

ALLEGATO 1

METODOLOGIE ANALITICHE UTILIZZATE

ANALISI FISICHE

Analisi granulometrica

Di ogni campione di sedimento sono stati prelevati circa 50-100 g umidi di materiale rappresentativo. La preparazione di ogni campione consiste di diverse fasi per una durata complessiva di circa 7 giorni per sedimenti prevalentemente sabbiosi, mentre per sedimenti contenenti frazioni più sottili sono necessari anche 10 giorni. Trattandosi di sedimenti composti da più frazioni granulometriche la procedura analitica è stata eseguita per *via umida*, per *via secca* e con il granulometro laser

La frazione di campione rappresentativa è stata sottoposta ai seguenti trattamenti:

- essiccazione in stufa termostatica ventilata a 105° C per 24 ore,
- raffreddamento in essiccatoio e successiva determinazione del peso ottenuto
- doppio lavaggio con acqua ossigenata, a seconda del contenuto in materiale organico, e lavaggio finale con acqua distillata
- essiccazione a 105°C forno ventilato, per circa 24 h sino a massa costante e lasciato raffreddare in essiccatoio alla temperatura ambiente e successiva determinazione del peso ottenuto
- lavaggio per via umida con setaccio 63 µ per separare la frazione sabbiosa dalla frazione da analizzare con il granulometro laser
- setacciatura a secco della frazione superiore a 63 µ utilizzando una pila di setacci della serie ASTM con apertura delle maglie da 4000 µ a 63 µ, e successiva determinazione dei pesi delle singole frazioni ottenute
- decantazione ed essiccazione in forno della frazione minore di 63 µ e successiva determinazione del peso ottenuto
- quartatura a secco della frazione minore di 63 µ sino ad ottenere un subcampione da utilizzare per l'analisi con il granulometro laser

- dispersione del subcampione in una soluzione acquosa con esametafosfato di sodio per 24 ore
- mescolamento della soluzione per 2 h con frullino a pale e quartatura per via umida della soluzione in 8 subcampioni da utilizzare per l'analisi con il granulometro laser.

I dati numerici ottenuti con le varie fasi analitiche sono stati utilizzati per la costruzione di curve cumulative e di frequenza. Le frazioni ottenute con le diverse tecniche sono state quindi classificate secondo la scala di Udden-Wentworth, e le normative AGI 1977, 1994.

Contenuto d'acqua

Ogni campione di sedimento da analizzare per il contenuto d'acqua è stato prelevato in situ e conservato in contenitore, precedentemente numerato e pesato in laboratorio, ben chiuso e conservato direttamente a 4°C. In laboratorio il contenitore è stato posto in stufa termostata a 105°-110°C per 24 h sino a massa costante e lasciato raffreddare in essiccatore alla temperatura ambiente e successivamente è stato determinato il peso. I dati numerici ottenuti sono stati espressi in percentuale.

Peso specifico dei granuli

Ogni campione di sedimento è stato opportunamente essiccato in stufa a 105°-110°C per 24 h, raffreddato in essiccatore, pestato delicatamente in mortaio e setacciato a 4750 μ e 425 μ per stabilire se utilizzare il picnometro o il volumetro; per ogni misura è stata pesata una aliquota di 10 g di campione ed è stata seguita la procedura come da normativa ASTM D854, utilizzando picnometri da 100 ml.

ANALISI CHIMICHE

Carbonio Organico Totale (TOC) e Azoto Totale (TN)

Il metodo analitico utilizzato è quello riportato in "Metodologie Analitiche di Riferimento (ICRAM, 2001)".

Un'aliquota di circa 25 mg di campione (pesato con la precisione di 0.1 mg), preventivamente essiccato alla temperatura di 36°, viene acidificato con 1M di HCl e posto in stufa a 60°C.

Il campione così preparato viene inserito all'interno dell'analizzatore elementare (ThermoElectron Flash EA1112) con un flusso di He di 300 ml/min e di ossigeno di 250 ml/min. La temperatura del forno di combustione e di ossidazione dell'analizzatore è stata rispettivamente di 1020 e 650°C.

Il 30% dei campioni è stato ripetuto almeno 2 volte per verificare la riproducibilità dei valori con un errore associato sulla singola misura del $\pm 5\%$. Inoltre, ogni 8 campioni è stato misurato uno standard di riferimento (Acetanilide - N:C 10.6%:71.2%). La tecnica utilizzata per la quantificazione del carbonio organico totale e dell'azoto totale nei campioni è quella dello standard esterno con retta di calibrazione a 5 punti.

Metalli pesanti (Al, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn, Hg, Cd, As)

Metodo attacco totale:

Le metodiche di mineralizzazione utilizzate sono quelle riportate in EPA 3052.

Una quantità di circa 250 mg di campione precedentemente essiccato a 30°C e polverizzato a $\phi < 30 \mu\text{m}$ è stata portata in soluzione tramite attacco acido totale.

Per la digestione dei sedimenti è stato utilizzato il forno a microne focalizzate Mars X della CEM. E' stata utilizzata una procedura a doppio step consistente in una prima fase di digestione (miscela acida: $\text{HNO}_3:\text{HF}:\text{HCl}=6:2:2$) dei campioni e una seconda fase di tamponamento dell'acido fluoridrico con acido borico (10 ml di una soluzione preparata con 15 g di H_3BO_3 in 250 ml di H_2O).

La prima fase consiste in due step:

- 1) Potenza 1200 W 15.00 min a 600 psi T=165°C
- 2) Potenza 1200 W 3.00 min a 600 psi T=200°C

La seconda fase consiste in due step:

- 1) Potenza 1200 W 12.00 min a 600 psi T=150°C
- 2) Potenza 1200 W 5.00 min a 600 psi T=200°C

Lo standard di matrice utilizzato per verificare le prove di recupero e l'affidabilità delle misure è stato il PACS-2 (i cui dati sono relativi a sedimenti di porto analizzati con digestione totale).

La tecnica di quantificazione in ICP-AES (EPA 6010c) è stata quella dello standard esterno con curve di calibrazione a 5 punti.

Il recupero stimato per i vari metalli è stato superiore al 95%.

Le analisi di tutti i metalli sono state eseguite con ICP-AES MPX Varian.

In tutte le operazioni analitiche è stata utilizzata acqua di tipo MilliQ e acidi ultrapure.

La deviazione standard associata alle singole misure è stata stimata essere $\pm 10\%$.

I risultati sono riportati come mg/kg di concentrazione rispetto a peso secco (T=105°C).

Idrocarburi C_{≤12}

Principio del metodo:

Circa 2g di sedimento sono raccolti in una vial da 20 ml per spazio di testa contenente 10 ml di acqua bidistillata. Al campione è inoltre aggiunto lo standard interno (BFB). Al momento dell'analisi, il campione viene inserito nello spazio di testa per agitazione e riscaldamento in un bagnetto ad 85 °C per 20 min. Il campione viene quindi iniettato nel GC-MS per quantificazione dei singoli composti volatili.

Apparecchiatura

Gasromatografo (Thermo Electron TRACE GC) equipaggiato con:

Rivelatore Spettrometro di Massa Quadrupolare (Thermo Electron DSQ) con Sorgente ad Impatto Elettronico (70eV),

Iniettore Split/Splitless, Spazio di Testa (TRIPLUS), controllato da PC.

Colonna capillare Restek-XT[®]-5 (95% dimetil-5% difenilpolisilossano): 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df.

Condizioni gascromatografiche

Temp. Max di esercizio della colonna: 350°C

Gas di trasporto: He; Flusso: 0.8 ml/min

Modalità Iniettore: Split; Split Flow 16; Split Ratio 20 ; Temp. Iniettore: 220°C.

Temp. Detector: 250°C.

Programmata termico del Forno:

	3°C/min.		60°C/min. .	
35°C	-----	75°C	-----	280°C
0.75min. .		5min		4 min.

Volume di iniezione 1µl.

Gli analiti investigati sono riportati nel Metodo EPA 5021 insieme ai differenti ioni qualificatori e quantificatori per ognuno delle singole molecole investigate.

Idrocarburi C>12

Principio del metodo:

Gli idrocarburi totali vengono estratti da campioni di terreno con tetracloroetene, purificati su colonna di gel di silice ed analizzati in FT-IR (metodo EPA 8440).

Reattivi e soluzioni standard

Tetracloroetene

Soluzione standard di n-esadecano, 2,2,4 Trimetilpentano.

Colonna silica-gel 60mesh 0.5gr

Sodio solfato anidro

Apparecchiatura

Normale vetreria da laboratorio.

FT-IR ThermoNicolet 200

Procedimento

5 g di campione terreno essiccato all'aria, pesati con la precisione di $\pm 0,01$ g, vengono estratti in bagno ad ultrasuoni per 20 minuti e centrifugato a 3000 rpm per 5 minuti.

Il campione viene quindi filtrato attraverso la SPE di gel di silice e quindi analizzata al FT-IR

Condizioni per l'analisi in FT-IR

L'intervallo di acquisizione per l'analisi degli idrocarburi è quello relativo a 2800-3015 cm^{-1} .

La valutazione del livello di concentrazione dei campioni è stata ottenuta confrontando i valori dell'altezza dello spettro $\sim 2940 \text{ cm}^{-1}$ con i valori ottenuti per le 5 miscele standard utilizzate per la calibrazione della retta di taratura e i cui valori di concentrazione variano tra 2 e 150 ppm.

Idrocarburi Policiclici Aromatici

Principio del metodo:

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici sono estratti da campioni di sedimento precedentemente essiccato all'aria setacciato e pestato, con una miscela di Esano:Acetone 80:20, concentrati a circa 1 ml, purificati su colonna di gel di silice ed analizzati in GC-MS in modalità SIM. La procedura prevede lo spiking del campione in fase di preparazione con standard di estrazione (sette IPA deuterati) ed interno (tre IPA deuterati) in grado di monitorare i valori del recupero dei diversi analiti nelle varie fasi di lavoro (estrazione e iniezione al GC/MS).

Reattivi e Soluzioni Standards

R1. Acetone per pesticidi

R2. Esano per pesticidi

R3. Cicloesano per pesticidi

R4. Sodio solfato anidro

R5. Terra di diatomee

a. Soluzione standard nativi da 1 ml di una miscela di IPA (Tab.1): 2µg/ml cadauno in toluene.

b. Soluzione standard deuterati di estrazione da 1 ml di una miscela di IPA (Tab.2): 2µg/ml cadauno in toluene.

c. Soluzione standard deuterati di siringa da 1 ml di una miscela di IPA (Tab.3): 2µg/ml cadauno in toluene.

d. Soluzioni standards di IPA per la curva di calibrazione a cinque punti con concentrazioni calcolate di 57, 113, 227, 454, 909 ng/ml, rispettivamente, preparati per diluizione della soluzione (a) con esano e per aggiunta di 50µl della soluzioni (b) e 50µl della soluzione (c).

e. Soluzione standard di estrazione: 0.01818 µg/ml viene preparata per diluizione della soluzione (b) con esano.

f. Soluzione standard interno: 0.091 µg/ml viene preparata per diluizione della soluzione (c) con esano.

Apparecchiatura:

Normale vetreria da laboratorio

Gascromatografo (Thermo Electron TRACE GC) equipaggiato con: Rivelatore Spettrometro di Massa Quadrupolare (Thermo Electron DSQ) con Sorgente ad Impatto Elettronico (70eV), Iniettore Split/Splitless, Autocampionatore per liquidi a 100 posti (TRIPLUS), controllato da PC.

Colonna capillare Restek-XT®-5 (95% dimetil-5%difenilpolisilossano): 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df.

Estrattore Accelerato con Solvente (Dionex ASE 200).

Tubi SPE, Silice 2g/15ml.

Turbo Vap® II.

Procedimento:

2g di campione essiccato all'aria, pesati con la precisione di $\pm 0.01g$, vengono trasferiti insieme a 2g di terra di diatomee in un tubo d'estrazione in acciaio da 33 mL per ASE a cui viene aggiunto 1 ml di standard SS (1.11). Si sottopone ad estrazione accelerata con una miscela Esano- Acetone 80:20 per pesticidi (miscela estraente) secondo il programma riportato:

Pressione: 1500 psi

Temperatura: 113°C

Static Time: 5 min.

Flush volume: 60%

Static cycle: 1

L'estratto raccolto in una vial in vetro scuro da 40 ml viene completamente portato a secco mediante TurboVap II sotto corrente di azoto anidro. Si effettua il cambio di solvente aggiungendo 1 ml di Cicloesano per pesticidi.

L'estratto viene trasferito su colonna di gel di silice contenente uno strato di sodio solfato anidro di 1 cm (previamente attivata con 25 ml di esano per pesticidi) ed eluito prima con 10 ml di esano che vengono scartati, e successivamente con 20 ml di una miscela Cicloesano-Acetone 70:30 che vengono raccolti in una vial e concentrati a circa 1 ml. L'eluato è infine trasferito in una vial da 1 ml per autocampionatore dove è portato completamente a secco mediante corrente di azoto e ripreso con 200 μ l della miscela standard IS (f).

1 μ l di tale soluzione è iniettato al GC-MS in modalità SIM.

Condizioni gas-cromatografiche

Temperatura Max di esercizio della colonna: 350°C

Gas di trasporto: He; Flusso: 1.2 ml/min

Modalità Iniezione:

Splitless

Splitless time: 1.50 min

Temperatura Iniettore: 280°C.

Temperatura Sorgente: 280°C.

Programmata termica del Forno:

	15°C/min.		7°C/min.	
80°C	-----	200°C	-----	305°C
1.5min.				10 min.
Run Time: 34.50 minuti				Volume di iniezione: 1µl.

TABELLA 1

- Naphthalene
- Acenaphthene
- Fluorene
- Phenanthrene
- Antracene
- Fluoranthene
- Pyrene
- Benz[a]anthracene
- Chrysene
- Benzo[b]fluoranthene
- Benzo[k]fluoranthene
- Benzo[e]pyrene
- Benzo[a]pyrene
- Perylene
- Indeno[1,2,3-cd]pyrene
- Benzo[ghi]perylene
- Dibenzo[a,h]antracene

PCB

Principio del metodo:

I PCB sono estratti da campioni di sedimento precedentemente essiccato all'aria setacciato e pestato, con una miscela di Esano ÷ Acetone 80:20, concentrati a circa 1 ml, purificati su colonna Florisil ed analizzati in GC-Ion Trap in modalità MS-MS.

Reattivi e Soluzioni Standards

1.1 Acetone per pesticidi.

1.2 Esano per pesticidi.

1.3 Isoottano per pesticidi.

1.4 Sodio solfato anidro.

1.5 Terra di diatomee.

1.6 Soluzione standard nativi da 1 ml di una miscela di PCB (Tab.1): 10µg/ml cadauno in isoottano.

1.7 Soluzione standard di estrazione PCB 105: 2µg/ml in nonano.

1.8 Soluzione standard di siringa PCB 209 in isoottano 2µg/ml.

1.9 Soluzioni standards di PCB per la curva di calibrazione (113-227-454-950-1050) ng/ml, sono preparati per diluizione della soluzione 1.6 con isoottano e per aggiunta di 50µl della soluzioni 1.7 (SS) e 50µl della soluzione 1.8 (IS).

1.10 Soluzione standard di estrazione (SS): 0.01818 µg/ml viene preparata per diluizione della soluzione 1.7 con isoottano.

1.11 Soluzione standard interno (IS): 0.091 µg/ml viene preparata per diluizione della soluzione 1.8 con isoottano.

Apparecchiatura:

Normale vetreria da laboratorio

Gascromatografo (Thermo Electron TRACE GC) equipaggiato con:

Rivelatore Spettrometro di Massa Quadrupolare (Thermo Electron DSQ) con Sorgente ad Impatto Elettronico (70eV),

Iniettore Split/Splitless, Autocampionatore per liquidi a 100 posti (TRIPLUS), controllato da PC.

Colonna capillare Restek-XT[®]-5 (95% dimetil-5% difenilpolisilossano): 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df.

Estrattore Accelerato con Solvente (Dionex ASE 200).

Tubi Florisil 1g-6ml I.

Procedimento:

2g di campione essiccato all'aria, pesati con la precisione di $\pm 0.01g$, vengono trasferiti insieme a 2g di terra di diatomee in un tubo d'estrazione in acciaio da 33 mL per ASE a cui viene aggiunto 1 ml di standard SS. Si sottopone ad estrazione accelerata con una miscela Esano- Acetone 80:20 per pesticidi (miscela estraente) secondo il programma riportato:

Pressione: 1500 psi

Temperatura: 113°C

Static Time: 5 min.

Flush volume: 60%

Static cycle: 1

L'estratto raccolto in una vial in vetro da 40 ml viene completamente portato a secco mediante TurboVap II sotto corrente di azoto anidro. Si riprende il campione con 1 ml una miscela Esano: Isoottano 1:1 per pesticidi.

L'estratto viene trasferito su colonna Florisil da 1g-6ml contenente uno strato di sodio solfato anidro di 1 cm (previamente attivata con 10 ml di esano per pesticidi) ed eluito con 20 ml di Esano: isoOttano 1:1 che vengono raccolti in una vial e concentrati a circa 1 ml. L'eluato è infine trasferito in una vial da 1 ml per autocampionatore dove è portato completamente a secco mediante corrente di azoto e ripreso con 200 µl della miscela standard IS.

Condizioni gascromatografiche

Temp. Max di esercizio della colonna: 350°C

Gas di trasporto: He; Flusso: 1.4 ml/min

Modalità Iniettore: Splitless w/Surge; Splitless time 1.50 min; Temp. Iniettore: 250°C.
Temp. Detector: 300°C.

Programmata termico del Forno:

	18°C/min.		6°C/min. .		50°C/min
40°C	-----	140°C	-----	290°C	-----315°C
2min. .					

Volume di iniezione: 1µl.

TABELLA 1

PCB Congeneri

28, 52, 77, 81, 101, 118, 126, 128, 138, 153, 156, 169 e 180.

Pesticidi organoclorurati ed esaclorobenzene

Principio del metodo

I pesticidi sono estratti da campioni di sedimento precedentemente essiccato all'aria setacciato e pestato, con una miscela di Esano ÷ Acetone 80:20, concentrati a circa 1 ml, purificati su colonna Florisil ed analizzati in GC-MS in modalità SIM.

Reattivi e Soluzioni Standard

1.1 Acetone per pesticidi.

1.2 Esano per pesticidi.

1.3 Isoottano per pesticidi.

1.4 Sodio solfato anidro.

1.5 Terra di diatomee.

1.6 Soluzioni standard nativi da 5 ml di ogni singolo pesticida elencato in TAB 1 da 100µg/ml.

1.7 Soluzione standard interno endosulfanlattone.

1.8 Soluzione standard di siringa tetracloro m-xylene .

1.9 Soluzioni standard di pesticidi per la curva di calibrazione (28; 56; 113; 227; 454) ng/ml, sono preparati per diluizione di una soluzione madre preparata a partire dai singoli pesticidi elencati in TAB.1 con isoottano e per aggiunta di 50µl della soluzioni 1.7 (SS) pari a 45 ppb e 50µl della soluzione 1.8 (IS) pari a 45 ppb.

1.10 Soluzione standard di estrazione (SS): 0.01818 µg/ml viene preparata per diluizione della soluzione 1.7 con isoottano.

1.11 Soluzione standard interno (IS): 0.045 µg/ml viene preparata per diluizione della soluzione 1.8 con isoottano.

Apparecchiatura

Normale vetreria da laboratorio

Gasromatografaco (Thermo Electron TRACE GC) equipaggiato con: Rivelatore Spettrometro di Massa Quadrupolare (Thermo Electron DSQ) con Sorgente ad Impatto Elettronico (70eV), Iniettore Split/Splitless, Autocampionatore per liquidi a 100 posti (TRIPLUS), controllato da PC.

Colonna capillare Restek-XT[®]-5 (95% dimetil-5%difenilpolisilossano): 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df.

Estrattore Accelerato con Solvente (Dionex ASE 200).

Tubi Florisil 1g-6ml I.

Procedimento

2g di campione essiccato all'aria (granulometria < 2 mm), pesati con la precisione di ± 0.01g, vengono trasferiti insieme a 2g di terra di diatomee in un tubo d'estrazione in acciaio da 33 mL per ASE a cui viene aggiunto 1 ml di standard SS (1.10). Si sottopone ad

estrazione accelerata con una miscela Esano- Acetone 80:20 per pesticidi (miscela estraente) secondo il programma riportato:

Pressione: 1500 psi

Temperatura: 113°C

Static Time: 5 min.

Flush volume: 60%

Static cycle: 1

L'estratto raccolto in una vial in vetro da 40 ml viene completamente portato a secco mediante una pompa da vuoto. Si riprende il campione con 1 ml una miscela Esano: Isoottano 1:1 per pesticidi.

L'estratto viene trasferito su colonna Florisil da 1g-6ml contenente uno strato di sodio solfato anidro di 1 cm (previamente attivata con 10 ml di esano per pesticidi) ed eluito con 20 ml di Esano: isoOttano 1:1 che vengono raccolti in una vial e concentrati a circa 1 ml. L'eluato è infine trasferito in una vial da 1 ml per autocampionatore dove è portato completamente a secco mediante corrente di azoto e ripreso con 200 µl della miscela standard IS (**1.11**).

Condizioni gascromatografiche

Temp. Max di esercizio della colonna: 350°C

Gas di trasporto: He; Flusso: 1.4 ml/min

Modalità Iniettore: Splitless; Splitless time 1.50 min; Temp. Iniettore: 250°C.

Temp. Detector: 300°C.

Programmata termico del Forno:

	18°C/min.		10°C/min. .		50°C/min	
70°C	-----	170°C	-----	300°C	-----	315°C
1min.						7.14min

Volume di iniezione: 1 μ l.

TAB.1

BHC alfa

BHC gamma

BHC beta

Dieldrin

Aldrin

Endrin

Cis Nonacoloro

Trans Nonacoloro

Trans Chlordane

Cis Chlordane

44 DDE

44DDD

44DDT

24 DDE

24DDD

24DDT

Eptacloro

Eptacloro epossido

Ossiclordano

Mirex

Metossicloro

Esaclorobenzene

Σ TBT

L'analisi dei composti organostannici espressa come Σ TBT è stata eseguita tramite estrazione in ASE 200 e conseguente analisi dell'estratto in ICP-MS.

Condizioni strumentali per l'estrazione in ASE 200

Volume celle: 40 ml

Peso del campione: 2g

Solvente di estrazione: Acetato di sodio 1M, Acido acetico in metanolo (1:1)

Pressione: 1500 psi

Temperatura del forno: 100°C

Volume di flushing: 60% volume celle di estrazione

Purge in azoto: 150 psi per 60 sec

L'estratto viene analizzato in ICP-MS per la quantificazione dello Sn. La curva di taratura è stata costruita con la tecnica dello standard esterno con 5 punti di calibrazione.

Le prove di recupero effettuate sulla matrice certificata BCR646 hanno dato valori superiori al 95%.

Fosforo totale

Il campione di sedimento, preventivamente essiccato a 30° per 24 ore, viene pesato in quantità pari a circa 40 mg (con la precisione di 0,1 mg) ed è introdotto in un contenitore da reazione (vessel da digestione). Utilizzando una pipetta, viene addizionata, in ogni vessel, una quantità di 25 ml di soluzione ossidante costituita da:

45 grammi di persolfato di potassio ($K_2S_2O_8$);

9,5 grammi di idrossido di sodio (NaOH);

1 litro di acqua ultrapura.

Ciascun contenitore di reazione, opportunamente munito di tappo, camicia e contro dilatatore assiale, è trasferito nel microonde CEM Mars X, disposto nell'apposito alloggio e sottoposto alla procedura CEM di digestione che prevede due step consecutivi: il microonde MDS viene programmato per dieci minuti al 100% della potenza (961 Watts) e

il controllore della pressione è settato a 30 psi; il microonde MDS viene programmato per trenta minuti al 100% della potenza (961 Watts) e il controllore della pressione è settato a 135 psi. Durante ogni ciclo di digestione è prevista tra i campioni la presenza di un bianco, costituito esclusivamente da 25 ml di soluzione ossidante. Al termine del processo, ciascun vessel è lasciato raffreddare alla temperatura ambiente e, successivamente, la soluzione viene diluita a 100 ml in un matraccio tarato.

Metodo colorimetrico

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso fosfomolibdico di colore blu (del gruppo dei blu di molibdeno) la cui concentrazione viene misurata per via colorimetrica. In particolare gli ioni ortofosfato formano, con gli ioni molibdato in soluzione solforica, acido fosfomolibdico; quest'ultimo viene ridotto con acido ascorbico a blu di fosfomolibdeno, la cui concentrazione viene determinata fotometricamente. In seguito alla fase di ossidazione del campione e di successiva filtrazione, un'aliquota pari a 5 ml viene pipettata in una provetta e trattata con i Kit della Merck Spectroquant per analisi fotometriche. Lo spettrofotometro utilizzato è il Varian Cary 50. Il Kit utilizzato (1.14848.0001) presenta le seguenti caratteristiche operative: lunghezza d'onda pari a 710 nm, valore corrispondente al massimo dell'assorbanza; cuvetta caratterizzata da un cammino ottico pari a 10 mm; intervallo di misura degli ioni ortofosfato: $0,2 \div 15,3 \text{ mg/l PO}_4^{3-}$. Dopo l'aggiunta dei reattivi presenti nel Kit, nelle opportune quantità e modalità, e dopo un tempo di reazione di circa cinque minuti, il campione viene passato allo spettrofotometro. La tecnica di quantificazione utilizzata è quella dello standard esterno con retta di calibrazione a 5 punti. Al fine di valutare la riproducibilità dei risultati, l'analisi relativa al 20% dei campioni è stata ripetuta due volte, con un errore associato alla singola misura pari a $\pm 10\%$.

ANALISI MICROBIOLOGICHE

Per le analisi microbiologiche sono stati applicati i protocolli standard e le metodiche riportate nel Manuale ICRAM, ottobre 2002. Le schede relative ai risultati sono riportate nell'ALLEGATO 3.

Preparazione del campione

Per ottenere una dispersione omogenea dei microrganismi, subito dopo la consegna in laboratorio, il campione di sedimento è stato sottoposto ad una fase di diluizione-omogeneizzazione in soluzione fisiologica tamponata, su agitatore magnetico per 15 minuti. Successivamente, dalla sospensione sono state effettuate diluizioni seriali decimali utilizzate per l'inoculo in terreni di coltura specifici.

Ricerca spore di clostridi solfito-riduttori

Dopo omogeneizzazione, la sospensione di sedimento è stata sottoposta ad un pretrattamento a 75°C per 15 minuti per eliminare le forme vegetative dei batteri sporigeni. Il conteggio delle spore di clostridi solfito-riduttori è stato effettuato utilizzando la tecnica dell'inclusione in terreno di coltura SPS, così come descritto dal manuale ICRAM-Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, scheda 6 – Analisi di spore di clostridi solfito-riduttori.

Escherichia coli

Il conteggio di E. coli è stato condotto secondo la tecnica MPN utilizzando un terreno di coltura a base di MUG (4-metilumbelliferil- β -D-Glucuronide), peptone, salicina e Triton X. E. coli, se presente nel campione, idrolizza il MUG in 4-metilumbelliferone e nel suo costituente glucuronide. La produzione di 4-metilumbelliferone, indicata dalla comparsa di una fluorescenza blu, può essere osservata con l'ausilio di una lampada UV a 366 nm. L'utilizzo di una elevata concentrazione di peptone e salicina consente un eccellente recupero dei batteri da ambienti stressanti, mentre il Triton X favorisce la dispersione dei microrganismi e del fluorogeno nel terreno di coltura.

L'uso di questo specifico terreno è stato reso necessario per aumentare la specificità e sensibilità del metodo in relazione alla particolare natura dei campioni da esaminare.

Streptococchi fecali

Il conteggio degli streptococchi fecali è stato condotto secondo la tecnica MPN utilizzando un terreno di coltura a base di MUD (4-metilumbelliferil- β -D-Glicoside). La particolare composizione del terreno di coltura consente un ottimo recupero di questi batteri da ambienti marini. L'elevata concentrazione di peptone e galattosio permette una rapida crescita anche dei batteri stressati, il polisorbato, il monopotassio fosfato e l'idrogenocarbonato di sodio migliorano la resa del terreno, l'acido nalidixico blocca la replicazione del DNA nei batteri sensibili e il tallio acetato inibisce la maggior parte della microflora contaminante. In questo modo si assicura una conta ottimale di streptococchi fecali in quasi completa assenza di altri batteri. Gli streptococchi, se presenti nel campione inoculato, idrolizzano il MUD in 4-metilumbelliferone e glucosio. La produzione di 4-metilumbelliferone, indicata dalla comparsa di una fluorescenza blu, può essere osservata con l'ausilio di una lampada UV a 366 nm.

L'uso di questo specifico terreno è stato reso necessario per aumentare la specificità e sensibilità del metodo in relazione alla particolare natura dei campioni da esaminare.

Salmonella spp.

Dal campione omogeneizzato sono stati prelevati 10 g ed inoculati in 90 mL di acqua peptonata tamponata. Dopo incubazione sono stati effettuati due arricchimenti, uno in Selenite broth ed un altro in Tetrathionate Broth. Gli arricchimenti sono stati incubati a 37°C fino a 5 giorni. Subculture sono state preparate inoculando McConkey agar e SS agar. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore sono state selezionate le colonie con morfologia tipica, che sono state sottoposte ad analisi biochimiche e sierologiche.

Espressione dei risultati

Per Salmonella i risultati sono stati riportati come presenza o assenza in 10g di sedimento (peso umido), mentre per streptococchi fecali, spore di clostridi solfito-riduttori, ed E. coli le concentrazioni sono state espresse come UFC o MPN g⁻¹ di sedimento (peso umido).