



APAT



Criteria per il rilevamento e la classificazione dello stato di qualità ecologico e chimico delle acque, con particolare riferimento all'applicazione del decreto legislativo 152/99

Sottoprogetto 10

Messa a punto e sperimentazione di nuovi sistemi di monitoraggio delle acque sotterranee rivolti all'implementazione applicativa del D. Lgs. 152/99

Stato dell'arte per i nuovi sistemi di monitoraggio tramite indici globali di contaminazione delle acque sotterranee.

Rapporto Tecnico/1

Ottobre 2005



Pag / indice

01 / Introduzione

03 / Analisi del TOX

06 / Bibliografia dell'introduzione e del TOX

10 / Effetto tossico con Vibrio Bischeri

12 / Bibliografia effetto tossico

16 / Analisi dell'ATP in bioluminescenza

19 / Bibliografia analisi dell'ATP in bioluminescenza

20 / E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

22 / Bibliografia Test E.L.I.S.A.

Gruppo di Lavoro

Redazione

Dott.ssa Paola Grenni (IRSA-CNR Roma)

Coordinamento

Dott. Angiolo Martinelli
Dott. Giuseppe Giuliano
(IRSA-CNR Roma)

Versione

Rev. 0

Visto

Dott. Giancarlo Marchetti

INTRODUZIONE

La legge quadro sulle acque o legge Ronchi (DLgs. 152/99 e sue successive modifiche, in particolare DLgs. 258/2000) definisce le caratteristiche quali-quantitative nei corpi idrici sotterranei, che, ai fini della classificazione del loro stato ambientale, devono essere monitorate.

Tale monitoraggio implicherebbe un'attività di natura organizzativa e scientifica complessa ed articolata; bisogna infatti considerare che sarebbe in primo luogo necessario effettuare un ampio campionamento spazio-temporale delle acque sotterranee al fine di effettuare in laboratorio le conseguenti analisi; quindi sarebbe necessario svolgere –per ciascun campionamento- più analisi, tenendo conto dell'elevato numero di parametri di valutazione (parametri di base ed addizionali). Dunque, delle procedure che richiedono lunghi tempi di esecuzione e che implicano notevoli costi di materiale e di risorse professionali.

L'IRSA-C.N.R. ha sviluppato delle tecniche alternative o, meglio, di screening iniziale, per il monitoraggio degli acquiferi attraverso lo studio e l'utilizzo degli indici globali di contaminazione (Guzzella *et al.*, 2003; Guzzella, 1996; IRSA-CNR, 2004a, b, c, d); tali tecniche sono volte a favorire lo sviluppo di metodologie di analisi più semplici e veloci oltre ch  di applicazione realistica. Basti pensare che tali analisi possono essere facilmente effettuate anche in laboratori mobili di monitoraggio degli acquiferi, permettendo il prelievo dei campioni dai pozzi e la loro immediata analisi (Guzzella *et al.*, 2003).

Al fine ottimizzare le analisi secondo le suddette metodologie, l'IRSA-CNR ha elaborato dei protocolli di analisi al fine appunto di monitorare, in modo agevole e rapido, l'evolversi temporale della situazione qualitativa degli acquiferi. Tali indici globali, sia chimici sia biologici, sono infatti in grado di identificare un ampio spettro di sostanze potenzialmente presenti nelle acque sotterranee e consentono di evidenziare la contaminazione da inquinanti di diversa origine (quale industriale, civile od agricola), cosicch  possono essere utilizzati per la "sorveglianza attiva" del rischio di inquinamento degli acquiferi utilizzati a scopo potabile.

I principali indici globali di contaminazione sono stati elaborati dall'IRSA-C.N.R., tenendo conto della letteratura internazionale e sviluppando poi, all'esito della elaborazione della stessa e dell'esperienza sul campo, un proprio know how. Appare quindi necessario soffermarsi su detti indici, leggendoli anche attraverso un'analisi critica della letteratura nazionale ed internazionale pi  recente.

Tali indici sono:

- **TOX** (total organic halogen): si ottiene attraverso un'analisi chimica strumentale che permette di identificare, con un'unica determinazione, l'insieme dei composti organici alogenati presenti nelle acque; essa viene effettuata tramite assorbimento degli alogeni organici presenti nel campione d'acqua su carbone attivo, utilizzando appositi kit disponibili in commercio (IRSA-CNR, 2004a).

- **Effetto tossico con *Vibrio fischeri***: si ottiene attraverso un'analisi biologica che permette di valutare gli effetti tossici degli inquinanti organici ed inorganici presenti, ed   in grado di evidenziare livelli di tossicit  anche molto limitati; l'analisi viene effettuata tramite la misurazione della eventuale diminuzione della bioluminescenza emessa dal batterio *Vibrio fischeri* a contatto con l'acqua da analizzare (IRSA-CNR, 2004c; IRSA-CNR-APAT, 2003a).

- **Analisi dell'ATP in bioluminescenza**: tale analisi si propone come alternativa, più rapida, alle colture microbiologiche classiche, fornendo una risposta biologica in funzione della carica batterica presente nelle acque (IRSA-CNR, 2004b; IRSA-CNR- APAT, 2003b)
- **E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**: tale test è un saggio immunoenzimatico particolarmente indicato alla determinazione degli erbicidi più comunemente utilizzati in agricoltura (IRSA-CNR, 2004d).

1. ANALISI DEL TOX (TOTAL ORGANIC HALOGEN)

I composti organici alogenati rivestono un ruolo molto importante nel determinare la qualità delle acque. Essi, quasi assenti in natura (Asplund & Grinnvall, 1991), per lo sviluppo dell'industria chimica hanno avuto un incremento notevole, con la conseguente loro immissione nell'ambiente; ciò implica che la loro presenza negli ecosistemi acquatici, ed in particolare nelle acque sotterranee, è dovuta esclusivamente all'attività antropica. Il loro uso diffuso, associato alla potenziale o provata tossicità ha portato, negli ultimi decenni, ad un interesse crescente verso il loro studio.

Tra i composti alogenati organici, rivestono un ruolo prevalente i cloroderivati organici, cui appartengono molti insetticidi ed erbicidi (es. il diclorobenzene, l'atrazina, il 2,4D, il dieledrin ecc.; Grøn, 1995); a causa della loro tendenza ad essere lisciviati dal suolo, possono essere riscontrati, come parentali o come prodotti di degradazione, nelle acque sotterranee (Juhler *et al.*, 2001).

I cloroderivati organici possono avere origine dall'attività industriale in particolare da quella cartaria che ne produce ingenti quantità dai processi di sbiancamento della cellulosa (Galassi *et al.*, 1983). Possono altresì avere origine dal trattamento di potabilizzazione delle acque negli acquedotti e negli effluenti domestici (Canova *et al.*, 1989; Ricci, 1996; Hua-Wu *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 1998). Appare dunque evidente come tali composti siano frequentemente riscontrabili nelle acque superficiali, in quelle reflue, in quelle industriali, nelle falde, nei sedimenti fluviali, nei suoli ed anche nelle acque destinate all'uso alimentare (Viganò *et al.*, 2003; Wensen *et al.*, 1990; Borch *et al.*, 2003; Alborzfar *et al.*, 2001 Sansebastiano *et al.*, 1995).

Molti cloroderivati organici sono estremamente tossici, anche a basse concentrazioni, e possono avere effetti mutageni, teratogeni o cancerogeni (Canova *et al.*, 1989); inoltre sono considerati pericolosi a causa della loro liposolubilità e, quindi, della loro tendenza a bioaccumularsi (Goerke *et al.*, 1979; Ricci, 1996), e ad entrare nella catena alimentare fino ad arrivare agli organismi superiori, uomo compreso (Dodds *et al.*, 1999). A causa della loro complessa struttura chimica, assai diversa da quella delle molecole organiche naturali, risultano scarsamente biodegradabili e, quindi, persistenti nell'ambiente; tipica è la presenza di residui alifatici ramificati che rendono queste molecole particolarmente resistenti alla degradazione microbica.

Il numero di alogeno-derivati organici che può essere presente negli ecosistemi acquatici, ed in particolare nelle acque sotterranee, è elevato perciò la determinazione delle singole sostanze è piuttosto complessa, oltre ad essere onerosa; inoltre solo per una parte di essi esistono metodiche disponibili (analisi cromatografica in fase liquida o gassosa/spettrometro di massa: LC/MS, GC/MS; HPLC) che garantiscono risultati soddisfacenti (Pruskin, 1990). Poiché la tossicità di tali sostanze può derivare anche da un'azione sinergica le une con le altre, l'utilizzo di un indice -quale è il TOX- che permetta di misurare un "parametro globale" indicativo della loro presenza, può essere particolarmente utile.

Con il termine di TOX (total organic halogen) si indica la somma di tutti gli alogeni organici presenti in un campione (chlorine, Cl, bromine, Br, e iodine, I) (EPA9020B, 1994; USEPA, 1982; APHA, 1985; ISO/DIS, 1988).

Il TOX è il risultato un'analisi chimica strumentale che permette di individuare, in un solo parametro, l'insieme dei composti organici alogenati presenti nelle acque (Grøn & Dybdahl, 1996; Gremm & Frimmel, 2000, Wigilius *et al.*, 1988) e viene espresso in $\mu\text{g Cl}_{\text{org}}/\text{l}$

Esso deriva dalla somma di quattro diverse tecniche di estrazione dalla matrice acquosa o solida degli alogeni organici (Biziuk & Przyjazny, 1996). In particolare: gli AOX (adsorbable organic halogens), che sono gli alogeni organici adsorbibili (Norm DIN EN 1485, 1996; ASTM, 1988; Norm DIN 38 409, 1985; Norm DIN 38409-22, 2001); i POX (purgeable organic halogens), che sono gli alogeni organici purgabili (Norm DIN 38 409 H 25); gli EOX (extractable organic halogens), che sono gli alogeni organici estraibili con solvente (NEN 6402, 1991) ed i VOX (volatile organic halogen) che sono composti alogenati organici volatili (US EPA 8010B).

Negli Stati Uniti, già nei primi anni '80, è stata sviluppata una tecnica analitica di assorbimento degli alogeni organici su carboni che, pur se denominata TOX (US EPA9020B), ha una procedura analitica molto simile a quella necessaria per gli AOX; per questo motivo spesso i due termini TOX e AOX risultano intercambiabili (Ricci, 1996); ciò che preme evidenziare comunque è che attraverso gli AOX, si ottiene una stima molto buona del parametro TOX (inteso nel senso più ampio) in un campione di acque sotterranee (Bianchi *et al.*, 1999; Grøn, 1995).

Ed è per questo che anche l'Unione Europea (EU) ha riconosciuto l'importanza dell'AOX nell'ambito della prevenzione dell'inquinamento ambientale (COM 93; CEN/TC 292; Langenkamp & Pärt, 2001) e diversi Stati Europei già tengono conto di tale parametro come indice di inquinamento (Jekel *et al.*, 1980; Gremm & Frimmel, 2000).

Data l'importanza degli alogeni organici, ed in particolare dei cloroderivati organici, la normativa vigente in Italia (DLgs 152/99) per le acque di scarico esprime, nella tabella A (scarichi in acque superficiali) una concentrazione massima ammissibile di 0.05 mg/l per i pesticidi clorurati e di 1 mg/l per i solventi clorurati.

Per le acque destinate al consumo umano, invece, la direttiva CEE 80/778 indica un valore guida di 1 µg/l per i singoli composti alogenati organici che non rientrano tra gli antiparassitari e non indica una concentrazione massima ammissibile. Per quanto riguarda gli antiparassitari e i prodotti assimilabili, la concentrazione massima ammissibile è di 0.1 µg/l per ogni singolo pesticida clorurato, e di 0.5 µg/l per il totale degli stessi. Il DPR n. 236/88, attuativo di tale direttiva europea, prevede anche per i composti alogenati organici che non rientrano tra gli antiparassitari, una concentrazione massima ammissibile di 30 µg/l.

E' da rilevare che il metodo del TOX viene già usato da vari anni come monitoraggio della qualità delle acque sotterranee (Grøn & Dybdahl, 1996; Sansebastiano *et al.*, 1995; Leenheer *et al.*, 2001; Sweeney, 1999; Mikkelsen *et al.*, 1996; Remenarova *et al.*, 2001; Tredoux *et al.*, 2004).

L'IRSA-CNR ha sviluppato una tecnica di analisi degli alogeni organici totali nelle acque (IRSA-CNR, 2004a; Guzzella *et al.*, 2003) che rappresenta un ottimo e veloce strumento per monitorare una parte cospicua di composti alogenati organici nelle acque sotterranee, e dà indicazioni su dove sia necessario effettuare ulteriori analisi chimiche mediante strumentazioni più sofisticate (GC/MS o LC/MS o HPLC), per l'identificazione delle singole sostanze organiche alogenate (Bianchi *et al.*, 1999).

Il TOX (IRSA-CNR, 2004a; Guzzella *et al.*, 2003) si basa sull'assorbimento degli alogeni totali, sia organici che inorganici, ed in particolare su un "sorbente" solido (Biziuk & Przyjazny, 1996), quale è un carbone attivo (Gremm & Frimmel, 2000; Laniewski *et al.*, 1999; Borsdorf *et al.*, 2003; Norm DIN EN 1485, 1996). Successivamente all'assorbimento avviene la "desorbazione" dal carbone attivo degli alogeni inorganici, mediante lavaggio; quindi si procede alla combustione del carbone e degli alogeni organici assorbiti; la quantificazione di questi ultimi avviene per determinazione microcoulometrica degli idrogeni alogenati sviluppati (Grøn & Dybdahl, 1996). Il campo di misura del metodo è compreso tra 0.05 e 3.0 mg/l (IRSA-CNR, 2004a).

Il metodo sviluppato dall'IRSA per l'analisi del TOX prevede l'utilizzo di un Kit (Kit LCK 390 del Dr B. Lange, Milano, Italia) che ha il vantaggio di poter fornire una risposta analitica in tempi brevi e di poter essere effettuata *in situ*.

In uno studio condotto dall'IRSA, volto al monitoraggio di acque sotterranee nella provincia di Milano, sono stati confrontati i dati di analisi degli alogeni organici, determinati con strumentazioni di tipo combustivo-coulometriche, con quelli determinati con il Kit LCK 390; ne è risultata una correlazione tra i valori significativa ($R^2 > 0,94$), con la conseguente comparabilità delle due tecniche (Fig. 1).

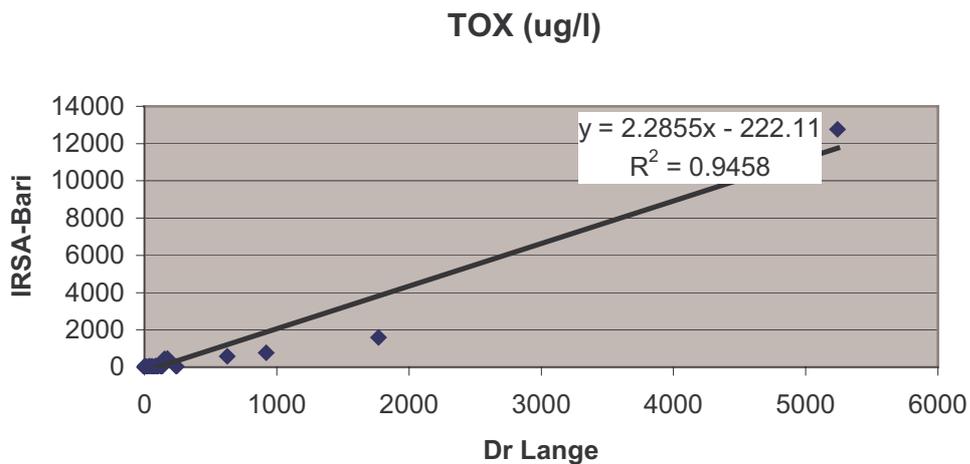


Fig. 1: Comparazione TOX da Kit e da metodiche combustivo-coulometriche (IRSA-Bari). Da: "Resoconto sintetico dell'attività sviluppo di tecniche di sorveglianza degli acquiferi attraverso lo studio di indici globali di contaminazione". IRSA-C.N.R, Gruppo Nazionale per la difesa dalle Catastrofi Idrogeologiche, Rapporto interno 2004)

Bibliografia dell'introduzione e del TOX

Alborzfar M, Villumsen A, Gron C., 2001 Artificial recharge of humic ground water. *Journal of Environmental Quality*, 30: 200-209.

APHA (American Public Health Association), 1985 - *Standard methods for examination of water and wastewater*. Rand M.C., Greenberg, A.E., Taras M.J., Frasons M.A. (Eds.), 15th Edition. New York, NY: APHA.

Asplund G., Grinvall A., 1991 – Organohalogenes in nature. *Environmental Science & Technology*, 25: 1347-1350.

ASTM (American Society for Testing Materials), 1988 – *Standard test method for organics halides in water by carbon adsorption-microcoulometric detection*. Method D 4744-87. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA.

Bartone C., Pozzoni F. e Guzzella L., 1996 – Utilizzo di tecniche immunoenzimatiche per l'analisi dei residui di erbicidi in suoli agrari. *Acqua Aria*, 9: 793 – 799.

Bianchi M., Pasturenzi M., Muntan H., 1999 – *AOX: un parametro di somma per la valutazione della qualità delle acque*. Istituto dell'Ambiente, Centro Comune di Ricerca, Ispra (Italy), EUR 18750 IT: 77 pp.

Biziuk, M., Przyjazny, A., 1996 - Methods of isolation and determination of volatile organohalogen compounds in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, 733: 417-448.

Borch T., Ambus P., Laturus F., Svensmark B., Gron C., 2003 - Biodegradation of chlorinated solvents in a water unsaturated topsoil. *Chemosphere*, 51: 143-152.

Borsdorf H., Fiedler P., Wilke D., Weiß H., 2003 – A simplified analytical procedure for the determination of organically bound halogen in salt-containing water samples. *Acta Hydrochimica Hydrobiologica*, 31: 19-24.

Canova F., Dal Prà A., Duzzin B., Marchi T., Marin V., Moretti G., Navazio G., Sottani N., Zanovello A., 1989 – *Acqua quale futuro*. GB (Ed.): 139 pp.

CEN/TC 292: Characterization of waste. Comité Européen de Normalisation, Technical Committee.

COM 423, 1993 – Integrated Pollution Prevention Control.

Dodds L., King W., Woolcott Ch., Pole J., 1999 - Trihalomethanes in public water supplies and adverse birth outcomes. *Epidemiology*, 10: 233-237.

EPA (Environmental Protection Agency) 9020B, 1994 – Total organic halides (TOX). Environmental Protection Agency.

Galassi S., Viganò L., Sanna M., 1996 - Bioconcentration of organochlorine pesticides in rainbow trout caged in the River Po. *Chemosphere*, 32: 1729-1739.

Galassi S., De Paolis A., Marchetti R., 1983 – Presenza dei pesticidi clorurati in acque di scarico di conceria. *Acqua e Aria*, 6: 601-606.

Goerke H., Eder, K., Weber K., Ernst W., 1979 – Patterns of organochlorine residue in animals of different trophic level from Weser estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 10: 127-133.

Gremm Th. J., F. H. Frimmel, 2000 - Characterization of AOX by Fractionation Analysis and Size-exclusion Chromatography. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 28: 202-211.

Grøn C., 1995 - AOX in groundwater. In: *Naturally-produced organoalogenes* by E.W.B. de Leer (ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 49-64.

Grøn C., Dybdahl H.P., 1996 – Determination of total organic halogens (TOX); bias from a non-halogenated organic compound. *Environment International*, 22: 325-329.

Guzzella L., 1996 – Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti. IRSA-CNR (Istituto di Ricerca sulle Acque), Notiziario dei Metodi Analitici (Abstract in English): 1-8.

Guzzella L., De Paolis A., Giuliano G., 2003 – Indici globali di contaminazione per il monitoraggio degli acquiferi. *Acqua e Aria*, 9: 86-94.

Hua-Wu L., Liss S.N., Allen D.G., 1997 - The influence of anoxic conditioning of sludge on enhanced AOX (adsorbable organic halogen) removal in aerobic biological treatment systems. *Water Science and Technology*, 35: 77-84.

IRSA-CNR, 2004a – Protocollo per l'analisi del TOX. Istituto di Ricerca Sulle Acque – CNR, Rapporto Interno Progetto MIMA.

IRSA-CNR, 2004b – Protocollo per l'analisi dell'ATP. Istituto di Ricerca Sulle Acque – CNR, Rapporto Interno Progetto MIMA.

IRSA-CNR, 2004c – Protocollo per l'analisi della tossicità. Istituto di Ricerca Sulle Acque – CNR, Rapporto Interno Progetto MIMA.

IRSA-CNR, 2004d – Protocollo per l'analisi degli erbicidi con E.L.I.S.A. Istituto di Ricerca Sulle Acque – CNR, Rapporto Interno Progetto MIMA.

IRSA-CNR- APAT, 2003a – Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti. In: *Metodi analitici per le acque*. Istituto di Ricerca Sulle Acque (IRSA)-CNR, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici, APAT Manuali e Guide, 29/2003, Vol.3, sezione 9000: 1003-1012.

IRSA-CNR- APAT, 2003b – Determinazione dell'Adenosintrifosfato. In: *Metodi analitici per le acque*. Istituto di Ricerca Sulle Acque (IRSA)-CNR, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici, APAT Manuali e Guide, 29/2003. Vol.3, sezione 9000: 1143-1147.

ISO/DIS, 1988 - Water quality determination of total organic halogens. Draft international standard, International Standardization Organization.

Jekel M.R., Roberts P.V., 1980 – Total organic halogen as a parameter for the characterization of reclaimed waters: measurement, occurrence, formation, and removal. *Environmental Science & Technology*, 14: 970-975.

Juhler R.K., Sørensen S.R., Larsen L., 2001 - Analysing transformation products of herbicide residues in environmental samples. *Water Research*, 35: 1371-137.

Langenkamp H., Pärt P., 2001 - Organic Contaminants in Sewage Sludge for Agricultural Use. In: *Project Coordination European Commission Joint Research Centre Soil and Waste Unit*: 31 pp.

Laniewski K., Dahlén J., Borén H., Grimvall A., 1999 - Determination of group parameters for organically bound chlorine, bromine and iodine in precipitation. *Chemosphere*, 38: 771-782.

Leenheer J.A., Rostad C.E., Barber L.B., Schroeder R.A., Anders R., Davisson M. L., 2001 - Nature and Chlorine Reactivity of Organic Constituents from Reclaimed Water in Groundwater, Los Angeles County, California. *Environmental Science & Technology*, 35: 3869 – 3876.

Mikkelsen, P.S.; Häfliger, M.; Ochs, M.; Tjell, J.C.; Jacobsen, P.; Boller, M., 1996 - Experimental assessment of soil and groundwater contamination from two old infiltration systems for road run-off in Switzerland. *The Science of the Total Environment*, 189-190: 341-347

NEN 6402, 1991 - Determination of halogen content derived from non-volatile with petroleum extractible organohalogen compounds.

Norm DIN 38 409, teil14, 1985 – Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung der adsorbierbaren organisch Gebundendehnen Halogene (AOX). Deutsches Industrie Normung.

Norm DIN 38 409-22, 2001 - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H): Bestimmung gelöster adsorbierbarer organisch gebundener Halogene in stark salzhaltigen Wässer nach Festphasen-anreicherung (SPE-AOX) (H22). Deutsches Industrie Normung.

Norm DIN 38 409 t25. Bestimmung von aus Blasbahnen organischen Halogen. Deutsches Industrie Normung.

Norm DIN EN 1485, 1996 - Wasserbeschaffenheit: Bestimmung adsorbierbaren organischer Halogene (AOX). Deutsches Industrie Normung

Pruskin S.L., 1990 – Comparison of TOX and GC/MS data for R CRA groudwater monitoring well samples. *Waste Water and Quality Assurance*, Vol.2. ASTM STP 1062.

Remenarova D., Reider M., Kodes V., 2001 – Czech National Groundwater quality monitoring project and harmonization with the approaches in the EU countries. Workshop on the protection of groundwater used as a source of drinking water supply. Budapest, November 2001.

Ricci F., 1996 – AOX ed EOX parametri significativi nella determinazione rapida degli alogenoderivati organici totali nei reflui. *Biologi Italiani*, 11: 38-40.

Sansebastiano G., Rebizzi V., Bellelli E., Sciarrone F., Reverberi S., Saglia S., Braccaioli A., Camerlengo P., 1995 - Total halogenated organic (tox) measurement in ground waters treated with hypochlorite and with chlorine dioxide. Initial results of an experiment carried out in Emilia-Romagna (Italy). *Water Research*, 29: 1207-1209.

Schulz, S., Hahn H.H., 1998 - Generation of halogenated organic compounds in municipal waste water. *Water Science and Technology*, 37: 303-309.

Sweeney, M.D., 1999 - Groundwater Monitoring Plan for the 216-A-29 Ditch. Report Number PNNL-13047 Pacific Northwest National Lab., Richland, WA (US). US Department of Energy (US)

Tredoux G., Cavé L., Engelbrecht P., 2004 – Groudwater pollution: are we monitoring appropriate parameters? *Water S.A.*, 30 (Special Edition): 114-119.

US EPA (United States Environmental Protection Agency), 1982 - Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. Method 9020; total organic halides (TOX). U.S: Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

US EPA (United States Environmental Protection Agency), method 8010B: Halogenated and Aromatic Volatile Organics by Gas Chromatography Using Photoionization and Electrolytic Conductivity Detectors. U.S: Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

Viganò L., Arillo A., Buffagni A., Camusso M., Ciannarella R., Crosa G., Falugi C., Galassi S., Guzzella L., Lopez A., Mingazzini M., Pagnotta R., Patrolecco L., Tartari G., Valsecchi S., 2003 - Quality assessment of bed sediments of the Po River (Italy). *Water Research*, 37: 501-518.

Wensen C., Carlberg G.E., Martinsen K., 1990 – On the identity of chlorinated organic substances in aquatic organisms and sediments. *Ambio*, 19: 36-38.

Wigilius B., Allard B., Boren H., Grimvall A., 1988 – Determination of AOX and their molecular weight distribution in surface water samples. *Chemosphere* 17: 1985-1994.

2. EFFETTO TOSSICO CON *Vibrio fischeri*

La contaminazione degli ecosistemi ed in particolare dell'acqua sotterranea, può avvenire anche da parte di microinquinanti organici. Quotidianamente sono sintetizzati nuovi composti e, di conseguenza, vengono immessi nell'ambiente un numero sempre crescente di prodotti chimici (Galassi *et al.*, 2004). Nelle acque quindi si possono trovare sostanze eterogenee, difficili da determinare con analisi chimiche, sia in quanto presenti anche a basse concentrazioni, sia in quanto per l'individuazione di ogni singolo composto è richiesto un metodo analitico ben specifico.

Da qui i test ecotossicologici che utilizzano organismi (dai batteri ad organismi più evoluti), detti bioindicatori, che hanno la proprietà di essere sensibili alle sostanze tossiche. Lo studio della risposta dei bioindicatori ai composti biologicamente attivi contenuti in campioni di acqua viene detto bio-assay e viene realizzato con dispositivi semplici.

I test ecotossicologici valutano in modo ampio le condizioni di un campione d'acqua, raggiungendo risultanti anche migliori dell'analisi chimica (Keddy *et al.*, 1995; Persoone *et al.*, 2003), integrando gli effetti positivi e negativi sia dell'impatto chimico (dato dai composti tossici), sia delle condizioni ambientali (ad es. temperatura); inoltre –come già detto- forniscono indicazioni sulla presenza di sostanze tossiche non generalmente monitorate negli acquiferi (ad es. farmaci, composti della chimica di base, additivi alimentari ed intermedi vari, metalli pesanti), presenti anche a basse concentrazioni e che richiederebbero metodi analitici specifici per essere identificati (Galassi *et al.*, 2004).

Tali test consentono di valutare altresì il danno potenziale relativo agli effetti sinergici ed additivi dovuti alla contemporanea presenza di più sostanze tossiche nella matrice acquosa, anche se non forniscono indicazioni su quale sia specificamente la componente tossica quivi presente.

Sono poi test economici, riproducibili, richiedono basse quantità di estratti di acqua ed hanno il vantaggio statistico dato dal numero alto di batteri utilizzati (Galassi *et al.*, 2004).

I test ecotossicologici sugli estratti di acqua possono, quindi, essere usati come screening totali per valutare in modo veloce e semplice la qualità dell'acqua, con riguardo alla contaminazione da microinquinanti, sia organici che inorganici.

Tra i diversi test di tossicità che utilizzano i batteri (Katsev, 2002, Layton *et al.*, 1999), un tipo di facile applicazione, utilizzato già da diversi anni, è quello che utilizza batteri bioluminescenti.

La bioluminescenza prodotta dal batterio marino Gram negativo *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*, famiglia Vibrionaceae) è la base di molti saggi biologici (Bulich, 1979; Virta *et al.*, 1995; King *et al.*, 1990; Chun *et al.*, 1996; Parados *et al.*, 1999; Fernández-Alba *et al.*, 2002); in letteratura esistono diversi metodi ufficiali per l'utilizzo di tali batteri (Anon, 1999 a e b; Norm DIN38412, Part 341, 1992; ISO/DIS 11348.2, 1996) che sono alla base del metodo sviluppato dall'IRSA-CNR (Guzzella *et al.*, 2003; IRSA-CNR, 2004c; IRSA-CNR- APAT, 2003a). Il test si basa sulla eventuale diminuzione della bioluminescenza, prodotta dal batterio, in presenza dei composti tossici; tali composti hanno un effetto negativo sul sistema batterico di luminescenza che, a sua volta, viene misurata con un semplice luminometro.

Con l'utilizzo del batterio *Vibrio fischeri* sono stati condotti molti studi di tossicità testando diverse sostanze, singolarmente o cumulativamente considerate (in particolare si sono utilizzati pesticidi; Kahru *et al.*, 1996; Kay, 1997; Kahru, 1996; Jennings *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 1999; Fernández-Alba *et al.*, 2001; Canna-Michaelidou *et al.*, 1996).

L'analisi è altresì utilizzata come screening di sostanze tossiche in acqua (Bulich & Isenberg, 1981; Guzzella & Mingazzini, 1994; Fernández *et al.*, 1995, Hao *et al.*, 1996; Guzzella *et al.*, 2002; Ultzur *et al.*, 2002; Chun *et al.*, 1996), nei sedimenti (Svenson *et al.*, 1996; Guzzella, 1998; Johnson & Long, 1998, Viganò *et al.*, 2003; Guzzella *et al.*, 1996; Blaise *et al.*, 2004) e nel suolo (Galli *et al.*, 1994; Brohon & Gourdon, 2000).

In un recente studio (Chun *et al.*, 1996) l'analisi attraverso tale batterio viene anche utilizzato per effettuare un monitoraggio continuo delle acque, al fine di ottenere risposte in tempo reale circa la qualità dell'acqua.

Nei test ecotossicologici, la tossicità in genere viene espressa come EC50 (concentrazione di un campione che causa il 50% della riduzione della risposta biologica studiata): nel caso del batterio *Vibrio fischeri* è la luminosità ad essere determinata, in un certo tempo di esposizione (5, 10, 15 o 30 min).

Il metodo sviluppato dall'IRSA-CNR analizza l'effetto tossico provocato dai microinquinanti nell'acqua utilizzando batteri bioluminescenti della specie *Vibrio fischeri* ceppo NRRL-B-11177, commercializzato della Environmental AZUR (Carlsbad, California, USA).

Per la conduzione del test è stato selezionato un protocollo di analisi denominato *Comparison Test*, in accordo con il protocollo Americano EPA (US EPA 600-3-88/035,) adatto anche a evidenziare livelli di tossicità anche molto contenuti; i risultati (tossici) del test così effettuato sul campione d'acqua vengono quindi confrontati con acqua di riferimento e vengono espressi come percentuale di inibizione, con esposizioni a 5, 15 e 30 minuti (Guzzella, 1996).

Bibliografia effetto tossico utilizzando il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*

Anon, 1999a – *BS EN ISO 11348.3, PART 3 – Method Using Freeze-dried Bacteria*. Infonorme London Information, ascot, UK.

Anon, 1999b – *BS EN ISO 11348.3, PART 2 – Method Using Liquid Dried Bacteria*. Infonorme London Information, ascot, UK.

Blaise C., Gagne F., Chevre N., Harwood M., Lee K., Lappalainen J., Chial B., Persoone G., Doe K., 2004 - Toxicity assessment of oil-contaminated freshwater sediments. *Environmental Toxicology*, 19: 267-273.

Brohon B., Gourdon R., 2000 – Influence of soil microbial activity level on the determination of contaminated soil toxicity using Lumistox and MetPlate bioassays. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 853-857.

Bulich, A.A., 1979 – *Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments*. In: L.L. Markings and R.A. Kimerle (Eds.), *Aquatic Toxicology*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 98 pp.

Bulich A.A., Isenberg D.L., 1981 – Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of the aquatic toxicity. *ISA Trans.*, 20: 29-33.

Canna-Michaelidou S., Nicolau A.-S., 1996 – Evaluation of the genotoxicity potential (by MutatoxTM test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. *The Science of the Total Environment*, 193: 27-35.

Chun U.-H., Simonov N., Chen Y., Britz M.L., 1996 - Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. *Resources, Conservation and Recycling*, 18: 25-40.

Fernández A., Tejedor C., Cabrera F., Chordi A., 1995 – Assessment of toxicity of river water and effluents by the luminescence assay using *Photobacterium phosphoreum*. *Water Research*, 29: 1281-1286.

Fernández-Alba A., Guil M.D.H., López G.D., Chisti Y., 2002 –Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Analytica Chimica Acta*, 451: 195-202.

Fernández-Alba A., Guil L.H., López G.D., Chisti Y., 2001 – Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Analytica Chimica Acta*, 426: 289-301.

Galassi S., Guzzella L., Croce V., 2004 - Screening organic micropollutants in surface waters by SPE extraction and ecotoxicological testing. *Chemosphere*, 54: 1619-1624.

Galli R., Munz C.D., Scholtz R., 1994 – Evaluation and application of aquatic toxicity tests: use of the Microtox test for the prediction of toxicity based upon concentration of contaminants in soil. *Hydrobiologia*, 273: 179-189.

Guzzella L., 1996 – Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti. IRSA-CNR (Istituto di Ricerca sulle Acque), *Notiziario dei Metodi Analitici* (Abstract in English): 1-8.

Guzzella L., Bartone C., Ross F., Tartari G., Muntau H., 1996 - Toxicity Identification Evaluation of Lake Orta (Northern Italy) Sediments Using the Microtox System. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35: 231-235.

Guzzella L., Mingazzini M., 1994 – Biological assaying of organic compounds in surface water. *Water Science and Technology*, 30: 113-124.

Guzzella L., 1998 – Comparison of test procedures for sediment toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere*, 37: 2895-2909.

Guzzella L., De Paolis A., Giuliano G., 2003 – Indici globali di contaminazione per il monitoraggio degli acquiferi. *Acqua e Aria*, 9:86-94.

Guzzella L., Ferretti D., Monarca S., 2002 - Advanced oxidation and adsorption technologies for organic micropollutant removal from lake water used as drinking-water supply. *Water Research*, 36: 4307-4318.

Hao O.J., Shin C.-J., Lin C.-F., Jeng F.-T., Chen Z.-C., 1996 – Use of the Microtox tests for screening industrial wastewater toxicity. *Water Science and Technology*, 34: 43-50.

IRSA-CNR, 2004c – Protocollo per l'analisi della tossicità. Istituto di Ricerca Sulle Acque – CNR, Rapporto Interno Progetto MIMA.

IRSA-CNR- APAT, 2003a – Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti. *Metodi analitici per le acque*. Istituto di Ricerca Sulle Acque (IRSA)-CNR, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici, APAT Manuali e Guide, 29/2003, Vol.3, sezione 9000: 1003-1012.

ISO/DIS 11348.2, 1996 – Water quality determinations of the inhibitory effects of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). International Standard Organization, Geneva.

Norm DIN38412, Part 341, 1992 – German standard method for evaluation of water, wastewater and sewage. Determination of the inhibition effect of wastewater on the light emission of *Photobacterium phosphoreum* (test using luminescent bacteria). Berlin: Berth Verlag.

Layton A.C., Gregory B., Schultz T.W., Saylor G.S., 1999 – Validation of genetically engineered bioluminescent surfactant resistant bacteria as toxicity assessment tools. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 222-228.

Jennings V.L.K., Rayner-Brandes M.H., Bird D.J., 2001 – Assessing chemical toxicity with the luminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water Research*, 35:3448-3456.

Johnson B.T., Long E.R., 1998 – Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: A new tandem *in vitro* testing approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 1099-1106.

Kahru A., Tomson K., Pall T., Külm I., 1996 – Study of toxicity of pesticides using luminescent bacteria *Photobacterium phosphoreum*. *Water Science and Technology*, 33:147-154.

Kay H., 1997 - Toxicity-based approach to environmental protection. *European Water Pollution Control*, 7: 49-52.

Katsev, A. M., 2002 – Utilities of Luminous Bacteria from the Black Sea. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38: 189-192.

Keddy C.J., Grene J.C., Bonnel M.A., 1995 - Review of Whole-Organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30: 221-251.

King J.M.H., Di Grazia P.M., Applegate B., Burlage R., Sanseverino J., Dunbar P., Larimer F., Sayler G.S., 1990 – Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science*, 249: 778-781.

Lin Y.-J., Karuppiah M., Shaw A., Gupta G., 1999 – Effect of simulated sunlight on atrazine and metolachlor toxicity of surface waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 35-37.

Parados M., Benninghoff C., Guéguen C., Thomas R., Dobrowolski J., Dominik J., 1999 – Acute toxicity assessment of Polish (waste)water with a microplate-based *Hidra attenuata* assay: a comparison with the Microtox[®] test. *Science of the Total Environment*, 243-244: 141-148.

Persoone G., Marsalek B., Blinova I., Törökne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nalecz-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova L., Kolar B., 2003 - A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology*, 18: 395-402.

Svenson A., Edsholt E., Rickling M., Remberger M., Rottorp J., 1996 – Sediment contaminants and Microtox toxicity tested in a direct contact exposure test. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 11: 293-300.

Ulitzur S., 1997 - Established technologies and new approaches in applying luminous bacteria for analytical purposes. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 12: 179-192.

Ulitzur S., Lahav T., Ulitzur N., 2002 – A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity. *Environmental Toxicology*, 17:291-296.

Virta M., Lampinen J., Karp M., 1995 – A luminescence-based mercury bio-sensor. *Analytical chemistry*, 67: 667-669.

Viganò L., Arillo A., Buffagni A., Camusso M., Ciannarella R., Crosa G., Falugi C., Galassi S., Guzzella L., Lopez A., Mingazzini M., Pagnotta R., Patrolecco L., Tartari G., Valsecchi S., 2003 - Quality assessment of bed sediments of the Po River (Italy). *Water Research*, 37: 501-518.

3. ANALISI DELL' ATP IN BIOLUMINESCENZA

Il D.Lgs. n. 152/99 e il D.Lgs. n. 31/01 fissano i criteri di potabilità dell'acqua affinché essa sia microbiologicamente pura.

Per testare la presenza di batteri nocivi (coliformi totali e fecali) nelle acque, vengono utilizzate le tecniche di crescita su piastra (metodo UFC). Tali metodiche, però, richiedono il rispetto di protocolli di una notevole durata temporale (del resto correlata al tempo di crescita dei batteri); ciò incide sui tempi di risposta e può provocare inconvenienti. Basti pensare che, ottenuti i risultati –eventualmente anche di non potabilità- le acque sono spesso già consumate, con la vanificazione conseguente del test effettuato anche e soprattutto ai fini della protezione della salute umana.

Gli operatori che trattano la qualità dell'acqua hanno perciò necessità di ottenere risposte in tempo reale sulla qualità batterica delle acque, ma nello stesso tempo affidabili e semplici.

Negli ultimi decenni stanno emergendo dei metodi più rapidi per la conta dei batteri; tra essi spicca l'analisi dell'ATP.

La determinazione della contaminazione microbiologica delle acque tramite analisi dell'ATP implica un saggio biologico che, con metodologie alternative a quelle tradizionali già descritte, fornisce in tempi rapidi una risposta biologica in funzione della carica batterica presente nel campione d'acqua, ed ha il vantaggio di poter essere svolta *in situ*, grazie anche alla strumentazione utilizzata (trasportabile e maneggevole) ed ai tempi brevi di esecuzione.

L'ATP (adenosina trifosfato) è una molecola che si trova in ogni cellula vivente, incluse le cellule microbiche, e che rapidamente si distrugge negli organismi morti. Tale molecola gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo delle cellule, essendo il donatore universale di energia per le reazioni metaboliche. L'ATP, dunque, è una molecola organica utilizzata da tutti gli organismi per accumulare energia, ed in ogni organismo esiste una quantità nota di ATP. La misura dell'ATP è quindi in funzione della quantità di organismi viventi presenti nel campione.

L'analisi dell'ATP in bioluminescenza si utilizza da molti anni (Cappelle, 1968; Harris, 1985, Zoppini, 1990), così si sono sviluppati metodi per la sua determinazione; grazie alla loro semplicità e rapidità, essi vengono applicati con successo in diversi contesti:

- stima dell'attività microbica in un processo biologico;
- stima del carico biologico totale.

Il principio del test si basa sull'idrolisi delle molecole di ATP ad adenosina monofosfato (AMP) mediante l'utilizzo dell'enzima Luciferasi e il cofattore eterociclico luciferina; in questa idrolisi viene rilasciata energia sottoforma di luce. La quantità di luce che viene emessa è strettamente proporzionale alla concentrazione di ATP presente e, quindi, proporzionale alla conta cellulare. Tale rilascio di luce può essere quantificato con un semplice luminometro ad alto grado di sensibilità (IRSA-CNR- APAT, 2003b)

Molti laboratori di controllo della qualità microbiologica già utilizzano la tecnologia della luminescenza dell'ATP per monitorare l'igiene generale dell'acqua, per valutare il carico biologico totale (Guzzella *et al.*, 2003; Hawroskyj & Holah, 1977; Deninger & Lee, 2001), per verificare la tossicità degli inquinanti nei fanghi attivi (Chu *et al.*, 2001; Dalzell & Christofi, 2002) o, ancora, per valutare la misura della biomassa attiva nei filtri a carbone attivo usati nei trattamenti delle acque (Magic-Knezev & van der Kooij, 2004).

Molti tipi di strumentazione sono disponibili per il test della bioluminescenza con l'ATP; e sono stati redatti metodi standard di analisi dell'ATP, anche nell'acqua (Standard Methods 9211C.1, 1995)

Il metodo che utilizza la bioluminescenza dell'adenosina trifosfato (ATP) è rapido e nello stesso tempo sensibile e di semplice esecuzione, e necessita di un limitato volume di acqua (anche meno di 10 ml); per tali ragioni può essere svolto anche sul campo ed è stato sviluppato anche dall'IRSA (IRSA-CNR, 2004b; IRSA-CNR- APAT, 2003b).

Secondo la metodologia testata, con esso viene determinata la quantità di ATP presente nel campione d'acqua concentrato su membrane filtranti, al quale viene aggiunto un liquido di estrazione per l'apertura delle cellule batteriche (l'enzima D-luciferina e la luciferasi); successivamente viene misurata la bioluminescenza del campione.

La misura dell'ATP viene espressa come Unità di Luminescenza Relative (RLU), ed è in stretta relazione con le conte classiche su piastra che comunemente vengono effettuate per la determinazione di coliformi totali e fecali (Deninger & Lee, 2001; Delahaye *et al.*, 2003; Guzzella *et al.*, 2003).

A titolo di esempio si riporta uno studio condotto dall'IRSA, che comprende il monitoraggio di acque sotterranee nella provincia di Milano. In esso sono stati confrontati i dati di analisi dell'ATP effettuati con la procedura IRSA, con i valori di conta totale dei mesofili e termofili e con la carica batterica dei coliformi totali e fecali con metodo UFC; si è evidenziata una correlazione positiva e significativa dei due metodi (Fig. 2), tanto che le due metodiche possano considerarsi equiparabili.

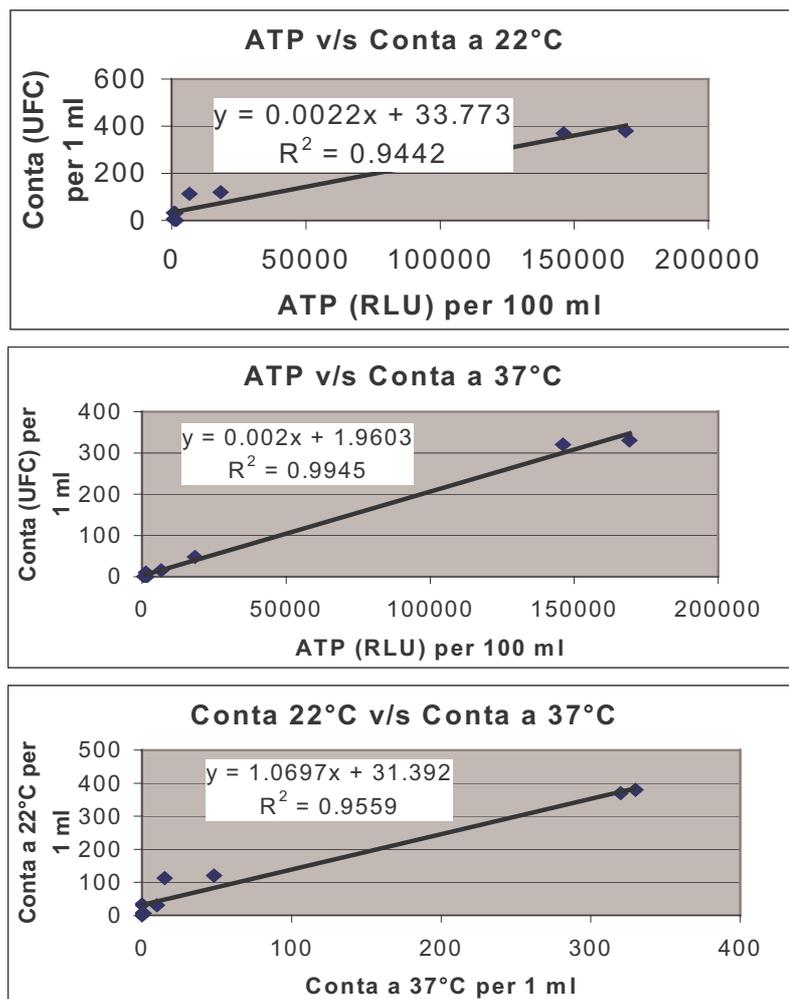


Fig. 2: Correlazione tra i risultati dell'ATP e le conte batteriche totali a 22 e 37 °C (da: "Resoconto sintetico dell'attività sviluppo di tecniche di sorveglianza degli acquiferi attraverso lo studio di indici globali di contaminazione". IRSA-C.N.R, Gruppo Nazionale per la difesa dalle Catastrofi Idrogeologiche, Rapporto interno).

Bibliografia Analisi dell' ATP in bioluminescenza

Cappelle E.W., Lewin C.V., 1968 – Use of firefly bioluminescence reactor for rapid detection and counting bacteria. *Biochemical medicine*, 2: 41-52.

Chu C.P., Lee D.J., Chang B.V., Liao C.S., 2001 – Using ATP bioluminescence technique for monitoring microbial activity in sludge. *Biotechnology and bioengineering*, 75: 469-474.

Dalzell D., Christofi N., 2002 – An ATP luminescence method for direct toxicity assessment of pollutants impacting on the activated sewage sludge process. *Water Research*, 36: 1496-1502.

Delahaye E., Welté B., Levi Y., Leblon G., Montiel A., 2003 An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network. *Water Research*, 37: 3689-3696.

Deninger R.A., Lee J., 2001 – Rapid determination of bacteria in drinking water using ATP assay. *Field Analytical Chemistry and Technology*, 5: 185-189.

Guzzella L., De Paolis A., Giuliano G., 2003 – Indici globali di contaminazione per il monitoraggio degli acquiferi. *Acqua e Aria*, 9: 86-94.

Harris C., Kell D., 1985 – Estimation of microbial biomass. *Biosensor*, 1: 17-84.

Hawroskyj J.M., Holah J., 1977 –ATP: a universal hygiene monitor. *Trends in food Science & Technology*, 8: 79-84.

IRSA-CNR- APAT, 2003b – Determinazione dell'Adenosinatrifosfato. *Metodi analitici per le acque*. Istituto di Ricerca Sulle Acque (IRSA)-CNR, Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici, APAT Manuali e Guide, 29/2003. Vol.3, sezione 9000: 1143-1147.

IRSA-CNR, 2004b – Protocollo per l'analisi dell'ATP. Istituto di Ricerca Sulle Acque – CNR, Rapporto Interno Progetto MIMA.

Magic-Knezev A., van der Kooij D., 2004 – Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment. *Water Research*, 38: 3971-3979.

Zoppini A.M., 1990 – Adenosinatrifosfato cellulare (ATP). *Nova Thalassia*, 11: 225-230.

4. E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

L'utilizzo sempre maggiore di pesticidi in agricoltura ha comportato un progressivo aumento della possibilità di rinvenire tali sostanze, o i loro prodotti di degradazione, nel suolo e nelle acque sotterranee. Anche tali sostanze devono essere quindi monitorate affinché non superino i limiti di tollerabilità previsti dalla legge (D.Lgs. 152/99, parametri chimici addizionali), che variano da 0.1 µg/l a 0.03 µg/l (per Aldrin, Dieldrin, Eptacloro e Eptacloro epossido) con un tetto massimo di 0.5 µg/l se più pesticidi sono compresenti.

I metodi di determinazione degli erbicidi e i loro prodotti di degradazione nelle acque sono lunghi, costosi e richiedono attrezzature sofisticate, sia per la loro estrazione dalla matrice che per la loro determinazione (cromatografia liquida o gassosa, associata alla spettrometria di massa; HPLC, high-pressure liquid chromatography).

Negli ultimi anni sono state sviluppate delle tecniche biologiche immunoenzimatiche (quali è, ad esempio, il test E.L.I.S.A., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) particolarmente sensibili ed adatte alla determinazione degli erbicidi più comunemente utilizzati in agricoltura (Gabaldón et al., 2002; Bartone *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 2005; Karu *et al.*, 1994; Clegg *et al.*, 1999; Manclús & Montoya, 1996; Fránek *et al.*, 1995; Brecht et al., 1998), dei PAH (idrocarburi policiclici aromatici) (Barceló *et al.*, 1998) nonché degli insetticidi (Nakata et al., 2001; Marco *et al.*, 1995a).

Hanno altresì il pregio di poter essere svolti *in situ*, di essere semplici, veloci, altamente specifici e selettivi nei confronti delle sostanze target, e molto affidabili se comparati con le misurazioni effettuate con gli strumenti convenzionali di analisi (Gascón *et al.*, 1995; Thacker & Casale, 1998; Touloupakis *et al.*, 2005; Banks & Hernandez, 2003). Una tale selettività consente di evitare di ricorrere a procedure elaborate di separazione del pesticida dalla matrice, al fine di togliere le interferenze; consente altresì di ottenere risultati affidabili anche in presenza di livelli molto bassi di pesticidi. A ciò si aggiunga che la sensibilità del test aumenta se si effettua una pre-concentrazione del campione (Aga & Thurman, 1995; Guzzella & Pozzoni 2000).

Anche l'IRSA-CNR ha sviluppato tali tecniche (IRSA-CNR, 2004d; Touloupakis *et al.*, 2005) che –come detto– permettono di rilevare valori di presenza di pesticidi anche in misura significativamente inferiore ai limiti di legge (0,1 µg/l). Il test E.L.I.S.A. non presenta difficoltà di conduzione, richiede tempi di analisi non particolarmente lunghi (inferiori alle due ore) ed è applicabile direttamente in campo. Il test E.L.I.S.A. (fornito in kit) comprende una tecnica che consente di individuare e quantificare un composto target usando un anticorpo che lega solo o principalmente quella sostanza; esso si basa sulla competizione tra l'erbicida, a concentrazione nota legato ad un enzima (complesso enzima-coniugato) e quello presente nel campione. La quantificazione del pesticida presente nel campione d'acqua viene determinata per via colorimetrica, in quanto avviene una reazione colorimetrica tra il pesticida e l'enzima specifico; vengono perciò determinate le densità ottiche dei campioni alla lunghezza d'onda di 450 nm con un semplice fotometro. Gli erbicidi per i quali attualmente sono disponibili i kit di analisi sono le triazine, alachlor e gli erbicidi ureici.

Per quanto riguarda i limiti di rilevabilità dei pesticidi, in uno studio svolto dall'IRSA in campioni di acqua sotterranea (Touloupakis et al., 2005), sono stati ritrovati: per le triazine in generale, 0,02 µg/l (per l'atrazina, 0,02 µg/l; per simazina 0,065 µg/l; per la terbutilazina, 0,15 µg/l); per l'alachlor, 0,046 µg/l; per gli erbicidi ureici (linuron e del diuron), 0,02 µg/l.

I test che utilizzano l'E.L.I.S.A. come saggi per la presenza di pesticidi nelle acque sono già utilizzati da vari anni (Banks & Hernandez, 2003), ed in particolare anche per le acque sotterranee (Marco et al., 1995b; Francioni et al., 2003; Lee et al., 2002a; Lee et al., 2002b; Blake et al., 2001; Gojmerac et al., 1996).

Bibliografia Test E.L.I.S.A.

Aga D.S., Thurman E.M., 1995 – Application of solid-phase extraction for trace analysis of herbicides in water and soil by enzyme-linked immunosorbent assays. *New frontier in agrochemical immunoassays*. Kurtz D.A., Skerritt J.H., Stanker L (Eds.), Arlington, VA: AOAC International: 123-136.

Banks K.E., Hernandez S., 2003 – Evaluation and validation of commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) specific for atrazine, chlorpyrifos, and diazinon in aqueous phase. *Talanta*, 61: 257-265.

Barceló D., Oubiña A., Salau J.S., Perez S., 1998 – Determination of PAHs in river water samples by ELISA. *Analytica Chimica Acta*, 376: 49-53.

Bartone C., Pozzoni F., Guzzella L., 1996 – Utilizzo di tecniche immunoenzimatiche per l'analisi dei residui di erbicidi in suoli agrari. *Acqua e Aria*, 9: 793-799.

Blake DA, Jones RM, Blake RC 2nd, Pavlov AR, Darwish IA, Yu H., 2001 - Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosensors and Bioelectronics*, 16:799-809.

Brecht A., Klotz A., Barzen C., Gauglitz, G., Harris R.D., Quigley G.R., Wilkinson J.S., 1998 - Optical immunoprobe development for multiresidue monitoring in water. *Analytica Chimica Acta*, 362: 69-79.

Cao Y., Lu Y., Log S., Hong J., Sheng G., 2005 – Development of an ELISA for detection of bromoxynil in water. *Environment International*, 31: 33-42.

Clegg B.S., Stephenson G.R., Hall J.C. 1999 - Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 5031-5037.

Fránek M., Kolář V., Eremin S.A., 1995 – Enzyme immunoassays for s-triazine herbicides and their application in environmental and food analysis. *Analytica Chimica Acta*, 311: 349-356.

Francioni E., Fillmann G., Hamacher C., Wagener A.d.L.R., Depledge M.H., Readman J.W., Meniconi M.d.F.G., 2003 - Evaluation of a Commercially Available Elisa Kit as a Tool to Determine BTEX in Groundwater. *Environmental Technology*, 24: 665-670.

Gabaldón J.A., Cascales J.M., Maquieira A., Puchades R., 2002 – Rapid trace analysis of alachlor in water and vegetable samples. *Journal of Chromatography A*, 963: 125-136.

Gascón J., Martínez E., Barceló D., 1995 – Determination of atrazine and alachlor in natural waters by rapid-magnetic particle-based ELISA. Influence of common cross-reactants: deethylatrazine, deisopropylatrazine, simazine and metolachlor. *Analytica Chimica Acta*, 311: 357-364.

Gojmerac T., Kartal B., Bilandzic N., Roic B., Rajkovic-Janje R., 1996 - Seasonal atrazine contamination of drinking water in pig-breeding farm surroundings in agricultural and industrial areas of Croatia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56: 225-230

Guzzella L., Pozzoni F., 2000 - Tecniche di estrazione e concentrazione di fitofarmaci da campioni di acqua e suolo, *Quaderni IRSA*, Volume: 112: 46-65.

IRSA-CNR, 2004d – Protocollo per l'analisi degli erbicidi con E.L.I.S.A. Istituto di Ricerca Sulle Acque – CNR, Rapporto Interno Progetto MIMA.

Lee E.A., Zimmerman L.R., Bhullar B.S., Thurman E.M., 2002a - Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate *Analytical Chemistry*, 74: 4937-4943.

Lee J.K., Ahn K.C., Park O.S., Ko Y.K., Kim D.W., 2002b - Development of an immunoassay for the residues of the herbicide bensulfuron-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1791-1803

Karu A.E., Schmidt D.J., Richman S.J., Cooper C., Tran D., Hsu J., 1994 - Validation of a Monoclonal Immunoassay for Diuron in Groundwater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 310 – 315.

Manclús J.J. Montoya A., 1996 - Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Insecticide Chlorpyrifos. 2. Assay Optimization and Application to Environmental Waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 4063-4070.

Marco M.P., Chiron S., Gascón J., Hammock B.D., Barceló D., 1995a – Validation of two immunoassays methods. *Analytica Chimica Acta*, 311: 319-329.

Marco M.P., Chiron S., Gascón J., Hammock B.D., Barceló D., 1995b - Validation of two immunoassay methods for environmental monitoring of carbaryl and 1-naphthol in ground water samples. *Analytica Chimica Acta*, 311: 319-329.

Nakata M., Fukushima A., Ohkawa H., 2001 – A monoclonal antibody-based ELISA for the analysis of the insecticide flucythrinate in environmental and crop samples. *Pest Management Science*, 57: 269-277.

Thacker J.D., Casale E.S., 1998 – A High-throughput ELISA system for surface water and groundwater analysis. *Analytica Chimica Acta*, 376: 61-65.

Touloupakis, E.; Giannoudi, L.; Piletsky, S.A.; Guzzella, L.; Pozzoni, F.; Giardi, M.T., 2005 - A multi-biosensor based on immobilized Photosystem II on screen-printed electrodes for the detection of herbicides in river water. *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 1984-1992.