

EDITORIALE

Il Notiziario "Metodi Analitici per le Acque" è stato pubblicato per la prima volta nel 1980 ed è nato con lo scopo di diffondere e trasferire i risultati di studi relativi alla messa a punto dei metodi di analisi delle acque, con particolare riferimento allo sviluppo di nuove tecniche analitiche, alla determinazione di nuovi indici, alla definizione delle più idonee modalità di campionamento e conservazione dei campioni, alla individuazione dei rimedi per eliminare possibili interferenze. Nei cinquanta numeri fin qui usciti il Notiziario ha pubblicato lavori originali a carattere sperimentale ed applicativo, reviews ed informazioni su attività relative alle metodologie applicate all'analisi delle acque. Sono inoltre stati pubblicati articoli dedicati a specifici argomenti di carattere ambientale, con particolare riferimento alla analisi ed alle modalità di applicazione di normative nazionali e comunitarie.

Da questo numero il Notiziario esce rinnovato nella forma e con una ulteriore finalizzazione per quanto riguarda gli scopi. Infatti, a seguito della decisione presa di pubblicare i metodi analitici ufficiali in un unico volume con cadenza quadriennale (il primo volume, attualmente in stampa presso l'Istituto Poligrafico dello Stato, è previsto venga distribuito all'inizio del 1995), al Notiziario verrà anche affidato il compito di rendere nota l'attività della Commissione Metodi Analitici istituita presso l'IRSA e di divulgare i metodi da questa proposti man mano che gli stessi vengono licenziati ed in attesa che, con periodicità quadriennale, vengano ufficializzati. Il Notiziario sostituirà, in altre parole, le "schede" con cui sono stati divulgati i metodi analitici negli anni '80.

Alla luce di queste ulteriori finalità, gli articoli pubblicati sul Notiziario saranno relativi a lavori originali, reviews, informazioni e proposte di metodo. Per i primi tre tipi di contributi la comunità scientifica è vivamente invitata a collaborare con il Notiziario sottoponendo al Comitato di Redazione articoli, note e quantaltro ritenuto meritevole di segnalazione. Per quanto riguarda i metodi proposti, la collaborazione della comunità scientifica e degli operatori del settore dovrà riguardare la indicazione di eventuali proposte o suggerimenti migliorativi riguardanti il metodo, prima che lo stesso assuma piena ufficialità.

Prof. Roberto Passino
Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

DETERMINAZIONE DI NUTRIENTI, CLOROFILLE, FEOPIGMENTI E METALLI NEL PARTICELLATO LACUSTRE RACCOLTO MEDIANTE TRAPPOLE DI SEDIMENTAZIONE

Tartari G.*, Camusso M., Muntau H.***, Biasci G.***, Binelli A.**, Previtali L.* e Renoldi M.

* Istituto di Ricerca Sulle Acque, Brugherio, Milano
** Joint Research Centre, Ispra, Varese
*** Università degli Studi di Milano

RIASSUNTO

Viene presentata una procedura per la determinazione di nutrienti, feopigmenti, composizione elementare e metalli nel particellato sedimentato di ambienti lacustri. La sequenza delle operazioni prevede una serie di misure dirette sulla sospensione di particellato fresco: per l'azoto ed il fosforo totale, mediante contemporanea mineralizzazione in autoclave, e per le clorofille ed i feopigmenti per estrazione con solvente acetone, in entrambi i casi con rivelazione finale in assorbimento molecolare. Le rimanenti determinazioni, CHN e metalli, vengono effettuate, dopo separazione del particellato mediante centrifugazione, sul residuo solido secco, rispettivamente mediante rivelazione gascromatografica, per la misura delle componenti elementari, e in spettrofotometria ad assorbimento atomico, dopo digestione ad umido, per i metalli.

SUMMARY

A procedure for determining nutrients, pheopigments, elemental composition and metal content in particulate matter collected in sediment traps in lakes is presented. Total nitrogen and total phosphorus are determined together on fresh particulate matter following oxidative mineralization in autoclave, and chlorophyll and pheopigments by acetone extraction; in both cases with final determination by molecular absorption spectrophotometry. C, H, N and metals, are determined on dry particulate matter, after centrifugal separation, by combustion and gas chromatography for the former, and by atomic absorption spectrophotometry, after wet acid digestion, for the latter.

INDICE

EDITORIALE.....	1
DETERMINAZIONE DI NUTRIENTI, CLOROFILLE, FEOPIGMENTI E METALLI NEL PARTICELLATO LACUSTRE RACCOLTO MEDIANTE TRAPPOLE DI SEDIMENTAZIONE.....	1
DETERMINAZIONE DEL COBALTO.....	18

INTRODUZIONE

Lo studio della componente particellata presente in sospensione ed in corso di sedimentazione nelle acque lacustri presenta una certa difficoltà, sia a causa della sua eterogenea composizione chimica e biologica, che per i complessi scambi che avvengono nel mezzo acquoso. Il campionamento del seston può essere effettuato in due modi differenti, a seconda che si desidera distinguere tra la componente sospesa e quella sedimentata. Nel primo caso si procede mediante la raccolta di grandi volumi di acqua, da cui il particellato viene separato per centrifugazione in continuo (De Mora and Harrison, 1983), mentre nel secondo caso il campionamento viene effettuato utilizzando trappole di sedimentazione poste a differenti profondità lungo la colonna d'acqua lacustre, nelle quali il seston si raccoglie per gravità.

Le procedure di raccolta e la descrizione della strumentazione necessaria riguardante il campionamento con le trappole di sedimentazione è stata già oggetto di un precedente lavoro (Tartari et al., 1993a) a cui si rimanda per ogni dettaglio, in questo vengono invece presentate alcune procedure analitiche applicabili nella determinazione di componenti elementari del particellato: fosforo ed azoto, clorofilla e feofitina, carbonio, idrogeno e metalli.

Le determinazioni suggerite non esauriscono tutte le possibili misure analitiche sul particellato sedimentato, ma rappresentano quelle più comuni. L'importanza di questa procedura è quindi da ricercare nella presentazione di uno schema operativo integrato, delle cui fasi sono state a lungo verificate l'efficienza e la qualità analitica dei risultati.

ANALISI DEL PARTICELLATO LACUSTRE SEDIMENTATO

Schema delle operazioni

Lo schema delle operazioni viene presentato in modo dettagliato con lo scopo di farne uno strumento operativo completo, in grado di soddisfare un ampio spettro di esigenze. Nata dall'esperienza maturata nel corso di circa un decennio di misure condotte presso il Reparto Sperimentale di Idrobiologia Applicata del CNR - IRSA di Brugherio, volte alla determinazione dei flussi di sedimentazione di nutrienti e metalli in alcuni ambienti lacustri dell'Italia settentrionale (Tartari et al., in prep.), la procedura suggerisce un percorso analitico che può essere suddiviso in due fasi: determinazione dei nutrienti, delle clorofille e dei feopigmenti nella fase fresca sospesa e misura di specie elementari nel residuo secco.

I procedimenti di pretrattamento ed analisi su campioni di seston presentati in questo lavoro, vengono indicati in Fig. 1. La procedura prevede una fase preliminare, comune a tutte le metodiche indicate, di subcampionamento della sospensione raccolta dalle trappole di sedimentazione, da effettuarsi sotto agitazione magnetica, allo scopo di ovviare alla eterogeneità delle sospensioni di materiale particellato. Da questo punto vengono definite tre linee procedurali ben distinte: una relativa all'analisi di azoto e fosforo totali (TN e TP), una per la determinazione di clorofilla (Chl) e feofitina (Feo),

ed una terza, infine, per i metalli in traccia e l'analisi elementare di carbonio, azoto ed idrogeno (CHN).

La prima linea prevede una digestione per via umida con persolfato di potassio (Smart et al., 1983), che consente la trasformazione delle varie forme di azoto e fosforo (organiche ed inorganiche) presenti nel particellato in forme determinabili (Valderrama, 1981) mediante spettrofotometria di assorbimento molecolare (MAS/UV e VIS). La procedura per la determinazione delle clorofille e dei feopigmenti prevede l'estrazione con acetone seguita dalla misura diretta in spettroscopia di assorbimento molecolare (MAS/VIS) della clorofilla e la determinazione della feofitina, dopo acidificazione dell'estratto con la medesima tecnica (Lorenzen, 1967). La terza linea si differenzia infine dalle altre due perchè prevede, dopo centrifugazione in continuo ed essiccamento in stufa, l'ottenimento di un residuo solido che, omogeneizzato, viene utilizzato sia per la determinazione dei metalli mediante spettrofotometria di assorbimento atomico (AAS/HGA), sia di carbonio ed idrogeno in gascromatografia (GC) che, unitamente al fosforo ed all'azoto, consentono valutazioni complessive sulla composizione elementare del particellato (C:H:N:P, Redfield, 1934).

La procedura indicata permette l'analisi della composizione del particellato che sedimenta negli ambienti lacustri, utilizzando quantità di campione analiticamente sufficienti se si opera con coppie di trappole aventi ciascuna diametri compresi tra 7 e 10 cm. Il vantaggio di questa procedura consiste nella riduzione del numero complessivo delle operazioni (campionamento, prelievo e pretrattamento), e nel maggior controllo di una serie di rischi, individuabili nella contaminazione e nella perdita parziale del campione attraverso la codificazione di tutte le fasi procedurali.

Trattamento dei campioni

Il materiale particellato raccolto con le trappole di sedimentazione al momento del prelievo viene trasferito in appositi recipienti di 5 L di volume, dove viene conservato fino al momento dell'analisi. In genere esso giunge in laboratorio dopo una giornata di operazioni di campagna e quindi viene analizzato solo il giorno successivo.

Il campione è costituito da una sospensione più o meno concentrata, a seconda del volume d'acqua surnatante trattenuto al momento del prelievo. Durante la conservazione il seston tende a coagulare in masse fiocose che precipitano sul fondo del contenitore, mentre le particelle più fini tendono a galleggiare e a depositarsi per adesione lungo la linea del pelo liquido, formando dopo alcuni giorni una ben visibile fascia di colore scuro. Anche se al buio ed in ambiente refrigerato ($\sim 4^\circ\text{C}$), all'interno del recipiente di raccolta hanno luogo sia fenomeni di grazing che di decomposizione, i primi causati dalla presenza di zooplancton, salvo operare una preventiva filtrazione della sospensione di seston al momento del prelievo con un retino da plancton con maglie di adeguate dimensioni ($\sim 30\text{-}75\ \mu\text{m}$); i secondi causati dall'attività di mineralizzazione batterica, ben evidenziata, all'aumentare del tempo di conservazione, dalla produzione di emissioni maleodoranti e dal progressivo intorbidimento del surnatante residuo. Per tali motivi è vivamente consigliato effettuare le operazioni

di analisi entro e non oltre le 24 h dal prelievo, se si vuole limitare gli errori di misura e facilitare le operazioni di riomogeneizzazione del campione.

DETERMINAZIONE DELL'AZOTO E DEL FOSFORO TOTALE

Seguendo lo schema di Fig. 1, le operazioni analitiche sul particolato hanno inizio con la misura del volume totale di campione (V_i), seguita dall'omogeneizzazione della sospensione con un agitatore magnetico di forma cilindrica, preferibilmente dotato di anello. Il prelievo del subcampione per l'analisi dei nutrienti ($V_{TN/TP}$) viene effettuato con una pipetta di vetro tarata o graduata di opportuno volume, cercando di pescare il liquido nella zona mediana del gorgo di agitazione. Al termine dell'operazione su ciascun campione, è consigliabile annotare nella tabella di lavoro, di cui la Tab. 1 costituisce un esempio, i volumi utilizzati per l'analisi del fosforo e dell'azoto e necessari per il successivo calcolo dei flussi di sedimentazione.

Principio del metodo

Il campione di particolato viene sottoposto a digestione ad umido con persolfato di potassio ($K_2S_2O_8$) a 120 °C in autoclave, in ambiente a pH variabile da condizioni alcaline ad acide, secondo la procedura riportata da Valderrama (1981) a cui si rimanda per ogni dettaglio. Rispetto al metodo originale la procedura qui indicata presenta alcune modifiche volte a migliorare l'efficienza dell'ossidazione nel caso di campioni ad elevato contenuto di particolato e ad aumentare la stabilità dei reattivi. Al fine di ottenere la completa digestione del campione, il persolfato viene infatti introdotto in parte in soluzione ed in parte in forma solida, che viene gradualmente utilizzata durante la digestione.

Poichè il metodo per la determinazione simultanea dell'azoto e del fosforo totali non è compreso tra i Metodi Analitici per le Acque dell'IRSA (IRSA, 1995), si ritiene utile, per completezza della procedura oggetto di questo protocollo, riportare in APPENDICE 1 i dettagli esecutivi del metodo.

Trattamento dei recipienti

Le bottiglie per la digestione devono essere in vetro robusto, con tappo a vite che consenta la chiusura ermetica e che sia resistente alla temperatura di 120°C (tipo Duran da 100 mL per reagenti, con filettatura ISO, anello salvagoccia di PTFE e tappo a vite in PPN). La vetreria usata per l'analisi del fosforo e dell'azoto totali deve essere lavata con detersivi esenti da fosforo, oppure con acido solforico concentrato. Tutti i recipienti utilizzati per la digestione in autoclave vanno periodicamente spazzolati con uno scovolino in modo da asportare meccanicamente l'eventuale residuo che aderisce alle pareti e che può contribuire ad aumentare il livello dei bianchi. Al fine di evitare l'adesione di piccole quantità di materiale digerito alle pareti dei tappi è consigliabile conservarli a bagno in acqua in un recipiente coperto per qualche giorno, infine risciacquarli e farli asciugare

all'aria in ambiente controllato su un foglio di carta da filtro, con la parte interna rivolta verso il basso.

Diluizione del campione

Generalmente la quantità di particolato presente nel campione da analizzare è elevata anche se il tempo di esposizione delle trappole è limitato ad una settimana. Si rende quindi necessario effettuare una opportuna diluizione del campione, che tenga conto anche che il particolato raccolto aumenta all'aumentare della profondità. In genere sarebbe preferibile adottare bassi fattori di diluizione, per contenere sia l'errore associato al prelievo che quello volumetrico, anche se fattori più elevati garantiscono un maggiore recupero durante la digestione. I fattori di diluizione comportano però necessariamente il prelievo di minori quantità di volume di sospensione rispetto ai 50 mL destinati alla digestione (ad es. 25, 10 o 5 mL, rispettivamente per fattori di diluizione 2, 5 e 10). Ne consegue quindi che prelievi di una così limitata entità di un campione eterogeneo, come la sospensione di particolato raccolta dalle trappole di sedimentazione, sono soggetti ad una elevata variabilità nelle repliche. Si consiglia quindi di effettuare almeno 3 repliche per campione per contenere l'incertezza delle determinazioni entro una variazione del $\pm 10\%$. Si consiglia infine di mantenere gli stessi fattori di diluizione per tutta la durata della campagna di misura.

Filtrazione del digerito e determinazione analitica

La determinazione dell'azoto e del fosforo totali è consigliato effettuarla entro e non oltre le 24 ore dalla digestione, in caso contrario il digerito può essere conservato in congelatore, dopo raffreddamento, negli stessi recipienti di digestione tenuti rigorosamente chiusi per evitare l'aspirazione di aria.

Al termine della digestione il campione presenta generalmente un residuo insolubile biancastro, costituito da componenti inorganiche non aggredibili dall'ossidante utilizzato per la mineralizzazione. Tale residuo, prima di proseguire le operazioni analitiche, deve essere separato mediante filtrazione. Questa operazione può essere condotta con membrane di nitrato di cellulosa, esenti da fosforo (tipo Sartorius 11306-47 PFN), di 0,45 μm di porosità, prelevando il digerito con una siringa di politene da 50 mL, munita di un tubicino di plastica al posto dell'ago, e successiva eluizione attraverso il filtro montato in un portafiltri. L'operazione è favorita dall'uso di un puntale per micropipetta tagliato a lunghezza adeguata per l'imbocco del portafiltri, montato all'estremità della siringa.

La determinazione analitica in assorbimento molecolare si effettua infine per l'azoto totale alla lunghezza d'onda di 220 nm, corrispondente al picco di assorbimento dello ione nitrato in cui si sono trasformate per reazione ossidativa le varie forme di azoto inizialmente presenti nel campione, mentre il fosforo totale, trasformato in ortofosfato, viene rivelato a 882 nm come complesso fosfomolibdico.

DETERMINAZIONE DELLA CLOROFILLA E DEI FEOPIGMENTI

Come riportato nello schema di Fig. 1, il prelievo della aliquota da destinare alla determinazione della clorofilla e dei feopigmenti va effettuato contemporaneamente a quello per la determinazione dell'azoto e del fosforo totali, mentre la restante parte della sospensione sarà destinata alla separazione del particolato per centrifugazione o filtrazione.

Principio del metodo

La determinazione di clorofilla *a* e dei feopigmenti prevede la filtrazione di un'aliquota di campione su filtri in fibra di vetro e in presenza di una leggera depressione, in modo da concentrare sulla membrana le cellule fitoplanctoniche contenute nel particolato in sospensione. La successiva estrazione dei pigmenti clorofilliani avviene a freddo, dopo un'opportuna triturazione ed omogeneizzazione dei filtri mediante un sistema meccanico, immergendo la sospensione ottenuta in una soluzione neutra di acetone acquoso.

La stima della concentrazione di clorofilla *a* nell'estratto avviene per via spettrofotometrica, sfruttando la loro proprietà di assorbire la luce nella zona del rosso dello spettro visibile. Acidificando direttamente in fase di lettura l'estratto acetone si provoca poi la degradazione della clorofilla a feofitina, per la perdita dell'atomo di magnesio dal nucleo porfirinico della molecola. Mediante appropriate equazioni (IRSA, 1990) che prevedono l'utilizzo di adeguati coefficienti di assorbimento molari, si calcolano quindi le concentrazioni di clorofilla *a*, di feofitina *a* e delle clorofille *b* e *c*.

Reagenti

- Acetone acquoso al 90%, neutralizzato con 5 g di $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2\text{nH}_2\text{O}$ per ogni litro.

- HCl 0,2 N preparato usando fiale a concentrazione standard.

Filtrazione

Per effettuare le analisi dei feopigmenti i campioni possono essere conservati al freddo ($\sim 4^\circ\text{C}$) ed al buio nei contenitori di prelievo per non più di 12 ore e le operazioni che seguono vanno effettuate preferibilmente con poca luce artificiale.

Il prelievo dell'aliquota da sottoporre a filtrazione (V_{CHL}) per l'analisi di clorofilla *a* e dei feopigmenti viene effettuato secondo gli stessi criteri indicati per il fosforo e l'azoto totali, registrando i volumi nella stessa Tab. 1.

I campioni vengono filtrati, sotto aspirazione a 0,01-0,02 bar, con filtri in fibra di vetro (tipo Wathman GF/C) da 5,5 cm di diametro, utilizzando un volume d'acqua tale da permettere letture di assorbanze nell'estratto superiori a 0,200 UA (colorazione omogenea ma non intensa del filtro). Ogni filtro, piegato a metà, viene quindi asciugato premendolo su carta da filtro in fogli per togliere gran parte dell'umidità, che potrebbe comportare un deterioramento del particolato durante la conservazione, avvolto in foglio di alluminio e riposto in una capsula Petri di materiale plastico, insieme ad alcuni cristalli di gel di silice, che impediscono la formazione di condensa. Il tutto può essere conservato in freezer per un periodo non superiore ad un mese, ma è consigliata la misura nel più breve tempo possibile.

A differenza dei campioni ottenuti con la filtrazione di acque pelagiche, generalmente il residuo ottenuto dopo filtrazione del particolato delle trappole di sedimentazione mostra una colorazione bruna raramente omogenea. Si consiglia perciò di effettuare alcune repliche con volumi diversi di seston, in modo da definire le migliori condizioni operative.

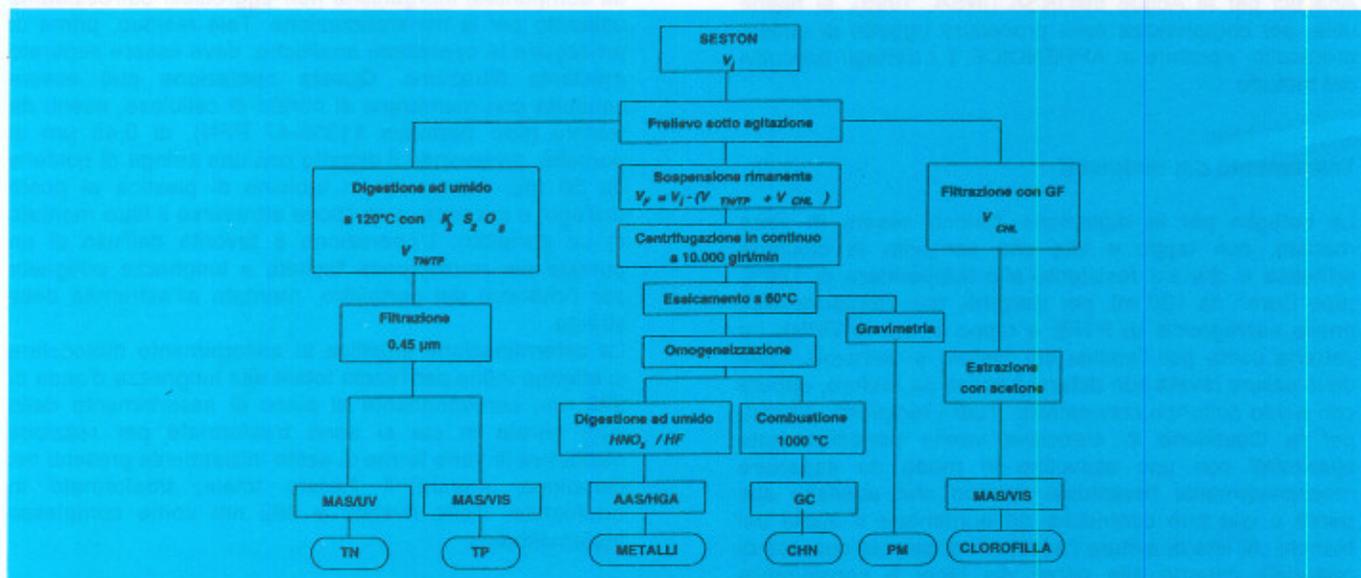


Fig. 1 - Schema delle procedure di analisi del particolato raccolto mediante trappole di sedimentazione. I simboli indicati nei riquadri sono spiegati nel testo.

Analisi della clorofilla e dei feopigmenti

L'analisi della clorofilla e dei feopigmenti presenti nel residuo depositato nel filtro può essere effettuata, analogamente ad ogni campione di qualsiasi comparto acquatico, seguendo il metodo riportato nei Metodi di analisi per acque di mare (IRSA, 1990) a cui si rimanda per ogni dettaglio operativo.

Per il calcolo delle concentrazioni finali possono essere utilizzati due metodi a seconda che nel campione vengano determinate o meno le feofitine. Rimandando alla letteratura specifica (Lorenzen, 1967; Jeffrey and Humphrey, 1975) ogni chiarimento sulla procedura di calcolo delle concentrazioni, al fine di facilitare le operazioni si ritiene comunque utile riportare nella APPENDICE 2 il programma in BASIC in uso presso il CNR IRSA di Brugherio.

SEPARAZIONE DEL PARTICELLATO E DETERMINAZIONE DEL PESO SECCO

La sospensione di particellato rimanente dopo il prelievo dei subcampioni da destinare all'analisi di TN/TP, clorofilla e feopigmenti (V_F) viene sottoposta (Fig. 1) a centrifugazione (Fig. 2) per separare il particellato. Le operazioni vanno compiute entro e non oltre 48 ore dal prelievo, perchè le mutate condizioni ambientali comportano cambiamenti nella composizione chimica a seguito di adsorbimento, rilascio, degradazione e mineralizzazione ad opera dello zooplancton e della flora batterica.

La centrifugazione provoca la sedimentazione delle particelle di una sospensione attraverso l'applicazione di una "gravità artificiale". La forza centrifuga generata dalla rotazione è proporzionale al quadrato della velocità angolare, ma come parametro di rotazione si preferisce utilizzare più semplicemente il numero di giri al minuto (giri/min) effettuati dal rotore. A seconda della velocità massima di rotazione le centrifughe sono genericamente classificate in: a bassa velocità (2-6000 giri/min), ad alta velocità (18-25000 giri/min) ed in ultracentrifughe (>40000 giri/min). Per la separazione del particellato sospeso raccolto con le trappole di sedimentazione si possono applicare due diversi metodi di centrifugazione: la separazione in flusso continuo e quella in discontinuo. Se il contenuto di materiale particellato è modesto, la centrifugazione in continuo è la tecnica ideale, perchè consente l'utilizzo di grandi volumi d'acqua e permette di condurre l'analisi direttamente sul materiale raccolto. L'operazione è utile anche quando sia disponibile una cospicua quantità di particellato, perchè consente l'accumulo senza limiti eccessivi, contrariamente ad altri sistemi quali la filtrazione. Non disponendo di una adatta centrifuga in continuo, si può però operare anche in discontinuo, ma con tale tecnica le possibilità di alterazione del campione sono più elevate, a causa delle notevoli manipolazioni richieste per l'intera operazione di separazione.

In generale una separazione di fase solido/liquido che privilegi il residuo rispetto al filtrato può essere effettuata anche per filtrazione (Danielsson, 1982). Questa tecnica, però, non trova una favorevole considerazione nel caso del seston delle trappole di sedimentazione per due motivi fondamentali. Il primo è legato alla rilevante quantità di particellato che occlude rapidamente i pori del

filtro, impedendo di fatto l'operazione di recupero del seston. Il secondo è invece legato alla possibile introduzione di un fattore di disturbo di non poco conto nell'analisi finale a causa del filtro, che rappresenta, per alcune misure, una sorgente di contaminazione del campione. La centrifugazione invece offre, accanto ad una più ampia possibilità di trattamento di volumi di campione, la pressochè nulla presenza di supporto, rappresentato dal solo recipiente di contenimento (Comba and Kaiser, 1990).

Con la filtrazione non vengono trattenute solo le particelle con dimensioni superiori a quelle dei pori; ma anche quelle con dimensioni più piccole rimangono sulle membrane, per il progressivo accumularsi del particellato sulla membrana (Baudo e Bertoni, 1984). Nel caso dell'uso della filtrazione, come tecnica di separazione del seston, è quindi necessario operare con sistemi filtranti di grande diametro, in grado di trattenere notevoli quantità di particellato, ma soprattutto che consentano la filtrazione completa di volumi non trascurabili di sospensione (1-3 L). Queste considerazioni, oltre alle precedenti, sconsigliano quindi l'applicazione di questa tecnica.

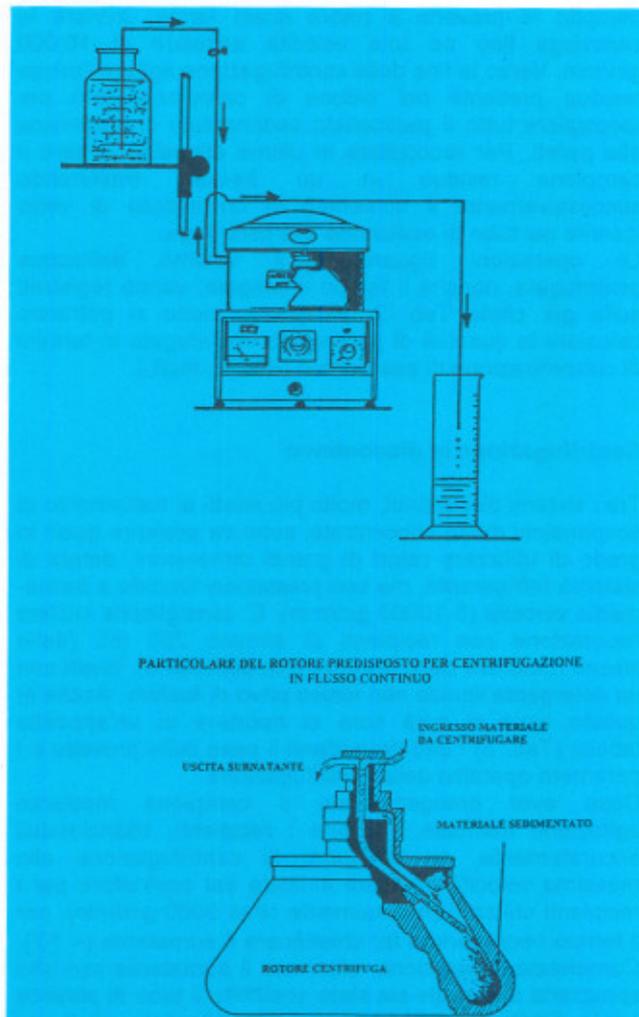


Fig. 2 - Rappresentazione schematica del trattamento del materiale particellato mediante centrifugazione in continuo.

Centrifugazione in continuo

In un rotore predisposto per il flusso in continuo di campione (Fig. 2), si introducono due provette di policarbonato o polipropilene, preventivamente essiccate a 60°C, pesate e numerate avendo cura di trascrivere i valori sull'apposita tabella di lavoro (Tab. 2), e le si chiude con gli appositi tappi di acciaio, stringendo accuratamente le viti di bloccaggio per evitare la fuoriuscita dell'acqua (Fig. 2). Nel caso che il materiale sedimentato sia destinato in particolare alla analisi dei metalli, le provette vanno trattate con una soluzione di HNO₃ 1:5, risciacquate con acqua Milli-Q, condizionate per qualche giorno con HNO₃ 1 N, risciacquate ed asciugate in stufa a 60°C.

Il recipiente col campione va posizionato in modo da garantire alla centrifuga l'alimentazione del flusso per gravità, raccogliendo l'acqua centrifugata in un cilindro graduato posto al di sotto del piano della centrifuga (Fig. 2). Il flusso viene regolato fino a valori di 30-40 mL/min, utilizzando una pinza di Hoffmann posta sul tubo di adduzione. Al termine della regolazione dei flussi, l'acqua raccolta nel cilindro va reintrodotta nel bidone. Dopo aver riempito le provette a rotore quasi fermo, avviare la centrifuga fino ad una velocità angolare di 10.000 giri/min. Verso la fine della centrifugazione agitare l'acqua residua presente nel bidone di campionamento per raccogliere tutto il particellato sedimentato che aderisce alle pareti. Per raccogliere le ultime aliquote, versare il campione residuo in un becker, trasferendo successivamente il contenuto in un imbuto di vetro inserito nel tubo di adduzione alla centrifuga.

Le operazioni riguardanti il volume dell'acqua centrifugata, nonché il tempo impiegato, vanno registrati sulla già citata Tab. 2. In questo modo si potranno calcolare le quantità di particellato centrifugato in termini di concentrazione di peso secco (PMdw, mg/L).

Centrifugazione in discontinuo

Tra i sistemi discontinui, molto più adatti al trattamento di sospensioni molto concentrate, sono da preferire quelli in grado di utilizzare rotori di grandi dimensioni, dotate di sistema refrigerante, ma con prestazioni limitate a basse-medie velocità (5-10000 giri/min). E' consigliabile iniziare l'operazione con recipienti di almeno 250 mL (dello stesso materiale delle provette o in polietilene), lavati con un detergente liquido non ionico privo di fosforo. Anche in questo caso si avrà cura di riportare in un'apposita tabella (Tab. 3) i dati riguardanti il peso delle provette e i parametri operativi della centrifugazione.

Dopo aver omogeneizzato il campione mediante agitazione manuale, riempire i recipienti, bilanciandoli accuratamente, ed effettuare la centrifugazione alla massima velocità angolare indicata dal costruttore per i recipienti utilizzati (normalmente circa 5000 giri/min), per il tempo necessario a far chiarificare il surnatante (~ 10'). Completata l'operazione, eliminare il surnatante con una spruzzetta alla quale sia stato sostituito il tubo di plastica per la distribuzione dell'acqua con uno tagliato all'altezza del tappo. Queste operazioni andranno ripetute più volte, fino a ridurre il volume complessivo del campione a non più di 100 mL.

Poiché il particellato tende ad aderire alle pareti in una disposizione lenticolare che asseconda il moto centrifugo,

al fine di eliminare qualsiasi deposito, durante l'operazione di travaso, conservare, dopo la prima centrifugazione, una aliquota del surnatante chiarificato da utilizzare per rimuovere il particellato dalle pareti, spruzzandolo con un sottile getto mediante una siringa munita di ago. Infine, aiutandosi con una siringa munita di tubicino di plastica lungo circa 15 cm, raccogliere accuratamente il residuo in due provette di polietilene da 50 mL ciascuna, munite di tappo, precedentemente essiccate in stufa a 60°C, pesate senza tappo e numerate. Bilanciare le provette e centrifugare a 5000 giri/min per circa 5'.

Essiccamento, pesata e conservazione del particellato

A fine centrifugazione, recuperare le provette e, maneggiandole delicatamente per non rimuovere il sedimento, aspirare il surnatante lasciandone pochi millilitri sul fondo. Dopo essiccamento in stufa a 60°C per un giorno circa, pesare,appare con "parafilm" e riporre le provette in congelatore avvolte in foglio di alluminio e chiuse in un sacchetto di plastica. L'essiccazione del particellato alla temperatura di 60 °C risponde all'esigenza di ottenere un residuo poco alterato da fattori termici, ma comunque a peso costante. Ciò non costituisce un criterio assoluto ed anche adottando un trattamento a 105 °C le operazioni indicate non richiedono comunque modifiche alle procedure che seguono.

Tutte le indicazioni numeriche riguardanti la tara ed il peso lordo delle provette devono essere accuratamente trascritte in una apposita tabella di lavoro (Tab. 2 o 3).

Il peso netto rappresenta infine la quantità di particellato sedimentato nel periodo di campionamento, salvo correzione per i volumi utilizzati per precedenti determinazioni, come riportato successivamente nel paragrafo dedicato al calcolo dei flussi di sedimentazione.

ANALISI DEI METALLI

L'analisi dei metalli viene condotta sul materiale particellato secco dopo digestione acida ad umido utilizzando miscele costituite da acido cloridrico, acido solforico, acido nitrico e/o fluoridrico, in diversi rapporti tra loro, in sistemi di digestione aperti o chiusi (bombe), in stufa o in forno a microonde. La scelta della miscela di acidi utilizzata per la mineralizzazione dipende dalla composizione organica ed inorganica del materiale particellato e dal tipo di informazione che si desidera ottenere rispetto ai contenuti di elementi maggiori (Al, Ca, Mg, Fe, Mn) ed in traccia (As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn). L'utilizzo di una miscela nitrico-fluoridrica (HNO₃-HF) permette anche l'attacco della matrice cristallina dei silicati e la determinazione del contenuto totale dei metalli nel particellato, mentre l'utilizzo del solo acido nitrico solubilizza i metalli legati alla frazione scambiabile, ai carbonati, agli ossidi di ferro e manganese oltre alla sostanza organica. Quindi nel primo caso si determina anche la componente naturale contenuta nei minerali provenienti dal bacino lacustre e raccolti nelle trappole, mentre nel secondo caso si determina la componente

Tab. 1 - Determinazione dei flussi di sedimentazione: misura del fosforo e dell'azoto totale in spettroscopia di assorbimento molecolare.

Lago				Data di campionamento			Tabella		
Stazione				Data di analisi			Operatore		
Superficie delle trappole (m ²)									
Periodo di esposizione (gg)		dal	al						

N	Sigla	Profondità m	Volumi				M.A.S. Diluzione	TP			TN			Flussi di sedimentazione		Note
			Iniziale	Per TN/TP (*)	Per CH (*)	Finale		Assorbance (mAU)	Concentrazione	Assorbance (mAU)	Concentrazione	TP	TN			
			Vl @	V TN/TP @	V CH @	Vf @		A	Bianco	mg/l	mg/l	mg/m ² d	mg/m ² d			
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																

(*) L'indicazione dei volumi per TN/TP e CH riguarda le aliquote prelevate per le rispettive analisi

Osservazioni

Tab. 2 - Determinazione dei flussi di sedimentazione: separazione del particolato sedimentato mediante centrifugazione in continuo.

Lago				Data di campionamento			Tabella		
Stazione				Data di analisi			Operatore		
Superficie delle trappole (m ²)									
Periodo di esposizione (gg)		dal	al	Velocità rotore (giri/min)					

N	Profondità m	Sigla	Provette			Parametri operativi della centrifugazione				Sedimentazione			Note
			Lordo	Tara	Mpc	Ora	Durata	Volume (Vl)	Flusso	Concentrazione	Flusso		
			g	g	mg	Inizio	Fine	min	l	ml/min	mg/l	mg/m ² d	
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													

Osservazioni

antropogenica di arricchimento del metallo (Krumgalz and Fainshtein, 1989).

Principio del metodo

In questa procedura per determinare il contenuto totale dei metalli nel particellato si provvede ad una dissoluzione del materiale inorganico e ad una digestione di quello organico ad umido e sotto pressione. A tale scopo si utilizza una miscela di HNO_3/HF in crogioli di teflon, posti in una piastra bimetallica, costituita da alluminio ed acciaio, effettuando l'attacco con un trattamento termico a 150°C per 12 h.

Trattamento del materiale

Tutto il materiale utilizzato per le operazioni analitiche deve essere conservato in luoghi al riparo dalla polvere (ad esempio in scatole di plastica di adeguate dimensioni munite di coperchio). Le provette utilizzate vanno lavate con HNO_3 diluito 1:5, e risciacquate con acqua Milli-Q. Tra un campionamento e l'altro le provette vanno poste a condizionare in HNO_3 concentrato, di grado analitico, diluito 1:5, dal quale vengono estratte, lavate con acqua Milli-Q, asciugate in stufa a 60°C e pesate solo il giorno prima dell'uso. Il materiale plastico utilizzato per le operazioni analitiche va lavato con HNO_3 diluito 1:5 e poi sciacquato con acqua Milli-Q. I crogioli dopo l'utilizzo vanno trattati con HNO_3 1:1 per circa un'ora e poi risciacquati con acqua Milli-Q, e conservati in apposite bottiglie contenenti acido nitrico concentrato. Per la conservazione del digerito è preferibile utilizzare sempre bottiglie in polietilene nuove, lavate e condizionate in acido nitrico 1 N.

Gli strumenti utilizzati nella fase di omogeneizzazione del particellato secco con mortaio e pestello non vanno trattati con acido, ma solo lavati con acqua Milli-Q, eliminando eventuali residui organici con alcool etilico al 95 %. Le navicelle e le spatole vanno trattati con HNO_3 (1:5) per 1 h, risciacquati con acqua Milli-Q e asciugati.

Reagenti

- Acido nitrico concentrato (69%) ad elevato grado di purezza (tipo BDH Aristar, cat. n°4500)
- Acido fluoridrico concentrato (48%) ad elevato grado di purezza (tipo BDH Aristar, cat. n° 45009)

Digestione dei campioni

Le provette conservate in congelatore, prima di essere utilizzate per le analisi, devono essere riportate a temperatura ambiente. Operando sotto cappa di aspirazione, introdurre in ciascuna provetta 1 mL di miscela acida (70 % di HNO_3 e 30 % di HF) utilizzando una micro-pipetta. Tutte le operazioni richiedono l'uso di materiale volumetrico in plastica, dato l'uso di acido fluoridrico, appositamente dedicato allo scopo. Preoccupandosi di recuperare anche il materiale aderente alle pareti mediante una spatola di plastica, e ripetendo l'operazione tre volte fino ad un volume di 3 mL, si

trasferisce la sospensione in un crogiolo di digestione in Teflon ad elevata densità (Fig. 3). Ogni singolo crogiolo numerato (bomba) viene chiuso con il rispettivo tappo di Teflon, anch'esso numerato, e posto nel suo alloggiamento all'interno del contenitore metallico di digestione. Bloccato accuratamente il coperchio del digestore, lo si introduce in stufa, riscaldando a 150°C per 12 h.

Al termine della digestione è necessario attendere il completo raffreddamento del contenitore prima di aprire il digestore sotto cappa. La soluzione digerita contenuta nei crogioli viene trasferita, con l'ausilio di un imbuto in polietilene, in bottiglie da 50 o da 100 mL, a seconda della diluizione scelta in base alla quantità di particellato digerito ed al contenuto di metalli. Anche in questo caso bisogna recuperare tutta la soluzione procedendo con almeno due lavaggi del crogiolo con acqua Milli-Q e misurando i volumi d'acqua utilizzati. Al termine, si porta il volume della soluzione al valore desiderato aggiungendo il volume mancante, calcolato sottraendo dal volume finale quello ottenuto sommando il volume digerito (3 mL) e quello utilizzato per i lavaggi del crogiolo (Tab. 4). Questa operazione può essere facilmente eseguita utilizzando un dosatore di politene contenente acqua Milli-Q, ed impostando a priori il volume d'acqua totale da aggiungere per la diluizione. I campioni vengono infine conservati al buio ed a 4°C .

Nel caso di campioni costituiti da una quantità di particellato di peso superiore ai 100 mg, è preferibile digerire solo una parte del materiale per ottenere la completa mineralizzazione del campione, dopo aver proceduto alla omogeneizzazione di tutto il materiale contenuto nella coppia di provette. L'omogeneizzazione è vivamente raccomandata anche nel caso in cui si verifichi una distribuzione differenziale tra le due provette durante la centrifugazione. Dopo essiccamento del contenuto delle due provette a 60°C per 1 h, l'operazione va condotta raschiando con una spatola di plastica il materiale dal fondo e dalle pareti delle provette e trasferendo il particellato in un mortaio di agata, dove si procede alla omogeneizzazione utilizzando un pestello. È importante adottare per l'operazione un mortaio manuale perché il materiale è generalmente di piccola entità. Durante l'omogeneizzazione occorre fare attenzione a non perdere il particellato, recuperandolo il più possibile dalle pareti della provetta, dove tende ad aderire perché si carica elettrostaticamente. La polvere ottenuta viene infine posta in recipienti di vetro scuro muniti di tappo e sottotappo, precedentemente trattati con HNO_3 1:5, che vengono conservati al buio ed in ambiente asciutto. Le bottiglie utilizzate vanno numerate seguendo accuratamente quella delle provette, registrando le sigle su un'apposita tabella. Prima dell'operazione di digestione è necessario sottoporre i contenitori di vetro scuro ad essiccamento ulteriore in stufa a 60°C per 2 h e conservare il campione in essiccatore. L'analisi viene condotta prelevando un subcampione di circa 30-50 mg, trasferendolo dalle bottiglie al crogiolo di digestione in Teflon tramite navicelle monouso di polietilene, precedentemente trattate con HNO_3 1:5 e lavate in acqua Milli-Q. Si procede quindi come sopra descritto, avendo cura di versare l'acido direttamente nelle navicelle per asportare completamente il materiale. È preferibile effettuare le repliche dei campioni in tornate diverse di digestione.

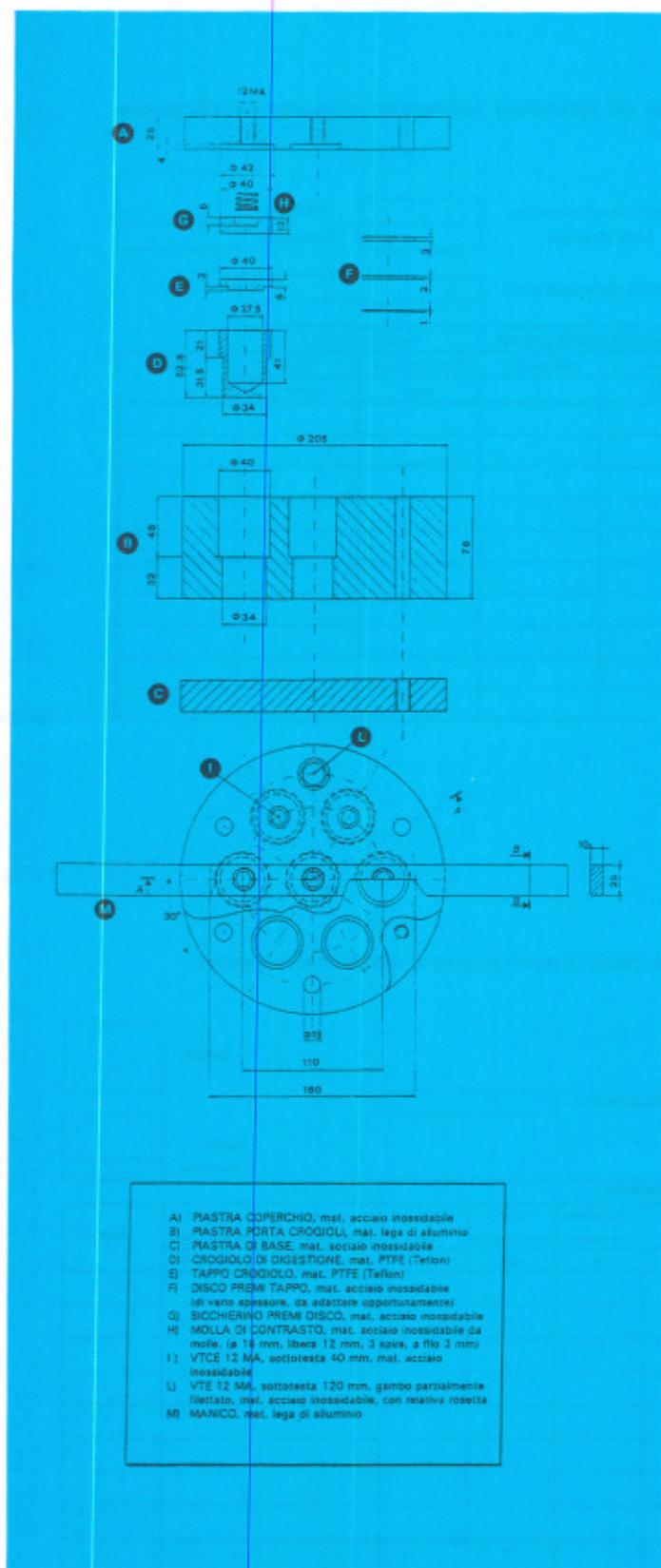


Fig. 3 - Piastra a 7 posti per crogioli in teflon utilizzata per la digestione del particolato per la determinazione dei metalli (Modello Seneco, Milano, su progetto I.R.S.A.).

Digestione dei bianchi

Periodicamente è necessario verificare il livello di contaminazione dei crogioli di digestione, effettuando delle digestioni in bianco. La frequenza di misura di bianchi dipende dalla quantità di materiale presente nei campioni analizzati, e quindi nel caso di elevato contenuto di metallo è consigliabile non compiere più di tre tornate di digestioni di campioni, con ogni singola serie di crogioli, senza interporre una tornata di bianchi come controllo. Inoltre, in ogni tornata, il crogiolo in posizione centrale nella piastra di digestione (Fig. 3) deve essere sempre utilizzato per un bianco.

Per le operazioni si procede esattamente come per i campioni, ponendo nel crogiolo la sola soluzione di digestione, diluita al termine a 50 mL con acqua Milli-Q. I bianchi vanno numerati e registrati in un'apposita tabella, nella quale vanno indicati anche il numero della tornata di analisi ed il numero del crogiolo utilizzato.

Determinazione analitica

L'analisi dei metalli viene effettuata in spettroscopia di assorbimento atomico in fornello di grafite o in fiamma, a seconda delle concentrazioni attese nei campioni. Per le modalità della calibrazione dello strumento e le condizioni analitiche da usare per i singoli elementi si consiglia la consultazione del manuale dello strumento. Si suggerisce la preparazione di soluzioni standard multiple e acidificate ($\text{HNO}_3\text{-HF}$) per riprodurre il più possibile la matrice dei campioni.

Per quantificare l'efficienza di recupero dell'intera procedura vanno utilizzati campioni di materiale certificato, effettuando la digestione contemporaneamente alla determinazione nei campioni di particolato lacustre.

La data dell'analisi, il nome del campione e la relativa concentrazione dei metalli analizzati vanno accuratamente registrati su una tabella di lavoro, mentre i dati finali di tutta l'operazione riguardante l'analisi dei metalli vanno riportati in una tabella riassuntiva (Tab. 4), da utilizzare anche per calcolare le concentrazioni di metallo rispetto al volume (m/V) ed alla massa (m/m), nonché i flussi di sedimentazione.

ANALISI DEL CHN NEL PARTICELLATO

L'analisi elementare (CHN) viene condotta utilizzando il materiale particolato essiccato, tenendo conto dei problemi connessi alla micro-eterogeneità creata dalla relativamente esigua aliquota necessaria per l'analisi, tipicamente 0.5-2 mg. La determinazione dell'azoto (N) nel particolato centrifugato in continuo e seccato a 60 °C, comporta inevitabilmente una parziale sottostima rispetto alla misura del particolato fresco (TN), determinata dall'azione meccanica disagregativa operata con questo sistema di separazione solido/liquido. Tale differenza si riduce a valori trascurabili se si adotta per la separazione la centrifugazione discontinua o la filtrazione. Per la determinazione di questo elemento occorre quindi scegliere la tecnica più adatta, a seconda del protocollo procedurale adottato.

Tab. 3 - Determinazione dei flussi di sedimentazione: separazione del particolato sedimentato mediante centrifugazione discontinua.

Lago
 Stazione
 Superficie delle trappole (m²)
 Periodo di esposizione (gg) dal al

Data di campionamento
 Data di analisi
 Velocità rotore (giri/min)

Tabella
 Operatore

N	Provette			Parametri operativi della centrifugazione			Sedimentazione		Note	
	Profondità m	Sigla	Lordo g	Tara g	Mpc mg	Travasì N	Durata min	Volume (Vf) l		Concentrazione mg/l
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Osservazioni

Tab. 4 - Determinazione dei flussi di sedimentazione: misura dei metalli in spettroscopia di assorbimento atomico.

Lago
 Stazione
 Superficie delle trappole (m²)

Metallo

Tabella
 Operatore

N	Data Campion.		Data analisi	Profondità trappole m	Sigla campione	DIGESTIONE					A.A.S. concentrazione µg/l	Metallo nel digesto µg	Concentrazione nel particolato (CMp) µg/g	Flusso di sedimentazione µg/m ² d	Note
	dal	al				Particolato centrifugato (Mpc) mg	Particolato digesto mg	Crogialo n	Inizio h	Fine h					
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															

Osservazioni

Principio del metodo

Il carbonio, l'idrogeno e l'azoto contenuti nel particolato vengono liberati per combustione ad alta temperatura sotto forma di CO_2 , H_2O e N_2 , successivamente separati selettivamente per cromatografia e rivelati in conducibilità termica.

Determinazione analitica

Un'aliquota del materiale particolato viene pesata all'interno di una capsula di stagno dalle dimensioni di circa 3 x 5 mm, utilizzando una bilancia analitica di precisione (precisione di 1 μg). Le capsule, prima dell'uso, vanno lavate con acetone e quindi essiccate in stufa a 100 °C. Dopo la pesata, la capsula viene chiusa con una pinzetta e ridotta, con un apposito utensile, a forma di sfera di un diametro quanto più piccolo possibile. Le sfere sono mantenute in un apposito contenitore (capacità: 30 - 50 posizioni) fino al momento dell'analisi.

I campioni vengono introdotti singolarmente in un reattore verticale di quarzo mantenuto ad una temperatura costante di 1030 °C attraverso il quale fluisce elio. Nel momento dell'introduzione della capsula nel reattore, il flusso di elio viene arricchito con ossigeno puro che porta ad una combustione immediata del campione. I gas prodotti dalla combustione sono trasportati dal flusso di elio fino ad un catalizzatore (Cr_2O_3) che permette la formazione di CO_2 e H_2O e di N_2 , mentre una parte di azoto resta in forma di N_xO_y . Un secondo reattore mantenuto a 650 °C, contenente un ulteriore catalizzatore (Cu, composti di cobalto e argento), riduce gli ossidi di azoto ad azoto elementare.

I gas (CO_2 , H_2O , N_2) trasportati dal flusso di elio, vengono infine separati in una colonna cromatografica ed ogni componente fluisce in un rivelatore a conducibilità termica, che genera un segnale elettrico proporzionale alla sua concentrazione nel gas di trasporto. Il segnale viene amplificato, elaborato e visualizzato da un registratore potenziometrico.

Il materiale del portacampione (capsule) deve essere rimosso dopo circa 300 analisi. Le misure devono essere accompagnate da prove in bianco, che comportano l'analisi di una capsula vuota per verificare l'assenza di contaminazione esterna.

Calibrazione

La calibrazione viene effettuata analizzando sostanze organiche pure delle quali si conosce l'esatta composizione percentuale (C, H, N), quali l'isotiurea, l'acido picrico o similari.

Tipicamente si analizzano 6-8 campioni di peso variabile dello stesso standard, e da ogni misura si calcola il fattore di calibrazione secondo la seguente formula

$$K = \frac{A_{st} \cdot P_{st}}{S_{st}}$$

dove: A_{st} rappresenta percentuale dell'elemento (C, H, N) nello standard, P_{st} la massa di standard utilizzato (mg) e

S_{st} l'intensità del segnale. La serie di 6-8 valori di K così ottenuti, viene utilizzata per il calcolo del fattore medio di calibrazione \bar{K} che si applica ad ogni serie di misure.

Quantificazione

I segnali ottenuti di ogni singola analisi permettono di risalire al contenuto in carbonio (Q_C), idrogeno (Q_H) e azoto (Q_N) nel campione attraverso il calcolo delle percentuali presenti secondo la formula:

$$Q_E = \frac{\bar{K} \cdot S}{P}$$

dove Q_E rappresenta la concentrazione (espressa in %) dell'elemento in esame, S l'intensità del segnale fornito dal campione per ciascun elemento e P è il peso del campione (mg).

CALCOLO DEL FLUSSO DI SEDIMENTAZIONE

La caratterizzazione del flusso di materiale particolato

Φ_{PM} , espresso come massa di sostanza secca ($\text{mg}/\text{m}^2 \cdot \text{d}$), viene ricavata dai dati di centrifugazione di Tab. 2, se si opera con il metodo in continuo, o di Tab. 3 nel caso di procedura in discontinuo. Il flusso di particolato viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\Phi_{PM} = \frac{M_{PM}}{t_j \cdot S}$$

$$M_{PM} = M_{PC} \frac{V_i}{V_f}$$

dove M_{PM} indica il peso secco di particolato effettivamente sedimentato (mg), ricavato dalla massa di particolato centrifugato (M_{PC}), corretta per il rapporto tra il volume prelevato (V_i , in litri) e quello centrifugato (V_f) riportati in Tab. 1, e con t_j e S rispettivamente la durata (giorni, d) del periodo di esposizione (j) e la superficie utile di raccolta delle trappole di sedimentazione (m^2). Se i parametri vengono riportati nelle unità indicate, il flusso risultante è espresso in $\text{mg}/\text{m}^2 \cdot \text{d}$.

Il calcolo del flusso unitario di sedimentazione dell'azoto è effettuato tenendo conto del contributo derivante dall'azoto totale (TN_j) presente nelle acque pelagiche alla stessa profondità delle trappole di sedimentazione. Il TN_j va sottratto al valore grezzo della concentrazione di azoto totale (TN) ottenuto con l'analisi della sospensione di

seston. Il valore ricavato (C_{TN}) è l'effettivo azoto sedimentante con la componente particellata da utilizzare

per il calcolo del flusso Φ_N , secondo l'espressione:

$$\Phi_N = \frac{(C_{TN} - C_{TN_i}) \cdot V_i}{t_j \cdot S}$$

dove con C_{TN} si indica la concentrazione (mg/L) di azoto totale ottenuta dall'analisi del campione di seston, con

C_{TN_i} quella dell'azoto totale in fase sospesa, e con V_i il volume iniziale (L) del campione. Utilizzando le unità di misura indicate il flusso è espresso in $\text{mgN/m}^2 \text{ d}$.

Per il calcolo del flusso di fosforo Φ_P normalmente non è necessario sottrarre la componente sospesa, poiché generalmente assume valori trascurabili rispetto a quella ricavata dal seston, per cui in questo caso la formula diventa:

$$\Phi_P = \frac{C_{TP} \cdot V_i}{t_j \cdot S}$$

dove C_{TP} è espresso in mg/L e V_i , t_j e S come precedentemente indicato.

Nel caso di ambienti lacustri ad alta trofia, il calcolo del flusso deve essere effettuato analogamente al caso dell'azoto, sottraendo la componente sospesa (TP_i), da determinare con lo stesso metodo sul campione di acqua prelevato alla profondità delle trappole.

La procedura per il calcolo dei flussi di sedimentazione di carbonio, idrogeno e dell'azoto ricavato dall'analisi elementare del particolato secco, prevede la trasformazione dei dati originali nella massa del singolo elemento, poiché essi vengono generalmente espressi in percentuale rispetto al peso secco di particolato analizzato. Il calcolo viene effettuato come indicato nella formula seguente:

$$\Phi_{CHN} = \frac{\%_{(CHN)} \cdot \Phi_{PM}}{100} = \frac{\%_{(CHN)} \cdot M_{PM}}{100 \cdot t_j \cdot S}$$

dove $\%_{(CHN)}$ indica la percentuale della componente elementare, mentre M_{PM} , t_j , S assumono il significato precedentemente indicato.

Per il flusso della clorofilla e dei feopigmenti il calcolo viene effettuato secondo quanto indicato nella seguente espressione, analoga a quella utilizzata per il fosforo:

$$\Phi_{CHL} = \frac{C_{CHL} \cdot V_i}{t_j \cdot S}$$

dove C_{CHL} rappresenta la concentrazione nel campione di sospensione di seston analizzato (mg/m^3) e V_i il volume iniziale di campione.

Il calcolo della determinazione della sedimentazione dei metalli è infine ottenuto dal prodotto della concentrazione di metallo nel particolato (C_{Mep}), espresso in $\mu\text{g/g}$, per il flusso di materiale particolato (Φ_{PM}) raccolto con le trappole di sedimentazione

$$\Phi_{Me} = \frac{C_{Mep} \cdot \Phi_{PM}}{1000} = \frac{C_{Mep} \cdot M_{PM}}{1000 \cdot t_j \cdot S}$$

dove 1000 è un fattore di trasformazione dimensionale. Tutti i valori dei flussi di sedimentazione così ottenuti vengono espressi generalmente in $\mu\text{g/m}^2 \text{ d}$.

CALCOLO DEI FLUSSI DI MASSA DAL FLUSSO DI SEDIMENTAZIONE

Il calcolo della massa di una specie sedimentata dai flussi misurati nelle trappole non è il semplice prodotto tra un flusso ($\text{g/m}^2 \text{ d}$) ed una superficie (m^2), poiché per entrambe le grandezze esistono incertezze non marginali nella valutazione dei loro valori. Il flusso misurato è infatti legato alla distanza dal fondo, per effetto della risospensione, che può portare ad incrementi del flusso di sedimentazione fino ad un fattore di 1,5-3 volte più alto rispetto a quello misurato nelle trappole più superficiali (Davison et al., 1982; Camusso et al., 1989). Le trappole troppo superficiali, collocate nella zona eufotica, tendono invece a sottostimare il flusso del bioseston, sia per una non adeguata raccolta rispetto alla fascia di produttività, che per i fenomeni di grazing all'interno delle trappole stesse. La migliore profondità utile per calcolare i flussi di massa risulta quindi condizionata dalla rappresentatività verticale del flusso, che in laghi profondi (>50 m) può essere individuata approssimativamente con il limite dell'1% della intensità di luce trasmessa, variabile in ciascun ambiente a seconda dello stato trofico. Anche la morfologia della linea di costa di un ambiente limnico costituisce un rilevante fattore di disturbo sulla rappresentatività del flusso di sedimentazione, risolvibile solo predisponendo più punti di prelievo per tener conto di zone a diversa sedimentazione nella cuvetta lacustre.

Il calcolo del flusso di massa in un lago si può quindi effettuare utilizzando metodi semplici, quale quello che tiene conto del flusso misurato al di sotto della zona eufotica e della superficie alla quota media del lago (Tartari et al., 1993 b, c), oppure in modi più complessi, che tengono conto delle superfici isobatimetriche di collocazione delle trappole (Camusso et al., 1989), sottraendo, ad esempio, il contributo derivante dal rilascio dai sedimenti (Davison et al., 1982).

Nel complesso il calcolo dei flussi di massa è un problema aperto che va affrontato in modo mirato in ogni singola situazione, conoscendo approfonditamente la morfometria della cuvetta lacustre ed in particolare le curve ipsografiche di ciascuna zona del lago, nel caso di ambienti con un elevato indice di sinuosità. In tutti i casi, però, la misura della sedimentazione lorda, pur con le incertezze associate costituisce uno strumento di rilevante importanza nella definizione dei bilanci di input-output, in particolare per definire la massa di un elemento

confinata nei sedimenti, al netto del rilascio dello stesso, quando conosciuto.

CONTROLLI DI QUALITÀ ANALITICA

Riproducibilità delle misure di sedimentazione

Per valutare la riproducibilità delle misure di sedimentazione possono essere analizzati separatamente campioni provenienti dai singoli cilindri costituenti le coppie di trappole. Prove condotte per l'azoto ed il fosforo totali, mostrano valori che si mantengono entro i limiti indicati in bibliografia (Bloesch and Burns, 1980), ed in particolare l'azoto si mantiene sempre su valori medi inferiori al 10 %, mentre il fosforo supera questo limite solo nei campioni raccolti alle profondità più prossime ai sedimenti, dove aumenta la probabilità di fenomeni di disturbo, da imputarsi a risospensione di materiale proveniente dal fondo o all'azione di correnti profonde. Analoghe prove effettuate analizzando il fosforo reattivo (P-PO₄) mostrano che solo la zona superiore di ogni cilindro risente leggermente dell'effetto turbativo dell'ambiente esterno durante la fase di recupero. La procedura di omogeneizzazione del materiale proveniente dai due cilindri su cui effettuare le successive analisi è perciò da considerarsi accettabile.

Efficienza della ossidazione nella misura di TP e TN sul particellato fresco

Le condizioni analitiche in grado di fornire una elevata efficienza del processo di ossidazione del materiale particellato, sono state definite mettendo a confronto i risultati ottenuti su campioni analizzati con differenti gradi di diluizione e di aggiunte di ossidante (K₂S₂O₈), sia in soluzione che in forma solida. Le prove hanno indicato che in laghi mediamente profondi e per trappole poste in prossimità della zona eufotica, è sufficiente una diluizione limitata (da 1:2 a 1:4), mentre al di sotto di questa profondità, la maggior quantità di materiale raccolto dalle trappole richiede una diluizione maggiore (da 1:5 a 1:10). Con un errore di diluizione che è quantificabile in circa il 10%.

Il confronto tra diverse aggiunte di miscela ossidante fino ad un fattore 3 rispetto al valore nominale (APPENDICE 1), ha evidenziato che l'aumento del volume dell'aggiunta non fa altro che incrementare l'errore analitico senza apportare nessun beneficio nell'accuratezza. Al contrario l'aggiunta, direttamente nel subcampione, di ossidante in forma solida (0,3 g di K₂S₂O₈), provoca un incremento sensibile nell'efficienza di recupero rispetto a quella ottenuta aggiungendo al campione la sola miscela ossidante.

Perdita di nutrienti per centrifugazione

Analizzando il contenuto di fosforo e azoto totale sia nella sospensione che nell'acqua centrifugata operando in continuo a 10000 giri è evidente una sensibile perdita di fosforo e azoto, con una sottostima fino a circa il 20-30%, da ascrivere alla disgregazione delle cellule sottoposte al processo di centrifugazione. Assieme a questo fenomeno anche la intrinseca disomogeneità del materiale solido e

la perdita per evaporazione durante il processo di essiccamento contribuiscono a rendere i dati ottenuti analizzando la matrice solida meno affidabili di quelli ottenuti dall'analisi del materiale fresco; ne consegue che l'analisi della componente elementare deve essere circoscritta alle sole componenti principali, che risentono meno delle perdite data la loro elevata concentrazione, mentre meno attendibile risulta il valore dell'azoto. Per simili quantificazioni risulta quindi più adatto il particellato separato per centrifugazione discontinua, oppure per filtrazione e successivo recupero del residuo dalla superficie di filtrazione.

Controllo di qualità analitica nell'analisi dei metalli

Il controllo della qualità nell'analisi dei metalli viene solitamente effettuato mediante l'utilizzo di campioni certificati. Per le prove di qualità analitica possono essere utilizzati campioni certificati del BCR (Bureau Communautaire de Reference, Bruxelles). In particolare è disponibile il CRM (Certified Reference Material) "BCR 414 - Freshwater plankton", nel quale alcuni elementi sono stati certificati (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, V e Zn) mentre altri sono forniti a titolo indicativo (Co, Mo, K, Fe, Sc e Sr) ed a titolo di conoscenza (Al, Ba, Br, C, Ca, Cs, H, La, Mg, N, Na, P, Rb, S, Sb, Sn, Ti e Tl) (Quevauviller *et al.*, 1993a, 1993b).

Prima dell'analisi del campione certificato è necessario procedere alla sua omogeneizzazione, introducendo una pallina di teflon accuratamente lavata nel contenitore del materiale di riferimento. Il prelievo della aliquota viene effettuato sul CRM tal quale, agitando il campione prima di ogni pesata, consistente in aliquote comprese tra 20 e 60 mg, utilizzando le navicelle monouso indicate sopra, precedentemente trattate in HNO₃ 1:5 per almeno un'ora. La digestione del subcampione avviene nello stesso modo dei campioni, con l'eccezione che l'acido va aggiunto direttamente nella navicella utilizzata nella pesata invece che nelle provette, analogamente a quanto previsto per i campioni di rilevante quantità.

Per la correzione dell'umidità esistente nel CRM, è prescritto nel certificato che l'umidità deve essere dosata su un'aliquota indipendente, cioè non utilizzata per altre analisi, essiccandola a 105 °C fino a costanza di peso. La concentrazione dei metalli determinata va quindi corretta per il fattore ricavato calcolando la quantità di umidità dalla differenza di peso prima e dopo l'essiccazione.

Per un miglior controllo analitico si consiglia infine di tenere uno schema dell'utilizzo dei crogioli nella piastra in un'apposita tabella, per poter verificare eventuali inquinamenti dei campioni collegabili a determinate posizioni.

Controllo di qualità delle misure di CHN

Ogni 10 campioni inserire un'aliquota dello standard per verificare la stabilità del fattore di calibrazione (K), ed un bianco per verificare il livello di contaminazione.

Poiché la composizione dei campioni di particellato è molto diversa se confrontata con la sostanza pura dello standard, è necessario effettuare delle misure utilizzando un materiale di riferimento. Anche in questo caso è consigliabile l'analisi del materiale certificato dal BCR "CRM 414 - Freshwater plankton" (Quevauviller *et al.*,

1993a, 1993b), possibilmente all'inizio ed alla fine di ciascuna serie di analisi.

Altre possibili cause di errore

La procedura qui riportata per il trattamento del seston raccolto con le trappole di sedimentazione presenta ulteriori possibili cause di errore, tra i quali quello della misurazione dei volumi è sicuramente rilevante. Tutte le operazioni indicate prevedono infatti la registrazione dei dati finali in apposite tabelle ma, durante la fase operativa, possono verificarsi errori di trascrizione dei dati, specialmente nella operazione di misura del volume iniziale. Molto più grave è invece il verificarsi dell'eventualità di effettuare un errore di volume durante il subcampionamento per il prelievo delle aliquote per la determinazione di TN, TP e CHL.

Un'altra tipica sorgente di errore, che comporta una sottostima dei flussi di sedimentazione è quella dovuta al non completo recupero di tutto il particellato durante le fasi di travaso da un recipiente ad un'altro. Esistono almeno tre fasi critiche in tutte le operazioni di manipolazione: il trasferimento del seston dai cilindri delle trappole ai recipienti di stoccaggio, la misura del volume totale iniziale mediante cilindro e la fase di separazione (per centrifugazione o per filtrazione). In tutti questi casi, inevitabilmente, si perdono piccole aliquote di campione a causa della adesione della sospensione alle superfici interne dei recipienti, cosa che può essere aggravata da operazioni maldestre e/o poco attente.

Nel caso della centrifugazione in continuo un'ulteriore causa di perdita di campione è dovuta alla deposizione di particellato in alcuni punti critici del sistema di distribuzione, oltre che lungo i tubi di adduzione del campione alla centrifuga. In questo caso occorre effettuare, con la massima cura, un lavaggio di tutto il sistema utilizzando parte dell'acqua centrifugata. Con la separazione mediante centrifugazione in discontinuo, invece, l'operazione più critica è dovuta all'aderenza del particellato alla superficie del recipiente di centrifugazione, come già indicato in precedenza, ma altre possibili perdite si possono avere nel filetto del tappo di chiusura, oppure per un'eccessivo riempimento degli stessi recipienti, che venendo posizionati con una certa inclinazione nel rotore possono presentare fuoriuscite di campione durante l'operazione.

Anche l'operazione di essiccamento può comportare errori di sovrastima o sottostima. Il primo caso si presenta quando l'essiccamento a 60°C è incompleto oppure il campione non viene pesato immediatamente dopo averlo raffreddato a temperatura ambiente in essiccatore. Un lasso di tempo troppo prolungato tra campionamento ed analisi può infatti provocare modifiche del peso secco per l'introduzione accidentale di altre polveri, assorbimento di umidità, ecc. Il secondo caso può invece verificarsi per prolungati tempi di essiccamento o per temperature più elevate di quella stabilita (60 °C). La scelta di effettuare un essiccamento a 60 °C richiede un rigoroso rispetto, poichè a temperature più elevate possono verificarsi modificazioni anche sensibili nella massa del particellato, che porta ad un non trascurabile errore di sottostima. La temperatura adottata risponde alla necessità di ottenere un residuo il meno alterato possibile, anche nell'acqua di cristallizzazione. Operare a 105 °C, come usualmente indicato, comporta la perdita per evaporazione di alcune

specie labili (composti organici, sali di ammonio, metalli volatili) e non garantisce la completa stabilità del particellato, che se essiccato erroneamente a temperature più elevate comporta comunque una perdita di massa.

Un'ulteriore causa di errore è frequentemente associata alle operazioni di omogeneizzazione, sia del campione fresco che del particellato secco, mediante mortaio d'agata. Altre sorgenti di errore possono essere: la perdita accidentale di particelle nei travasi, i residui che restano aderenti al mortaio, l'alterazione da contenuto in metalli, ecc., evitabili solo adottando una attenta procedura, i cui dettagli esulano dal presente contesto, ma che devono essere compresi nelle buone pratiche di laboratorio degli operatori.

CONCLUSIONI

La procedura di analisi presentata in questo protocollo operativo è volta ad ottenere una serie collettiva di informazioni sulla composizione del seston lacustre. Le fonti analitiche basate su una procedura multipla consentono di controllare in modo omogeneo la manipolazione del campione, con il vantaggio di poter conoscere e controllare attentamente le diverse sorgenti di errore, che in una procedura separata per ciascuna determinazione sarebbe più complesso valutare.

La validità di questo procedimento è stata verificata nel corso di un lungo periodo di raccolte in campo su due ambienti molto diversi tra di loro: il lago di Pusiano, 24 m di profondità, ed il lago d'Orta, 143 m. Ciò non toglie che quanto indicato sia da considerare comunque un suggerimento operativo, da adottare caso per caso secondo gli obiettivi e la struttura del sistema analitico a disposizione.

Nel complesso però questo protocollo è stato pensato per un'ampia gamma di unità operative, poichè tutte le operazioni indicate sono di relativamente semplice applicazione, oltre che di limitato costo complessivo. La procedura operativa qui suggerita presenta inoltre un certo grado di versatilità rispetto ai parametri analizzabili. Ad esempio con l'uso di cilindri delle trappole in materiale metallico, il seston raccolto può essere destinato all'analisi di microinquinanti organici, sostituendo semplicemente con vetro o Teflon i recipienti di plastica di conservazione e separazione del particellato, lasciando comunque inalterata la linea di misura di TN, TP, CHN e feopigmenti, ovviamente sopprimendo la linea metalli.

Queste considerazioni portano a concludere che la procedura qui indicata può costituire quindi un punto di partenza per affrontare la misura della sedimentazione di una vasta gamma di specie chimiche, di cui oggi non si conoscono ancora bene i meccanismi di segregazione nei sedimenti lacustri.

BIBLIOGRAFIA

- Baudo R. e Berton R. (1984): "Analisi del materiale particolato: significato e limiti", *Acqua e Aria*, **6**, 579-589.
- Bloesch J. and Burns N. M. (1980): "A critical review of sedimentation trap technique", *Schweiz. Z. Hydrol.*, **42**, 15-55.
- Camusso M., Tartari G. and Cappelletti E. (1989): "Seasonal trends of copper sedimentation in lake Orta (Italy)", *Sci. Total. Environ.*, **87/88**, 59-75.
- Comba M. E. and Kaiser K. L. E. (1990): "Suspended particulate concentrations in the St. Lawrence River (1985-1987) determined by centrifugation and filtration", *Sci. Total. Environ.*, **97/98**, 191-206.
- Danielsson L. G. (1982): "On the use of filters for distinguishing between dissolved and particulate fractions in natural waters", *Water Res.*, **16**, 179-182.
- Davison W., Woof C. and Rigg E. (1982): "The dynamics of iron and manganese in a seasonally anoxic lake; direct measurement of fluxes using sediment traps", *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 987-1003.
- De Mora S. J. and Harrison R. M. (1983): "The use of physical separation techniques in trace metal speciation studies", *Water Res.*, **17**, 7, 723-733.
- IRSA (1990): "Clorofilla: metodo spettrofotometrico", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **59**, Scheda 570.1, 1-6 pp.
- IRSA (1994): "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **100**.
- Jeffrey S. W. and Humphrey G. F. (1975): "New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁, and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton", *Biochem. Physiol. Plant. Pflanzen.*, **164**, 343-346.
- Krumgalz B. S. and Fainshtein G. (1989): "Trace metal contents in certified reference sediments determined by nitric acid digestion and atomic absorption spectrometry", *Analitica Chimica Acta*, **218**, 335-340.
- Lorenzen C. J. (1967): "Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations", *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 343-346.
- Quevauviller Ph., Vercoutere K., Muntau H. and Griepink B. (1993a): "The certification of the contents (Mass Fractions) of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, V and Zn in plankton", CRM 414. *European Res. Rpt. EUR 14558 EN*, 71 pp.
- Quevauviller Ph., Vercoutere K., Muntau H. and Griepink B. (1993b): "Certified reference material (CRM 414) for the quality control of trace element analysis in plankton", *Fresenius Zeitschrift Analytische Chemie*, **345**, 12-16.
- Redfield A. C. (1934): "On the proportion of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton". In: *James Johnston Memorial Volume*, Liverpool University Press, 176-192.
- Smart M. M., Rada R. E. and Donnermayer G. N. (1983): "Determination of total nitrogen in sediments and plants using persulfate digestion. An evaluation and comparison with Kjeldahl procedure", *Water Res.*, **17**, 9, 1207-1211.
- Tartari G., Previtali L. and Biasci G. (1993a): "Metodi di campionamento del particolato per la misura dei flussi di sedimentazione in ambienti lacustri", *Notiziario Metodi Analitici per le Acque*, **13**, (2-3), 13-29.
- Tartari G., Biasci G., Renoldi M., Previtali L. and Camusso M. (1993b): "Pluriannual nutrient sedimentation in a limed Italian lake (Lake Orta, N. Italy)", *Verh. Intern. Verein. Limnol.*, **25**, 762-765.
- Tartari G., Binelli A., Biasci G., Renold M., Panizzuti M. and Lacqua P. (1993c): "Theoretical evaluation of the pluriannual (1986-1992) nutrient load evolution in lake Orta (N. Italy)", Proc. 5th Int. Conf. "Conservation and management of lakes: strategies for lake ecosystems beyond 2000". Stresa, Italy, 17-21 May, 573-577.
- Tartari G., Biasci G., Renoldi M., Previtali L. and Camusso M. (in prep.): "Flussi di sedimentazione in ambienti lacustri italiani: il caso dei laghi d'Orta e di Pusiano", *Acqua e Aria*.
- Valderrama J. C. (1981): "The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters", *Marine Chem.*, **10**, 109-122.

APPENDICE 1

DETERMINAZIONE DI AZOTO E FOSFORO TOTALE IN ASSORBIMENTO MOLECOLARE

Linearità

Azoto: 0,1 - 7,0 mgN/L
Fosforo: 10 - 1000 µgP/L

Reagenti

Miscela ossidante: sciogliere nell'ordine: 50 g di potassio persolfato ($K_2S_2O_8$) allo 0,001 % massimo di azoto, 30 g di acido borico cristallino e 14 g di sodio idrossido in gocce, in 1000 mL di acqua deionizzata.

Reagenti per il fosforo

Soluzione riducente: sciogliere 17,5 g di acido ascorbico $C_6H_8O_6$ e 0,075 g di acido etilendiammino tetracetico sale disodico ($EDTANa_2$) in circa 200 mL di acqua deionizzata. Aggiungere 1,5 mL di acido formico ($HCOOH$) e portare a 250 mL con acqua.

Miscela dei reagenti: a) antimonio potassio tartrato: sciogliere 0,1675 g di $KOOC(CHOH)_2COOSbO \cdot \frac{1}{2}H_2O$ in circa 25 mL di acqua deionizzata. b) ammonio

eptamolibdato: sciogliere 4,05 g di $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in circa 50 mL di acqua deionizzata. c) acido solforico: diluire 50,1 mL di acido solforico concentrato ($d=1,84 \text{ g/cm}^3$) fino a 150 mL con acqua deionizzata.

Dopo aver sciolto separatamente, miscelare le tre soluzioni e portare a 250 mL con acqua deionizzata.

Reagenti per l'azoto

Acido solforico (al 98 %) esente da azoto.

Durata delle soluzioni

Miscela ossidante: la soluzione è stabile per circa due mesi, se conservata al buio e a temperatura ambiente.

Miscela di reagenti e soluzione riducente: queste soluzioni sono stabili un mese se conservate in frigorifero a 4 °C ed al buio.

Digestione

A 50 mL di campione si aggiungono 7 mL di miscela ossidante e 0,3 g di $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. I campioni si pongono quindi in autoclave a 120°C per 30 minuti. Al termine della digestione i campioni vanno lasciati raffreddare all'aria e successivamente filtrati con membrane di nitrato di cellulosa, esenti da fosforo, di 0,45 µm di porosità, trasferendo tutta l'aliquota digerita in una beuta da 100 mL.

Determinazione analitica

Azoto totale

Dal campione digerito e filtrato si prelevano 10 mL, utilizzando una pipetta automatica con puntali monouso, e si trasferisce l'aliquota in una beuta da 25 mL curando di sostituire il puntale dopo ogni campione. L'aliquota prelevata, acidificata con 0,15 mL di H_2SO_4 , viene utilizzata d'onda di 220 nm, utilizzando cuvette di quarzo con percorso ottico di 10 mm. L'azzeramento si esegue con 20 mL di acqua deionizzata acidificata con 0,3 mL di acido solforico esente da azoto.

Fosforo totale

Ai rimanenti 47 mL di campione si aggiungono nell'ordine: 1,25 mL di soluzione riducente e dopo circa 2 minuti, 1,25 mL di miscela di reagenti. La lettura spettrofotometrica si esegue dopo 5 minuti alla lunghezza d'onda di 882 nm, utilizzando cuvette in vetro di percorso ottico di 40 mm, e azzerando con acqua deionizzata.

Osservazione

La procedura qui riportata fa riferimento ai percorsi ottici utilizzati nelle campagne CNR - IRSA. In entrambi i casi possono comunque essere adottati anche percorsi ottici minori (ad esempio 5 mm per il TN e 10 o 20 mm per il TP), a seconda delle esigenze operative.

APPENDICE 2

PROGRAMMA PER IL CALCOLO DELLE CONCENTRAZIONI DI CLOROFILLA E FEOFITINA

(Metodi di Lorenzen e Jeffrey and Humphrey)

```
REM Programma CHLFEO redatto in QUICKBAS 4.5
REM Programma per il calcolo della clorofilla e della feofitina
REM Calcolo effettuato secondo i metodi di Lorenzen (1967) e Jeffrey and
REM Humphrey (1975)
REM Per le equazioni consultare Zoppini, Camusso e Tartari (1990). Quad. Ist.
REM Ric. Acque, 59. Scheda 570.1
REM
PRINT "CALCOLO DELLA CLOROFILLA E DELLA FEOFITINA": PRINT
LPRINT "CALCOLO DELLA CLOROFILLA E DELLA FEOFITINA"
LPRINT
INPUT "DATA DI ANALISI (gg,mm,aaaa)": G, M, A
LPRINT "Data di esecuzione delle analisi: "; G; "/" ; M; "/" ; A
DO
DIM W$(50)
CLS
```

```

PRINT
INPUT "LAGO"; W$
PRINT
INPUT "DATA DI CAMPIONAMENTO (gg,mm,aaaa)"; GG, MM, AA
PRINT
LPRINT
LPRINT "LAGO di "; W$
LPRINT
LPRINT "Campionamento del "; GG; "/"; MM; "/"; AA
LPRINT : PRINT
INPUT "PROFONDITA' (m)"; WOS$
LPRINT
LPRINT "Profondita' (m) = "; WOS$
LPRINT : LPRINT : PRINT
PRINT "Inserisci il volume di ACQUA FILTRATA filtrata (l),"
INPUT F
PRINT "Inserisci i ml di ACETONE utilizzati per l'estrazione"
INPUT E
LPRINT "Volume di acqua filtrata (l)=", F, "Volume di acetone (ml) =", E
LPRINT : LPRINT : PRINT
LPRINT "CALCOLO DELLA CLOROFILLA a E DELLA FEOFITINA SECONDO LORENZEN"
LPRINT
PRINT "INTRODUZIONE DEI DATI"
PRINT "Nota: inserire le assorbanze in milliunità (mAU)"
PRINT
INPUT "Campione NON ACIDIFICATO, assorbanza (mAU) a 663 nm (NA-663) :"; A
INPUT "          assorbanza (mAU) a 750 nm (NA-750) :"; b
INPUT "Campione ACIDIFICATO, assorbanza (mAU) a 663 nm (A-663) :"; c
INPUT "          assorbanza (mAU) a 750 nm (A-750) :"; D
LPRINT "NA-663 ="; : LPRINT USING " ###.###"; A; LPRINT " NA-750 ="; : LPRINT USING " ###.###"; b
LPRINT " A-663 ="; : LPRINT USING " ###.###"; c; LPRINT " A-750 ="; : LPRINT USING " ###.###"; D
Z = (A - b) / 4
Y = (c - D) / 4
LPRINT : LPRINT
W = E / F
G = (Z - Y) * W * 27.3
H = (Z - 2.43 * (Z - Y)) * W * 17.857
LPRINT
LPRINT "Clorofilla a (mg/m3) ="; : LPRINT USING " ###.###"; G / 1000
LPRINT "Feofitina (mg/m3) ="; : LPRINT USING " ###.###"; H / 1000
LPRINT : LPRINT
LPRINT "CLOROFILLE a, b, c SECONDO JEFFREY E HUMPHREY"
LPRINT
INPUT "Campione NON ACIDIFICATO, assorbanza (mAU) a 645 nm (NA-645) :"; I
INPUT "          assorbanza (mAU) a 630 nm (NA-630) :"; L
LPRINT "NA-645 ="; : LPRINT USING " ###.###"; I; LPRINT " NA-630 ="; : LPRINT USING " ###.###"; L
X = (I - b) / 4
U = (L - b) / 4
V = (11.64 * Z - 2.16 * X + .1 * U) * W
T = (20.97 * X - 3.94 * Z - 3.66 * U) * W
S = (54.22 * U - 5.53 * Z - 14.81 * X) * W
LPRINT
LPRINT "Clorofilla a (mg/m3) ="; : LPRINT USING " ###.###"; V / 1000
LPRINT "Clorofilla b (mg/m3) ="; : LPRINT USING " ###.###"; T / 1000
LPRINT "Clorofilla c (mg/m3) ="; : LPRINT USING " ###.###"; S / 1000
LPRINT
LPRINT "*****"
LPRINT : LPRINT : PRINT
PRINT "Hai finito? <SI=1 NO=0>"
INPUT J
LOOP UNTIL J = 1
REM Ver. Giugno 1994,
END

```

DETERMINAZIONE DEL COBALTO

(metodo spettrofotometrico ad assorbimento atomico)

1 - Principio del metodo

Il cobalto contenuto nel campione di acqua viene determinato per iniezione diretta nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico e l'assorbanza misurata a 240,7 nm.

2 - Campo di applicazione

Il metodo può essere impiegato per misurare concentrazioni di cobalto nell'intervallo 0,5-20 µg/L. Per concentrazioni superiori a 20 µg/L è opportuno effettuare una diluizione del campione.

3 - Interferenze e causa di errore

Non sono stati riscontrati significativi fenomeni di interferenza da parte delle principali specie chimiche presenti nell'acqua.

4 - Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione dovranno essere effettuati in accordo con quanto previsto nel manuale "Metodi analitici per le acque" (IRSA, 1995). Una stima del cobalto totale è ottenibile addizionando 5 mL di HNO₃ conc. (6.1) per litro di campione e filtrando successivamente il campione su membrana da 0,45 µm. Se si vuole determinare soltanto il cobalto disciolto, il campione viene filtrato subito dopo il prelievo, il più presto possibile attraverso un filtro a membrana da 0,45 µm senza preventiva acidificazione e addizionato di 5 mL di HNO₃ conc. (6.1). Per la determinazione quantitativa del cobalto totale è necessario invece sottoporre il campione ad un procedimento di digestione. Si consiglia di conservare i campioni in contenitori di polietilene.

5 - Apparecchiature

- 5.1 - Normale attrezzatura da laboratorio per il prelievo di piccoli volumi nella preparazione degli standard e per l'iniezione nel tubicino di grafite pirolitica. L'utilizzo di un tubicino non pirolitico comporta una diminuzione di sensibilità. È necessario servirsi di micropipette automatiche, qualora non si disponga di opportuno autocampionatore.
- 5.2 - Spettrofotometro ad assorbimento atomico munito di correttore di fondo e lampada per il cobalto.
- 5.3 - Fornetto di grafite con velocità di riscaldamento programmabile.
- 5.4 - Registratore per evidenziare la forma del picco o altro sistema equipollente

6 - Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua distillata e/o deionizzata.

- 6.1 - Acido nitrico concentrato di grado ultrapuro (HNO₃, d=1,40).
- 6.2 - Soluzione standard di cobalto (1000 mg/L).
Utilizzare lo standard disponibile in commercio sotto la voce standard per assorbimento atomico, oppure prepararlo pesando esattamente 1,000 grammi di cobalto, sciogliendolo in 50 mL di acido nitrico conc. di grado ultrapuro (6.1) e portandolo a volume in un matraccio tarato da 1000 mL. La soluzione, conservata in bottiglia di polietilene, è stabile per almeno 6 mesi.
- 6.3 - Soluzione standard diluita di cobalto (1 mg/L).
100 µL di soluzione concentrata (6.2) si diluiscono a 100 mL con acqua contenente 0,1 mL di acido nitrico conc. (6.1). Questa soluzione deve essere preparata giornalmente.

7 - Procedimento

Trasferire il campione, comunque acidificato con 5 mL/L di acido nitrico concentrato (6.1) in quattro matracci da 10 mL, che vengono successivamente portati a volume. Aggiungere quindi a ciascun matraccio 0; 50; 100; 200; µL di soluzione diluita (6.3), ottenendo 4 soluzioni con arricchimenti di cobalto pari a 0-5-10-20 µg/L. Tale procedimento si riferisce all'impiego di tubicino di grafite pirolitica.

Si misura l'assorbanza delle quattro soluzioni con uno spettrofotometro ad assorbimento atomico a 240,7 nm con correttore di fondo inserito, introducendo aliquote da 20 µL di campione nel fornetto equipaggiato con tubo di grafite pirolitica, usando argon UPP come gas di trasporto.

Si consiglia il seguente ciclo elettrotermico:

	R.T.	H.T.	T °C	G.	R.
Essiccamento	20	10	140	300	
Incenerimento	20	20	1000	300	
Atomizzazione	0	6	2200	0	*
Pulizia	1	5	2600	300	
Raffreddamento	1	5	20	300	

R.T. = tempo in secondi di salita della temperatura

H.T. = tempo in secondi di permanenza a temperatura costante

T °C = temperatura

G = flusso del gas in mL/min

R = lettura attivata

8 - Calcoli

La concentrazione di cobalto nel campione analizzato può essere calcolata graficamente o analiticamente.

8.1 - Procedimento grafico

Si costruisce, su carta millimetrata, la retta standard con le concentrazioni aggiunte ($\mu\text{g/L}$) sull'asse delle ascisse e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, sull'asse delle ordinate.

L'assorbanza del campione, a concentrazione incognita, viene posta sull'asse delle ordinate a concentrazione aggiunta di analita uguale a zero.

La concentrazione incognita di cobalto si ricava dall'intercetta della retta sperimentale con l'asse delle x, misurando con la stessa scala di concentrazione il segmento compreso tra il punto di intersezione suddetto e il punto di incontro degli assi x e y.

8.2 - Procedimento analitico

Siano C_0, C_1, C_2, C_3 rispettivamente le concentrazioni del campione incognito senza aggiunta (C_0) e quelle del campione con la 1^a, 2^a, 3^a aggiunta. A_0, A_1, A_2, A_3 saranno le corrispondenti assorbanze. Il calcolo della concentrazione incognita del campione (C_0) potrà effettuarsi con la seguente relazione:

$$C_0 = A_0 / f$$

in cui A_0 è l'assorbanza del campione senza aggiunte e f è il valore medio dei rapporti tra gli incrementi di assorbanza e i corrispondenti incrementi di concentrazione. Ad esempio nel caso in esame f potrà essere definito da:

$$f = \frac{\left(\frac{A_1 - A_0}{C_1 - C_0}\right) + \left(\frac{A_2 - A_1}{C_2 - C_1}\right) + \left(\frac{A_3 - A_2}{C_3 - C_2}\right) + \left(\frac{A_3 - A_0}{C_3 - C_0}\right) + \left(\frac{A_2 - A_0}{C_2 - C_0}\right) + \left(\frac{A_3 - A_1}{C_3 - C_1}\right)}{6}$$

9 - Precisione

Su campioni di acqua contenenti $5 \mu\text{g/L}$ di cobalto si è ottenuta una deviazione standard relativa di 2,3% mentre

a concentrazioni dell'ordine di $50 \mu\text{g/L}$ la precisione è risultata pari a 0,2%.

Effettuando 10 determinazioni su campioni con contenuto di cobalto di circa $2 \mu\text{g/L}$ si è potuto calcolare una concentrazione minima determinabile, espressa come 3 volte la deviazione standard, di $0,3 \mu\text{g/L}$. Con un sistema di preconcentrazione dell'analita in "situ" costituito da una triplice iniezione di $20 \mu\text{g/L}$ di campione nel tubicino di grafite, si è ottenuto un limite di rivelabilità pari a $0,15 \mu\text{g/L}$ con una deviazione standard relativa di 2,48% a $2 \mu\text{g/L}$ di Co e di 0,52% a $5 \mu\text{g/L}$ di Co.

10 - Bibliografia

APHA-AWWA-WPCF (1989): "Standard Methods for the examination of water and wastewater. 3113 Metals by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry", 3-43.

EPRI (Electric Power Research Institute) (1988): "Round Robin Study of Methods for Trace Metal Analysis. Volume 1-2 Atomic Absorption Spectroscopy". Palo Alto, California CS-5910 Project 1851-1 Final Report August.

IRSA (1995): "Metodi analitici per le Acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, 100, 44-53.

LETOURNEAUS V.A., JOSHI B.M., BUTHLER L.C. (1987): "Comparison between Zeeman and continuum background correction for graphite furnace AAS on environmental samples", *At Spectrosc.*, 8, 5: 145-149.

PERKIN-ELMER (1984): "Analytical Methods for Furnace Atomic Absorption Spectrometry", Publication B332 Uberlingen, FRG.

SLAVIN W. (1984): "Graphite Furnace AAS Source Book", the Perkin-Elmer Corporation Norwalk, 97-99.

WES T.S. (1988): "The Determination of Trace Metals in Natural Waters", The late H.W. Numberg; IUPAC; Blackwell Scientific Publication, London.

Supplemento a Quaderni, 100 (Aut. Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)
Pubblazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche
Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque, Via Reno, 1 - 00198 Roma - Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861
Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta
Segreteria di redazione: C. M. Blundo
Elaborazione grafica su computer: P. Fusco

NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Istituto di ricerca sulle acque - CNR