alla pompa.

Regolare il flusso d'acqua in uscita, in base alle indicazioni della casa produttrice le membrane e/o cartucce, applicando un regolatore del flusso idrico in entrata. In uscita è consigliabile applicare un contalitri. Dopo il prelievo, mettere la cartuccia e/o membrana in una busta di plastica ed etichettarla indicando luogo, data del prelievo e il volume filtrato. Porre la cartuccia in una borsa termica o in frigorifero portatile sino al ritorno in laboratorio.

Fasi in laboratorio

Eluizione del virus adsorbito alla cartuccia e/o membrana:

In laboratorio è preferibile eluire la cartuccia e/o membrana immediatamente o comunque entro le 24 h conservandola a circa +4°C. L'eluente utilizzato per favorire il distacco del virus dal supporto solido può essere variato secondo le proprie necessità. Per eluire correttamente una cartuccia da 10 pollici sono necessari 1,2-1,5 L di eluente in ricircolo continuo con l'ausilio di una pompa da laboratorio (in breve, va collegata l'uscita della pompa all'entrata del contenitore per

cartucce. Il tubo di entrata della pompa deve pescare nella beuta contenente l'eluente. A sua volta l'uscita del contenitore deve ritornare, mediante un tubo flessibile, alla beuta). Far fluire l'eluente per almeno 15 minuti e alla fine raccoglierlo svuotando completamente la cartuccia. Per membrane piane da 142 mm verranno utilizzati 90 mL di eluente facendolo passare lentamente goccia a goccia.

Neutralizzare l'eluato con acido cloridrico (HCl) prestando attenzione che il pH sia intorno a $7,0 \pm 0,2$.

b. Procedura di concentrazione secondaria

Al fine di ridurre il volume da seminare su colture cellulari, che deve essere estremamente ridotto, è necessario procedere ad una seconda fase di concentrazione che può differenziarsi secondo i virus che si intendono ricercare o dell'eluente utilizzato per eluire la cartuccia e/o membrana. La stessa metodica descritta nella prima fase di concentrazione (cartuccia o membrana elettropositiva) può essere anche utilizzata nella seconda fase, utilizzando membrane o cartucce di superficie inferiore. Altri sistemi prevedono una precipitazione degli enterovirus eventualmente presenti. Le tre metodiche più comunemente utilizzate sono: l'ultrafiltrazione, la flocculazione organica e la precipitazione con Polietilenglicol 6000. Una di queste tre metodiche, come consigliato dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003 “Metodi Analitici per le acque”, verrà utilizzata in questa fase.

Isolamento ed identificazione di enterovirus

Le tecniche utilizzate in questa fase sono legate alla diversa tipologia degli enterovirus.

Alcuni virus, capaci di moltiplicarsi su sistemi cellulari, sono in grado di indurre un tipico effetto citopatico (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus), altri (Epatite A) possono moltiplicarsi senza indurre alcuna alterazione evidente. In quest'ultimo caso la loro presenza può essere svelata solo con tecniche immunologiche (immunofluorescenza diretta o indiretta, “test” immunoenzimatici, “test” radioimmunologici) o di biologia molecolare (ibridazione, reazione a catena della polimerasi).

a. Colture cellulari

Le linee cellulari da utilizzare sono diverse per i diversi tipi di virus. Sono classificabili in tre gruppi: cellule di primo espanto, linee cellulari continue e cellule diploidi.

Le cellule vengono fatte crescere su supporti solidi (fiasche) in plastica speciale per colture cellulari di dimensioni variabili da 12,5 cm² sino a 175 cm², o in “roller” (fiasche tonde in rotazione continua) da 500 cm² (le cellule possono essere anche coltivate in tubi, in piastre da 2 a 96 pozzetti o in capsule di Petri in genere da 45 a 90 mm di diametro).

I monostrati cellulari ad intervalli regolari e variabili, secondo le diverse linee cellulari, devono essere separati nelle loro singole cellule da utilizzare per la preparazione di altri monostrati cellulari.

I campioni comunque concentrati presentano una notevole quantità di batteri che debbono essere eliminati prima dell’inoculo su cellule.

Inoculare 0,5 mL di campione per fiasche da 25 cm² ed aggiungere uguale volume di terreno di mantenimento (diluizione finale 1:2). La quantità di campione che può essere inoculato su monostrati cellulari dipende strettamente dalla tossicità del campione ed in alcuni casi è consigliabile ricorrere a diluizioni superiori (1:7-1:10).

L’isolamento su monostrato cellulare può essere effettuato, dopo inoculo del campione sul monostrato cellulare e successivo adsorbimento del virus, aggiungendo terreno per colture cellulari in soluzione liquida o addizionato ad agar.

b. Isolamento di virus che non provocano effetto citopatico: sistemi immunologici e tecniche di biologia molecolare

Alcuni virus, come l'Epatite A, crescono con estrema difficoltà e con tempi di incubazione lunghi anche diverse settimane. Questi possono essere messi in evidenza con tecniche immunologiche di immunofluorescenza diretta o indiretta, “radio-immuno focus assay” (RIFA) e tecniche immunoenzimatiche (ELISA) dove l’anticorpo specifico verso un determinato antigene è adeso alla fase solida (piastre per “test” ELISA a 96 pozzetti).

Ogni “test” deve sempre comprendere controlli negativi e controlli positivi. Un'altra possibilità per identificare questi virus è fornita dalle tecniche di biologia molecolare, applicabili sia al campione concentrato che dopo passaggio su cellule. Tali sistemi comprendono le sonde molecolari o “probes” sia a DNA sia a RNA (“test” di ibridazione) e la reazione a catena della polimerasi (“Polymerase Chain Reaction”, PCR). Uno di questi metodi, consigliati dal manuale APAT – IRSA/CNR, – 29/2003 “Metodi Analitici per le acque”, verrà utilizzato per identificare la presenza di questo tipo di enterovirus.

Calcoli

La procedura descritta permette di determinare la presenza di Enterovirus sia attraverso tecniche qualitative, che danno un'indicazione della sola presenza o assenza dei virus, che quantitative, effettuando il conteggio in un volume noto di acqua delle Unità Formanti Placche (UFP/Volume).

Idrocarburi totali

Il metodo di riferimento per l'analisi degli idrocarburi totali è il Metodo 5160 del Manuale APAT – IRSA/CNR– 29/2003. Esso propone la tecnica gravimetrica per concentrazioni superiori ai 10 mg/L e quella spettrofotometrica all'infrarosso, di cui si riporta la procedura analitica, per basse concentrazioni (> 0.05 mg/L).

Apparecchiature

- Normale attrezzatura di laboratorio.
- Bottiglia di campionamento in vetro a collo largo, da 500-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione in teflon.
- Imbuti separatori di volume adeguato, muniti di rubinetto e tappo in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro dello stesso volume con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon.
- Spettrofotometro FT-IR o IR, doppio raggio, munito di celle in quarzo con cammino ottico di 1 cm e di 4 cm.
- Colonnine di percolazione in vetro, d.i. 10 mm, con rubinetto in teflon.
- Bilancia analitica.
- Bilancia tecnica.

Procedura analitica

Ottimizzazione delle condizioni strumentali

Lo spettrofotometro IR (o FT-IR) rimane normalmente acceso anche nel caso di prolungata inattività. Prima di avviare il ciclo di misure, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli di riferimento.

Taratura

Quando la natura dell'inquinante è nota, è auspicabile impiegare per la taratura lo stesso composto, preparando soluzioni diluite in 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Tuttavia, poiché nella maggior parte dei casi la natura della miscela di idrocarburi presente nel campione non è nota, si ricorre ad una miscela di riferimento. Per molti anni si è utilizzata come soluzione di riferimento una miscela di esadecano (37,5%), iso-ottano (37,5%) e benzene (25%). Tuttavia, la maggiore attenzione prestata in questi ultimi anni alle problematiche concernenti la salute degli operatori addetti al controllo, in particolar modo in presenza di sostanze, come il benzene, di accertata cancerogenicità, suggerisce di eliminare, in accordo con quanto previsto dal metodo ASTM, il benzene dalla suddetta miscela. Tale eliminazione ha, peraltro, scarsa rilevanza sul piano della qualità del dato ottenuto in quanto i diversi protocolli di riferimento prevedono la misura dell'assorbanza in una regione dello spettro IR in cui il benzene non fornisce alcun contributo (come altezza di picco a 2930 cm^{-1} o come area integrata nell'intervallo $3015\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$).

Alla luce delle considerazioni esposte si suggerisce l'impiego di una soluzione di riferimento costituita da n-esadecano (50% in volume) e iso-ottano (50% in volume).

Registrare lo spettro IR delle soluzioni diluite nella regione compresa tra 3200 cm^{-1} e 2700 cm^{-1} utilizzando il 1,1,2-triclorotrifluoroetano come riferimento. Misurare l'integrale dell'area sottesa dai picchi compresi nella regione $3015\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$.

Trattamento del campione

Estrazione: Trasferire un quantitativo noto del campione in esame, compreso tra 0,5 L e 2,0 L, in adatto imbuto separatore e procedere all'aggiunta di 5 mL di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤ 2 , in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1. Aggiungere, operando sotto cappa, 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano con cui si è lavata la bottiglia di raccolta del campione e, qualora sia stato usato, il contenitore in vetro dell'apposito dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Lasciare separare le due fasi e far percolare la fase organica attraverso una colonnina di vetro, munita di rubinetto in teflon e riempita con 0,5 g di gel di silice e 0,3 g di Na_2SO_4 disposti su strati sovrapposti.

La colonnina va preventivamente lavata con 1,1,2-triclorotrifluoroetano e l'eluato analizzato all'IR per controllare l'assenza di bande idrocarburiche nell'intervallo spettrale di interesse

analitico. Generalmente sono sufficienti per il lavaggio 15 mL. Raccogliere il percolato in un matraccio tarato da 50 mL, avendo cura di scartare i primi 2 mL circa. Ripetere l'estrazione con altri 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano; l'estratto, assieme alle tracce di emulsione eventualmente presenti, viene percolato attraverso la colonnina e raccolto nello stesso matraccio precedente. Portare a volume a 50 mL.

Analisi

Effettuare uno spettro preliminare per rendersi conto dell'ordine di grandezza del valore di area da misurare. Registrare lo spettro IR della soluzione ottenuta dall'estrazione del campione seguendo le modalità già indicate per le soluzioni diluite.

Misurare l'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm⁻¹.

Calcoli

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le quantità (in mg) delle soluzioni diluite in ascissa e le unità di area corrispondenti in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

La concentrazione di idrocarburi totali viene ricavata dalla seguente formula:

$$C = \frac{A \cdot f}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di idrocarburi totali;

A = quantità (mg) ricavata utilizzando l'equazione della retta di regressione;

f = fattore di diluizione (eventuale) dell'estratto;

V = volume (L) di campione.

IPA

Apparecchiature

Normale vetreria di laboratorio che dopo il lavaggio deve essere sciacquata con acqua bidistillata, con acetone e seccata prima dell'uso e comprende:

- Bottiglie di vetro da 1 o 2 L;
- Imbuti separatori di vetro Pyrex di varie capacità con rubinetto e tappi di teflon;

- Matracci e pipette (classe A) di varie capacità ed accuratamente pulite;
- Flaconi di vetro di varie capacità con tappi in gomma teflonata;
- Microsiringhe per liquidi di varie capacità;
- Palloni da 250 mL in Pyrex con cono normalizzato;
- Bilancia analitica;
- Evaporatore rotante;
- Colonne per cromatografia in vetro (1 cm d.i., 30 cm lunghezza) dotate di setto poroso G0, rubinetto in teflon e serbatoio da 50 mL;
- Gascromatografo, equipaggiato con colonne capillari e rivelatore a selezione di massa con sistema di integrazione dati (HRGC/LRMS).

In alternativa può essere utilizzato l'HPLC che consiste in uno strumento dotato di rivelatore UV (a lunghezza d'onda variabile) e/o fluorescenza e di colonna a fase inversa. La fase mobile è costituita da una miscela di acetonitrile/acqua o metanolo/acqua. L'analisi viene effettuata in gradiente la cui composizione e durata, così come il flusso di lavoro, dipende dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

- Colonna capillare per GC e colonna per HPLC.

Procedura analitica

Estrazione

a. Estrazione liquido/liquido

Trasferire quantitativamente il campione di acqua in un imbuto separatore da 2 L. Risciacquare accuratamente la bottiglia con 50 mL di diclorometano.

Aggiungere il riferimento interno 0,1 mL (SI acetone) agitando per una accurata distribuzione.

Aggiungere il solvente di estrazione diclorometano (50 mL), agitare vigorosamente per 2 minuti.

Lasciare decantare e trasferire l'estratto ottenuto in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione altre due volte con uguali aliquote di solvente (50÷60 mL). Riunire gli estratti e anidrificarli con solfato di sodio anidro.

Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) l'estratto organico con evaporatore rotante; la temperatura del bagno termostato non deve essere superiore a 40°C.

Dopo aver concentrato l'estratto a circa 1 mL sotto flusso di azoto trasferirlo

quantitativamente in una fiala da 4 mL con diclorometano.

Fare attenzione durante le fasi di concentrazione a non andare a secco con l'estratto per non perdere gli IPA più volatili.

b. Estrazione su fase solida

Gli analiti vengono estratti tramite estrazione su fase solida (SPE) utilizzando Empore disk C18 (o cartuccia C18). Lavare il disco con 10 mL di diclorometano e condizionarlo aggiungendo metanolo (10 mL) sotto vuoto. Rimuovere l'eccesso di solvente con acqua esente da contaminanti organici (10 mL). Far passare 2 litri di campione contenente 10 mL di metanolo attraverso il disco sotto un vuoto di 10 cm di Hg. Durante questa operazione è necessario prevenire che il disco vada a secco controllando il vuoto e chiudendolo al momento opportuno.

Alla fine della filtrazione, far passare aria attraverso la membrana per alcuni minuti per rimuovere l'eccesso di acqua. Eluire gli analiti facendo passare diclorometano (10 mL) con un vuoto moderato (circa 0,5 cm di Hg). Raccogliere l'eluato in provetta graduata e concentrare sotto flusso di azoto a temperatura ambiente a piccolo volume (esattamente misurato). Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice

Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice

a. Preparazione della fase stazionaria

Purificare il gel di silice con diclorometano in Soxhlet per 12 ore. Evaporare il solvente residuo con evaporatore rotante e successivamente in stufa a 35°C. Attivare il gel di silice in stufa a 250°C per 16 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto. Attivare il sodio solfato a 400°C per 8 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto. Le fasi stazionarie, conservate in essiccatore sotto vuoto, sono attive per 5 giorni.

b. Preparazione della colonna cromatografica

Pesare in una beuta da 50 mL, munita di tappo smeriglio, 6,0 g di gel di silice, aggiungere 5 mL di una miscela esano/acetone 8:2 (v:v) e chiudere la beuta. Agitare e lasciare la beuta immersa in un bagno ad ultrasuoni per 5 minuti.

Introdurre nella colonna cromatografica pochi millilitri di esano. Trasferire nella colonna parzialmente riempita con esano, il gel di silice avendo cura che non si formino bolle d'aria. Aggiungere 2,0 g di solfato di sodio mantenendo la colonna sempre bagnata da esano. Condizionare la colonna con 10 mL di esano degassato mediante ultrasuoni.

c. Eluizione cromatografica

Portare l'estratto del campione ad un volume di 0,5 mL in esano mediante leggero flusso di azoto (prepurificato per passaggio su setacci molecolari) e caricare quantitativamente il campione aiutandosi se necessario con una piccola quantità di esano. Eluire per gravità in successione con:

- 30 mL di esano (prima frazione di scarto contenente gli alifatici);
- 20 mL acetone/esano 1:1 (v/v) (seconda frazione contenente gli IPA).

Concentrare lentamente la seconda frazione in evaporatore rotante fino a 0,5 mL (evitando di andare a secco), quindi trasferirla in una fiala da 1,8 mL aiutandosi con esano. Aggiustare il volume fino ad una quantità nota compresa tra 0,5-1 mL (con esano o mediante leggero flusso di azoto, prepurificato per passaggio su setacci molecolari) a seconda delle concentrazioni attese. Fino al momento dell'analisi conservare l'estratto a 4°C al buio.

Analisi dell'estratto

a. Analisi in HRGC/LRMS

L'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione può essere analizzato direttamente in HRGC/LRMS oppure, nel caso di matrici complesse, sottoposto a purificazione su colonna di gel di silice (come descritto in "Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice") e poi analizzato. È opportuno prima di iniziare l'analisi porre il forno alla massima temperatura raggiunta dall'analisi e monitorare la linea di base fino a che questa resti costante.

b. Analisi in HPLC/fluorescenza

Per effettuare l'analisi in HPLC/fluorescenza l'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione (vedi § 3.8.2, Estrazione, punti *a* e *b*) deve essere reso compatibile con la fase mobile impiegata. Ciò viene realizzato concentrando a 100 µL l'estratto in diclorometano e aggiungendo acetonitrile fino ad un volume finale di 1 mL. Il rivelatore a fluorescenza viene usato per la determinazione simultanea dei differenti composti. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione vengono variate in dipendenza del tipo di colonna e delle condizioni cromatografiche utilizzate.

Calcoli

Iniettare nel cromatografo volumi uguali di estratto e di soluzioni di riferimento diluite.

Costruire quindi le rette di taratura per i singoli IPA, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento. La quantificazione viene effettuata mediante la tecnica del riferimento interno.

Riportare in grafico il rapporto area picco componente/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del componente stesso.

La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

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

dove

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

A = area del picco dell'analita 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.

PCB

Apparecchiature

- Gascromatografo che consenta l'impiego di colonne capillari;
- Rivelatori: Rivelatore di massa (MS) operante in SIM, che consente in alcuni casi l'analisi quantitativa di congeneri non separabili cromatograficamente. Se tale rivelatore non è disponibile si può utilizzare il rivelatore ECD;
- Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici;
- Evaporatore rotante, con possibilità di operare con il vuoto e con bagno termostatico ed opportuno sistema per il recupero dei solventi.
- Vetreria: Oltre la normale vetreria in uso nel laboratorio si indicano qui di seguito alcuni elementi indispensabili per l'analisi.
- Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza=10 cm, d.i.=3,5 cm), senza setto poroso, con gambo sfinato (d.i.=10 mm). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento

in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA (volume serbatoio=60 mL, lunghezza colonna 10 cm, d.i. 2 cm, gambo sfinato (d.i.=8 mm).

- Colonna cromatografica in vetro (h=30 cm, d.i.=4,2 mm), con parte inferiore sfinata (h=3,5 cm, d.i.=2 mm) e serbatoio di riserva solventi della capacità di circa 60 mL.
- Fiale o provette da concentrazione in vetro (preferibilmente con gambo sfinato graduato a 0,5 mL ed 1 mL) da 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL.
- Imbuti separatori da 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.
- Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante, aventi capacità di 50 mL, 100 mL e 250 mL.
- Matraci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.
- Pipette graduate di precisione (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL).
- Colonne gascromatografiche: si consiglia di utilizzare colonne con rapporto di fase (raggio/2 x spessore di fase) circa 250 e di lunghezza non inferiore a 30 m.
- Microsiringhe per gascromatografia (tipo Hamilton o equivalenti) da 5 e 10 μ L.
- Bilancia analitica, risoluzione 0.1 mg.

Procedura analitica

Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, attendere che si equilibri a temperatura ambiente prima dell'estrazione. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità.

Estrazione

Trasferire 500 mL (o un volume minore) di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 60 mL (ridurre a 20-30 mL ed usare un imbuto separatore da 250 mL, se il volume di campione prelevato è di 100 mL) di miscela di diclorometano/n-esano 15:85 (v/v) ed agitare vigorosamente per almeno 3 minuti. Attendere la separazione tra le due fasi.

Nel caso di formazione di emulsione, aggiungere una soluzione satura di cloruro di sodio (50-100 mL), agitare ed attendere; se la quantità di emulsione rimane comunque elevata (volume di

emulsione pari ad un terzo o più della fase organica) centrifugare o filtrare su lana di vetro.

Scaricare la fase acquosa (fase inferiore) in un secondo imbuto separatore e raccogliere la fase organica (fase superiore) per percolazione in colonna di disidratazione su sodio solfato anidro (circa 30 g) in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL della stessa miscela di solventi, raccogliendo le fasi organiche disidratate su sodio solfato anidro sempre nello stesso pallone da 250 mL. Lavare il sodiosolfato con circa 20 mL di n-esano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche. Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) mediante evaporatore rotante dotato di bagno termostatico, alla temperatura di 45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente l'estratto concentrato in una provetta da concentrazione aiutandosi con la minima quantità necessaria di n-esano per i lavaggi del pallone, aggiungere 1 mL di iso-ottano e concentrare sotto flusso di azoto a circa 1 mL, assicurandosi della completa eliminazione del diclorometano.

Purificazione

Di seguito sono descritte le tecniche di purificazione più idonee per l'eliminazione delle più probabili interferenze. L'analista dovrà decidere se sottoporre l'estratto ad una o più di una delle seguenti procedure. Si consiglia comunque di sottoporre sempre l'estratto alla ripartizione con acetonitrile.

a. Ripartizione con acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi ed oli dall'estratto. Trasferire quantitativamente l'estratto in un imbuto separatore da 125 mL con un volume di n-esano sufficiente ad avere un volume finale nell'imbuto di 15 mL. Estrarre il campione per quattro volte con 30 mL di acetonitrile saturo di esano, agitando ogni volta vigorosamente per almeno 3 minuti.

Riunire le fasi acetonitriliche in un imbuto separatore da 1000 mL già contenente 700 mL di una soluzione di NaCl al 2%. Mescolare ed estrarre con due aliquote successive di 100 mL di n-esano, agitando vigorosamente ogni volta per almeno 3 minuti. Riunire gli estratti esanici in un imbuto separatore da 1000 mL e lavare con due aliquote successive di 100 mL di acqua distillata.

Scartare le acque di lavaggio e disidratare l'esano su solfato di sodio anidro in apposita colonna di disidratazione. Lavare l'imbuto separatore e il sodio solfato con tre porzioni di 10 mL di n-esano, riunendole all'estratto esanico. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL)

ed analizzare in gascromatografia. Se è necessario procedere con altre tecniche di purificazione, ridurre prima il volume sotto flusso di azoto fino a 1 mL.

b. Rimozione dello zolfo elementare

È consigliabile adottare questa purificazione anche se si sospetta una interferenza molto lieve.

Riempire una colonna cromatografica con 7 g di agente desolforante, trasferire quantitativamente l'estratto concentrato in testa alla colonna ed eluire con 25 mL di esano.

Concentrare l'eluato in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Se è necessario procedere con altre tecniche di purificazione, ridurre prima il volume, sotto flusso di azoto, fino a 1 mL.

c. Cromatografia su gel di silice attivato

L'estratto purificato può essere sottoposto a cromatografia su gel di silice attivato per la separazione dei PCB dai PCT.

Taratura dell'adsorbente: la cromatografia su gel di silice attivato (100-200 mesh) viene effettuata per completare il procedimento di purificazione dell'estratto e per ottenere la separazione dei PCB dai PCT in due frazioni in modo da facilitarne l'identificazione gascromatografica. È opportuno che ogni lotto di gel di silice ricevuto sia controllato per la riproducibilità della separazione secondo il procedimento seguente: da un lotto di gel di silice, conservato in un recipiente di vetro ermeticamente chiuso, prelevarne 60-80 g ponendoli in una larga capsula di porcellana e mantenerli in una stufa ad aria a 200°C per 8 ore (per l'attivazione dell'adsorbente è opportuno impiegare una stufa ad aria diversa da quella che si utilizza per il trattamento della vetreria). Il gel così attivato va conservato, in recipienti di vetro ermeticamente chiusi, in essiccatore e normalmente conserva le sue caratteristiche per 10-15 giorni.

Nella parte inferiore della colonna cromatografica pressare un batuffolo di lana di quarzo ed immettere 20 mL di n-pentano (chiudendo la parte inferiore della colonna) e poi 4 g di gel di silice attivato. Chiudere con un tappo a smeriglio la parte superiore della colonna, rovesciarla 2-3 volte e far depositare il gel di silice in modo da evitare la formazione di bolle d'aria. Iniziata la discesa del solvente, con piccoli quantitativi di n-pentano lavare le pareti della colonna per trasportare in basso tutto il gel di silice e successivamente, non appena il livello del solvente sta per raggiungere quello superiore dell'adsorbente, immettere nella colonna 2 mL del riferimento (in n-pentano) di

PCB+PCT e far adsorbire. Collegare il serbatoio riserva solventi ed eluire con 130 mL di n-pentano e, successivamente, con 60 mL di benzene. Il flusso dei solventi deve essere di circa 2-3 mL/minuto e può essere ottenuto applicando una lieve pressione nella colonna. Al termine della cromatografia concentrare le due frazioni in evaporatore rotante fino a pochi millilitri e portarle quasi a secchezza con debole flusso di azoto, a temperatura ambiente. Portare infine a un volume noto con n-esano ed esaminare i due eluati concentrati mediante gascromatografia. Per il corretto uso della colonna cromatografica l'efficacia della separazione (PCB nella prima frazione, PCT nella seconda) dovrebbe essere almeno del 95%. Se non si ottiene questo risultato variare opportunamente i volumi degli eluenti.

Cromatografia del campione: prima di procedere alla cromatografia su colonna del campione da analizzare, è opportuno ricavare almeno un tracciato gascromatografico complessivo dell'estratto diluito per avere un'idea orientativa delle sostanze presenti e delle loro quantità approssimative. Infatti, in caso di campioni molto contaminati l'estratto deve essere opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota della soluzione risultante dalla diluizione.

Usando la stessa tecnica utilizzata per la taratura dell'adsorbente immettere nella colonna cromatografica la soluzione di 2 mL in n-pentano del campione in analisi e far adsorbire; quindi effettuare due lavaggi del contenitore, ognuno con 2 mL di n-pentano e far adsorbire anche queste quantità.

Eluire poi con n-pentano (130 mL) e benzene (60 mL), oppure con i volumi più opportuni determinati nelle prove di controllo dell'adsorbente (utilizzare sempre contenitori separati per ciascun solvente al fine di non alterare la polarità). Il flusso dei solventi deve essere di circa 2-3 mL/minuto e può essere ottenuto applicando una lieve pressione nella colonna. Al termine della cromatografia concentrare le due frazioni in evaporatore rotante fino a pochi millilitri e portare quasi a secchezza con debole flusso di azoto, a temperatura ambiente. Portare infine a volume noto con n-esano ed esaminare i due eluati concentrati mediante gascromatografia.

d. Procedura semplificata di purificazione (trattamento con acido solforico e silice)

Trasferire l'estratto esanico concentrato (circa 1 mL) in provetta da reazione, lavando con altre piccole aliquote di esano. Aggiungere 1 mL di acido solforico concentrato, chiudere accuratamente la provetta ed agitare vigorosamente. Separare le due fasi (preferibilmente per centrifugazione) e prelevare la fase esanica concentrandola ad 1 mL. Una ulteriore purificazione si

può ottenere trasferendo l'estratto trattato con acido solforico su una colonna cromatografica riempita con 3 g di silice ed eluendo con 20 mL di una miscela esano/ benzene 95:5 (v/v). L'eluato, concentrato al volume desiderato, viene analizzato per gascromatografia. In alternativa, la procedura descritta può essere semplificata trasferendo l'estratto esanico del campione in testa ad una colonna cromatografica riempita con 10 g di silice/acido solforico 60:40 (p/p) ed eluendo con 30 mL di esano. L'eluato, concentrato al volume desiderato, viene analizzato per gascromatografia.

Tecniche di perclorazione

Perclorazione dei PCB a DCB (decaclorobifenile).

Controllo dell'efficacia della perclorazione: l'efficacia della perclorazione (resa % della conversione dei PCB a DCB) può essere controllata sia a partire da soluzioni di riferimento di diversi Aroclor o da loro miscele a concentrazione nota, sia a partire da una soluzione di riferimento di bifenile. La perclorazione del solo bifenile, essendo più rapida di quella dei PCB, è utile anche per controllare il grado di purezza del pentacloruro di antimonio impiegato (assenza del corrispondente pentabromuro).

Perclorazione dei PCB: immettere in ogni tubo per perclorazione volumi di 1-2 mL delle soluzioni di riferimento in n-esano di PCB calcolando i quantitativi teoricamente equivalenti di DCB. Aggiungere ad ogni tubo da perclorazione 2 granelli di carburo di silicio e 4-5 gocce di cloroformio concentrando poi su bagno ad acqua, con cautela, a circa 0,1 mL (attenzione alla fuoriuscita dei solventi per ebollizione). Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, aggiungere 2 mL di cloroformio e concentrare ancora a 0,1 mL; raffreddare e ripetere un'altra volta questo procedimento. Occorre porre attenzione a tali fasi di evaporazione che portano anche ad eliminare il bifenile eventualmente presente nel campione. Se il campione è perclorato, è possibile falsare completamente il dosaggio dei PCB.

Immettere nei tubi di perclorazione, (sotto cappa), circa 0,2 mL di pentacloruro di antimonio; chiudere ermeticamente con le apposite valvole e lasciare per 15-18 ore nel bagno a secco a 175-180°C. Terminata la perclorazione, lasciar raffreddare prima a temperatura ambiente e poi, per qualche minuto, in bagno a ghiaccio procedendo poi, sotto cappa, all'apertura della valvola del tubo. Trasferire quantitativamente il campione perclorato in un imbuto separatore da 60 mL riprendendo con 5 mL di HCl 6 M e poi con 15 mL di n-esano. Agitare e lasciare separare le fasi,

immettendo quella acida in un altro imbuto separatore e procedendo ad altre due estrazioni, ogni volta con 15 mL di n-esano. Sottoporre gli estratti riuniti di n-esano ai seguenti lavaggi: per due volte con 20 mL di acqua distillata, poi con 20 mL di NaHCO_3 al 10% ed infine per due volte con 20 mL di acqua distillata, scartando sempre le soluzioni di lavaggio. Filtrare la soluzione di n-esano su una colonna per disidratazione contenente circa 10 g di Na_2SO_4 anidro e, al termine, lavare l'imbuto separatore e la colonna con 60-70 mL di n-esano, riunendo le soluzioni.

Concentrare le soluzioni riunite ad 1 mL, mediante l'apposito evaporatore rotante e sotto vuoto leggero, per le successive determinazioni gascromatografiche del DCB.

Perclorazione del bifenile: la resa esatta della perclorazione può essere controllata a partire da quantità note di bifenile in cloroformio, immettendo nel tubo da perclorazione 0,1 mL della soluzione di riferimento diluita di bifenile. In questo caso non si deve procedere alle successive diluizioni ed evaporazioni della soluzione, procedendo senz'altro con l'aggiunta del pentacloruro di antimonio e quindi con la reazione ed i lavaggi come riportato sopra e con la valutazione gascromatografica del DCB.

Perclorazione del campione: la prima frazione di eluizione del gel di silice (che contiene i PCB), evaporata e ripresa con un 1 mL di n-esano, viene immessa nel tubo per perclorazione (perclorazione dei PCB). Procedere quindi ai lavaggi ed all'analisi gascromatografica.

Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare una colonna capillare con fase non polare ed un rivelatore di massa, o in assenza di questo, di un rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

Per la verifica della riproducibilità della risposta del rivelatore, ripetere almeno tre volte l'iniezione di una sostanza di riferimento (esempio: aldrina).

Determinazione gascromatografica con rivelatore di massa

L'uso della GC/MS per l'analisi quantitativa dei PCB presenta delle caratteristiche peculiari:

- possibilità di distinguere fra livelli di clorurazione differenti;
- maggiore uniformità dei fattori di risposta all'interno delle classi isomeriche in confronto con quanto avviene con il rivelatore ECD;

- maggiore sensibilità per i congeneri a basso livello di clorurazione (contrariamente all'ECD, la cui risposta è ovviamente funzione del numero e posizione degli atomi di cloro).

L'uso della GC/MS consente quindi una semplificazione nel riconoscimento dei singoli isomeri, generando di converso una notevole mole di dati (spettri di massa) che necessita di adeguati mezzi e metodi di trattamento.

Nella letteratura più recente è possibile reperire informazioni dettagliate sul comportamento cromatografico dei PCB su molte colonne capillari così come diversi schemi di acquisizione ed interpretazione dei dati. In linea teorica è possibile l'identificazione di tutti i congeneri con l'uso di adeguati programmi di temperatura e di tecniche di accoppiamento di due colonne a polarità differente. È inoltre oggi possibile reperire il riferimento di ogni congenere e quindi, sempre in linea teorica, operare una analisi quantitativa molto accurata. Il sistema analitico più adeguato alle esigenze della presente metodica prevede l'uso di una colonna capillare non polare (tipo SE-54) e di una soluzione il riferimento di congeneri (ad esempio quella riportata per i metodi EPA 525 o 625) contenente un singolo congenere per ogni classe isomerica, scelto in modo da rappresentare adeguatamente il valore medio del fattore di risposta per la classe isomerica rappresentata. In questo caso la scelta oculata nonché ovviamente la purezza delle soluzioni di riferimento usate è maggiormente critica rispetto all'utilizzazione di miscele di Aroclor commerciali.

La tecnica di acquisizione dei dati è generalmente SIM (Selected Ions Monitoring), in cui vengono misurati soltanto alcuni valori di m/z caratteristici delle sostanze di interesse.

La modalità di frammentazione dei congeneri dei PCB in condizioni di impatto elettronico (EI) è piuttosto semplice. Il "cluster" isotopico dello ione molecolare è comunque il più abbondante, seguito da quello relativo alla perdita di due atomi di cloro (ovviamente a partire dai diclorurati). Per i congeneri aventi due o più atomi di cloro adiacenti è rilevabile un "effetto orto" con perdita di HCl.

La ionizzazione chimica (CI) in ioni positivi porta alla formazione dello ione molecolare protonato con scarsissima o nulla frammentazione e può risultare utile in presenza di rilevanti quantità di sostanze interferenti. Quella in ioni negativi (NICI), oltre alla scarsa frammentazione, presenta livelli di sensibilità comparabili con l'ECD per i composti con elevata affinità elettronica. Il tipo di rivelatore di massa più adatto in termini di praticità di utilizzo, facile manutenzione, robustezza e ridotti costi di esercizio è quello a quadrupolo, sia classico che in configurazione "ion-trap", operando in condizioni di ionizzazione per impatto elettronico a 70 eV. L'acquisizione dei

dati in SIM dovrebbe essere ottimizzata sulla base delle informazioni ricavabili in letteratura sul comportamento cromatografico dei PCB. La colonna capillare più usata per questa analisi è del tipo metil-5% fenilsiliconico (SE-54 ed equivalenti) ed esistono in commercio miscele di congeneri specificatamente formulate per la definizione delle “finestre” di eluizione delle singole classi isomeriche.

Le possibilità di scelta per le masse da acquisire in SIM sono varie ed esistono in letteratura schemi più o meno complessi in funzione del livello di confidenza desiderato per l'identificazione dei composti e dell'uso più o meno spinto delle informazioni cromatografiche pregresse (es. tRR).

In generale, il requisito minimo è che vengano acquisiti per ogni classe isomerica almeno due valori di m/z dal “cluster” isotopico dello ione molecolare: uno per la quantificazione e l'altro per la conferma della identificazione. In questo caso esiste la possibilità di interferenza positiva da parte di congeneri a più alto livello di clorurazione (in particolare con 2 atomi di cloro in più). Tale interferenza può essere eliminata facendo ricorso ai dati cromatografici noti in letteratura o acquisendo contemporaneamente altri m/z diagnostici: nel primo caso il sistema di interpretazione dei dati sarà dipendente dal sistema cromatografico adottato (con il vantaggio di una relativa semplicità di applicazione), nel secondo caso si avrà un sistema relativamente svincolato dalla parte cromatografica, con la conseguenza di una maggiore complessità interpretativa e di una riduzione di sensibilità (maggior numero di m/z da acquisire contemporaneamente).

Determinazione gascromatografica con rivelatore ECD

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento che contengano un congenere per ogni classe isomerica, in modo da poter valutare, in prima approssimazione, la risposta del rivelatore in relazione agli atomi di cloro presenti in molecola. Le concentrazioni delle soluzioni di riferimento utilizzate dovrebbero essere tali che ad 1 μL di soluzione iniettato corrispondano quantità di clorobifenile comprese nell'intervallo 20-500 pg, assunto preliminarmente come intervallo di linearità del rivelatore. Non è necessario per i PCB determinare la curva di taratura per ogni singolo congenere. È sufficiente che la miscela di taratura contenga un congenere per ogni classe isomerica: la loro risposta può essere considerata rappresentativa dell'intera classe isomerica (anche se la risposta dell'ECD varia anche all'interno della stessa classe isomerica). Alternativamente la curva di taratura si può costruire utilizzando i picchi più rappresentativi di soluzioni di riferimento di PCB (Aroclor 1242, 1254 e 1260). Scelte le condizioni operative, controllata la stabilità strumentale e la

sensibilità del rivelatore si può passare all'analisi gascromatografica del campione estratto ed opportunamente concentrato, in modo che i picchi delle sostanze da analizzare entrino nell'intervallo di linearità.

Calcoli

Iniettare 1 µL di estratto purificato e concentrato del campione analizzato. Valutare qualitativamente la presenza di PCB ed identificare orientativamente la miscela (esempio Aroclor 1242, 1254 o 1260) eventualmente presente. Iniettare quindi 1 µL di esano per verificare che non compaiano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare 1 µL della soluzione standard della/delle miscele di PCB eventualmente identificate nel campione. La concentrazione della soluzione di riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza della concentrazione valutata nel campione. Iniettare quindi tre volte il campione e successivamente altre due volte la soluzione di riferimento. I policlorobifenili si presentano nei campioni reali in miscele di varia complessità e con una distribuzione dei congeneri non sempre eguale a quella delle soluzioni di riferimento, per cui è impossibile descrivere un metodo semplice per la loro determinazione quali-quantitativa. Si riportano qui di seguito i criteri di base di alcuni dei metodi che possono essere utilizzati.

Caso 1

Il caso in cui è evidente nel campione la presenza di una sola miscela (ad esempio Aroclor 1260) con le stesse percentuali dei diversi congeneri della soluzione di riferimento, è il più semplice che si possa incontrare. In questo caso, si può confrontare il cromatogramma del campione con quello della soluzione di riferimento corrispondente e misurare la somma delle aree dei picchi dei diversi congeneri nel campione e nella soluzione di riferimento, calcolando il risultato nel seguente modo:

$$C = \sum_i \left(\frac{A_{c_i}}{A_{s_i}} \right) \frac{Q_s \cdot V_f}{V_i \cdot V_c}$$

dove:

C = concentrazione (µg/L) di PCB;

Asi = area del generico picco (i) nel riferimento;

Aci = area del corrispondente picco (i) nel campione;

Qs = quantità (ng) di soluzione di riferimento iniettata;

Vf = volume finale (µL) dell'estratto;

V_i = volume (μL) di campione iniettato;

V_c = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi.

Per il calcolo della concentrazione ("PCB totali") si può procedere anche nel seguente modo. Iniettare una quantità nota di una soluzione di riferimento di una miscela ("Aroclor x"), che si ritiene abbia il tracciato cromatografico più simile a quello del campione. Calcolare i tempi di ritenzione relativi (tRR) rispetto al p,p'-DDE nella soluzione di riferimento. Misurare l'area di ciascun picco e calcolare il fattore di risposta (R) per ogni singolo picco (singolo congenere o somma di congeneri non separabili cromatograficamente) nel seguente modo:

$$R_i = \frac{Q_s \cdot \frac{M_i}{100}}{A_i}$$

dove:

R_i = fattore di risposta (ng/area) del/dei congeneri, relativi al picco (i);

Q_s = quantità (ng) di miscela di riferimento iniettata;

M_i = media ponderale (%) del/dei congeneri, relativi al picco (i) nella soluzione di riferimento;

A_i = area del picco (i).

Calcolare i tRR e l'area di ciascun picco nel campione. Confrontare il cromatogramma del campione con quelli della soluzione di riferimento e calcolare la quantità relativa ad ogni picco preso in considerazione:

$$Q_i = R_i \cdot A_{ic}$$

dove:

Q_i = quantità (ng) relativa al picco (i) considerato;

R_i = fattore di risposta del congenere, relativi al picco (i);

A_{ic} = area del picco nel campione.

Addizionare le quantità (ng) relative a tutti i picchi considerati e calcolare la concentrazione nel campione:

$$C = \sum \frac{Q_i \cdot V_f}{V_c \cdot V_i}$$

dove:

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

$\Sigma Q(i)$ = somma delle quantità relative ad ogni singolo picco considerato;

V_e = volume (μL) di estratto;

V_c = volume (mL) di campione estratto;

V_i = volume (μ L) di estratto iniettato.

Caso 2

Nelle situazioni più complesse quali:

- la presenza nel campione di più miscele (esempio Aroclor 1242+1254+1260) con i singoli congeneri alle stesse percentuali con cui sono presenti nelle soluzioni di riferimento;
- la presenza nel campione di più miscele (esempio Aroclor 1242+1254+1260) con i singoli congeneri a percentuali diverse da quelle con cui sono presenti nelle soluzioni di riferimento;
- la combinazione dei due casi precedenti;

l'accuratezza del metodo di calcolo decresce quanto più è alto il grado di alterazione rispetto alla distribuzione dei congeneri nelle soluzioni di riferimento. Se il campione presenta la stessa distribuzione dei congeneri della/delle soluzioni di riferimento, il calcolo effettuato come nel Caso 1 è infatti relativamente accurato. In caso contrario, la variabilità del dato finale è elevata, soprattutto nel caso in cui si debba utilizzare, in assenza di spettrometri di massa, il rivelatore a cattura di elettroni (ECD), che presenta fattori di risposta estremamente variabili e relativi al numero e posizione di sostituzione degli atomi di cloro nella molecola. L'utilizzazione di un rivelatore di massa, aumentando la possibilità di identificare correttamente i singoli congeneri, aumenta di conseguenza l'attendibilità del dato quantitativo finale.

Occorre comunque tenere presente che se il dato viene espresso come concentrazione nel campione di un "Aroclor x", questo significa che l'analista ritiene che il tracciato cromatografico del campione è significativamente più simile a quello dell'"Aroclor x" che a quelli degli altri Aroclor e quindi l'analisi è stata effettuata prendendo come riferimento una soluzione di riferimento di "Aroclor x".

In alternativa, se è possibile operare con una colonna capillare con adeguato programma di temperatura e se sono disponibili le soluzioni di riferimento dei singoli congeneri più abbondanti si può procedere alla identificazione e quantificazione dei congeneri stessi nel campione analizzato ed esprimere il risultato sommandone le quantità.

Metodo basato sulla perclorazione

Il limite più evidente della tecnica di perclorazione è l'impossibilità di avere informazioni

sulle concentrazioni dei singoli congeneri e sulla miscela responsabile della contaminazione. D'altra parte, vi è il vantaggio che la determinazione non è influenzata da alcuna delle interferenze che si possono incontrare in un campione di acqua, ad eccezione della eventuale presenza del bifenile nel campione.

Si ricorda ancora che il dato quantitativo viene espresso come DCB (decaclorobifenile) originato dalla perclorazione di tutti i clorobifenili presenti nel campione ed è quindi necessario, per una sua corretta valutazione, specificare che è stata adottata la tecnica della perclorazione per l'analisi.

Pesticidi organoclorurati

Apparecchiature

- d) Gascromatografo che consenta l'impiego di colonne capillari.
- e) Rivelatori: Rivelatore a cattura di elettroni (ECD). Se disponibile, può essere vantaggiosamente adottato il rivelatore di massa (MS) operante in SIM, soprattutto per l'analisi quantitativa di composti non separabili cromatograficamente.
- f) Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici.
- g) Colonne gascromatografiche.
- h) Evaporatore rotante, con possibilità di operare con il vuoto, bagno termostatico e adatto sistema per il recupero dei solventi.
- i) Vetreria.
- j) Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza 10 cm; 3,5 cm d.i.) senza setto poroso, con gambo sfinato (10 mm d.i.). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA.
- k) Microcolonna in vetro (lunghezza 30 cm; 4,2 mm d.i.), con estremità superiore munita di smeriglio per il collegamento con un serbatoio per l'eluente, per la cromatografia su gel di silice disattivato.
- l) Fiale o provette da concentrazione in vetro da 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL preferibilmente con gambo sfinato.

- m) Imbuti separatori da 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.
- n) Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante aventi capacità 50 mL, 100 mL e 250 mL.
- o) Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.
- p) Pipette tarate (volumi da 0,5 mL a 10 mL).
- q) Altra vetreria normalmente in dotazione in qualsiasi laboratorio chimico (beute con tappo smeriglio, cilindri graduati, imbuti, pipette Pasteur).
- r) Microsiringhe per gascromatografia (tipo Hamilton o equivalenti) aventi capacità di 5 μ L e 10 μ L.
- s) Microsiringhe per dosaggio di liquidi (tipo Hamilton o equivalenti per HPLC) da 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 250 μ L e 500 μ L.
- t) Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.

Procedura analitica

Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo equilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità.

Estrazione

Trasferire 500 mL (od un volume minore) di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 60 mL (ridurre a 20-30 mL se la quantità di campione prelevata è di 100 mL) di miscela di diclorometano/n-esano 15:85 (v/v) ed estrarre per 3 minuti con forte agitazione. Attendere la separazione tra le due fasi. Nel caso di formazione di emulsione, aggiungere una soluzione satura di cloruro di sodio (50-100 mL), agitare ed attendere; se la quantità di emulsione rimane comunque elevata (volume di emulsione pari ad un terzo della fase organica) centrifugare o filtrare su lana di vetro. Scaricare la fase acquosa (fase inferiore) in un secondo imbuto separatore e raccogliere la fase organica (fase superiore) per percolazione su sodio solfato anidro (circa 30 g) in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL di miscela diclorometano/n-esano 15:85 (v/v). Riunire le fasi organiche disidratate su sodio solfato anidro; lavare il sodio solfato con circa 20 mL di n-esano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche.

Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico alla temperatura di 45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente l'estratto in una provetta da concentrazione aiutandosi con circa 5 mL di esano per i lavaggi, aggiungere 1 mL di iso-ottano e concentrare sotto flusso di azoto a circa 2 mL per assicurare la completa eliminazione del diclorometano.

Purificazione

Di seguito sono descritte le tecniche di purificazione più idonee per l'eliminazione delle più probabili interferenze. L'analista dovrà decidere se sottoporre l'estratto ad una o più di una delle seguenti procedure. Si consiglia comunque di sottoporre sempre l'estratto alla ripartizione con acetonitrile.

a. Ripartizione con acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi ed oli dall'estratto. Trasferire quantitativamente l'estratto in un imbuto separatore da 125 mL con un volume di n-esano sufficiente ad avere un volume finale nell'imbuto di 15 mL. Estrarre il campione per quattro volte con 30 mL di acetonitrile saturo di esano, agitando ogni volta vigorosamente per 1 minuto. Riunire le soluzioni di acetonitrile in un imbuto separatore da 1000 mL già contenente 700 mL di soluzione al 2% di NaCl. Miscelare ed estrarre con due aliquote successive di 100 mL di n-esano, agitando ogni volta. Riunire gli estratti esanici in un imbuto separatore da 1000 mL e lavare con due porzioni successive di 100 mL di acqua distillata. Scartare le acque di lavaggio e disidratare l'esano su solfato di sodio anidro. Lavare l'imbuto separatore e il sodio solfato con tre porzioni di 10 mL di n-esano, riunendole all'estratto esanico. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Ridurre sotto flusso di azoto fino a 1 mL, se è necessario procedere alla purificazione successiva.

b. Rimozione dello zolfo elementare

È consigliabile adottare questa purificazione anche se si sospetta una interferenza molto lieve. Riempire una colonnina cromatografica (d.i. 7 mm) con 7 g di agente desolforante. Trasferire quantitativamente l'estratto concentrato nella colonnina ed eluire con 25 mL di esano. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Ridurre sotto flusso di azoto fino a 1 mL, se è necessario procedere alla purificazione successiva.

c. Cromatografia su gel di silice disattivato

La cromatografia su gel di silice viene effettuata per completare il procedimento di purificazione dell'estratto e per ottenere un frazionamento, anche se parziale, dei composti organoclorurati in due frazioni al fine di facilitare l'identificazione cromatografica.

Taratura dell'adsorbente

Prima di eseguire la cromatografia del campione, è indispensabile procedere alla taratura dell'adsorbente perché le caratteristiche possono variare ampiamente in relazione al tipo e al lotto di gel di silice. La taratura consiste nella definizione dei volumi di eluizione, utilizzando opportune soluzioni di riferimento dei pesticidi in esame, in modo da ottenere lo smistamento desiderato. I parametri indicati più avanti potranno dunque, dopo la fase di taratura dell'adsorbente, subire delle modifiche.

Preparazione della colonna

Chiudere la parte inferiore della microcolonna con un batuffolo di cotone sgrassato e versare nella colonna 2 g di gel di silice disattivato, in modo che la riempia fino ad una altezza di circa 20 cm (l'altezza è importante per la riproducibilità della separazione). Aggiungere un altro batuffolo di cotone sgrassato e uno strato di circa 1 cm di altezza di solfato di sodio anidro. Per il controllo dell'efficacia della colonna, senza prelavare il gel di silice aggiungere 1 mL di una soluzione di riferimento cumulativa, contenente i seguenti composti: aldrina, p,p'-DDT, p,p'-DDD e lindano.

Ciascun principio attivo dovrebbe essere ad una concentrazione di circa 0,1 ng/μL. Dopo adsorbimento, aggiungere 1 mL di esano (questa quantità serve per simulare il lavaggio del contenitore del campione). Dopo adsorbimento del solvente connettere il serbatoio alla colonna e quindi eluire, nell'ordine, con le seguenti miscele, cambiando il recipiente di raccolta quando il livello di un eluente raggiunge lo strato superiore del gel di silice:

- n-esano: 26 mL. Questa frazione deve contenere aldrina, p,p'-DDT e circa il 50% del p,p'-DDD;
- benzene/esano (60:40): 15 mL. Questa frazione deve contenere il residuo p,p'-DDD ed il lindano.

Il flusso degli eluenti deve essere di circa 1-2 mL/min e può essere ottenuto applicando una lieve pressione in testa alla colonna. Le due frazioni vengono concentrate con l'evaporatore rotante e sotto leggero vuoto, portate a volume noto con n-esano (<10 mL) ed analizzate in gascromatografia. Per l'eluizione del metossicloro e del captano occorre eluire con successivi 10 mL di benzene (frazione C). È indispensabile che la taratura dell'adsorbente sia effettuata nel laboratorio dove normalmente vengono effettuate le analisi; la riproducibilità della separazione dipende infatti oltre che dall'attività dell'adsorbente e dalla purezza dei solventi, anche dalla

temperatura e dall'umidità.

Cromatografia del campione

Prima di procedere alla cromatografia, nel caso di campioni molto contaminati, l'estratto va opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota dello stesso.

Usando la stessa tecnica utilizzata per la standardizzazione dell'adsorbente e nelle condizioni di disattivazione prima identificate, introdurre la soluzione del campione concentrato ad 1 mL nella microcolonna e far adsorbire. Quindi con 1 mL di esano lavare il contenitore del campione e introdurlo nella microcolonna. Eluire con i volumi più opportuni di n-esano e n-esano/benzene determinati nelle prove di taratura dell'adsorbente. Raccogliere separatamente le due frazioni e procedere secondo le modalità descritte per la standardizzazione dell'adsorbente. Eseguire l'analisi gascromatografica delle due frazioni per la determinazione dei pesticidi.

d. Cromatografia su gel di silice attivato

La prima frazione esanica proveniente dalla cromatografia su gel di silice disattivato può essere sottoposta a cromatografia su gel di silice attivato quando l'analisi gascromatografica mette in evidenza la presenza dei PCB oltre ai pesticidi clorurati. Questa tecnica, sviluppata da Snyder e Reinert e modificata da Leoni, permette la separazione dei PCB dal DDT e DDE.

Taratura dell'adsorbente

Nella colonna cromatografica, chiusa nella parte inferiore sfinata con un batuffolo di lana di quarzo, immettere 4 g di gel di silice attivato ricoprendoli quindi con n-pentano; chiudere con tappo a smeriglio e rovesciare più volte la colonna facendo infine depositare uniformemente l'adsorbente. Far percolare il solvente fino a circa 1 cm dal livello superiore dell'adsorbente e mettere nella colonna 1 mL di una soluzione in pentano di PCB e p,p'-DDE entrambi alla concentrazione di 5 µg/mL. Eluire la colonna nell'ordine con 140 mL di n-pentano e successivamente con 60 mL di benzene. Concentrare i due eluati a un volume opportuno: all'analisi cromatografica i PCB e il p,p'-DDE si devono rinvenire rispettivamente negli eluati A e B. Si richiama l'attenzione sul fatto che una buona preparazione della colonna è essenziale per la riproducibilità della separazione, in particolare deve essere evitata la formazione di bolle d'aria. L'efficienza della separazione è normalmente superiore al 90-95%. Se non si ottengono tali livelli di efficienza variare i volumi degli eluenti.

Analisi del campione

Evaporare la soluzione in n-esano del campione, che contiene i pesticidi cloro-organici e i policlorodifenili (cioè proveniente dal primo gruppo di eluizione del gel di silice disattivato) fino a secchezza. Riprendere il residuo con un piccolo volume di n-pentano (2-3 mL) e quindi eseguire una cromatografia su gel di silice attivato nelle condizioni descritte in precedenza al punto A).

Nella prima frazione si possono rinvenire i pesticidi HCB, aldrina, eptacloro ed i PCB, mentre nella seconda frazione sono presenti i due isomeri del DDT e del DDE. I due eluati possono quindi essere analizzati con le tecniche gascromatografiche di seguito illustrate.

Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare una colonna capillare con fase non polare ed un rivelatore a cattura di elettroni.

a. Caratteristiche cromatografiche delle colonne consigliate e relativi cromatogrammi

Considerando l'elevato numero di composti organoclorurati presi in considerazione dal presente metodo e la variabilità delle prestazioni del rivelatore a cattura di elettroni si ritiene superfluo indicare i limiti di quantificazione per i singoli composti. D'altra parte, come già accennato, essi sono comunque abbondantemente sufficienti per il controllo delle acque di scarico in funzione dei limiti di legge esistenti. Per la verifica della riproducibilità della risposta del rivelatore, ripetere almeno tre volte l'iniezione di una sostanza di riferimento (esempio: aldrina).

b. Procedura per la taratura del rivelatore a cattura di elettroni

È necessario stabilire l'intervallo di linearità del rivelatore ed ottenere una curva di taratura per la verifica periodica della stabilità delle prestazioni del rivelatore e della stabilità delle soluzioni di lavoro. Per ogni composto da analizzare preparare soluzioni di lavoro ad almeno tre diverse concentrazioni. Le concentrazioni debbono essere tali che ad 1 μL di soluzione iniettato corrispondano quantità di pesticida comprese nell'intervallo 20-500 pg (questo è l'intervallo che può essere assunto preliminarmente come intervallo di linearità del rivelatore). Costruire una curva di taratura, riportando in diagramma il fattore di taratura (rapporto tra area del picco e massa iniettata) in funzione delle quantità iniettate. Stabilire l'intervallo di linearità di risposta del rivelatore (intervallo di massa di composto iniettato nel quale la curva ha un andamento parallelo all'asse delle ascisse). Per la verifica della stabilità delle condizioni gascromatografiche confermare quotidianamente l'andamento della curva di taratura con almeno una soluzione di riferimento

diluita. Se la risposta varia da quella attesa più del 10%, il “test” deve essere ripetuto, utilizzando eventualmente soluzioni di riferimento diluite appena preparate. Altrimenti costruire una nuova curva di taratura. Scelte le condizioni operative, controllata la stabilità strumentale e la sensibilità del rivelatore a cattura di elettroni, passare all’analisi gascromatografica del campione estratto opportunamente concentrato, in modo che i picchi delle sostanze da analizzare entrino nell’intervallo di linearità. L’analisi qualitativa si basa sul confronto dei tempi di ritenzione, relativi ad una sostanza di riferimento, dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento, iniettati nelle stesse condizioni. La sostanza generalmente presa come riferimento è l’Aldrina. Soluzioni di riferimento e campione devono essere preparate nello stesso solvente. Se la complessità del cromatogramma del campione (elevato rumore di fondo e/o presenza di numerosi picchi e/o bande) non permette alcuna identificazione, adottare le opportune tecniche di eliminazione delle possibili sostanze interferenti. Per l’analisi quantitativa procedere nel modo seguente. Iniettare 1 μL di esano per verificare che non vi siano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare le soluzioni di riferimento relative ai composti identificati nel campione. La concentrazione del riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza di quella del composto nel campione. Iniettare, quindi, il campione e confrontare l’area relativa al singolo composto nel cromatogramma del campione con quella relativa allo stesso composto nel cromatogramma delle soluzioni di riferimento.

Analisi di conferma

a. Qualora siano stati identificati nel campione uno o più pesticidi clorurati dell’elenco di Tab. 1 (IRSA), è opportuno procedere ad un’analisi di conferma utilizzando una colonna con polarità diversa da quella utilizzata per l’analisi. Poichè nel metodo è stato suggerito l’uso di una colonna capillare con fase non polare (tipo SE-54), si può ripetere l’analisi per la conferma della identità dei picchi. Poichè sulla colonna di conferma l’ordine di eluizione è differente, si debbono controllare i tempi di ritenzione relativi ai picchi dei pesticidi clorurati identificati con la prima colonna e se, iniettando standard e campione sulla colonna di conferma, i picchi vengono confermati, si ritiene l’identificazione soddisfacente.

b. Analisi gascromatografica con rivelatore di massa (GC/MS)

Il rivelatore di massa (GC/MS), costituisce un utilissimo mezzo di identificazione perchè la sua risposta è in relazione al peso molecolare ed alla struttura del composto.

Calcoli

Il calcolo della concentrazione di un generico pesticida organoclorurato, nel campione di acqua in esame si effettua applicando la seguente formula:

$$C = \frac{S \cdot A_c \cdot V_f}{A_s \cdot V_i \cdot V_c}$$

dove:

Ci = concentrazione (µg/L) del pesticida identificato nel campione;

S = quantità (ng) di riferimento iniettato;

Ac = area del picco relativo al pesticida nel campione;

Vf = volume finale (µL) dell'estratto;

As = area del picco relativo al pesticida nel riferimento;

Vi = volume (µL) di estratto iniettato;

Vc = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi (mL).

Azoto e Fosforo totali

Apparecchiature

Le attrezzature di laboratorio utilizzate per l'analisi dell'azoto e del fosforo totale sono riportate nelle schede relative all'analisi dei Nitrati e degli Ortofosfati del Manuale “Metodologie analitiche di riferimento” APAT-ICRAM 2001-2003.

E' inoltre necessario l'utilizzo di un' autoclave o normale pentola a pressione (in quest'ultimo caso può essere più pratico usare, come contenitori per i campioni, provettoni da circa 50 cm³ con tappi a vite e guarnizioni in teflon e utilizzare un volume ridotto di campione)

Procedura analitica

Preparazione delle soluzioni stock

a. Azoto totale

Per quanto riguarda la determinazione dell'azoto totale, occorre preparare le soluzioni stock indicate nella scheda Nitrati riportata nel Manuale “Metodologie analitiche di riferimento” APAT-ICRAM 2001-2003 e una soluzione di azoto organico.

Soluzione di azoto organico (10 mmol/L)

Disciogliere 186,2 mg di disodio-EDTA in 90 cm³ di acqua grado reagente. Portare a volume

in un matraccio tarato da 100 cm³ (classe A). Conservare in frigorifero, in bottiglia di vetro scura.

La soluzione è stabile per qualche mese.

b. Fosforo totale

Per la determinazione del fosforo totale occorre preparare le soluzioni di seguito elencate.

Acido solforico 4,5 mol/L

Aggiungere con cautela 250 cm³ di acido solforico concentrato a 750 cm³ di acqua grado reagente. Far raffreddare e portare a 1 L. Conservata in una bottiglia da reagente, la soluzione è stabile indefinitamente.

Reagente misto

Sciogliere 12,5 g di ammonio eptamolibdato tetraidrato cristallino in 125 cm³ di acqua grado reagente. Sciogliere separatamente 0,5 g di potassio antimonio tartrato in 20 cm³ di acqua grado reagente. Aggiungere, sotto agitazione, la soluzione di molibdato a 350 cm³ di acido solforico 4,5 mol/L. Aggiungere successivamente la soluzione di potassio antimonio tartrato e mescolare il tutto. Conservata in bottiglia di vetro scuro, la soluzione è stabile per parecchi mesi.

Reagenti da preparare al momento dell'uso

a. Soluzione acidificata di acido ascorbico

Sciogliere 10 g di acido ascorbico in 50 cm³ di acqua reagente ed aggiungere 50 cm³ di acido solforico 4,5 mol. Conservare in una bottiglia di vetro scuro, in frigorifero. La soluzione è utilizzabile finché rimane incolore (circa una settimana), ma è preferibile prepararla al momento dell'uso.

Preparazione delle soluzioni standard

Le soluzioni standard da preparare sono quelle indicate nella scheda dei Nitrati e degli Ortofosfati riportata nel Manuale "Metodologie analitiche di riferimento" APAT-ICRAM 2001-2003

Preparazione della soluzione per la verifica dell'efficienza del reagente ossidante

Preparare una soluzione 10 µmol/L in azoto, diluendo con acqua grado reagente, in un matraccio da 100 cm³ (classe A), 100 mm³ (misurati con una pipetta di precisione) di soluzione stock di azoto organico. Dividere la soluzione in due subcampioni da 50 cm³, travasandola nei contenitori di reazione. Aggiungere 5 cm³ di reattivo ossidante. L'analisi deve portare alla

determinazione di tutta la quantità di azoto presente nella soluzione (10 $\mu\text{mol/L}$). Nel caso ciò non si verificasse, occorre preparare di nuovo la soluzione ossidante.

Preparazione dei bianchi dei reagenti

- Trasferire 50 cm^3 di acqua grado reagente in 3 contenitori di reazione ed inoculare 5 cm^3 di reagente ossidante in ciascuno di essi.
- Autoclavare seguendo la procedura indicata per il trattamento analitico dei campioni.

Per preparare i bianchi dei reagenti relativi all'analisi dell'azoto totale (bIN):

- prelevare (con una pipetta automatica) 5 cm^3 da ciascuno dei 3 contenitori, versarli in beaker da 100 cm^3 ;
- aggiungere a ciascuno 45 cm^3 di acqua grado reagente;
- trattare i bianchi dei reagenti dell'azoto con la stessa procedura applicata ai campioni ed illustrata in dettaglio nella scheda Nitrati del Manuale "Metodologie analitiche di riferimento" APAT-ICRAM 2001-2003.

Per preparare i bianchi dei reagenti relativi all'analisi del fosforo totale (bIP):

- aggiungere, a ciascuno dei 50 cm^3 rimasti nei 3 contenitori, i reagenti (soluzione acidificata di acido ascorbico e reagente misto) così come indicato per il trattamento analitico dei campioni;
- procedere al dosaggio spettrofotometrico come indicato nella scheda Ortofosfati del Manuale "Metodologie analitiche di riferimento" APAT-ICRAM 2001-2003.

Trattamento analitico

- Mettere in autoclave o in pentola a pressione, per almeno 30 minuti a 120°C, i contenitori con i campioni e le soluzioni da analizzare.
- Portare i contenitori a temperatura ambiente e controllare che il volume dei campioni sia rimasto invariato. Eventualmente riportare il volume a 55 cm^3 con acqua grado reagente, ma registrare il cambiamento di volume che può aver comportato un parallelo inquinamento del campione.
- Alla fine dello stadio di ossidazione tutto l'azoto del campione dovrebbe essere stato convertito a nitrato e tutto il fosforo a fosfato.
- Procedere secondo quanto indicato per la determinazione del nitrato e fosfato, tenendo conto delle integrazioni e modifiche che seguono.

Per l'analisi dell'azoto:

- prelevare (con una pipetta automatica) 5 cm^3 di ogni campione e dei due campioni di controllo con

EDTA. Versarli in beaker da 100 cm³ ed aggiungere 45 cm³ di acqua grado reagente;

- procedere alla determinazione della concentrazione di nitrati.

Per l'analisi del fosforo adoperare i restanti 50 cm³ di campione:

- aggiungere con un dispenser 1 cm³ di soluzione acidificata di acido ascorbico;
- agitare e, dopo circa 30 secondi, aggiungere 1 cm³ di reagente misto (misurato con un dispenser) agitando nuovamente;
- procedere al dosaggio spettrofotometrico.

Calcoli

- Determinare il bianco delle celle (blc,N e blc,P) come riportato nelle schede dei Nitrati e degli Ortofosfati del Manuale "Metodologie analitiche di riferimento" APAT-ICRAM 2001-2003.
- Calcolare il bianco dei reagenti, sia per il fosfato (blP) che per il nitrato (blN) come media dei valori di assorbanza delle tre soluzioni con acqua grado reagente.
- Determinare il fattore colorimetrico per i due componenti secondo la procedura indicata nelle metodiche per fosfati (fP) e nitrati (fN).
- Calcolare le concentrazioni secondo le formule:

$$[\text{NO}_3^-, \text{tot}] = (\text{ABSN} - \text{blc}, i, \text{N} - \text{blN}) \text{ fN}$$

$$[\text{PO}_4^{3-}, \text{tot}] = (\text{ABSP} - \text{blc}, i, \text{P} - \text{blP}) \text{ fP}$$

dove:

ABSN = assorbanza dei campione a 553 nm

ABSP = assorbanza del campione a 882 nm

blc,i,N = bianco della cella i-esima a 553 nm

blc,i,P = bianco della cella i-esima a 882 nm

blN = bianco dei reagenti dell'azoto

blP = bianco dei reagenti del fosforo

fN = fattore colorimetrico per i nitrati

fP = fattore colorimetrico per i fosfati

I risultati saranno espressi in µmol/L.

Per il fosforo totale il limite di determinazione è pari a 0,03 µmol/L, ovvero a 0,92 µg/L.

Per l'azoto totale il limite di determinazione è pari a 0,05 µmol/L, ovvero a 0,7 µg/L.

Metalli pesanti

L'analisi dei metalli pesanti verrà effettuata utilizzando una delle metodiche standard di seguito riportate.

Determinazione dei metalli pesanti mediante la tecnica della spettrofotometria ad assorbimento atomico

Il principio di funzionamento è concettualmente semplice ed è basato sull'esame dell'assorbimento di una radiazione elettromagnetica dopo che questa passa in un mezzo in cui il campione sia presente come atomi o ioni monoatomici.

E' applicabile solo ad elementi metallici e ciascun elemento richiede una diversa sorgente di radiazione (solitamente lampada a catodo cavo).

Per rendere un campione analizzabile in spettrofotometria di assorbimento atomico è necessario ridurre il campione solido in soluzione. Esistono diversi metodi per ottenere tale risultato a titolo di esempio viene schematicamente riassunta una metodologia spesso utilizzata dall'ENEA con riferimento a quanto proposto da Agemian e Chau (1975) e ampiamente collaudata e impiegata in Italia e in diversi paesi da decenni:

1 g di sedimento di granulometria minore 63 micron, ottenuto settacciando ad umido il sedimento da analizzare, dopo essiccamento a 50°C e omogeneizzazione (macinazione), viene disciolto in miscela di HF, HNO₃, HClO₄ concentrati (Agemian Chau, 1975) in contenitori di teflon e scaldato (forno a microonde o piastra termica).

La soluzione ottenuta una volta atomizzata viene colpita da una sorgente luminosa di opportuna lunghezza d'onda, solitamente utilizzando una lampada il cui catodo è formato con lo stesso elemento da analizzare, l'assorbimento dello spettro è proporzionale alla quantità di elemento presente nella soluzione atomizzata.

A seconda dei limiti di rivelabilità che si vogliono ottenere l'atomizzazione può essere eseguita in fiamma o in fornello di grafite, quest'ultimo permette di lavorare con poco materiale e permette una rivelabilità superiore anche di 3 ordini di grandezza rispetto all'atomizzazione in fiamma.

Il fornello di grafite è particolarmente indicato per metalli presenti in basse concentrazioni quali ad es. il Cd, viceversa elementi relativamente più abbondanti, come ad es. lo Zn, possono essere agevolmente determinati in fiamma con sufficiente precisione.

Per il Hg è spesso utilizzato il sistema dei vapori freddi. Il campione viene fatto reagire con un potente riducente (SnCl_2 o NaBH_4). Gli atomi di mercurio vengono allontanati dalla soluzione facendovi gorgogliare dell'aria, che viene successivamente essiccata e indirizzata sulla cella a tubo orizzontale di uno spettrofotometro attraversata dalla radiazione. Con questo metodo è possibile rilevare tracce di mercurio fino a 9 ng/l.

Determinazione dei metalli pesanti mediante la tecnica della spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)

La tecnica della spettrometria di massa a plasma (ICP-MS) accoppiato induttivamente presenta limiti di rivelabilità dell'ordine dei ppt (ng/l) per molti elementi della tavola periodica. Questa tecnica interfaccia una sorgente a plasma induttivamente accoppiato con uno spettrometro di massa a quadrupolo per quanto riguarda l'ICP-MS o con un rivelatore ottico (fotomoltiplicatore) nel caso dell'ICP-OES (ottico). Il principio di funzionamento prevede che un flusso di argon trasporta il campione vaporizzato in una torcia ICP, dove raggiunge la temperatura di 6000-8000°C e hanno luogo la ionizzazione e l'atomizzazione. Il plasma risultante viene aspirato e trasportato al rivelatore. Nel caso di un ICP-MS (Mass Spectrometer) è lo spettrometro di massa a rilevare i vari elementi in funzione della massa. In un ICP-OES (Optical Emission Spectroscopy) viene analizzata la composizione spettrale della luce emessa dalla sorgente tramite un monocromatore (reticolo di diffrazione) che scinde la luce entrante in spettri che vengono intercettati da un fotomoltiplicatore. L'ICP-AES (Atomic Emission Spectrometry) non è altro che un modo diverso per chiamare un ICP ottico. Il vantaggio principale della tecnica ICP è relativo alla sua efficacia rispetto agli effetti matrice.

Cianuri

Apparecchiature

- ÷ Materiale di uso comune di laboratorio
- ÷ Apparecchio di distillazione.
- ÷ Spettrofotometro idoneo per misure di assorbanza a 620 nm.

Procedura analitica

Reattivi

Utilizzare reattivi del tipo puro per analisi ed acqua distillata o deionizzata.

- Soluzione di idrossido di sodio 1 M: sciogliere 40 g di idrossido di sodio (NaOH) in 1000 mL di acqua.
- Acido solforico.
- Soluzione di cloruro di magnesio (510 g/L): sciogliere 51 g di cloruro di magnesio esaidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in acqua e diluire a 100 mL.
- Soluzione di acido acetico 1+4: aggiungere un volume di acido acetico concentrato a 4 volumi di acqua distillata.
- Soluzione di idrossido di sodio 0,2 M: aggiungere a 1 volume di idrossido di sodio 1 M, 4 volumi di acqua.
- Soluzione di cloramina T (10 g/L): sciogliere 10 g di cloramina T in 1000 mL di acqua. La soluzione è stabile per una settimana e va conservata in frigorifero.
- Soluzione di 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-one (5 g/L): preparare una soluzione satura (5 g/L) aggiungendo 0,25 g di pirazolone a 50 mL di acqua calda (circa 75°C); raffreddare agitando di tanto in tanto.
- Piridina
- Bis-pirazolone (3,3'-dimetil-1,1'-difetil-[4,4'-bi-2-pirazolina]-5,5'-dione).
- Reattivo misto piridina-pirazolone: miscelare 125 mL di soluzione filtrata di 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-one con la soluzione filtrata ottenuta sciogliendo 0,025 g di bis-pirazolone in 25 mL di piridina. Preparare questo reattivo giornalmente.
- Soluzione concentrata di cianuro (1 mL=1 mg): sciogliere 2,51 g di cianuro di potassio e 2,0 g di idrossido di potassio in 1000 mL di acqua. Controllare il titolo ogni settimana con una soluzione di nitrato di argento a titolo noto (metodo di Liebig modificato).
- Soluzione diluita I di cianuro (1 mL=10 µg): diluire 10 mL della soluzione a 1000 mL. La soluzione va preparata giornalmente.
- Soluzione diluita II di cianuro (1 mL=1 µg): diluire 10 mL della soluzione a 100 mL; la soluzione va preparata giornalmente.
- Acido ascorbico
- Carbonato di piombo

- Solvente per l'estrazione dei grassi (iso-ottano o n-esano o cloroformio)
- 1-butanol
- Soluzione di indicatore al p-dimetilamminobenzilidenerodanina (0,2 g/L): sciogliere 0,02 g di p-dimetilaminobenzilidenerodanina in 100 mL di acetone.
- Soluzione di nitrato di argento: sciogliere 3,2467 g di nitrato d'argento (AgNO_3) seccato a 140°C , in 1000 mL di acqua. Il titolo di questa soluzione viene determinato con una soluzione a titolo noto di cloruro di sodio (NaCl) usando come indicatore K_2CrO_4 . Sulla base del titolo così determinato, diluire opportunamente 500 mL di soluzione per far sì che 1 mL equivalga a 1 mg di CN.
- Soluzione di idrogeno fosfato disodico: sciogliere 5 g di Na_2HPO_4 anidro in 100 mL di acqua.
- Soluzione di indicatore al blu di bromotimolo 0,4%
- Soluzione di indicatore al blu di bromotimolo 0,04%: diluire 10 mL della soluzione a 100 mL.

Procedimento

Solubilizzazione dei cianuri insolubili: nel caso di presenza di cianuri insolubili allo stato di piccole particelle solide sospese nel liquido portare il campione all'ebollizione per alcuni minuti (normalmente 10 minuti risultano sufficienti) curando che il pH si mantenga sul valore di 11. Raffreddare e filtrare.

Distillazione: introdurre il liquido, già sottoposto ai pretrattamenti ritenuti necessari, nel pallone da distillazione, tenendo presente che, per concentrazioni di CN- non superiori a 10 mg/L, occorre distillare un campione di 500 mL mentre per concentrazioni superiori a 10 mg/L, occorre una quantità proporzionalmente inferiore, che si diluirà in ogni caso a 500 mL con acqua. Predisporre l'apparecchio di distillazione sotto cappa, ponendo in ciascun assorbitore 50 mL di NaOH 1 M, che possono essere diluiti con acqua al fine di assicurare un battente liquido sufficiente. Collegare l'apparecchio ad una pompa da vuoto ad acqua e regolare, tramite l'apposita pinza, il flusso dell'aria in modo che il gorgogliamento non sia superiore a 1÷2 bolle al secondo. Assicurare la tenuta dei giunti utilizzando le relative pinze. Aggiungere 50 mL di acido solforico 1+1 e 10 mL di soluzione di cloruro di magnesio. Riscaldare il pallone per un'ora evitando, per quanto possibile, che il vapor d'acqua superi metà dell'altezza del refrigerante, mentre si mantiene

in funzione il passaggio di una corrente di aria che ha il compito di trasportare tutto l'acido cianidrico liberato nel recipiente di raccolta. Interrompere, quindi, il riscaldamento e lasciare raffreddare mantenendo il gorgogliamento di aria per altri 15 minuti; interrompere il flusso di aria e trasferire il contenuto degli assorbitori in un matraccio tarato di volume C a seconda della ipotizzata concentrazione in CN⁻. Lavare i tubi e gli assorbitori con acqua che viene aggiunta nello stesso matraccio tarato; portare a volume con acqua.

Determinazione volumetrica mediante titolazione di Liebig modificata: prelevare un volume B del distillato portato a volume; aggiungere 0,5 mL di soluzione di pdimetilamminobenzilidenerodaninae titolare con la soluzione di nitrato di argento finché il colore vira dal giallo al rosa. Eseguire anche una prova in bianco su un identico volume B di acqua contenente la stessa quantità di idrossido di sodio contenuto nella soluzione sottoposta a titolazione.

Determinazione spettrofotometrica

Taratura: porre in diversi cilindri graduati a tappo smerigliato da 50 mL rispettivamente 10 mL di almeno quattro soluzioni di taratura ottenute diluendo la soluzione più adatta affinché la misura del campione rientri nell'intervallo fissato dalla curva di taratura e porre in un altro matraccio 10 mL di acqua (bianco). Aggiungere 5 mL di idrossido di sodio 0,2 M e neutralizzare con acido acetico, in presenza di una goccia di blu di bromotimolo fino a colorazione gialla, cioè fino a circa pH 5. Aggiungere 0,2 mL di soluzione di cloramina T, tappare i cilindri, mescolare per rovesciamento due o tre volte; lasciare riposare per 1 o 2 minuti; aggiungere 5,0 mL di reattivo misto piridina-pirazolone, tappare di nuovo, mescolare per rovesciamento; lasciare sviluppare il colore per 20 minuti, diluire portando al volume di 25 mL con acqua, mescolare e determinare l'assorbanza delle soluzioni a 620 nm contro il bianco. Costruire una curva di taratura.

Dosaggio del campione: prelevare un volume B (di solito 15 mL) del liquido di assorbimento portato a volume e trasferirlo in un cilindro graduato a tappo smerigliato da 50 mL. Procedere come stabilito per la taratura.

Dosaggio previa concentrazione del complesso colorato: operare come al punto "Dosaggio del campione" fino al termine dei 20 minuti di sviluppo del colore. A questo punto aggiungere 1 mL di soluzione di Na₂HPO₄. Misurare esattamente 10 mL di butan-1-olo che vengono aggiunti in un cilindro a tappo smerigliato da 50 mL. Tappare e mescolare per rovesciamento. Se le due fasi non si

separano entro 3 minuti, aggiungere altra soluzione di Na_2HPO_4 e mescolare ancora. Prelevare una parte della fase organica e misurare l'assorbanza a 620 nm contro un bianco ottenuto per estrazione del bianco dei reattivi.

Calcoli

Determinazione volumetrica: la concentrazione in cianuro del campione in esame viene calcolata con la seguente formula:

$$C_{\text{cianuri}}(\text{mg} / \text{LCN}^-) = \frac{A}{B} \cdot \frac{C}{D} \cdot 1000$$

dove:

A = mg di CN^- corrispondenti ai mL di nitrato di argento impiegati nella titolazione dopo aver sottratto i mL consumati dal bianco dei reattivi;

B = volume (mL) di distillato utilizzato per la titolazione;

C = volume totale (mL) del distillato, raccolto in matraccio e portato con lavaggi a volume;

D = volume (mL) di campione sottoposto a distillazione.

Determinazione spettrofotometrica: la concentrazione in cianuro del campione in esame viene calcolata con la seguente formula:

$$C_{\text{cianuri}}(\text{mg} / \text{LCN}^-) = \frac{A}{B} \cdot \frac{C}{D} \cdot 1000$$

dove:

A = mg di CN^- letti sulla curva di taratura;

B = volume (mL) del distillato, portato a volume, sottoposto a dosaggio spettrofotometrico;

C = volume totale (mL) del distillato raccolto in matraccio e portato con i lavaggi a volume;

D = volume (mL) di campione sottoposto a distillazione.

Composti Organostannici

Apparecchiature

- Bagno ad ultrasuoni.
- Centrifuga.
- Evaporatore rotante.

- Gas Cromatografo con rivelatore FPD (senza filtro ottico), colonna capillare in Silice fusa da 30 m di lunghezza e 0,53 mm di diametro interno con fase legata metilsiliconica e spessore del film 1.5 μm (DB-1 J&W Scientific o equivalente).
- Gas cromatografo con rivelatore MS, colonna capillare da 30 m di lunghezza, diametro interno 0,20 mm con fase legata metil-5% fenilsiliconica e spessore del film 0,25 μm ; rivelatore a selezione di massa a quadrupolo con ionizzazione ad impatto elettronico da 70 eV.

Procedura analitica

Il metodo di analisi che verrà utilizzato comprende una fase preliminare di trattamento del campione, costituita a sua volta da quattro stadi principali: l'estrazione, la derivatizzazione, la purificazione e la preconcentrazione finale del campione. Queste operazioni hanno lo scopo di estrarre gli analiti dal campione, di ridurre le interferenze e di trasformare i composti organostannici in una forma chimica più facilmente separabile, mediante gas-cromatografia, e poi quantificabile attraverso la tecnica analitica strumentale scelta per la determinazione finale.

Estrazione

La fase di estrazione degli analiti dalla matrice è la più critica dell'intera procedura di trattamento del campione, sia per la non elevata stabilità degli analiti, sia per le forti interazioni che essi instaurano con la matrice. Scarse rese di estrazione, infatti, indipendentemente da eventuali perdite occorrenti in altre fasi della procedura, portano a sottostimare la quantità di analita contenuta nel campione. La scelta del metodo è correlata alla tecnica di rivelazione e al tipo di strumentazione disponibile. Tra i metodi proposti possiamo distinguere i seguenti:

- metodi di estrazione “classica” con solventi organici, o in miscele di diversi solventi (di diversa polarità) in presenza o meno di acidi e/o di agenti complessanti (assistita mediante l'utilizzo di diverse forme di energia, per facilitare il rilascio dei composti organostannici dalla matrice, quali: calore, ultrasuoni, microonde, agitazione meccanica ecc.);
- metodi di estrazione mediante idrolisi basica e enzimatica;
- metodi di estrazione in fluidi supercritici;
- metodi di estrazione “accelerata” con solvente.

Derivatizzazione

L'analisi gascromatografica di composti organostannici, la cui forma ionica ha una bassa volatilità, richiede necessariamente una fase di derivatizzazione nella procedura analitica affinché essi siano trasformati in composti più volatili. Nonostante la derivatizzazione comporti l'aumento della manipolazione del campione essa offre i grossi vantaggi di eliminare le interferenze di sostanze coestratte dalla matrice reale. La reazione di derivatizzazione viene effettuata generalmente con due tecniche differenti:

1. Formazione di idruri (reazione con composti boro-organici);
2. Alchilazione (reazione con reattivi di Grignard).

La derivatizzazione per alchilazione con reattivo di Grignard è l'approccio più seguito sia per l'analisi di sedimenti che per le matrici biologiche.

I reattivi di Grignard comunemente usati sono: il metilmagnesio bromuro (MeMgBr), l'etilmagnesio bromuro (EtMgBr), il pentilmagnesio bromuro (PeMgBr) e l'esilmagnesio bromuro (EsMgBr). La scelta del reagente alchilante dipende dal tipo di analita da analizzare e in particolare dalla sua volatilità.

Purificazione

È necessaria anche una fase di purificazione, da effettuare dopo la derivatizzazione e con lo scopo di eliminare sostanze coestratte dai campioni ed eccessi di reattivi utilizzati che potrebbero interferire nella determinazione analitica. Nonostante questo stadio aggiuntivo comporti un'ulteriore possibilità di perdite, si rende comunque necessario in quanto porta un aumento della sensibilità, un miglioramento della risoluzione dei picchi cromatografici, e quindi in generale un miglioramento della prestazione analitica.

Le procedure di purificazione più impiegate si basano su una separazione cromatografica liquido-solido su fase adsorbente. Gli adsorbenti più comunemente usati sono il gel di silice, il florisil e l'allumina, mentre gli eluenti più utilizzati sono benzene, esano, toluene o miscele di questi solventi organici.

Preconcentrazione

Viene operata con le procedure convenzionali che, in genere, prevedono un'evaporazione del solvente.

Rivelazione

I sistemi di rivelazione proposti per l'analisi gascromatografica dei composti organostannici sono:

- rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID: “flame ionization detector”);
- rivelatore a cattura di elettroni (ECD: “electron capture detector”);
- spettrofotometro ad assorbimento atomico (AAS: “atomic absorption spectrometer”);
- rivelatore fotometrico a fiamma (FPD: “flame photometric detector”);
- rivelatore a emissione atomica (AED: “atomic emission spectrometer”);
- spettrometro di massa (MS: “mass spectrometer”).

Lo spettrometro di massa è, insieme al rivelatore a fotometria di fiamma, uno dei rivelatori più usati per l'analisi dei composti organostannici poiché presenta il grande vantaggio di permettere l'identificazione dei composti oltre ad essere caratterizzato da un'elevata sensibilità e selettività. Recentemente, nell'ambito delle tecniche accoppiate, sono state proposte delle applicazioni della tecnica a spettrometria di massa avente come sorgente di ioni il plasma indotto da microonde.

Torbidità

Apparecchiature

- Stufa a convezione naturale, munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura entro $\pm 1^\circ\text{C}$.
- Essiccatore
- Bilancia analitica di 200 g di capacità con risoluzione di 0,1 mg.
- Apparecchio per filtrazione sotto vuoto, adeguato al tipo di filtro prescelto.
- Membrane filtranti con pori di diametro medio di 0,45 μm .

Procedura analitica

Porre il filtro per 1 ora in stufa alla temperatura di 105°C ; lasciarlo raffreddare in essiccatore per 30 minuti e pesarlo al decimo di milligrammo. Collocare il filtro nell'apparecchio di filtrazione.

Prelevare un'opportuna aliquota del campione da analizzare, dopo preventiva omogeneizzazione, ed effettuare la filtrazione sotto vuoto, avendo cura di lavare il dispositivo di prelievo (cilindro graduato o altro) con il liquido filtrato. Per campioni a bassa torbidità il volume prelevato deve esser almeno di un litro, mentre per valori di torbidità più elevati deve essere tale da

fornire da 20 a 100 mg di solidi sospesi. Lavare per tre volte il filtro con acqua deionizzata (10 mL per volta) e, a filtrazione completata, mantenere il vuoto per tre minuti.

Ultimata la filtrazione, trasferire il filtro con il suo contenuto in una stufa alla temperatura di 105°C. Dopo 1 ora lasciar raffreddare il filtro in essiccatore per 30 minuti e pesare.

Calcoli

Il contenuto di solidi totali disciolti alla temperatura scelta è dato da:

$$\text{Solidi totali disciolti (mg/L)} = \frac{(M_1 - M_0) \cdot 1000}{V}$$

dove:

M1 = peso (mg) del filtro e del residuo dopo essiccamento;

M0 = peso (mg) del filtro;

V = volume (mL) di campione sottoposto a filtrazione.

Ossigeno disciolto

Apparecchiature

- Matracci tarati da 1 L.
- Microburetta di vetro o a pistone da 1 ml o da 5 ml.
- 5 bottiglie di pyrex dello stesso tipo di quelle adoperate per il campionamento.
- Micropipetta di precisione da 0,500 ml; micropipetta da 0,200 ml.
- Agitatore magnetico.
- Ancorette magnetiche.
- 2 dispenser o micropipette automatiche o siringhe di polietilene con tacche ogni 0,5 ml (per reattivi ossigeno).
- Dispenser da 1 ml (per l'acido solforico concentrato).

Procedura analitica

Preparazione dei reagenti

a. Solfato di manganese:

Sciogliere 365 g di solfato di manganese monoidrato $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in acqua distillata e portare

il volume ad 1L

b. Soluzione alcalina ioduro:

Sciogliere 500g di idrossido di sodio in 500 ml di acqua distillata.

Sciogliere 300g di potassio ioduro in 450ml di acqua distillata e mescolare le due soluzioni.

c. Soluzione standard di tiosolfato 0.01N

d. Soluzione di amido solubile

Sospendere 2g di amido solubile in 300-400 ml di acqua. Aggiungere una soluzione di idrossido di sodio 20% in modo vigoroso. Aggiungere acido cloridrico fino a che la soluzione è acida alla cartina tornasole e dopo aggiungi 2ml di acido acetico. Alla fine diluire la soluzione a 1 litro di acqua distillata. Escludere la soluzione quando il colore finale non è più lungo di un blu e tende al verde.

Analisi dei campioni

1. Rimuovere il tappo dalla bottiglia Pyrex ed aggiungere 1 ml di solfato manganese, ponendo la pipetta giusto al di sotto del livello del campione. Subito dopo aggiungere 1ml di soluzione alcalina iodata. Richiudere immediatamente la bottiglia e mescolare il contenuto fino a che il precipitato idrossido manganese-manganico non risulta disperso in modo uniforme.

2. Quando il precipitato si è depositato (in 2-3 minuti) agitare nuovamente fino a che la parte solida risulta ben separata dalla soluzione. Lasciare il campione fino a quando il precipitato non si deposita completamente lasciando una soluzione supernatante chiara.

3. Aggiungere 1 ml di acido solforico concentrato, richiudere la bottiglia e mescolare così da sciogliere tutto il precipitato senza far entrare aria nella bottiglia.

4. Ad un'ora dall'acidificazione trasferire 50 ml di soluzione in un flacone conico colorato attraverso una pipetta. Titolare con una soluzione standard di tiosolfato 0.01N fino a quando non rimane un colore paglia molto pallido. Aggiungere 5 ml dell'amido indicatore e terminare la titolazione.

Calcoli

Sottrarre la correzione del bianco alla titolazione per ottenere la corretta titolazione, V ml, e calcolare il contenuto di ossigeno del campione dalla formula:

$$\text{mg-atomo O}_2/\text{L} = 0.1006 * f * V$$

nel caso in cui venga prelevata un'aliquota di 50 ml, oppure

$$\text{mg-atomo O}_2/\text{L} = (Y/Y-2) * 5.00/X * f * V$$

quando una aliquota X ml viene prelevata da una bottiglia Y-ml.

I millilitri di ossigeno presenti in un litro di acqua può essere calcolato come segue:

$$\text{ml O}_2(\text{NTP})/\text{L} = 11.20 * \text{mg-atomo O}_2/\text{L}$$

$$\text{mg O}_2/\text{L} = 16.00 * \text{mg-atomo O}_2/\text{L}$$

Calcolo del fattore f

Riempire una bottiglia Pyrex con acqua di mare o acqua distillata ed aggiungere 1ml di acido solforico concentrato, 1ml di soluzione iodata alcalina e mescolare. Alla fine aggiungere 1ml di solfato di manganese e mescolare di nuovo. Porre circa 50ml all'interno del contenitore per la titolazione e titolare con 0.1N tiosolfato sodico o 0.001 tiosolfato sodico.

Fare 3 o 5 repliche e calcolare il valore di f come:

$$f = 5.00/v$$

Clorofilla a

Apparecchiature

- Apparato per la filtrazione
- Pompa da vuoto
- Filtri in fibra di vetro Whatman GF/F 25 mm
- Provette da centrifuga da 10 ml
- Cilindri graduati da 1L
- Spettrofotometro

Procedura analitica

Preparazione dei reagenti

a. Acetone neutralizzato

Aggiungere all'acetone puro carbonato di sodio anidro in eccesso ed agitare vigorosamente. Filtrare,

dopo almeno 24 ore, su carta da filtro e travasare nella spruzzetta.

b. Acetone neutro al 90 %

Mescolare 100ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone.

c. Acetone neutro all'80%

Mescolare 200ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone.

d. Acido cloridrico 0.66 mol/L

Versare lentamente e sotto agitazione 55 ml di acido cloridrico concentrato in 950 ml di acqua grado reagente.

Analisi dei campioni

Filtrare un volume noto (da 1 a 4L) di un campione d'acqua su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F (25 mm di diametro). Utilizzare una pompa da vuoto assicurandosi che la pressione sia di circa 150 mmHg, per evitare la rottura delle cellule vegetali ed il conseguente passaggio dei pigmenti attraverso il filtro.

Conservare i filtri in provette da 10 mL in 5mL di Acetone disidratato 100% (inibisce le clorofillasi) al buio ad una temperatura compresa di -20°C (i pigmenti sono fotolabili e termolabili) se si desidera posticipare il dosaggio spettrofotometrico. Nel caso in cui questo venga effettuato subito dopo la filtrazione riporre le provette a 4°C.

Triturare i filtri con un pestello ed aggiungere un volume di Acetone 80% pari al volume di Acetone 100% con lo scopo di ottenere un estratto al 90%. Riporre i campioni ad una temperatura di circa 4°C per 24h per completare l'estrazione. Nel caso in cui il dosaggio spettrofotometrico venga effettuato subito dopo la filtrazione, riporre a 4°C per un'ora.

Centrifugare le provette chiuse per 15 minuti a 4000 giri/min in modo da separare il filtro dalla soluzione. Prelevare il sopranatante mediante pipetta e riempire la cuvette per la lettura allo spettrofotometro.

Procedere con la lettura dell'estratto allo spettrofotometro.

Calcoli

Tre sono i metodi più ampiamente utilizzati per la stima dei pigmenti fotosintetici:

- metodo della stima della clorofilla a (con feopigmenti) (Jeffrey & Humphrey, 1975);
- metodo per la stima delle clorofille a,b e c (Lorenzen & Jeffrey, 1980);

- metodo per la stima separata della clorofilla a e dei feopigmenti (Lorenzen, 1967).

3. MONITORAGGIO DEI FONDALI MARINI

Le attività oggetto di questo capitolo sono relative alla realizzazione di campagne *in situ* per la raccolta di campioni di sedimento al fine di monitorare le caratteristiche degli eventuali sedimenti che si depositano sul fondale marino in conseguenza delle attività di dragaggio.

A tal fine verranno raccolti, nelle tre stazioni del transetto in Fig.3-1, 3 carote prima della messa in opera dei dragaggi e 6 carote durante la fase di dragaggio, per ciascuna delle quali verranno prelevati 2 sub-campioni da analizzare, per un totale di 18 campioni di sedimento.

Ogni campione sarà sottoposto all'analisi dei seguenti parametri: Coliformi totali; Coliformi fecali; Streptococchi fecali; Salmonella; Spore di clostridi solfito riduttori, Enterovirus; Idrocarburi totali; IPA; PCB; Pesticidi organoclorurati; Azoto totale; Fosforo totale; Alluminio; Mercurio; Cadmio; Antimonio; Arsenico; Berillio; Cromo; Nichel; Piombo; Rame; Selenio; Vanadio; Zinco; Cianuri; Composti organostannici.



Fig.3-1 Piano di campionamento

I prelievi di sedimento saranno eseguiti utilizzando un carotiere a gravità leggero (UWITEC) acqua-sedimento con supporto di massa battente in grado di campionare cores di sedimento indisturbato fino alla profondità di circa 1.20 metri. Tutti i campioni verranno manipolati avendo cura di garantire la sterilità degli utensili adoperati, e in maniera da ridurre al minimo la possibilità di contaminazione.

L'insieme dei campioni di sedimento da prelevare sarà costituito quindi da un totale di 9 carote. Da ogni carota verranno prelevate 2 sezioni rappresentative delle quali una dal sedimento superficiale.

I campioni stoccati verranno trasportati presso il laboratorio dove saranno oggetto delle tipologie di analisi e prove previste, ciascuna corredata di un rapporto di prova certificato in conformità a quanto previsto dalla normativa vigente.



Fig. 3-2 Campionamento dei sedimenti marini mediante carotiere

Le attività analitiche previste per la caratterizzazione del sedimento eseguite su ciascun subcampione fanno riferimento a quanto riportato nel manuale 'Metodologie analitiche di riferimento' MATTM-ICRAM e “Manuale per la Movimentazione dei Sedimenti Marini” (APAT-ICRAM).

Ad integrazione delle attività di campionamento previste dal presente Allegato, verranno

effettuati dei profili verticali mediante sonde multiparametriche, al fine di misurare le caratteristiche fisico-chimico-biologiche della colonna d'acqua. Verranno inoltre utilizzati dei modelli matematici di simulazione numerica al fine di evidenziare la propagazione di sostanze conservative e non conservative presenti nella colonna d'acqua, in modo da poter analizzare il fenomeno di dispersione dei sedimenti. I dati raccolti durante il monitoraggio dei dragaggi verranno utilizzati nell'ambito di specifiche indagini scientifiche finalizzate allo studio dell'interazione tra i processi chimico-fisici e quelli biologici in ambiente marino costiero. La localizzazione del transetto su cui verranno effettuati i campionamenti è tale da permettere un'efficace analisi quali-quantitativa della variazione verticale e della distribuzione orizzontale delle variabili oceanografiche lungo un gradiente costa-largo. Le attività di ricerca potranno portare alla pubblicazione di articoli scientifici in riviste di rilievo nazionale ed internazionale.

3.1 Operazioni in mare

3.1.1 Modalità di campionamento

Per i carotaggi sarà utilizzato un carotiere a gravità leggero UWITEC munito di massa battente in alluminio (Fig.3.1.1-1). Verranno utilizzati liners di lunghezza pari a 1.20 metri e sezione di 8.6 centimetri per il prelievo di carote di lunghezza maggiore o uguale a 70 centimetri.



Fig.3.1.1-1: Carotiere leggero a gravità UWITEC con massa battente in alluminio.

Ogni carota sarà subcampionata in due sezioni rappresentative rispettivamente dello strato superficiale e dello strato profondo. Le operazioni di subcampionamento saranno effettuate preferibilmente in nave subito dopo il prelievo, in modo da limitare eventuali fenomeni di rimescolamento e contaminazione.

3.1.2 Conservazione dei campioni

I subcampioni di sedimento così ottenuti saranno conservati in appositi contenitori secondo le seguenti modalità.

Caratteristiche granulometriche

I campioni saranno conservati in contenitori di plastica o vetro a temperatura ambiente fino all'arrivo in laboratorio, dove saranno conservati a +4°C.

Analisi microbiologiche

Dopo il prelievo, il campione deve essere conservato in contenitori sterili. Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa

fra 4° e 10°C. Le analisi microbiologiche verranno effettuate entro e non oltre 12 ore dal prelievo.

Spore di clostridi

Il sedimento destinato all'esame microbiologico sarà conservato in recipienti puliti e sterili e conservato refrigerato durante il trasporto e fino al momento dell'analisi, che deve essere svolta entro 24 ore dal momento del prelievo.

Enterovirus

Il campione va conservato a circa 4°C sino al momento dell'esame che deve avvenire al massimo entro ventiquattro ore dal prelievo.

Idrocarburi totali

Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

IPA

I campioni vanno conservati al buio ed in frigorifero a 4°C (è consigliabile effettuare le operazioni di estrazione il più presto possibile e comunque non oltre 48 ore).

PCB

I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana; eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall'aggiunta di HCl concentrato (1 mL/L di campione).

Composti organoclorurati

Si prelevano campioni omogenei, che saranno conservati entro fogli di alluminio decontaminati alla temperatura di -20°C.

Azoto totale

I campioni verranno congelati immediatamente a -20°C, fino all'analisi in laboratorio. La loro conservazione può protrarsi anche per diversi mesi senza causare alterazione dei risultati.

Fosforo totale

I campioni vengono congelati immediatamente a -20°C , fino all'analisi in laboratorio. La loro conservazione può protrarsi anche per diversi mesi senza causare alterazione dei risultati.

Cianuri

I campioni saranno conservati alla temperatura di -20°C in barattoli di polietilene decontaminati.

Composti organostannici

L'elevata tendenza alla degradazione di questi composti nei campioni reali rende necessaria la conservazione del campione in opportune condizioni. L'umidità del campione e la luce sono i maggiori responsabili della degradazione dei composti organostannici. Per minimizzare tale rischio, è necessario liofilizzare, omogeneizzare e conservare i campioni al buio a -20°C immediatamente dopo il loro prelievo.

Metalli pesanti

I campioni saranno conservati ad una temperatura inferiore a 4°C in barattoli di polietilene decontaminati.

3.2 Operazioni in laboratorio

Granulometria

Apparecchiature

I campioni saranno riposti in un contenitore di plastica a temperatura ambiente fino all'arrivo in laboratorio dove verranno conservati a $+4^{\circ}\text{C}$. I campioni di sedimento verranno sottoposti all'analisi di distribuzione del diametro dei granuli secondo la scala Wentworth.

Verranno riportate le percentuali delle varie frazioni dimensionali:

Frazioni granulometriche al $1/2\phi$

dove

$\phi = -\log_2 (\text{diametro in mm} / \text{diametro unitario in mm})$

Trattamento dei campioni: metodo di quartazione (procedura selettiva del materiale da trattare).

Metodo dei coni

Si procede disponendo ogni singolo campione a forma di cono su di una superficie piana, dividendolo in quattro settori e prelevandone i due opposti, finché non si ottiene il peso necessario.

Al fine di eliminare la frazione organica contenuta in ogni campione, il materiale così quartato viene disperso in acqua distillata allo scopo di ottenere un primo lavaggio completo e successivamente sottoposto all'azione di un agitatore meccanico.

Questa fase viene effettuata attraverso una centrifugazione alla velocità di 44 giri/minuto, per circa quindici minuti, al fine di eliminare tutta l'acqua in esso contenuta.

Il trattamento viene ripetuto fino a quando la prova dei cloruri presenta un risultato negativo. Ciò si ottiene prelevando una piccola quantità d'acqua proveniente dalla centrifugazione del campione addizionata ad alcune gocce di nitrato di argento; se il composto non mostra la formazione di un precipitato biancastro di cloruro di argento il campione può essere considerato totalmente desalinizzato. La fase di eliminazione completa dei cloruri è determinante al fine di evitare, durante l'applicazione delle rispettive analisi granulometriche, la formazione di aggregati nella frazione sabbiosa e la formazione di flocculi nella frazione fine.

Successivamente, ogni campione così trattato viene asciugato in stufa alla temperatura di circa 120° C. Allo scopo di separare la frazione ARENITICA ($> 62,5 \mu$) da quella PELITICA ($< 62,5 \mu$), ogni singolo campione viene sottoposto ad un secondo lavaggio attraverso un apposito setaccio dotato di una maglia da $62,5 \mu$ (4 f, ossia 1/16 mm).

A questo punto per ogni campione (opportunamente asciugato nuovamente in stufa a 120° C) possono essere ottenute tre porzioni, da destinare ad altrettante differenti metodologie di analisi granulometrica:

- a) la frazione ruditica ($> 4 \text{ mm}$) viene analizzata mediante il metodo del CALIBRO;
 - b) la frazione arenitica ($4 \text{ mm} < 1/16 \text{ mm}$) viene analizzata mediante SETACCIAMENTO;
 - c) la frazione pelitica ($< 1/16 \text{ mm}$) viene analizzata tramite il metodo della DENSIMETRIA.
- ci)

Analisi della frazione ruditica

Metodo del Calibro

Si utilizza un normale calibro con scala millimetrata e si definisce la misura (in mm) del diametro medio di ogni singolo componente della frazione ruditica, opportunamente rappresentata da un sufficiente numero di campioni ciottolosi.

Per ogni singolo ciottolo viene dunque definito il peso (in grammi) ed il diametro medio, cosicché ogni ciottolo possa essere collocato all'interno delle classi granulometriche previste per la frazione ruditica dalla scala Wentworth.

Successivamente si procede alla stima della percentuale di ogni classe granulometrica sulla base del peso totale iniziale del campione ruditico.

Analisi della frazione arenitica

Metodo di Setacciamento

Si utilizza un'apposita batteria di setacci, disposti in pila, in cui l'apertura della maglia diminuisce progressivamente verso il basso nella misura di $\frac{1}{2}$ f.

La batteria di setacci impiegata appartiene alla serie ASTM, ed ogni setaccio è dotato di un'altezza pari a 50 mm. La frazione arenitica relativa ad ogni campione viene fissata intorno ai 200 gr e successivamente posta all'interno del setaccio più "alto" (dotato cioè delle maglie più larghe); l'intera batteria viene così sottoposta all'azione di un agitatore meccanico per un periodo di circa 30 minuti, al fine di ottenere la completa vagliatura del materiale.

Successivamente si procede alla stima del peso di ogni singola frazione trattenuta all'interno di ogni setaccio, valutandone la percentuale rispetto al peso totale iniziale per ogni singola classe granulometrica di appartenenza.

La frazione eventualmente passata al di sotto dell'ultimo setaccio (con maglie di larghezza pari a 62,5 μ m) viene successivamente aggiunta alla frazione pelitica relativa al medesimo campione.

I valori di ogni singola pesata così ottenuti vengono riferiti alle classi granulometriche appartenenti alla scala Wentworth.

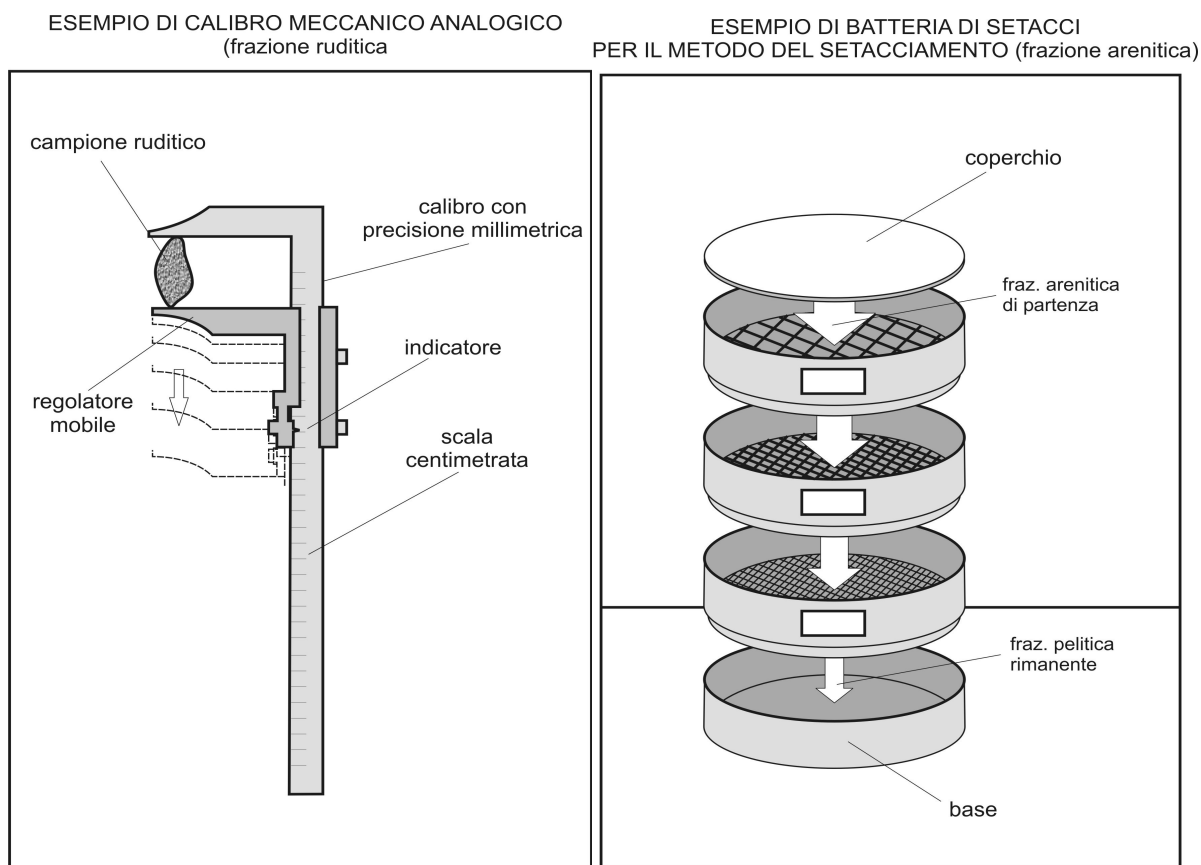


Fig. 3.2-1 Calibro meccanico e setacciatore

Analisi della frazione pelitica

Essa viene effettuata attraverso l'impiego di una metodologia indiretta che sfrutta il comportamento idrodinamico delle particelle in sospensione in un fluido, al fine di dedurre le caratteristiche granulometriche della frazione analizzata.

Metodo della Densimetria

Basato sul principio espresso dalla Legge di Stoke: Una sfera immersa in un fluido viscoso, fermo ed indefinito, e abbandonata a se stessa senza velocità iniziale, per effetto della gravità cade con moto inizialmente accelerato. Se il diametro della sfera è abbastanza piccolo così che nella sua caduta essa non provochi la formazione di scie vorticosi (regime lamellare), la sfera raggiunge una velocità di regime alla quale si equilibrano la resistenza del mezzo e la forza motrice, proseguendo la sua caduta con moto uniforme.

Una volta trattato il campione con acqua ossigenata, la frazione pelitica, eventualmente

integrata con la percentuale di pelite avanzata dal setacciamento, si procede al trattamento del campione secondo una quantità non inferiore a 30 gr. La quantità da trattare viene collocata in un contenitore con l'aggiunta di 50 gr di deflocculante ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ossalato di sodio + Na_2CO_3 carbonato di sodio).

Tali condizioni vengono mantenute per qualche minuto; successivamente il sedimento con l'aggiunta del deflocculante viene inserito in un agitatore meccanico tenuto in funzione per circa 10 minuti. Lo scopo di questa operazione è quello di permettere una efficace deflocullazione del materiale fine.

Al termine di questa operazione, la sospensione viene collocata in un cilindro di vetro con l'aggiunta di acqua distillata fino ad un volume totale di 1000 cm^3 . Prima di procedere alla lettura della densità del fluido, viene agitato l'intero contenuto del cilindro attraverso una momentanea occlusione della sommità superiore. Ad inizio prova viene inserito un densimetro di tipo ASTM, tipo A, a bulbo leggermente asimmetrico, tarato ad una temperatura di 20°C in acqua distillata.

Vengono così effettuate le letture della densità del fluido ad intervalli di tempo predefiniti dalla relazione che la Legge di Stoke implica tra la densità del fluido e la percentuale di particelle che via via sedimentano. Le percentuali vengono ottenute per interpolazione lineare tra i valori di densità letti sull'indicatore superiore del densimetro e i tempi di misura, tramite un'apposita tabella.

Per le tre metodologie (calibro, setacciamento e densimetria) vengono ottenute le percentuali di materiale relative ad ogni intervallo granulometrico e diagrammate secondo delle conseguenti curve cumulative.

In esse viene esposta la relazione tra il diametro delle particelle espresso in μ e la percentuale cumulativa di ogni campione analizzato.

Ponendo in relazione la frequenza (espressa in percentuale) di ogni classe granulometrica rappresentata con il diametro delle particelle si ottengono delle curve di frequenza tramite cui è possibile ottenere il valore dei vari percentili, necessari per il calcolo dei Parametri Statistici.

Percentuale di umidità

Verrà calcolata la percentuale di umidità di ciascun campione con metodo Gravimetrico; l'umidità residua viene calcolata come differenza tra la massa di un campione di terra fine e la massa dello stesso campione dopo essiccamento a 105°C fino a massa costante.

Le apparecchiature utilizzate constano di attrezzature da laboratorio di uso comune ed in

particolare una stufa termostata in grado di mantenere una temperatura di 105°C (± 2°) ed un pesafiltri (Ø 8 cm).

A tal proposito verranno pesati 20 g del campione di terra fine in un pesafiltri, preventivamente tenuto, per almeno 2 ore, in stufa a 105°C e tarato dopo raffreddamento in essiccatore.

Molto importante è tenere per almeno 16 ore il pesafiltri, contenente il campione di terra fine, nella stufa già preriscaldata a 105°C.

Dopo il raffreddamento in essiccatore, il pesafiltri verrà pesato con precisione di 1 mg.

L'umidità si esprime in g kg⁻¹, con una cifra decimale; i calcoli che verranno effettuati utilizzano la seguente espressione

$$C = 1000 \cdot \frac{M_0 - M_1}{M_0}$$

dove

C = umidità, espressa in g · kg⁻¹ di terra fine

M₀ = massa del campione prima dell'essiccazione, espressa in grammi

M₁ = massa del campione dopo l'essiccazione, espressa in grammi.

Il fattore di moltiplicazione f, per convertire i dati analitici ottenuti per il suolo secco all'aria in dati riferiti al suolo secco a 105°C, si calcola con la seguente espressione:

$$f = \frac{M_0}{M_1}$$

dove i simboli hanno il significato visto sopra.

Tenuto conto che i risultati analitici vengono riferiti al peso del campione di suolo secco in stufa a 105°C, il contenuto di umidità residua deve essere accertato prima di ogni altra determinazione analitica.

Per suoli la cui frazione organica è caratterizzata da elevato contenuto di composti volatili o facilmente ossidabili è opportuno procedere alla determinazione dell'umidità residua mantenendo il campione in stufa a 70°C per 48 ore. Deve essere precisato, tuttavia, che non c'è specifica temperatura che possa consentire la rimozione dell'umidità senza provocare perdita di costituenti organici.

Peso specifico

Verrà calcolato il peso specifico per ciascun campione con metodo Gravimetrico; la misura gravimetrica è il metodo più usato per la determinazione della quantità in massa del materiale particolato. Viene effettuata mediante una bilancia analitica in grado di misurare il peso di una sostanza da 10 microgrammi a 40 grammi.

Procedura analitica

Ogni campione sarà trattato con una soluzione di perossido di idrogeno ed acqua distillata (2:8) per 48 ore a temperatura ambiente per facilitare la separazione dei granuli.

In seguito, il sedimento verrà separato su maglia da 63 μm in umido con acqua distillata; le due frazioni ottenute saranno essiccate in stufa a 60°C e successivamente pesate.

Verrà vagliata la frazione $> 63 \mu\text{m}$ (sabbia e ghiaia) con pile di setacci da -1 a 4 phi con un intervallo di 0,5 phi ($\phi = -\log_2$ del valore in mm) della serie ASTM; verrà pesato il sedimento corrispondente a ciascun intervallo ed al termine delle operazioni verrà calcolato il peso dell'intera frazione.

Per la frazione fine o pelitica ($< 63 \mu\text{m}$) verrà eseguita quartatura per ottenere la massima distribuzione casuale dei granuli mantenendo il sedimento in sospensione per 24 ore in una soluzione di acqua distillata ed esametafosfato di sodio (0,05%) in ragione di 2,5 g di campione per 100 ml di soluzione; la frazione $< 63 \mu\text{m}$ sarà analizzata mediante sedigrafo a raggi X o granulometro laser.

I campioni, una volta scongelati, vengono pesati e successivamente seccati in stufa a 40°C, raffreddati e pesati di nuovo. La percentuale d'acqua contenuta nel sedimento si ricava dal rapporto fra il peso del sedimento umido e il peso di quello secco, moltiplicato per 100.

Calcoli

Il risultato sarà espresso sia in forma grafica con una curva di distribuzione che in forma tabellare con le percentuali per ciascuna categoria granulometrica.

Coliformi totali

Procedura analitica

Durante la preparazione del campione, preliminarmente, verrà effettuata la omogeneizzazione del campione, in seguito, si procederà alla misura del grado di umidità, attraverso l'uso di una termobilancia che consentirà di misurare il parametro nel tempo di circa un'ora; questi valori saranno confrontati con i corrispondenti valori di umidità percentuale misurati durante le analisi granulometrici, per avere risultati confrontabili.

In seguito, per ogni campione, sia umido sia omogeneizzato, saranno pesate quantità di sostanza secca equivalenti a 10, 1 e 0,1 grammi. Per ogni diluizione e per ogni campione verranno effettuate tre pesate per tre inoculi.

Per quanto riguarda la preparazione del terreno di coltura, saranno pesati 13 g di *Lactose broth dehydrated* e sciolti in un litro di acqua deionizzata. 10 ml di tale soluzione saranno versati in provette di semina che, tappate, si faranno sterilizzare a 121°C per 15 minuti.

Successivamente si passerà all'inoculazione; i campioni, pesati come precedentemente descritto, saranno seminati nel terreno di coltura e quindi posti in incubazione in stufa a 37°. Dopo le prime 24 ore si effettuerà una prima lettura e i campioni delle provette risultate positive saranno inoculati nell'altro terreno di coltura (*Brilliant green bile (2%) broth*) per la conferma; queste provette saranno poste in incubazione a 37°C. Analogo trattamento subiranno i campioni risultati positivi dopo 48 ore dalla prima inoculazione; i campioni risultati negativi dopo tale periodo saranno considerati negativi. Le letture sulle provette di conferma saranno effettuate dopo 24 ore e dopo 48 ore.

Coliformi fecali

Procedura analitica

La preparazione del campione segue le stesse procedure utilizzate per i coliformi totali; invece per la preparazione del terreno di coltura saranno pesati 35 gr di *Azide dextrose broth* e disciolti in un litro di acqua deionizzata. 10 ml di tale soluzione saranno versati nelle provette di semina che, tappate, saranno sterilizzate a 121°C per 15 minuti.

Nel processo di inoculazione i campioni, pesati come precedentemente descritto, saranno seminate nel terreno di coltura e quindi posti in incubazione in stufa a 37°C. Dopo le prime 24 ore sarà effettuata una prima lettura, e i campioni risultati positivi saranno inoculati nell'altro terreno di coltura (*E.V.A*) per la conferma; queste provette saranno poste in incubazione a 37°C. Analogo trattamento subiranno i campioni risultati positivi dopo 48 ore dalla prima inoculazione; i campioni risultati negativi dopo tale periodo saranno considerati negativi.

Le letture sulle provette di conferma saranno effettuate dopo 24 ore e dopo 48 ore.

Salmonelle

Procedura analitica

Un'aliquota di 25 gr di campione sarà incubata in una beuta contenente 225 ml di acqua peptonata tamponata a 37°C per 18-24 ore. Dalla coltura saranno prelevati 0,1 ml ed inoculati in 10 ml di Rappaport-Vassiliadis Broth con aggiunta di 40 microgrammi /ml di novobiocina incubando a 37 e/o 43 °C per 24-48 ore. Successivamente la coltura sarà strisciata su XLD agar e, dopo incubazione a 37°C per 24 ore, saranno prelevate 3 colonie tipiche che saranno inoculate singolarmente in Kliger Iron Agar (KIA) a becco di clarino ed incubate a 37°C per 24 ore. Infine, le colture cresciute nei tubi di KIA, che avranno evidenziato reazioni biochimiche tipiche della Salmonella, saranno sottoposte al test di agglutinazione su vetrino con antisiero omnivalente e, in caso di positività, saranno saggiate con antisieri anti-Salmonella per determinare il gruppo di appartenenza.

Spore di clostridi solfito riduttori

Procedura analitica

Verrà preparata una sospensione, che verrà pesata in un contenitore sterile una massa *m* (almeno 10 g) del campione da analizzare, successivamente sarà addizionato il diluente, preferibilmente acqua fisiologica tamponata (K_2HPO_4 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, NaCl 8,5 g/L; pH $7,2 \pm 0,2$, in misura pari a 9 ml x *m*). La sospensione verrà lasciata agitare per alcuni minuti su piastra magnetica o tramite Stomacher per rendere la sospensione omogenea.

Per questo tipo di campione è necessario effettuare un pretrattamento; la procedura permette la disaggregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei clusters microbici. Successivamente la sospensione di campione verrà

trattata al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, favorendo contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

La sospensione del campione sarà sottoposta, per circa 15 secondi, a omogeneizzazione meccanica con omogeneizzatore elettrico, del tipo “per coltura di tessuti” con regolatore di velocità da 1000 a 10000 g/min e pestello in teflon, mantenendo la sospensione in un bagno di ghiaccio. In alternativa, verrà sottoposta a sonicazione per circa 10 secondi. Successivamente il campione verrà mantenuto per 15 minuti a $75 \pm 5^\circ\text{C}$ a partire da acqua inizialmente fredda che, con il progressivo riscaldamento, innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Il campione sarà raffreddato sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

Verranno inoculate almeno due aliquote del campione, diluito o tal quale, in doppio per ciascuna aliquota, in tubi contenenti il terreno di isolamento Agar al Solfito Polimixina Solfadiazina (SPS).

L'inoculo sarà effettuato nei tubi con il terreno disciolto e mantenuto tale alla temperatura di circa 45°C , avendo cura di distribuire bene il campione nel terreno evitando la formazione di bolle d'aria. Dopo raffreddamento verranno aggiunte in ogni tubo alcuni millilitri di olio di vaselina per assicurare condizioni di anaerobiosi. L'incubazione sarà protratta per 24 ± 24 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

I tubi che presenteranno colonie invasive o patine batteriche che schermano la crescita nella massa del terreno saranno esclusi. Verranno presi in considerazione i tubi in cui le colonie sono ben leggibili e separate. I conteggi relativi a due diluizioni successive verranno annotati contando le colonie nere, circondate da un alone nerastro, di dimensioni 0,3-0,5 mm di diametro, cresciute nello spessore dell'Agar.

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium*, sarà eseguita, almeno sul 5% delle colonie sospette, la colorazione di gram e la prova della catalasi. Per una identificazione a livello di specie dei microrganismi isolati saranno utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio. Per procedere allo svolgimento delle prove di conferma, la colonia da saggiare, prelevata con un'ansa sterile, sarà trasferita sulla superficie di due piastre contenenti Agar nutritivo con sangue di coniglio o, in alternativa, di due piastre di Agar Columbia con 5% di sangue di montone.

Una piastra sarà incubata a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore, l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in anaerobiosi.

I microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* cresceranno unicamente sul terreno incubato in condizioni anaerobiche. Si procederà quindi allo svolgimento della prova della catalasi.

La prova della catalasi serve per differenziare i batteri solfito-riduttori appartenenti al genere *Clostridium* (catalasi negativi) da quelli appartenenti al genere *Bacillus* (catalasi positivi).

Le colonie da saggiare saranno seminate su agar nutritivo ed incubate a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore in anaerobiosi. La colonia in esame sarà strisciata su un vetrino da microscopio e quindi ricoperta con una goccia di perossido d'idrogeno. La reazione negativa, tipica del genere *Clostridium*, sarà evidenziata dalla mancata formazione di bolle (liberazione di gas).

Il resoconto di prova indicherà il metodo utilizzato esprimerà i risultati come numero di spore di clostridi solfito riduttori per volume di campione.

Enterovirus

Procedura analitica

Il metodo di recupero di virus enterici da sedimenti marini verrà effettuata attraverso le procedure di eluizione e di successiva concentrazione al fine di eliminare il sedimento.

Isolamento ed identificazione di enterovirus

Le tecniche utilizzate in questa fase sono legate alla diversa tipologia degli enterovirus.

Alcuni virus, capaci di moltiplicarsi su sistemi cellulari, sono in grado di indurre un tipico effetto citopatico (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus), altri (Epatite A) possono moltiplicarsi senza indurre alcuna alterazione evidente. In quest'ultimo caso la loro presenza può essere svelata solo con tecniche immunologiche (immunofluorescenza diretta o indiretta, "test" immunoenzimatici, "test" radioimmunologici) o di biologia molecolare (ibridazione, reazione a catena della polimerasi).

Colture cellulari

Le linee cellulari da utilizzare sono diverse per i diversi tipi di virus. Sono classificabili in tre gruppi: cellule di primo espianto, linee cellulari continue e cellule diploidi.

Le cellule vengono fatte crescere su supporti solidi (fiasche) in plastica speciale per colture cellulari di dimensioni variabili da $12,5\text{ cm}^2$ sino a 175 cm^2 , o in "roller" (fiasche tonde in rotazione continua) da 500 cm^2 (le cellule possono essere anche coltivate in tubi, in piastre da 2 a 96 pozzetti

o in capsule di Petri in genere da 45 a 90 mm di diametro).

I monostrati cellulari ad intervalli regolari e variabili, secondo le diverse linee cellulari, devono essere separati nelle loro singole cellule da utilizzare per la preparazione di altri monostrati cellulari.

I campioni comunque concentrati presentano una notevole quantità di batteri che debbono essere eliminati prima dell'inoculo su cellule.

Inoculare 0,5 mL di campione per fiasche da 25 cm² ed aggiungere uguale volume di terreno di mantenimento (diluizione finale 1:2). La quantità di campione che può essere inoculato su monostrati cellulari dipende strettamente dalla tossicità del campione ed in alcuni casi è consigliabile ricorrere a diluizioni superiori (1:7-1:10).

L'isolamento su monostrato cellulare può essere effettuato, dopo inoculo del campione sul monostrato cellulare e successivo adsorbimento del virus, aggiungendo terreno per colture cellulari in soluzione liquida o addizionato ad agar.

Isolamento di virus che non provocano effetto citopatico: sistemi immunologici e tecniche di biologia molecolare

Alcuni virus, come l'Epatite A, crescono con estrema difficoltà e con tempi di incubazione lunghi anche diverse settimane.

Questi possono essere messi in evidenza con tecniche immunologiche di immunofluorescenza diretta o indiretta, "radio-immuno focus assay" (RIFA) (richiede la marcatura radioattiva dell'anticorpo) e tecniche immunoenzimatiche (ELISA) dove l'anticorpo specifico verso un determinato antigene è adeso alla fase solida (piastre per "test" ELISA a 96 pozzetti).

Ogni "test" deve sempre comprendere controlli negativi (cellule non infettate) e controlli positivi (cellule infettate con ceppi virali noti di laboratorio).

Un'altra possibilità per identificare questi virus è fornita dalle tecniche di biologia molecolare, applicabili sia al campione concentrato che dopo passaggio su cellule.

Tali sistemi comprendono le sonde molecolari o "probes" sia a DNA sia a RNA ("test" di ibridazione) e la reazione a catena della polimerasi ("Polymerase Chain Reaction", PCR).

Idrocarburi totali

Procedura analitica

L'isolamento degli idrocarburi verrà effettuato tramite un bagno ad ultrasuoni. 40 gr di campione fresco dovranno essere posti in una provetta da centrifuga di 100 ml con sodio solfato e 50 ml di n-pentano. Il tutto verrà posto in un bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. La temperatura del bagno non dovrà superare i 50°C per evitare il riscaldamento ad opera degli ultrasuoni. In seguito si procederà alla centrifugazione della miscela e verrà prelevato il sopranatante, che sarà poi concentrato fino ad un volume di 500 microlitri per l'analisi cromatografica.

Le analisi saranno eseguite mediante un gas cromatografo Shimadzu GC14A, con rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e con colonne capillari di silice fusa a fase legata del tipo ZB624 lunghe 30 m; lo spessore del film è di 0,5 micron ed il diametro interno di 0,53 mm. Il gas di trasporto è l'elio con una pressione in testa alla colonna di 20 psi. La temperatura del rivelatore sarà di 250°C. Il forno sarà tenuto a 50°C per 3 minuti, quindi la temperatura sarà portata a 200°C con un aumento di 8°C al minuto.

La determinazione degli idrocarburi sarà effettuata confrontando le risposte con quelle di standard più puri (Supelco TM). Il risultato sarà derivato dalla somma di tutti gli idrocarburi determinati e quantificati. Il "black" sarà valutato utilizzando 5 replicati (in tempi diversi) e sottoposto ad estrazione con le fasi usuali. I recuperi saranno calcolati tramite addizione di quantità note di standard su replicati omogenei dello stesso campione (metodo delle addizioni) effettuate prima dell'estrazione; i recuperi previsti saranno superiori al 90%.

La determinazione degli idrocarburi sarà effettuata confrontando le risposte con quelle di standard più puri (Supelco TM). Il risultato sarà derivato dalla somma di tutti gli idrocarburi determinati e quantificati. Il "black" sarà valutato utilizzando 5 replicati (in tempi diversi) e sottoposto ad estrazione con le fasi usuali. I recuperi saranno calcolati tramite addizione di quantità note di standard su replicati omogenei dello stesso campione (metodo delle addizioni) effettuate prima dell'estrazione; i recuperi previsti saranno superiori al 90%.

IPA

Procedura analitica

Il metodo prevede una saponificazione seguita da una estrazione con una soluzione di cicloesano: metanolo. La purificazione verrà eseguita su gel di silice.

La determinazione quali-quantitativa verrà eseguita mediante cromatografo liquido (HPLC) con rivelatore spettrofotometrico a fluorescenza o di assorbimento nell'UV.

In alternativa al cromatografo liquido (HPLC), ove le concentrazioni lo permettano, potrà essere utilizzata la gas-cromatografia con colonna capillare, con rivelatore FID o accoppiato con uno spettrometro di massa.

Indipendentemente dalle apparecchiature utilizzate per le misure, nel rapporto di analisi verranno specificati il limite di rilevabilità della metodica utilizzata e le percentuali di recupero dei singoli elementi (accuratezza) rispetto a matrici certificate.

Procedimento

Verranno pesati g 10 di sedimento in un pallone da 100 ml con collo smerigliato aggiungendo 30 ml di potassa alcolica (KOH 2N in metanolo). Verrà agitato per 15 minuti e successivamente messo a refluire su di un bagnomaria a 80°C per due ore.

Il contenuto sarà trasferito in un provettone da centrifuga e si effettuerà una prima estrazione aggiungendo 40 ml di cicloesano con 20 ml di una miscela composta da metanolo:acqua estratta 4:1. Si disporrà in agitatore per 15 minuti e si centrifugherà a 1200 giri per altri 15 minuti.

Il surnatante sarà prelevato e passato su di una colonna (20 mm di diametro) riempita con solfato di sodio (circa 20 g) raccogliendo l'eluato in una beuta da 150 ml.

Si effettueranno altre tre estrazioni con 25 ml di cicloesano.

Si concentrerà a piccolo volume e si trasferirà in un cilindro graduato da 300 ml con tappo a smeriglio usando etere di petrolio fino ad avere un volume totale di 10 ml. Successivamente si aggiungeranno 10 ml di soluzione reagente tetrabutylammonio solfito (il TBA solfito viene preparato sciogliendo 3,39 g di tetrabutylammoniosolfato in 100 ml di acqua estratta e si estrae con 20 ml di diclorometano per tre volte; gli estratti vengono saturati con 25 g di sodio solfito).

Si dibatterà per 2 minuti e si lascerà separare riprendendo il surnatante. Verranno effettuate altre tre estrazioni con 15 ml di etere di petrolio 40°-60°.

Dopo aver concentrato a piccolo volume si trasferirà quantitativamente su una colonna cromatografica (10 mm di diametro con rubinetto in teflon e serbatoio) in cui verranno caricati 5 g di gel di silice (disattivato al 15%) e si eluirà con 75 ml di n-esano. Si porterà a secco e si riprenderà con 2 ml di acetonitrile.

La determinazione verrà condotta su di HPLC con rivelatore a fluorescenza.

La fase della colonna è una C18 (25 cm x 4,6 mm i.d.). L'eluizione avverrà mediante un gradiente binario acqua/acetonitrile (60-100% in 30 minuti) ad un flusso di 1,5 ml/min.

La determinazione qualitativa verrà effettuata sulla base del tempo di ritenzione, cioè del tempo di ritenzione relativo o dell'indice di ritenzione.

Le concentrazioni saranno espresse in mg/kg rispetto al peso secco. Il limite di determinazione è di 0,001 mg/kg per singolo idrocarburo.

Pesticidi organoclorurati

Procedura analitica

Le analisi del campione saranno condotte in ambiente pulito e secondo le norme di buona pratica di laboratorio per l'analisi di composti organici in tracce.

I reagenti usati saranno di grado RPE (puri per analisi di pesticidi).

Principio del metodo

- Estrazione con miscela acetone + etere di petrolio.
- Purificazione con TBA e colonna cromatografica di Florisil.
- Determinazione con Gascromatografia capillare e Rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

Estrazione

10-30 g di campione essiccato saranno posti in una provetta da centrifuga da 250 ml con tappo a vite e guarnizione rivestita in PTFE.

Saranno aggiunti 100 ml di miscela acetone + esano (1:1 v:v) e agitando per 2 minuti. Verranno aggiunti 20 ml di acqua estratta con CH_2Cl_2 e 3 g di Na_2SO_4 agitando per 50 minuti.

La fase organica sarà separata per centrifugazione, sarà rimossa e filtrata su colonna di 25 g di sodio solfato anidro (200 x 20 mm d.i.) e successivamente il sedimento sarà raccolto in beuta. Il sedimento verrà estratto ancora con 2 x 50 ml di esano. La colonna di sodio solfato verrà lavata con 4 x 5 ml di etere di petrolio.

Gli eluati saranno raccolti e concentrati a secco con rotavapor (40°C; pressione ridotta).

Rimozione dello Zolfo

Il residuo proveniente dal rotavapor e ripreso con 10 ml di esano verrà addizionato con 5 ml di alcool isopropilico e 10 ml di una soluzione di tetrabutylammonio idrogeno solfato (tale soluzione viene preparata sciogliendo 3,39 g di tetrabutylammoniosolfato in 100 ml di acqua estratta e si estrae con 20 ml di diclorometano per tre volte; gli estratti vengono saturati con 25 g di sodio solfito).

La soluzione verrà dibattuta energicamente a mano per 1 minuto. Verranno addizionati 50 ml di acqua estratta dibattendo ancora per 3 minuti. La fase organica verrà filtrata su colonna di Na_2SO_4 e raccolta in beuta; la soluzione residua verrà ancora estratta con 2 x 10 ml di n-esano e le fasi organiche raccolte insieme verranno portate a secco con rotavapor.

Purificazione

Il residuo derivante dal trattamento per la rimozione dello zolfo verrà recuperato con 1 x 3 ml di n-esano e trasferito su una colonna di Florisil.

Una colonna cromatografica sarà preparata a secco (vetro 300 x 10 mm d.i., con rubinetto in PTFE) con 2,5 g di Florisil (60-100 mesh, attivato a 130°C per una notte) ricoperto con uno strato di 1 cm di sodio solfato anidro.

La colonna sarà lavata con 3 x 5 ml di etere di petrolio scartando i lavaggi.

L'estratto grezzo sarà trasferito quantitativamente sulla colonna effettuando lavaggi della beuta con 3 x 1 ml di etere di petrolio 40-60°.

la colonna sarà eluita con:

- 1) 30 ml di n-esano;
- 2) 25 ml di n-esano:toluene (80:20);
- 3) 30 ml di n-esano:toluene:etile acetato (80:19:1).

I tre eluati saranno raccolti in tre beute da 100 ml.

Ciascun eluato sarà concentrato a piccolo volume con rotavapor e poi a secco per rotazione manuale. Verrà ripreso con 1 ml di isoottano e iniettato.

Determinazione Gas Cromatografica

Verrà condotta con Gascromatografo equipaggiato con Rivelatore a cattura di elettroni (ECD) e colonne capillari di idonea fase stazionaria.

Per la conferma, verranno utilizzate due diversi tipi di colonne. Si citano ad esempio:

- DB1 (15 m x 0,53 mm d.i. x 1,5 μ m di spessore del film);
- DB 1701 (15 m x 0,53 mm d.i. x 1 μ m di spessore del film);
- OV 1 (50 m x 0,32 mm d.i. x 0,17 μ m di spessore del film);
- Ultra 2 (25 m x 0,32 mm d.i.).

L'identificazione verrà condotta per confronto con i tempi di ritenzione ottenuti iniettando, nelle stesse condizioni, soluzioni standard di composti (ossia soluzioni a titolo noto).

Verranno determinate le concentrazioni dei composti identificati, confrontando le altezze o le aree con quelle dei picchi ottenuti iniettando quantità note dei composti standard e tenendo conto delle diluizioni effettuate. Verranno condotte prove in bianco con i reattivi.

Verranno inoltre condotte prove di recupero dell'intera procedura con le soluzioni standard al fine di verificare le prestazioni del metodo.

Allo stesso scopo verranno, infine, condotte prove di confronto con materiali di riferimento certificati.

Azoto totale

Procedura analitica

Per ottenere una valutazione dell'azoto totale, una quantità nota (1-2 gr) sarà posta in un provettone insieme alla miscela digerente. La mineralizzazione sarà quindi effettuata tramite un sistema di digestione automatica per il quale sarà impostato il seguente programma di temperatura:

1 – 60 minuti a 120°C

2 – 60 minuti a 200°C

3 – 120 minuti a 360°C

dopo il raffreddamento, 50 ml di acqua distillata e 50 ml di idrossido di sodio 35%p saranno aggiunti al provettone, che sarà poi sottoposto a distillazione in corrente di vapore con un sistema automatico. Il distillato sarà raccolto in una beuta contenente 25 ml di acido borico 40 gr/l e alcune gocce di indicatore misto (rosso metile-blu dimetilene) e titolato con acido solforico 0,02 N.

Fosforo totale

Procedura analitica

Per la determinazione del fosforo totale, 1 g di campione di sedimento verrà messo in una beuta di 100 ml, aggiungendo 10 ml di HNO₃ e 2 ml di HClO₄. Una volta avvenuta la digestione

sarà fatta evaporare la soluzione fino alla scomparsa dei fumi bianchi. A questo punto verranno aggiunti 0,5 ml di H_2SO_4 2,5 M e 20 ml di acqua e, portato ad ebollizione, sarà lasciato raffreddare e sarà filtrato portando a volume di 100 ml. Sarà trasferita un'aliquota di soluzione in matraccio da 100 ml, sarà aggiunta una goccia di fenoltaleina e idrossido di sodio 2 M fino a leggera colorazione rosa e sarà portato a volume. In una serie di cilindri saranno introdotti rispettivamente 0,5, 10, 20, 30, 50 ml della soluzione standard diluita preventivamente preparata e sarà portato a volume di 100 ml. Saranno aggiunti 10 ml di reagente misto preventivamente preparato e sarà agitato. Dopo 10 minuti a temperatura ambiente sarà effettuata la misura fotometrica, alla lunghezza d'onda di 710 nm con spettrofotometro.

PCB

Procedura analitica

Per la determinazione delle concentrazioni di policloro bifenili, aliquote variabili da 5 a 10 g di materiale secco saranno sottoposte a digestione alcalina (KOH 1 N in etanolo) per 1 h; l'estratto sarà poi trasferito in normal-esano. L'estratto sarà quindi purificato in colonna cromatografica impaccata con gel di silice. L'eluato verrà concentrato a 5 ml e, dopo purificazione con acido solforico e lavaggio con acqua, verrà utilizzato per la determinazione dei PCB.

Le analisi saranno eseguite utilizzando un gas cromatografo, con rilevatore a cattura di elettroni, colonna capillare di silice fusa a fase legata del tipo lunghe 30m. Lo spessore del film sarà di 25 micron ed il diametro interno di 0,2 mm. Il gas di trasporto sarà l'elio con rapporto di splittaggio 50/1. La temperatura dell'iniettore sarà di 200°C, la temperatura del rilevatore sarà di 370°C. Il forno sarà tenuto a 100°C per 10 minuti, quindi la temperatura sarà portata 280 °C con un aumento di 5 gradi al minuto.

La determinazione dei congeneri dei PCBs sarà eseguita confrontando i picchi ottenuti con quelli di miscele standard. Il "bianco" sarà valutato utilizzando 5 campioni (in tempi diversi) e sottoposto ad estrazione con le fasi usuali. I recuperi saranno valutati con il metodo delle addizioni.

Metalli pesanti

Procedura analitica

Il metodo prevede la digestione totale del sedimento mediante mineralizzazione con miscela di acidi forti, a caldo, in un sistema chiuso, a microonde.

Il contenuto dei metalli è determinato per spettrofotometria ad assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma o termoelettrica. Per il mercurio si utilizza la tecnica dello strippaggio con vapori freddi previa riduzione del metallo con soluzione di cloruro stannoso. In alternativa all'assorbimento atomico potrà essere utilizzata la spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP – AES) o altre tecniche ugualmente valide in accordo con la letteratura corrente.

Indipendentemente dalle apparecchiature utilizzate per le misure, nel rapporto di analisi verranno specificati il limite di determinazione della metodica utilizzata e le percentuali di recupero (accuratezza) dei singoli metalli rispetto a sedimenti marini certificati.

Si preleveranno campioni omogenei e rappresentativi per ogni subcampione.

Per il tempo intercorrente tra il prelievo e l'analisi, il campione verrà conservato ad una temperatura inferiore a 4°C, utilizzando contenitori di polietilene non contaminati.

La metodica analitica sarà in grado di determinare concentrazioni nel campione di sedimento secco (mg/kg p.s.) almeno fino a:

Al 1000 mg/kg p.s.

As 0.5 mg/kg p.s.

Cd 0,05 mg/kg p.s.

Cr 1 mg/kg p.s.

Cu 1 mg/kg p.s.

Fe 1000 mg/kg p.s.

Hg 0,05 mg/g p.s.

Ni 1 mg/g p.s.

Pb 1 mg/g p.s.

V 10 mg/g p.s.

Zn 1 mg/g p.s.

Reagenti principali per la digestione (acidi ultrapuri)

- Acido nitrico 65%.
- Acido cloridrico 37%.
- Acido fluoridrico 50%.
- Acido borico.
- Acqua ultrapura.

La procedura di analisi consta di tre distinte operazioni; 0,5 g del campione di sedimento tal quale verranno trasferiti nell'apposito contenitore, tolti manualmente eventuali corpi grossolani superiori a 0,5 centimetri.

Verranno addizionati 3 ml di HCl e 9 ml di HNO₃ per poi lasciare riposare 15-20 minuti.

Verranno aggiunti 2 ml di HF, per poi lasciare riposare per 15-20 minuti e ripetere il ciclo di mineralizzazione.

Dopo il raffreddamento verranno aggiunti 30 ml di soluzione satura di H₃BO₃, trasferendo poi la soluzione in contenitore tarato portando a volume (V) con acqua ultrapura.

La procedura verrà eseguita in doppio per ogni campione.

La prova in bianco verrà effettuata con le stesse modalità operative sulla soluzione composta da 3 ml di HCl e 9 ml di HNO₃ e 2 ml di HF.

I diversi elementi saranno misurati con differente modalità a seconda delle concentrazioni attese e del tipo di elemento. Tale informazione verrà riportata nella descrizione della metodica utilizzata.

Tutte le procedure di digestione ed analisi saranno ripetute su campioni certificati.

Calcoli

Per il calcolo sarà utilizzata la seguente espressione:

$$C = A \cdot D \cdot V / M$$

dove:

C = contenuto del metallo nel sedimento, espresso in mg/kg peso secco

A = concentrazione del metallo nella soluzione del campione, espressa in mg/L

D = fattore di diluizione (D = 1, se la soluzione in esame non è stata diluita)

V = volume finale espresso in millilitri

M = massa del campione espressa in grammi di peso secco

I risultati finali verranno espressi in mg/kg peso secco.

I risultati così ottenuti saranno riferiti ad 1 kg di sostanza secca a 105°C, previa determinazione gravimetrica del contenuto di umidità residua, come indicato dal D.M. 185 del 13/09/99 "Approvazione dei metodi ufficiali per l'analisi chimica del suolo" (Metodo II.2). Le pesate per ottenere il valore di umidità (almeno in doppio) verranno eseguite contemporaneamente a quella per la determinazione dei metalli.

Per quello che riguarda il Mercurio verrà utilizzato il metodo IRSA 1985.

La mineralizzazione del campione, data la facile volatilizzazione del mercurio, viene eseguita riscaldando a riflusso con miscela solfonitrica il pallone munito di refrigerante a ricadere. A tale scopo da 2.0 a 4.0 g di fango, essiccato all'aria, vengono posti in pallone da 100 ml a collo smerigliato cui si aggiungono 10 ml di miscela solfonitrica (10.6.6) ed alcune palline di vetro. Si innesta il refrigerante, si lascia a temperatura ambiente per circa 15 minuti, si lascia raffreddare il pallone e dall'alto del refrigerante si aggiungono 30-40 ml di acqua. Si porta nuovamente ad ebollizione per scacciare gli ossidi d'azoto e si fa bollire per 20 minuti. Si lascia raffreddare, si lava con poca acqua il refrigerante, si travasa tutto in pallone graduato da 100 ml e si porta a volume. Si filtra e si prelevano parti aliquote (10-20 ml) a seconda del contenuto in mercurio e si effettua il dosaggio previa riduzione a mercurio metallico, seguendo le modalità indicate nel citato manuale (IRSA, 1972).

Composti organostannici

Procedura analitica

Il trattamento del campione deve essere eseguito nel minor tempo possibile poiché i sali dei composti organostannici presenti nei campioni non sono stabili in ambiente acido e in presenza di luce. Pertanto è opportuno non interrompere la procedura prima della derivatizzazione, e comunque terminare il trattamento del campione entro una giornata lavorativa.

Estrazione

Una quantità da 0,1 a 0,5 g di campione viene posta in un tubo da centrifuga. Si aggiunge una quantità nota di tripropilistagno cloruro (la concentrazione di tale composto nella soluzione derivante dal trattamento del campione, su cui si effettua la determinazione analitica, deve essere simile a quella degli analiti da determinare).

Si aggiungono in sequenza 15 ml di una soluzione metanolica allo 0,03% di tropolone e 1 ml di acido cloridrico concentrato. Il campione viene posto in bagno ad ultrasuoni per 15 minuti, quindi si raccoglie l'estratto dopo centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti. Si ripete l'estrazione sul campione residuo e si riuniscono gli estratti in un imbuto separatore.

Cambiamento del solvente

Agli estratti si aggiungono 100 ml di una soluzione acquosa di cloruro di sodio al 5% (serve per minimizzare la possibilità che si formino delle emulsioni) e 15 ml di diclorometano. Si agita per

qualche minuto (l'agitazione non deve essere violenta poiché favorisce la formazione di emulsioni, specialmente nel caso di campioni ricchi di grassi, e quindi rende difficile la separazione delle fasi) e dopo la separazione si raccoglie la fase organica in un pallone a cuore, facendola passare attraverso un filtro di solfato di sodio.

Si ripete l'estrazione con un'altra aliquota di 15 ml di diclorometano. Agli estratti si aggiungono 0,5 ml di isoottano. L'estratto viene concentrato fino ad un volume di circa 1 ml in un evaporatore rotante, ad una temperatura non superiore a 35°C e sotto vuoto moderato (si deve evitare l'ebollizione del solvente). Viene quindi trasferito quantitativamente in un tubo di reazione da 12 ml, lavando le pareti del pallone a cuore con 2 ml di diclorometano ed 1 ml di isoottano ed infine ulteriormente concentrato fino ad un volume di circa 100 µl sotto leggerissimo flusso di azoto.

Derivatizzazione

Si aggiunge 1 ml di pentilmagnesio bromuro 2 M in etere etilico, si chiude il tubo con il tappo teflonato, e si lascia procedere la reazione per 15 minuti agitando saltuariamente. A questo punto si elimina l'eccesso di reattivo aggiungendo cautamente, goccia a goccia, dell'acqua distillata sino ad un volume massimo di 2 ml. La reazione del reattivo di Grignard con l'acqua è abbastanza violenta e porta l'etere ad ebollizione.

Bisogna quindi porre molta attenzione nelle aggiunte delle gocce di acqua, e comunque si deve evitare che la soluzione vada a secchezza a causa dell'evaporazione dell'etere. A tal fine prima dell'evaporazione completa si aggiunge 1 ml di esano. A questo punto si aggiungono 5 ml di una soluzione acquosa di acido solforico 1 M, per eliminare ogni traccia del reattivo di Grignard, e si agita per qualche minuto.

Dopo un tempo sufficiente per la separazione delle fasi si recupera la fase organica, e si ripete l'estrazione della fase acquosa con un'altra aliquota di 1 ml di esano.

Ai due estratti riuniti in un tubo di reazione si aggiungono 3 ml di una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio 0,1 M. Si agita, si elimina la fase acquosa e si ripete il lavaggio (tale lavaggio ha lo scopo di eliminare sostanze, come per esempio polialcoli, che interferirebbero nella fase di purificazione). La fase organica, quindi, si trasferisce in una fiala e si concentra, per evaporazione sotto un debole flusso di azoto, sino ad un volume di 0,5 ml.

Purificazione

Si prepara una colonnina di purificazione riempiendola con 3 g di gel di silice, e ponendo in

testa uno strato da 1 cm di solfato di sodio. Prima dell'eluizione del campione si fanno passare in colonna 2 ml della soluzione eluente, che è una miscela di esano e toluene 1:1 (tale trattamento ha lo scopo di eliminare i siti più attivi della fase adsorbente con le tracce di acqua contenute nei solventi). Successivamente l'estratto viene trasferito in testa alla colonna ed eluito prima con 3 aliquote di 1 ml della soluzione eluente con cui si è effettuato il lavaggio della fiala contenente l'estratto, e successivamente con altri 5 ml di eluente. L'eluato raccolto viene concentrato ad un volume di circa 1 ml sotto debole flusso di azoto.

Analisi mediante GC-FPD

Per l'analisi in GC-FPD si impiega una colonna capillare in silice fusa di 30 m di lunghezza e 0,53 mm di diametro interno, con una fase legata metilsiliconica di spessore pari a 1,5 μm (megabore DB1 della J&W Scientific o equivalente). I gas utilizzati come combustibile, comburente, gas di trasporto e come make-up sono, rispettivamente, idrogeno, aria, elio e azoto. Il volume di campione da iniettare è di 2 ml, e le condizioni operative dello strumento utilizzato (Varian 3600) sono:

Flussi:

- idrogeno: 130 ml/min
- aria 1: 83 ml/min
- aria 2: 173 ml/min
- carrier (elio): 20 ml/min
- carrier + make up (azoto): 33 ml/min.

Temperature:

- iniettore: 240°C
- rivelatore: 240°C

La temperatura iniziale sarà di 80°C mantenuta per un minuto, innalzamento della temperatura fino a 280°C con una velocità di 10°C/min, temperatura finale 280°C mantenuta per tre minuti. La quantità minima quantificabile è dell'ordine di 20 pg di composto (come stagno) iniettato, mentre il campo di linearità arriva sino ad una quantità iniettata pari a circa 400 pg.

L'analisi quantitativa viene eseguita con il metodo della curva di calibrazione nell'intervallo di linearità della risposta.

Analisi mediante GC-MS

Per l'analisi in GC-MS si utilizza una colonna capillare lunga 25 m e con un diametro interno di 0,20 mm, con una fase legata metil-5% fenilsiliconica di spessore pari a 0,25 μm (DB 5 della J&W Scientific o equivalente). Il rivelatore è a selezione di massa a quadrupolo con ionizzazione ad impatto elettronico da 70 eV. La rivelazione degli analiti viene effettuata mediante monitoraggio a singolo ione (SIM). Il gas utilizzato come gas di trasporto è l'elio. Il volume di campione da iniettare è di 1 ml, e le condizioni operative dello strumento utilizzato (HP-5980, MS HP 5970) sono:

Pressione del gas di trasporto in testa alla colonna: 120 KPa.

Temperature:

- iniettore (splitless): 240°C
- "transfer line": 280°C

Programma di temperatura: temperatura iniziale di 80°C mantenuta per un minuto, innalzamento della temperatura fino a 280°C con una velocità di 10°C/min, temperatura finale 280°C mantenuta per tre minuti.

Programma di acquisizione dati SIM (selected ions monitoring)

La quantità minima quantificabile è dell'ordine di 3 pg di composto (come stagno) iniettato, mentre il campo di linearità arriva sino ad una quantità iniettata pari a circa 1000 pg.

L'analisi quantitativa viene eseguita con il metodo della curva di calibrazione nell'intervallo di linearità della risposta. Per ogni composto le curve di calibrazione sono costruite riportando sulle ascisse la concentrazione delle soluzioni standard, impiegate per costruire le stesse curve, e sulle ordinate il rapporto tra l'area del picco cromatografico del composto rispetto all'area del picco dello standard interno.

Cianuri

Procedura analitica

Determinazione spettrofotometrica manuale

50 ml di campione verranno pipettati in un pallone volumetrico da 100 ml.

Alla soluzione saranno aggiunti 15 ml di sodio fosfato 1M e sarà mescolata, quindi saranno aggiunti 2 ml di cloroammina-T e sarà mescolata nuovamente. Un minuto dopo l'aggiunta di cloroammina-T si effettuerà un test del cloro tramite carta di KI-amido. Se il test risulterà negativo

si aggiungerà 0,5 ml cloroammina-T. Dopo un minuto sarà effettuato un altro controllo con carta di KI-amido. Si dovrà continuare ad aggiungere cloroammina-T con incrementi di 0,5 ml finché non si presenta un eccesso. Dopo 1-2 minuti dovranno essere aggiunti 5 ml di soluzione acida di piridina-barbiturica per poi mescolare. Il tutto dovrà essere diluito a 100 ml con acqua e di nuovo mescolato. Dopo 8 minuti per lo sviluppo del colore, si leggerà l'assorbanza a 578 nm in un cella di 1 cm per 15 minuti. La concentrazione di idrossido di sodio sarà 0,125 N.

Preparazione di una Curva Standard per campioni senza Solfuro:

Una serie di standard saranno preparati pipettando volumi adeguati di una soluzione di cianuro di potassio in un pallone volumetrico da 250 ml. Ad ogni pallone volumetrico saranno aggiunti 50 ml di idrossido di sodio 1,25 N e sarà diluito a 250 ml con acqua. Le soluzioni dovranno essere eseguite osservando la seguente tabella. La concentrazione di idrossido di sodio sarà 0,25 N.

mL di Soluzione Standard (1 mL = 10 µg CN ⁻)	Concentrazione (µg CN ⁻ /L)
0	blank
1.0	40
2.0	80
5.0	200
10.0	400
15.0	600
20.0	800

Quindi pipettare 50 mL di ciascuna soluzione standard in un pallone volumetrico da 100 mL e ripetere nuovamente il protocollo della determinazione spettrofotometrica manuale, così da ottenere valori di assorbanza con i quali verrà preparata una curva di calibrazione.

Le concentrazioni finali per questa curva standard corrisponderanno alla metà dei valori presenti nella tabella sovrastante (tra 20 a 400 µg/L).

Preparazione di una Curva Standard per campioni con Solfuro:

Tutti gli standard devono essere distillati col metodo delle “addizioni standard”.

Gli standard così ottenuti daranno una curva lineare soltanto a basse concentrazioni.

Si raccomanda che vengano distillati almeno cinque standard e devono essere preparati con una concentrazione simile a quella utilizzata nella “Preparazione di una Curva Standard per

campioni senza Solfuro” e analizzati mediante il protocollo della “determinazione spettrofotometrica manuale”.

Preparare quindi una curva di calibrazione plottando l'assorbanza verso la concentrazione dei cianuri.

Calcoli

Utilizzando il metodo spettrofotometrico è necessario poi calcolare la concentrazione dei cianuri, in µg/L, nel modo seguente:

$$CN^- (\mu g/L) = \frac{A \times B \times C}{D \times E}$$

dove:

A = µg/L di CN⁻ letto dalla curva standard

B = mL di campione dopo la preparazione per l'analisi colorimetrica (raccomandati 100mL)

C = mL di campione dopo la distillazione (raccomandati 250mL)

D = mL di campione originale per distillazione (raccomandati 500mL)

E = mL usati per l'analisi colorimetrica (raccomandati 50 mL)

4. MONITORAGGIO DEI SEDIMENTI REFLUITI IN COLMATA

In questa fase verranno effettuate le attività necessarie ad accertare in corso d'opera l' idoneità fisico-chimico-biologica dei sedimenti dragati che andranno refluiti in colmata come stabilito dal D.M. 24.01.1996 e ss.mm.ii., secondo le modalità indicate nella lettera a) delle attività di monitoraggio indicate nel manuale delle attività operative approvato dal Ministero dell' Ambiente per il monitoraggio dell' ambiente marino di cui al Dec. V.I.A. 2935/1997.

4.1 Operazioni in mare

Il campionamento dei sedimenti per la caratterizzazione verrà effettuato direttamente dalla draga.

In particolare verranno prelevati n° 40 (quaranta) campioni, su cui verranno condotte le analisi chimiche, fisiche e microbiologiche, così come previsto dal DM 24 gennaio 1996, Allegato B1 "Materiali di Dragaggio Portuale" per quanto attiene alla caratterizzazione dei sedimenti provenienti da attività di dragaggio portuale, e sulla base delle linee guida individuate dal 'Manuale per la Movimentazione dei Sedimenti Marini' (APAT-ICRAM) nell'ambito della movimentazione e gestione dei sedimenti provenienti da attività di dragaggio portuale.

4.1.1 Modalità di campionamento

Il campionamento di sedimenti verrà effettuato da operatori tramite campionatori a mano, come ad esempio dei liner, o comunque tramite idonea strumentazione "leggera", tramite cui effettuare il campionamento dei sedimenti superficiali al fine di ottenere un campione medio.

Ciascun campione, sarà prelevato dallo strumento con una spatola di acciaio decontaminata, sarà omogeneizzato e successivamente conservato in appositi contenitori, etichettati e datati.

Per ogni punto di prelievo verrà compilata una scheda di campionamento dove riportare i dati inerenti il punto (nome della stazione, data e ora, coordinate effettive del punto di prelievo, strumentazione utilizzata, spessore del sedimento), il numero e la sigla dei campioni prelevati ed infine la descrizione macroscopica del campione (caratteristiche fisiche, colore, odore, grado di idratazione, presenza di resti vegetali o frammenti conchigliari, eventuali variazioni cromatiche e

dimensionali).

4.1.2 Conservazione dei campioni

Per ciascun campione la quantità di materiale prelevata sarà tale da poter essere suddivisa in due aliquote, delle quali una verrà destinata all'esecuzione delle analisi fisiche, chimiche, microbiologiche e l'altra conservata (da -18°C a -25°C) per le eventuali controanalisi e verifiche.

Le operazioni di subcampionamento saranno effettuate preferibilmente in nave subito dopo il prelievo, in modo da limitare eventuali fenomeni di rimescolamento e contaminazione.

I subcampioni di sedimento così ottenuti saranno conservati in contenitori appositi in funzione delle analisi a cui devono essere sottoposti.

Le operazioni di laboratorio e le analisi a cui saranno sottoposti saranno le stesse riportate nel capitolo 3.

5. TRATTAMENTO E RESTITUZIONE DEI DATI

I risultati derivati dalle diverse attività di ricerca e monitoraggio saranno raccolti in relazioni tecniche dettagliate. I dati delle stazioni di monitoraggio fisse saranno elaborati e processati dal personale del Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina della Toscana, che provvederà a trasmetterli al Centro di Elaborazione Dati dell'Autorità Portuale, dove, con il supporto scientifico del Laboratorio stesso è stato implementato un Portale Informatico, sul quale sarà possibile visualizzare i dati storici, acquisiti durante i monitoraggi precedentemente effettuati dall'Autorità Portuale, nonché i dati dell'attuale monitoraggio.

I risultati provenienti dall'analisi e dalla caratterizzazione delle diverse matrici ambientali considerate saranno raccolti in rapporti tecnici dettagliati.

Tutti i dati raccolti, durante le attività di cantiere, saranno inoltre raccolti in un database informatico organizzato, messo a punto dal Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina, che verrà messo a disposizione dell'Autorità Portuale di Civitavecchia.