



Utilizzo dei molluschi bivalvi nel programma di monitoraggio dell'ambiente costiero (*Protocollo Mussel Watch*)

→ INTRODUZIONE

L'impiego dei molluschi bivalvi nel monitoraggio della contaminazione chimica degli ambienti costieri è, da decenni, utilizzato sia negli Stati Uniti sia in numerosi Paesi europei in programmi internazionali di Mussel Watch.

La caratteristica più importante, che la specie scelta come bioindicatore deve presentare, è la mancanza di meccanismi biochimici o fisiologici in grado di regolare le concentrazioni tissutali dei contaminanti. In questo modo, infatti, l'organismo concentra queste sostanze nei propri tessuti in maniera proporzionale al loro livello ambientale.

I principali vantaggi offerti da un programma di monitoraggio condotto mediante l'utilizzo di bioindicatori si possono riassumere nei seguenti punti:

- valutazione del grado di contaminazione dell'area costiera secondo una misura "integrata nel tempo" e non riferibile, quindi, al solo momento in cui è stato effettuato il prelievo;
- possibilità di evidenziare facilmente gradienti di inquinamento sia in senso spaziale che temporale, nonché di effettuare confronti tra aree geograficamente distanti;
- stima della "biodisponibilità" delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente marino e valutazione del rischio legato al trasferimento di questi elementi attraverso le catene alimentari.

Tuttavia, il corretto utilizzo di organismi bioindicatori in programmi di biomonitoraggio non può prescindere dalla conoscenza che alcune variabili biologiche sono note influenzare l'accumulo dei contaminanti negli organismi. L'effetto di queste variabili deve dunque essere attentamente considerato sia per una impostazione rigorosa del programma di monitoraggio che per una corretta interpretazione dei risultati ottenuti.

Vengono di seguito riportate alcune indicazioni di carattere generale.

→ ORGANISMI DA CAMPIONARE

Esistono alcuni requisiti considerati indispensabili affinché una specie possa essere utilizzata come bioindicatore. Tra questi, l'assenza di meccanismi di regolazione delle concentrazioni tissutali di contaminanti, la sessilità, le abitudini alimentari preferibilmente di tipo filtratorio, facilità di raccolta, ampia diffusione geografica ed infine, ma non per questo meno importante, la conoscenza del ciclo biologico.

La specie sicuramente più utilizzata a livello mondiale per questo tipo di studi è il mitilo comune, per il quale la letteratura internazionale offre numerosi dati di riferimento ed indicazioni sulle principali variabili biologiche da considerare nell'interpretazione dei dati.

Si raccomanda pertanto che il presente programma sia effettuato esclusivamente mediante l'utilizzo del mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis*.

→ UTILIZZO DI INDIVIDUI APPARTENENTI A POPOLAZIONI NATURALI

In questo caso i mitili da analizzare sono quelli provenienti da popolazioni naturali, comprese quelle che si trovano su strutture artificiali come piloni, catene sospese, pali ecc., ma comunque non soggette ad esposizione all'aria (come ad esempio nelle pozze di scogliera). Per quelle Regioni in cui possa essere difficile il reperimento di organismi naturali, lo studio di biomonitoraggio potrà essere effettuato mediante l'utilizzo di organismi "trapiantati" secondo quanto verrà descritto in seguito.

I mitili provenienti da popolazioni naturali dovranno essere campionati in modo tale da selezionare almeno 150 individui di taglia approssimativamente compresa tra il 70-90% della media delle taglie massime osservate. Se non si raggiunge il numero di 150 individui, procedere come descritto nel paragrafo "Utilizzo di individui trapiantati".

Il periodo di esposizione dovrà coincidere con il periodo di massima maturazione presunta, in quanto variabile geograficamente.

I periodi di campionamento dovranno fissarsi in relazione ai periodi di minore e maggiore accrescimento gonadico. Tali periodi variano a seconda delle caratteristiche idrologiche dei bacini e vanno perciò fissati in sede locale in base alle indicazioni fornite dalla letteratura e dagli operatori del settore della mitilocoltura, tenendosi comunque negli intervalli, rispettivamente, di gennaio-marzo e di agosto-ottobre.

I due periodi di campionamento sono stati selezionati al fine di acquisire informazioni riguardo l'influenza che lo stato di maturazione sessuale esplica sulla capacità di bioaccumulo dell'organismo.

Negli organismi destinati alle analisi dovranno essere misurati i principali parametri biometrici secondo quanto indicato nell'apposito protocollo.

→ UTILIZZO DI INDIVIDUI TRAPIANTATI

In quelle aree in cui vi siano difficoltà reali nel reperimento di mitili naturali, l'indagine di monitoraggio potrà essere effettuata secondo la tecnica degli organismi trapiantati.

In questo caso i mitili dovranno essere raccolti da una popolazione naturale proveniente da un sito di controllo o di allevamento e traslocati per un periodo di 4 settimane nelle aree da monitorare prive di organismi nativi (compresa almeno un'area di bianco, anche se la medesima del sito di prelievo), senza alcuna stabulazione e con uguale procedura di trattamento per tutti i campioni utilizzati.

Gli organismi da trapiantare dovranno essere in numero compreso tra 200 e 300 individui, di taglia omogenea approssimativamente compresa tra il 70 e il 90% delle dimensioni massime della popolazione da cui sono raccolti.

Il trapianto sarà effettuato mantenendo gli organismi in reti di nylon, strutture plastiche o di acciaio inossidabile da fissare nella stazione da monitorare, ad una profondità compresa tra 1 e 5 metri e ad almeno 1 metro dal fondo.

Il periodo di esposizione dovrà coincidere con il periodo di massima maturazione presunta, in quanto variabile geograficamente.

Trascorse 4 settimane, gli organismi traslocati verranno recuperati e conservati fino al momento dell'analisi.

Anche per questi individui dovranno essere accuratamente misurati tutti i parametri morfometrici secondo quanto già indicato per le popolazioni naturali.

Si sottolinea l'importanza della misura accurata dei parametri indicati, che renderà possibile valutare l'effetto delle variazioni ponderali degli organismi (legate ad es. al ciclo riproduttivo) sulle fluttuazioni stagionali delle concentrazioni dei contaminanti. Sarà oltremodo possibile stabilire se (ed in che misura) eventuali differenze tra stazioni diverse possano essere legate a variazioni nelle condizioni metaboliche degli organismi utilizzati, piuttosto che a diversi livelli ambientali dei contaminanti.

→ CONSERVAZIONE NEL TRASPORTO

Dopo il prelievo, i campioni destinati allo studio del bioaccumulo possono essere congelati a -20°C o mantenuti refrigerati a circa 4°C in ambiente umido, ma non immersi, fino a 24 ore dal momento del prelievo.

Qualora si intenda estendere lo studio ad altre indagini che prevedono una migliore conservazione (ad es. analisi dei biomarker), i campioni dovranno essere posti e mantenuti in azoto liquido.

BIBLIOGRAFIA

- Lobel P.B., Bajdik C.D., Belkhole S.P., Jackson S.E., Longerich H.P. (1991) *Improved protocol for collecting Mussel Watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 409-411.
- Phillips D.J.H., Segar D.A. (1986) *Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives*. Marine Pollution Bulletin, 1, 10-17.

- Regoli F., Orlando E. (1993) *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses. *Science of Total Environment Supplement*, 2, 1283-1292.
- Regoli F., Orlando E. (1994) *Seasonal variation of trace metal concentrations (Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) in the digestive gland of Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis: comparison between a polluted and a non polluted site*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(1), 36-43.
- Regoli F., Orlando E. (1994) *Bioavailability of "Biologically detoxified" lead: risks arising from consumption of polluted mussels*. *Environmental Health Perspectives*, 102, Supplement 3, 335-338.
- Regoli F., Orlando E. (1994) *Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) in the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis during a field transplant experiment*. *Marine Pollution Bulletin*, 28, 592-600.

a cura di

David PELLEGRINI, Claudia VIRNO LAMBERTI (ICRAM, Roma)

Francesco REGOLI (Istituto Biologia e Genetica, Università di Ancona)

Silvano FOCARDI (Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena)



Raccolta e preparazione dei molluschi

Tratto e modificato da: UNEP/FAO/IAEA (1984) *Sampling of selected marine organisms and sample preparation for the analysis of chlorinated hydrocarbons*. Reference Methods for Marine Pollution Studies n. 12 Rev. 1, UNEP

→ PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Come già indicato nella scheda precedente, che riporta il protocollo del *Mussel Watch*, dopo il prelievo, i campioni destinati allo studio del bioaccumulo possono essere mantenuti refrigerati a circa 4°C, in ambiente umido ma non immersi in acqua, fino a un massimo di 24 ore dal momento del prelievo; ovvero essi possono essere congelati a -20°C. Qualora si intenda estendere lo studio ad altre indagini che prevedono una migliore conservazione (ad es. analisi dei biomarker), i campioni dovranno essere posti e mantenuti in azoto liquido.

Gli organismi selezionati dovranno essere di taglia omogenea. Si raccomanda che questa sia approssimativamente compresa tra il 70 e il 90% della taglia massima della popolazione. Va raccolta la parte molle di almeno 30 organismi (suddivisi in almeno 3 replicati), ciascun replicato contenente i tessuti di 10 animali.

Deve essere usata la massima cura nell'evitare la contaminazione del campione durante la fase di manipolazione del materiale da analizzare; pertanto gli organismi dovranno essere maneggiati con le dovute cautele al fine di ridurre i rischi di contaminazione.

Analisi di composti organici

È importante evitare il contatto dei campioni con materiale plastico.

Va utilizzato materiale di pyrex o di porcellana o di plastica rivestita di alluminio decontaminato, bisturi, pinzette, coltelli in acciaio inossidabile decontaminati.

Tutto il materiale deve essere ben lavato con detergente, risciacquato con acqua distillata e con acetone.

Analisi dei metalli in tracce

Va utilizzato materiale da dissezione (coltelli, scalpelli, bisturi, pinzette e forbici) in acciaio inossidabile o teflon.

→ PROCEDIMENTO

- Annotare i parametri biometrici (peso delle carni, lunghezza e peso delle conchiglie) degli organismi destinati alle analisi.
- Ripulire tali organismi da eventuali incrostazioni presenti sulle valve, rimuovendo il materiale estraneo con un coltello pulito.
- Lavare ciascun esemplare con acqua distillata o con acqua di mare pulita.
- Estrarre il bisso dalle valve chiuse.
- Usare un secondo coltello pulito: inserirlo fra le valve dove estrude il bisso ed aprirle con delicatezza tagliando il muscolo adduttore posteriore (Fig. 1).
- Assicurarsi che il bisso sia stato eliminato completamente.

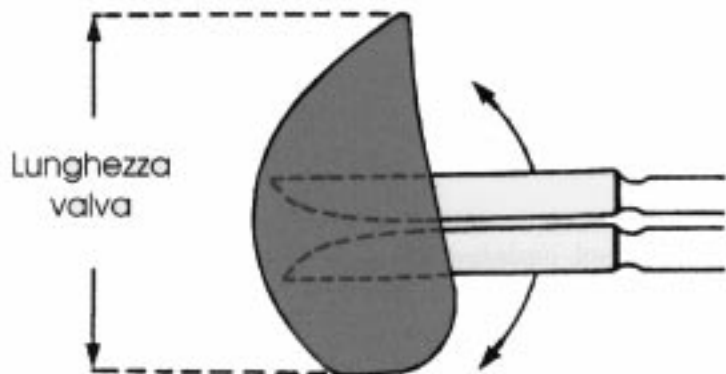


Fig. 1- Apertura del mitilo.



- Lavare il tessuto molle del mitilo con acqua distillata.
- Prelevarlo con pinzette pulite e sgocciolarlo.
- Raccogliere la parte molle.
- Annotare il peso composito delle parti molli considerate, che sarà registrato come *peso del pool campione*.
- Le parti molli raccolte vanno chiuse in fogli di alluminio decontaminato (nel caso dell'analisi di composti organici) o in idonei contenitori – buste di plastica – (nel caso dell'analisi di metalli in traccia) ed analizzate. Se i campioni non vengono analizzati subito, è possibile congelarli a -20°C, dopo averli posti in contenitori etichettati.
- Per l'analisi di metalli in tracce, i campioni essiccati che non vengono sottoposti immediatamente al ciclo di mineralizzazione devono essere conservati in essiccatore.

Per ogni pool-campione deve essere predisposta una scheda recante le specifiche del campionamento e la registrazione dei parametri, quali il numero di organismi considerato, la lunghezza media delle valve ed il peso del pool-campione.

→ **NOTA**

Ricordare che:

- per i mitili la lunghezza totale delle valve va misurata come indicato nella figura 1;
- per peso dell'organismo ci si riferisce al peso fresco dell'intero mitilo;
- per peso del campione ci si riferisce al peso totale dei tessuti molli (pool-campione);
- le lunghezze medie ed i pesi medi si riferiscono alla media aritmetica dei pesi e delle lunghezze di singoli individui;
- calcolare sempre le deviazioni standard.



Analisi dei composti organoclorurati

→ ANALISI

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

Tutta la vetreria usata deve essere ben lavata e decontaminata e i reagenti usati devono essere di grado RPE (puri per analisi di pesticidi).

→ PRINCIPIO DEL METODO

- Estrazione con miscela acetone + etere di petrolio (1:1).
- Ripartizione in fase solida e colonna cromatografica di Florisil.
- Determinazione con Gascromatografia capillare e Rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

→ ESTRAZIONE

25-30 g di campione vengono omogenizzati con miscela acetone-etere di petrolio (1 : 1, v : v) (1 x 100 ml e 2 x 50 ml) con omogenizzatore UltraTurrax. Il solvente derivante dalle estrazioni viene prelevato e passato su colonna di 25 g di sodio solfato anidro (200 x 20 mm d.i.).

Lavare la colonna di sodio solfato con 4 x 5 ml di etere di petrolio.

Raccogliere gli eluati e concentrarli a secco con evaporatore rotante (40°C; pressione ridotta).

Pesare il residuo oleoso e trasferire 1 g di olio in 2,5 ml di n-esano su colonna pronta all'uso Extrelut 3 (Merck). Attendere 10 minuti poi eluire con 4 x 5 ml di CH₃CN.

Trasferire l'eluato su una colonna impaccata con 0,72 g di miscela 1+1 di Extrelut 3+ C₁₈.

Eluire la colonna con 3 x 10 ml di etere di petrolio.

Raccogliere gli eluati, concentrarli a secco con rotavapor e riprendere con 1 ml di etere di petrolio.

Apparecchiature e reagenti:

- vetreria da laboratorio decontaminata
- omogenizzatore UltraTurrax T 25
- rotavapor
- gascromatografo con rivelatore ECD
- etere di petrolio 40°-60°
- acetone
- esano
- etilacetato
- acetonitrile
- sodio solfato anidro
- Extrelut 3
- isoottano
- Florisil

→ PURIFICAZIONE

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

Lavare la colonna con 3 x 5 ml di etere di petrolio e scartare i lavaggi.

Trasferire quantitativamente sulla colonna l'estratto grezzo effettuando la-

vaggi della beuta con 3 x 1 ml di etere di petrolio 40-60°.

Eluire la colonna con:

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

Raccogliere i 3 eluati in 3 beute da 100 ml.

Nel primo eluato si troveranno PCBs, DDE, Aldrin, HCB, Clordano, Mirex.

Nel secondo eluato si troveranno DDT, DDD, HCHs, clordano.

Nel terzo eluato si troveranno Dieldrin, Endrin e Metossicloro.



Concentrare ciascun eluato a piccolo volume con rotavapor e poi a secco per rotazione manuale. Riprendere con 1 ml di isoottano. Iniettare.

→ DETERMINAZIONE GAS-CROMATOGRAFICA

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

È consigliabile, per la conferma, utilizzare due diverse colonne. Si citano ad esempio:

DB1 (15 m x 0.53 mm d.i. x 1,5 µm di spessore)

DB 1701 (15 m x 0.53 mm d.i. x 1 µm di spessore)

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

Determinare la concentrazione dei composti identificati, confrontando le altezze o le aree con quelle dei picchi ottenuti iniettando quantità note dei composti standard e tenendo conto delle diluizioni effettuate.

Devono essere condotte prove in bianco con i reattivi.

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

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

→ RAPPRESENTAZIONE DEL DATO

Le concentrazioni dei composti considerati devono essere *esprese in µg/kg per unità di peso secco*.

Nella stessa unità di misura deve essere indicato il limite di quantificabilità analitica. Per questo metodo il limite di determinazione è pari a 0,01 µg/kg.

BIBLIOGRAFIA

- Di Muccio A., Stefanelli P., Funari E., Pelosi P., Generali T., Amendola G. (1999) *Levels of contamination by chlorobiphenyls in edible fishes in Adriatic sea during 1997*. Society Of Environmental Toxicology And Chemistry (SETAC)-Europe, 25-29 May 1999, Leipzig, Germany, p.120.
- Di Muccio A., Stefanelli P., Funari E., Pelosi P., Generali T., Amendola G. (2000) *Levels of contamination by chlorobiphenyls in the edible portion of fishes, shellfishes and crustaceans from Adriatic sea during 1997*. 3rd European Pesticide Residue Workshop (EPRW 2000), York (UK), 3-5 July 2000.



Analisi di tributilstagno (TBT), dibutilstagno (DBT) e monobutilstagno (MBT)

→ ANALISI

I campioni devono essere conservati in contenitori di ceramica lavati con acetone e n-esano e conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento delle analisi.

→ ESTRAZIONE

Omogenizzare il campione (5 g) con 40 ml di una soluzione tropolone/acetone 0,1%* e 10 ml di una soluzione di HCl 1N** in UltraTurrax (velocità 80 rpm x 100 per 50 secondi seguiti da 1 minuto di pausa per 4 volte, 200 secondi complessivi).

Lasciare il campione nella provetta per 12 ore per la digestione.

→ SEPARAZIONE

Agitare per 10 minuti il campione con 500 ml di H₂O e 50 ml di una soluzione tropolone/toluene 0,1%***. Se necessario, aggiungere 5 g di CaCl₂ per facilitare la formazione dell'emulsione durante l'estrazione. Filtrare il campione attraverso un imbuto con setto inerte e lavare con 40 ml di acetone/tropolone.

Dopo la separazione (circa 30 minuti), raccogliere la fase apolare contenente il campione in un imbuto separatore da 300 ml, filtrando attraverso un imbuto con setto e lavando con la soluzione tropolone/acetone.

Agitare nuovamente la fase polare e 50 ml di soluzione tropolone/toluene in un imbuto separatore per 10 minuti e lasciare separare per 1 ora.

A separazione avvenuta, scartare la fase polare.

Filtrare la fase apolare attraverso l'imbuto con setto e aggiungere all'altra, precedentemente raccolta, nell'imbuto separatore da 300 ml.

→ PURIFICAZIONE DEL CAMPIONE

Impaccare una colonna con 35 g di Na₂SO₄, essiccato in stufa a 105°C per 1 ora.

Eluire il campione e raccogliere in un pallone per evaporatore rotante.

Concentrare a 2-3 ml.

→ ANALISI SPETTROFOTOMETRICA DEL TBT

Portare il campione a secco con l'evaporatore rotante.

Il residuo viene ripreso con 4 ml di esano, tre di questi vengono posti in provette di vetro.

Alla soluzione si aggiungono 3 ml di NaOH al 3% (v/v) per eliminare lo stagno inorganico e le forme mono- e di-alchilstagno.

Si prelevano 2 ml di esano e si trasferiscono in provette da 5 ml per evaporarli a secco sotto azoto.

Il residuo viene digerito con 1 ml di HNO₃ al 69% per 1 ora a 120°C.

Si fa evaporare l'acido innalzando la temperatura a 150°C con le provette aperte.

Il residuo viene ripreso con 2 ml di soluzione satura di acido borico con l'1% di HCl.

* La soluzione è stata ottenuta miscelando 0,39 g di tropolone in 500 ml di acetone (tropolone: 2,3,5-trifeniltretazolo cloridrato).

** La soluzione è stata ottenuta miscelando 2,2 g di HCl in 60 ml di H₂O.

*** La soluzione è stata ottenuta miscelando 0,56 g di tropolone in 650 ml di toluene.

Lo stagno viene analizzato allo Spettrofotometro con la tecnica HGA-AS.

Le concentrazioni sono espresse in ng/g rispetto al peso fresco.

Il limite di determinazione del metodo è di 5 ng/g.

→ **ANALISI GASCROMATOGRAFICA**
(SEPARAZIONE DELLE VARIE FORME DI ALCHIL-STAGNO)

Derivatizzazione

Trasferire il campione in una provetta da 20 ml e concentrare a volume finale 5 ml (in toluene).

Aggiungere 5 ml di n-propil magnesio bromuro (reattivo di Grignard $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{MgBr}$; 2 mol/L circa).

Agitare le provette in acqua fredda e lasciare a 40°C per 30 minuti. Eliminare il reattivo di Grignard aggiungendo 20 ml di una soluzione di H_2SO_4 1N*.

Aggiungere il contenuto di ciascuna provetta a 40 ml di H_2O e 10 ml di una soluzione toluene/n-esano 10%.

Agitare di nuovo la fase polare con 10 ml della soluzione toluene/n-esano 10% (10 minuti) e lasciar separare.

Concentrare le due fasi apolari ottenute a 5 ml con evaporatore rotante.

Scartare la fase polare.

Purificazione del campione

Impaccare la colonna con 20 g di Florisil non attivato.

Dopo aver trasferito il campione in colonna, evaporare sotto N_2 a flusso lento per circa 2-3 ore.

Eluire con 120 ml di acetonitrile e 30 ml H_2O , raccogliendo in un imbuto separatore contenente 600 ml di H_2O e 100 ml di n-esano.

Agitare la soluzione contenente il campione per 10 minuti e lasciar separare.

Separare ancora la fase polare con 100 ml di soluzione toluene/n-esano 10%.

Scartare la fase polare.

Concentrare le due fasi apolari a 5 ml in evaporatore rotante e trasferire in una provetta da 20 ml.

Impaccare le colonne con 6 g di Florisil essiccato in stufa (130°C per 12 ore).

Eluire il campione con 40 ml di n-esano.

Concentrare l'eluato ad un volume finale esatto di 5 ml.

→ **ANALISI GASCROMATOGRAFICA**

Utilizzare un gascromatografo con rivelatore fotometrico a fiamma (FPD), dotato di un filtro per emissioni di stagno regolato su 610 nm e colonna capillare di silice fusa a fase legata del tipo SBP-5, lunghezza 30 m, spessore del film 0,25 μm , diametro interno 0,2 mm.

Le concentrazioni sono espresse in ng/g rispetto al peso fresco.

Il limite di determinazione del metodo è di 5 ng/g per ciascuna delle forme di alchil-stagno determinate (MBT, DBT e TBT).

* La soluzione è stata ottenuta miscelando 4,9 g di H_2SO_4 in 100 ml di H_2O .



Analisi di idrocarburi policiclici aromatici

→ PRINCIPIO DEL METODO

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

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

In alternativa al cromatografo liquido (HPLC), ove le concentrazioni lo permettano, può essere utilizzata la gas-cromatografia con colonna capillare, con rivelatore FID o accoppiato con uno spettrometro di massa. Indipendentemente dalle apparecchiature utilizzate per le misure, nel rapporto di analisi devono essere specificati il limite di rilevabilità della metodica utilizzata e le percentuali di recupero dei singoli elementi (accuratezza) rispetto a matrici organiche certificate.

→ PROCEDIMENTO

Si pesano g 10 di tessuto in un pallone da 100 ml con collo smerigliato e si aggiungono 30 ml di potassa alcolica (KOH 2N in metanolo). Si omogeneizza con UltraTurrax per 5 minuti e si mette a refluire su di un bagno ad acqua a 80°C per due ore.

Si trasferisce il contenuto in un provettone da centrifuga e si effettua la prima estrazione aggiungendo 40 ml di cicloesano e 20 ml di una miscela composta da metanolo:acqua estratta 4:1. Si mette su agitatore per 15 minuti e si centrifuga a 1200 giri per altri 15 minuti.

Si preleva il surnatante e si passa su di una colonna (20 mm di diametro) riempita con solfato di sodio (circa 20 g) raccogliendo l'eluato in una beuta da 150 ml. Si effettuano altre tre estrazioni con 25 ml di cicloesano.

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

La determinazione viene condotta su di HPLC con rivelatore a fluorescenza. La fase della colonna è una C18 (25 cm x 4,6 mm i.d.). L'eluizione avviene mediante un gradiente binario acqua/acetonitrile (60-100% in 30 minuti) ad un flusso di 1,5 ml/min.

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

La determinazione quantitativa viene effettuata mediante l'uso di curve di calibrazione utilizzando preferibilmente la tecnica dello standard interno, altrimenti quello esterno.

Le concentrazioni sono espresse in mg/kg rispetto al peso secco.

Il limite di determinazione è di 0,001 mg/kg per singolo idrocarburo.

Apparecchiature e reagenti:

- vetreria da laboratorio in uso comune (opportunamente decontaminata)
- Ultraturax T25
- centrifuga
- agitatore
- rotavapor
- bagno ad acqua termostato
- cromatografo liquido (HPLC) con rivelatore spettrofotometrico a fluorescenza o di assorbimento nell'UV
- metanolo
- cicloesano
- n-esano
- acetonitrile
- idrossido di potassio
- acqua estratta con diclorometano
- gel di silice
- solfato di sodio (una notte in muffola a 600°C)



Analisi del contenuto di alcuni elementi chimici in *Mytilus galloprovincialis* (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Zn)

→ INTRODUZIONE ALLA METODICA

Il metodo prevede la digestione dei campioni con opportune soluzioni acide mediante sistema chiuso, a microonde o sistema a riflusso.

Il contenuto dei metalli è determinato per spettrofotometria ad assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma o termoelettrica. Per il mercurio si utilizza la tecnica dello strappaggio a vapori freddi previa riduzione del mercurio con cloruro stannoso.

In alternativa all'assorbimento atomico, ove le concentrazioni lo permettano, può essere utilizzata la spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES) o altre tecniche ugualmente valide in accordo con la letteratura corrente.

Indipendentemente dalle metodologie ed apparecchiature utilizzate per la mineralizzazione dei campioni e la determinazione degli elementi, nel rapporto di analisi devono essere specificati il limite di rilevabilità della metodica utilizzata e le percentuali di recupero dei singoli elementi (accuratezza) rispetto a matrici organiche certificate.

→ PROCEDIMENTO

Preparazione della soluzione per la mineralizzazione con forno a microonde

Trasferire circa 0,3 g di campione (sostanza secca) nell'apposito contenitore.

Aggiungere 7 ml di HNO₃ e 1 ml di H₂O₂.

Lasciare riposare dopo l'aggiunta dei reattivi per 15/20 minuti.

Impostare il ciclo operativo riportato a fianco.

È estremamente importante attenersi alle quantità di reattivi ed alle potenze indicate.

La prova in bianco viene effettuata con le stesse modalità operative sulla soluzione composta da 7 ml di HNO₃ e 1 ml di H₂O₂.

Altri sistemi di digestione (esempio riflusso per 4-6 ore) possono prevedere l'impiego di altre miscele acide (es. HCl:HNO₃ 3:1).

Dopo raffreddamento trasferire la sospensione in contenitore tarato, dopo eventuale filtrazione, e portare a volume noto (V) con acqua ultrapura.

Lettura analitica

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

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

Espressione dei risultati

Per il calcolo è utilizzata la seguente espressione:

Apparecchiature e reagenti:

- mineralizzatore a microonde dotato di contenitori a pressione
- spettrofotometro ad assorbimento atomico a fiamma ed elettrofornace
- sistema generatore di idruri
- acido nitrico (HNO₃) 65%
- acqua ossigenata (H₂O₂) 30%
- acido cloridrico (HCl) 37%
- acqua ultrapura

Step	Tempo (min.)	Potenza (Watt)
1	1	250
2	1	0
3	5	250
4	5	400
5	5	650

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

dove:

C = contenuto del metallo nella matrice, espresso in mg/kg

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

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

V = volume finale espresso in millilitri

M = massa del campione espressa in grammi

I risultati finali vanno espressi in mg/kg peso secco.*

→ **LIMITE DI DETERMINAZIONE**

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

Metallo	mg/kg p.s.
Al	5
As	0,5
Cd	0,1
Cr	0,2
Cu	1
Fe	1
Hg	0,05
Ni	0,1
Pb	0,2
V	1
Zn	1

* Per l'inserimento dei dati nel Si.Di.Mar. i risultati analitici devono essere convertiti in µg/kg p.s. moltiplicando il risultato espresso in mg/kg per il fattore di conversione 1000.

a cura di

David PELLEGRINI (ICRAM, Roma)

Barbara SALIVA (CIBM, Livorno)

Francesco REGOLI (Istituto Biologia e Genetica, Università di Ancona)