

Lo studio del fitoplancton in aree marine balneari

GIANLUIGI DOJMI DI DELUPIS, PAOLA MAGNATTI, CLAUDIO SERAFINI
e GIORGIO UGOLINI

Laboratorio di Igiene del Territorio, Istituto Superiore di Sanità

Riassunto. — Nel quadro di una collaborazione con gli organismi internazionali UNEP e WHO per il monitoraggio delle acque costiere ad uso ricreativo e balneare (Progetto Pilota WHO/UNEP, MED VII) sono stati presi in considerazione per alcuni mesi del 1978 nella zona costiera di Castel Porziano, in corrispondenza del tratto balneare comunale e del tratto terminale di un canale che in esso sfocia, i parametri relativi alla biomassa e densità di fitoplancton. I prelievi sono stati eseguiti a 10 m dalla riva in considerazione dei riflessi igienico-sanitari che la qualità dell'acqua può produrre, data la densità di bagnanti lungo questa linea. La densità di fitoplancton è stata valutata con il metodo della filtrazione su membrana sotto vuoto e ne sono state favorite, con qualche lieve modifica, caratteristiche di rapidità e praticità. La biomassa è stata stimata avvalendosi di determinazioni spettrofotometriche di clorofilla « a » secondo un metodo standard proposto dall'UNESCO. Mentre i valori di densità di fitoplancton marino non superano 640 cellule/ml, il canale presenta fitoplancton costituito prevalentemente da diatomee con densità assai più elevate, che scarica in mare sia d'inverno che d'estate. Si prendono in esame e si discutono, con particolare riferimento ad aree balneari, alcuni aspetti dell'inquinamento marino di origine terrestre correlabili all'apporto di fitoplancton da parte di piccoli corsi d'acqua.

Summary (*Phytoplankton monitoring in bathing coastal water*). — In the framework of a collaboration with the international organizations UNEP and WHO on recreational and bathing coastal water monitoring (Pilot Project WHO/UNEP, MED VII) phytoplankton biomass and density parameters were taken into consideration for some months in 1978 at « Castel Porziano ». The monitored area includes recreational sea water of the municipal shore tract and of the terminal tract of a flowing water course.

Phytoplankton density was measured by the membrane filtration method. The fitness of this method used for monitoring was analyzed and was made

more rapid and practical by some slight changes. Samples were drawn ten meters offshore considering the high bathers density at this line and possible water quality effects on human health. Biomass was evaluated by chlorophyll spectrophotometric analyses, according to a tentative standard method of UNESCO. While marine phytoplankton density values do not exceed 640 cell/ml, the water course shows phytoplankton, prevalently constituted by diatoms with density much more elevated which is discharged either by winter or by summer. Some aspects of marine pollution of terrestrial origin are examined with particular relation to recreational coastal water in its connection with small water courses contribution in phytoplankton.

INTRODUZIONE

Nel quadro di una collaborazione con gli organismi internazionali UNEP e WHO per il monitoraggio delle acque costiere ad uso ricreativo e balneare (Progetto Pilota WHO/UNEP, MED VII) sono stati esaminati, per alcuni mesi del 1978, nella zona costiera di Castel Porziano, in corrispondenza del tratto balneare comunale, i parametri relativi alla biomassa e densità del fitoplancton. Ciò ha fornito l'occasione per una ricerca, scelta e messa a punto di un metodo di concentrazione e di conteggio del fitoplancton, che presentasse caratteristiche di rapidità e praticità, necessarie quando le aree da studiare siano estese e la disponibilità di tempo sia scarsa per la rapidità di evoluzione dei fenomeni. Infatti la sorveglianza della qualità delle acque, esaminando il contenuto in fitoplancton, può rivelare tendenze a fenomeni di eutrofizzazione e svelarne l'andamento qualora questi fossero in atto.

Tali fenomeni possono, quando conducono a fioriture esplosive, causare non solo spiacevoli alterazioni organolettiche delle acque di balneazione (odore, ecc.), ma anche disturbi diretti ai bagnanti, come irritazioni oculari ed alla gola prodotte dall'aerosol proveniente dalla schiuma [1], o dermatiti, attribuite ad alghe marine unicellulari [2].

Nella zona presa in esame scorre un canale, che limita a Nord il tratto balneare, e che è stato compreso nel presente studio allo scopo di valutare l'influenza, sull'area marina immediatamente antistante, dell'apporto di piccoli corsi d'acqua, che provenendo dal retroterra abitato, sfociano in mare e sono talora esposti anche all'uso balneare.

CARATTERISTICHE DELLA ZONA PRESA IN ESAME

La zona esaminata comprende, come si è già detto, il tratto balneare comunale della spiaggia di Castel Porziano (Fig. 1). Esso si estende per circa due chilometri. È delimitato sia a Nord che a Sud da due canali. Il canale a Nord, « Fosso Focetta » proviene dal retroterra abitato. La larghezza

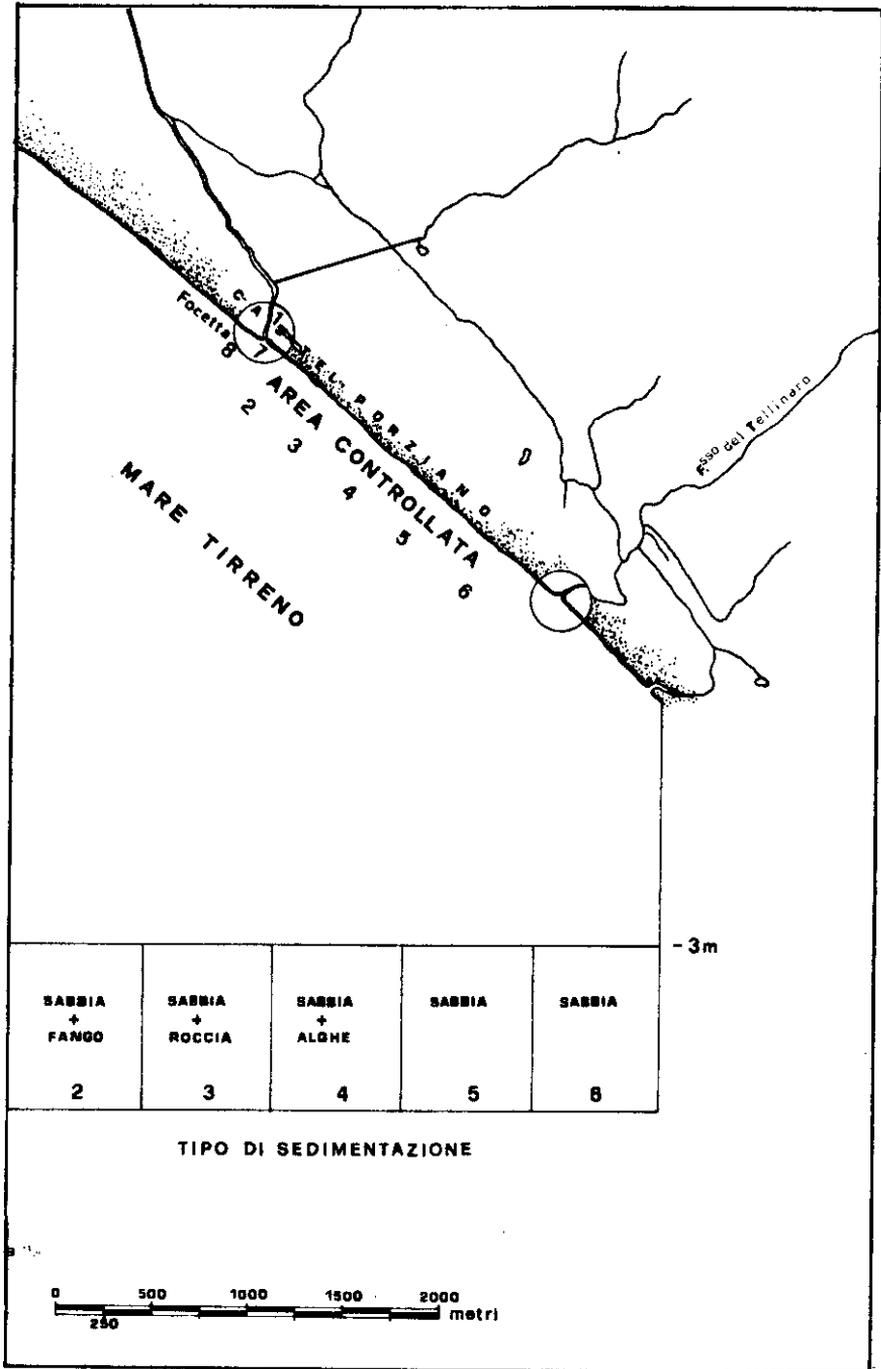


Fig. 1. — Mappa della zona esaminata.

del tratto che attraversa la spiaggia è approssimativamente di 4 m, mentre la profondità delle sue acque è assai esigua (intorno a mezzo metro). La portata è molto variabile. La temperatura delle sue acque, misurata nel punto di prelievo a circa 30 m dal mare, è quasi sempre diversa da quella marina della vicina area balneare, superiore nei mesi di giugno e settembre e inferiore nel resto del periodo di studio. Il tratto che attraversa la spiaggia è soggetto a mescolamento con acqua marina proveniente da onde, in special modo quando il mare è mosso. Tuttavia, anche in condizioni di mare calmo, le acque marine si mescolano nella foce del canale come appare dai parametri chimico-fisici e chimici rilevati con i seguenti valori:

conducibilità specifica (a 5 °C): 2110 $\mu\text{S cm}^{-1}$;

cloruri (metodo argentometrico): 816,00 mg/l.

Spesso il deflusso in mare delle acque del canale diminuisce e talora s'interrompe essendo ostacolato dai fenomeni della dinamica marina (moto ondoso, maree, correnti). Si formano allora facilmente nel tratto che attraversa la spiaggia, o in prossimità di essa, delle zone di ristagno; a ciò concorre anche la conformazione del letto del canale in questo tratto, che si fa meno profondo avvicinandosi al mare.

Il canale che delimita il tratto di spiaggia a Sud, « Fosso del Tellinaro », non sfocia al mare se non raramente, durante e dopo mareggiate, ma termina a qualche decina di metri dalla battigia, sulla spiaggia. Per questo motivo non è stato preso in considerazione in questo studio.

La temperatura superficiale dell'acqua marina nella zona di campionamento rilevata nell'anno 1978 ha l'andamento mostrato nella Fig. 2. Nella Fig. 3 sono invece riportati i valori dell'irraggiamento solare sempre per il tratto di costa considerato. Il fondo marino è sabbioso con piccole rocce e rare scogliere spesso artificiali di vecchia costruzione (Fig. 1).

L'andamento delle correnti è prevalentemente quasi parallelo o incidente alla costa. La foce del Tevere, a Nord del punto di campionamento, non influenza la zona stessa, come è chiaramente visibile osservando l'andamento correntometrico evidenziato dalla Fig. 4, in cui si vede che il largo filone di corrente, uscendo dal porto canale di Fiumicino, piega con ampia curva, visibilmente e quasi invariabilmente, a NNW, secondo una direzione parallela alla linea di costa, trascinato dalla corrente costiera. Tale corrente costiera, debole nei tempi normali, è accentuata dai venti dominanti della zona [3].

METODI

I prelievi sono stati eseguiti nel periodo tra febbraio 1978 e la fine di settembre dello stesso anno. Il fitoplancton è stato esaminato durante l'intero periodo. Nel periodo giugno-settembre è stata esaminata anche la clorofilla

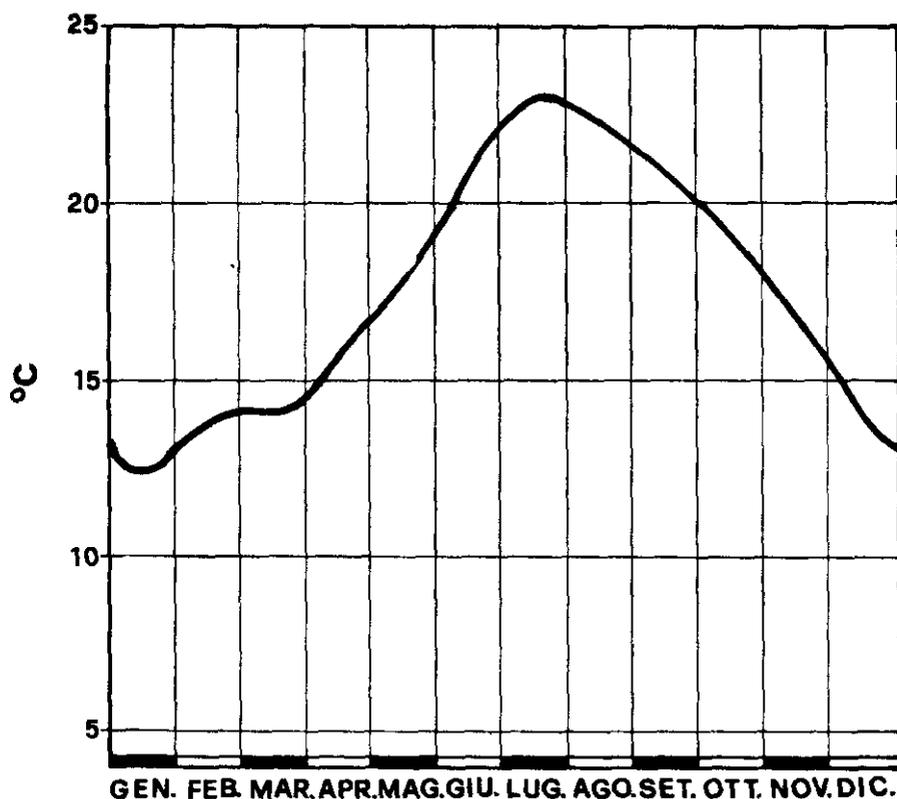


Fig. 2. — Valori della temperatura dell'acqua marina nella zona di campionamento.

« a ». I punti di prelievo per l'acqua marina, numerati da 2 a 6, procedendo verso Sud, sono quasi ugualmente intervallati tra di loro e sono situati a circa 10 metri dalla battigia (distanza fissata da WHO/UNEP per tutti i parametri del progetto pilota MED VII). Sul canale a Nord « Fosso Focetta », è stato fissato un punto di prelievo, n. 1, a circa 30 m prima dello sbocco in mare. Dal mese di luglio in poi sono stati aggiunti altri due punti di prelievo: n. 7, al punto d'impatto delle acque del canale con quelle marine, e n. 8 a circa 30 m dalla battigia e sulla prosecuzione ideale in mare della linea del canale.

I campioni di acqua marina e di acqua del canale sono stati prelevati alla superficie (circa 5-10 cm sotto l'interfacies acqua-aria), tra le ore 10 e le 12, in quantitativi di 1, 2, 5 litri. Rinchiusi in bottiglie di vetro collocate entro cassette a temperatura prossima a quella marina, venivano subito trasportati in laboratorio. Qui se ne prelevavano generalmente 300 ml, a cui si aggiungeva soluzione di Lugol (10 g di iodio, 20 g di ioduro di potas-

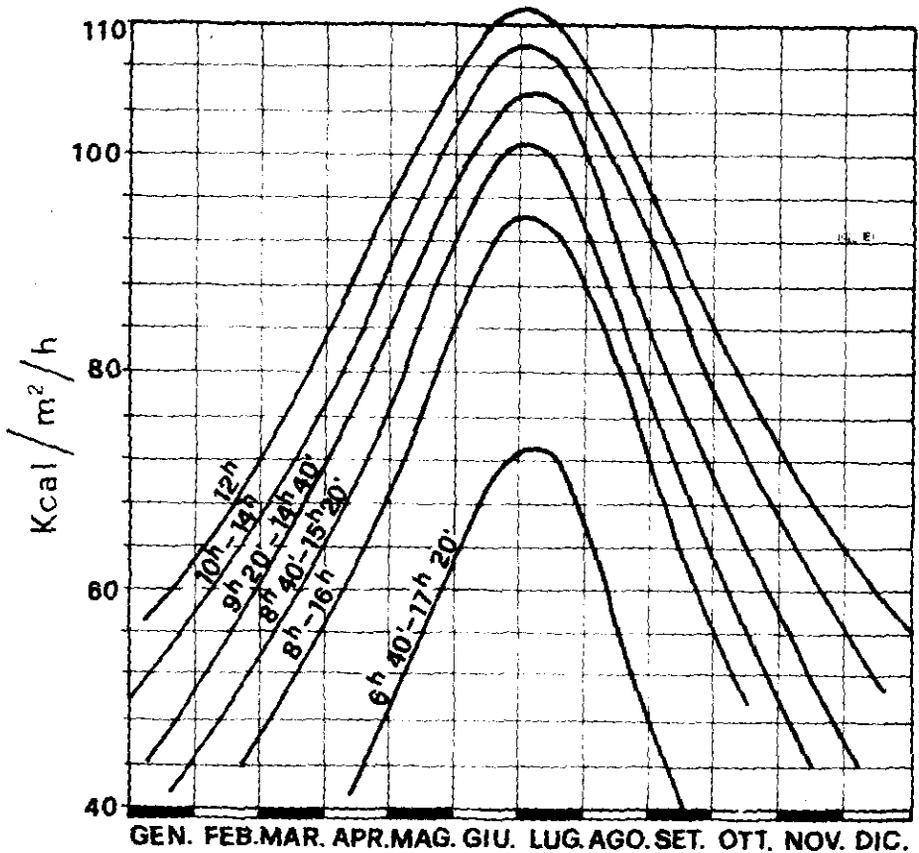


Fig. 3. — Valori dell'irradiazione solare nella zona di campionamento.

sio in 200 ml di acqua distillata e aggiunta di 20 ml di acido acetico). Il resto dell'acqua dei campioni era utilizzato per le determinazioni della clorofilla. L'acqua dei campioni, trattata con la soluzione di Lugol era destinata all'allestimento di preparati di fitoplancton per il conteggio delle cellule. A questo scopo da 50 a 300 ml di acqua, secondo la grandezza della membrana filtrante e l'abbondanza di fitoplancton, venivano filtrati sotto vuoto su membrane filtranti con pori di $0,45 \mu$ e di diametro di 47 o 25 mm, costituite da esteri di cellulosa (Millipore) montate su supporti con imbuto. Per la concentrazione di fitoplancton mediante filtrazione sono consigliate da Fournier [4] membrane di acetato di cellulosa, perché trattengono meglio le cellule, e con pori di diametro da $0,45 \mu$ fino a $0,8 \mu$, essendo questa la misura del più piccolo organismo fitoplanctonico conosciuto. È stata impiegata una pompa capace di fornire un vuoto di -10 cm di mercurio, al fine di rendere quanto minore possibile l'alterazione degli organismi più delicati

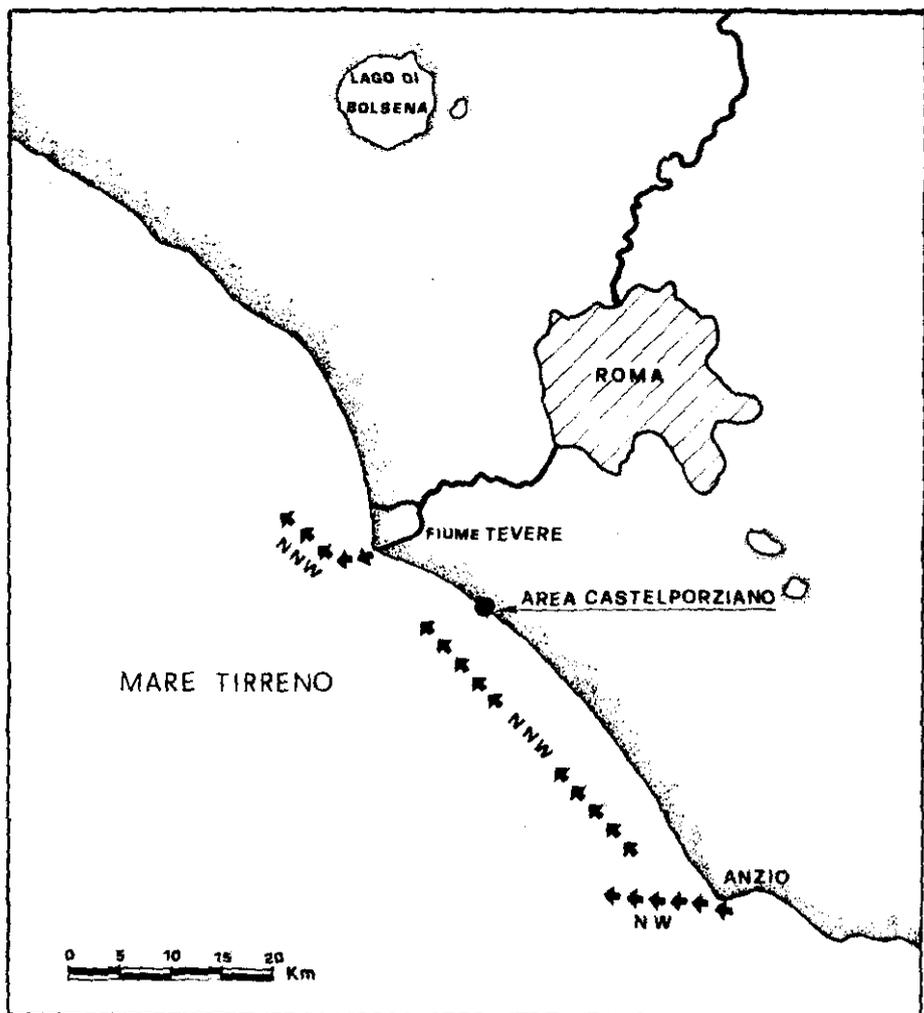


Fig. 4. — Andamento correntometrico della fascia compresa fra Anzio e la foce del Tevere.

sotto le sollecitazioni meccaniche. Si è infatti constatato che con questo valore, il tempo occorrente per filtrare i campioni era generalmente di alcuni minuti. Dopo filtrazione le membrane filtranti venivano lavate. Poiché l'aggiunta di acqua sulla membrana filtrante può disturbare l'omogeneità di distribuzione degli elementi di fitoplancton, l'acqua di lavaggio è stata versata lentamente facendola scorrere sulla parete dell'imbuto, al di sopra della superficie del liquido del campione, prima ancora che questo fosse del tutto filtrato. Si evitava in questo modo un versamento diretto sulla superficie della membrana. Per i lavaggi venivano impiegati in successione eguali

volumi di acqua marina diluita al 50 %, al 33 % e di acqua distillata. In genere il liquido aggiunto complessivamente era di 35 ml, se i campioni da filtrare erano, come nella maggior parte dei casi, di 200-300 ml. Si riduceva o si aumentava proporzionalmente, se il volume del campione variava al di là di questi limiti. Per l'acqua del canale, non salata come quella di mare, si aggiungeva per il lavaggio solo acqua distillata. Le membrane filtranti, liberate dai loro supporti, erano asciugate con ventilazione a circa 30-35 °C. Tale operazione richiedeva meno di 10 min. Sono state eseguite delle prove per accertare se la ventilazione non asportasse parte del fitoplancton aderente alla superficie della membrana. I risultati di tre prove effettuate, basate su un confronto con uguali membrane asciugate senza ventilazione, hanno dimostrato che, se la ventilazione era contenuta entro i limiti generalmente considerati dal metodo usato (ventilatore schermato in cella di termostato), non si aveva alcuna perdita di fitoplancton. Si riscontravano perdite se la ventilazione era di intensità notevolmente superiore (velocità di flusso d'aria di 5-7 m/sec).

Se la membrana è bene essiccata, bastano poche gocce di olio per obiettivi ad immersione per essere immediatamente diafanizzata e pronta per l'osservazione e il conteggio al microscopio, dopo averla collocata su vetrino portaoggetti e coperta semplicemente con vetrino coprioggetti. Non occorre quindi lasciare la membrana filtrante, come suggerisce Moore [5], a 40 °C per 24 ore, dopo l'aggiunta dell'olio per obiettivi ad immersione, né lasciarla con l'olio a temperatura ambiente per un certo tempo (24 ore), come sostiene McNabb [6].

È stata provata come liquido diafanizzante anche la glicerina: non occorre in questo caso nemmeno essiccare la membrana filtrante, ma è sufficiente versare qualche goccia sulla membrana ancora bagnata, o umida e già collocata su vetrino portaoggetti. La diafanizzazione è quasi immediata, non è però perfetta come con l'olio per obiettivi ad immersione, non essendo adeguato l'indice di rifrazione della glicerina e può essere sufficiente solo per l'osservazione degli organismi più grandi o con contorni più netti (ad esempio diatomee).

Il conteggio, al fine di evitare al massimo dispendio di tempo, e data la sufficiente concentrazione di fitoplancton sulla membrana che appositamente si cercava di raggiungere, è stato eseguito su cinque campi microscopici fissati e scelti mediante numeri randomizzati, generalmente a ingrandimento di 200 volte (obiettivi 20 X), ricorrendo di tanto in tanto durante l'osservazione a maggiori ingrandimenti per osservare meglio o con maggiore sicurezza qualche singola forma. Filtrando adeguati volumi di acqua marina o del canale (da 50 a 300 ml), la concentrazione di fitoplancton sulla membrana veniva ad essere tale da ottenere opportuni valori nei conteggi in 5 campi microscopici. Questi valori devono essere abbastanza ampi da per-

mettere un'accuratezza proporzionata allo scopo dello studio e la possibilità di comparazione mediante calcolo dei limiti di confidenza. Essi in buona parte erano superiori a 100 cellule, o compresi tra 50 e 100. Restringere i conteggi per motivi di rapidità a 5 campi microscopici, ai quali corrisponde una frazione dell'intera area della membrana (sottocampionamento), dovrebbe presupporre per il fitoplancton portato dalla membrana una omogeneità di distribuzione. Se la distribuzione è casuale, essa viene ad essere conforme a quella di Poisson. E poiché riguardo alla casualità di distribuzione ottenibile sulle membrane filtranti, McNabb [6] e Holmes [7] portano risultati diversi, abbiamo voluto applicare il test del χ^2 per una prima verifica della distribuzione casuale degli elementi di fitoplancton marino a conteggi eseguiti su 14 membrane filtranti di 47 mm di diametro in 5 campi microscopici randomizzati, usando ingrandimento di 200 volte. Eccettuato un caso, i valori si mantengono, al limite di $P = 0,05$, al di sotto della significatività; abbiamo utilizzato per questo la seguente formula [8]:

$$\chi^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{\bar{x}}$$

Nel nostro caso si introducevano nel calcolo i valori (x) dei conteggi ottenuti nei singoli campi e la media (\bar{x}) riferita ai 5 campi. Poiché sulle membrane filtranti il fitoplancton è stato filtrato con la medesima tecnica, i 14 valori del χ^2 , sempre seguendo Fisher [8], si possono addizionare, considerando 56 (14×4) gradi di libertà. La formula impiegata in particolare, poiché i gradi di libertà sono al di sopra di 30, è la seguente:

$$z = \sqrt{2 \chi^2} - \sqrt{2n - 1},$$

espressione normalmente distribuita intorno allo zero. Nel nostro caso la somma dei χ^2 ha dato 44,95; questo valore introdotto nel calcolo ha dato: $z = -1,06$, non significativo per il limite del 5%. Il test dunque depone per l'omogeneità di distribuzione degli elementi del fitoplancton sulle membrane filtranti. Le nostre condizioni sperimentali e le particolarità del metodo usato sono diverse da quelle riferite da Holmes, il quale giunge a risultati che contraddicono alla distribuzione casuale e alla conformità alla distribuzione di Poisson per il fitoplancton sulle membrane [7]. Lo studio della distribuzione sulle membrane filtranti in riferimento alla tecnica di concentrazione e di conteggio di fitoplancton sopradescritta è comunque tuttora in corso (e in particolare sono in studio le membrane di 25 mm di diametro).

Il numero di cellule di fitoplancton per unità di volume (ml) è stato calcolato usando la seguente formula:

$$N = \frac{C \cdot \text{area filtrante}}{V \cdot \text{N}^\circ \text{ di campi microscopici} \cdot \text{area del campo microscopico}}$$

dove: N = numero di elementi (cellule) per unità di volume;

C = conteggio eseguito nei campi microscopici considerati; μ^2

V = volume di campione filtrato.

Infine, per verificare se durante la filtrazione, fase particolarmente delicata, si avessero perdite di parte del fitoplancton per rottura o danneggiamento delle cellule, tali da renderle invisibili o iriconoscibili, sono state compiute, e sono tuttora in corso, prove dirette a confrontare il metodo di concentrazione del fitoplancton con filtrazione su membrana con il metodo di concentrazione per decantazione in apposite camere mediante tubi, per l'osservazione con il microscopio invertito (metodo di Utermöhl). La validità sotto questo aspetto del metodo di filtrazione su membrana è stata confermata da Holmes [7] mediante confronti con il metodo di Utermöhl. Le nostre prove hanno compreso conteggi eseguiti con i due metodi sullo stesso campione. I conteggi su membrana non sono stati ristretti a pochi campi microscopici, ma estesi all'intera membrana. Le prime prove già compiute indicherebbero delle differenze significative nei conteggi fatti con i due metodi, denunciando perdite di materiale fitoplanctonico durante la filtrazione. Sono state compiute anche prove di altro tipo: è stato filtrato un campione non trattato con fissativo, cioè recante fitoplancton vivo. Al termine della filtrazione è stata lavata la membrana con pochi ml di acqua per asportare e trasferire gli organismi su un vetrino per osservarne l'integrità al microscopio. Essi apparivano vivi (flagellati in movimento).

Per la determinazione della clorofilla è stato usato un metodo standard consigliato per campioni di acqua marina in una monografia dell'UNESCO [9].

Si deve notare a questo punto che la natura molto particolare della zona in esame rende possibile che nella determinazione della clorofilla sia compreso pure l'apporto di clorofilla proveniente da fitoplancton, che, affluendo dal canale e incontrando nel suo impatto con il mare condizioni ambientali assai diverse, non conserva uno stato fisiologico ottimale o normale e si avvia alla morte e alla disgregazione cellulare: sono inoltre presumibilmente presenti in mare detriti vegetali estranei al fitoplancton, convogliati dal canale e sono spesso presenti anche alghe pluricellulari. Ricercatori, che hanno fatto comparizioni tra contenuto di clorofilla e conteggi di fitoplancton, hanno messo in luce considerevoli discrepanze tra determinazioni di clorofilla, quale stima della biomassa, e misure di densità di fitoplancton (conteggi di

cellule); questo è da mettere in relazione con le notevoli differenze di contenuto di clorofilla nelle diverse specie, e anche con lo stato fisiologico delle cellule, che può essere influenzato da fattori come luce e sostanze nutrienti, potendosi alterare il contenuto cellulare di clorofilla [11].

Nella zona esaminata, oltre all'alternarsi nello spazio e nel tempo di diverse specie di fitoplancton, si deve pure tenere in considerazione l'influenza indotta dai bruschi cambiamenti dall'ambiente d'acqua dolce a quello salmastro e viceversa, e da quello d'acqua dolce o salmastro a quello marino; si può fare l'ipotesi che tali influenze si riflettano sul contenuto cellulare di clorofilla. Gli organismi fitoplanctonici che muoiono, inoltre, introducono ulteriori problemi di interpretazione sui rapporti tra clorofilla « a » e numero di cellule di fitoplancton.

Spesso nei preparati allestiti per il conteggio del fitoplancton abbiamo riscontrato la presenza di abbondante quantità di particelle di colore verdastro e dell'ordine di grandezza pressappoco uguale o spesso inferiore a quello degli organismi di fitoplancton. L'interpretazione di questo fatto è tuttora in studio. Si può pensare che queste particelle derivino da fitoplancton morto e disgregato, e non si può escludere l'ipotesi che cellule fitoplanctoniche prossime alla morte siano più vulnerabili e più suscettibili alle sollecitazioni meccaniche prodotte dalla filtrazione a vuoto su membrana. Sia l'una che l'altra ipotesi, comunque, conducono, sia pure con vie diverse, a problemi di interpretazione nelle comparazioni tra clorofilla « a » e numero di cellule di fitoplancton.

Con la morte degli organismi di fitoplancton inizia la degradazione della clorofilla. I prodotti di degradazione della clorofilla « a » presenti in campioni marini possono condurre, quando siano apprezzabili, ad erronee sovrastime di clorofilla « a » e manca un conveniente metodo di stima di questi prodotti, tale da poter essere inserito in un procedimento standard di analisi della clorofilla [11]. Marker e Gunn [12], che hanno sottoposto a studio corsi d'acqua inglesi interessati da eutrofizzazione, mettono in rilievo analoghi problemi di interpretazione. Essi sostengono che le stime della clorofilla « a », anche quando siano corrette per i prodotti di degradazione, non necessariamente presentano corrispondenza con i conteggi delle cellule vive (diatomee di origine bentonica) e che occorre considerare anche la presenza di prodotti intermedi di degradazione, non facilmente rivelabili. Tali problemi sorgono qualora la clorofilla « a » non subisca una rapida degradazione nelle cellule morte.

È attualmente in studio la scelta di accorgimenti o metodi che svelino con sicurezza l'origine fitoplanctonica di frammenti o fini particolati: ciò potrebbe inoltre agevolare lo studio e la valutazione dello stress esercitato in particolari casi dalle condizioni ambientali sulle popolazioni fitoplanctoniche. Uno di questi metodi può essere riconosciuto nella microscopia a fluore-

scenza [13]. Yentsch [14] osserva che particelle la cui origine è riconducibile a fitoplancton morto e disgregato emettono una fluorescenza di colore rosso-arancio, mentre una fluorescenza di colore rosso brillante è propria dei cloroplasti delle cellule del fitoplancton e conclude asserendo che la fluorescenza propria della clorofilla è normalmente associata alla cellula intatta.

Il metodo standard proposto dall'UNESCO per la determinazione della clorofilla comprende concentrazione dei campioni mediante filtrazione a vuoto su membrana ed estrazione con acetone al 90 % della clorofilla mediante macinazione e omogeneizzazione della membrana contenente il fitoplancton, seguita da centrifugazione. La clorofilla in acetone viene determinata spettrofotometricamente, leggendo le densità ottiche alle lunghezze d'onda di 750, 663, 645 e 630 nm e mediante calcolo che utilizza delle equazioni « tricromatiche » e correzione per la torbidità dell'estratto a mezzo della lettura a 750 nm. Il « bianco » consigliato è acetone al 90 %, il cammino ottico della cella spettrofotometrica deve essere scelto tra i valori di 40 mm e 100 mm, lo spettrofotometro deve presentare ampiezza di banda di 3 m μ al massimo.

Nell'ambito del metodo standard suddetto sono state usate membrane filtranti Millipore HA, di diametro di 47 mm e con pori di 45 μ , alle quali immediatamente prima di versare l'acqua del campione per la filtrazione si aggiungeva del carbonato di magnesio (10 mg per cm² di superficie filtrante): ciò serviva per favorire la filtrazione, facilitare la centrifugazione per l'estrazione, prevenire l'alterazione della clorofilla. Le membrane Millipore HA sono state scelte tra quelle proposte dal metodo dell'UNESCO, perché, come sostengono Humprey e Wootton [15] nella stessa monografia dell'UNESCO, forniscono i migliori risultati nel processo di filtrazione, sia come efficienza che come velocità.

I campioni provenienti dal canale, le cui acque nel punto di prelievo considerato sono facilmente mescolabili con la vicina acqua di mare, sono stati sottoposti allo stesso metodo, consigliato per l'acqua marina. Il volume d'acqua filtrato variava da 300 a 600 ml per l'acqua del canale e da 900 a 1500 ml per l'acqua marina. Il metodo standard seguito prescrive a tale proposito quantitativi tali da contenere circa 1 μ g di clorofilla « a ». Data la notevole variabilità di concentrazione di clorofilla in una zona assai particolare come quella in esame, era talvolta difficile prevedere, all'atto di decidere il volume da filtrare, i contenuti di clorofilla, per cui si superavano talora i valori consigliati, attestandosi comunque sempre molto al di sotto di 10 μ g, valore che nello stesso metodo standard si raccomanda di non superare.

Al metodo standard proposto dall'UNESCO sono state apportate alcune non rilevanti modifiche, talora per esigenze di organizzazione di lavoro (conservazione a freddo delle membrane con il materiale concentrato oltre il

limite proposto), ma in genere soprattutto per adattarlo alle caratteristiche delle popolazioni fitoplanctoniche in esame. Così, osservando il materiale al microscopio durante le operazioni prescritte per l'estrazione della clorofilla, ossia dopo l'omogeneizzazione per un minuto a 500 rpm con l'aggiunta di acetone al 90 % fino al volume di 5-10 ml e dopo riposo all'oscurità per 10 min, si notavano ancora grumi verdi, cellule o frammenti di cellule. Si è cercato perciò di rendere più completa ed efficiente questa fase del metodo: si macinava da 100 a 300 rpm per un minuto con omogeneizzatore dotato di sferetta di acciaio rotante il materiale con l'aggiunta di 0,5 ml di acetone; poi, versando goccia a goccia altri 3 ml di acetone, si macinava e si omogeneizzava per altri 6 minuti a circa 500 rpm.

La centrifugazione è stata spinta molto al di sopra di 4.000 - 5.000 g, come viene indicato nel metodo standard, per rendere il sedimento così compatto da non incontrare inconvenienti all'atto del trasferimento dell'estratto nella cella spettrofotometrica. Il volume totale di solvente (acetone al 90 %) era in genere di 10 ml ed era raggiunto aggiungendo acetone direttamente nella cella: questa operazione, ritenuta necessaria per evitare possibilità di intorbidamento dell'estratto, veniva compiuta con cautela con pipetta graduata e mescolando il liquido nell'interno della cella con bacchettina di vetro molto sottile. È stata usata una cella con cammino ottico di 40 mm: è questa la cella più grande, che, compatibilmente con il volume di solvente usato, si adatta al tipo di spettrofotometro impiegato (Perkin Elmer mod. 550).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Il metodo di filtrazione a vuoto dei campioni con allestimento di preparati composti di membrane filtranti con fitoplancton da noi descritto presenta alcuni vantaggi: esso è rapido, essendo il tempo ridotto soprattutto dall'essiccazione con ventilazione a 35 °C, che fa seguito alla altrettanto rapida filtrazione. L'attrezzatura occorrente, inoltre, assolutamente non ingombrante, può essere trasportata agevolmente sia a mano che da un automezzo, che, fungendo da laboratorio mobile, percorra le spiagge.

L'allestimento dei preparati, molto semplice, come pure il conteggio al microscopio, possono essere eseguiti nell'interno del laboratorio mobile. Le caratteristiche di celerità e di semplicità possono rivelarsi particolarmente necessarie quando le aree da sottoporre ad esame si presentino estese e quando si verificano fenomeni di eutrofizzazione intensi quanto rapidi nella loro evoluzione e possono compensare la minor precisione, dovuta a una certa perdita di fitoplancton, riscontrabile se si mette a confronto diretto questo metodo con quello che utilizza il microscopio invertito con camere di decantazione (metodo di Utermöhl).

La densità di fitoplancton presenta valori che, almeno nel tratto che interessa la balneazione, da noi considerato, non appaiono anormali, come si può vedere nella Tab. 1. Ciò vale pure per quanto riguarda i valori di clorofilla « a » esposti nella Tab. 2. Questi dati sono stati parzialmente presentati al Workshop on Monitoring of Recreational Coastal Water Quality and Shellfish Culture Areas within the Framework of WHO/UNEP Pilot Project MED VII, che ha avuto luogo a Roma dal 17 al 19 gennaio 1979.

Per quanto riguarda l'apporto del canale considerato in questo studio si nota una considerevole densità di fitoplancton, che viene trascinato dalla

TABELLA 1

Numero di cellule di fitoplancton per ml negli 8 punti di prelievo della zona balneare di Castel Porziano

DATA DI PRELIEVO	PUNTI DI PRELIEVO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
22 febbraio 1978	428	24	22	136	102	53	—	—
2 marzo 1978	588	2	—	9	103	126	—	—
17 maggio 1978	3.914	307	161	166	640	541	—	—
23 giugno 1978	2.171	121	80	—	70	76	—	—
14 luglio 1978	1.741	482	596	144	406	185	462	571
9 settembre 1978	795	95	73	73	87	52	47	68
14 settembre 1978	1.262	117	138	158	170	240	413	112

TABELLA 2

Valori della clorofilla « a » espressi in mg/m^3 negli 8 punti di prelievo nella zona balneare di Castel Porziano. Poiché la clorofilla « a » costituisce in media l'1,5 % del peso secco di sostanza organica algale, moltiplicando per un fattore di 67 i valori esposti, si possono valutare le biomasse fitoplanctoniche

DATA DI PRELIEVO	PUNTI DI PRELIEVO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
23 giugno 1978	19,67	2,05	2,14	1,87	1,99	1,87	—	—
14 luglio 1978	11,40	2,47	—	1,51	1,90	1,97	3,15	3,64
14 settembre 1978	4,14	1,87	1,57	3,61	3,26	3,08	3,04	1,64

corrente sia in inverno che d'estate. Questo continuo e abbondante flusso in mare di fitoplancton costituisce il fatto più rilevante osservato.

Sia per le popolazioni di fitoplancton marino che per quelle del canale è stato effettuato anche uno studio a carattere qualitativo. Il fitoplancton del canale è costituito nella maggior parte dei prelievi prevalentemente da diatomee. È interessante notare, da quanto appare nella Tab. 3, la diversità di composizione delle popolazioni del punto di prelievo n. 8, distante in mare 30 m. dalla battigia, rispetto a quelle del n. 7, situato in corrispondenza dell'impatto con le acque del canale; essa ricalca la composizione del fitoplancton riscontrata negli altri punti di prelievo marini, che nelle corrispondenti date è interessata dalla presenza di dinoficcee, come appare nella Tab. 4. In questa tabella sono riassunte delle indicazioni sulla composizione del fitoplancton marino e del canale. Le dinoficcee cominciano ad apparire nel mare a maggio per permanere fino a settembre.

TABELLA 3

Alcuni taxa prevalenti trovati nei punti di prelievo 1, 7
e 8 della zona balneare di Castel Porziano

DATA DI PRELIEVO	PUNTI DI PRELIEVO		
	1	7	8
22 febbraio 1978	diatomee	—	—
2 marzo 1978	diatomee	—	—
17 maggio 1978	euglenoficcee	—	—
23 giugno 1978	diatomee	—	—
14 luglio 1978	diatomee	dinoficcee	dinoficcee e diatomee
9 settembre 1978	diatomee	diatomee	dinoficcee
14 settembre 1978	diatomee	diatomee	dinoficcee

Un fatto interessante da sottolineare e sottoporre ad ulteriore studio è dato dalla presenza di euglenoficcee nelle acque marine in concomitanza con la loro presenza nel canale. È da notare infatti che nei prelievi in data 17 maggio, in concomitanza con la notevole abbondanza di euglenoficcee nel canale, si riscontra in quasi tutti i campioni marini la presenza di queste alghe. Ciò che desta interesse è il destino del fitoplancton costantemente scaricato in mare dal canale: esso permane verosimilmente per qualche tempo nell'acqua marina e può essere trascinato anche a notevole distanza lungo la linea della costa a pochi metri dalla spiaggia prima di decomporsi. Il fito-

TABELLA 4

Presenza di Diatomee, Dinoficee, ed Euglenoficee negli 8 punti di prelievo della zona balneare di Castel Porziano

DATA DI PRELIEVO	N. Campione	Diatomee	Dinoficee	Euglenoficee
22 febbraio 1978	1	(a) +		+
	2	+		
	3	+		
	4	+		
	5	+		
	6	+		
2 marzo 1978	1	(a) +		+
	2			
	4	+		
	5	+		
	6	+		
17 maggio 1978	1	+		(a) +
	2	+		+
	3	+		+
	4		+	+
	5	+	+	+
	6		+	+
23 giugno 1978	1	(a) +		+
	2	+	+	
	3	+	+	
	5	+	+	
	6	+	+	
14 luglio 1978	1	(a) +		+
	2	+	+	+
	3		+	
	4		+	
	5		+	+
	6		+	
	7	+	+	+
	8	+	+	+
9 settembre 1978	1	(a) +		
	2	+	+	
	3	+	+	
	4	+	+	
	5	+	+	
	6	+	+	
	7	+		
	8		+	
14 settembre 1978	1	(a) +		
	2	+	+	
	3	+	+	+
	4	+	+	
	5	+	+	+
	6	+	+	
	7	+		
	8	+	+	

(a) Si presentano come le più abbondanti.

plancton che viene trasportato dalla corrente può essere di origine veramente planctonica, in certi casi in cui si origina da acque calme; oppure alcuni organismi (ad esempio diatomee) possono provenire dal letto dei corsi d'acqua, essendovi stati strappati via [16]. Scarichi di origine domestica in zone interessate da insediamenti civili facilitano grandemente con l'apporto di sali nutrienti la formazione e la moltiplicazione di tutti questi organismi. Nel caso del canale preso in esame, in particolare, si possono notare spesso delle zone di ristagno in prossimità del mare, prodotte da rallentamento del deflusso causato dall'azione del mare facilitata dal profilo del letto del canale in prossimità dello sbocco. In queste zone di ristagno, ove le acque poco profonde sono per giunta attraversate pienamente dalla luce solare, è presumibile che il fitoplancton si moltiplichi facilmente. Giunto infine al mare, il fitoplancton, decomponendosi, cede all'acqua marina il proprio materiale organico. Le dimensioni di corsi d'acqua come il canale considerato, piccole, se confrontate con quelle di un fiume, possono essere compensate, per quanto concerne il loro apporto al mare, dal loro alto numero lungo un tratto di costa, come appunto si verifica in certi tratti della costa laziale.

Nel nostro studio il retroterra che interessa il percorso del canale « Fosso Focetta » non risulta industrializzato; tuttavia l'esempio di un continuo flusso in mare di fitoplancton può fornire dei suggerimenti per i casi in cui i vari corsi d'acqua carichi di fitoplancton provengano verso un certo tratto di costa da zone densamente industrializzate. In questi casi sostanze presenti nell'acqua, di provenienza industriale, possono essere assorbite e concentrate dal fitoplancton, quindi veicolate e trasferite in mare. A proposito di assorbimento e concentrazione di sostanze tossiche da parte di fitoplancton esistono non poche indicazioni di vari autori. L'accumulazione può essere, in certe condizioni favorevoli, assai elevata: Denny e Welsh [17] segnalano per acqua dolce un caso in cui per il piombo viene raggiunto un fattore di concentrazione pari a 100.000.

Si ringrazia il Dott. Riccardo Capocaccia per la collaborazione nella parte statistica.

Si ringraziano i Sigg. Sandro Mazzola per l'assistenza tecnica ed Ermete Filippi per la collaborazione prestata nella elaborazione dei grafici e disegni inseriti nel presente lavoro.

Ricevuto il 12 febbraio 1981.

Accettato il 2 marzo 1981.

BIBLIOGRAFIA

1. SWEENEY, B. M. 1976. « Red tides ». *Natural History*, **85** (7): 78-82.
2. HASHIMOTO, R. W., KAMIYA, H., YAMAZATO, K. & NOZAWA, K. 1976. Occurrence of toxic blue-green alga inducing skin dermatitis in Okinawa. *Animal, Plant, and Microbial Toxins*. Vol. 1. Akira Ohsaka Kyoza Hayashi and Yoshio Sawai (Eds.), pp. 333-338.

3. ISTITUTO IDROGRAFICO DELLA MARINA. 1974. Portolano del Mediterraneo. Vol. 1/a.
4. FOURNIER, R. O. 1978. Membrane filtering. In: UNESCO. *Phytoplankton Manual*. A. Sourin (Ed.), pp. 108-112.
5. MOORE, J. K. 1963. Refinement of a method for filtering and preserving marine phytoplankton on a membrane filter. *Limnol. Oceanogr.* **8**: 304-305.
6. McNABB, C. D. 1963. Enumeration of freshwater phytoplankton concentrated on the membrane filter. *Limnol. Oceanogr.* **5** (1): 57-61.
7. HOLMES, R. W. 1962. *The Preparation of Marine Phytoplankton for Microscopic Examination and Enumeration*. U. S. Department of the Interior Fish and Wildlife Service.
8. FISHER, R. A. 1946. *Statistical Methods for Research Workers*. 10th ed. Edinburg.
9. UNESCO PUBLICATION CENTRE 1969. « *Monograph on Oceanographic Methodology. I. Determination of Photosynthetic Pigments in Sea Water* ». 2th ed., pp. 11-18.
10. YENTSCH, C. S. 1966. The measurement of chloroplast pigments - thirty years of progress?. In: *Chemical Environment in the Aquatic Habitat*. Proceedings of an I. B. P. Symposium. Amsterdam and Nieuwersluis, 10-16/10/1966, H. L. Golterman & R. S. Clymo (Eds), pp. 255-270.
11. PARSON, T. R. 1969. The determination of photosynthetic pigments in sea water. A survey of methods. In: UNESCO Publication Centre. « *Monograph on Oceanographic Methodology. I. Determination of Photosynthetic Pigments in Sea Water* » 2th ed., pp. 19-36.
12. MARKER, A. F. H. & GUNN, R. J. M. 1977. The benthic algae of some streams in southern England. III. Seasonal variations in chlorophyll in the seston. *J. Ecol.* **65**: 223-234.
13. WOOD, E. J. F. & OPPENHEIMER, C. H. 1962. Note on fluorescence microscopy in marine microbiology. *Zeitschrift Allg. Mikrobiol.* **2** (2): 164-165.
14. YENTSCH, C. S. 1966. The measurement of chlorophyll and phaeophytin in the open ocean. *Deep-Sea Res.* **12**: 653-666.
15. HUMPHREY, G. F. & WOOTTON, M. 1969. Comparison of the techniques used in the determination of phytoplankton pigments. In: UNESCO Publication Centre. « *Monograph on Oceanographic Methodology. I. Determination of Photosynthetic Pigments in Sea Water* », 2th ed., pp. 40-42.
16. HYNES, H. B. N. 1972. *The Ecology of Running Waters*. Liverpool University. Chapter VI.
17. DENNY, P. & WELSH, R. P. 1979. Lead accumulation in plankton blooms from Ullswater, the English lake district ». *Environ. Pollut.* **18**: 1-9.

Contributo alla conoscenza delle polveri di alcuni legni esotici

G. MARINI BETTOLO (a), A. PAOLETTI (a) e M. NICOLETTI (b)

(a) Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università Cattolica, Roma

(b) Cattedra di Chimica Generale ed Inorganica dell'Università, Roma

Riassunto. — Gli Autori propongono una metodologia chimica semplice e poco costosa per identificare i principali composti attivi presenti nelle polveri di legno. In particolare vengono riportati i risultati delle analisi da essi effettuate su alcuni legni esotici: Iroko, Mogano Merante, Mogano Sipo, Noce Mansonia, Noce Tanganica, Obeche, Palissandro d'Asia e Teck.

Summary (*Identification of components of Wooden powders*). — The Authors propose a simple chemical methodology to identify the main active components contained in wooden powders. In particular the results of the analysis of some exotic woods performed according this system are reported.

Scopo del presente lavoro è indicare una metodologia chimica atta a stabilire la presenza dei principali composti presenti nelle polveri di legno; essa consente una rapida esecuzione con apparecchiature e materiali semplici e non costosi e risulta specifica per le classi di sostanze ricercate. I saggi utilizzati non intendono identificare sostanze singole, bensì quei composti appartenenti alle classi organiche biologicamente più attive.

In particolare, poi, si espongono i risultati delle analisi effettuate su alcuni legni esotici tra i più comunemente usati dalle falegnamerie del Lazio. Vengono di seguito riportate e brevemente commentate alcune parole chiave [1-4] per una migliore comprensione del testo:

a) *legno botanico*: sistema di tessuti vegetali provvisto di una componente vascolare (linfa), una parenchimale (di riserva) ed una scheletrica (di sostegno);

b) *legno commerciale*: porzione interna di fusto e rami degli alberi utilizzati per lavori di costruzione od opere di falegnameria;

c) *legno nostrano*: indigeno, nel nostro caso di origine europea: tra i resinosi ricordiamo l'Abete, il Pino e il Larice; tra le latifoglie la Quercia, il Leccio, l'Acero, il Faggio, il Frassino, il Pioppo, il Noce, il Castagno, l'Olmo, il Ciliegio, l'Olivo, l'Ontano ecc.;

d) *legno esotico*: non indigeno, nel nostro caso importato da Africa, Americhe, Asia, ecc. Alcuni esempi: Iroko, Mogano, Mansonia, Obeche, Palissandro, Teck, Ebano, Okoumé, Sapèle, Pitch-pine, Abete Douglas, Ramino, ecc.;

e) *legno tropicale*: legno proveniente da aree tropicali o subtropicali. Gran parte dei legni esotici sono anche tropicali;

f) *legno-composizione*: per il 90-99 % è costituito da polimeri a base (cellulosa, emicellulosa e lignina), il resto comprende una varietà di sostanze tra cui i tannini, i fenoli, gli alcaloidi, i chinoni, i glucosidi e le saponine, i quali composti ne determinano i caratteri chimici peculiari e risultano caratteristici del metabolismo secondario di ciascuna specie;

g) *legno-lavorazione*: la materia prima legno, derivante dai procedimenti di forestazione e trattamento preliminare dei tronchi, viene utilizzata principalmente per la « lavorazione del legno e mobili » che comprende la produzione di semilavorati naturali ed artificiali (tavole, profili, tranciati, sfogliati, compensati, truciolati, ecc.), la produzione industriale di costruzioni navali, ferroviarie ed edili, la produzione industriale di manufatti (mobili, infissi, serramenti, ecc.), le lavorazioni artigianali ed artistiche (mobili, infissi, oggetti vari, sculture, ecc.), la produzione di scope, utensili ed altri manufatti, le lavorazioni di rifinitura e restauro; altre lavorazioni che utilizzano il legno sono la produzione della cellulosa per carta, fibre tessili artificiali ed esplosivi, la distillazione del legno e produzione del carbone vegetale, l'estrazione di resine, coloranti ed altri principi attivi; gli usi del legno come materiale combustibile sono oggi assai limitati;

h) *polvere di legno-azioni biologiche*: sono descritte in letteratura varie azioni biologiche tra cui un'azione irritante ed una allergica per cute, mucose oculari e mucose respiratorie, un'azione tossico-sistematica per il sistema nervoso, l'apparato digestivo, la muscolatura scheletrica, il tessuto miocardico ed il sangue, un'azione oncogena per le fosse nasali e, forse, anche per altre sedi.

MATERIALI E METODI

Le prove sono state effettuate su campioni di legni esotici ottenuti da un rivenditore di legname di Roma, avendo cura di sceglierli tra quelli non trattati con sostanze chimiche conservanti. La polvere di legno è stata ottenuta per rasatura a mano, evitando di utilizzare quella prodotta da macchinari, che può risultare inquinata, ad esempio da lubrificanti. Il processo di estrazione è stato eseguito su polvere fine e ben essiccata.

La ricerca dei composti chimici presenti nei legni è stata effettuata mediante un saggio in soluzione ed uno su strato sottile di gel di silice (lastre

Merck HF 254). Il primo è più adatto per ottenere informazioni semiquantitative, il secondo per indicare il numero dei composti presenti. In alcuni casi è stato possibile accoppiare i due metodi, in altri no (Tab. 1); il saggio in soluzione è a volte preferito per la maggiore praticità e facilità di esecuzione.

Un'analisi preliminare su strato sottile è stata condotta su estratti metanolico e cloroformico, utilizzando diversi eluenti e come rivelatore acido solforico 2N a 120° per 2', al fine di evidenziare anche la presenza di eventuali composti appartenenti a classi diverse da quelle in esame.

TABELLA I

Saggi utilizzati per la ricerca delle sostanze

SOSTANZE RICERCATE	Saggio in soluzione	Saggio su strato sottile
Glucosidi cardiaci	si	si
Alcaloidi	si	si
Antranoidi	si	—
Polifenoli (fenoli, chinoni, stilbeni)	si	si
Tannini e/o flavonoidi	si	—
Saponine e lignani	(a)	(a)
Steroidi e/o terpeni	(b)	(b)

(a) Non esistono saggi adeguati.

(b) In corso ulteriori studi.

Saggio per glicosidi cardiaci.

0,5 g di polvere vennero estratti con EtOH/MeOH (1 : 1 v/v; 10 ml) per 24 h a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta mediante filtrazione venne evaporata a secchezza e quindi estratta a caldo con HCl acquoso all'1 % (1 ml). La soluzione fu quindi estratta con CHCl₃:EtOH (2 ml, 1 : 1 v/v); la fase organica fu fatta separare e sottoposta al test di Kedde (sol. A: sol. etanolica di acido 3,5 dinitrobenzoico al 2 %; sol. B: sol. etanolica di KOH al 10 %). 0,5 ml della Sol. A e 0,5 ml della Sol. B vengono aggiunte successivamente; una colorazione blu-violetta dopo 3-8' è indice di saggio positivo). Una soluzione alcolica di digi-tossina allo 0,025 % venne usata come confronto della intensità dei colori ottenuti. Per l'analisi cromatografica SSSC (strato sottile di gel di silice) dell'estratto organico, furono usati benzene/acetato di etile 1 : 2 v/v come eluente e soluzione spray del reattivo di Kedde come agente rivelatore. Furono rivelate le seguenti macchie dopo 5-20': Noce mansonica: Rf 0,61 (violetta), 0,86 (azzurra); Palissandro: 0,82 (bruno-viola); Mogano sipo: 0,10 (viola). Iroko: 0,90 (rossa), 0,84 (rossa cupa), 0,51 (viola); Mogano merante: ca. 0 (azzurra); Obeche: ca. 0 (azzurra).

Saggio per alcaloidi.

1 g di polvere venne estratto con HCl acquoso all'1% (10 ml) per 24 h a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta dalla successiva filtrazione venne quindi divisa in due parti. Una venne concentrata a volume ridotto (ca. 1 ml) e venne aggiunto ad essa il reattivo di Valzer (10 g di KI in 100 ml di H₂O), quindi vennero aggiunti 11 g di HgI₂ e la soluzione filtrata dopo lunga agitazione; torbidità persistente o precipitazione sono indicative della presenza di alcaloidi. La seconda parte venne portata a pH 8 mediante aggiunta di NaHCO₃ ed estratta con CHCl₃ (1 ml). Le due fasi risultanti vennero separate, quella acquosa acidificata a pH 2 mediante aggiunta di 2N HCl e quindi venne aggiunto cautamente il reattivo di Dragendorff (sol. A: 2% nitrato basico di bismuto in una miscela con AcOH conc. (10 µl) e H₂O (40 ml); soluzione B: KI (8 g) in H₂O (10 ml); le due sol. vennero conservate in bottiglie scure e mescolate prima dell'uso e 1 ml venne diluito con AcOH conc. (2 ml) e H₂O (10 ml) fino a totale precipitazione degli alcaloidi quaternari. A conferma della positività del saggio la soluzione venne inoltre sottoposta ad analisi con solfato di cerio (sol. satura in H₂SO₄ al 65%) su piastra: solo l'estratto da legno di Teck dette reazione positiva. La soluzione organica venne estratta con 2N HCl (1 ml) e alla fase acquosa separata venne aggiunto il reattivo di Dragendorff al fine di ottenere la precipitazione degli alcaloidi terziari. La necessità di ripetere il saggio con diversi reattivi e successive estrazioni, risiede nella possibile interferenza di sostanze non alcaloidiche con il reattivo di Dragendorff, che pure rimane il più sensibile. Una soluzione acquosa allo 0,05% di solfato di stricnina venne usata come riferimento. La soluzione cloroformica del saggio degli alcaloidi terziari venne sottoposta ad esame cromatografico SSSG (benzene/acetato di etile/dietilammina 5:4:1 v/v/v come eluente e reattivo di Dragendorff spray come rivelatore); vennero rivelate le seguenti macchie: Palissandro: Rf 0,31 (++)+, 0,91 (-); Teck 0,27 (-+).

Saggio per antranoidi.

0,5 g di polvere in 0,5 N KOH (2 ml) e H₂O₂ diluita (2 ml) vennero bollite per 3-4; la mistura fu raffreddata, filtrata, acidificata con AcOH concentrato ed infine estratta con C₆H₆ (1 ml). La fase organica venne separata e ad essa aggiunto 0,5 N KOH (1 ml). Una colorazione rossa o rosa della fase acquosa è indizio di saggio positivo. Come riferimento venne presa una soluzione allo 0,02% di emodina.

Saggio per polifenoli.

0,2 g di polvere vennero estratti con EtOH/MeOH (1:1 v/v, 2 ml) per 24 h a temperatura ambiente. A 1 ml della sol. ottenuta mediante filtrazione, venne quindi aggiunta una soluzione di FeCl₃ acquoso al 2% e K₄[Fe(CN)₆] (2 o 3 gocce), ottenendo una colorazione della soluzione in caso di test positivo. La medesima soluzione venne esaminata in cromatografia SSSG (benzene/acetato di etile 2:1 v/v come eluente e FeCl₃ spray - sol. al 5% in 0,5 N HCl - come rivelatore). Vennero rivelate le seguenti macchie: Palissandro: Rf 0,71 (gialla) (+), 0,88 (azzurra) (+). Iroko: 0,44 (gialla) (+), 0,68 (viola) (+-); 0,82 (azzurra) (+); Teck: 0,53 (viola) (+), 0,60 (azzurra) (-), 0,81 (viola) (-+); Noce mansonica: 0,62 (azzurra), 0,38 (gialla).

Saggio per tannini e flavanoidi.

2 g di polvere vennero estratti per 12 h con acquoso EtOH all'80% (20 ml) a temperatura ambiente: la sol. venne filtrata, evaporata e riestratta a caldo con una sol. acquosa allo 0,9% di NaCl (1 ml). La soluzione venne raffreddata e quindi vennero aggiunti 0,5 ml di gelatina acquosa all'1%. L'ottenimento di precipitato dopo l'aggiunta di gelatina è indice della presenza di tannini e/o flavanoidi. Una soluzione allo 0,05% di acido tannico venne presa come riferimento.

RISULTATI

I risultati da noi ottenuti (Tab. 2) hanno confermato la presenza nei legni esaminati di composti già noti ed inoltre di altre sostanze appartenenti alle classi biologicamente più attive.

Iroko (Chlorophora excelsa).

Viene largamente usato in falegnameria, costruzioni navali, pavimenti ed è apprezzato per la sua resistenza; esso è largamente diffuso in Africa centro-occidentale ed è albero nazionale e sacro in Nigeria, dove la esportazione è proibita. Conosciute da tempo sono le sue proprietà irritanti e la sua resistenza agli attacchi di funghi e insetti. Due stilbeni (la cloroforina [5] e il 2,4,3',5, tetraidrossistilbene) [6] sono stati isolati dal legno di questa pianta.

Il saggio in soluzione per i composti polifenolici ha effettivamente mostrato la presenza di almeno due macchie con reazione fortemente positiva per tali composti. Sono risultati inoltre presenti, in quantità rilevante, glucosidi cardiaci e tannini. Questi ultimi due risultati sono particolarmente interessanti, anche in relazione al fatto che nessuno studio farmacologico finora ha dimostrato che i due stilbeni isolati siano i responsabili dell'attività irritante.

Mogano Merante (Shorea Assamica).

Di tale legno esistono quattro varietà distinte in base al colore: rosso chiara, rosso scura (Shorea pauciflora detto Mogano Filippino), gialla e bianca. Viene usato in falegnameria per rivestimenti, compensati, pavimenti e per la costruzione di barche. È originario della penisola della Malesia e delle Filippine. La varietà rosso scura è discretamente resistente ai funghi. La varietà gialla è moderatamente resistente ai funghi ma non alle termiti. La varietà gialla è moderatamente resistente ai funghi ma non alle termiti. La varietà bianca contiene piccoli aggregati di silice.

Abbiamo riscontrato una debole reazione al saggio per glucosidi cardiaci.

Mogano sipo (Entandrophragma utile).

Molto ricercato in falegnameria dove è usato per infissi, porte esterne, rivestimenti, mobili per negozi e uffici. Diffuso nell'Africa centrale e occidentale, è importato soprattutto dal Ghana e dalla Costa d'Avorio. È molto resistente alle termiti, scarsamente resistente ai funghi. Dal legno di questa pianta sono stati isolati alcuni steroidi comuni ad altre piante della stessa specie (entandrophragmina, fragmina, utilina metilengolensato, β sitosterolo [7]).

Abbiamo riscontrato una debole reazione al saggio dei glucosidi cardiaci e reazione positiva per i tannini.

Noce Mansonia (Mansonia altissima).

Viene usato in falegnameria per mobili. È originario dell'Africa occidentale (esportato dalla Costa d'Avorio, dal Ghana, dalla Nigeria). È usato quale ingrediente per il veleno

TABELLA 2

Sintesi dei risultati analitici sui legni esaminati

L. E. C. N. O. (Nome volgare)	Famiglia	Specie	Glicosidi Cardiaci	Alcaloidi	Antracenioidi	Poliifenoli (fenoli, chinoni, stilbeni)	Tannini e/o Flavanoidi	Composti non identificati	Altro in letteratura
Iroko	Moraceae	<i>Chlorophora Ex-celsa</i>	+++	—	—	++ [5, 6]	++	—	—
Mogano merante	Dipterocarpaceae	<i>Shorea Assamica</i>	+	—	—	—	—	—	—
Mogano sipo	Meliaceae	<i>Entandrophragma utile</i>	+	—	—	—	++	—	[7]
Noce mansonia	Sterculiaceae	<i>Mansonia altissima</i>	+++ [8]	—	+	++ [8]	+	—	—
Noce tanganica	Sapotaceae	<i>Aningeria altissima</i>	—	—	—	—	—	+	—
Obeche	Sterculiaceae	<i>Triplochiton Scleroxylon</i>	+	—	—	—	+	—	—
Palissandro d'Asia	Papilionaceae	<i>Dalbergia Lati-folia</i>	+++ [9-11]	+++	—	+	++	—	[9-11]
Tek	Verbenaceae	<i>Tectona Grandis</i>	—	++	—	+++ [12]	+++	—	[13]

delle frecce. È un legno molto durevole, resistente ai funghi e alle termiti. Da vari autori sono stati isolati ed identificati numerosi chinoni, idrochinoni, glucosidi cardiaci (Mansononi, idrichinoni, corrispondenti; mansonine, strofoteroside, strofoalloside, xilcmansocina [8].

I saggi da noi eseguiti sono in accordo con la presenza di queste sostanze.

Noce Tanganica (Aningeria altissima).

È usato prevalentemente per impiallacciature. Il suo nome è improprio non essendo un noce e non essendo importato dalla Tanzania, bensì dalla Costa d'Avorio dove è detto Aniegré. Il suo contenuto siliceo, seppure piccolo, è sufficiente per renderlo abrasivo nei confronti degli utensili da taglio usati per lavorarlo. Non abbiamo dati per quanto riguarda la resistenza ai funghi mentre si sa che è estremamente attaccato dagli insetti.

Questo legno non ha dato reazione positiva per alcuno dei saggi effettuati. Nell'estratto metanolico è però presente un composto evidenziato mediante cromatografia su strato sottile meritevole di ulteriori approfondimenti.

Obeche (Triplachiton scleroxylon).

Molto usato perché facilmente lavorabile, anche se scarsamente durevole, per infissi falegnameria, compensati, cornici. Proviene dall'Africa centro-occidentale. È facilmente attaccato dai funghi e dalle termiti. Assai scarsa la letteratura; per esperienza degli autori è un legno dotato quantomeno di azione assai irritante per cute e mucose.

Ai saggi effettuati ha dato reazione leggermente positiva per glucosidi cardiaci e tannini.

Palissandro d'Asia (Dalbergia latifolia).

Usato largamente per lavori d'ebanisteria, mobili e strumenti musicali. La varietà da noi esaminata è di origine asiatica ma la specie *Dalbergia* si trova anche in Brasile e Africa. La varietà Africana (*D. melanoxylon*) è molto resistente a funghi ed insetti. Non abbiamo in letteratura dati per le altre varietà, anche se la presenza di sostanze simili fa supporre un'analoga resistenza.

In numerose piante del genere *Dalbergia* sono state isolate 4 fenilcumarine. Queste si comportano come fenoli. Inoltre nel legno di *Dalbergia* sono presenti dei composti chinoidi, dalbergioni e derivati del fenilpropano, strutturalmente correlati con le precedenti [9-11].

Le reazioni effettuate sono risultate fortemente positive per i glucosidi cardiaci oltreché per gli alcaloidi, i fenoli e i tannini.

Teck^a (Tectona grandis).

Usato per costruzioni navali, fine falegnameria, impiallacciature, banchi da laboratorio data la sua acido-resistenza. È originario dell'Asia tropicale (Tailandia, India, Indocina, Giava). Difficile da lavorare per la natura abrasiva, contiene sostanze chinoidi (nattochinoni: lapacolo, deossilapacolo, lapachenolo; antrachinoni: tectochinone, 2-idrossi 2-metil antrachinone, 3-metossi 2-metil antrachinone, pachibasina, rubiadina, muniistina, 2 metil chinizarina) e cumarine [12]. Dalle radici sono state isolate: acido butinilico (steroidi)

e delle sapogenine [13]. Al Lapacolo e al Tactochinone viene attribuita la resistenza di tale legno contro le termiti e quindi la durezza del Teck. Tali sostanze sono invece inefficaci contro gli attacchi dei funghi. Nelle dermatiti da Teck si è visto che i tests allergometrici eseguiti erano positivi sia per il legno di Teck che per il lapacolo (che sembrerebbe esserne l'agente eziologico).

L'esame su strato sottile ha mostrato la presenza di diverse sostanze fenoliche e di un composto alcaloidico. Anche per i tannini si è avuto un saggio fortemente positivo.

COMMENTO

I risultati ottenuti consentono di:

– ricavare un metodo adatto ad ottenere in tempi brevi delle informazioni tossicologiche di massima su tipi di legno effettivamente utilizzati negli ambienti di lavoro;

– porre le basi per una correlazione tra il contenuto più o meno elevato di determinati composti chimici e la sintomatologia riscontrata nei lavoratori esposti a rischio da polvere;

– eseguire uno *screening* preliminare delle sostanze presenti nel legno che sia propedeutico alle analisi più sofisticate di isolamento ed identificazione dei principi attivi puri.

Ricevuto il 10 novembre 1980.

Accettato il 5 dicembre 1980.

BIBLIOGRAFIA

1. CANDURA, F. 1974. Elementi di Tecnologia Industriale ad uso dei cultori di Medicina de Lavoro. *Aurora Leg. Cart. Di C.* GE-Pavia.
2. BELLI, S., BRACCI, C., COMBA, P. & SETTIMI L. 1978. Nocività delle polveri di legno nell'ambiente di lavoro. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 14: 819-842.
3. BENEZRA, C., FOUSSEREAU, J. & MALEVILLE, J. 1970. L'identification chimique des allergènes végétaux et son intérêt dans la prévention de nombreux eczemas allergiques professionnels. *Arch. Mal. Prof.*, 31, n. 10-11, 539-550.
4. FORTIN, Y. & POLIQUIN, J. 1976. Natural durability and preservation of one hundred tropical African woods. IDRS (International Development Research Centre), Ottawa.
5. KING, F.E. & GRUNDON, M.F. 1949. The Constitution of Chlorophorin, a constituent of Iroko, the Timber of *Chlorophora excelsa*. Part. I. J.C.S. 3151.
6. MORGAN, J.W.W. & OSLER, R.J. 1968. The chemistry of color changes in wood. I. The significance of stilbenes. *Holzforschung*. 22: 11.

7. AKISANYA, A., BEVAN, C.W.L., HIRST, J., HARSALL, T.G. & TAYLOR, D.A.H. 1969. West African Timbers. Part. III. Petroleum extracts from the Genus *Entandrophragma*. J.C.S. 3827.
8. GALEFFI, C., CASINOVÌ, C.G., MIRANDA DELLE MONACHE, E. & MARINI BETTOLO, G.B. 1966. Chinoni sesquiterpenici della *Mansonia altissima* Chev. *Ann. Ist. Super. Sanità* 2: 327.
9. MARINI BETTOLO, G.B., CASINOVÌ, C.G., GONCALVES DE LIMA, O., DALIZ MAIA, M.H. & D'ALBUQUERQUE I.L. 1962. Sulla struttura dei Dalbergioni: due nuovi chinoni della *Dalbergia nigra*. *Ann. Chim. Rome* 52: 1190.
10. EYTON, W.B., OLLIS W.D., SUTHERLAND, I.O., JACKMAN, L.M., GOTTLIEB, O.R. & MACALHAES, M.I. 1962. Dalbergiones: a new group of natural products. *Proc. Chem. Soc.* 301.
11. AHLUWALIA, V.K., MEHTA, A.C. & SESHADRI, T.R. 1957. Constitution of Dalbergin (III), synthesis of dalbergin, isodalbergin and their ethers. J.C.S. 970.
12. THOMSON, R.H. 1971. *Naturally Occuring Quinones*. Academic Press, London e New York pp. 372-378.
13. HEGNAUER, R. 1973. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Vol. 6. Birkhauser Verlag, Basel e Stuttgart, pp. 673 e 675.