

EDITORIALE

Il "Notiziario dei Metodi Analitici" propone in questo numero tre metodi chimici e due metodi microbiologici, frutto dell'attività dei Gruppi di lavoro "Metalli" e "Metodi microbiologici" che in questi ultimi quattro anni hanno lavorato - insieme ai gruppi "Campionamento", "Qualità del dato analitico", "Cromatografia ionica" e "Microinquinanti organici" - alla revisione e aggiornamento delle metodologie IRSA pubblicate nel quaderno n. 100 "Metodi analitici per le Acque".

L'attività dei suddetti gruppi si è da poco conclusa e le bozze dei nuovi metodi, unitamente a quelle relative a metodi già pubblicati ma che hanno richiesto rielaborazioni marginali, sono state trasmesse per la pubblicazione all'Agenzia Nazionale di Protezione Ambientale. Infatti è a quest'organo che spetta il compito, sulla base del disposto del D.L.152/99, di aggiornare i metodi analitici di riferimento da impiegare nelle operazioni di controllo e tutela delle acque dall'inquinamento.

Tra i metodi chimici presentati, segnaliamo un metodo per la determinazione dell'antimonio che impiega la spettrometria di assorbimento atomico con formazione di idruri. Con questa tecnica è possibile conseguire prestazioni, in termini di precisione, accuratezza e sensibilità, adeguate al limite più restrittivo imposto dalla nuova direttiva europea, in corso di recepimento, concernente la qualità delle acque potabili (5 µg/L invece dei 10 µg/L previsti dal DPR 236/88 attualmente in vigore).

Tra i metodi microbiologici, grande attenzione è rivolta alla determinazione dell'Escherichia coli, parametro destinato a sostituire i coliformi fecali, finora utilizzati come indice di contaminazione fecale in tutte le normative italiane. La ricerca di Escherichia coli è già stata stabilita dal D.Lgs. n. 152/99, ma ad oggi non è stato indicato alcun metodo di riferimento. Vengono pertanto proposti alcuni metodi analitici, di nuova formulazione, specifici e diretti alla determinazione della specie, allo scopo di fornire uno strumento applicativo di riferimento per l'unificazione delle procedure di analisi.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, febbraio 2001

TRATTAMENTO PRELIMINARE DEI CAMPIONI PER L'ANALISI DEI METALLI MEDIANTE MINERALIZZAZIONE ACIDA\*

A cura di Camusso M.\*, Bettinelli M.\*\* e Spezia S.\*\*

\* Irsa - Cnr, Brugherio.

\*\* Enel produzione, Laboratorio di Piacenza, Piacenza.

RIASSUNTO

Viene descritto un metodo di trattamento mediante mineralizzazione acida in stufa (A) o forno a microonde (B) di campioni di acque naturali, superficiali e sotterranee, ed acque di scarico per portare in soluzione metalli colloidali od associati al particolato, prima di effettuare la determinazione analitica.

INDICE

TRATTAMENTO PRELIMINARE DEI CAMPIONI PER L'ANALISI DEI METALLI MEDIANTE MINERALIZZAZIONE ACIDA	1
DETERMINAZIONE DELL'ANTIMONIO (METODO PER SPETTROMETRIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO CON FORMAZIONE DI IDRURI)	8
DETERMINAZIONE DELLA SALINITÀ'	12
ESCHERICHIA COLI NELLE ACQUE: SIGNIFICATO SANITARIO E METODOLOGIE DI ANALISI	15
METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLE SPORE DI CLOSTRIDI SOLFITO-RIDUTTORI IN CAMPIONI DI SEDIMENTI, FANGHI DI DEPURAZIONE, SUOLO E PRODOTTI DI COMPOSTAGGIO	23
INFORMAZIONI	27

Il metodo è stato discusso e approvato dal gruppo di lavoro Metalli composto da: Campanella L. (Uni, Roma), Bettinelli M. (Enel Produzione, Laboratorio di Piacenza), Camusso M. (Irsa, Brugherio), Capri S. (Irsa, Roma), Falciani R. (CSM, Roma), Mastroianni D. (Irsa, Roma), Muccioli G. (Enichem, Ravenna), Perdicaro R. (Laboratorio Centrale di Idrobiologia, Roma), Petruzzelli D. (Irsa, Bari), Pettine M. (IRSA, Roma), Spezia S. (Enel Produzione laboratorio di Piacenza), Torcini S. (Enea, Roma).

## SUMMARY

This paper describes preliminary treatments by acid digestion for surface, ground and waste water samples before analytical determinations of metals. Acid digestion procedures in open and/or closed vessels on a hot-plate (A) or in a microwave system (B) are reported. Acid selection, calibration of the microwave unit, quality control and safety recommendations are also provided.

## A METODO DI MINERALIZZAZIONE ACIDA CONVENZIONALE

### 1- INTRODUZIONE

Campioni contenenti materiale particolato o sostanza organica richiedono un trattamento preliminare prima dell'analisi dei metalli. Con il termine *metalli totali* s'intende tutti i metalli che possono trovarsi nelle acque nelle forme solubili e colloidali, organiche ed inorganiche e nelle forme insolubili associate con il particolato. Si indica con *metallo sospeso* (o in *sospensione*): il metallo presente nella fase solida di un campione non acidificato trattenuta da un filtro avente porosità di 0,45 µm, mentre con *metallo estraibile con acido*: la concentrazione di un metallo in soluzione dopo trattamento di un campione non filtrato con acido. Per determinare il metallo *disciolto* (<0,45 µm) separatamente da quello *particolato* bisogna filtrare il campione subito dopo il prelievo. Questo trattamento può essere più o meno forte, secondo lo scopo delle indagini; ovviamente quanto più il trattamento è forte, tanto più la concentrazione del metallo estraibile con acido diventa prossima alla concentrazione del metallo totale.

### 2 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consiste in una digestione con acido concentrato a caldo in recipienti chiusi in stufa (o aperti sotto cappa) di campioni acquosi per portare in soluzione i metalli associati al particolato o presenti in forma colloidale e poter determinare i metalli totali in spettrometria di assorbimento atomico (FAAS - GFAAS), o di emissione in sorgente plasma (ICP-OES).

### 3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Si consiglia di utilizzare il metodo di digestione meno forte, che garantisca un recupero completo e compatibile con le tecniche analitiche da utilizzare a seconda del metallo in esame. La digestione con acido nitrico è la più adeguata per la maggior parte dei campioni e il nitrato costituisce una buona matrice per le diverse tecniche analitiche (GFAAS/FAAS/ICP-OES).

Alcuni campioni richiedono l'aggiunta di altri acidi (perclorico, cloridrico, solforico, fluoridrico) per una digestione completa. Poiché questi acidi possono interferire nell'analisi di alcuni metalli o costituire una scadente matrice per l'analisi, è necessario verificare la percentuale di recupero dei metalli per ogni procedura di digestione utilizzata.

In generale la digestione con il solo acido nitrico è consigliata per campioni puliti o per composti facilmente ossidabili, la miscela  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$  o  $\text{HNO}_3\text{-HCl}$  per la sostanza organica facilmente ossidabile; la miscela  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$  o  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HF}$  è necessaria per mineralizzare la sostanza organica refrattaria o i minerali (ad es. silice). Attualmente la tendenza è di utilizzare acido nitrico e cloridrico, od anche la miscela tra i due (acqua regia 1: 3 v/v  $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ ), mentre si tende a sconsigliare l'uso dell'acido perclorico per i rischi connessi con possibili esplosioni, e ad utilizzare l'acido fluoridrico in aggiunta ad altri acidi, quando necessario, facendo particolare attenzione nel maneggiarlo e indossando le protezioni necessarie alla sicurezza dell'operatore. L'utilizzo di contenitori chiusi ad alta pressione presenta alcuni vantaggi rispetto ai sistemi aperti, quali quelli di poter operare con minori volumi di acidi, di poter operare a temperature e pressioni più elevate di quella atmosferica, di diminuire il livello di contaminazione e di evitare la perdita di elementi volatili. Particolare attenzione deve essere rivolta al materiale con cui è fatto il contenitore, ad esempio con l'acido fluoridrico i contenitori non devono essere in vetro o quarzo. Si consiglia inoltre di utilizzare il minore volume possibile di soluzione acida, per minimizzare la contaminazione dei campioni da parte delle impurezze contenute negli acidi, e di preparare sempre dei bianchi di controllo (Kingston e Walter, 1992; Apha, 1995).

### 4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla sezione 1030 "Metodi di campionamento".

### 5 - APPARECCHIATURE

#### 5.1 - Vetreria di laboratorio

#### 5.2 - Piastra riscaldante o stufa dotata di controllo della temperatura e di temporizzatore

#### 5.3 - Contenitori chiusi per la digestione, singoli o in sistemi multiposto (Fig. 1)

## 6 - REATTIVI

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro e l'acqua utilizzata per la preparazione dei reattivi deve essere ad elevato grado di purezza (conducibilità <0.1µS/cm).

6.1-Acido nitrico concentrato di grado ultra puro (HNO<sub>3</sub>) (d=1,40 kg/L)

6.2-Acido cloridrico concentrato di grado ultra puro (HCl) (d=1,15 Kg/L)

## 7 - PROCEDIMENTO

### 7.1 Procedimento con il sistema chiuso

Per la mineralizzazione acida in un sistema chiuso sono utilizzati dei contenitori in PTFE o fluoropolimeri con coperchio, alloggiati in piastre metalliche multiple o camicie metalliche singole, dotate di valvole per la pressione (Fig.1). Prelevare, preferibilmente per pesata, e trasferire nel contenitore per la digestione 45 mL di campione acquoso, dopo averlo ben mescolato. Aggiungere 5 mL di HNO<sub>3</sub>. Chiudere il contenitore con il coperchio e controllare la valvola per il controllo della pressione, seguendo le istruzioni della casa produttrice. Preparare per ogni tornata di campioni anche dei bianchi (45 mL di acqua e 5 mL di acido), i campioni con le aggiunte e i campioni in doppio, secondo il protocollo del controllo di qualità. Porre il sistema in stufa a 95 °C per due ore. Lasciar raffreddare a temperatura ambiente ed aprire i contenitori sotto cappa. Trasferire i campioni digeriti in bottiglie di plastica, opportunamente lavate con acido; qualora si notasse presenza di precipitato lasciar sedimentare o filtrare il campione digerito.

### 7.2 - Procedimento con il sistema aperto

#### 7.2.1 - Mineralizzazione con acido nitrico

Agitare il campione e trasferire un volume adeguato (50-100 mL) in una beuta da 125 mL, aggiungere 5 mL di acido nitrico, riscaldare su una piastra e lasciar evaporare fino al minor volume possibile (10-20 mL). Continuare a riscaldare e ad aggiungere acido nitrico se necessario fino a che la mineralizzazione è completa, cioè fino ad ottenere una soluzione trasparente ed incolore. Non fare andare a secco. Trasferire la soluzione, dopo averla filtrata se necessario, in un matraccio tarato da 100 mL, aggiungere due successive aliquote di 5 mL di acqua con cui sono state lavate le pareti della beuta, lasciar raffreddare la soluzione e portare a volume con acqua. Per campioni a basse concentrazioni si consiglia di aumentare il volume iniziale di campione.

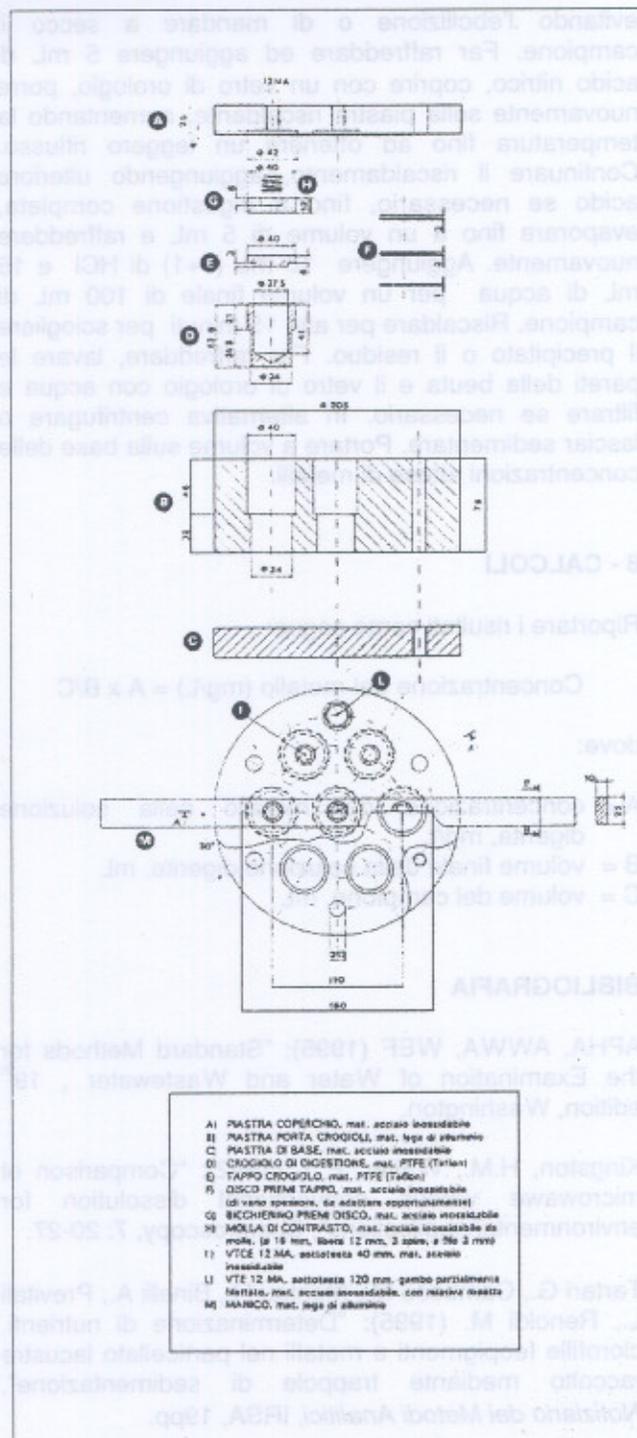


Fig. 1 - Piastra a 7 posti per crogioli in teflon utilizzata per la digestione del particellato per la determinazione dei metalli (Modello Seneco, Milano, su progetto Irsa)

#### 7.2.2 - Mineralizzazione con acido nitrico e cloridrico

Se fosse necessaria una mineralizzazione più forte, agitare il campione e trasferire un volume adeguato (50-100 mL) in una beuta da 125 mL, aggiungendo 3 mL di acido nitrico, riscaldare su una piastra e far evaporare il campione fino a un volume di 5 mL,

evitando l'ebollizione o di mandare a secco il campione. Far raffreddare ed aggiungere 5 mL di acido nitrico, coprire con un vetro di orologio, porre nuovamente sulla piastra riscaldante, aumentando la temperatura fino ad ottenere un leggero riflusso. Continuare il riscaldamento, aggiungendo ulteriore acido se necessario, fino a digestione completa, evaporare fino a un volume di 5 mL e raffreddare nuovamente. Aggiungere 10 mL (1+1) di HCl e 15 mL di acqua per un volume finale di 100 mL di campione. Riscaldare per altri 15 minuti per sciogliere il precipitato o il residuo. Far raffreddare, lavare le pareti della beuta e il vetro di orologio con acqua e filtrare se necessario. In alternativa centrifugare o lasciar sedimentare. Portare a volume sulla base delle concentrazioni attese di metalli.

## 8 - CALCOLI

Riportare i risultati come segue:

$$\text{Concentrazione del metallo (mg/L)} = A \times B/C$$

dove:

A = concentrazione del metallo nella soluzione digerita, mg/L

B = volume finale della soluzione digerita, mL

C = volume del campione, mL

## BIBLIOGRAFIA

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

Kingston, H.M., Walter, P.J. (1992): "Comparison of microwave versus conventional dissolution for environmental applications", *Spectroscopy*, 7: 20-27.

Tartari G., Camusso M., Muntau H., Binelli A., Previtali L., Renoldi M. (1995): "Determinazione di nutrienti, clorofille feopigmenti e metalli nel particolato lacustre raccolto mediante trappole di sedimentazione", *Notiziario dei Metodi Analitici*, IRSA, 19pp.

## B METODO DI MINERALIZZAZIONE ACIDA CON SISTEMA A MICROONDE

### 1 - INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni l'impiego delle microonde come sorgente di energia termica sta avendo una vastissima applicazione, sia in campo industriale che domestico. L'energia delle microonde copre uno spettro di frequenze varianti tra 300 e 300.000 MHz, mentre le frequenze normalmente usate nel campo industriale e scientifico variano tra i 900 e i 5000 MHz. La

frequenza più usata per i forni a microonde, che corrisponde anche alla frequenza utilizzata nei forni a microonde domestici, è di 2450 MHz. L'energia a microonde è una radiazione non ionizzante che provoca il movimento molecolare per migrazione degli ioni o rotazione dei dipoli, senza necessariamente causare cambi nella struttura molecolare.

Generalmente l'energia a microonde è assorbita dal campione mediante due meccanismi: la conduzione ionica e la rotazione dei dipoli. La conduzione ionica è la migrazione conduttiva degli ioni disciolti presenti nelle soluzioni sotto l'effetto di un campo elettromagnetico. Tale migrazione è influenzata da parametri quali la concentrazione e la mobilità degli ioni e la temperatura della soluzione. La rotazione dei dipoli consiste invece nell'allineamento delle molecole che hanno momenti di dipolo non nulli, sotto l'effetto di un campo magnetico. Ambedue questi meccanismi avvengono nella maggior parte dei casi simultaneamente. Inoltre, rispetto al riscaldamento tradizionale per conduzione, le microonde riscaldano contemporaneamente tutto il campione, senza riscaldare i contenitori utilizzati che sono di materiali trasparenti alle microonde. In tal modo le soluzioni raggiungono molto più rapidamente il proprio punto di ebollizione e il riscaldamento è molto più veloce ed efficace del sistema tradizionale (Zlotorzynski, 1995).

Nei laboratori analitici la possibilità di sviluppare calore controllabile in modo selettivo ha reso possibile le applicazioni delle microonde oltre che a trattamenti generali di riscaldamento, anche a processi di disidratazione rapida e alla determinazione analitica dell'umidità di campioni diversi, a reazioni chimiche delicate da condurre in breve tempo a temperatura controllata in modo riproducibile e a tecniche rapide per la preparazione dei campioni d'analisi.

I campi di applicazione attuali sono notevolmente ampi, e comprendono la preparazione dei campioni per l'analisi mediante spettrometria atomica o al plasma, polarografia ed altri metodi elettrochimici, mediante processi di solubilizzazione dei materiali inorganici e di incenerimento e/o mineralizzazione umida delle sostanze organiche (Kingston e Bassie, 1988).

### 2 - STRUMENTAZIONE

Esistono, allo stato attuale, due famiglie di strumenti: quelli che prevedono il riscaldamento con microonde diffuse e quelli con microonde focalizzate. I componenti principali delle due tipologie di strumenti sono identici: Le microonde sono generate da un generatore (chiamato magnetron), propagate attraverso una guida d'onda e propagate all'interno della camera di riscaldamento.

Nei *sistemi a microonde diffuse*, le microonde emesse dal magnetron sono erogate, per mezzo di un agitatore, all'interno del forno, che deve essere ermeticamente chiuso per evitare la dispersione delle microonde all'esterno, dove vanno rimbalzando tra le sue pareti costruite di metallo che le riflette in tutte le direzioni. I campioni sono contenuti in contenitori

ermeticamente chiusi costituiti di materiali trasparenti alle microonde (PTFE, quarzo ecc.) e in grado di sopportare gli aumenti di temperatura e pressione che si generano all'interno dei contenitori stessi.

Negli strumenti di nuova concezione, sono inoltre previsti dei sistemi di regolazione e controllo delle pressioni e delle temperature all'interno dei contenitori.

Gli *strumenti a microonde focalizzate*, invece, focalizzano le microonde prodotte dal magnetron in un fascio ristretto verso la cavità dove è situato il campione. Il fascio di microonde è in tal modo focalizzato direttamente sulla parte inferiore del contenitore dove si trova la miscela del campione con i reagenti, consentendo di ridurre la potenza applicata e quindi la dispersione dell'energia elettromagnetica. Si può perciò lavorare a pressione atmosferica con contenitori aperti muniti di refrigerante a ricadere per assicurare la necessaria azione di riflusso. In entrambe le configurazioni strumentali la camera è fornita di un camino o di un sistema di estrazione dei vapori prodotti, che a seconda dei prodotti è collegato a sistemi di ventilazione programmabile o a dispositivi di aspirazione e di abbattimento dei fumi (Kingston et al., 1997).

### 3 - APPLICAZIONI

Non si può raccomandare una procedura generalizzata per la mineralizzazione dei campioni, a causa della varietà dei campioni da sottoporre ad analisi e degli elementi da analizzare, così come della varietà delle possibili tecniche analitiche utilizzate.

I tradizionali metodi di dissoluzione acida, sia quelli in sistema chiuso che quelli in sistema aperto, presentano in ogni caso alcuni problemi, quali la possibile perdita dei composti volatili, tempi prolungati di analisi con necessità di controllo costante da parte dell'operatore e pericoli di inquinamento dei campioni. Questi problemi sono significativamente ridotti dall'impiego del forno a microonde per la preparazione dei campioni.

#### 3.1 Scelta dell'acido

La dissoluzione acida di un campione è governata da molti e complessi fattori che devono essere attentamente valutati. La scelta del tipo di acido utilizzato, o della combinazione di acidi, diventa uno dei parametri fondamentali per l'efficienza della decomposizione.

Nella scelta devono essere preferiti quegli acidi in grado di formare sali solubili con i metalli di interesse. Per tali ragioni, gli acidi nitrico e cloridrico sono largamente utilizzati, anche l'acido perclorico è stato nel passato ampiamente utilizzato, ma oggi si tende a sconsigliarne l'uso data la sua elevata pericolosità. Inoltre, è essenziale conoscere la natura del campione e dei suoi principali costituenti, ad esempio, l'acido fluoridrico non è adeguato alla dissoluzione dei campioni vegetali, ma se in tali campioni è presente

una componente silicica (ad es. particelle di terreno o polvere atmosferica) ecco che l'utilizzo di una piccola quantità di acido fluoridrico in aggiunta alla miscela di acidi normalmente usati diventa efficace.

Un altro importante punto da considerare è l'interazione tra gli acidi e il contenitore utilizzato per l'attacco acido, ad esempio, l'acido fluoridrico non deve essere usato con contenitori in vetro o in quarzo, così come l'acido solforico, che ha un alto punto di ebollizione, (339°C) potrebbe fondere molti materiali plastici, PTFE compreso (Apha, 1995).

Di seguito vengono indicate le principali applicazioni nelle quali i singoli acidi vengono generalmente usati.

#### 3.1.1 - Acido nitrico

È l'acido più comunemente utilizzato. È un ossidante forte, per tale motivo viene ampiamente utilizzato nella decomposizione di matrici biologiche o botaniche, spesso in aggiunta al perossido di idrogeno. In un contenitore chiuso ad alta pressione, sotto l'influsso delle microonde, può raggiungere i 176 °C in circa 5 minuti, incrementando significativamente le proprie capacità ossidanti.

#### 3.1.2 - Acido cloridrico

L'acido cloridrico concentrato è un eccellente solvente per molti ossidi di metalli e per i metalli che hanno un potenziale di ossidazione più basso dell'idrogeno. Inoltre, ad elevate pressioni e temperature è anche in grado di decomporre molti silicati, ossidi refrattari e solfati.

#### 3.1.3 - Acido fluoridrico

L'acido fluoridrico è il reattivo ideale per attaccare i materiali a base di silicati. I silicati sono convertiti a SiF<sub>4</sub>, volatile, liberando gli elementi di interesse. Viene utilizzato inoltre in aggiunta ad ossidanti per la dissoluzione dei materiali organici in presenza di tracce di composti a base silicica.

#### 3.1.4 - Acido fosforico

L'acido fosforico è utilizzato per la dissoluzione di leghe ferrose e non ferrose. A causa della bassa pressione di vapore, si possono raggiungere delle temperature di reazione relativamente elevate, senza avere incrementi di pressione significativamente elevati.

#### 3.1.5 - Miscela di acidi

Le combinazioni degli acidi per le decomposizioni alle microonde sono efficaci per le medesime ragioni per

le quali sono usate nelle procedure di mineralizzazione classica. Tali composizioni sono scelte per la capacità di ciascun acido a decomporre efficacemente i singoli componenti di una particolare matrice.

La tecnica di mineralizzazione con contenitori chiusi ad alta pressione ha degli ulteriori vantaggi quando gli acidi sono utilizzati in combinazioni gli uni con gli altri ad alte temperature.

L'acqua regia, miscela di nitrico e cloridrico, è un potente agente ossidante e viene usata frequentemente nella dissoluzione di sostanze organiche.

### 3.2 - Dissoluzione acida in contenitori aperti e chiusi.

In generale, tutti i contenitori utilizzati per gli attacchi con metodi di riscaldamento conduttivo, possono essere utilizzati anche per gli attacchi in microonde, con la sola eccezione dei materiali metallici, sia per quanto riguarda i sistemi aperti che i sistemi chiusi.

La decomposizione acida in sistema chiuso presenta molti vantaggi rispetto all'attacco a pressione atmosferica. Gli acidi nitrico e cloridrico possono essere usati per decomporre materiali che non reagiscono a temperatura e pressione ambiente. Le temperature elevate provocano incrementi significativi nei potenziali di ossidazione e formano intermedi, quali i radicali liberi, che favoriscono l'attacco dei campioni. Inoltre, i sistemi chiusi minimizzano le contaminazioni provenienti dall'ambiente del laboratorio

Tab.2 - Esempi di applicazioni su matrici complesse

Matrice	Peso (mg)	Reagenti (mL)	Stadio n°	Tempo (min)	Potenza (Watt)	Vol. fin. (mL)
Materiale biologico	250	HCl/HNO <sub>3</sub> 20	1	10	300	50
			2	5	600	
			3	10	450	
Carboni, Ceneri, Fanghi, Sedimenti	250	1° fase HF 2 - HCl/HNO <sub>3</sub> 8	1	8	250	50
			2	4	400	
			3	6	600	
			4	6	400	
		2° fase H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 3	1	3	300	
Materiale vegetale	250	HNO <sub>3</sub> 8 - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 - HF 0,2	1	5	250	50
			2	1	600	
			3	3	300	
Acciai basso legati	100	HNO <sub>3</sub> 3 - HCl 1 - HF 0,1	1	5	250	50
			2	5	400	
			3	5	600	
Oli Combustibili	250	HNO <sub>3</sub> 6 - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	1	6	250	25
			2	4	400	
			3	3	500	
			4	2	0	
			5	4	500	

e necessitano di quantità inferiori di acidi per la dissoluzione dei materiali, riducendo in tal modo i bianchi analitici associati alla fase di preparazione dei campioni.

Infine, gli elementi volatili, che sarebbero normalmente persi in una mineralizzazione in sistemi aperti, restano intrappolati nei sistemi chiusi e sono recuperati quantitativamente.

#### 3.2.1 - Esempi

Data la grande varietà delle strumentazioni esistenti è impossibile riassumere in uno schema generale le varie applicazioni del forno a microonde per la mineralizzazione dei campioni. Nelle tabelle seguenti sono riportati alcuni esempi di applicazioni per tipologie diverse di matrici per un sistema a microonde con contenitori chiusi ad alta pressione (US Epa, 1990; Apha, 1995; Kingston et al., 1997).

Tab.1 - Esempi di applicazioni – campioni acquosi

Matrice	Volume campione (mL)	Reagenti (mL)	Stadio n°	Tempo (min)	Potenza (Watt)
Soluzione acquosa	8	HNO <sub>3</sub> 2	1	2	250
			2	3	400
			3	3	600
			4	1	0
			5	2	600

## BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1995): "Standard methods for the examination of water and wastewater", 19th edition, Washington

Kingston, H.M. e Bassie L.B. (1988): "Introduction to microwave sample preparation: theory and practice", American Chem. Soc., Washington, DC.

Kingston, H. M., Walter, P.J., Chalk, S.J., Lorentzen, E.M. e Link, D.D. (1997): "Microwave-Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation, and Applications", Kingston, H. M., Haswell, S.J. (Eds), American Chem. Soc., Washington, Cap 3, 223-349.

US Epa (1990): "Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts", SW-846 Method 3015, Test Method for Evaluating Solid Waste, Washington.

Zlotorzynski, A. (1995): "The application of microwave radiation to analytical and environmental chemistry", *Critical Rev. In Anal. Chem*, **25**, 43-76.

## APPENDICE

### 1 - NORME PER LA SICUREZZA

Riguardo l'uso del microonde si raccomanda quanto segue:

1. Esistono molte raccomandazioni d'uso e sicurezze specifiche per ogni modello di forno a microonde, relativamente alla schermatura dello strumento in oggetto al possibile rilascio nell'ambiente di microonde, e alla sicurezza dell'operatore dalla contaminazione degli acidi usati per la mineralizzazione. Non è possibile in questa sede operare una lista di tutte le possibili avvertenze dei vari modelli, si rimanda perciò alla consultazione del manuale d'uso dello strumento del laboratorio.
2. I contenitori per l'attacco a microonde sono costituiti comunemente da un liner esterno e da uno o più contenitori interni. I contenitori esterni non sono speso così resistenti agli acidi e alla pressione come i liner interni: degradazioni chimiche o fisiche di questi contenitori possono perciò causare problemi di efficienza del sistema e di sicurezza dell'operatore. Si consiglia perciò di operare un controllo periodico dello stato di conservazione di questi contenitori.
3. Durante la mineralizzazione a microonde la pressione interna dei contenitore raggiunge valori elevati: si sconsiglia pertanto l'uso di contenitori senza valvole di sfogo in grado di rompersi alle pressioni indicate dal costruttore. Deve essere inoltre assicurata un'efficiente aspirazione dall'interno del forno a microonde a una cappa

chimica per evitare che la rottura della valvola di un contenitore possa immettere nell'ambiente vapori acidi con pericolo per l'operatore.

4. Si deve in ogni caso evitare l'uso di forni a microonde domestici, del tipo di quelli da cucina.

### 2 - NORME PER LA TARATURA DI UN FORNO A MICROONDE

1. Pesare una quantità esatta di acqua deionizzata in un bicchiere di teflon da 1 litro. Lasciare riposare a temperatura ambiente il contenitore con l'acqua, quindi misurare la temperatura dell'acqua con una termocoppia tarata.
2. Porre quindi il contenitore nel forno a microonde e sottoporlo a riscaldamento per un tempo definito (generalmente 1 - 2 minuti) alla potenza voluta, impostando l'apposito programma di riscaldamento.
3. Terminato il programma, togliere il contenitore dal forno, aggiungere un'ancoretta magnetica e agitare il liquido su un agitatore magnetico, quindi misurare la temperatura. La misura della temperatura deve essere effettuata in ogni caso entro 30 secondi dalla fine del programma termico.
4. Calcolare la differenza di temperatura tra il valore misurato dopo il riscaldamento e il valore iniziale.
5. Ripetere le operazioni descritte ai punti 1 + 4 altre 2 volte.
6. Calcolare la media delle tre differenze di temperatura.

L'innalzamento di temperatura è correlato alla potenza effettivamente erogata mediante la formula seguente :

$$P = \frac{K \cdot Cp \cdot m \cdot \Delta T_m}{t}$$

dove :

- P = la potenza apparente assorbita espressa in Watt;
- K = il fattore di conversione da calorie/sec a watt pari a 4,184;
- Cp = il calore specifico dell'acqua a temperatura ambiente pari a 0,9997 cal \* g<sup>-1</sup> \* C<sup>-1</sup>;
- m = la massa dell'acqua espressa in grammi
- $\Delta T_m$  = la media delle differenze di temperatura registrate prima e dopo il riscaldamento nel forno;
- t = il tempo di riscaldamento in secondi.

# DETERMINAZIONE DELL'ANTIMONIO (METODO PER SPETTROMETRIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO CON FORMAZIONE DI IDRURI)

a cura di Capri S.\*, Mastroianni D.\*, Pettine M. e Spezia S.\*\*

\* Irsa - Cnr, Roma

\*\* Enel produzione, laboratorio di Piacenza

## RIASSUNTO

Viene descritta una procedura analitica per la determinazione dell'antimonio totale, dell'antimonio (III) e dell'antimonio (V) in acque naturali. Il campione è analizzato mediante spettroscopia di assorbimento atomico con generazione di idruri in due possibili configurazioni strumentali ("batch" system" oppure "flow injection").

## SUMMARY

An analytical procedure for the determination of total antimony, Sb (III) and Sb(V) in natural waters is described. The analysis of antimony is performed by hydride generation atomic absorption spectrometry using two possible instrumental apparatuses (batch system or flow injection).

## INTRODUZIONE

La concentrazione di antimonio nella crosta terrestre è di circa 0,2 ppm (IRSA, 1986). In natura si trova allo stato di solfuro  $Sb_2S_3$ , di triossido  $Sb_2O_3$ , di tetrossido  $Sb_2O_4$  e di tioantimonito  $Ag_3SbS_3$ . Le principali fonti antropogeniche dell'elemento sono l'attività mineraria, metallurgica e l'uso di carbone quale combustibile. Tra gli impieghi più significativi si segnala la produzione di leghe metalliche bassofondenti e considerevolmente dure. Viene impiegato, ad esempio, insieme a stagno e piombo in leghe per caratteri da stampa. E' inoltre probabile che l'antimonio vada a sostituire, alla luce dei limiti più restrittivi imposti per il piombo dalla nuova direttiva europea concernente la qualità delle acque potabili, il piombo nelle leghe di saldatura utilizzate nelle reti acquedottistiche. L'antimonio può essere presente in natura in diversi stati di ossidazione (+5), (+3), (0) e (-3) ma solo gli stati trivalente e pentavalente hanno importanza pratica. L'antimonio ha scarsa tendenza ad essere adsorbito sul particolato presente nelle acque. Essendo un elemento poco diffuso e poco indagato si hanno informazioni limitate sui livelli naturali dell'elemento nelle acque. Viene indicato come valore naturale di riferimento 1  $\mu\text{g/L}$  per le acque fluviali e 0,2  $\mu\text{g/L}$  per i sistemi marini (Martin e Whitfield, 1983).

La nuova direttiva europea concernente la qualità delle potabili (98/83/CE) ha introdotto un limite per l'antimonio (5  $\mu\text{g/L}$ ), più restrittivo rispetto al DPR 236 del 24/5/88, attualmente in vigore (10  $\mu\text{g/L}$ ). Obiettivi

di qualità ancor più stringenti sono quelli previsti dal recente decreto del Ministero dell'Ambiente per la salvaguardia della laguna di Venezia (Decreto Interministeriale del 23/4/1998), (1,0  $\mu\text{g/L}$  per il bacino scolante; 0,6  $\mu\text{g/L}$  e 0,2  $\mu\text{g/L}$ , valori imperativo e guida, rispettivamente, per la laguna). Emerge quindi la necessità di prevedere procedure analitiche caratterizzate da prestazioni adeguate, in termini di precisione, accuratezza, sensibilità, ai requisiti imposti dalle normative. La procedura analitica descritta in questo lavoro oltre a soddisfare queste esigenze consente inoltre di effettuare la speciazione dell'antimonio.

## 1 - PRINCIPIO DEL METODO

L'antimonio viene determinato mediante spettroscopia di assorbimento atomico con generazione di idruri e lettura dell'assorbimento alla lunghezza d'onda di 217,6 nm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: "batch system" oppure "flow injection". Il metodo si avvale di una preriduzione chimica con potassio ioduro a temperatura ambiente in cui avviene la riduzione dell'antimonio (V) ad antimonio (III). Successivamente l'antimonio (III), ridotto dal sodio boro idruro a  $SbH_3$ , viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura mantenuta ad una temperatura di 1000°C tramite un mantello riscaldante.

## 2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo consente la determinazione e la speciazione dell'antimonio nelle acque superficiali, sotterranee e potabili nell'intervallo di concentrazione 1-10  $\mu\text{g/L}$ .

## 3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

Per determinare quantitativamente l'antimonio (V) è indispensabile sottoporre il campione ad un trattamento preliminare di preriduzione con potassio ioduro. L'acido nitrico utilizzato per mineralizzare il metallo associato alla fase particolata o a composti metalloorganici eventualmente presenti non interferisce nella determinazione. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice nuova o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice. L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. L'acido fluoridrico interferisce nella determinazione dell'antimonio per concentrazioni > di 0,5 M. Tale interferenza può essere rimossa aumentando la concentrazione di acido cloridrico aggiunto (> 1,5 M).

#### 4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polietilene o altro materiale caratterizzato da scarsa capacità di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HCl 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto l'antimonio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo, su membrana da 0,45  $\mu\text{m}$  (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a  $\text{pH} < 2$  con HCl (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo.

La concentrazione di antimonio totale può essere ottenuta dalla somma dell'antimonio (III) e dell'antimonio (V) della frazione solubile, più il metallo presente nel percolato, oppure effettuando un trattamento di mineralizzazione del campione tal quale, (ad es. sottoponendo il campione acidificato con  $\text{HNO}_3$  a mineralizzazione in forno a microonde). E' buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'adottare tutte le precauzioni necessarie per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

#### 5 - APPARECCHIATURE

5.1 - Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 - Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 - Cella di misura in quarzo con finestre di quarzo o altro materiale trasparente a 217,6 nm. La cella di misura è fissata alla camera del bruciatore; negli strumenti moderni può essere riscaldata a una temperatura di 1000 °C tramite un apposito mantello riscaldante.

5.4 - Sistema batch

5.5 - Sistema flow injection

5.5.1 - Pompa peristaltica per il trasporto delle soluzioni

5.5.2 - Valvola con loop di caricamento del campione (normalmente il loop ha una capacità di 500  $\mu\text{L}$ )

5.5.3 - Separatore gas-liquido: si tratta di una membrana semipermeabile che permette solo il passaggio della fase gassosa contenente l'idruro metallico

5.5.4 - Regolatore di pressione

5.6 - Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

#### 6 - REATTIVI

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 - Acido cloridrico concentrato ( $d=1,19 \text{ kg/L}$ )

6.2 - Soluzione di preriduzione (KI 10%)

6.3 - Soluzione di  $\text{NaBH}_4$  al 3% in NaOH all'1%

Sciogliere 10 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di polietilene da 1 litro contenente circa 500 mL di  $\text{H}_2\text{O}$  ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 30 grammi di  $\text{NaBH}_4$ , quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata a temperatura non superiore a 4°C.

6.4 - Soluzione di  $\text{NaBH}_4$  (0,2 %) in NaOH (0,05%) per sistema flow injection.

Sciogliere 0,5 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di polietilene da 1 litro contenente circa 500 mL di  $\text{H}_2\text{O}$  ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 2 grammi di  $\text{NaBH}_4$ , quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata ad una temperatura non superiore a 4°C.

Nota: il sodio boridruro libera idrogeno a contatto con acido, dovrà pertanto essere maneggiato con cura e conservato secondo le indicazioni del fornitore.

6.5 - Soluzione di riferimento concentrata contenente 1000 mg/L di antimonio.

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento di antimonio ad elevato grado di purezza disponibili in commercio. Le soluzioni di lavoro per la calibrazione si ottengono per diluizioni successive della soluzione concentrata (6.5). Preparare almeno tre soluzioni di lavoro nel campo di applicabilità del metodo.

## 7 - PROCEDIMENTO

### 7.1 - Preparazione del campione

Per determinare soltanto l'antimonio trivalente solubile, acidificare con HCl concentrato (6.1) fino ad avere una soluzione 0,3 M. In queste condizioni durante il processo di ossido riduzione che porta alla formazione dell'idruro di antimonio ( $SbH_3$ ) la forma pentavalente di antimonio non è ridotta e quindi non è determinata.

Per determinare l'antimonio totale solubile,  $Sb(III) + Sb(V)$ , è necessario sottoporre il campione ad una preriduzione con ioduro di potassio. Al campione acidificato secondo le modalità precedentemente indicate si aggiunge 1 mL della soluzione di ioduro di potassio (6.2) per ogni 10 mL di campione. In queste condizioni la forma pentavalente di antimonio viene ridotta immediatamente ad antimonio trivalente a temperatura ambiente. Il risultato analitico che si ottiene è riferito all'antimonio totale solubile espresso come somma dell'antimonio (III) e dell'antimonio (V).

#### 7.1.1 - Ottimizzazione dei parametri strumentali con il sistema batch

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento. Nelle Tab. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema batch.

Tab. 1 - Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	217,6
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (mL)	10

La fase "purge 1" ha lo scopo di eliminare dal campione composti volatili che possono interferire nella misura; per assicurare una eliminazione completa si può aumentare opportunamente la durata del purge 1.

Tab. 2 - Condizioni operative tipiche per l'analisi dell'antimonio con il sistema batch

Purge 1	20 sec	
Reazione	15 sec	lettura attivata
Purge 2	30 sec	
temp. cella	1000°C	

Durante la fase di reazione con  $NaBH_4$  si forma  $SbH_3$  che viene trasferito mediante un flusso di gas inerte (Ar) nella cella di misura.

La fase "purge 2" consente la pulizia del sistema e la sua preparazione alla lettura del campione successivo.

#### 7.1.2 - Ottimizzazione dei parametri strumentali con il sistema flow injection

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento. Nelle Tab. 1a-2a sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema flow injection.

Tab. 1a - Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	217,6
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume di campionamento ( $\mu L$ )	500
Temperatura cella ( $^{\circ}C$ )	1000
Flusso di argon (mL/min.)	90
Flusso carrier (HCl) mL/min.	10
Flusso riducente ( $NaBH_4$ ) mL/min.	6

Tab. 2a - Condizioni operative tipiche per l'analisi dell'antimonio con il sistema flow injection

Stadio	t(s)	P1 (rpm)	P2 (rpm)	Pos.valvola	lettura
0	15	Sì	Sì	Riempimento	
1	10	Sì	Sì	Riempimento	
2	1	No	Sì	Iniezione	Sì

t(s) = tempo in secondi; P1, P2 = pompa 1, pompa 2  
rpm = giri/min

### 7.2 - Analisi

#### 7.2.1 - Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in Tab. 1, 2 o 1a, 2a (nel caso che si adoperi, rispettivamente il sistema batch o flow injection) costruire la curva di calibrazione utilizzando almeno tre soluzioni di lavoro scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione intermedia (6.5), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di lavoro compreso il bianco almeno due volte. Effettuare il

controllo sulla bontà della curva di calibrazione come riportato al punto 8.1.

Quindi, eseguire l'analisi dei campioni provenienti dal trattamento descritto in (7.1) effettuando almeno due repliche per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori delle repliche che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di lavoro e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità.

Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la calibrazione inserendo ad intervalli regolari, da definire in funzione della stabilità della risposta strumentale, una soluzione di lavoro a concentrazione nota e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il  $\pm 5\%$  del valore atteso.

### 7.2.2 - Metodo delle aggiunte note

Il campione proveniente dal trattamento descritto in (7.1) viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti di antimonio dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi, seguendo le indicazioni riportate in 7.2.1 avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di antimonio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

## 8 - CALCOLI

### 8.1 - Determinazione diretta

La retta di calibrazione si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le ( $\mu\text{g/L}$ ) delle soluzioni di lavoro in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco dei reattivi, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se la deviazione standard della retta stimata è inferiore al 5%. Ricavare quindi la concentrazione di antimonio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

### 8.2 - Metodo delle aggiunte

Siano  $C_1, C_2, C_3$ , rispettivamente le quantità corrispondenti alla 1°, 2°, 3° aggiunta e  $A_0, A_1, A_2, A_3$ , le assorbanze del campione ( $A_0$ ) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza  $A_0$  una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita

riferita al campione sarà data dal valore dall'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se la deviazione standard della retta stimata è inferiore al 5%.

## 9 - PRECISIONE E ACCURATEZZA

Prove effettuate ( $n=5$ ) con entrambe le procedure di analisi descritte (batch e flow injection) su campioni di acqua deionizzata contenenti 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/L}$  di antimonio hanno fornito valori del coefficiente di variazione ( $\text{CV}(\%) = \text{Scarto tipo/valore medio} \cdot 100$ ) entro il 5%.

Il limite di rivelabilità del metodo è stato calcolato effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di antimonio di 1,0  $\mu\text{g/L}$ , alternate con una misura del bianco. Tale limite, espresso come tre volte la deviazione standard delle dieci repliche, è risultato pari a 0,2  $\mu\text{g/L}$ .

**Nota:** si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su campioni certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Il campione certificato va caratterizzato in termini di valore medio e deviazione standard ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere, condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

## CONCLUSIONI

La procedura analitica descritta può essere efficacemente impiegata nella determinazione dell'antimonio totale in acque naturali (dolci e di mare), sotterranee e potabili. Si tratta di una procedura operativamente semplice che consente il dosaggio dell'antimonio a livelli di 1,0  $\mu\text{g/L}$  e inferiore, rendendo possibile la sua applicazione nelle operazioni di controllo volte a verificare il rispetto delle normative più severe in materia di controllo delle acque.

## BIBLIOGRAFIA

Decreto del Presidente della Repubblica del 24 maggio 1988, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano ai sensi dell'art. 15 della legge 16 aprile 1987, n. 183, in *G.U. n.60 del 30 giugno 1988*.

Decreto Interministeriale del 23/4/1998, concernente i requisiti di qualità delle acque e caratteristiche degli

impianti di depurazione per la tutela della laguna di Venezia, in *G.U. n.140, del 18/6/1998*.

Direttiva 98/83/CE del 3 novembre 1998, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, in *G.U. delle Comunità Europee, L330/32 del 5.12.98*.

IRSA (1986): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque, 71, 9*.

Martin J.M. & Whitfield D.M. (1983): "The significance of the river input of chemical elements to the ocean. In C.S. Wong et al. *Trace Metals in Seawater, NATO Conf. Ser. IV*, Plenum Press, 265-296.

## APPENDICE

### Norme di sicurezza

I vapori di antimonio prodotti a seguito della reazione con sodio boro idruro sono tossici e rappresentano, se inalati, un serio pericolo per l'operatore. Si consiglia pertanto di procedere ad un intrappolamento di tali vapori. Ciò si realizza attraverso un sistema a circolazione chiusa come quello riportato in Fig. 1.

I vapori di antimonio vengono trasportati mediante un flusso di gas inerte (Ar) attraverso il tubo (d) nella cella di misura (A), chiusa all'estremità da finestre (f) costituite di materiale trasparente a 217,6 nm. Successivamente vengono convogliati tramite i tubi di collegamento (e) prima in una Drain Trap (B) e poi in una trappola (C) contenente un filtro a carbone attivo che trattiene l'antimonio. L'uscita della trappola a carbone attivo (g) è collegata, tramite un tubo, ad una cappa aspirante provvista anche essa di filtro in carbone attivo. Il carbone attivo deve essere sostituito periodicamente e sottoposto a smaltimento nel rispetto delle normative vigenti.

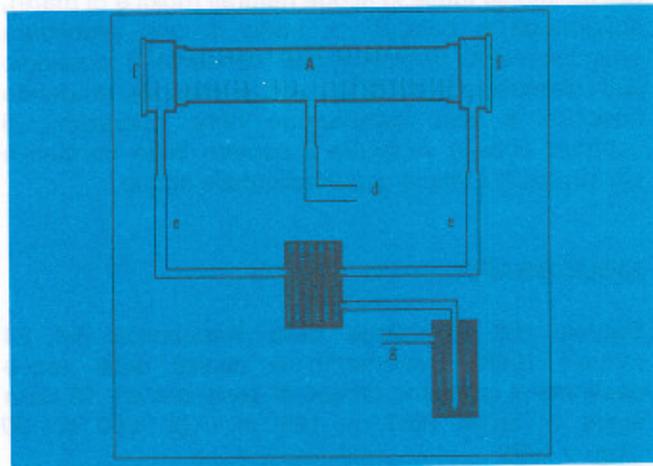


Fig. 1 - Descrizione schematica del sistema a circolazione chiusa utilizzato per intrappolare i vapori di antimonio.

## DETERMINAZIONE DELLA SALINITÀ'

a cura di Puddu A.\* e Rabitti S.\*\*

\* Irsa - Cnr, Roma

\*\* Ibm - Cnr, Venezia

### RIASSUNTO

Il metodo che si descrive per la misura della salinità è basato sulla determinazione del rapporto di conducibilità tra il campione ed uno standard di riferimento. Costituisce la procedura di riferimento internazionale e sostituisce il metodo argentometrico utilizzato in passato. Richiede l'uso di strumenti accurati, quali i salinometri da laboratorio o le sonde multiparametriche, ma vengono fornite indicazioni anche per l'uso di più semplici conduttimetri, da campo o da laboratorio.

### SUMMARY

The proposed methodology for the determination of water salinity is based on the conductivity ratio between the sample and the standard seawater solution. This method represents the internationally acceptable reference procedure and replaces the old silver nitrate titration. Accurate instruments, like bench salinometers or CTD probes are needed; however, suggestions to use simple bench or field conductometers are also given.

### INTRODUZIONE

La salinità è stata storicamente definita come la quantità di sali (misurata in grammi) contenuta in un kilogrammo di acqua di mare (Forch et al., 1902). La determinazione diretta della salinità di un'acqua naturale, effettuata attraverso la misura della concentrazione di tutti i sali in essa disciolti, è estremamente complessa e quindi non può essere considerata come metodo analitico pratico. Si ricorre pertanto ad un metodo indiretto basato sulla determinazione di una proprietà fisica del campione, quale la conducibilità elettrica, la densità, la velocità di trasmissione del suono o l'indice di rifrazione.

UNESCO, ICES, SCOR e IAPSO, hanno formato il Joint Panel of Oceanographic Tables and Standards (JPOTS), che nel 1965 ha sostituito l'equazione originale di Knudsen, basata sulla relazione gravimetrica salinità/clorinità, con il set di equazioni di Cox basate sulla conducibilità relativa e la clorinità.

Dal 1978 viene utilizzata la Salinità Pratica (simbolo S) definita dal rapporto  $K_{15}$  tra la conducibilità elettrica del campione di acqua di mare, alla temperatura di 15°C ed alla pressione di una atmosfera standard, e la conducibilità elettrica di una soluzione di cloruro di potassio (KCl), nella quale la massa di KCl sia 32,4356 g/kg, nelle stesse condizioni di temperatura e

pressione (UNESCO, 1978). Questo significa che tutti i rapporti di conducibilità sono riferiti ad una conducibilità standard ben definita e riproducibile.

Il metodo universalmente riconosciuto come valido per la determinazione della salinità è quindi basato sulla misura della conducibilità elettrica dell'acqua di mare e sul rapporto tra questa e la conducibilità di una soluzione di riferimento.

Lo standard di riferimento adottato da decenni dalla comunità scientifica mondiale è l'Acqua Standard IAPSO, che è costituita da acqua di mare naturale, filtrata, cui è stata aggiunta solamente acqua distillata. Lo standard principale ha una salinità di circa 35 (serie P) e viene considerato valido per la taratura di salinometri da laboratorio su un valore singolo. Tale standard è certificato nel suo rapporto di conducibilità ( $K_{15}$ ) relativo ad una soluzione a titolo noto di cloruro di potassio ed in clorinità. Sono disponibili inoltre due standard a bassa salinità (serie L) di valore approssimativo 10 e 30, ed uno ad alta salinità (serie H) di valore circa 38, certificati nel medesimo modo.

La determinazione della salinità adottata in passato, effettuata attraverso la determinazione della clorinità per titolazione degli ioni cloruro con metodo argentometrico (IRSA, 1994), è pertanto da ritenersi attualmente obsoleta.

## 1 - PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo è basato sulla determinazione del rapporto  $K_t$  tra la conducibilità del campione e quella di una soluzione standard per la quale sia noto il  $K_{15}$ , misurate entrambe alla stessa temperatura  $t$ . Da  $K_t$  si risale alla salinità pratica del campione che risulta essere una quantità adimensionale.

## 2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Il campo di applicazione riguarda salinità comprese tra 2 e 42.

## 3 - INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

La misura della conducibilità può venire alterata da eventuali sostanze oleose contenute nel campione, che possono adsorbirsi sulla superficie degli elettrodi.

## 4 - CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I contenitori, in vetro e con tappo a tenuta, di volume in genere pari a 250 mL (il volume dipende dallo strumento utilizzato), devono essere accuratamente risciacquati due volte con l'acqua da analizzare prima di essere riempiti. Il riempimento deve essere totale per non lasciare aria all'interno del contenitore. Per evitare qualsiasi reazione, oltre a curare che la tenuta

del tappo sia perfetta, si consiglia di conservare i campioni al buio in condizioni di temperatura costante. E' comunque opportuno procedere alla determinazione il più presto possibile, per evitare fenomeni di evaporazione e conseguente concentrazione dei sali.

## 5 - APPARECCHIATURE

### 5.1 - Salinometro

Gli strumenti più accurati e più diffusamente utilizzati nella pratica oceanografica sono i salinometri da laboratorio che hanno un elevato controllo della temperatura del campione e dello standard.

## 6 - REATTIVI

### 6.1 - Acqua di mare standard

Lo standard IAPSO è commercializzato dallo Standard Seawater Service, gestito da Ocean Scientific International Limited, Brook Road, Wormley, Surrey, GU8 5UB, UK.

## 7 - PROCEDIMENTO

### 7.1 - Determinazione del rapporto di conducibilità $K_t$

E' ottenuto dal rapporto tra la conducibilità del campione e quella dello standard, misurate alla temperatura  $t$ :

$$K_t = K_t \text{ campione} / K_t \text{ standard}$$

La lettura deve avvenire alla stessa temperatura per campione e standard e deve rimanere costante durante la misura. Alcuni salinometri, che forniscono direttamente la misura del rapporto di conducibilità, dispongono di un bagno termostato all'interno del quale la temperatura del campione o dello standard viene stabilizzata prima della lettura. Nel caso in cui il campione provenga da ambiente estuarino può essere necessaria una calibrazione secondaria dello strumento, ottenuta con la costruzione di curve di diluizione.

## 8 - CALCOLI

Il seguente algoritmo (UNESCO 1981, 1983) consente il calcolo della salinità pratica:

$$S = a_0 + a_1 K_t^{0.5} + a_2 K_t + a_3 K_t^{1.5} + a_4 K_t^2 + a_5 K_t^{2.5} + \Delta S$$

dove  $\Delta S$ , nullo nel caso in cui la misura sia stata effettuata a 15°C, è:

$$\Delta S = (b_0 + b_1 K_t^{0.5} + b_2 K_t + b_3 K_t^{1.5} + b_4 K_t^2 + b_5 K_t^{2.5}) \cdot f(t)$$

in cui  $f(t) = (t-15)/(1 + 0,0162(t-15))$

e i valori delle costanti sono:

$a_0 = 0,0080$	$b_0 = 0,0005$
$a_1 = -0,1692$	$b_1 = -0,0056$
$a_2 = 25,3851$	$b_2 = -0,0066$
$a_3 = 14,0941$	$b_3 = -0,0375$
$a_4 = -7,0261$	$b_4 = 0,0636$
$a_5 = 2,7081$	$b_5 = -0,0144$

Per estendere la salinità pratica a salinità inferiori, nell'intervallo 0-40, può essere applicata la seguente equazione (Hill et al., 1986):

$$S = S_{ps} - (a_0/(1+1,5X + X^2)) - (b_0 f(t)/(1 + Y^{0.5} + Y^{1.5}))$$

in cui:

$S_{ps}$  = valore determinato precedentemente per la salinità pratica

$X = 400 Kt$

$Y = 100 Kt$

$a_0, b_0$  ed  $f(t)$  hanno i valori precedentemente definiti

## 9 - PRECISIONE

Poiché conducibilità e temperatura vengono determinate per via strumentale, la precisione finale deriva dalla precisione di tali misure. Attualmente, la precisione che si può ottenere con i migliori strumenti commerciali è pari a  $\pm 0,0002$  (APHA, 1998).

**Note:** Per la misurazione *in situ* della salinità lungo la colonna d'acqua si ricorre nella pratica all'utilizzo di sonde multiparametriche che includono sensori di conducibilità, temperatura e pressione ed acquisiscono questi dati con una frequenza fino a 30 campioni al secondo. Il dato di salinità viene in genere riportato in uscita direttamente dallo strumento, dopo l'opportuna conversione dei segnali elettrici dei sensori, corretta in base agli algoritmi di calcolo predisposti dal costruttore. Per quanto riguarda la salinità, per essere affidabile lo strumento deve prevedere la taratura periodica con campioni standard per il controllo della deriva strumentale. La sensibilità che si può conseguire con le migliori apparecchiature disponibili può raggiungere  $\pm 0,003$  unità di salinità.

Se si utilizzano per la misura della conducibilità semplici conduttimetri da laboratorio o da campo, di costo certamente inferiore ai salinometri da laboratorio, bisogna essere consapevoli della minore accuratezza della misura. In ogni caso devono essere considerati i seguenti aspetti:

a) lo strumento può essere utilizzato solo per misurare la conducibilità in campioni discreti o, se

utilizzato *in situ*, soltanto nello strato superficiale, ma in tal caso deve essere prevista la compensazione della temperatura;

- b) deve essere adatto a misurare gli elevati valori di conducibilità propri delle acque marine, superiori nel mar Mediterraneo ai  $50000 \mu\text{mhos cm}^{-1}$ ;
- c) deve consentire una taratura che può essere effettuata considerando le seguenti conducibilità standard a 25C (APHA, 1998):

Concentrazione di KCl (M)	conducibilità a 25C ( $\mu\text{mhos cm}^{-1}$ )
0,1	12890
0,2	24800
0,5	58670
1	111900

Anche se lo strumento è predisposto per fornire direttamente il valore di salinità, la conversione deve essere controllata utilizzando la soluzione di acqua di mare standard mediante la quale, a partire dal  $K_{15}$  dichiarato, si può risalire al valore di salinità pratica.

## BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard methods for the examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington), 2-48/2-49.

Forch, C., Knudsen M. e Sorensen S. P. L. (1902): "Berichte uber die Konstantenbestimmungen zur Aufstellung der hydrographischen Tabellen", Kgl. Danske Vidensk Selsk. Skrifter, 6 Raekke Naturvidensk. Mathem. Afd., 12, 1-151.

Hill, K.D., Dauphine T.M. e Woods D.J. (1986): "The extension of the practical salinity scale 1978 to low salinities", *IEEE J. Oceanic Eng.*, OE-11, 109.

Irsa (1994): "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, 100, 79-86.

UNESCO (1978) "Eight report of the Joint Panel on Oceanographic Tables and Standards, Woods Hole, March 1977", *Unesco Techn. Pap. In Mar. Sci.*, 30, p.32.

UNESCO (1981): "The practical salinity scale 1978 and international equation of sea state of seawater 1980", *Unesco Techn. Pap. In Mar. Sci.*, 36, 1-25.

UNESCO (1983): "Algorithms for computations of fundamental properties of seawater", *Unesco Techn. Pap. In Mar. Sci.*, 44, 1-53.

## ESCHERICHIA COLI NELLE ACQUE: SIGNIFICATO SANITARIO E METODOLOGIE DI ANALISI

a cura di Bonadonna L. - Istituto Superiore di Sanità, Roma

### RIASSUNTO

Per talune peculiari caratteristiche *Escherichia coli* sembra meglio soddisfare i requisiti insiti nella definizione di organismo indicatore, rispetto ai tradizionali indicatori di contaminazione fecale dell'acqua. Finora, i substrati disponibili per il suo rilevamento necessitano tutti di almeno una prova di conferma. Di qui l'esigenza di indicare metodi di rilevamento a risposta più rapida, anche in relazione all'inserimento, nelle più recenti normative nazionali ed europee, del microorganismo tra i parametri microbiologici da ricercare.

### SUMMARY

Among the traditional indicators of faecal water pollution, *Escherichia coli* has shown to fit better with the definition of "indicator organism". Till now its recovery has been time-consuming and needs confirmation tests. In this report more rapid and direct methods, based on enzymatic reactions, are presented.

### INTRODUZIONE

Le normative relative alla determinazione della qualità igienico-sanitaria delle acque fanno riferimento ad una serie di controlli che, dal punto di vista microbiologico, sono basati in modo prioritario sulla determinazione della presenza di indicatori di contaminazione fecale che, più che avere una loro specifica valenza, consentono di acquisire dati atti a valutare l'evoluzione dei fenomeni che inducono l'inquinamento delle acque in esame.

Un microorganismo per essere elevato al ruolo di indicatore deve presentare una correlazione dotata di significato statistico con agenti eziologici specifici di malattie, i patogeni, la ricerca diretta dei quali non è però praticabile di routine per la mancanza di metodi sufficientemente specifici, sensibili, economici e di pronta e facile esecuzione. I microorganismi indicatori oltre a segnalare la presenza dei patogeni, dovrebbero esibire, rispetto a questi, un analogo spettro di sensibilità ai disinfettanti ed una stessa capacità di risposta alle condizioni ambientali; dovrebbero inoltre essere facilmente rilevabili con metodi sensibili, specifici ed economici e, possibilmente, non essere dotati di vita autonoma nell'ambiente, in modo da poter indicare selettivamente il tipo di evento da cui derivano. Tradizionalmente coliformi e streptococchi fecali sono stati assunti come indicatori di

contaminazione fecale. Tuttavia, da alcuni anni, la validità dei coliformi, come indice accurato di presenza e densità di patogeni, è stata messa in discussione a causa della presenza nel gruppo, compreso nella famiglia delle Enterobacteriaceae, anche di microrganismi ambientali, non associati a contaminazione di origine fecale, ma in grado di colonizzare acqua, suolo e vegetazione. Per questi motivi, in questi ultimi anni si è andata sempre più delineando l'eventualità di sostituire il parametro coliformi - fecali o termotolleranti - con quello di *Escherichia coli*. Già da tempo l'Organizzazione Mondiale della Sanità considera questa specie come indicatore primario di inquinamento di origine fecale, valido indice soprattutto per il controllo delle acque dolci. Tale scelta è motivata dalla maggiore stabilità della sua presenza nell'ambiente acquatico rispetto ai coliformi, che risulterebbero più sensibili alle variazioni stagionali, e non di meno dalla minore sensibilità del microorganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei patogeni enterici. Inoltre va considerato che nell'ambito del gruppo dei coliformi, *Escherichia coli* è ampiamente rappresentata ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, a differenza dei microrganismi appartenenti ai generi *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* che si caratterizzano per una potenziale capacità di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente.

La specie *Escherichia coli* è un microorganismo a forma di bastoncino, gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, non sporigeno, che cresce alla temperatura di  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , lattosio-fermentante, indolo-positivo in terreni contenenti triptofano,  $\beta$ -D-glucuronidasi-positivo. In letteratura, la presenza di questo enzima è stata evidenziata nel 94-99,5 dei biotipi di *Escherichia coli*, con l'eccezione dei sierotipi O157:H7, e anche, in bassa percentuale, in *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*. L'enzima non è prodotto dai coliformi; conseguentemente il rilevamento della sua presenza può essere usato per discriminare *Escherichia coli* da questi ultimi.

I metodi fino ad ora utilizzati per la ricerca di *Escherichia coli* risultano inadeguati per laboriosità e lunghezza d'esecuzione e di risposta, poiché, non essendo stati formulati per la sua selezione, ma per il rilevamento dell'intero gruppo dei coliformi fecali, necessariamente devono prevedere prove di conferma e di identificazione. Più di recente sono stati formulati substrati diversi da quelli tradizionali, modificati con l'aggiunta di composti cromogeni e fluorogeni che si basano sul rilevamento dell'attività enzimatica della  $\beta$ -glucuronidasi, evidenziabile dall'idrolisi di  $\beta$ -glucuronidi e  $\beta$ -galatturonidi, cromogeni o fluorogeni con rilascio di composti colorati o fluorescenti (Kilian and Bulow, 1976; Walter et al., 1994).

Il progressivo recepimento delle Direttive Europee in materia di gestione e qualità delle acque richiede l'aggiornamento dei metodi analitici mediante l'introduzione di tecniche più specifiche, selettive e

rapide. Pertanto, allo scopo di fornire uno strumento applicativo di riferimento per la pianificazione e l'unificazione delle procedure di analisi e anche in relazione all'introduzione del parametro *Escherichia coli*, realizzata nel D.Lgs. n. 152/99 e successive modifiche (D. Lgs n. 258/00), vengono di seguito proposti alcuni metodi analitici, specifici per la determinazione della specie. Le tecniche analitiche presentate, alcune delle quali già riconosciute da organizzazioni internazionali di standardizzazione dei metodi e/o derivate da esperienze di laboratorio svolte anche nell'ambito di circuiti interlaboratoriali europei, confermano la possibilità di evidenziare, con questi substrati, in modo selettivo, direttamente la specie ricercata, con rese equivalenti o superiori rispetto ai metodi convenzionali (Bonadonna e Volterra, 1992; Bonadonna e Villa, 1993; Bonadonna *et al.*, 1997; Briancesco *et al.*, 2000).

## ESCHERICHIA COLI: PROCEDURA ANALITICA

### OBIETTIVO

I metodi descritti consentono di valutare, in un determinato volume di acqua, la concentrazione di *Escherichia coli* mediante il calcolo statistico del Most Probable Number (MPN, numero più probabile) o con procedure di conta diretta.

### PRINCIPIO DEI METODI

Di seguito sono proposti diversi metodi per il rilevamento di *Escherichia coli* (Metodo A-F), tutti basati, non più sulla tradizionale reazione della fermentazione del lattosio, bensì sul rilevamento dell'attività enzimatica della  $\beta$ -glucuronidasi, evidenziabile dall'idrolisi di  $\beta$ -glucuronidi cromogeni o fluorogeni, con rilascio di composti colorati o fluorescenti.

### CAMPO DI APPLICAZIONE

Tipo di acqua	N° di diluizioni	N° di pozzetti/diluizione		Valori limite di misura N° batteri/100 mL
superficiale marina	2	64	a 1:2	15-3,5 $\times 10^4$
		32	a 1:20	
superficiale dolce	4	24	a 1:2	40-3,2 $\times 10^6$
		24	a 1:20	
		24	a 1:200	
		24	a 1:2000	
reflua grezza e trattata	6	16	a 1:2	60-6,7 $\times 10^8$
		oltre 16	a 1:200000	

Le procedure analitiche di seguito riportate possono essere utilizzate per l'analisi di acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

### METODO A

Il metodo di seguito descritto corrisponde alla Norma ISO 9308-3 (1998). E' applicabile all'analisi di tutti i tipi di acque superficiali e reflue, ed è particolarmente adatto all'esame di quelle ricche di materiale in sospensione (Hernandez *et al.*, 1991). E' di facile e rapido impiego.

#### Principio del metodo A

Il campione diluito è inoculato in 96 pozzetti da 350  $\mu$ L contenenti il terreno di coltura disidratato. Dopo un periodo di incubazione di 36-72 ore a  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$  si procede alla lettura dei risultati sotto lampada di Wood (366 nm). *Escherichia coli*, idrolizzando il 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG), produce fluorescenza blu nei pozzetti. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

#### Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare le diluizioni da inoculare in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

Di seguito, per l'analisi di alcuni tipi di acqua vengono riportati alcuni esempi in funzione del presunto livello di contaminazione delle acque:

## Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, dalla preparazione del terreno colturale alla lettura dei risultati, oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- ✓ essiccatore;
- ✓ lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- ✓ micropipetta a 8 canali per l'inoculo di 200 µL;
- ✓ nastro adesivo sterile;
- ✓ piastre Petri
- ✓ piastre sterili a 96 pozzetti da 350 µL, non fluorescenti e a fondo piatto;
- ✓ puntali sterili per micropipetta;
- ✓ tubi per diluizioni.

## Reagenti e terreni di coltura

### MUG/EC medium

Composizione per 1 L di terreno:

Triptone	40 g
Salicina	1 g
Triton X 100	1 g
MUG	100 mg

Il terreno si trova in commercio disidratato e pronto per l'uso, già distribuito in piastre a 96 pozzetti corredate di nastro adesivo. Per la procedura di analisi, seguire le istruzioni della ditta produttrice.

Qualora si proceda alla sua preparazione, a 1 L di acqua distillata aggiungere triptone, salicina e Triton (il Triton X 100 è uno dei prodotti utilizzabili, disponibili in commercio; possono comunque essere utilizzati prodotti equivalenti purché sia dimostrato forniscano gli stessi risultati), mantenendo in agitazione fino ad ebollizione e completa dissoluzione degli ingredienti. Raffreddare ed aggiungere il MUG disciolto in 2 mL di N,N-dimetilformamide. Aggiustare il pH a  $6,9 \pm 0,2$ .

Sterilizzare per filtrazione attraverso membrane con porosità nominale di 0,2 µm. Distribuire in aliquote da 100 µL in ciascuno dei 96 pozzetti in piastra. Disidratare immediatamente in un essiccatore o sotto cappa a flusso laminare.

La N,N-dimetilformamide è tossica. Il prodotto può causare il cancro ed è Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere e uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

### Soluzione diluente

Composizione:

Acqua di mare sintetica	22,5 g
Soluzione di blu di bromofenolo	10 mL

Acqua distillata 1000 mL

Miscelare gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  per 15-20 min.

Preparare la soluzione di blu di bromofenolo aggiungendo 0,04 g a 100 mL di etanolo al 50%. L'aggiunta di questa soluzione è facoltativa e utile solo per la colorazione della soluzione diluente.

In alternativa alla soluzione diluente sopra indicata, possono essere utilizzati altri diluenti, quali acqua distillata, a meno che le stesse diluizioni preparate per il conteggio di *Escherichia coli* non debbano essere usate per il conteggio degli enterococchi intestinali.

### Acqua distillata

Utilizzare acqua distillata priva di sostanze inibenti la crescita nelle condizioni di prova. Sterilizzare l'acqua distillata a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  per 15-20 min.

### Procedura

#### Preparazione delle diluizioni

Acque con salinità < 30‰.

Aggiungere 9 mL di soluzione diluente in tutti i tubi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di soluzione diluente (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

Acque con salinità  $\geq 30\text{‰}$ .

Aggiungere 9 mL di acqua distillata sterile nel tubo della prima diluizione e 9 mL di soluzione diluente a tutti i tubi successivi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di acqua distillata (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

### Semina delle diluizioni e incubazione

Con le adeguate regole di asepsi, versare la diluizione iniziale in una piastra Petri vuota sterile e, usando una micropipetta a 8 canali, distribuire 200 µL in ciascun pozzetto contenente il terreno disidratato MUG/EC medium, corrispondente alla prima diluizione. Operare

in modo analogo per le diluizioni successive, cambiando la piastra Petri e i puntali ad ogni diversa diluizione. Coprire la piastra di inoculo con nastro adesivo sterile per prevenire contaminazioni esterne e disidratazione dell'inoculo.

Incubare le piastre inoculate a  $44\pm 0,5^\circ\text{C}$  per almeno 36 ore e fino ad un massimo di 72 ore.

### Letture dei risultati

I pozzetti che sotto lampada di Wood risultano blu-fluorescenti sono considerati positivi.

### Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

Se nessuno dei pozzetti è positivo, esprimere il risultato come  $<n/100$  mL, dove  $n$  è il valore dell'indice MPN per 1 pozzetto positivo nelle condizioni di diluizioni impiegate.

Per il calcolo dell'indice MPN procedere determinando il numero caratteristico in base al numero di pozzetti positivi per ciascuna diluizione selezionata, che, con più di 3 diluizioni, dovrà corrispondere ad un numero composto da 3 cifre. Individuato il numero caratteristico, per calcolare il valore dell'MPN consultare la norma NF T 90-433: agosto 1997, ovvero consultare le tabelle fornite con il terreno colturale.

### Resoconto di prova

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

### METODO B

Il metodo di seguito descritto viene riportato nel Manuale Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater sotto il nome di Enzyme Substrate Test (APHA, 1998). L'EPA ha approvato questo tipo di analisi, e le successive modifiche (possibilità di quantificare la concentrazione di *Escherichia coli* tramite la tecnica dell'MPN), sotto il nome di MMO-MUG test (Colilert) (USEPA, 1994). L'AOAC ha inserito il metodo analitico in Official Methods of Analysis con il nome di Defined Substrate Technology (Colilert) (AOAC, 1995).

Recentemente la performance del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratorio di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.

È applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche oligotrofe, clorate e comunque contenenti *Escherichia coli* danneggiati. È di facile e rapido impiego.

### Principio del metodo B

Il prodotto è già disponibile in commercio sotto forma di kit completo per l'inoculo del campione, utilizzabile in tubi e piastre multi-pozzetto, monouso, per lo svolgimento della tecnica del numero più probabile (MPN). Dopo un periodo di incubazione di 18 o 24 ore a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  si procede alla lettura dei risultati sotto lampada di Wood (366 nm). *Escherichia coli*, idrolizzando il 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG), produce fluorescenza nei pozzetti. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

### Volume da analizzare

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

### Strumentazione e vetreria

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

- ✓ lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- ✓ sigillatore automatico.

### Reagenti e terreni di coltura

#### Defined Substrate Technology (Colilert)

Composizione:

Ammonio solfato	5g
Manganese solfato	0,5mg
Zinco solfato	0,5mg
Magnesio solfato	100mg
Sodio cloruro	10g
Calcio cloruro	50g
Sodio solfito	40g
Amfotericina B	1mg
O-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside	0,5g
4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide	75mg
Solanum	0,5g
Hepes buffer	
Sali di sodio	5,3g
Acido organico	6,9g

Il terreno disidratato viene distribuito in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione

o di una sua diluizione e di piastre a pozzetti (51 o 97). Il kit fornisce la possibilità di leggere i risultati dopo 18 o 24 ore.

### Procedura

Seguendo le istruzioni della ditta produttrice, mescolare, in un flacone sterile, il terreno disidratato Defined Substrate Technology (Colilert) con 100 mL di campione o di una sua diluizione. Chiudere il flacone e mescolare per sciogliere completamente il terreno. Attendere che l'eventuale formazione di schiuma sia sparita e versare il contenuto del flacone nella piastra sterile a 51 pozzetti o in quella a 97 pozzetti. Sigillare la piastra inocolata con l'apposito sigillatore automatico che provvede anche alla distribuzione del campione all'interno dei pozzetti.

### Incubazione

Incubare a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  entrambi i tipi di piastre per un periodo di 18 ore per Colilert 18 e di 24 ore per Colilert.

### Letture e interpretazione dei risultati

I pozzetti che sotto lampada di Wood risultano fluorescenti sono considerati positivi per *Escherichia coli*. Senza diluizioni la piastra a 51 pozzetti permette la lettura da 1 a 200 microrganismi/100 mL; la piastra a 97 pozzetti permette la lettura da 1 a 2419 microrganismi/100 mL.

### Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

I valori dell'indice MPN sono calcolati in base alla tabella specifica fornita con il kit di analisi.

### Resoconto di prova

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

### METODO C

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.

In presenza di elevate concentrazioni di *Escherichia coli* nel campione, la lettura dei risultati può rivelarsi complicata dalla diffusione e confluenza della fluorescenza prodotta dalle colonie tipiche. Pertanto il metodo risulta più idoneo all'analisi di acque trattate e comunque poco contaminate.

### Principio del metodo C

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di  $0,45\ \mu\text{m}$  di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a  $44\pm 1^\circ\text{C}$  si procede alla lettura dei risultati sotto lampada di Wood (366 nm). Il composto 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla  $\beta$ -glucuronidasi di *Escherichia coli*, rilasciando il composto 4-metilumbelliferone che produce quindi colonie di colore blu-verde, fluorescenti alla luce ultravioletta.

I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

### Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

### Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessaria la lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm.

### Reagenti e Terreni di coltura

#### Substrato cromogeno agarizzato I (C-EC Agar)

Composizione per 1 L di terreno:

Triptosio	10g
Triptofano	1g
Peptocomplesso	5g
Estratto di lievito	3g
Sodio cloruro	5g
Sali di bile n. 3	1,5g
IPTG	0,1g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08g
4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucuronide	0,05g
Agar Bios LL	13g
pH 6,8 $\pm$ 0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a  $115\pm 1$  °C per 15 min. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

### Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento Substrato cromogeno agarizzato I (C-EC Agar) e procedere all'incubazione a  $44,5\pm 1$  °C per 18-24 ore.

### Letture e interpretazione dei risultati

*Escherichia coli* sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu che risultano fluorescenti alla luce ultravioletta. Le colonie atipiche crescono di colore biancastro o incolore.

### Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

### Resoconto di prova

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

## METODO D

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.

Il metodo risulta idoneo all'analisi di acque reflue.

### Principio del metodo D

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 0,45 µm di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a  $44\pm 1$  °C si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β-glucuronidasi di

*Escherichia coli* che produce quindi colonie di colore blu-verde.

I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

### Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

### Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

### Reagenti e terreni di coltura

Substrato cromogeno agarizzato II (Chromogenic *E. coli*, EC X-GLUC AGAR)

Composizione per 1 L di terreno:

Triptone	20g
Triptofano	1g
Estratto di lievito	5g
Sodio cloruro	5g
Sali di bile n. 3	1,5g
Sodio fosfato bibasico	5g
Potassio fosfato monobasico	1,5g
X-Gluc	0,06g
Agar	12g
pH 7,0±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a  $121\pm 1$  °C per 15 min. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

### Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento Substrato cromogeno agarizzato II (Chromogenic *E. coli*, EC X-GLUC AGAR) e procedere all'incubazione a  $44\pm 1$  °C per 18-24 ore.

## Lettura e interpretazione dei risultati

*Escherichia coli* sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu. Le colonie atipiche crescono incolori.

## Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

## Resoconto di prova

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

## METODO E

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.

Il metodo risulta idoneo all'analisi di acque trattate e comunque contenenti *Escherichia coli* danneggiati.

## Principio del metodo E

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 0,45 µm di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a 36±1°C si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β-glucuronidasi di *Escherichia coli* che produce quindi colonie di colore grigio-blu.

I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

## Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

## Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

## Reagenti e terreni di coltura

Substrato cromogeno agarizzato III (Chromogenic Coliform Agar)

Composizione per 1 L di terreno:

Triptosio	10g
Triptofano	0,1g
Estratto di lievito	3g
Peptocomplex	5g
Sodio cloruro	5g
Sali di bile n. 3	1,5g
IPTG	0,1g
X-Gluc	0,06g
Salmon Gal	0,15g
Agar	13g
pH 7,0±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±1°C per 15 min. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

## Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento Substrato cromogeno agarizzato III (Chromogenic Coliform Agar) e procedere all'incubazione a 36±1°C per 18-24 ore.

## Lettura e interpretazione dei risultati

*Escherichia coli* sviluppa colonie tipiche di colore grigio-blu. Le colonie di coliformi crescono di colore salmone e le colonie atipiche incolori.

## Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

## Resoconto di prova

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

## METODO F

Il metodo di seguito descritto è stato prodotto su indicazione del Public Health Laboratory Service (PHLS) e contiene il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronide (BCIG) (PHLS, 1994).

La performance del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratoriale di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.

Il metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.

Il metodo risulta particolarmente idoneo all'analisi di acque superficiali dolci o marine.

### Principio del metodo F

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 0,45  $\mu$ m di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a 44 $\pm$ 1 °C si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla  $\beta$ -glucuronidasi di *Escherichia coli*, che produce quindi colonie di colore blu-verde.

I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

### Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

### Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

### Reagenti e terreni di coltura

Substrato cromogeno agarizzato IV (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar, TBX)

### Composizione per 1 L di terreno:

Tryptone	20g
Sali di bile n. 3	1,5g
X-Gluc	0,075g
Agar	15g
pH 7,2 $\pm$ 0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121 $\pm$ 1°C per 15 min. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

### Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45  $\mu$ m di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento Substrato cromogeno agarizzato IV (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar, TBX) e procedere all'incubazione a 44,5 $\pm$ 1 °C per 18-24 ore.

### Letture e interpretazione dei risultati

*Escherichia coli* sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu.

### Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

### Resoconto di prova

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

### BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 9223 B Enzyme Substrate Test. 20<sup>th</sup> Edition. American Public Health Association, Washington, D.C.

Association of official Analytical Chemists (1995): "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists". AOAC Official Method

991. 15. Total coliforms and *Escherichia coli* in water. Defined Substrate Technology (Colilert) Method. 16<sup>th</sup> Edition. AOAC International, Arlington, Vi.

Bonadonna L., Volterra L. (1992): "Un metodo rapido per l'analisi microbiologica dell'acqua: il test Autoanalysis Colilert", *Biologi italiani*, **10**, 14-17.

Bonadonna L., Villa L. (1993): "Un substrato cromogeno per l'isolamento dei coliformi totali nelle acque: il C-EC-MF". Metodi analitici per le acque, *Notiziario Irsa - Cnr*, **13**, 3-7.

Bonadonna L., Chiaretti G., Coccia A. M., Semproni M. (1997): "Valutazione comparativa di procedure analitiche per il rilevamento di *Enterobacteriaceae* in acque marine costiere". Rapporti ISTISAN 97/3, 42 pp.

Briancesco R., Coccia A. M., Della Libera S., Semproni M. e Bonadonna L. (2000): "Nuovi orientamenti normativi per il controllo delle acque: la ricerca di *Escherichia coli*", *Igiene e Sanità Pubblica*, **LVI**, 85-94.

Hernandez J.F., Guibert J.M., Delattre J.M., Oger C., Charriere C., Hughes B., Serceau R., Sinigre F. (1991): "Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *E. coli* and enterococchi in marine water", *Water Science and Technology*, **24**, 137-141.

ISO 9308-3 E (1998): "Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water". Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium. ISO Cont. 06/ 09308-03.

Kilian M. and Bulow P. (1976): "Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae* I. Detection of bacterial glycosidases", *Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica* (section B), **84**, 245-251.

Public Health Laboratory Service (1994): "The microbiology of water. Methods for the examination of waters and associated materials". Report No. 71, Her Majesty's Stationary Office, London.

US Environmental Protection Agency. (1994): Federal Register - National Primary and Secondary Drinking Water Regulations: Analytical Methods for regulated drinking water contaminant: Final Rule. Part V, 40 CFR Part 141-143. Federal Register 59: 62456.

Walter K.S., Fricker E.J., Fricker C. R. (1994): "Observation on the use of a medium detecting  $\beta$ -glucuronidase activity and lactose fermentation for the simultaneous detection of *E. coli* and coliforms". *Letters in Applied Microbiology*, **19**, 47-49.

## METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLE SPORE DI CLOSTRIDI SOLFITO-RIDUTTORI IN CAMPIONI DI SEDIMENTI, FANGHI DI DEPURAZIONE, SUOLO E PRODOTTI DI COMPOSTAGGIO

a cura di Bonadonna L. e Marini R. - Istituto Superiore di Sanità, Roma

### RIASSUNTO

Viene descritto il metodo analitico per la determinazione quantitativa delle Spore di Clostridi solfito-riduttori. Il parametro viene generalmente ancora quantificato con metodiche più adatte per l'analisi delle acque. Il metodo qui riportato, modifica invece la procedura di rilevamento per adeguarla all'analisi di materiale solido, quali sedimento, fango di depurazione, suolo e prodotti di compostaggio e vuole essere uno strumento applicativo di riferimento utile alla pianificazione e all'unificazione delle procedure analitiche per le strutture che operano nel settore del controllo della qualità igienico-sanitaria ed ambientale di specifiche matrici ambientali.

### SUMMARY

The described analytical procedure allows the quantitative enumeration of the parameter Spores of Anaerobic Clostridia in solid matrixes, such as sediment, sludge, soil and compost. The present technique should be an useful reference method for all the laboratories working on the hygienic quality control of the environment.

### GENERALITÀ E DEFINIZIONI

I clostridi sono microrganismi anaerobi obbligati; bacilli gram-positivi, in gran parte mobili per flagelli peritrichi e raramente capsulati. Riducono il solfito con produzione di solfuri e producono spore termoresistenti a localizzazione terminale o subterminale. Le spore, resistenti a condizioni ambientali sfavorevoli, non si riproducono nell'ambiente e, sopravvivendo a lungo, possono dare indicazioni su condizioni di contaminazione pregressa. Alcune specie sono saprofiti e vivono negli strati superficiali del suolo e dei sedimenti, altre sono patogene (*Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*) e producono potenti esotossine che causano sindromi particolarmente gravi (Koneman *et al.*, 1995). Alcune specie vivono anche nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo. Il loro numero nelle feci umane, rispetto ai coliformi e agli streptococchi, è inferiore, in rapporto rispettivamente di circa 1/100 e 1/10. In particolare *Clostridium perfringens*, presente nel materiale fecale dell'uomo in concentrazioni variabili tra  $10^2$  e  $10^7$  UFC/g, è considerato utile indicatore di

contaminazione in quanto specie di sicura origine fecale. La specie, presente anche nelle feci canine e suine, è meno comune o addirittura assente nelle feci degli altri animali a sangue caldo. Nei reflui le concentrazioni del microrganismo possono raggiungere valori intorno a  $10^5$  UFC/100 mL e il loro abbattimento durante i trattamenti può raggiungere il 95-99%. In sedimenti marini le sue concentrazioni possono oscillare ampiamente tra valori di  $10^1$  e  $10^4$  UFC/g. Valori più elevati ( $10^3$ - $10^5$  UFC/g) possono essere registrati in sedimenti fluviali in corrispondenza di apporti di tipo organico (Bonadonna *et al.*, 1995). È importante notare che il microrganismo può essere considerato valido indicatore di contaminazione e supporto per la valutazione della qualità di matrici ambientali, primariamente quando si debba stimare la qualità di acque clorate, acque non trattate che contengano scarichi industriali letali per i microrganismi non sporigeni, acque reflue, compost, sedimenti e matrici ambientali che abbiano ricevuto reflui contenenti virus e protozoi parassiti (Davies *et al.*, 1995).

### Campo di applicazione

La procedura analitica può essere utilizzata per l'analisi di campioni di materiale solido quali sedimenti, fanghi di depurazione, suolo e prodotti di compostaggio.

### Principio del metodo

Il metodo si basa sul conteggio diretto delle colonie utilizzando la tecnica dell'inclusione e consente di calcolare la concentrazione delle spore dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* presenti in un volume noto di campione.

La procedura consiste in una serie di fasi successive così suddivise:

- ✓ Preparazione della sospensione del campione
- ✓ Pretrattamento del campione
- ✓ Inseminazione del campione con la tecnica dell'inclusione in terreno colturale agarizzato ed incubazione
- ✓ Conteggio ed identificazione delle colonie
- ✓ Eventuale conferma delle colonie
- ✓ Espressione dei risultati

### Controllo di qualità

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

### Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione una giara con accessori per la produzione di condizioni anaerobiche.

### Reagenti e terreni di coltura

#### Terreno di isolamento

#### Agar al Solfito Polimixina Solfadiazina (SPS)

Composizione per 1 L di terreno:

Solfito di sodio	0,5g
Solfato di polimixina	0,01g
Sulfodiazina	0,12g
Triptone o peptone	15g
Estratto di lievito	10g
Citrato di ferro	0,5g
Sodio tioglicollato	0,1g
Sorbitan monooleato	0,05g
Agar	15g
pH	7,0±0,2

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni. Sterilizzare a  $118 \pm 1$  °C per 15 min. Conservare a circa +4°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

#### Olio di vaselina sterile

#### Agar nutritivo base al sangue di coniglio

Composizione per 1 L di terreno:

Estratto di carne	3g
Peptone	5g
Agar	15g
pH	6,8±0,2

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni e sterilizzare a  $121 \pm 1$  °C per 15 min.

Dopo sterilizzazione, preparare, con le normali procedure, alcune piastre di terreno senza aggiunta di sangue; in altre piastre, in condizioni di asepsi, trasferire 0,5 mL di sangue defibrinato di coniglio e aggiungere circa 12-13 mL di agar nutritivo preventivamente sciolto e portato a 50-60°C in bagno termostato, miscelare e lasciar solidificare a

temperatura ambiente. Il terreno colturale al sangue ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di conservarlo a +4°C per non oltre una settimana, o meglio prepararlo al momento dell'uso. Scartare eventuali piastre che presentino contaminazione.

#### *Sangue defibrinato di coniglio*

Il sangue defibrinato di coniglio è reperibile in commercio e si può conservare per circa una settimana a circa +4°C in condizioni ottimali.

#### *Agar Columbia con 5% di sangue di montone*

Composizione del terreno completo:

Bio-polyptone	10g
Idrolizzato di proteine animali e vegetali	10g
Bio-miotone	3g
Amido di mais	1g
Cloruro di sodio	5g
Sangue di montone	50mL
Agar	13,5g
pH	7,3±0,2

Il terreno si trova in commercio già pronto per l'uso e preparato in piastre Petri. Ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di comprarne piccoli lotti.

Esistono in commercio diversi substrati per la crescita dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium*. In alternativa all'Agar nutritivo al sangue di coniglio qui viene anche riportata la composizione dell'Agar Columbia con 5% di sangue di montone.

E' necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di selettività, produttività, ecc.

#### *Perossido di idrogeno al 3%*

Conservare al riparo della luce diretta e a circa +4°C in condizioni ottimali.

### **Procedura**

#### *Preparazione della sospensione*

Pesare in un contenitore sterile una massa *m* (almeno 10 g) del campione da analizzare. Aggiungere il diluente, preferibilmente acqua fisiologica tamponata (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, NaCl 8,5 g/L; pH 7,2±0,2, in misura pari a 9 [mL] × *m*. Lasciare agitare per alcuni minuti la sospensione su piastra magnetica o tramite Stomacher per rendere la sospensione omogenea.

#### *Pretrattamento*

La procedura permette la disgregazione delle particelle di campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei clusters microbici. Successivamente la sospensione di campione è trattata al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, favorendo contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

Sottoporre la sospensione del campione, per circa 15 sec, 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, sottoporre a sonicazione per circa 10 sec. Prima dell'omogeneizzazione è possibile eventualmente anche aggiungere Tween 80 ad una concentrazione di 0,1% (v/v).

Successivamente mantenere il campione per 15 min a 75±5°C a partire da acqua inizialmente fredda che, con il progressivo riscaldamento, innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

#### *Inseminazione per inclusione ed incubazione*

In funzione della tipologia e della qualità del campione da esaminare, inoculare 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).

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. Lasciare raffreddare ed aggiungere in ogni tubo alcuni millilitri di olio di vaselina per assicurare condizioni di anaerobiosi. In alternativa, porre i tubi in giara per anaerobiosi. Incubare a 36±1°C per 24+24 ore.

#### *Identificazione e conteggio delle colonie*

Escludere i tubi che presentano colonie invasive o patine batteriche che schermano la crescita nella massa del terreno. Prendere in considerazione i tubi in cui le colonie sono ben leggibili e separate. Annotare i conteggi relativi a due diluizioni successive contando le colonie nere, circondate da un alone nerastro, di dimensioni 0,3-0,5 mm di diametro, cresciute nello spessore dell'agar.

#### *Conferma*

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium*, è necessario eseguire, almeno sul 5% delle colonie sospette, la

colorazione di gram e la prova della catalasi. Nel caso in cui sia interesse, tra le colonie sospette, individuare in modo specifico *Clostridium perfringens*, una identificazione presuntiva può prevedere lo svolgimento di prove relative alla verifica della motilità (negativo), dell'idrolisi della gelatina (positivo) e della fermentazione del glucosio e del lattosio (positivo) (Koneman *et al.*, 1995).

Per una identificazione a livello di specie dei microrganismi isolati si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.

Per procedere allo svolgimento delle prove di conferma per l'appartenenza al genere, trasferire la colonia da saggiare, prelevata con un'ansa sterile, 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.

Incubare una piastra a 36±1°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. Procedere allo svolgimento della prova della catalasi.

#### 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).

Seminare la colonie da saggiare su agar nutritivo e incubare a 36±1°C per 24±2 ore in anaerobiosi. Strisciare su un vetrino da microscopio la colonia in esame, quindi ricoprire con una goccia di perossido d'idrogeno.

La reazione negativa, tipica del genere *Clostridium*, è evidenziata dalla mancata formazione di bolle (liberazione di gas).

#### Espressione dei risultati

Riportare il numero di spore di Clostridi solfito-riduttori come UFC/g o mL di campione esaminato, calcolando il numero di microrganismi sulla base della seguente formula:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

ove:

$\sum C$  = somma delle colonie nei tubi considerati

V = volume in mL dell'inoculo seminato in ogni tubo (in genere, 1 mL)

$n_1$  = numero dei tubi considerati per la prima diluizione

$n_2$  = numero dei tubi considerati per la seconda diluizione

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione

Arrotondare il risultato per eccesso o per difetto alle prime due cifre significative e, se uguale o superiore a 100, riportare il risultato come:

$$1,0 \pm 9,9 \times 10^0 \text{ UFC/g o mL}$$

ove:

UFC = Unità Formanti colonia;

$10^n$  = inverso del fattore di diluizione

#### Resoconto di prova

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

#### BIBLIOGRAFIA

Bonadonna L., Di Girolamo I. e Liberti R. (1995): "Studio preliminare sulle acque e sui sedimenti del fiume Arrone (Roma): aspetti microbiologici", *Acqua Aria*, **3**, 315-318.

Davies C.M., Long J.A., Donald M. and Ashbolt N.J. (1995): "Survival of fecal microorganisms in aquatic sediments of Sydney, Australia", *Applied Environmental Microbiology*, **61**, 1888-1896.

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R. jr., Janda W.M., Schreckenberger P.C. e Winn W.C. Jr. (1995): "Atlante di microbiologia diagnostica", II Ed. Delfino editore, Roma.

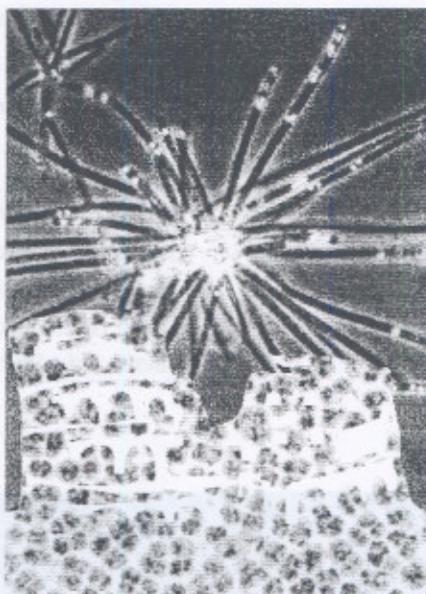
## PROVISIONAL PROGRAMME

3rd IWA International Specialised Conference on

# MICROORGANISMS IN ACTIVATED SLUDGE AND BIOFILM PROCESSES

Aula Convegni Consiglio Nazionale delle Ricerche,  
P.le Aldo Moro 7  
Rome, Italy

13 – 15 June 2001



Organized by  
The International Water Association (IWA) Specialist Group on  
Activated Sludge Population Dynamics  
and the Italian National Research Council, Water Research Institute Rome, Italy



### Purpose of the conference

The microbial complexity and the functions of the biomass present in activated sludge and biofilm systems is the subject of the 3<sup>rd</sup> Conference of the IWA Specialist Group on Activated Sludge Population Dynamics. A detailed knowledge of the identity, physiology and ecology of the microorganisms involved is crucial for any attempts to influence and modify the composition of the biomass.

Recently-introduced molecular biological methods permit one to directly address the population

structure, dynamics and function of these microbial communities. The use and benefits of molecular techniques in the identification of relevant bacterial groups present in the systems will be evaluated. Another focus will be on methods suitable for direct analysis of microbial activities. The behavior of microorganisms under different aeration conditions and substrate feeding patterns will be examined. Descriptions of new microorganisms will be presented. Particular emphasis will be given to work done in full-scale treatment plants to solve problems and improve performances.

The Conference aim will be to strengthen the co-operation of engineers, chemists, microbiologists and plant operators in establishing effective approaches for solving practical problems.

#### Conference on the web

Conference updates will be posted on the IWA Home Page at:  
<http://www.iawq.org.uk/confs/200106rome.htm>

#### Information

Dr. Valter Tandoi  
Dr. Carmela Maria Blundo  
CNR-IRSA  
Via Reno, 1  
00198-Rome, Italy  
E-mail: [tandoi@irsa.rm.cnr.it](mailto:tandoi@irsa.rm.cnr.it)  
E-mail: [blundo@irsa.rm.cnr.it](mailto:blundo@irsa.rm.cnr.it)  
fax: 39 068417861; tel.: 39 068841451

#### Important dates

April 30, 2001 Early registration deadline

#### Language/Lingua

The official language of the Conference will be English; simultaneous translation from English to Italian will be provided.  
La lingua ufficiale del Convegno è l'Inglese con traduzione simultanea in Italiano.

#### Registration fees

(including 20% Value Added Tax).

Registration includes Conference attendance, Proceedings, refreshments, lunches and banquet

Type	Euro
Early registration (IWA members)	450
Late registration (IWA members)	500
Early registration (non IWA members)	500
Late registration (non IWA members)	550
Bona-fide Students (letter required)	200

*istituto di ricerca sulle acque - cnr*

**NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI**

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

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

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

Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861

Direttore responsabile: R. Passino

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

Segreteria di redazione: C. M. Blundo

Stampato in proprio

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda

Allestimento e stampa: C. Pastore