



# INTERVENTI DI RIQUALIFICAZIONE AMBIENTALE LUNGO IL BASSO CORSO DEL FIUME ZERO PER IL CONTROLLO E LA RIDUZIONE DEI NUTRIENTI SVERSATI NELLA LAGUNA DI VENEZIA

(D. D. R. D. T. A- N°33 19/08/98)

## Efficacia delle fasce tampone forestali

Monitoraggio e Sperimentazione  
presso l'Azienda Agricola Diana  
nell'ambito del progetto Ue "NICOLAS"

### Allegato 1 Materiali e metodi



---

Dr Bruna Gumiero, Via Cuccoli n°3 40127 Bologna C.F. GMRBRN60L59C991E;  
p. IVA 01882321209 Tel 348-7093570 e-mail: [peg0693@iperbole.bologna.it](mailto:peg0693@iperbole.bologna.it)

Dr Boz Bruno, Via Dante Alighieri n° 18 32032 Feltre (BL) C.F. BZO BRN 74C26 D53OR;  
p. IVA 00975600255 Tel 347/3169813 e-mail: [bruboz@libero.it](mailto:bruboz@libero.it)



## Efficacia delle fasce tampone forestali

Monitoraggio e Sperimentazione presso Az. Ag. Diana nell'ambito del progetto Ue - "NICOLAS"

### Allegato 1 - Materiali e metodi

<b>DETTAGLIO DELLE METODICHE ANALITICHE UTILIZZATE</b>	<b>3</b>
<b>Umidità</b>	<b>3</b>
<b>Granulometria</b>	<b>3</b>
<b>Potenziale di mineralizzazione dell'azoto</b>	<b>3</b>
<b>Estrazione delle forme inorganiche (ammoniacale-nitrati-nitriti) dell'azoto</b>	<b>4</b>
<b>Azoto nitroso</b>	<b>4</b>
<b>Azoto nitrico</b>	<b>4</b>
<b>Azoto ammoniacale</b>	<b>5</b>
<b>Azoto organico disciolto (ossidazione con persolfato di potassio)</b>	<b>5</b>
<b>Immobilizzazione microbica dell'azoto</b>	<b>5</b>
<b>Mineralizzazione netta dell'azoto</b>	<b>6</b>
<b>Azoto Kjeldahl esclusi nitrati</b>	<b>6</b>
<b>Carbonio organico/sostanza organica</b>	<b>6</b>
<b>pH in acqua</b>	<b>7</b>
<b>Fosforo assimilabile</b>	<b>7</b>
<b>Denitrificazione in situ</b>	<b>7</b>
<b>Emissioni naturali di N<sub>2</sub>O</b>	<b>8</b>
<b>Attività enzimatica della denitrificazione</b>	<b>8</b>
<b>Bibliografia essenziale</b>	<b>9</b>



## **DETTAGLIO DELLE METODICHE ANALITICHE UTILIZZATE**

### **Umidità**

#### **(G.U. n°181 del 21.10.1999 Metodo II.2)**

Determinazione gravimetrica calcolata come differenza tra la massa umida del campione (25 - 30 g) e la massa dello stesso dopo essiccazione in stufa ventilata a 105°C per 24 ore.

### **Granulometria**

#### **(G.U. n°181 del 21.10.1999)**

La procedura determina le frazioni granulometriche della terra fine aventi un diametro compreso tra 2 e 2000 micron per via ponderale applicando il metodo alla pipetta.

Il campione di terreno (10 g) precedentemente essiccato all'aria e macinato a 2 mm viene trattato con acqua ossigenata al 30% (con 5 - 6 aliquote da 5 ml) in piastra riscaldante per distruggere le sostanze organiche presenti. Terminata questa fase viene disperso utilizzando una soluzione di Sodio esametafosfato al 5% (20 ml) in agitatore orizzontale per 2 ore. La fase terminale della procedura di analisi prevede l'applicazione del metodo alla pipetta automatizzato utilizzando un granulometro che effettua i prelievi del campione disperso a tempi e profondità diverse. I tre prelievi del campione vengono depositati dal granulometro in capsule precedentemente tarate. Queste ultime vengono essiccate a 105°C e pesate nuovamente. Dalle differenze tra peso netto e lordo delle capsule si risale al contenuto percentuale di argilla, limo totale e limo fine. Il contenuto in sabbia (%) si ottiene invece dalla differenza a 100 dei valori di argilla (%) e limo totale (%).

### **Potenziale di mineralizzazione dell'azoto**

La procedura si effettua su campione fresco mediante una incubazione in condizioni di anaerobiosi. Il terreno fresco (15 g) viene posto in una bottiglia Pyrex, si aggiunge acqua deionizzata (50 ml). Si tappa perfettamente e si pone per 7 giorni in un incubatore alla temperatura di 40°C.

L'ossigeno libero preesistente viene consumato rapidamente e l'incubazione prosegue in condizioni anaerobiche. L'azoto organico mineralizzato si accumula sotto forma di ammoniaca. La concentrazione dell'ammoniaca viene misurata seguendo la procedura per la determinazione dell'azoto ammoniacale come descritto in seguito. La differenza tra la concentrazione dell'ammoniaca



contenuta nel terreno fresco e quella riscontrata dopo l'incubazione anaerobica indica la quantità di azoto organico mineralizzato.

### **Estrazione delle forme inorganiche (ammoniaca-nitrati-nitriti ) dell'azoto**

Un campione di suolo fresco (10g) si estrae con 50 ml di  $K_2SO_4$  0,5M (35 g/l) in modo da rispettare il rapporto terreno/estraente di 1:5.

L'estratto ottenuto viene conservato in frigorifero; se invece le analisi non vengono effettuate entro qualche giorno viene congelato alla temperatura di  $-20^{\circ}C$ .

### **Azoto nitroso**

#### **(Methods of Soil Analysis Part 2 – Page, Miller, Keeney 1982)**

Dosaggio su 2 ml di campione estratto mediante sviluppo colorimetrico diretto utilizzando le soluzioni di Griess 1 (acido solfanilico) e di Griess 2 (8 ammino naftalen acido solfonico ) che formano in ambiente acido un composto azoico di color rosso fragola. Lettura per via spettrofotometrica dopo 25 minuti su cuvette da 1 cm di cammino ottico alla lunghezza d'onda di 540 nm. (Limite di rilevabilità = 0,05 mg/Kg  $NO_3-N$ ).

### **Azoto nitrico**

#### **(Methods of Soil Analysis Part 2 – Page, Miller, Keeney 1982)**

Effettuare la preparazione della colonna con le due fasi di seguito riportate:

- A) Rameizzazione del cadmio. Il cadmio granulare (50g) si tratta con 250 ml di HCl 6N per un minuto. Si decanta l'acido cloridrico e si lava il cadmio metallico con acqua demineralizzata.

Quest'ultimo si tratta per 2 volte con 250ml di  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (2%) effettuando nuovamente dei risciacqui con acqua demineralizzata fino ad eliminazione del bleu/grigio dell'acqua di lavaggio.

- B) Riempimento della colonna. Si riempie con la soluzione di  $NH_4Cl$  (0.5%) e si deposita il cadmio rameizzato fino a raggiungere una altezza di 20 cm assicurandosi un buon impaccamento del materiale senza formazione di bolle d'aria.

Si lava accuratamente sempre con la soluzione di  $NH_4Cl$  (0,5%).

Eliminare l'eccesso della soluzione di  $NH_4Cl$  (0.5%), pipettare 1 ml di soluzione di  $NH_4Cl$  concentrata (20%) ed aggiungere un volume (che può variare da 2 a 5 ml) di campione estratto. Si eluisce nella colonna dove avviene la riduzione da nitrato a nitrito, aggiungendo 75-80 ml di  $NH_4Cl$  (0.5%) e raccogliendo in un



matraccio da 100 ml. Si aggiunge 2 ml di diazotante (0,5 g di sulfanilammide in 100 ml di HCl 2.4M ) e 2 ml di reagente accoppiante (0,3 g N-1 Naptylethylendiammina cloridrata in 100 ml di HCl 0.12M). Si porta a volume il matraccio da 100 ml.

Lettura per via spettrofotometrica in cuvette da 1cm di cammino ottico alla lunghezza di 540 nm.

### **Azoto ammoniacale**

#### **(Methods of Soil Analysis Part 2 – Page, Miller, Keeney 1982)**

Dosaggio su 3 ml di campione estratto. Si aggiunge 1 ml di EDTA (6 g disale bisodico dell'acido etilendiammino tetra acetico in 100 ml di acqua con aggiustamento del pH a 7) per evitare che cationi bivalenti di calcio e magnesio possano interferire. Si aggiungono 2 ml di fenolo nitroprussiato (7g di fenolo e 0,034 g di sodio nitroprussiato in 100 ml di acqua demineralizzata ) e 4 ml del tampone di ipoclorito (1,48 g di NaOH con 4,98 g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 20 ml di NaOCl circa al 5% con controllo del pH della soluzione compreso tra 11.4 e 12.2). Lo sviluppo del colore del complesso bleu-indofenolo (in presenza del catalizzatore che accelera la reazione aumentandone la sensibilità può avvenire a bagnomaria a 40°C per 30 minuti) oppure a temperatura ambiente (24°C per 1 ora). Lettura per via spettrofotometrica del complesso formatosi su cuvette da 1 cm di cammino ottico alla lunghezza d'onda di 636 nm.

### **Azoto organico disciolto (ossidazione con persolfato di potassio)**

Dosaggio su 5 ml di campione estratto come descritto precedentemente effettuando una ossidazione con 5 ml di persolfato di potassio (25 g di  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 15 g di  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e 7,5 g di NaOH in 500 ml di acqua deionizzata) in autoclave a 120°C per 30 minuti. Questo processo trasforma sia l'azoto inorganico che quello organico disciolto in nitrati che vengono quindi misurati con il metodo descritto sopra.

### **Immobilizzazione microbica dell'azoto**

#### **(Jenkinson e Poulson (1976) metodica semplificata)**

Un campione di suolo fresco (20 g) viene fumigato con una procedura semplificata di Jenkinson e Poulson (1976) in un essiccatore sottovuoto per 24 ore a temperatura ambiente utilizzando del cloroformio (50 ml). Il suolo fumigato viene estratto con 100 ml di  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5M (35 g/l) rispettando sempre il rapporto terreno/estraente di 1:5. Successivamente si misurano i nitrati con la procedura sopra descritta.



## **Mineralizzazione netta dell'azoto**

Viene misurato mediante la differenza nel contenuto di N inorganico in un campione di suolo lasciato in situ per un mese all'interno di un sacchetto di polietilene con quello raccolto al momento del campionamento. La nitrificazione netta viene misurata mediante la differenza dei soli nitrati all'inizio e alla fine del mese di incubazione.

## **Azoto Kjeldahl esclusi nitrati**

### **(G.U. n°181 del 21.10.1999 Metodo XIV.3)**

La procedura per l'azoto Kjeldahl impiegata generalmente per la determinazione dell'azoto totale si effettua in tre fasi:

- A) Digestione di 2-3g di campione (60 minuti) per convertire l'azoto organico ad ammoniaca utilizzando acido solforico (10 ml) e acqua ossigenata (2 - 4 porzioni da 5 ml) su piastra di mineralizzazione.
- B) Determinazione dell'ammoniaca nel campione digerito effettuando una distillazione previa basificazione dell'ambiente e raccogliendo il distillato in un volume di una soluzione di acido solforico a titolo noto (N/100).
- C) Titolazione dell'eccesso di acido solforico con una soluzione alla stessa normalità di idrato sodico a titolo noto utilizzando l'indicatore di Tashiro (preparato mescolando in parti uguali una soluzione alcolica allo 0.2% di rosso di metile e una soluzione alcolica allo 0.1% di blu di metilene) per evidenziare il viraggio della soluzione dal blu al verde.

## **Carbonio organico/sostanza organica**

### **(Manuale Unichim n°145 M.U.775)**

La determinazione si effettua su campione condizionato all'aria e precedentemente macinato ad una dimensione di 2 mm. Viene determinato il carbonio organico presente effettuando un'ossidazione utilizzando una soluzione di dicromato di potassio in presenza di acido solforico sfruttando la temperatura esotermica della reazione. Il terreno pesato (da 0.5 a 1 g) viene messo in un matraccio da 100 ml, si aggiunge bicromato di potassio 1N (10 ml) ed acido solforico concentrato (20 ml), agitando lentamente in modo che il terreno venga completamente a contatto con la soluzione. Si lascia a riposo per 30 minuti alla temperatura esotermica che la reazione assume, quindi si interrompe la reazione raffreddando il campione e portando a volume. Il cromo trivalente formatosi viene letto per via spettrofotometrica su cuvette da 1 cm di cammino ottico alla lunghezza di 600 nm. Per risalire al tenore di sostanza organica si effettua un calcolo di trasformazione moltiplicando la percentuale di carbonio organico per 1.72.



## **pH in acqua**

### **(G.U. n°181 del 21.10.1999 Metodo III.1)**

Determinazione effettuata per via potenziometrica ottenuta misurando la differenza di potenziale di un elettrodo permeabile agli ioni H<sup>+</sup> ed uno di riferimento. Al campione di terreno (20g) secco all'aria precedentemente macinato a 2 mm viene aggiunto acqua demineralizzata (50 ml) in modo da rispettare il rapporto terreno/acqua di 1:2.5. Si agita meccanicamente per 15 minuti e si lascia a riposo l'estratto per altri 30 minuti. Si travasa il liquido surnatante e si misura il valore del pH previa taratura strumentale utilizzando tamponi a pH noto prossimi al valore del campione (7 e 9).

## **Fosforo assimilabile**

### **(Metodo ISO DIN 11263-1)**

La procedura prevede l'estrazione del fosforo assimilabile con una soluzione di sodio bicarbonato 0.5M (42g di NaHCO<sub>3</sub> con aggiustamento del pH a 8,5). Al campione di terreno (2,5 g) secco all'aria e precedentemente macinato a 2 mm viene aggiunta la soluzione estraente (50 ml) in modo da rispettare il rapporto terreno/acqua di 1:20. L'estratto (2 ml) viene colorato con 8 ml di reagente cromogeno (in 720 ml di acqua si sciolgono 1 g di acido ascorbico, 0,05 g sodio tiosolfato pentaidrato, 15 ml di reagente solfomolibdico preparato pesando 49,08 g di ammonio molibdato in 278 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 36N portati a litro e 65 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N). Si lascia a riposo per 30 minuti e si colloca a bagnomaria a 99 - 100°C per 5 minuti. Raffreddare il campione per arrestare lo sviluppo colorimetrico. Lettura per via spettrofotometrica su cuvette da 1 cm di cammino ottico alla lunghezza d'onda di 825 nm.

## **Denitrificazione in situ**

La denitrificazione è stata misurata utilizzando il metodo di Yoshinari e Knowels (1976). Questa metodica utilizza l'acetilene (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) come inibitore specifico dell'attività dell'ossido nitroso-riduttasi e quindi della trasformazione dell'ossido nitroso (N<sub>2</sub>O) in azoto molecolare (N<sub>2</sub>). Nella stima del tasso di denitrificazione l'impiego dell'acetilene offre il vantaggio di misurare un composto quale l'ossido nitroso, un intermedio obbligatorio della denitrificazione, piuttosto che l'azoto molecolare, contenuto al 75% in atmosfera. Inoltre l'esposizione a quantità inibitrici di C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> per diverse ore non è tossica alle cellule denitrificanti (Florenzano, 1989).

I flaconi a chiusura ermetica contenenti i campioni di suolo, una volta pesati, venivano trattati con acetilene privo di acetone fino a portare l'atmosfera all'interno del flacone a 10 KPa di acetilene e 90 KPa di aria. Il tasso di denitrificazione è stato calcolato come il tasso di N<sub>2</sub> accumulato all'interno del campione dopo 2 h di incubazione alla stessa temperatura del campo. Successivamente il gas immesso in una provetta sottovuoto (venoject)



mediante un ago multiplo, è stato conservato in frigorifero nell'attesa di effettuare le analisi. Le analisi dei campioni di gas relative al periodo 1999-2000 sono state effettuate nei laboratori dell'Università di Rennes (Francia) utilizzando un gas cromatografo a cattura d elettroni, ECD  $^{63}\text{Ni}$ , dotato di colonne Poropak Q di 2 m di lunghezza. Le analisi dei gas, nei due anni successivi, sono state svolte presso il Laboratorio di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Padova. Il gascromatografo è utilizzato è un Perkin-Elmer Sigma 300, dotato di una colonna Poropak T modificata di 3 m di lunghezza.

### **Emissioni naturali di $\text{N}_2\text{O}$**

Sono state misurate mediante camere in PVC (enclosure) di forma cilindrica con un diametro di 15 cm dotate di un piccolo setto di gomma nella parte superiore. Queste enclosure venivano conficcate nel terreno per almeno 5 cm. Il flusso di gas dalla superficie del suolo viene determinato campionando dopo 1 e 4 ore l'aria nelle enclosure dopo averla mescolata con una siringa. I campioni di gas vengono raccolti mediante un ago multiplo e relativa venoject attraverso il setto di gomma e analizzati da un gas cromatografo per  $\text{N}_2\text{O}$  usando lo stesso metodo visto sopra.

### **Attività enzimatica della denitrificazione**

È stata misurata mediante la procedura di Smith and Tiedje's (1979). Quattro set per ognuno dei 27 campioni di terreno vengono messi in condizioni anossiche mediante aggiunta di acqua distillata ed estraendo l'aria dalle bottiglie e immettendo azoto gassoso. Lasciando incubare per 8 ore con acetilene privo di acetone fino a portare l'atmosfera all'interno del flacone a 10 KPa (10% V/V) di acetilene e 90 KPa di aria alla temperatura media del suolo. Un set di campioni veniva lasciato semplicemente in condizioni ottimali di anossia, ad un secondo set di campioni veniva aggiunto nitrato (10 mg  $\text{NO}_3\text{-N}$  g-1, sulla base del peso fresco del campione di suolo) e con riferimento DEA+N); a un terzo set veniva aggiunto Carbonio (4 mg C-glucose g-1) con riferimento DEA+C; un quarto set veniva aggiunto sia Nitrato che Carbonio con le stesse quantità DEA+C+N.

I ratei di denitrificazione sono stati calcolati come il rateo di accumulazione di ossido nitroso nella parte aerea della bottiglia tra le 4 e le 8 ore di incubazione. L'ossido nitroso è stato misurato dallo stesso laboratorio sopra menzionato.





## Bibliografia essenziale

1. Brookes P.C., Landman A., Pruden G. and Jenkinson D.S. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 17 (6): 837-842.
2. Day P.R. 1965. Particle fractionation and particle size analysis. In "Methods of Soil Analysis" C.A. Black Ed.. Agronomy series n°9. pp. 545-567.
3. Florenzano G. 1989. Fondamenti di microbiologia del terreno, Ed. reda, pp.748.
4. Jenkinson D.S. & Poulson D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, 8: 209-213.
5. Keeney D.R. & Nelson D.W. 1982. Nitrogen - Inorganic forms. In «Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph n°9. A.L. Page Editor, ASA-SSSA Publisher. pp. 643-698.
6. Smith M.S. & Tiedje J.M. 1979. Phases of denitrification following oxygen depletion in soils. *Soil Biology & Biogeochemistry*, 11: 261-267.
7. Technicon 1976. Technicon Instrument System. Technicon Method Guide. Tarrytown, NY, USA.
8. Waring S.A. & Bremner J.M. 1964. Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of nitrogen availability. *Nature*, 201: 951-952.
9. Yoshinari T. & Knowles R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemistry, Biophysics*