

L'ANALIZZATORE EASYCHEM TOX PER IL SAGGIO DI TOSSICITÀ ACUTA CON BATTERI BIOLUMINESCENTI (*VIBRIO FISCHERI*): VERIFICA DEI CRITERI DI PRECISIONE E VALIDITÀ

di A. Paina^a, C. Martone^b, A. Pati^c, S. Barbizzi^d, S. Rosamilia^e, O. Faraponova^f, D. Conti^g, S. Balzamo^h

ISPRA - andrea.paina@isprambiente.it^a; ISPRA - cristina.martone@isprambiente.it^b;
ISPRA - alessandra.pati@isprambiente.it^c; ISPRA - sabrina.barbizzi@isprambiente.it^d;
ISPRA - silvia.rosamilia@isprambiente.it^e; ISPRA - olga.faraponova@isprambiente.it^f;
ISPRA - daniela.conti@isprambiente.it^g; ISPRA - stefania.balzamo@isprambiente.it^h

Abstract. Il saggio con *Vibrio fischeri* è uno dei metodi più diffusi ed utilizzati per la valutazione della tossicità acuta delle acque e di campioni acquosi (acque di scarico, lisciviati, ecc.). Il test è caratterizzato da una notevole semplicità di esecuzione, rapidità di risposta ad un costo relativamente contenuto. In questo lavoro abbiamo verificato l'efficienza e la precisione di un nuovo analizzatore, l'EasyChem Tox, caratterizzato da elevata automazione, rapidità di esecuzione in tutte le fasi del test, associata ad un'efficienza uso dei reagenti (il campione minimo da analizzare è di 320 µL) ed elevata produttività. La lettura della bioluminescenza con frequenza fino a 45^{sec}, l'esecuzione in duplicato di ogni singola diluizione del campione e la restituzione grafica del risultato in tempo reale (figura 1 e 2), consente di verificare l'andamento della risposta batterica nel corso del test. L'analizzatore è stato testato utilizzando quattro sostanze tossiche; bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇), solfato di zinco (ZnSO₄*H₂O), 3,5 Diclorofenolo (C₆H₄Cl₂O) e Cloruro di cadmio (CdCl₂*2,5H₂O). I risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente ai fini della determinazione delle ripetibilità e riproducibilità del sistema. Ulteriori prove sono state condotte confrontando i risultati del sistema EasyChem Tox con il sistema Microtox®. Il sistema EasyChem Tox ha mostrato una notevole precisione, un'ottima versatilità e semplicità d'uso combinata ad un'elevata produttività.

Keywords: analizzatore, saggio con batteri bioluminescenti, tossicità acuta, criteri di validità.

Introduzione.

Il test Microtox®, grazie al suo ampio spettro di sensibilità a diversi composti sia organici che inorganici, è ampiamente utilizzato come strumento di screening adatto a determinare la tossicità in ambiente acquatico attraverso l'analisi di campioni di svariata origine e natura: acque di scarico, sedimenti, suoli e lisciviati di varia natura (percolati di discarica, estratti acquosi da rifiuti solidi, ecc). Il limite principale di questo saggio è la relativa scarsa produttività potendosi eseguire un numero limitato di saggi per effetto sia dei volumi dei reagenti necessari all'esecuzione del test, sia dei tempi di esecuzione del saggio, vincolati questi, alla determinazione dell'end-point prestabilito (valore di EC a 5, 15 o 30^{min}). Inoltre, nell'esecuzione del saggio con gli analizzatori ad oggi più diffusi sul mercato (Microtox, Lumistox), il contributo dell'operatore è fondamentale nel determinare la corretta esecuzione del test e il livello di riproducibilità dello stesso, aspetti fondamentali per una corretta interpretazione dei risultati. In questo studio sono state verificate le prestazioni dell'EasyChem Tox, un nuovo analizzatore discreto di bioluminescenza per

l'esecuzione di test cronici con batteri bioluminescenti. L'EasyChem Tox è caratterizzato da elevata automazione di tutte le fasi di saggio associate ad un efficiente uso di reagenti e buffer. La lettura della bioluminescenza ogni 40^{sec} consente di monitorare in tempo reale l'andamento del test e la risposta batterica; il software che gestisce lo strumento restituisce un elaborato grafico (figura 1 e 2) in cui si può osservare la risposta dell'organismo, in termini di bioluminescenza emessa, lungo tutta la durata del saggio. In questo lavoro abbiamo verificato le prestazioni dell'analizzatore Easychem Tox in termini di ripetibilità e di ripetibilità intermedia oltre a verificare i risultati in relazione ai criteri di validità della EN 11348-3:2009 [1]. Inoltre, abbiamo comparato i valori di tossicità ottenuti con Easychem Tox con quelli rilevati con Microtox® M500, utilizzando batteri liofilizzati in formulazione commerciale conservati a -20°C (Modern Water).

Materiali e metodi.

I batteri utilizzati sono della specie *Vibrio fischeri* (freeze-dried bacteria, NRRL B-11177) prodotti in formulati commerciali liofilizzati (Microtox®, Modern Water. Reagent A, Systea) e conservati a -20°C fino al momento dell'uso. Gli analizzatori utilizzati sono il Microtox® M500 (Modern Water) e l'EasyChem Tox (Systea, figura 3). Nelle prove per la determinazione della ripetibilità, sono stati utilizzati i batteri, i buffer, la soluzione di riattivazione e le soluzioni di controllo prodotti e forniti dalla Systea. La verifica di comparabilità dei risultati tra EasyChem Tox e Microtox® M500, è stata condotta utilizzando batteri *V. fischeri* liofilizzati, buffer osmotico, diluente e soluzione di riattivazione Microtox®, prodotti e commercializzati dalla Modern Water. I reagenti utilizzati nei saggi e le relative concentrazioni sono; K₂Cr₂O₇ (Panreac) 105,8mg/L, ZnSO₄*H₂O (Panreac) 12,07mg/L, 3,5 Diclorofenolo (97%, Sigma-Aldrich) 7,01mg/L e CdCl₂*2,5H₂O (Panreac) 100mg/L. Le modalità operative e i criteri di validità sono quelli definiti dalla EN11348-3[1]. Le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua ultrapura con conducibilità 0.054µS/cm. La vetreria utilizzata è stata preventivamente pulita con un doppio lavaggio con detergente acido e basico e un risciacquo in acqua demineralizzata a 75°C.



Figura 1 – EasyChem Tox; Rapporto di saggio di un test con ZnSO₄*H₂O (*V. fischeri*, Modern Water)

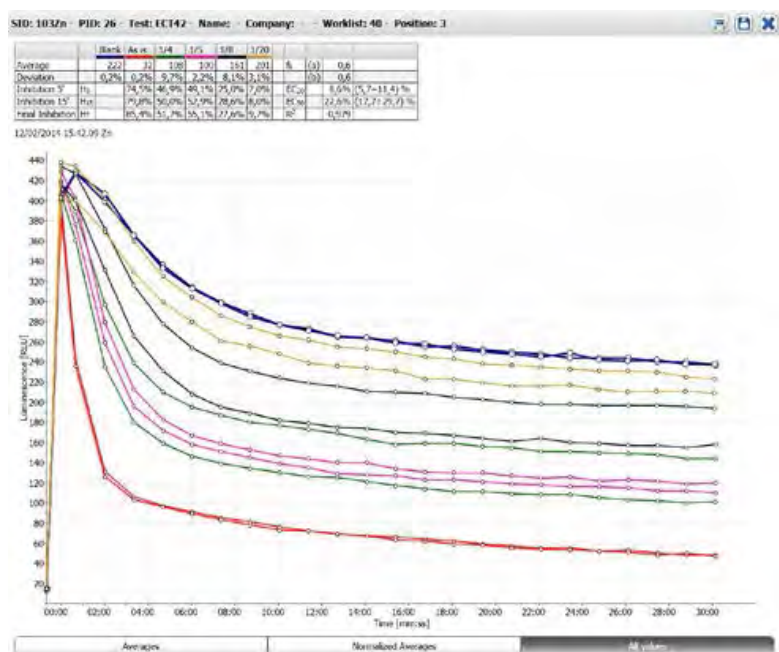


Figura 2 – EasyChem Tox; Rapporto di saggio di un test con $ZnSO_4 \cdot H_2O$ (*V. fischeri*, *Syستا*).

Per la verifica di ripetibilità sono stati utilizzati i valori di EC_{50} a 30^{min} ottenuti da 54 saggi effettuati su ciascun tossico; ciascun saggio è stato condotto con cinque concentrazioni e un controllo in duplicato. Le prove sono state eseguite per tre giorni consecutivi e ripetute nelle tre settimane a seguire. In ciascuna settimana il medesimo operatore ha eseguito tutte le fasi di saggio (riattivazione dei batteri, preparazione delle soluzioni ed esecuzione dei saggi).



Figura 3 – L'analizzatore EasyChem Tox; sono visibili il comparto dei reagenti (a sx), dei campioni (al centro in basso), il braccio con l'ago per il trasferimento dei reagenti (al centro in alto) e il vano per la lettura dei campioni (a dx) con la torre di lavaggio delle cuvette. In basso a destra un particolare del comparto di lettura dei campioni

con, sullo sfondo, uno dei quattro rack di cuvette test e, a sx la torre di lavaggio delle cuvette

Risultati e discussione.

Elaborazione statistica dei risultati: determinazione della ripetibilità ristretta ed intermedia.

I risultati ottenuti utilizzando batteri Sys tea, evidenziano una generale tendenza di maggior sensibilità della risposta batterica; i valori di EC_{50} a 30^{min} registrati, infatti, sono inferiori a quelli riportati all'Allegato C della EN11348-3:2009. Nel caso del cromo il valore medio è di $9,9 \pm 1,4 mg/L$ con un $CV=15\%$. Per il DCP il valore medio è $2,61 \pm 0,33 mg/L$ con un $CV=13\%$. Nel caso dello zinco il valore medio è $1,04 \pm 0,35 mg/L$ con un $CV=34\%$. Per il cadmio il valore medio è $7,2 \pm 2,2 mg/L$ con un $CV=30\%$. Per quanto riguarda la differenza percentuale tra i valori dei duplicati di controllo (punto 11 della EN 11348-3:2009), la media dei valori registrati in tutti i test effettuati (216 test) è inferiore al limite previsto dalla norma tecnica di riferimento; il 75% dei valori è inferiore al limite del 3%.

Nelle prove di comparazione sono stati utilizzati i valori di EC_{50} a 30^{min} , ottenuti da saggi eseguiti con cinque concentrazioni più un controllo in duplicato, per i test effettuati con EasyChem Tox, e senza repliche di controllo, per i test eseguiti con Microtox® M500. I valori relativi al fattore di correzione medio a 30^{min} (f_{kt} - è il rapporto tra l'intensità luminosa dei batteri misurata dopo l'aggiunta della soluzione di controllo a 15 o 30 minuti e l'intensità luminosa prima dell'aggiunta della stessa soluzione ed espresso come media dei fattori di correzione per le due repliche del controllo) sono risultati più critici; il 31% di tutti i valori registrati è inferiore al limite minimo previsto dalla EN11348-3 (0,6). Il calcolo di ripetibilità e ripetibilità intermedia dell'EasyChem Tox, in conformità ai criteri definiti dal Vocabolario Internazionale di Metrologia[2], è stata condotta elaborando statisticamente i risultati ottenuti da una serie di 54 test effettuati su ciascuna sostanza tossica. I valori di ripetibilità ristretta ed intermedia (tabella 1) sono stati ottenuti applicando il test ANOVA. I valori di ripetibilità, valutati in riferimento a quanto riportato da Environment Canada[3] come "ragionevoli" (30%) e "preferibili" (20%), sono molto buoni per quanto riguarda la ripetibilità con il DCP e la ripetibilità ristretta con cromo, e buoni per la ripetibilità intermedia con cromo.

Tabella 1 - stima della ripetibilità del sistema EasyChem Tox

	<i>Cd</i>	<i>Cr</i>	<i>Zn</i>	<i>DCP</i>
<i>ripetibilità ristretta [%]</i>	<i>30</i>	<i>14</i>	<i>34</i>	<i>13</i>
<i>ripetibilità intermedia [%]</i>	<i>37</i>	<i>24</i>	<i>38</i>	<i>18</i>

Per quanto riguarda il cadmio e lo zinco i valori sono più critici se si considerano in rapporto al riferimento riportato in Environment Canada. Tuttavia, per quanto riguarda il cadmio, le valutazioni sono un po' differenti se si prendono a riferimento i risultati del circuito ISPRA-IC20[4] del 2011 a cui hanno partecipato 45 laboratori delle Agenzie regionali e provinciali per l'ambiente (ARPA/APPA). Infatti, pur considerando che i risultati dalle prove eseguite hanno un $CV 30\%$, il 69% dei valori rilevati rientra nei limiti stabiliti per il circuito ISPRA-IC20 ($8,6 \pm 2,7 mg/L$). Per quanto riguarda lo zinco invece, sempre in riferimento a quanto riportato in Environment Canada, i valori sono risultati abbastanza elevati.

Studio di comparazione dei risultati di Microtox® M500 ed EasyChem Tox.

In questa fase sono stati comparati, utilizzando batteri Microtox®, i valori di EC_{50} a 30^{\min} , ottenuti con $K_2Cr_2O_7$ e $ZnSO_4 \cdot H_2O$. In figura 4 sono riportati, in forma grafica, i valori di f_{kt} a 30^{\min} dei controlli nei saggi effettuati durante le prove di comparazione. Nelle prove sono stati utilizzati due lotti batterici differenti (lotto 13G4098 e 14A4003) testati su entrambi gli analizzatori, sia in giorni differenti che contemporaneamente. I valori registrati rientrano per il 99% entro i limiti di validità riportati nella EN11348-3. La media e lo scarto tipo dei valori di f_{kt} registrati dai due strumenti sono differenti, quindi si è verificata la probabilità che tale differenza sia imputabile ad un effetto casuale. Applicando il “test t” di Student il valore è risultato significativo (<0.05) e quindi le piccole differenze osservate non sono esclusivamente dovute al caso. Tuttavia, se l’analisi statistica mette in rilievo questa differenza, è stato già osservato che, praticamente, tutti i valori registrati rientrano nei limiti di validità della norma di riferimento. Inoltre possiamo osservare (figura 5) che, considerando lo scarto tipo in rapporto alla media dei due gruppi di valori, vi è un’area di sovrapposizione assai ampia; i due gruppi di valori sono “compatibili” in senso metrologico in quanto “il valore assoluto della differenza di una qualsiasi coppia di valori misurati, derivanti da due risultati di misura differenti, è minore di un certo multiplo dell’incertezza tipo associata a tale differenza” (2.47 - CEI UNI 70099:2010-04).

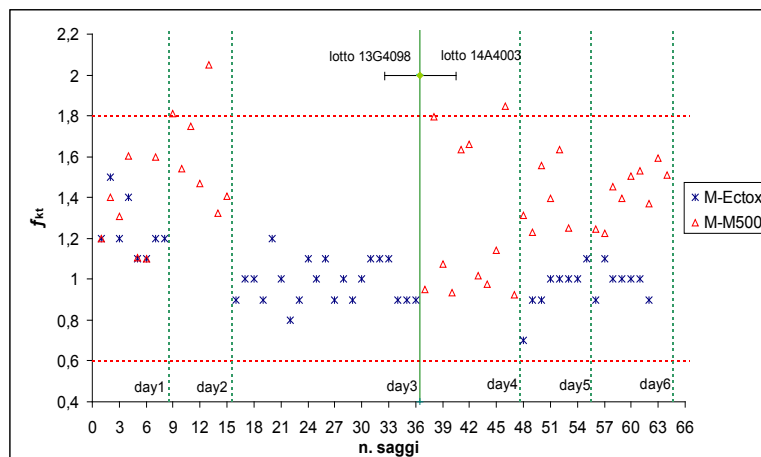


Figura 4 – Valori di f_{kt} a 30^{\min} con batteri Microtox sugli analizzatori EasyChem Tox (M-Ectox) e Microtox® M500 (M-M500)

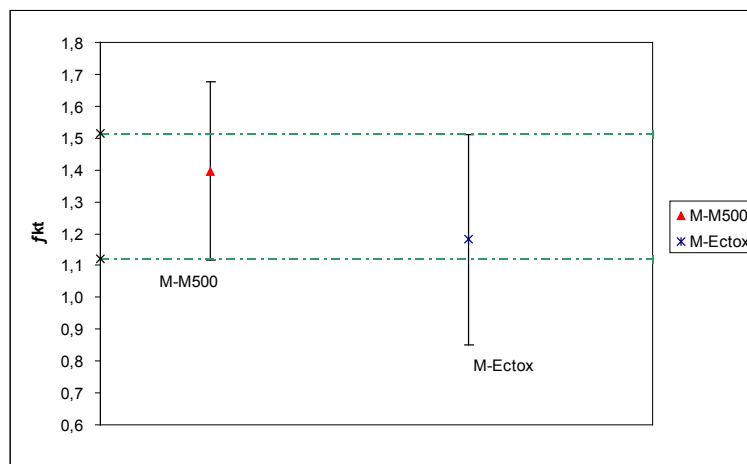


Figura 5 – Valori medi di f_{kt} a 30^{\min} e scarto tipo con batteri Microtox sugli analizzatori EasyChem Tox (M-Ectox) e Microtox® M500 (M-M500)

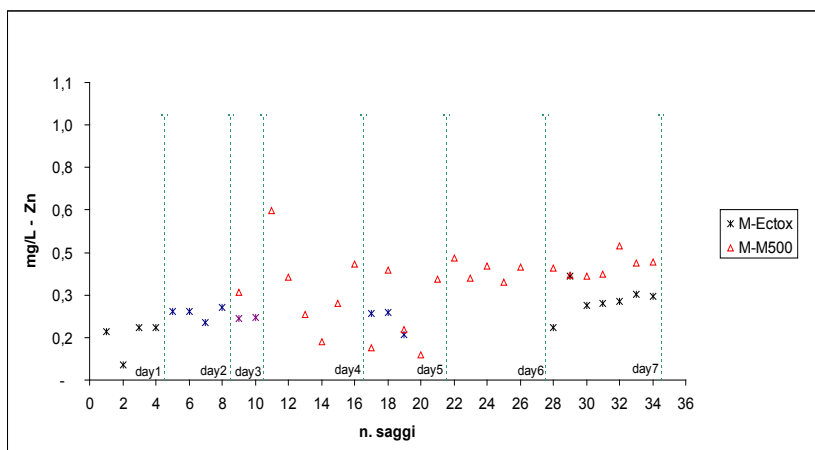


Figura 6 - Valori di EC_{50} a 30^{min} con zinco e batteri *Microtox* sugli analizzatori *EasyChem Tox (M-Ectox)* e *Microtox® M500 (M-M500)*

In figura 6 sono riportati i valori di EC_{50} a 30^{min} ottenuti con zinco, su entrambi gli strumenti; I saggi sono stati effettuati in giorni (day) non consecutivi e con batch batterici differenti tranne per i giorni 3, 5 e 7 in cui sono stati utilizzati batteri provenienti dallo stesso batch su entrambi gli strumenti. I valori ottenuti con zinco (*EasyChem Tox* $0,24 \pm 0,07 \text{ mg/L}$ e con *Microtox® M500* $0,37 \pm 0,12 \text{ mg/L}$) sono risultati molto inferiori a quelli di riferimento riportata nella EN11348-3 ($2,17 \pm 0,73 \text{ mg/L}$). In sostanza i batteri mostrano una elevata sensibilità allo zinco. I valori medi e lo scarto tipo dei valori di EC_{50} a 30 min ottenuti dai due strumenti, sono leggermente differenti. Il risultato del "test t" di Student, è significativo ($< 0,05$), quindi le piccole differenze osservate non sono esclusivamente casuali.

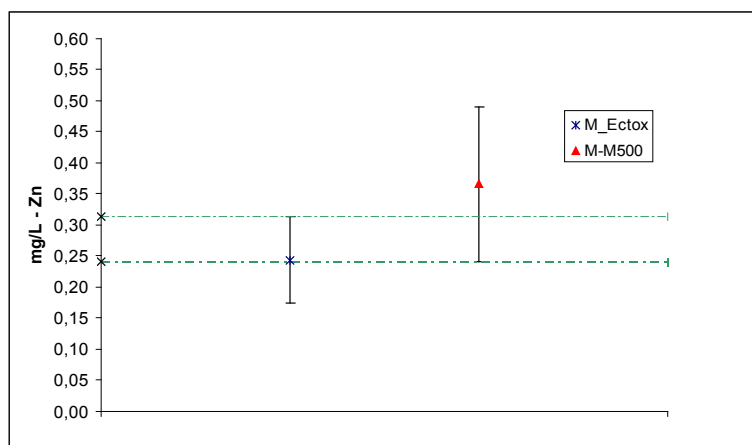


Figura 7 - Valori medi di EC_{50} a 30^{min} e scarto tipo con zinco e batteri *Microtox* sugli analizzatori *EasyChem Tox (M-Ectox)* e *Microtox® M500 (M-M500)*

Tuttavia, come è possibile osservare in fig. 7, considerando lo scarto tipo in rapporto alla media dei due gruppi di valori, vi è una significativa area di sovrapposizione e i risultati ottenuti sono compatibili metrologicamente.

Nella figura 8 sono riportati i valori di EC_{50} a 30^{min} con cromo ottenuti dai due strumenti insieme ai valori derivati dal circuito ISPRA-IC20. I valori hanno una distribuzione abbastanza ampia ma rientrano sostanzialmente nei limiti previsti dalla EN11348-3 e sono in linea con quelli ottenuti dai 42 laboratori partecipanti al circuito ISPRA-IC20. Anche in questo caso è stato effettuato un "test t" di Student per

rilevare l'eventuale distribuzione casuale dei valori ottenuti dai due strumenti; il valore non è significativo, quindi la distribuzione statistica dei risultati è casuale e quindi i due gruppi di valori sono paragonabili; inoltre, i valori ottenuti sono "compatibili" in senso metrologico.

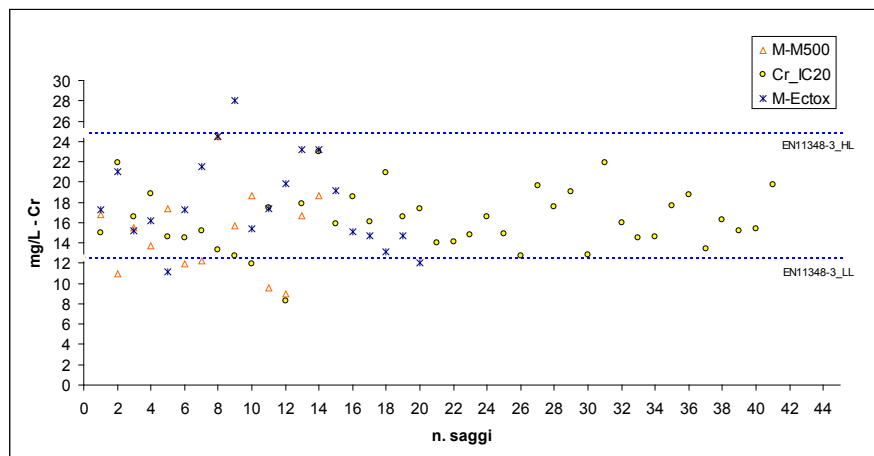


Figura 8 – Valori di EC_{50} a 30^{min} con cromo e batteri *Microtox* (*Modern Water*) ottenuti con gli analizzatori *EasyChem Tox* (*M-Ectox*) e *Microtox*® (*M-M500*) e i valori derivati dal circuito ISPRA IC20 (*Cr_IC20*)

Conclusioni.

La ripetibilità del sistema *EasyChem Tox* è risultata buona per quanto riguarda cromo e DCP mentre i valori sono un po' elevati per quanto riguarda cadmio e soprattutto zinco (Tabella 1). Per il cadmio, tuttavia, i valori sono in linea con i limiti di attenzione stabiliti per il circuito ISPRA-IC20. Il valore di f_{kt} è risultato il parametro più critico ed è molto probabilmente correlato non tanto alle modalità operative ed alle caratteristiche dello strumento, quanto alla risposta batterica in termini di sviluppo della bioluminescenza (figura 2). Relativamente alla comparabilità dei risultati ottenuti con *EasyChem Tox* rispetto a *Microtox*® M500, questa è risultata, limitatamente alle condizioni dei test, buona

I valori di f_{kt} restituiti dai due strumenti in analoghe condizioni, sono compatibili in senso metrologico e in linea con i riferimenti della EN11348-3. La risposta al cromo dei due strumenti è comparabile essendo non significativo il "test t" di Student; inoltre i valori ottenuti sono in linea con i limiti di precisione della norma tecnica di riferimento. Per quanto riguarda la risposta allo zinco, si sono rilevati valori molto bassi rispetto ai limiti di precisione della EN11348-3; la valutazione statistica conferma che la distribuzione dei valori non è esclusivamente casuale, tuttavia, i due gruppi di valori sono compatibili in senso metrologico. Dal punto di vista gestionale l'analizzatore *EasyChem Tox* si è dimostrato molto performante grazie all'elevata automazione di tutte le fasi di saggio e all'utilizzo di volumi molto contenuti di reagenti e buffer ($32\mu\text{L}$ è il volume di batteri da utilizzare). Lo strumento consente di effettuare fino a 45 test/h, che significa poter eseguire fino a 9 saggi completi - con 5 concentrazioni più un controllo in duplicato - ogni due ore. A queste caratteristiche si aggiunge poi una notevole semplicità di gestione insieme ad una flessibilità d'uso dello strumento molto elevata.

Bibliografia.

- [1] EN 11348-3:2009 - Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria
- [2] CEI UNI 70099:2010-04, International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM). 2010-04
- [3] Environment Canada EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments) "Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests
- [4] ISPRA- ICO20" - Valutazione ecotossicologica di contaminazione delle acque mediante saggi di tossicità acuta con *Vibrio fischeri*". ISPRA, 2011.