

Metodi X

**METODI APPLICABILI
AI CONCIMI ORGANICI,
ORGANO-MINERALI,
AMMENDANTI E CORRETTIVI**

Metodo X.1

Determinazione del carbonio organico secondo Springer-Klee

1. Oggetto e campo di applicazione

Descrizione di un metodo volumetrico per la determinazione del carbonio organico di origine biologica. Il metodo è applicabile agli ammendanti organici, ai concimi organici e organo-minerali con l'esclusione di quelli contenenti prodotti a lenta cessione di azoto come: urea-formaldeide, crotonilidendiurea, isobutildendiurea, ecc. La presenza di formurea può venire accertata, previa idrolisi ed identificazione della aldeide formica con acido cromotropico.

2. Principio

Ossidazione della sostanza organica per trattamento a condizioni definite di acidità e di temperatura (160°C) con quantità note di dicromato di potassio.

La quantità di dicromato di potassio consumata nella reazione può essere determinata titolando direttamente il dicromato rimasto con una soluzione di solfato ferroso, oppure mediante titolazione di ritorno di un eccesso misurato di solfato ferroso con dicromato di potassio.

La titolazione in entrambi i casi può essere eseguita con un titolatore automatico oppure manualmente. Per la titolazione manuale si usa come indicatore il 4-difenilammina solfonato di bario o di sodio.

3. Interferenze

Tra le numerose interferenze possibili interessano solo quelle da urea e da cloruri, che vengono determinati con i metodi ufficiali.

L'interferenza da urea è eliminata con nitrito di sodio; quella dovuta ai cloruri, se inferiore allo 0,2%, con solfato d'argento, se superiore, come nel caso di concimi organo-minerali contenenti cloruro di potassio, i risultati, ottenuti con il metodo normale, sono corretti in funzione della percentuale di ioni cloruro.

4. Reagenti

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o di purezza equivalente e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

- 4.1. Acido solforico 96% (m/m), ($\rho = 1,84$).
- 4.2. Nitrito di sodio.
- 4.3. Solfato d'argento.
- 4.4. Dicromato di potassio $K_2Cr_2O_7$, soluzione 2N: in un matraccio tarato da 1.000 ml trasferire 98,08 g di $K_2Cr_2O_7$ polverizzato ed essiccato per 1 ora a 130-140°C; sciogliere, portare a volume con H_2O ed omogeneizzare.
- 4.5. Acidi fosforico e solforico, miscela: in un matraccio tarato da 1.000 ml trasferire circa 500 ml di H_2O ed aggiungere 150 ml di H_3PO_4 , 85% (m/m), ($\rho = 1,71$) e lentamente, sotto agitazione, 150 ml di H_2SO_4 (4.1.). Raffreddare, portare a volume con H_2O e omogeneizzare.
- 4.6. Solfato ferroso $FeSO_4$, soluzione 0,2N: in un matraccio tarato da 1.000 ml trasferire 55,6 g di $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e aggiungere 100 ml di H_2O . Agitare fino a dissoluzione completa. Aggiungere 20 ml di H_2SO_4 (4.1.), raffreddare, portare a volume con H_2O ed omogeneizzare. La soluzione deve essere preparata giornalmente.

Titolare la soluzione trasferendone 25 ml esatti in una beuta da 200 ml. Aggiungere 2 ml di miscela fosfo-solforica (4.5.) e titolare con la soluzione di dicromato 0,2N (4.8.). Verso il termine (dopo circa 20 ml) aggiungere 8 gocce di indicatore (4.7.) e completare la titolazione fino a colorazione violetta. La normalità della soluzione di solfato ferroso (N_1) è data da:

$$N_1 = \frac{V \cdot N}{25}$$

dove:

V e N sono rispettivamente il volume (ml) e la normalità della soluzione di dicromato (4.8.).

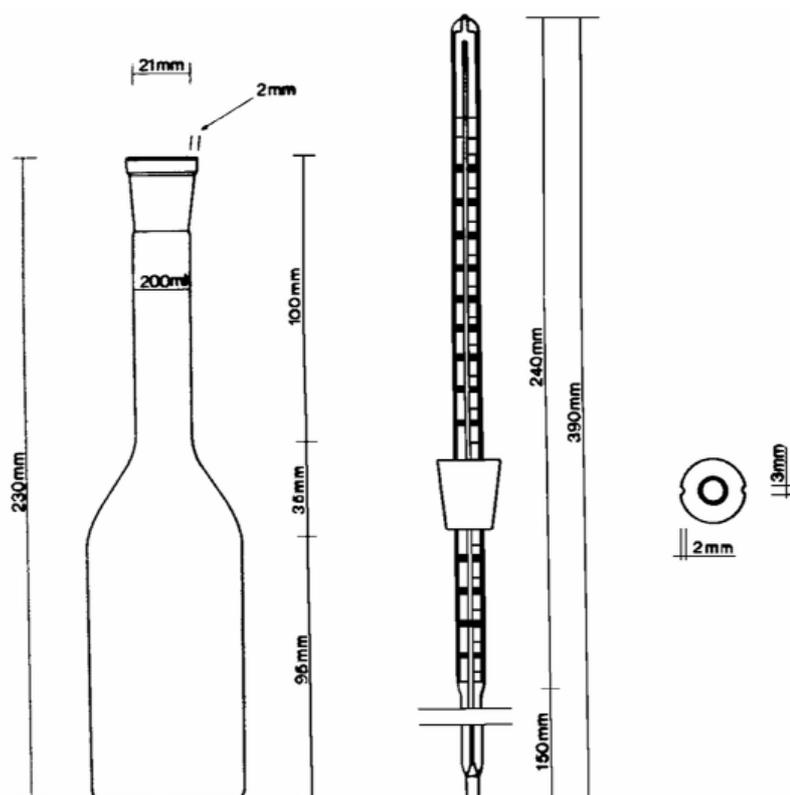
- 4.7. 4-difenilammina solfonato di bario (o di sodio), indicatore, soluzione: in un bicchiere da 100 ml trasferire 0,2 g di 4-difenilammina solfonato di bario (oppure di sodio) e aggiungere 50 ml di acqua. Sciogliere, portare a volume di 100 ml con acqua ed omogeneizzare.
- 4.8. Dicromato di potassio, soluzione 0,2N: si ottiene per diluizione 1:10 della soluzione 4.4.

5. Apparecchiatura

Corrente attrezzatura da laboratorio e in particolare:

- 5.1. Setaccio con luce netta delle maglie da 0,25 mm.
- 5.2. Matraccio per attacco del tipo descritto in fig. 1, di peso non superiore a 140 g, completo di termometro con graduazioni di 1°C.
- 5.3. Piastre di protezione per bunsen in vetroceramica di tipo CERAN.
- 5.4. Titolatore automatico corredato da elettrodo combinato di platino per misure di potenziale di ossido-riduzione e microburetta automatica da 5 ml con aggiunte unitarie di 2 µl.

Figura 1. Principali caratteristiche del matraccio utilizzato per la determinazione del carbonio organico



6. Procedimento

6.1. Preparazione del campione per l'analisi

Macinare il campione, setacciarlo con il vaglio (5.1.) e rimacinare il residuo fino a passaggio completo attraverso lo stesso setaccio. Omogeneizzare tutte le frazioni. Nel caso si debba seccare il campione prima della macinazione, porlo in stufa a 50-60°C fino a peso costante e tenerne conto nel calcolo.

6.2. Presa del campione

Nel matraccio per attacco (5.2.), trasferire una quantità di campione pesata con una precisione di $\pm 0,001$ g e contenente 30-50 mg di carbonio C organico di origine biologica (preferibilmente 40 mg).

6.3. Determinazione in assenza di urea e di cloruri:

6.3.1. Preparazione della soluzione per la titolazione

Per mezzo di una buretta, aggiungere: 20 ml esatti di soluzione di dicromato (4.4.) e successivamente goccia a goccia (con buretta) 26 ml esatti di acido solforico (4.1.), raffreddando in modo che la temperatura della soluzione sia tra 40 e 50°C.

Inserire il termometro (5.2.) e riscaldare con fiamma il più rapidamente possibile per raggiungere la temperatura di $160 \pm 2^\circ\text{C}$ e mantenerla costante per 10 minuti esatti, agitando di tanto in tanto. Raffreddare rapidamente a temperatura ambiente, trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 200 ml, portare a volume con acqua ed omogeneizzare. Lasciare decantare la soluzione per 12 ore circa.

6.3.2. Titolazione della soluzione

6.3.2.1. Titolazione diretta

Pipettare dal matraccio da 200 ml, 20 ml di soluzione limpida trasferendoli in una beuta da 250 ml. Aggiungere 2 ml di miscela fosfo-solforica (4.5.) ed 8 gocce di indicatore (4.7.). Diluire poi con acqua fino a circa 100 ml.

Titolare l'eccesso di dicromato con la soluzione di solfato ferroso 0,2N (4.6.) fino al viraggio, cioè al passaggio dal violetto al verde usando, per vedere meglio il viraggio, una sorgente luminosa al di sotto della beuta.

Qualora si disponga del titolatore automatico (5.4.) si esegua la titolazione potenziometrica omettendo le aggiunte della miscela fosfo-solforica e dell'indicatore.

6.3.2.2. Titolazione di ritorno

Pipettare dal matraccio da 200 ml, 20 ml di soluzione limpida trasferendoli in una beuta da 250 ml. Aggiungere mediante buretta 25 ml esatti di soluzione di solfato ferroso 0,2N (4.6.). Aggiungere poi 2 ml di miscela fosfo-solforica (4.5.) ed 8 gocce di indicatore (4.7.). Titolare l'eccesso di solfato ferroso con la soluzione di dicromato 0,2N (4.8.) fino a colorazione violetta.

Qualora si disponga del titolatore automatico (5.4.), si esegua la titolazione potenziometrica omettendo le aggiunte della miscela fosfo-solforica e dell'indicatore.

6.4. Determinazione in bianco

In entrambi i casi effettuare parallelamente una prova in bianco nelle stesse condizioni, omettendo il campione.

6.5. Determinazione in presenza di urea

Preparare la presa di campione come al punto 6.2., tenendo conto che la quantità di campione non deve contenere più di 80 mg di carbonio, ivi compreso quello ureico. La quantità presente di carbonio organico di origine biologica deve essere compresa fra 30 e 50 mg. Aggiungere 2,30 mg di nitrito (4.2.) per ogni mg di urea contenuta nel campione, prima

dell'aggiunta della soluzione di dicromato.

Operare quindi come al punto 6.3.

Nella prova in bianco aggiungere la stessa quantità di nitrito utilizzata per il campione e una quantità di urea corrispondente a quella in esso contenuta.

6.6. *Determinazione in presenza di cloruri*

Preparare la presa di campione come al punto 6.2., tenendo conto che la quantità di campione non deve contenere più di 80 mg di carbonio, ivi compreso il cloro espresso come carbonio (equivalente in carbonio = %Cl · 0,0846). La quantità presente di carbonio organico di origine biologica deve essere compresa fra 30 e 50 mg.

6.6.1. Cloruri inferiori al limite dello 0,2%

Aggiungere una quantità di solfato di argento di 4,4 mg per ogni milligrammo di ione cloruro presente nel campione analizzato. In ogni caso non superare la quantità massima di 200 mg di solfato di argento per evitare la formazione di un precipitato bruno, contenente cromo esavalente difficilmente solubile, specie a caldo.

Operare come al punto 6.3.

6.6.2. Cloruri superiori al limite dello 0,2%

Operare come ai punti 6.2. e 6.3., senza aggiungere il solfato d'argento.

Correggere i risultati secondo il punto 7.3.2.

Il metodo è applicabile sino ad un rapporto Cl/C non superiore a 5.

Il tenore dei cloruri può essere dedotto con buona approssimazione dal contenuto in potassio, in quanto nei concimi organo-minerali il cloruro di potassio è di norma l'unica fonte di cloruri, quando siano assenti sostanze organiche contenenti cloruri come il sangue.

Convertire il tenore dell'ossido di potassio in cloro mediante il fattore 0,75269.

7. **Espressione dei risultati**

Il contenuto di carbonio organico, espresso come percento (m/m) è dato da:

7.1. In assenza di urea e di ioni cloruro

7.1.1. Titolazione diretta:

$$C\% (m/m) = \frac{(A - B) \times N_1 \times 0,003 \times 200}{20 \times M} \times 100 = \frac{(A - B) \times N_1 \times 3}{M}$$

dove:

A = volume, espresso in millilitri, di soluzione di solfato ferroso (4.6.) consumata per la prova in bianco;

B = volume, espresso in millilitri, di soluzione di solfato ferroso (4.6.) consumata per l'analisi del campione;

N₁ = normalità della soluzione del solfato ferroso (4.6.);

0,003 corrisponde all'equivalente del carbonio;

M = massa, espressa in grammi, del campione analizzato.

7.1.2. Titolazione di ritorno

$$C\% (m/m) = \frac{(B - A) \times N \times 0,003 \times 200}{20 \times M} \times 100 = \frac{(B - A) \times N \times 3}{M}$$

dove:

B = volume, espresso in millilitri, di soluzione di dicromato di potassio (4.8.) consumata per l'analisi del campione;

A = volume, espresso in millilitri, di soluzione di dicromato di potassio (4.8.) consumata per la prova in bianco;

N = normalità della soluzione di dicromato di potassio (4.8.);

0,003 corrisponde all'equivalente del carbonio;

M = massa, espressa in grammi, del campione analizzato.

7.2. *In presenza di urea*

Applicare le formule del punto 7.1.

7.3. *In presenza di cloruri*

7.3.1. Se inferiori allo 0,2%

Applicare le formule del punto 7.1.

7.3.2. Se superiori allo 0,2%

La percentuale di carbonio effettivo C_e è data da:

$$C_e(m/m) = C\% - 0,0864 \times Cl\%$$

dove:

C% = percentuale (m/m) di carbonio calcolato secondo il punto 7.1.;

Cl% = percentuale (m/m) di ioni cloruro contenuti nel campione;

0,0846 = rapporto tra le masse di un atomo di carbonio e quattro atomi di cloro.

N.B.: Il certificato di analisi deve riportare l'indicazione "Titolazione diretta" o "Titolazione di ritorno", a seconda del procedimento utilizzato.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.6

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.2

Valutazione del carbonio organico di origine biologica estraibile o già estratto (TEC) - Frazionamento e quantificazione del carbonio umificato (HA + FA) presente in alcuni tipi di fertilizzanti - Determinazione del grado e tasso di umificazione (DH% e HR%)

1. Oggetto

Il metodo, articolato in 4 sezioni per rendere più semplice l'organizzazione dell'analisi, definisce le modalità per:

Sezione 1: l'estrazione del carbonio organico in soda e sodio pirofosfato 0,1M e la preparazione dei campioni per la determinazione del carbonio organico nei prodotti già trattati industrialmente a tale scopo.

Sezione 2: il frazionamento del carbonio organico umificato presente negli estratti in soda e sodio pirofosfato o in acqua, mediante l'uso di apposito supporto cromatografico.

Sezione 3: la determinazione del carbonio organico negli estratti e nei liquidi frazionati per ossidazione con bicromato di potassio.

Sezione 4: la definizione ed espressione dei parametri di umificazione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai seguenti fertilizzanti:

- 2.1. torba umificata, leonardite, vermicompost da letame, ammendanti da residui solidi urbani (compost maturo), estratti umici, umati solubili, letame essiccato;
- 2.2. concimi organo-minerali ed altri prodotti per i quali in futuro venga richiesta la sua applicazione nell'ambito della legislazione sui fertilizzanti.
Per i fertilizzanti per i quali venga dichiarata la presenza di carbonio organico umificato già in forma estratta (es. umati solubili liquidi e solidi, estratti umici in forma solida o in soluzione) il procedimento analitico prevede la sola dissoluzione in acqua (7.1.2.).

3. Interferenze

La presenza di urea e cloruri interferisce nella determinazione del carbonio organico estratto in soda e pirofosfato 0,1M (TEC) ed in quello solubilizzato con acqua.

L'interferenza dell'urea viene eliminata con l'aggiunta al campione di sodio nitrito che provoca, in ambiente acido, la decomposizione dell'urea stessa. Per contenuti di cloruri inferiori a 0,2% l'interferenza è eliminata per precipitazione con solfato d'argento degli ioni cloruro.

Per contenuti superiori allo 0,2% il tenore in carbonio organico riscontrato deve essere corretto in funzione della percentuale di ioni cloruro.

4. Preparazione del campione

Per i prodotti solidi, il campione rappresentativo viene essiccato a 60°C fino a peso costante, macinato e vagliato finché tutto il campione passa attraverso un vaglio da 0,2 mm. Sul campione così preparato verrà effettuata una misura dell'umidità residua alla temperatura di 105°C in concomitanza con l'esecuzione dell'analisi riportata nel titolo.

Per i prodotti già in soluzione o in sospensione, si opererà direttamente sul campione tal quale previa accurata omogeneizzazione.

5. Reagenti

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o di purezza equivalente e reattivi di qualità riconosciuta.

5.1. Sezione 1 - Estrazione del carbonio organico

5.1.1. Soluzione estraente di soda e sodio pirofosfato 0,1 M: pesare 44,6 g di $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ in un matraccio tarato da 1000 ml, aggiungere 4 g di NaOH, sciogliere in circa 900 ml di acqua distillata e portare a volume;

5.2.2. Azoto gassoso

5.2. Sezione 2 - Frazionamento del carbonio organico umificato

5.2.1. Acido solforico al 50% (v/v) a partire da H_2SO_4 al 96% (m/m) ($d = 1,84$);

5.2.2. Acido solforico 0,005 M;

5.2.3. Polivinilpirrolidone resina insolubile (del tipo PVP Cod. 85648/7 Aldrich, West Germany);

5.2.4. Sodio idrato 0,5 M.

5.3. Sezione 3 - Determinazione del carbonio organico in soluzione

5.3.1. Acido solforico 96% (m/m) ($d = 1,84$);

5.3.2. Bicromato di potassio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), soluzione 1/3 M: porre 98,08 g di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ polverizzato ed essiccato (1 ora a $130-140^\circ\text{C}$) in un matraccio tarato da 1000 ml ed aggiungere circa 800 ml di acqua distillata. Agitare sino a completa dissoluzione, portare a volume con acqua distillata ed omogeneizzare;

5.3.3. Acido fosforico 85% ($d = 1,71$);

5.3.4. Solfato ferroso, soluzione 0,4 M: sciogliere in un matraccio tarato da 1000 ml 111,2 g di solfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in circa 500 ml di acqua distillata, agitare fino a completa dissoluzione e aggiungere 20 ml di H_2SO_4 (5.3.1.). Raffreddare, portare a volume con acqua distillata ed omogeneizzare. La soluzione deve essere preparata giornalmente;

5.3.5. Acido 4-difenilamminosolfonico, indicatore: porre 0,2 g di sale di bario dell'acido difenilamminosolfonico in matraccio tarato da 100 ml, aggiungere circa 50 ml di acqua distillata ed agitare fino a completa dissoluzione, portare a volume ed omogeneizzare.

Oppure: porre 0,2 g di 4-difenilamminosolfonato sodico ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NaNO}_3\text{S}$) in un matraccio tarato da 100 ml, sciogliere in H_2SO_4 (5.3.1.) e portare a volume sempre in H_2SO_4 (5.3.1.); Nel caso venga adottata la titolazione in automatico, i reagenti di cui ai punti 5.3.3. e 5.3.5. non sono necessari.

5.3.6. Nitrito di sodio;

5.3.7. Solfato d'argento

5.4. Sezione 4 - Parametri di umificazione

Nessun reagente.

6. Apparecchiatura

Corrente attrezzatura da laboratorio e in particolare:

6.1. Sezione 1 - Estrazione del carbonio organico

6.1.1. Stufa;

- 6.1.2. Setaccio con luce netta delle maglie di 0,2 mm;
- 6.1.3. Agitatore a scosse in bagno d'acqua termoregolabile a 65°C (agitatore del tipo Dubnoff);
- 6.1.4. Centrifuga;
- 6.1.5. Tubi da centrifuga da 150 ml;
- 6.1.6. Unità filtrante composta da beuta per vuoto, attacco per filtrazione e pompa per vuoto (è sufficiente anche la depressione creata da una normale pompa ad acqua);
- 6.1.7. Filtri da 0,8 mm del tipo HA della Millipore (fare attenzione, comunque, che non siano di cellulosa);
- 6.1.8. Cartina indicatore universale di pH.
- 6.2. *Sezione 2 - Frazionamento del carbonio organico umificato*
- 6.2.1. Centrifuga;
- 6.2.2. Tubi da centrifuga da 100 ml;
- 6.2.3. Siringhe ipodermiche da 10 cm³;
- 6.2.4. Lana di vetro in fibre.
- 6.3. *Sezione 3 - Determinazione del carbonio organico in soluzione*
Al fine di avere maggiore uniformità nel procedimento analitico si consiglia di usare vetreria del tipo Duran.
- 6.3.1. Matraccio per attacco del tipo già descritto nel metodo ufficiale per la determinazione del carbonio organico secondo Springer-Klee - Metodo P.1;
- 6.3.2. Termometro con scala fino a 200°C con graduazioni di 1°C e porta-termometro come già descritto nel metodo ufficiale per la determinazione del carbonio organico secondo Springer-Klee - Metodo X.1;
- 6.3.3. Bunsen con piastre di protezione in vetroceramica tipo Ceran della Duran;
- 6.3.4. Titolatore automatico (opzionale) dotato di elettrodo combinato di Pt-Ag/AgCl.
- 6.4. *Sezione 4 - Parametri di umificazione*
Nessuna apparecchiatura.

7. Procedimento

7.1. *Sezione 1 - Estrazione del carbonio organico*

- 7.1.1. Prodotti contenenti carbonio organico estraibile in soda e sodio pirofosfato 0,1M.
Pesare 2 g di campione preparato secondo quanto riportato al punto 4. in matraccio di Erlenmeyer da 250 ml (beuta), aggiungere 100 ml di soluzione estraente (5.1.1.) e controllare il pH mediante cartina indicatore universale (il pH della soluzione soda/sodio pirofosfato deve essere circa 12,5). Insufflare per 1 minuto con N₂ (5.1.2.), tappare ermeticamente, porre in agitatore a scosse (regolato a 65°C e 80 scosse al minuto) per 48 ore. Controllare dopo 48 ore che il pH si sia mantenuto al valore di 12,5. Raffreddare poi il matraccio in bagno freddo e travasare quantitativamente in tubo da centrifuga da 150 ml. Centrifugare a 2500-2700 rpm per 20 minuti. Filtrare il surnatante su filtri del tipo HA da 0,8 µm (6.1.7.). Travasare il filtrato in recipiente pulito e asciutto, insufflare nuovamente per 1 minuto N₂ (5.1.2.) e tappare ermeticamente. I campioni se non vengono analizzati in giornata devono essere conservati in frigorifero a 4°C e solo per alcuni giorni.

7.1.2. Prodotti contenenti carbonio organico già in forma estratta

7.1.2.1. Estratti solidi

Pesare 0,5 g di campione in matraccio di Erlenmeyer da 250 ml (beuta), aggiungere 100 ml di acqua distillata, tappare ermeticamente, porre in agitatore a scosse a temperatura ambiente per 30 minuti in modo da facilitare la dissoluzione del materiale. Travasare quantitativamente in tubo da centrifuga da 150 ml. Centrifugare a 2500-2700 rpm per 20 minuti. Filtrare il surnatante su filtri del tipo HA da 0,8 μm (6.1.7.). Travasare il filtrato in recipiente pulito ed asciutto, insufflare nuovamente per 1 minuto N_2 (5.1.2.) e tappare ermeticamente. I campioni, se non vengono analizzati in giornata, devono essere conservati in frigorifero a 4°C e solo per alcuni giorni.

7.1.2.2. Estratti in soluzione

Nel caso di campioni già in soluzione (es. estratti umici) si procederà ad una diluizione (per esempio 1:25) con aggiunta di acqua distillata, alla centrifugazione e filtrazione come descritto al punto 7.1.2.1. a partire da: "Centrifugare a 2500-2700 rpm ...".

7.2. Sezione 2 - Frazionamento del carbonio organico umificato

7.2.1. Preparazione del polivinilpirrolidone (PVP)

Introdurre circa 50 g di polvere di polivinilpirrolidone insolubile (5.2.3.) in un contenitore trasparente almeno da 1-1,5 litri, aggiungere energicamente acqua di rubinetto ed agitare molto accuratamente la miscela. Lasciare decantare le parti più grossolane per circa 10-15 minuti e scartare le frazioni più fini. Ripetere l'operazione con acqua di rubinetto per due volte. Lavare ora per due volte con acqua distillata eliminando sempre la frazione fine ancora in sospensione, quindi aggiungere una soluzione 0,005M di H_2SO_4 (5.2.2.) tale da acidificare la resina. Il PVP così preparato deve essere conservato in contenitore chiuso anche a temperatura ambiente, ma sempre ricoperto di soluzione.

7.2.2. Preparazione delle colonnine

Le colonnine possono essere agevolmente preparate utilizzando delle siringhe ipodermiche in plastica da 10 cm^3 (6.2.3.) eliminando l'ago e inserendo al suo posto 10 cm circa di un tubicino di gomma. Alla base della siringa viene posto uno strato di circa 0,5 cm di lana di vetro (6.2.4.) opportunamente pressato per evitare la fuoriuscita di PVP. Le colonnine devono essere fissate ad un supporto rigido in posizione verticale e non devono essere mosse dopo averle caricate con la resina. Il caricamento del PVP viene effettuato versando la sospensione acida sull'estremità superiore della colonnina stessa, lasciando sedimentare. L'operazione viene interrotta quando il volume riempito è intorno ai 4-6 cm^3 , facendo attenzione poi a non far seccare la colonnina dopo avere concluso la preparazione. La colonnina ora è pronta per ricevere il surnatante dell'acidificazione dell'estratto totale o della soluzione.

7.2.3. Frazionamento su resina di polivinilpirrolidone

7.2.3.1. Fertilizzanti di cui al punto 2.1.

Pipettare un'aliquota di 25 ml di estratto totale (da ora in poi solo ET) e porlo in provetta da centrifuga da 100 ml circa. Aggiungere 0,3-0,5 ml di H_2SO_4 al 50% (5.2.1.) fino al raggiungimento di $\text{pH} < 2$.

7.2.3.2. Fertilizzanti di cui al punto 2.2.

Pipettare un'aliquota di 50 ml di estratto totale (da ora in poi solo ET) e porlo in provetta da centrifuga da 100 ml circa. Aggiungere 0,5-1 ml di H_2SO_4 al 50% (5.2.1.) fino al raggiungimento di $\text{pH} < 2$.

Tappare la provetta, agitare accuratamente e lasciare riposare per qualche minuto. Quindi mettere la provetta in centrifuga a 2500-2700 rpm, circa, per 20 minuti, togliere e versare il surnatante sulla colonnina preventivamente preparata impiegando 4-6 cm³ di polivinilpirrolidone insolubile (5.2.3.). Scartare l'eluito e continuare il lavaggio della colonnina con circa 25 ml di H₂SO₄ 0,005M. Terminata l'operazione, aggiungere lentamente sulla sommità della colonnina una soluzione di NaOH 0,5M che consentirà al materiale adsorbito su PVP di eluire. Il fenomeno è solitamente ben visibile in quanto le sostanze polifenoliche adsorbite sul PVP sono di colore bruno chiaro-arancio e sono sufficienti 3-4 ml per fare arrivare la soluzione colorata all'estremità della colonnina. Inserire ora la provetta nella quale è precipitata la frazione umica (acidi umici, HA) e proseguire il lavaggio utilizzando circa 15 ml di NaOH 0,5M (se necessario anche volumi superiori). Travasare quantitativamente la soluzione contenente gli HA ora disciolti e gli acidi fulvici FA purificati, provenienti dal lavaggio della colonnina, in un matraccio da 25 ml o da 50 ml (talvolta per materiali particolarmente ricchi di HA come leonarditi, torba umificata, ecc., è necessario utilizzare matracci di volume superiore) e portare a volume con NaOH 0,5M. Agitare e conservare ET e HA+FA in frigorifero per la successiva determinazione del carbonio organico.

7.3. *Sezione 3 - Determinazione del contenuto di carbonio organico delle soluzioni ottenute nelle sezioni precedenti*

7.3.1. Dalle soluzioni ottenute secondo quanto descritto nelle sezioni 7.1 e 7.2, prelevare un'aliquota contenente una quantità di carbonio compresa tra 5 e 25 mg e comunque non superiore a 10 ml di volume e trasferirla in matraccio da attacco (6.3.1.). Per prelievi inferiori a 10 ml, a seconda dei casi, aggiungere soluzione estraente o acqua distillata fino a raggiungere il volume finale di 10 ml. Aggiungere poi all'estratto, per mezzo di una buretta, 5 ml esatti di soluzione di K₂Cr₂O₇ (5.3.2.) e successivamente goccia a goccia, o comunque molto lentamente, 20 ml esatti di H₂SO₄ (5.3.1.), raffreddando in bagno di acqua e ghiaccio in modo che la temperatura della soluzione venga mantenuta tra 40 e 50°C. Inserire il termometro (6.3.2.) in modo che il bulbo non tocchi il fondo del matraccio. Posizionare il matraccio su bunsen e piastra del tipo Ceran (6.3.3.) precedentemente riscaldata e portare la temperatura della soluzione il più rapidamente possibile a 160°C ± 2°C. Mantenere in queste condizioni per 10 minuti esatti, agitando di tanto in tanto. Al termine raffreddare a temperatura ambiente, trasferire quantitativamente in beuta da 250 ml, lavando più volte il matraccio d'attacco, fino ad un volume di circa 100 ml, quindi lasciare raffreddare.

7.3.2. Eliminazione delle interferenze da urea e cloruri

L'eliminazione delle interferenze dovute ad urea e/o cloruri deve essere effettuata negli estratti preparati secondo 7.1. e destinati alla determinazione del carbonio organico totale estratto. Il contenuto in urea e cloruri deve essere preventivamente determinato sul campione in esame utilizzando i metodi ufficiali.

7.3.2.1. Determinazione in presenza di urea

Prelevare una parte aliquota della soluzione, preparata come al punto 7.1., tale che il contenuto di carbonio, compreso quello ureico, non superi i 25 mg assicurandosi che il contenuto di carbonio organico di origine biologica sia almeno uguale a 5 mg.

Aggiungere 2,30 mg di nitrito di sodio (5.3.6.) per ciascun mg di urea contenuto nella parte aliquota prelevata. Aggiungere poi la soluzione di bicromato (5.3.2.) e quindi procedere come indicato al punto 7.3.1.

7.3.2.2. Determinazione in presenza di cloruri

7.3.2.2.1. Contenuto in cloruri inferiore allo 0,2% (m/m)

Prelevare una parte aliquota della soluzione preparata come al punto 7.1., tale che il contenuto di carbonio organico di origine biologica sia compreso fra i 5 e i 25 mg. Aggiungere 4,4 mg di solfato d'argento (5.3.7.) per ciascun mg di ioni cloruro presenti nella parte aliquota prelevata. In ogni caso non devono essere superati i 200 mg di solfato di argento per evitare la formazione di un precipitato bruno, contenente cromo esavalente, difficilmente solubile, specie a caldo. Procedere poi come indicato al punto 7.3.1.

7.3.2.2.2. Contenuto in cloruri superiore allo 0,2% (m/m)

Prelevare una parte aliquota della soluzione preparata come al punto 7.1., tale che il contenuto in carbonio, ivi compreso il cloro espresso come C (equivalente in carbonio = %Cl \times 0,0846) non superi i 25 mg, assicurandosi che il contenuto di carbonio organico di origine biologica sia almeno uguale a 5 mg.

Si procede poi come indicato al punto 7.3.1.

Attenzione: il metodo è applicabile solo per fertilizzanti con rapporto Cl/C inferiore a 5.

7.3.3. Prove in bianco

Scopo delle prove in bianco è quello di accertare il consumo di ossidante sia nelle condizioni operative che in quelle a freddo, delle soluzioni in esame utilizzate per l'estrazione del carbonio organico e per la separazione della frazione umica + fulvica.

Le soluzioni in questione sono:

7.3.3.1. Carbonio organico estraibile (7.1.1.): soluzione di soda e sodio pirofosfato 0,1M.

7.3.3.2. Carbonio organico già in forma estratta (7.1.2.): acqua distillata.

7.3.3.3. Carbonio umico + fulvico (7.2.3.): soluzione di NaOH 0,5M acidificata a pH 1-1,5 con H₂SO₄ 50% v/v.

7.3.3.4. Prova in bianco a caldo: prelevare 10 ml della soluzione in esame e trasferirla in matraccio da attacco (6.3.1.). Aggiungere poi alla soluzione per mezzo di una buretta 5 ml esatti di soluzione K₂Cr₂O₇ (5.3.2.), procedendo poi come indicato al punto 7.3.1.

7.3.3.5. Prova in bianco a freddo: prelevare 10 ml della soluzione in esame e trasferirla in matraccio da attacco (6.3.1.). Aggiungere poi all'estratto, per mezzo di una buretta, 5 ml esatti di soluzione K₂Cr₂O₇ (5.3.2.) e successivamente goccia a goccia, o comunque molto lentamente, 20 ml esatti di H₂SO₄ (5.3.1.), raffreddando in bagno di acqua e ghiaccio in modo che la temperatura della soluzione venga mantenuta tra 40 e 50 °C. Questa soluzione non si scalda a 160 \pm 2°C per 10 minuti, ma si trasferisce poi quantitativamente in beuta da 250 ml, lavando più volte il matraccio d'attacco fino a circa 100 ml, lasciando infine raffreddare.

7.3.3.6. Prova in bianco in presenza di urea: tale prova è da effettuarsi solamente sugli estratti ottenuti al punto 7.1. In questo caso aggiungere alla soluzione in esame la stessa quantità di urea riscontrata nel campione e la corrispondente quantità di nitrito sodico impiegata per distruggere l'urea, prima di aggiungere la soluzione di bicromato (5.3.2.). Continuare poi come descritto al punto 7.3.1.

7.3.4. Titolazione del carbonio organico

7.3.4.1. Titolazione manuale: aggiungere alla soluzione da titolare 10 ml di acido fosforico (5.3.3.) e 4 gocce di indicatore (5.3.5.). Titolare l'eccesso di K₂Cr₂O₇ con FeSO₄ 0,4M (5.3.4.) fino al viraggio, cioè al passaggio dal violetto al verde brillante, usando una sorgente luminosa al di sotto della beuta per vedere meglio il viraggio stesso.

Titolare allo stesso modo sia la prova in bianco a freddo, sia quella a caldo.

7.3.4.2. Titolazione in automatico: si procede allo stesso modo descritto al punto precedente, ma in questo caso si omette l'aggiunta al campione dell'acido fosforico (5.3.3.) e dell'indicatore (5.3.5.).

8. Espressione dei risultati

Il contenuto di carbonio organico determinato nelle soluzioni ottenute secondo le sezioni 7.1. e 7.2., si ricava dalla relazione:

$$C\% = (A - B) \cdot N_1 \cdot D \cdot 0,318 \cdot \frac{I}{P}$$

data da:

$$C\% = (A - B) \cdot N_1 \cdot D \cdot 0,003 \cdot \frac{100}{P} \cdot 1,06$$

dove:

A = volume, espresso in ml, di soluzione di FeSO₄ (5.3.4.), consumato per titolare le prove in bianco a caldo (7.3.3.4.);

B = volume, espresso in ml, di FeSO₄ (5.3.4.) consumato per titolare il campione;

N₁ = normalità reale del FeSO₄, calcolata facendo il rapporto fra i 5 ml di K₂Cr₂O₇ 1/3 M (2N) presenti nella prova in bianco a freddo (7.3.3.5.) ed i ml di FeSO₄ utilizzati per titolarli, cioè:

$$(5 / \text{ml FeSO}_4 \text{ utilizzati per titolare PB a freddo}) \cdot 2$$

La sua determinazione è richiesta per eliminare sia l'errore dovuto alla minima decomposizione del K₂Cr₂O₇ durante il riscaldamento a 160°C, sia per normalizzare il FeSO₄. Fare attenzione alla differenza fra i ml di FeSO₄ utilizzati per la titolazione della prova in bianco a freddo e quelli impiegati per la titolazione della prova in bianco a caldo. Se tale differenza supera 0,4 ml, è opportuno ripetere sia le prove in bianco, sia verificare l'esatta normalità del FeSO₄.

D = fattore di diluizione, calcolato in base all'aliquota prelevata per la determinazione rispetto al volume totale dell'estratto;

0,003 = peso equivalente del carbonio;

P = peso del campione secco, espresso in grammi, utilizzato nella prova;

1,06 = fattore di correzione che tiene conto della sottostima media che si ha nell'applicazione del metodo.

8.1. Presenza di urea

La formula riportata al punto 8. è utilizzabile così com'è.

8.2. Presenza di cloruri

Per tenori in cloruri inferiori allo 0,2% (m/m), la formula riportata al punto 8. È valida. Per tenori superiori allo 0,2%, il reale contenuto in carbonio organico di origine biologica è calcolato con la seguente equazione:

$$C \text{ organico di origine biologica} = C\% - 0,0846 \text{ Cl}\%$$

dove:

C%= contenuto di carbonio apparente ottenuto applicando la formula riportata al punto 8.;

Cl%= contenuto in cloruri del fertilizzante in esame;

0,0846= rapporto fra la massa di un atomo di carbonio e la massa di 4 atomi di cloro.

9. Sezione 4 - Parametri dell'umificazione: definizioni ed espressione

9.1. Parametri dell'umificazione

Per il calcolo dei parametri dell'umificazione sono necessari i seguenti dati:

- 9.1.1. C organico totale presente nel materiale tal quale (TOC), determinato secondo il metodo Springer-Klee (Metodo P.1);
- 9.1.2. C organico dell'estratto totale (TEC), sia proveniente dall'estrazione nel caso di materiali solidi (7.1.1.), o semplicemente per diluizione, centrifugazione e filtrazione per i materiali in soluzione (7.1.2.) determinato con il metodo per il carbonio organico in soluzione (7.3.);
- 9.1.3. C organico estratto umificato (HA + FA), determinato con il metodo per il carbonio organico in soluzione (7.3.);
- 9.1.4. C organico estratto non umificato (NH), ottenuto per differenza nel seguente modo:
 $NH = TEC - (HA+FA)$.

9.2. Calcolo dei parametri dell'umificazione:

$$\text{Grado di umificazione (IH\%)} = \frac{(HA + FA)}{TEC} \cdot 100$$

percentuale del C organico umico presente nell'estratto rispetto al C totale dell'estratto;

$$\text{Tasso di umificazione (HR\%)} = \frac{(HA + FA)}{TOC} \cdot 100$$

percentuale del C organico umico presente nell'estratto rispetto al C totale presente nel campione;

$$\text{Indice di umificazione (HI)} = \frac{NH}{(HA + FA)}$$

rapporto fra il C non umico dell'estratto e quello umico.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.6

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.3

Determinazione del grado di racemizzazione nei fertilizzanti mediante elettroforesi capillare

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione del grado di racemizzazione, considerando come tale, il rapporto percentuale tra la forma D (*R*) dell'alanina libera rispetto alla somma delle forme L (*S*) e D (*R*) dell'alanina libera.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai concimi organici azotati fluidi ed agli ammendanti per i quali è richiesta la dichiarazione del grado di racemizzazione.

3. Principio

La separazione degli enantiomeri viene effettuata per elettroforesi capillare utilizzando la β -ciclodestrina come selettore chirale.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

- 4.1. Tampone Tris(idrossimetil)-amminometano (TRIS) 0,1 M / borato 0,1 M + acido etilendiamminotetracetico (EDTA) 2,5 mM + sodio dodecilsolfato (SDS) 0,1% + urea 7 M, pH 8,6 (Fluka, 82616).
- 4.2. β -ciclodestrina, $C_{42}H_{70}O_{35}$, >99%.
- 4.3. *Tampone per elettroforesi capillare*
Disciogliere in 100 l del tampone (4.1) 1,135 g di β -ciclodestrine (4.2), agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione, conservare a +4 °C. Se correttamente conservata ha una durata di 2 mesi.
- 4.4. Acetonitrile (ACN), CH_3CN , >99,8%.
- 4.5. Dansil cloruro, 5-dimetilamminonafalene 1-sufonil cloruro (DNS-Cl), >99%.
- 4.6. *Dansil cloruro, soluzione 15 mM in acetonitrile*
Disciogliere in 5 l di ACN (4.4) 20 mg di DNS-Cl (4.5), questa soluzione deve essere preparata fresca ogni volta.
- 4.7. Sodio bicarbonato, $NaHCO_3$, >99,8%.
- 4.8. *Sodio bicarbonato, $NaHCO_3$ soluzione 0,5 M*
Pesare 36 g di sodio bicarbonato (4.7) con una precisione di 0,01 g e porlo in un pallone tarato da 1 l, aggiungere circa 600 l di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione del bicarbonato, quindi portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a +4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.
- 4.9. L (*S*) alanina, $CH_3CH(NH_2)CO_2H$, 99%.
- 4.10. D (*R*) alanina, $CH_3CH(NH_2)CO_2H$, 99%.

- 4.11 L (S) D(R) alanina, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$, 99%.
- 4.12. *L (S) alanina soluzione 10 mM*
Pesare 0,089 g di L (S) alanina (4.9) con una precisione di 1 mg, porla in un pallone tarato da 100 l, aggiungere circa 60 l di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore con chiusura ermetica e mantenuta a $-16\text{ }^\circ\text{C}$. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.
- 4.13. *D (R) alanina soluzione 10 mM*
Pesare 0,089 mg di D (R) alanina (4.10) con una precisione di 1 mg, porla in un pallone tarato da 100 l, aggiungere circa 60 l di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore con chiusura ermetica e mantenuta a $-16\text{ }^\circ\text{C}$. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.
- 4.14. *L (S) D(R) alanina soluzione 10 mM*
Pesare 0,089 mg di L (S) D (R) alanina (4.9) con una precisione di 1 mg, porla in un pallone tarato da 100 l, aggiungere circa 60 l di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore con chiusura ermetica e mantenuta a $-16\text{ }^\circ\text{C}$. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

5. Apparecchiatura

- 5.1. Stufa o agitatore riscaldante a bagno d'acqua.
- 5.2. Centrifuga per microprovette
- 5.3. Siringhe da 1 l tipo usa e getta.
- 5.4. Filtri da siringa da 1 l con pori del diametro di 0,45 mm in politetrafluoroetilene idrofilo (PTFE).
- 5.5. Elettroforesi capillare con rilevatore spettrofotometrico dotato di una lampada al deuterio e di un programma d'integrazione e calcolo delle aree dei picchi degli elettroferogrammi.
- 5.6. Capillare in silice fusa, rivestito esternamente con poliimmide ed internamente con poliacrilammide (BIOCPTM XL, 148-3081, BIO-RAD) di lunghezza totale (TL) di 50 cm e di lunghezza effettiva al rilevatore (EL) 45,4 cm, con diametro interno (ID) di 50 μm e diametro esterno (OD) di 375 μm .

6. Procedimento

- 6.1. *Preparazione del campione per l'analisi*
Pesare una quantità compresa tra 50-100 mg di campione all'interno di una microprovetta tipo Eppendorf da 1,5 l con tappo, quindi aggiungere 1 l di acqua, tappare la microprovetta ed agitare fino alla completa dissoluzione.
- 6.2. *Derivatizzazione del campione*
In una microprovetta con tappo tipo Eppendorf da 0,5 l aggiungere nell'ordine 10-50 μl di campione (6.1), 50 μl di soluzione di bicarbonato (4.8), 150 μl di soluzione di dansil cloruro (4.6) e acqua in quantità tale da portare il volume totale a 250 μl . Omogeneizzare il tutto agitando dolcemente per alcuni minuti, quindi porre nell'agitatore riscaldante a bagno d'acqua (5.1) a $65\text{ }^\circ\text{C}$ per 45 minuti. Trascorso questo tempo togliere i campioni

dall'agitatore, lasciarli raffreddare a temperatura ambiente al buio, quindi centrifugarli (5.2) a 5.000·g per 10 minuti a 4 °C. Prelevare il surnatante con una siringa (5.3) e filtrarlo (5.4) recuperando il campione derivatizzato nelle apposite microprovette per elettroforesi capillare.

A parte, derivatizzare insieme al campione, in microprovette separate, 10 µl delle soluzioni di L (S) alanina (4.12), D (R) alanina (4.13) e L (S) D (R) alanina (4.14). Questi tre campioni marcati servono per il preciso riconoscimento dei picchi della L (S) e D (R) alanina del campione.

6.3. *Elettroforesi capillare*

Installare nello strumento (5.5) il capillare (5.6) e condizionarlo lavandolo con acqua per 10 minuti e tampone (4.3) per 5 minuti sotto alta pressione (7 bar). Procedere all'analisi dei campioni predisponendo le seguenti condizioni:

- campo elettrico (costante) = 300 V·cm⁻¹;
- polarità: da - a +;
- intensità (limite): 50 mA;
- rilevazione: $\lambda = 240-260$ nm;
- iniezione campione: 2 psi·s = 30,4 Pa·s = 0,23 mm Hg·s = 3·10⁻⁴ bar·s;
- tempo di corsa: 35 minuti;
- temperatura capillare: 25 °C.

Prima di ogni corsa lavare il capillare sotto alta pressione (7 bar) con acqua per 3 minuti e tampone (4.3) per 2 minuti.

Il riconoscimento dei picchi della L (S) alanina e D (R) alanina deve essere fatto confrontando gli elettroferogrammi del campione da solo con quelli del campione marcato. Le aree dei picchi dei due enantiomeri devono essere valutate per mezzo di un idoneo programma di integrazione e calcolo.

7. **Espressione dei risultati**

Il grado di racemizzazione (%) si esprime in percentuale ed è calcolato utilizzando la seguente espressione:

Nota: Il fattore di trasformazione 2 deriva dall'accezione di racemo che, ai fini del presente metodo, viene definito come miscela proveniente da una racemizzazione spinta, a seguito della quale il rapporto dei due enantiomeri D/L è superiore a 0,5.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.7

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.4

Riconoscimento di torbe, leonarditi e ligniti nei fertilizzanti

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per il riconoscimento di torbe, leonarditi e ligniti nei fertilizzanti.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli ammendanti organici naturali.

3. Principio

Il riconoscimento si basa sulle differenze del profilo elettroforetico ottenuto per isoelettrofocalizzazione della sostanza organica estratta in sodio idrossido + sodio pirofosfato.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Sodio idrossido, NaOH, > 99%.

4.2. Sodio pirofosfato decaidrato, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$, > 99%.

4.3. Soluzione di NaOH 0,1 M e $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M

Pesare 4 g di NaOH (4.1) e 44,6 g di $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ (4.2), con una precisione di 0,01 g e porli in un matraccio tarato da 1000 ml, aggiungere circa 600 ml di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. Questa soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.4. Acrilammide, $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$, > 99,9%.

4.5. *N,N'*-metilene bisacrilammide (Bis), $\text{CH}_2\text{CHCONHCH}_2\text{NHCOCHCH}_2$, > 99,9%.

4.6. *Soluzione di acrilammide: Bisacrilammide 37,5:1 (30% T, 2,6% C)*

Pesare 29,22 g di acrilammide (4.4) e 0,78 g di Bis (4.5) con una precisione di 0,001 g e porli in un matraccio tarato da 100 ml, aggiungere circa 70 ml di acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione, portare a volume, omogeneizzare perfettamente e filtrare su carta. Conservare in un contenitore in polietilene a +4 °C al massimo per 30 giorni.

4.7. Ampholine® pH 3,5-5,0 Pharmacia LKB (80-1125-89), 0,4 g/ml.

4.8. Ampholine® pH 4,0-6,0 Pharmacia LKB (80-1125-90), 0,4 g/ml.

4.9. Ampholine® pH 6,0-8,0 Pharmacia LKB (60-1125-93), 0,4 g/ml.

4.10. *N,N,N',N'*-tetrametiletilediammina (TEMED), $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

4.11. *Soluzione di TEMED al 3% v/v*

Diluire 6 ml di TEMED (4.10) in un matraccio tarato da 50 ml con acqua. Conservare al buio a +4 °C al massimo per 2 mesi.

4.12. Ammonio persolfato, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 98%.

- 4.13. *Soluzione di ammonio persolfato 1,5% p/v*
Pesare 0,15 g di ammonio persolfato (4.12) con una precisione di 0,001 g, porli in un matraccio tarato da 10 ml, portare a volume con acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione del sale. Questa soluzione deve essere preparata fresca ogni volta.
- 4.14. *Soluzione di sodio idrossido 0,2 M (catodo)*
Pesare 0,8 g di sodio idrossido (4.1) con una precisione di 0,001 g e metterlo in un matraccio tarato da 100 ml, portare a volume con acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione. Filtrare su carta e conservare in un contenitore di polietilene a +4 °C al massimo per 2 mesi.
- 4.15. Acido *o*-fosforico, H₃PO₄, 85% (r = 1,71).
- 4.16. *Soluzione di acido o-fosforico 0,2 M (anodo)*
Diluire 1,35 ml di acido *o*-fosforico (4.15) in un matraccio tarato da 100 ml con acqua. Filtrare su carta e conservare in un contenitore di polietilene a +4 °C al massimo per 2 mesi.
- 4.17. Repel-Silane® ES, dimetildiclorosilano al 2% (p/v) in ottometil ciclo-ottosilano, Pharmacia (17-1332-01).
- 4.18. Etanolo, C₂H₅OH, 95%.
- 4.19. Acido acetico glaciale, CH₃COOH, 100%.
- 4.20. Blu brillante R-250 Coomassie®, C₄₅H₄₄N₃NaO₇S₂.
- 4.21. Rame (II) solfato pentaidrato, CuSO₄·5 H₂O, > 99,5%.
- 4.22. *Soluzione colorante: Blue R-250 0,025%, CuSO₄ 1%, etanolo 15%, acido acetico 15%*
Pesare 10 g di CuSO₄ (4.21) con una precisione di 0,01 g, porli in un matraccio tarato da 1.000 ml, aggiungere 400 ml di acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione del sale. Pesare 0,25 g di Blue R-250 (4.20) con una precisione di 0,001 g e aggiungerlo al matraccio contenente la soluzione di CuSO₄, aggiungere 150 ml di etanolo (4.18), 150 ml di acido acetico (4.19), agitare con un agitatore magnetico rotante fino alla completa dissoluzione del colorante, portare a volume con acqua e omogeneizzare. Filtrare su carta e conservare in un contenitore in vetro con chiusura ermetica. Se correttamente conservata questa soluzione ha una durata di 2 mesi, ovvero deve essere comunque sostituita dopo la colorazione di 5 piastre.
- 4.23. *Soluzione fissante: Blue R-250 0,0025%, CuSO₄ 1%, etanolo 15%, acido acetico 15%*
Pesare 10 g di CuSO₄ (4.21) con una precisione di 0,01 g, mettere in un matraccio tarato da 1.000 ml, aggiungere 400 ml di acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione del sale. Pesare 0,025 g di Blue R-250 (4.20) con una precisione di 0,001 g e aggiungerlo al matraccio contenente la soluzione di CuSO₄, addizionare 150 ml di etanolo (4.18) e 150 ml di acido acetico (4.19), agitare con un agitatore magnetico rotante fino alla completa dissoluzione del colorante, portare a volume con acqua. Filtrare su carta e conservare in un contenitore in vetro con chiusura ermetica. Se correttamente conservata questa soluzione ha una durata di 2 mesi, ovvero deve essere comunque sostituita dopo la colorazione di 5 piastre.
- 4.24. *Soluzione decolorante: etanolo 10%, acido acetico 10%*
Diluire 100 ml di etanolo (4.18) e 100 ml di acido acetico (4.19) in un matraccio tarato da 1.000 ml con acqua, agitare dolcemente fino alla completa omogeneizzazione. Conservare in un contenitore di polietilene con chiusura ermetica al massimo per 2 mesi.
- 4.25. Acido cloridrico, HCl, 35% (p/p)

4.26. *Soluzione di acido cloridrico 3 M*

Diluire 250 ml di acido cloridrico (4.25) in un matraccio tarato da 1.000 ml con acqua, agitare dolcemente fino alla completa omogeneizzazione. Conservare in un contenitore di polietilene con chiusura ermetica al massimo per 2 mesi.

5. **Apparecchiatura**

- 5.1. Tubi da dialisi in cellulosa rigenerata con pori di dimensioni molecolari nominali di 1.000 daltons.
- 5.2. Liofilizzatore
- 5.3. Lastre in vetro 125x260x3 mm.
- 5.4. Lastre in vetro 125x260x3 mm con guarnizione a U dello spessore di 0,5 mm.
- 5.5. Pinze (n. 4) con guarnizioni in gomma per lastre dello spessore 0,5 mm.
- 5.6. GelBond[®] PAG film, 124x258 mm, con una superficie idrofila ed una idrofoba, Pharmacia (80-1129-36).
- 5.7. Cella elettroforetica orizzontale con piatto refrigerabile in ceramica 210x270 mm ed elettrodi al platino.
- 5.8. Criostato a circolazione di acqua del tipo con capacità refrigerante 200 W a 5 °C, capacità pompa: pressione = 0,3 bar, flusso = 12 l/min, intervallo di lavoro: -10 ÷ +90 °C.
- 5.9. Alimentatore, intervallo di tensione: 35-3500 V, corrente massima: 400 mA, potenza massima 200 W.
- 5.10. IEF electrode strip, Pharmacia (18-1013-73).
- 5.11. pHmetro dotato di elettrodo per misure di superficie.
- 5.12. Densitometro laser ($\lambda = 633$ nm).
- 5.13. Fogli di cellophane 210x320 mm, Pharmacia (80-1129-38).

6. **Procedimento**

- 6.1. *Preparazione del campione per l'analisi*
Preparare il campione secondo quanto previsto dal Metodo A riportato nella Parte II della raccolta dei metodi ufficiali di analisi.
- 6.2. *Estrazione della sostanza organica*
Estrarre la sostanza organica secondo quanto previsto dal metodo X.2.
- 6.3. *Purificazione della sostanza organica estratta*
Neutralizzare 20 ml di estratto (6.2) con HCl (4.26), quindi porre la soluzione in un tubo da dialisi (5.1) lungo circa 30 cm e immergere un'estremità all'interno di una vasca contenente acqua. Cambiare l'acqua della vasca ogni 12 ore per almeno 3 giorni. Controllare il termine della dialisi verificando con una cartina al tornasole che il pH dell'estratto contenuto nel tubo e quello della acqua nella vasca siano uguali. Terminata la dialisi, liofilizzare (5.2) la sostanza organica estratta e purificata. Pesare 5 mg di liofilizzato, porli in una microprovetta tipo Eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 1 ml di acqua, agitare dolcemente fino alla dissoluzione del liofilizzato, conservare a -16 °C. I campioni possono essere conservati fino a 2 mesi.
- 6.4. *Preparazione della piastra*
Fare aderire alla lastra in vetro (5.3) la faccia idrofoba del supporto per gel tipo GelBond (5.5) con alcune gocce d'acqua. Montare la piastra unendo la faccia trattata con il Repel silane (4.18) della lastra dalla guarnizione a U (5.4) con la faccia della lastra di vetro (5.3) dove è stato fatto aderire il GelBond bloccando la piastra con le apposite pinze (5.5).

- 6.5. *Preparazione del gel di poliacrilammide (5%T, 2,6%C)*
 In una beuta da 150 ml mettere nell'ordine: 4,15 ml di soluzione di acrilammide-Bis (4.7), 0,72 ml di Ampholine 3,5-5,0 (4.8), 0,24 ml di Ampholine 4,0-6,0 (4.9), 0,24 ml di Ampholine 6,0-8,0 (4.10), 0,35 ml di soluzione di TEMED (4.12), 18,4 ml di acqua e 0,9 ml di soluzione di ammonio persolfato (4.14); mescolare bene per circa un minuto senza provocare la formazione di bolle d'aria all'interno della soluzione, eventualmente insufflare azoto per un minuto. Versare molto lentamente la soluzione nella fessura della piastra con una pipetta o una siringa evitando la formazione di bolle d'aria. Lasciare gelificare al buio, a temperatura ambiente per 1 ora. Conservare al buio a +4 °C al massimo per 48 ore.
- 6.6. *Isoelettrofocalizzazione*
 Reidratare il gel (6.5) versando alcune gocce d'acqua nella fessura della piastra. Disporre il gel nella cella elettroforetica (5.7) mantenendola a +2 °C con il criostato (5.8), disporre sul gel due strisce di strip (5.10) ai due bordi lunghi del gel, una (catodo) imbibita con la soluzione di sodio idrossido (4.15) e l'altra (anodo) con la soluzione di acido fosforico (4.17), collegare gli elettrodi della cella con gli strip e chiudere il circuito. Accendere l'alimentatore (5.9) della cella e impostare le seguenti condizioni di precorsa:
 - tensione (massima): 1.200 V;
 - intensità: 0,9 mA/cm;
 - potenza: 0,6 W/cm;
 - tempo: 3 ore.
 Trascorse le 3 ore di precorsa, interrompere l'alimentazione, disporre sul gel, a circa 0,5 cm dallo strip contenente la soluzione di sodio idrossido (catodo), dei rettangoli di strip lunghi circa 1 cm e distanti l'uno dall'altro circa 0,5 cm, deporre 20-50 µl di campione (6.3), portare a completa imbibizione i rettangoli di strip con acqua, rimontare la cella, riaccendere l'alimentatore e impostare le seguenti condizioni di corsa:
 - tensione (massima): 1.200 V;
 - intensità: 0,9 mA/cm;
 - potenza: 0,6 W/cm;
 - tempo: 2 ore.
 Trascorse le 2 ore interrompere l'alimentazione, togliere il gel dalla cella e misurare, con il piaccmetro (5.11), il pH della superficie del gel facendo letture ad intervalli di 0,5 cm dall'anodo verso il catodo, registrare i valori delle letture e la distanza dall'anodo.
- 6.7. *Colorazione del gel*
 Riempire una vaschetta con la soluzione colorante (4.23) e immergervi il gel, agitare dolcemente per 1 ora, sostituire la soluzione colorante con quella fissante (4.24) agitare dolcemente per 12 ore, togliere la soluzione fissante ed eliminare il colorante in eccesso con ripetuti lavaggi con la soluzione decolorante (4.24).
- 6.8. *Scansione del gel*
 Misurare l'intensità delle bande colorate con un densitometro laser (5.12) ($\lambda = 633 \text{ nm}$) e registrare il profilo dall'anodo al catodo.
- 6.9. *Conservazione del gel*
 Avvolgere il gel nella apposita busta di cellophane (5.13) facendo attenzione a formare il minor numero possibile di bolle d'aria, seccarlo all'aria mantenendolo sotto tensione per alcuni giorni e conservare il gel seccato in ambiente pulito e secco. Se correttamente seccato e conservato il gel mantiene le bande colorate per 1 anno.

7. **Espressione dei risultati**

Il riconoscimento di torbe, leonarditi e ligniti si basa sul confronto dei rispettivi profili di elettrofocalizzazione a 633 nm.

Le *torbe* (Fig. 2) sono caratterizzate da una banda molto intensa a pH 3,5, seguita da una poco intensa a pH 3,8 (regione A) e da un gruppo di bande (almeno 5 ben distinte) a pH compreso tra 4,0 e 4,4 (regione B); non sono presenti bande intense e ben focalizzate a pH > 4,4 (regione C). Le *leonarditi* (Fig. 2) presentano una banda molto intensa a pH 3,5, seguita da una poco intensa a pH 3,8 (regione A); nell'intervallo di pH compreso tra pH 3,8 e 4,4 (regione B) sono presenti un gruppo di bande ben focalizzate (almeno 5), fra le quali quella a pH maggiore è sempre la più intensa del gruppo; nell'intervallo di pH compreso tra 4,4 e 6,0 (regione C) è sempre presente un gruppo di bande molto intense (almeno 5). La regione C ha un'area relativa del profilo elettroforetico del 67% (Tab. 1), mentre le regioni A e B hanno un'area relativa del 14 e 19%, rispettivamente (Tab. 1). Le *ligniti* (Fig. 2) hanno un picco a pH 3,5 meno intenso rispetto alle torbe e alle leonarditi; nell'intervallo tra pH 3,8 e 4,4 (regione B) presentano bande poco intense e poco focalizzate, mentre nella regione a pH > 4,4 (regione C) presentano un gruppo di bande focalizzate abbastanza intense (sono riconoscibili almeno 4 bande). La regione C ha un'area relativa del 81% (Tab. 1), mentre le regioni A e B hanno un'area relativa del 8 e 11% rispettivamente (Tab. 1).

Figura 2. Confronto tra i profili di elettrofocalizzazione di una torba, una leonardite e una lignite

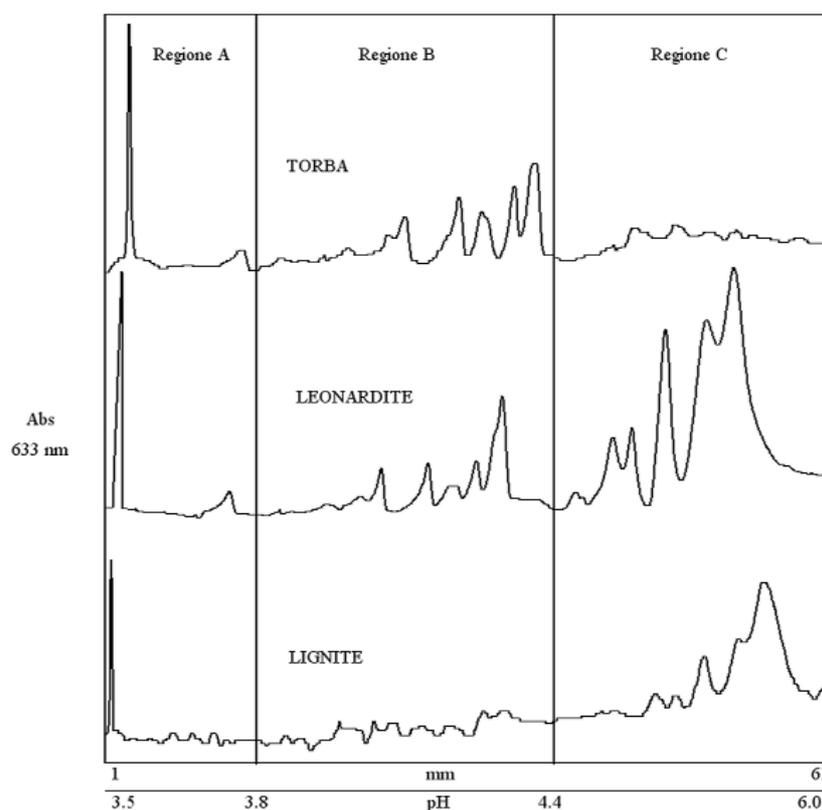


Tabella 1. Area relativa delle diverse regioni del profilo elettroforetico

Matrice	n	Regione del profilo elettroforetico		
		A (pH 3,5-3,8)	B (pH 3,8-4,4)	C (pH 4,4-6,0)
Torbe	31	51,3 ± 9,7 [†]	45,1 ± 6,9	3,6 ± 9,1
Leonarditi	15	13,9 ± 5,0	19,5 ± 6,9	66,7 ± 10,0
Ligniti	5	7,6 ± 0,9	11,3 ± 4,1	81,0 ± 4,6

[†] media ± deviazione standard

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.7

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.5

Determinazione delle masse molecolari nominali (NMW) < 10.000 daltons nei fertilizzanti a base di proteine idrolizzate

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione delle masse molecolari (NMW) prendendo come riferimento un *cut-off* a 10.000 daltons.

Nota: Il presente metodo può essere applicato anche per la determinazione di masse molecolari (NMW) diverse (per es. 1000, 5000, 20.000 daltons).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai fertilizzanti organici azotati fluidi per i quali è richiesta la dichiarazione delle masse molecolari.

3. Principio

La separazione delle NMW viene effettuata per ultrafiltrazione con membrane di esteri di cellulosa (CE), con pori di dimensione molecolare nominale (NMW) diverse, in questo caso di 10.000 daltons (2,5 nm) in condizioni di pH e forza ionica costanti, sotto flusso di gas inerte a +4 °C.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Potassio cloruro, KCl, > 99,5%.

4.2. *Potassio cloruro, KCl soluzione 10 mM*

Pesare 0,746 g di potassio cloruro (4.1) con una precisione di 0,001 g e porli in un pallone tarato da 1 l, aggiungere circa 600 ml di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di chiusura ermetica e a +4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.3. o-ftalaldeide (OPA), C₈H₆O₂.

4.4. Sodio tetraborato decaidrato, Na₂B₄O₇·10 H₂O, >99%.

4.5. Soluzione di sodio tetraborato 0,2 M

Pesare 19,07 g di sodio tetraborato decaidrato (4.4) con una precisione di 0,01 g, in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a +4 °C. La soluzione, se correttamente conservata, può essere utilizzata per 2 mesi.

4.6. Acido borico, H₃BO₃, > 99,8%.

4.7. Soluzione di acido borico 0,2 M

Pesare 12,36 g di acido borico (4.6) con una precisione di 0,01 g, in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a +4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

- 4.8. *Tampone acido borico-borato, pH 9.*
In un matraccio tarato da 200 ml, miscelare 50 ml soluzione di acido borico (4.7) con 59 ml di soluzione di sodio tetraborato (4.5), portare a volume con acqua. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a +4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.
- 4.9. Etanolo, C₂H₅OH, 95% v/v.
- 4.10. *Soluzione di OPA*
In una provetta di vetro da 10 ml con chiusura ermetica mettere nell'ordine: 2 ml di etanolo (4.9), una punta di spatola di OPA (4.3) e 5 ml di tampone acido borico-borato (4.8). Tappare e agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione dell'OPA. Questa soluzione deve essere conservata al buio a +4 °C ed è necessario prepararla fresca ogni volta.
- 4.11. Acido solforico, H₂SO₄ al 96% (ρ = 1,89).
- 4.12. Soluzione di acido solforico 2 M
Diluire con acqua 110 ml di acido solforico (4.11) in un matraccio tarato da 1000 ml sino a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

5. **Apparecchiatura**

- 5.1. Cella da ultrafiltrazione con una capacità di 10 ml.
- 5.2. Filtri da ultrafiltrazione in esteri di cellulosa (CE) con NMW da 10.000 daltons.
- 5.3. Gas inerte per forzare la filtrazione (elio).
- 5.4. Camera fredda o criostato a +4 °C.

6. **Procedimento**

- 6.1. *Preparazione del campione per l'analisi*
Omogeneizzare accuratamente il campione, pesare 10 g di campione con una precisione di 0,01 g all'interno di un matraccio tarato da 100 ml, quindi portare a volume con la soluzione di KCl (4.2) e agitare fino alla completa omogeneizzazione.
- 6.2. *Condizionamento della membrana*
Installare la membrana nella cella avendo cura di non danneggiarla, quindi condizionarla facendovi passare attraverso un opportuno volume di soluzione di KCl (4.2), in genere è sufficiente un volume pari a 5 volte la capacità della cella. L'ultrafiltrazione deve essere eseguita sotto flusso di un gas inerte (elio) e a temperatura costante (+4 °C).
- 6.3. *Ultrafiltrazione*
Mettere nella cella (5.1) 2 ml di campione (6.1), pari a 200 mg di campione iniziale ed aggiungere KCl (4.2) fino a riempire la cella. Recuperare l'eluato (< 10.000 daltons) dalla cella in un matraccio tarato da 100 ml contenente 5 ml di soluzione di H₂SO₄ (4.12). Man mano che la cella si vuota deve essere nuovamente riempita con la soluzione di KCl (4.2). Il termine del passaggio di materiale organico azotato con massa molecolare < 10.000 daltons viene valutato recuperando alcune gocce dell'eluato dalla cella all'interno di una provetta di vetro dotata di tappo e aggiungendovi 1 ml della soluzione di OPA (4.10). Dopo aver agitato dolcemente la provetta per un minuto, riporla al buio a +4 °C per 20 minuti, trascorsi i quali controllare il colore della soluzione contro quello della soluzione di OPA (4.10). Se il colore della soluzione contenente le gocce di eluito è più scura di quella di OPA (4.10) continuare l'ultrafiltrazione, se non è possibile notare a

vista alcuna differenza l'ultrafiltrazione può essere considerata conclusa. Quindi terminata l'ultrafiltrazione portare a volume il matraccio contenente la frazione eluita (< 10.000 daltons) e recuperare in modo quantitativo in un matraccio da 100 ml la frazione (> 10.000 daltons) di campione rimasta nella cella, utilizzando sempre la soluzione di KCl (4.2).

6.4. *Determinazione del contenuto in azoto organico e carbonio organico*

Sul campione iniziale e su entrambe le frazioni ottenute determinare:

- il contenuto in azoto organico (sottrarre dal valore dell'azoto totale il valore dell'azoto ammoniacale e nitrico) secondo quanto previsto dal Metodo IV.12.
- il contenuto in carbonio organico secondo quanto previsto dal Metodo X.1.

7. **Espressione dei risultati**

Le masse molecolari si esprimono mediando i valori del contenuto in azoto organico (Norg) e del carbonio organico (Corg) di ogni frazione (>10kDa e <10kDa), espressi in percentuale sui rispettivi contenuti totali:

$$\text{Frazione}_{<10 \text{ kDa}} = \frac{\frac{\text{Norg}_{<10 \text{ kDa}} (\%) + \text{Corg}_{<10 \text{ kDa}} (\%)}{\text{Norg}_{\text{totale}} (\%) + \text{Corg}_{\text{totale}} (\%)}}{2} \cdot 100$$

$$\text{Frazione}_{>10 \text{ kDa}} = \frac{\frac{\text{Norg}_{>10 \text{ kDa}} (\%) + \text{Corg}_{>10 \text{ kDa}} (\%)}{\text{Norg}_{\text{totale}} (\%) + \text{Corg}_{\text{totale}} (\%)}}{2} \cdot 100$$

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.7

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.6

Determinazione del grado d'idrolisi nei fertilizzanti a base di proteine idrolizzate

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione del grado d'idrolisi nei fertilizzanti.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai concimi organici azotati ed agli ammendanti a base di idrolizzati proteici.

3. Principio

Il grado di idrolisi qui proposto è calcolato sulla base del rapporto tra il contenuto in azoto α -amminico (N_{α}) e l'azoto organico (N_{org}) del fertilizzante. Il contenuto in N_{α} è valutato per via spettrofotometrica utilizzando l'*o*-ftaldialdeide (OPA) come agente derivatizzante.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Sodio tetraborato decaidrato ($Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$) $\geq 99,5\%$.

4.2. *Soluzione di sodio tetraborato (4.1) 0,1 mol l⁻¹*
pesare 38,14 g di sodio tetraborato (4.1) in un pallone da 1000 ml contenente 500 ml di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione e portare a volume con acqua. Se correttamente conservata questa soluzione ha una durata di alcuni mesi.

4.3. Sodio dodecil solfato (SDS) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) $\geq 99\%$.

4.4. *Soluzione di SDS (4.3) al 20% (p/p)*
pesare in un pallone tarato da 50 ml 10 g di SDS (4.3), aggiungere acqua e dissolvere sotto leggera agitazione, quindi portare a volume con acqua. Per ottenere dei risultati più accurati si consiglia di filtrare la soluzione su carta prima dell'uso. Se correttamente conservata ha una durata di alcuni mesi.

4.5. *O*-ftaldialdeide (OPA) ($C_8H_6O_2$) $\geq 99\%$.

4.6. Metanolo (CH_3OH) $\geq 99,8\%$.

4.7. *Soluzione di OPA (4.5)*
in una provetta di vetro con chiusura ermetica pesare 200 mg di OPA (4.5), aggiungere 5 ml di metanolo (4.6), chiudere ermeticamente ed agitare fino alla completa dissoluzione dell'OPA. Questa soluzione deve essere preparata al momento e deve essere mantenuta al buio.

4.8. 2-mercaptoetanololo (C_2H_6OS) $\geq 99\%$.

Avvertenze: Alcuni reagenti usati in questa procedura sono pericolosi; osservare particolare cura durante il loro utilizzo. Evitare il contatto con la pelle ed occhi e l'inalazione dei vapori.

Si raccomanda all'operatore di osservare le indicazioni riportate sull'etichetta del contenitore dei prodotti ed eventualmente consultare le relative schede di sicurezza per le specifiche informazioni sulla pericolosità dei reagenti usati e sulle modalità di smaltimento.

5. Apparecchiatura

- 5.1. Siringhe da 1 ml tipo usa e getta.
- 5.2. Filtri da siringa da 1 ml con pori del diametro di 0,45 mm in politetrafluoroetilene (PTFE).
- 5.3. Spettrofotometro dotato di lampada UV.
- 5.4. Cellette in quarzo da 1,5 ml con cammino ottico lungo 1 cm.

6. Procedimento

6.1. Preparazione del campione per l'analisi

Omogeneizzare accuratamente il campione, quindi pesare circa 50 mg di campione all'interno di un matraccio tarato da 10 ml e annotare la pesata (circa 5 g l⁻¹), portare a volume con acqua e agitare fino alla completa omogeneizzazione. Quindi filtrare un'aliquota del campione, prima dell'analisi, con una siringa (5.1.) utilizzando filtri da 0,45 µm (5.2.).

6.2. Preparazione del derivatizzante

Lavorando sotto cappa chimica, porre in un pallone tarato da 50 ml nell'ordine: 25 ml di soluzione di sodio tetraborato (4.2.), 2,5 ml di soluzione di SDS (4.4.), 1 ml di soluzione di OPA (4.7.), 100 µl di 2-mercaptoetanolo (4.8.), portare a volume con acqua, agitare dolcemente fino alla completa omogeneizzazione. Preparare, inoltre, una soluzione contenente gli stessi reagenti sopra riportati con l'esclusione dell'OPA. Questa soluzione serve per la misura del background del campione. Queste soluzioni devono essere preparate al momento dell'uso e conservate al buio, a +4 °C (o sotto ghiaccio) per tutta la durata dell'analisi.

6.3. Misure allo spettrofotometro

Accendere lo spettrofotometro (5.3.), selezionare la lunghezza d'onda (λ) di misura a 340 nm e attendere il tempo necessario per scaldare la lampada. Quindi all'interno di una celletta di quarzo (5.4.) mettere nell'ordine 10 µl di soluzione di campione preparato (6.1.) e 990 µl di soluzione di derivatizzante (6.2.), agitare brevemente per inversione, riporre la celletta nello spettrofotometro a temperatura ambiente e dopo 2 minuti esatti registrare il valore di assorbanza a 340 nm. Per la misura del background del campione operare come sopra riportato, utilizzando al posto della soluzione derivatizzante (6.2.) la soluzione senza l'OPA.

6.4. Determinazione dell'azoto organico

La determinazione dell'azoto organico deve essere effettuata secondo il metodo IV.12.

7. Espressione dei risultati

Il contenuto in N_α si ottiene dalla seguente formula:

$$N_{\alpha} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 14 \cdot \frac{\Delta \text{abs}_{340} \cdot f}{\varepsilon \cdot b \cdot c} \cdot 1000$$

dove,

14 = peso atomico dell'azoto (g mol⁻¹): si considera che ogni mole di peptide o amminoacido contenga 14 g N_α,

Δabs₃₄₀ = abs₃₄₀ del campione derivatizzato - abs₃₄₀ del campione non derivatizzato (background),

f = fattore di diluizione (10 µl → 1 ml = 100),

ε = coefficiente di estinzione molare medio dei peptidi derivatizzati con OPA (6000 M⁻¹ cm⁻¹),

b = costante di cella (1 cm),

c = concentrazione del campione analizzato (circa 5 g l⁻¹),

1000 = fattore di conversione unità di misura (g → mg).

Semplificando, l'equazione (1) diventa:

$$N_{\alpha} \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = 233 \cdot \frac{\Delta abs_{340}}{c}$$

Il grado d'idrolisi si calcola dalla sua definizione con la seguente formula:

$$\text{Grado di idrolisi (\%)} = \frac{N_{\alpha}}{N_{\text{org}}} \cdot 100$$

dove,

N_{α} = azoto α -amminico (mg g⁻¹),

N_{org} = azoto organico (mg g⁻¹).

In teoria, un campione completamente idrolizzato dovrebbe avere tutto l'azoto organico in forma α -amminica e quindi un grado d'idrolisi prossimo a cento.

Nota: l'OPA, in ambiente alcalino e in presenza di 2-mercaptoetanololo, non reagisce con le ammine che presentano un gruppo ϵ -amminico (ad es. la prolina e l'idrossiprolina). Pertanto questo metodo tende a sottostimare il grado d'idrolisi reale del fertilizzante che contenga apprezzabili quantità dei suddetti amminoacidi.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.8

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.7

Test di biodegradabilità per sostanze organiche alifatiche di sintesi nei fertilizzanti

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo convenzionale per la determinazione della biodegradabilità delle sostanze organiche di sintesi.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutte le sostanze organiche alifatiche sintetiche contenute nei prodotti fertilizzanti.

3. Principio

La determinazione della biodegradabilità viene effettuata in ambiente acquoso aerobico misurando la quantità di anidride carbonica che si sviluppa ad opera di ceppi batterici selezionati (normalmente presenti nel terreno agrario) rapportandola alla quantità che il fertilizzante avrebbe dovuto sviluppare in base al contenuto di carbonio organico determinato con il metodo Springer-Klee X.1.

Il procedimento viene mantenuto sotto controllo sottoponendo al trattamento un opportuno standard di riferimento strutturalmente simile al composto od ai composti organici di cui si desidera valutare la biodegradabilità.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare reagenti di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Acqua bidistillata, esente da sostanze tossiche (in particolare da rame), a basso contenuto di carbonio ($< 2,0$ mg/l TOC), con resistività ≥ 18 megaohms/cm.

4.2. *Soluzione madre contenente microelementi preparata a partire da:*

EDTA sale sodico	0,15 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3,0 g
MnSO ₄ · 2H ₂ O	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
CoSO ₄ o CoCl ₂	0,1 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄	0,1 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01 g
AlK(SO ₄) ₂	0,01 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,01 g

Sciogliere e portare a 1000 ml con acqua (4.1.), pH $7,2 \pm 0,2$.

4.3. *Soluzione madre vitaminica preparata a partire da:*

Biotina (vitamina H)	2,0 mg
Acido folico	2,0 mg
Piridossina cloridrato (B ₆)	10,0 mg
Tiamina cloridrato (B ₁)	5,0 mg
Riboflavina (B ₂)	5,0 mg
Acido nicotinico (PP)	5,0 mg
Pantenolo	5,0 mg
Vitamina B ₁₂	0,1 mg
Acido p-aminobenzoico	5,0 mg
Acido lipoico	5,0 mg

Sciogliere e portare a 1000 ml con acqua (4.1.).

4.4. *Terreno di coltura preparato a partire da:*

Soluzione madre 4.2.	10,0 ml
Soluzione madre 4.3.	10,0 ml
K ₂ HPO ₄	0,3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g

Sciogliere e portare a 1000 ml con acqua (4.1.).

4.5. *Substrato di laboratorio.*

Per la selezione in purezza dei batteri usare Nutrient Broth (NB) agarizzato costituito da:

Estratto di carne	2,0 g
Peptone batteriologico	5,0 g
Agar batteriologico	15,0 g

Portare a 1000 ml con acqua (4.1.), pH 6,8 ± 0,2.

4.6. Soluzione di NaOH 0,5N.

4.7. Soluzione di BaCl₂ · 2H₂O 1M.

4.8. Soluzione di HCl 1N.

4.9. Soluzione di fenolftaleina.

5. **Apparecchiatura**

Per ciascun prodotto da esaminare (il fertilizzante, la sostanza di riferimento e il bianco) e in base al numero di replicati necessari, l'apparecchiatura prevede l'impiego di 5 contenitori di vetro collegati in serie ad una valvola regolatrice di flusso elettronica o manuale che permette di regolare e mantenere un flusso costante di aria, pari a 600 ml/h.

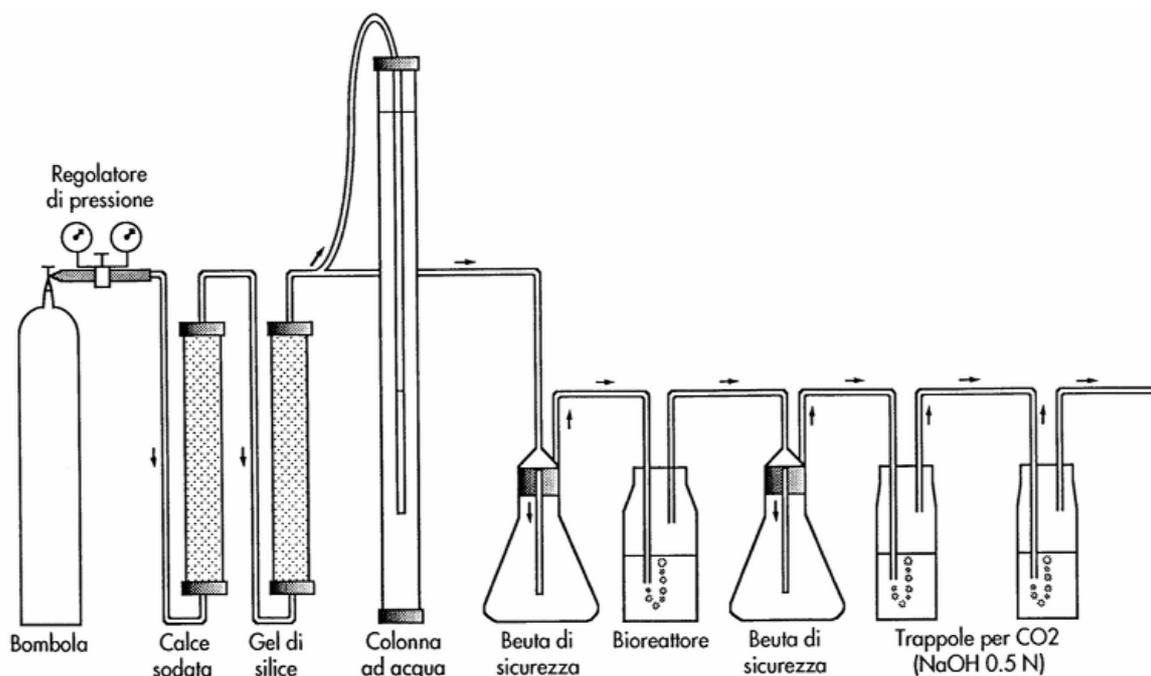
5.1. L'impianto si articola nelle seguenti parti (figura 3):

5.1.1. Linea di decarbonatazione.

L'aria erogata da una bombola viene fatta passare in una linea di decarbonatazione e deumidificazione costituita da colonne contenenti calce sodata e gel di silice, seguite da una colonna di policarbonato di altezza pari a due metri contenente acqua, avente lo scopo di compensare eventuali sbalzi di pressione creatisi nel sistema.

5.1.2. Reattori per la degradazione.

Flaconi di vetro scuro della capacità di 500 ml, con tappo a vite forato a tenuta, dotati di un tubo pescante in entrata da cui gorgoglia l'aria decarbonatata. Una seconda apertura, chiusa con tappo a tenuta, consente di misurare l'attività dell'inoculo, il pH e la temperatura. I reattori vanno protetti dalla luce per impedire la proliferazione di alghe e mantenuti sotto costante agitazione.



5.1.3. Polmoni di sicurezza.

Ogni reattore è preceduto e seguito da una beuta vuota, a tenuta, della capacità di 500 ml, per impedire il ritorno della soluzione di NaOH o del terreno di coltura dalle trappole al reattore e/o da quest'ultimo alle valvole regolatrici di flusso.

5.1.4 Trappole per CO₂.

Batteria di due assorbitori (drechsel) della capacità di 150 ml collegate in serie, contenenti ciascuna 100 ml di NaOH 0,5 N.

5.2. Preparazione dell'inoculo.

L'obiettivo è quello di isolare dal terreno microrganismi in grado di utilizzare il fertilizzante come substrato nutritivo. Si consiglia di selezionare da 3 a 5 ceppi batterici scegliendo un terreno agrario di tessitura equilibrata e di media fertilità.

A tale scopo, si aggiunge 1 g di terreno ad una beuta contenente 250 ml di terreno di coltura (4.4.) sterilizzato e addizionato di fertilizzante, portato a pH 7 e messo ad incubare a 28°C per 5 giorni in termostato, sotto costante agitazione. La procedura, in duplicato, deve essere realizzata in contemporanea con un test privo del prodotto in esame. Dopo sviluppo si lascia decantare brevemente e si procede ad una semina su piastre contenenti il substrato di laboratorio NB agarizzato (4.5.) riproducendo le diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ (usare per le diluizioni soluzione fisiologica sterile), lasciando poi incubare a 28 °C in termostato per 3 giorni. Le colonie batteriche evidenziate vanno isolate e riprodotte in purezza.

I ceppi batterici selezionati vanno infine inoculati in ragione dell'1-2% in 30 ml di NB liquido (4.5., privo di agar batteriologico), contenuti in provette da 50 ml e fatti sviluppare in termostato sotto costante agitazione a 28°C per 3 giorni. La miscela di microrganismi viene successivamente lavata con soluzione fisiologica sterile e centrifugata a 6000 giri per 20 minuti. Tale operazione deve essere ripetuta almeno 3 volte.

L'inoculo per la prova respirometrica si ottiene miscelando le cellule batteriche provenienti dai lavaggi e soluzione fisiologica sterile. Esso deve contenere 10⁷ unità formanti colonie (UFC) per ml, accertato mediante standard turbidimetrico e va impiegato lo stesso giorno della preparazione.

5.3. Prova respirometrica

La determinazione della biodegradabilità riguarderà il fertilizzante in esame, lo standard di riferimento scelto e un bianco e, per ciascuno di questi campioni, sarà effettuata in duplicato.

5.3.1. Preparazione dei campioni.

Il materiale da analizzare deve essere una soluzione vera o una sospensione omogenea. Se non si verifica questa condizione occorre diluire con acqua (4.1.).

La soluzione dello standard di riferimento deve avere un titolo in C analogo alla soluzione o sospensione della sostanza da esaminare.

5.3.2. Esecuzione della prova.

Nei reattori di ciascuna linea di analisi si introducono 200 ml di terreno di coltura (4.4.), a cui si aggiunge l'inoculo in ragione dell'1% (V/V). Si manda quindi in pressione l'impianto e si lascia aerare per 24 ore con aria decarbonatata, per eliminare la CO₂ presente nel sistema. Al termine della ventilazione le due trappole per la CO₂ vengono riempite ciascuna con 100 ml della soluzione di NaOH 0,5 N.

Nel reattore di ciascuna linea, eccettuati quelli per lo studio del "bianco", viene quindi introdotto il substrato da analizzare in quantità equivalenti a 40,91 mg di C_{org}, corrispondenti ad uno sviluppo teorico di 150 mg di CO₂.

La CO₂ svolta nei reattori viene condotta dal flusso d'aria nelle trappole, dove reagisce con la soluzione di NaOH, producendo Na₂CO₃.

La prova deve essere effettuata alla temperatura costante di 25 °C.

5.3.3. Determinazione della CO₂.

A date prestabilite, corrispondenti ai giorni 2, 4, 8, 16 e 25 dall'inizio della prova, viene staccato l'assorbitore di CO₂ più vicino al reattore. La quantità di CO₂ svolta viene determinata titolando il contenuto delle trappole con una soluzione di HCl 1N, previa aggiunta di 20 ml di BaCl₂ · 2H₂O 1M in presenza di fenolftaleina. Il secondo assorbitore viene avvicinato di un posto al reattore stesso e all'estremità della serie si aggiunge un nuovo assorbitore contenente 100 ml di soluzione fresca di NaOH 0,5N.

6. Calcolo della biodegradazione e conclusioni

La quantità di CO₂ sviluppata viene calcolata nel seguente modo:

$$mg\ CO_2 = (B - V) N \cdot E$$

dove:

V = volume (ml) di acido per titolare la soda nei collettori di CO₂ dei campioni trattati

B = volume (ml) di acido per titolare la soda nei collettori di CO₂ dei campioni controllo

N = normalità dell'acido

E = PE_{CO₂} = 22

La biodegradazione del prodotto viene espressa percentualmente in termini di CO₂ sviluppata entro il 25° giorno di prova (B_{25°}) rispetto alla CO₂ teoricamente sviluppabile in base al contenuto di carbonio organico determinato con il metodo Springer-Klee (Metodo X.1).

$$B_{25^\circ} \% = \frac{mg\ CO_2\ sviluppata}{mg\ CO_2\ teorica} \times 100$$

Sono ritenute biodegradabili le sostanze organiche alifatiche di sintesi che mostrano entro 25 giorni un tasso di mineralizzazione non inferiore al 50% rispetto al contenuto di C organico determinato sperimentalmente.

I risultati della prova di degradazione si considerano validi se sono soddisfatte le seguenti condizioni:

nella stessa serie di determinazioni, il prodotto di riferimento deve dare una biodegradazione uguale o superiore all'80% entro 25 giorni. In caso contrario, l'intera serie deve essere scartata e la prova ripetuta;

durante la prova, nelle bottiglie del "bianco" non deve verificarsi uno sviluppo significativo di CO₂, che non può superare 5 mg di CO₂ per 200 ml di soluzione.

A titolo esemplificativo viene riportato il diagramma di biodegradabilità di una sostanza organica alifatica di sintesi.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.8

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.8

Identificazione della presenza di “sangue” nei fertilizzanti

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo quali-quantitativo per identificare e determinare la presenza di “sangue” nei fertilizzanti.

2. Campo d'applicazione

Il metodo è applicabile ai concimi organici azotati “sangue secco” e “sangue fluido”. La stessa metodica può essere utilizzata anche per verificare (analisi qualitativa) la presenza di “sangue” nei seguenti fertilizzanti: “Miscela di concimi organici N e NP” e nei concimi organo-minerali contenenti “sangue secco” e “sangue fluido”.

3. Principio

La proteina più importante e caratteristica presente nel sangue è l'emoglobina. Si tratta di una proteina globulare caratterizzata dalla presenza del gruppo prostetico eme che contiene ferro (Fe^{2+}), facilmente rilevabile per via spettrofotometrica nello spettro del visibile. Nel presente metodo, il gruppo eme dell'emoglobina del sangue viene estratto mediante una soluzione di trietanolammina e caratterizzato per via spettrofotometrica. Il massimo di assorbanza dell'emoglobina si ha per $\lambda = 406,8$ nm. Il contenuto di emoglobina nei concimi organici azotati è determinato confrontando l'assorbanza a 406,8 nm dell'estratto in trietanolammina con quello di uno standard di emoglobina. Per l'accertamento qualitativo della presenza di “Sangue” in concimi contenenti oltre al sangue altre matrici organiche è necessario eseguire uno spettro di assorbimento nella regione di lunghezza d'onda (λ) compresa fra 340 e 500 nm. Dalla derivata prima [$f'(x)$] di questo spettro di assorbimento è possibile determinare la presenza di emoglobina osservando la presenza di un picco caratteristico a 420 nm.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Emoglobina (substrato per proteasi, sec. Anson).

4.2. Trietanolammina, $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$, $\geq 99\%$.

4.3. *Soluzione di trietanolammina al 5%.*

Sciogliere 50 ml di trietanolammina (4.2.) in 500 ml di acqua in un matraccio da 1000 ml e portare a volume con acqua. La soluzione deve essere conservata in un contenitore a chiusura ermetica e mantenuta a + 4 °C.

4.4. *Soluzione di trietanolammina al 2,5% a pH 9,2.*

Sciogliere 25 ml di trietanolammina (4.2.) 500 ml di acqua in un matraccio da 1000 ml e portare a volume con acqua. La soluzione deve essere conservata in un contenitore a chiusura ermetica e mantenuta a + 4 °C.

In alternativa, diluire al 50% (v/v) la soluzione di trietanolammina al 5% (4.3.) con acqua deionizzata.

Portare quindi la soluzione a pH 9,2 con HCl 0,1M (4.6.).

- 4.5. Acido cloridrico, HCl, 36%.
- 4.6. *Soluzione di acido cloridrico 0,1 M.*
Diluire 83,33 ml di HCl 36% (4.5.) in un matraccio tarato da 1000 ml con acqua fino a volume.

Avvertenze: alcuni reagenti usati in questa procedura sono pericolosi; osservare particolare cura durante il loro utilizzo. Evitare il contatto con la pelle ed occhi e l'inalazione dei vapori. Si raccomanda all'operatore di osservare le indicazioni riportate sull'etichetta del contenitore dei prodotti ed eventualmente consultare le relative schede di sicurezza per le specifiche informazioni sulla pericolosità dei reagenti usati e sulle modalità di smaltimento.

5. Apparecchiatura

- 5.1. Spettrofotometro UV/VIS dotato di software per l'elaborazione dei risultati (calcolo della derivata prima).
- 5.2. Agitatore magnetico con piastra riscaldante.
- 5.3. Termometro tarato fino a 100°C.
- 5.4. Piaccametro.
- 5.5. Filtri di carta tipo Whatman n. 42.
- 5.6. Stufa.

6. Procedimento

6.1. *Preparazione dei campioni per l'analisi*

I campioni solidi devono essere macinati e setacciati a 0,45 mm secondo quanto previsto dal metodo «Preparazione del campione per l'analisi» (D.M. 24 marzo 1986).

I campioni fluidi devono essere accuratamente agitati e omogeneizzati prima di essere sottoposti ad analisi.

6.2. *Estrazione dell'emoglobina*

6.2.1. Concimi organici azotati «sangue secco» e «sangue fluido»

6.2.1.1. Campioni solidi

Pesare 0,125 g di campione, con una precisione di 0,1 mg, in un matraccio da 100 ml, aggiungere 50 ml di soluzione di trietanolammina al 5% (4.3.) e porre il matraccio sull'agitatore magnetico (5.2.) preriscaldato a 85°C. Controllare la temperatura della sospensione e quando ha raggiunto 85°C continuare l'agitazione per 30 minuti. Raffreddare la sospensione a temperatura ambiente, aggiustare il pH a 9,2 mediante l'aggiunta di HCl 0,1 M (4.6.), portare a volume con acqua deionizzata. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 500 ml (0,25 g l⁻¹) e portare a volume con trietanolammina al 2,5% a pH 9,2 (4.4.). Filtrare su filtro di carta (5.4.).

6.2.1.2. Campioni fluidi

Pesare 1 g di campione, con una precisione di 0,1 mg, in un matraccio da 100 ml, aggiungere 50 ml di soluzione di trietanolammina al 5% (4.3.) e porre il matraccio sull'agitatore magnetico (5.2.) preriscaldato a 85°C. Procedere quindi come descritto al punto 6.2.1.

6.2.2. Miscela di concimi organici N e NP e concimi organo-minerali contenenti «sangue secco» e/o «sangue fluido»

Pesare 1 g di campione di concime in un matraccio da 100 ml, con una precisione di 0,1 mg, aggiungere 50 ml di soluzione di trietanolammina al 5% (4.3.) e porre il matraccio sull'agitatore magnetico (5.2.) preriscaldato a 85°C. Controllare la temperatura della

sospensione e quando ha raggiunto 85°C continuare l'agitazione per 30 minuti. Raffreddare la sospensione a temperatura ambiente, aggiustare il pH a 9,2 mediante l'aggiunta di HCl 0,1 M (4.6.), portare a volume con acqua deionizzata, filtrare su filtro di carta (5.4.).

6.3. *Preparazione degli standard di emoglobina (da preparare solo nel caso di campioni di concimi organici azotati «sangue secco» e «sangue fluido»)*

Preparare delle soluzioni da 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 mg l⁻¹ di emoglobina (4.1.) in trietanolammina al 2,5% a pH 9,2 (4.4.).

6.4. *Misure allo spettrofotometro*

6.4.1. *Concimi organici azotati: «sangue secco» e «sangue fluido»*

Utilizzando lo spettrofotometro UV/VIS (5.1.) procedere alla misura dell'assorbanza degli standard di emoglobina (6.3.) e degli estratti diluiti (6.2.1 e 6.2.2.) alla lunghezza d'onda (λ) di 406,8 nm utilizzando celle con percorso ottico di 1 cm e leggendo contro bianco preparato usando la soluzione di trietanolammina al 2,5% (4.4.) portata a pH 9,2 con HCl 0,1 M (4.6.).

6.4.2. *Miscela di concimi organici N e NP e concimi organo-minerali contenenti «sangue secco» e/o «sangue fluido».*

Utilizzando lo spettrofotometro UV/VIS (5.1.) registrare uno spettro di assorbimento dell'estratto nella regione di lunghezza d'onda (λ) compresa tra 340 e 500 nm utilizzando celle con percorso ottico di 1 cm e leggendo contro un bianco preparato usando la soluzione di trietanolammina al 2,5% a pH 9,2 (4.4.). Memorizzare gli spettri d'assorbimento per il successivo calcolo della derivata prima della funzione.

7. **Espressione dei risultati**

7.1. *Concimi Organici azotati: “sangue secco” e “sangue fluido”*

Utilizzare la curva di taratura costruita con lo standard di emoglobina per determinarne la concentrazione negli estratti:

$$\text{Emoglobina (mg g}^{-1}\text{)} = (a \cdot \text{abs}_{340} - m) / b \cdot c$$

dove,

a = coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuta dall'interpolazione della curva di taratura dell'emoglobina (concentrazioni dell'emoglobina in mg l⁻¹),

abs_{340} = assorbanza a 406,8 nm dell'estratto di concime,

m = intercetta della retta di regressione lineare ottenuta dall'interpolazione della curva di taratura dell'emoglobina,

b = costante di cella dello spettrofotometro (1 cm),

c = concentrazione del campione nell'estratto analizzato (g l⁻¹).

Da una serie di campioni di concimi analizzati nelle condizioni sperimentali descritte in questo metodo, è stato possibile stabilire che il valore medio di presenza di emoglobina nei concimi organici azotati “sangue secco” e “sangue fluido” era pari all'81,4% con una deviazione standard di 5,0 (dato espresso p/p sulla sostanza secca). Si ritiene pertanto ragionevole stabilire che nei concimi organici azotati “sangue secco” e “sangue fluido” la percentuale di emoglobina nel campione analizzato debba essere > 75% (dato espresso p/p sulla sostanza secca).

7.2. *Miscela di concimi organici N e NP e concimi organo-minerali contenenti «sangue secco» e/o «sangue fluido».*

In questi campioni, dove la presenza di “sangue” dichiarata può essere dell’ordine del 5-10% (la legge 19 ottobre 1984 n. 748 consente la dichiarazione in etichetta delle matrici organiche solo se presenti in quantità $\geq 5\%$ in peso del concime), si deve procedere alla determinazione della derivata prima $[f'(x)]$ dello spettro di assorbimento del campione nell’intervallo compreso tra 340 e 500 nm (6.4.). La presenza di “sangue” è determinabile, nella derivata prima $[f'(x)]$ dello spettro di assorbimento, dalla presenza di un picco caratteristico a 420 nm.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.8

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.9

Estrazione e caratterizzazione elettroforetica del DNA fungino da matrici organiche

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per l'estrazione di DNA genomico di funghi da matrici organiche. E' stata sviluppata una procedura veloce per estrarre DNA genomico da biomasse organiche in meno di 30 minuti. Questo metodo, oltre ad essere notevolmente rapido, evita l'utilizzo di solventi organici tossici come il fenolo ed il cloroformio utilizzati nei metodi tradizionali (Van Burik *et al.*, 1998). Permette di ottenere circa 1-50 µg di DNA genomico di dimensioni comprese tra le 6 e le 25 kilobasi (kb), a seconda del tipo di suolo e del numero degli organismi presenti. Tale metodo è stato adattato alla caratterizzazione di materiale genetico fungino in biomasse organiche di diversa origine.

2. Campo di applicazione

Il metodo è utilizzabile per estrarre DNA genomico da miceli o spore fungini in biomasse organiche di diversa origine.

3. Principio

Il sistema, grazie all'utilizzo di un micronizzatore (o disgregatore) e ad una attenta scelta dei reagenti, è in grado di lisare le cellule e stabilizzare il DNA con perdite minime di acidi nucleici.

4. Reagenti

- 4.1. Tampone di fosfato di sodio
- 4.2. Tampone MT
- 4.3. Soluzione precipitante per proteine
- 4.4. Matrice ad elevata affinità per il DNA
- 4.5. Soluzione di lavaggio priva di DNAasi contenente etanolo e sali. Aggiungere 100 ml di etanolo a 12 ml di soluzione madre (SEWS-M) priva di DNAasi. Agitare e conservare a temperatura ambiente .
- 4.6. Soluzione di eluizione del DNA. H₂O ultra-pura.
- 4.7. TAE 1X (Tris-EDTA-Acetato). Soluzione base (50X): disciogliere 242 g di Tris base e 57,1 g di acido acetico glaciale in 100 ml di EDTA 0.5 M (pH 8); portare quindi a volume finale di 1 l con H₂O distillata.
- 4.8. Agarosio
- 4.9. *Bromuro di etidio (EtBr): 3,8 diamino-5-etil-6-fenilfenantridiobromuro (C₂₁H₂₀BrN₃).*
Soluzione base: aggiungere 10 mg di EtBr per ml di H₂O distillata, agitare e conservare a 4°C in bottiglia scura. Per ottenere la concentrazione di lavoro diluire la soluzione madre fino ad ottenere 0,5-1 µg/ml di EtBr.
- 4.10. Blu di bromofenolo (BBF). Aggiungere 0,25% di blu di bromofenolo e 40% di saccarosio in H₂O distillata; conservare a 4°C.
- 4.11. DNA plasmidico di riferimento

5. Apparecchiatura

- 5.1. Tubi di polietilene (forniti col kit), contenenti una miscela di microsferette in ceramica e in silicio di due diverse dimensioni, disegnate per lisare efficacemente qualsiasi tipo di microrganismo, compresi quelli storicamente difficili da lisare come le spore eubatteriche e le endospore, batteri gram-positivi, lieviti, alghe, nematodi e funghi.
- 5.2. Filtri che assorbono il DNA (forniti col kit)
- 5.3. Tubi porta-filtro (forniti col kit)
- 5.4. Disgregatore FastPrep120 Instruments, Q-Biogene (RESNOVA) o analoghi, con rotore da 12 posti per tubi da 2 ml, in grado di agitare i tubi in ogni direzione a velocità molto elevate.
- 5.5. Cella elettroforetica orizzontale con elettrodi di platino
- 5.6. Alimentatore elettrico (5-200V- 200 W max)
- 5.7. Transilluminatore a raggi UV con sistema di acquisizione fotografica dell'immagine
- 5.8. Micropipette: P100, P200, P1000

6. Procedimento

6.1. Estrazione del DNA

Porre il campione (100-500 mg se secco o 350-800 μ l se liquido) nei tubi di polietilene contenenti una miscela di microsferette in ceramica e in silicio ed aggiungere 978 μ l di tampone di fosfato di sodio e 122 μ l di tampone MT. A causa del vigoroso movimento sviluppato dallo strumento, è stata osservata una pressione significativa sul tubo. Il contenuto non dovrebbe superare i 7/8 del volume totale del tubo. Lo spazio lasciato migliora notevolmente l'omogeneizzazione del campione.

Inserire i tubi nel disgregatore (5.4.) e processare i campioni per 20 secondi a velocità 6,5 dello strumento. Centrifugare nuovamente i tubi per 5 minuti a 13.000 giri/minuto e trasferire i surnatanti (circa 700-800 μ l) in tubi nuovi. Aggiungere 250 μ l di soluzione che precipita le proteine (4.3.) e agitare ad inversione a mano per 10 volte. Centrifugare quindi i tubi per 5 min ad una velocità di 13.000 giri/minuto e trasferire i supernatanti in nuovi tubi da 15 ml, in cui si aggiungeranno 500 μ l di matrice con affinità per il DNA (4.4., risospendere la soluzione, agitando bene prima dell'uso). Agitare per inversione su un rotore, oppure a mano, per 10 minuti per consentire al DNA di legarsi alla matrice ed attendere 5 min affinché precipiti la resina; togliere quindi, con cautela, 500 μ l del supernatante, senza toccare la resina, e buttarlo via. Risospendere quindi la resina rimanente col surnatante rimasto, e trasferirne circa 600 μ l in un filtro che assorbe il DNA (5.2.) inserito in un tubo porta-filtro (5.3.).

Centrifugare i campioni per 1 min a velocità 13.000 giri/minuto e poi svuotare i tubi porta-filtro (5.3.); aggiungere quindi il surnatante rimasto nel filtro che assorbe il DNA (5.2.). Centrifugare ancora per 1 min a velocità 13.000 giri/minuto ed aggiungere 500 μ l di soluzione di lavaggio (4.5.) sul filtro. Centrifugare ancora per 1 min a 13.000 giri/minuto di velocità, svuotare i tubi porta filtro e centrifugare ancora una volta per 2 min a 13.000 giri/minuto per asciugare bene la resina. Infine svuotare i tubi porta-filtro (5.3.), trasferire i filtri che assorbono il DNA in nuovi tubi porta-filtro e lasciare ad asciugare per 5 minuti con il tappo aperto a temperatura ambiente. Aggiungere dunque 100 μ l di soluzione di eluizione del DNA (4.6.) ai filtri che assorbono il DNA e risospendere delicatamente la resina con la punta della pipetta. Infine centrifugare per 2 min a 13.000 giri/minuto, aggiungere quindi altri 50 μ l di soluzione di eluizione del DNA (4.6.) al filtro e centrifugare per altri 2 min a 13.000 giri/minuto di velocità. Conservare quindi il supernatante con il DNA eluito, che può essere analizzato.

6.2. *Analisi del DNA*

La presenza di acidi nucleici viene valutata sia quantitativamente, tramite spettrofotometria all'ultravioletto (260 nm) o tramite lettura al fluorimetro, che qualitativamente tramite elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8%. Con la prima tecnica è anche possibile valutare il grado di purezza del DNA estratto. La seconda tecnica, oltre a consentire una valutazione approssimativa della quantità del DNA estratto, è soprattutto indicata per la determinazione della qualità del DNA, analizzando le dimensioni del DNA estratto in modo da valutarne l'integrità.

6.2.1. Determinazione per spettrofotometria all'ultravioletto

Prelevare un'aliquota del DNA estratto (pochi μ l) e portare a volume di 1 ml con acqua distillata sterile. Quindi porre la soluzione in una cuvetta di quarzo per rilevazioni spettrofotometriche all'UV e procedere alla lettura allo spettrofotometro.

Accendere lo spettrofotometro circa 20 minuti prima dell'effettuazione delle letture, in modo da consentire il riscaldamento della lampada all'UV, precedentemente selezionata nel vano portalampade dello strumento. Procedere quindi alla lettura dei campioni. Le lunghezze d'onda alle quali vengono letti i campioni sono: 240 nm, 260 nm, 280 nm.

Le letture alle lunghezze d'onda di 240 e 280 nm forniscono informazioni sulla presenza di proteine, mentre la lettura a 260 nm è specifica per le molecole di DNA.

Moltiplicare i dati ottenuti dalla lettura a 260 nm per un coefficiente di 50 nel caso si voglia determinare la concentrazione del DNA. Riportare le concentrazioni in mg/ml. Dal rapporto tra le letture a 260 nm e 280 nm (260/280) si ottiene l'indice di purezza del DNA estratto. Se il valore di tale rapporto risulta compreso tra 1,7 e 2,0 il DNA risulta sufficientemente puro.

6.2.2. Fluorescenza

Il metodo si basa sulla proprietà che ha una soluzione colorante Hoechst 33258 di formare legami con l'adenina e la timina presenti nella molecola di DNA e di emettere fluorescenza. In questo modo si può determinare in maniera precisa la concentrazione del DNA presente nella soluzione rilevando la fluorescenza emessa dal quantitativo che ha interagito con il DNA. Per operare tali determinazioni è necessario effettuare una retta di calibrazione dello strumento utilizzando una soluzione madre di DNA preparata in modo tale da essere sicuri che il DNA che si vuole analizzare abbia la stessa percentuale di adenina e timina di quello utilizzato per la calibrazione dello strumento. Al contrario della spettrofotometria UV, le impurità che normalmente si possono ritrovare nel DNA (proteine, oligonucleotidi e solventi organici) non causano la minima influenza nella determinazione quantitativa del DNA.

In relazione alla preparazione del fluorimetro, si rimanda alla documentazione del manuale allegata al tipo di strumento utilizzato.

6.2.3. Gel elettroforesi

Il metodo consiste nella risoluzione del DNA presente nei campioni per elettroforesi su gel di agarosio, seguita da colorazione con bromuro di etidio.

6.2.3.1. Preparazione del gel:

Porre 100 ml di Tris Acetato EDTA (1X) (4.7.) e 0,8 g di agarosio (4.8.) in una beuta da 250 ml. Scaldare la beuta (utilizzando un forno a microonde, un bunsen od una piastra riscaldante) fino ad ottenere una soluzione limpida, evitando di raggiungere la temperatura di ebollizione. Quindi attendere che la temperatura scenda al di sotto dei 60°C ed aggiungere 5 μ l di soluzione di bromuro di etidio (1 μ g/ml) (4.9.). Allestire la slitta per la preparazione del gel di agarosio, ponendola su un piano in bolla e disponendo gli opportuni pettini nelle apposite fessure. Versare delicatamente la soluzione preparata di

agarosio nella slitta in modo che risulti spesso non più di 5 mm, evitando la formazione di bolle d'aria ed attendendo che solidifichi (30-45 minuti a temperatura ambiente). Versare una piccola quantità di tampone sul gel e togliere quindi delicatamente i pettini.

6.2.3.2. Corsa elettroforetica

Allestire la cella elettroforetica versandovi un volume di tampone (TAE 1X) (4.7) sufficiente a riempirla per i 3/4 circa. Porre la slitta contenente il gel all'interno della cella elettroforetica (5.5.) in modo che il tampone ne ricopra la superficie (per circa 1 mm). Caricare 40 µl di DNA + 5 µl di blu di bromofenolo (4.10) nei pozzetti del gel ed un DNA plasmidico di riferimento (4.11). Collegare gli elettrodi della cella elettroforetica con l'alimentatore (5.6.) ed impostare ad una tensione costante di 120 V per tutta la corsa elettroforetica (per migliorare la risoluzione delle bande è consigliabile utilizzare un basso voltaggio e prolungare il più possibile la corsa). Trascorsi 45 minuti (è meglio osservare il gel agli UV una volta dopo 15 minuti ed una seconda dopo 45 minuti: se il DNA è molto frammentato e/o scarso si rischia di non vederlo più dopo una corsa prolungata), interrompere l'alimentazione e togliere la slitta contenente il gel dalla cella elettroforetica.

6.2.3.3. Scansione del gel

Togliere delicatamente il gel dalla slitta e porlo sul transilluminatore (5.7.). Accendere la lampada UV ed effettuare l'acquisizione dell'immagine con un apposito sistema fotografico.

6.2.3.4. Analisi dei risultati

La presenza di DNA genomico ad alto peso molecolare è quindi facilmente verificabile con l'aiuto di un apposito DNA di riferimento.

7. Note

Nel caso si voglia determinare la concentrazione dell'RNA con metodo spettrofotometrico all'ultravioletto come descritto al punto 6.2.1., è necessario moltiplicare i dati ottenuti dalla lettura a 260 nm per il coefficiente 40, anziché 50.

Alcuni reagenti usati in questo metodo sono tossici. In particolare, il reagente 4.4. contiene tiocianato di guanidina ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HSCN}$), altamente tossico, mentre il reagente 4.9. è costituito da EtBr, potente mutageno. Evitare quindi per entrambi il contatto con la pelle ed occhi e l'inalazione dei vapori, utilizzando guanti e maschera di protezione. Si raccomanda inoltre all'operatore di osservare le indicazioni riportate sull'etichetta del contenitore dei prodotti ed eventualmente consultare le relative schede di sicurezza per le specifiche informazioni sulla pericolosità dei reagenti usati e sulle modalità di smaltimento.

Il presente metodo ha fornito i migliori risultati estrattivi utilizzando kit specifici per miceli fungini esistenti in commercio.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 26/01/01 n.21, DM 21/12/00, Suppl. n.8

Posizione internazionale:

Assente

Metodo X.10

Determinazione degli amminoacidi liberi

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione degli amminoacidi liberi (naturali e aggiunti) mediante analizzatore automatico di amminoacidi.

2. Campo di applicazione

Il metodo si applica ai concimi organici azotati fluidi ed agli ammendanti per i quali viene richiesta la dichiarazione del tenore in amminoacidi liberi.

3. Principio

Il campione viene disciolto in HCl 0,1 N per permettere agli amminoacidi liberi di andare in soluzione. Gli amminoacidi vengono separati mediante cromatografia a scambio ionico e determinati, dopo reazione con la ninidrina, mediante rivelazione fotometrica a 570 nm per tutti gli amminoacidi, esclusi e prolina e idrossiprolina che vengono letti a 440 nm.

4. Reagenti

4.1. Acido picrico $C_6H_2(NO_2)_3(OH)$ 1% (p/v).

4.2. Soluzione di norleucina $C_6H_{13}NO_2$ (standard interno)

Pesare 32,797 mg di norleucina (PM 131,77 g/mol) e aggiungere 100 ml di HCl 0,1 N, in modo da ottenere una soluzione contenente 2500 nM/ml.

4.3. Composizione del tampone a pH 2,2

Pesare 14,09 g di litio citrato tribasico tetraidrato ($C_6H_5O_7Li_3 \cdot 4H_2O$), aggiungere 20 ml di tioglicole ($C_4H_{10}O_2S$), 0,1 ml di pentaclorofenolo (C_6HCl_5O) (250 mg in 50 ml di etanolo), 11,5 ml di HCl 37%. Sciogliere in 900 ml di H_2O bidistillata i reattivi elencati, aggiungere poi HCl 37% quanto basta per ottenere il pH specificato e portare a volume finale di 1000 ml con acqua bidistillata.

4.4. Composizione tamponi eluenti

	Tampone n.1	Tampone n.2	Tampone n.3	Tampone n.4
pH	2,70	3,08	4,04	5,42
molarità	0,2	0,6	1,0	1,0
litio citrato tribasico tetraidrato	18,8 g	16,92 g	42,3 g	42,3 g
litio cloruro	-	17,8 g	23,32 g	23,32 g
tiodiglicole	2 ml	2 ml	-	-
Pentaclorofenolo (250 mg in 50ml di etanolo)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
HCl 37%	13 ml	10 ml	14 ml	2 ml

4.5. Soluzione rigenerante LiOH 0,3 N

Pesare 12,59 g di $LiOH \cdot H_2O$ in 1000 ml di acqua bidistillata.

- 4.6. *Tampone sodio acetato 4 N pH 5,51*
Pesare 544,32 g di sodio acetato triidrato in circa ml 800 di acqua bidistillata, aggiungere ml 100 di acido acetico glaciale e aggiustare il pH con sodio idrossido 12 N o HCl 37% quindi portare a ml 1000 con acqua bidistillata.
- 4.7. Filtrare con filtri da 0,45 μm soluzioni e tamponi ai punti 4.1. - 4.2. - 4.4. - 4.5. - 4.6. - 4.7.
- 4.8. *Preparazione del reattivo derivatizzante ninidrina*
Il reattivo viene preparato in atmosfera di azoto sciogliendo 20 g di ninidrina in ml 750 di glicole etilenico monometil etero e ml 250 di tampone sodio acetato 4 N pH 5,51 (4.8.). Alla soluzione così ottenuta si aggiungono mg 0,4 di cloruro stannoso come riducente.

5. **Apparecchiatura**

- 5.1. Evaporatore rotativo.
- 5.2. Pipette graduate da 25 ml.
- 5.3. Colonne di vetro.
- 5.4. Filtri da 0,45 μm (diametro 47mm) e da 0,22 μm (diametro 13mm).
- 5.5. Pipette automatiche da 5 ml e da 1 ml.
- 5.6. Beaker da 150 ml.
- 5.7. Provette da centrifuga.
- 5.8. Centrifuga.
- 5.9. Analizzatore di amminoacidi.
- 5.10. Colonna cromatografica a scambio ionico.
- 5.11. Griglia con fori da 0,5 mm.

6. **Procedimento**

- 6.1. *Preparazione del campione*
Macinare il campione su griglia con fori da 0,5 mm. In un beaker da 150 ml pesare 1,5 g di campione finemente macinato, quindi aggiungere 100 ml di HCl 0,1 N. Si pone il beaker su agitatore magnetico lasciando in agitazione per circa 45 minuti, quindi filtrare su filtro di carta rapida. Prelevare con pipetta automatica 5 ml di soluzione filtrata e trasferire in una provetta da centrifuga. Aggiungere 25 ml di acido picrico 1% e 1 ml di soluzione di norleucina (4.2.) come standard interno; centrifugare per 20 minuti a 5000 rpm. Dopo centrifugazione prelevare 25 ml di surnatante e passarlo in colonne di resina Dowex 2x10 100-200 mesh in forma Cl, recuperando il campione in un pallone da 150 ml. Lavare la resina Dowex con 5 ml di HCl 0,02 N per tre volte (totale 15 ml) raccogliendo sempre nello stesso pallone. Portare a secco con evaporatore rotativo. Diluire quindi il campione con una quantità nota di tampone (4.3.) e filtrare con filtri da 0,22 μm .
- 6.2. *Preparazione dello standard di amminoacidi*
Diluire lo standard commerciale con il tampone (4.3.) in modo da analizzare una quantità, per ogni amminoacido, adeguata alla rivelabilità dello strumento impiegato.
- 6.3. Determinare gli amminoacidi per reazione con ninidrina e rivelazione fotometrica a 570 nm per tutti gli amminoacidi, esclusi prolina e idrossiprolina. Questi ultimi vengono letti a 440 nm.

7. Espressione dei risultati

Gli amminoacidi vengono espressi in percentuale sul campione tal quale secondo la formula:

$$AA (\% \text{ t.q.}) = \frac{A \times B \times 100}{C \times D}$$

dove:

A = μg di amminoacido standard analizzato.

B = altezza dell'amminoacido nel campione/altezza della norleucina nel campione.

C = altezza dell'amminoacido nello standard/ altezza della norleucina nello standard.

D = μg di campione analizzato.

La quantità di norleucina presente nello standard e nel campione deve essere la stessa.

Riportare la quantità di norleucina misurata nel campione allo stesso valore dello standard.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 10/04/06, n. 84, DM 15/03/06, Suppl. n.9

Posizione internazionale:

Assente

Metodi X.11

Determinazione degli amminoacidi totali

(Acido aspartico, treonina, serina, acido glutammico, prolina, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, istidina, lisina, arginina)

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione degli amminoacidi totali mediante analizzatore automatico di amminoacidi.

2. Campo di applicazione

Il metodo si applica ai concimi organici azotati fluidi ed agli ammendanti per i quali viene richiesta la dichiarazione del tenore in amminoacidi totali.

3. Principio

Il campione viene idrolizzato con HCl 6N in stufa a 110° C per 24 ore.

Gli amminoacidi vengono separati mediante cromatografia a scambio ionico e determinati dopo reazione con la ninidrina mediante rivelazione fotometrica a 570 nm per tutti gli amminoacidi, esclusi prolina e idrossiprolina che vengono rivelati a 440 nm.

4. Reagenti

Nel corso dell'analisi impiegare acqua bidistillata e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Acido cloridrico 6N

Diluire l'acido cloridrico 37% (12N) con acqua bidistillata nel rapporto 1:1.

4.2. Soluzione di norleucina $C_6H_{13}NO_2$ (standard interno)

Pesare 1,312 mg di norleucina (PM 131,17 g/mol) e aggiungere 1000 ml di HCl 6N, in modo da ottenere una soluzione contenente 10000 nM/ml.

4.3. Composizione del tampone a pH 2,2

Pesare 14,71 g di sodio citrato tribasico biidrato ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) (PM 294,1 g/mol), aggiungere 20 ml di tiodiglicole $C_4H_{10}O_2S$, 0,1 mL di pentaclorofenolo (C_6HCl_5O) (250mg in 50 ml di etanolo), 10 ml di acido cloridrico 37%. Sciogliere in 900 ml di acqua bidistillata tutti i reagenti indicati, aggiungere poi acido cloridrico 37% quanto basta per ottenere il pH specificato, portare a volume finale di 1000 ml e filtrare con filtri da 0,45 μ m.

4.4. Composizione dei tamponi

	Tampone n.1	Tampone n.2	Tampone n.3
pH	3,30	4,00	10,00
Molarità	0,15	0,2	0,2
Sodio citrato tribasico biidrato	14,71 g	19,61 g	-
Sodio tetraborato decaidrato	-	-	9,07 g
Sodio idrossido	-	-	4 g
Etanolo	20 ml	-	-
Tiodiglicole	2 ml	2 ml	-
Pentaclorofenolo (250mg in 50mL etanolo)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
HCl 37%	9 ml	9,5 ml	1,4 ml

- 4.5. *Soluzione rigenerante NaOH 0,2 N*
Sciogliere 8 g di sodio idrossido in 1000 ml di acqua bidistillata e filtrare con filtri da 0,45 μm .
- 4.6. *Tampone sodio acetato pH 5,51 4 N*
Sciogliere 544,32 g di sodio acetato triidrato ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) in circa 880 ml di acqua bidistillata, aggiungere 100 ml di acido acetico glaciale, aggiustare il pH con sodio idrossido 12 N o con HCl 37% al valore specificato quindi portare a 1000ml con acqua bidistillata e filtrare con filtri da 0,45 μm .
- 4.7. *Preparazione del reattivo derivatizzante ninidrina*
Il reattivo viene preparato in atmosfera di azoto sciogliendo 20 g di ninidrina in 750 ml di glicole etilenico monometil etero e 250 ml di tampone acetato pH 5,51 (4.6.). Alla soluzione così ottenuta si aggiungono 0,4 mg di cloruro stannoso come agente riducente.

5. Apparecchiatura

- 5.1. Agitatore magnetico.
- 5.2. Matracci da 1000 e da 250 ml.
- 5.3. Palloni da 150 ml.
- 5.4. Pipetta automatica da 5 ml.
- 5.5. Flacons in vetro Pyrex da 100 ml.
- 5.6. Filtri di carta rapidi.
- 5.7. Imbuti con porosità.
- 5.8. Filtri da 0,45 μm (diametro 47 mm) e da 0,22 μm (diametro 13 mm).
- 5.9. Stufa con regolazione della temperatura.
- 5.10. Evaporatore rotativo.
- 5.11. Analizzatore di amminoacidi.
- 5.12. Colonna cromatografica a scambio ionico.
- 5.14. Griglia con fori da 0,5 mm.

6. Procedimento

- 6.1. *Preparazione del campione per l'analisi*
Macinare il campione su griglia con fori da 0,5 mm di diametro. In un flacone di vetro Pyrex da 100 ml si pesa una quantità di campione corrispondente a circa 100 mg di protidi. Si aggiungono quindi 10 ml di norleucina come standard interno (4.2.) e 90 ml di HCl 6 N. Come antiossidante si usano 0,1 ml di acido tioglicolico. Si effettua uno scambio di gas tramite N_2 per eliminare O_2 quindi si chiudono i flaconi e si mettono in stufa a 110° C per 24 ore. Trascorso tale tempo si lascia raffreddare il campione, filtrare in un matraccio da 250 ml con filtro di carta rapido e si porta a volume con acqua bidistillata. Agitare la soluzione, trasferire da questa una quantità nota in un pallone da 150 ml e portare a secco in evaporatore rotativo. Diluire quindi il campione con una quantità nota di tampone (4.3.). Filtrare con filtri da 0,22 μm .
- 6.2. *Preparazione dello standard di amminoacidi*
Diluire lo standard commerciale con il tampone (4.3) in modo da iniettare una quantità adeguata alla rivelabilità dello strumento impiegato.
- 6.3. Determinare gli amminoacidi per reazione con ninidrina e rivelazione fotometrica a 570

nm per tutti gli amminoacidi, esclusi prolina e idrossiprolina. Questi ultimi vengono letti a 440 nm.

7. Espressione dei risultati

Gli amminoacidi vengono espressi in percentuale sul campione tal quale secondo la formula:

$$AA (\% \text{ t.q.}) = \frac{A \times B \times 100}{C \times D}$$

dove:

A = μg di amminoacido standard iniettato (6.2.).

B = altezza del picco dell'amminoacido nel campione / altezza del picco della norleucina (standard interno) nel campione.

C = altezza del picco dell'amminoacido nello standard / altezza del picco della norleucina (standard interno) nello standard.

D = μg di campione iniettati.

La quantità di norleucina presente nello standard e nel campione deve essere la stessa.

Riportare la quantità di norleucina misurata nel campione allo stesso valore dello standard.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 10/04/06, n. 84, DM 15/03/06, Suppl. n.9

Posizione internazionale:

Assente

Metodi X.12

Determinazione della biodegradabilità della pellicola di pacciamatura a base di amido plastificato

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione della biodegradabilità aerobica della pellicola di pacciamatura a base di amido plastificato.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile ai prodotti ammendanti a base di pellicole di pacciamatura a base di amido plastificato.

3. Principio

Il metodo è basato su due prove di laboratorio standard. La prima prova (**Prova 1**) si basa sulla determinazione della CO₂ rilasciata dalla decomposizione biologica del carbonio organico della pellicola di pacciamatura a base di amido plastificato, dovuta all'azione di una popolazione microbica proveniente da fanghi attivi di un depuratore delle acque di scarico ed è identica alla prova standard ISO 14852 (*Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium – Method by analysis of evolved carbon dioxide*).

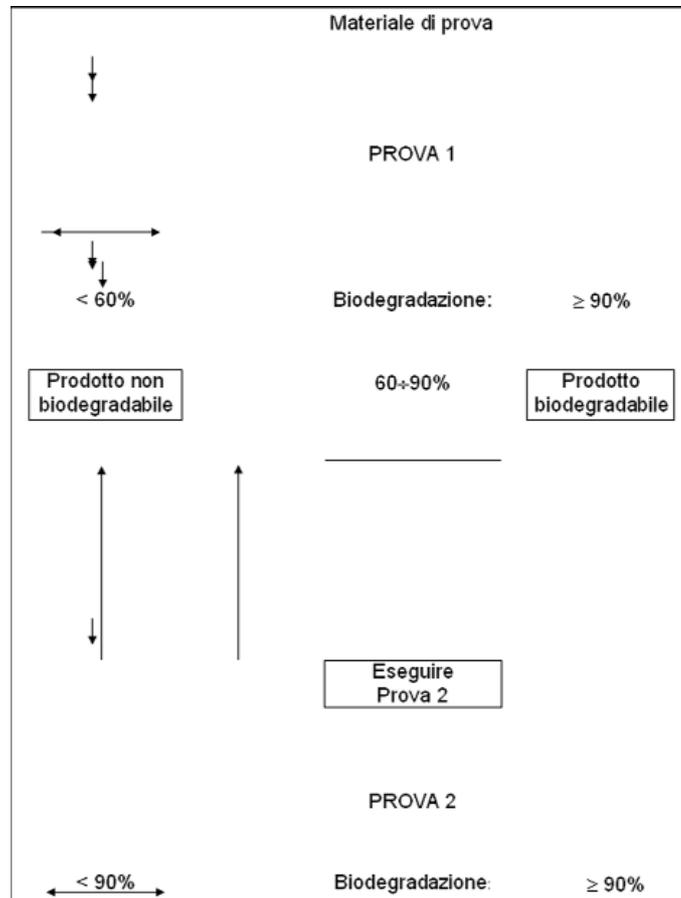


Figura 1. Schema metodo di determinazione della biodegradabilità

Il materiale in prova deve raggiungere un livello di biodegradazione pari al 90% del corrispondente valore raggiunto dalla cellulosa microcristallina, provata in parallelo come controllo positivo (biodegradazione relativa). Tale valore deve essere raggiunto in un periodo massimo di 180 giorni. Se il materiale in questo periodo non raggiunge la biodegradazione relativa del 90% ma mostra una biodegradazione relativa tra il 60% ed il 90%, allora il prodotto può essere considerato biodegradabile a condizione che superi un test supplementare, accelerato (**Prova 2**), che tecnicamente è identico alla prova standard ISO 14855 (*Determination of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of plastic materials under controlled composting conditions – Method by analysis of evolved carbon dioxide*). Il materiale in prova deve raggiungere un livello di biodegradazione relativa pari al 90% in un periodo massimo di 180 giorni.

Per riassumere: la dimostrazione della biodegradabilità della pellicola di pacciamatura a base di amido plastificato deve essere raggiunta tramite la Prova 1. Un materiale che, durante la Prova 1 non raggiunge una biodegradazione del 60% in 180 giorni è da considerarsi non biodegradabile ai fini della presente applicazione. Se il materiale mostra entro 180 giorni un valore di biodegradazione compreso tra il 60 e il 90% è necessario applicare la Prova 2 e dimostrare una biodegradazione relativa del 90% in 180 giorni. Non è necessario applicare la Prova 2 se con la Prova 1 il materiale raggiunge in 180 giorni una biodegradazione relativa del 90% (Figura 1).

4. Prova 1

4.1. Reattivi

4.1.1. Acqua distillata

4.1.2. Cellulosa microcristallina Avicelâ (Merck)

4.1.3. Idrossido di bario idrato per analisi, $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$.

4.1.4. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ soluzione: sciogliere 8 g di sale idrato per analisi (4.1.3) in acqua distillata (4.1.1) e portare a volume di 1000 ml

4.1.5. NaOH 10N

4.1.6. Terreno di coltura standard

4.1.6.1. Soluzione A

Sciogliere:

KH_2PO_4 8,5 g

K_2HPO_4 21,75 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33,4 g NH_4Cl 0,5 g (*)

in acqua distillata, portando a volume di 1000 ml in matraccio tarato.

(*) Nota: Rispetto a quanto riportato nella ISO 14852 è consigliabile aumentare la concentrazione di NH_4Cl fino ad un valore pari a 1,7 g, per assicurare una concentrazione di azoto sufficiente.

4.1.6.2. Soluzione B

Sciogliere 22,5g di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in acqua distillata, portando a volume di 1000 ml in matraccio tarato.

4.1.6.3. Soluzione C

Sciogliere 36,4 g di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in acqua distillata, portando a volume di 1000 ml in matraccio tarato.

4.1.6.4. Soluzione D

Sciogliere 0,25 g di $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in acqua distillata, portando a volume di 1000 ml in matraccio tarato.

4.1.6.5. Preparazione

Per preparare 1 litro di terreno di coltura, aggiungere a 500 ml di acqua distillata 10 ml di soluzione A e 1 ml delle soluzioni B, C e D, rispettivamente. Aggiungere acqua distillata, portando a volume di 1000 ml in matraccio tarato.

4.2. *Apparecchiatura per Prova 1*

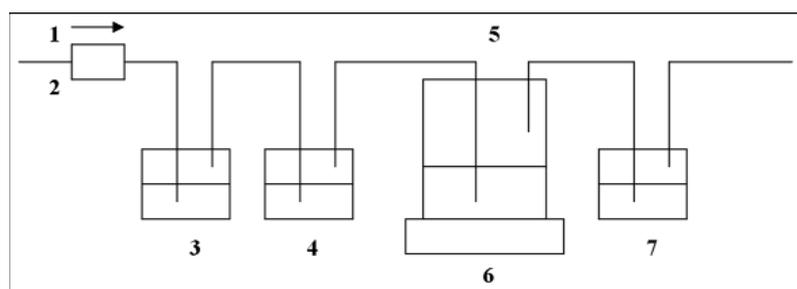


Figura 2. Schema apparato per Prova 1

1. Aria compressa
2. Flussimetro
3. Bottiglia di decarbonatazione (NaOH 10 N) normalmente vengono collegate in serie 2 bottiglie
4. Indicatore di CO_2 $\text{Ba}(\text{OH})_2$
5. Reattore
6. Agitatore magnetico
7. Trappola per $\text{CO}_2 \cdot \text{Ba}(\text{OH})_2$

4.2.1. Reattori

Utilizzare un reattore in vetro con un volume compreso tra 1 e 3 l. Utilizzare bottiglie tipo Drechsel del volume di 1 l per la decarbonatazione dell'aria (nello schema 3 e 4) e del volume di 100 ml per le trappola per CO_2 (nello schema 7).

4.2.2. Agitatore magnetico

Utilizzare un agitatore magnetico con ancoretta per mantenere in agitazione i reattori per tutta la durata della prova.

4.2.3. Tubi di gomma

Utilizzare tubi di gomma per collegare il reattore e le altre bottiglie. Utilizzare prodotti impermeabili alla CO_2 .

4.2.4. Altre apparecchiature

Pipette, cilindri e altre normale attrezzatura di laboratorio.

4.3. *Procedimento*

4.3.1. Preparazione dell'inoculo

4.3.1.1. Fango attivo

Prelevare, il giorno di inizio della prova, un campione di fango attivo, presso la vasca di ossidazione di un impianto di depurazione delle acque, civile o industriale. È possibile

utilizzare anche una miscela di fanghi provenienti da due o più impianti diversi o miscele con estratti di compost o suolo (vedi 4.3.1.2). E' possibile integrare la miscela con fanghi acclimatati al materiale di prova, per diminuire la durata di eventuali fasi "lag". Prima dell'uso determinare la concentrazione di solidi sospesi e diluire o concentrare, sino ad ottenere una concentrazione di 1 g/l, mantenendo in aerazione in laboratorio per 4-5 ore.

4.3.1.2. Suolo e/o compost

In alternativa è possibile utilizzare sospensioni di compost o suolo in acqua. Sospendere 10 g di suolo fertile o compost maturo proveniente da un impianto di compostaggio che tratta in maniera predominante rifiuti organici, in 100 ml di acqua distillata, agitare per 30 minuti, decantare e aggiungere nel reattore sino al raggiungimento di una concentrazione tra 1 e 5% V/V.

4.3.2. Preparazione del reattore

Riempire ciascun reattore da 3 l con 2900 ml di terreno di coltura standard e aggiungere 100 ml di inoculo (concentrazione solidi sospesi 1 g/l). Nel reattore si avrà una concentrazione finale di 33,33 mg/l di solidi sospesi. Adattare le quantità in modo proporzionale se si utilizzano reattori di dimensioni minori.

4.3.3. Materiale di prova

E' consigliabile effettuare la prova utilizzando il materiale sotto forma di polvere, in modo da rendere più veloce il processo di biodegradazione. La granulometria della polvere dovrebbe essere la più fine possibile. E' consigliabile aggiungere il materiale di prova in modo da raggiungere una concentrazione compresa tra i 30 e i 70 mg/l. Determinare la percentuale di carbonio presente nel materiale di prova.

4.3.4. Materiale di riferimento

Il materiale di riferimento da utilizzare è la cellulosa microcristallina AVICEL[®] prodotta da Merck. Determinare la quantità di carbonio presente nel materiale di riferimento.

4.3.5. Ambiente di prova

La prova deve essere condotta a temperatura ambiente, preferibilmente tra 20 e 25°C. Per gli scopi della presente applicazione non sono ammesse temperature di prova termofile, a differenza di quanto riportato negli standard internazionali ISO 14852 e ISO 14851. La massima temperatura ammissibile è pertanto fissata a 28°C.

4.3.6. Modo di operare

Per l'analisi di un campione prevedere i seguenti reattori:

- 2 reattori "bianchi", contenenti solamente il terreno di coltura e l'inoculo;
- 2 reattori per il materiale di prova;
- 2 reattori con il materiale di riferimento (cellulosa microcristallina Avicel).

Lo schema della prova è riassunto nella tabella 1:

Tabella 1

Reattore	Materiale di Prova	Materiale di riferimento	Inoculo
Bianco	-	-	+
Bianco	-	-	+
Materiale di prova	+	-	+
Materiale di prova	+	-	+
Riferimento	-	+	+
Riferimento	-	+	+

Riempire i reattori con terreno di coltura e collegarli alle bottiglie di decarbonatazione mediante l'uso di tubi di gomma. Iniziare a far fluire aria per 24 ore circa, in modo da rimuovere la CO₂ presente. Il giorno successivo aggiungere il materiale di prova e di riferimento (come riassunto dalla tabella 1), e collegare le trappole di Ba(OH)₂ per il recupero della CO₂ proveniente dai reattori. È consigliabile porre in serie almeno tre trappole dopo ogni reattore. Il flusso di aria attraverso i reattori deve essere tale da garantire una quantità di ossigeno sufficiente per la prova, normalmente tra 50 e 100 ml/min. A intervalli regolari titolare con HCl 0,05 N la quantità di CO₂ evoluta dai reattori che ha reagito con le trappole di Ba(OH)₂. Per maggiori dettagli sul metodo di determinazione della CO₂, consultare l'Allegato B dello standard ISO 14852.

La prova può considerarsi conclusa quando le curve di biodegradazione dei materiali di prova raggiungono la fase di *plateau*, corrispondente alla cessazione di produzione netta di CO₂. In corrispondenza dell'ultimo giorno del test è necessario misurare il pH di tutti i reattori, aggiungendo 1 ml di HCl concentrato in modo da decomporre carbonati e bicarbonati e convertirli in CO₂. Far fluire ancora per 24 ore e misurare infine la quantità di CO₂ presente nella serie di trappole collegate ai reattori.

4.4. *Espressione dei risultati*

La biodegradazione dei campioni (% B) viene calcolata rapportando il valore cumulativo totale di CO₂ prodotta durante la prova [(CO₂)c] alla CO₂ teorica (T CO₂). Quest'ultima rappresenta la quantità massima di anidride carbonica che il campione in esame sarebbe in grado di liberare se tutto il suo carbonio fosse ossidato a CO₂.

$$\% B = \frac{(\text{CO}_2)\text{c} - (\text{CO}_2)\text{b}}{\text{T CO}_2} \times 100$$

dove:

(CO₂)c = grammi di anidride carbonica prodotti nel reattore contenente il materiale di prova

(CO₂)b = grammi di anidride carbonica prodotti nel reattore contenente il solo inoculo (prova in bianco)

T CO₂ = grammi di anidride carbonica teoricamente prodotti dal campione se tutto il carbonio venisse ossidato a CO₂

La biodegradazione relativa è il rapporto percentuale tra la biodegradazione media del materiale di prova e la biodegradazione media del materiale di riferimento

$$\text{Biodegradazione relativa} = \frac{\% B (\text{materiale di prova})}{\% B (\text{cellulosa})} \times 100$$

4.5. *Validità dei risultati*

Il test è considerato valido se:

- il grado di biodegradazione del materiale di riferimento è > 60% alla fine del test.
- la quantità di CO₂ prodotta dai reattori "bianchi" alla fine del test non supera i 90 mg/l, utilizzando una concentrazione di solidi pari a 30 mg/l.

5. Prova 2

5.1. Reattivi

5.1.1. Acqua distillata.

5.1.2. Cellulosa microcristallina Avicell (Merck)

5.2. Apparecchiatura per Prova 2

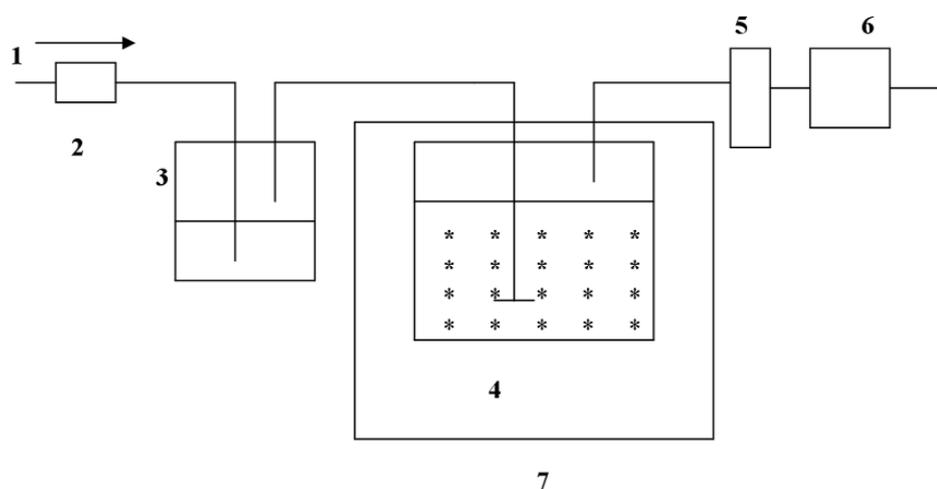


Figura 3. Schema apparecchiatura per Prova 2

1. Aria compressa

2. Riduttore di pressione

3. Bottiglia di decarbonatazione con soluzione NaOH (opzionale)

4. Reattore

5. Flussimetro

6. Sistema di misura della CO₂

7. Termostato o bagno termostatico

5.2.1. Reattore

Utilizzare un reattore in vetro con un volume almeno di 3 l, con chiusura ermetica e provvisto di tubo per flusso di gas con terminazione a “T” per meglio aerare la massa di compost.

5.2.2. Sistema di decarbonatazione

È possibile trattare l'aria di rete con una soluzione di NaOH allo scopo di eliminare la CO₂ presente. Tale operazione è opzionale. In alternativa è possibile usare aria compressa non decarbonata, misurare la concentrazione di CO₂ e sottrarre il valore ottenuto alle misure della concentrazione di CO₂ in uscita da ciascun reattore.

5.2.3. Tubi di gomma

Utilizzare tubi di gomma per i collegamenti. Utilizzare materiali impermeabili alla CO₂.

5.2.4. Bilancia tecnica

5.2.5. pHmetro

5.2.6. Stufa

5.2.7. Muffola

5.2.8. Cilindri e altre normali attrezzature di laboratorio.

5.2.9. Sistema di misura della CO₂

La determinazione della CO₂ proveniente dai reattori può essere misurata utilizzando un analizzatore infrarosso oppure con un gascromatografo.

5.3. *Procedimento*

5.3.1. Preparazione dell'inoculo

Prelevare l'inoculo presso un impianto di compostaggio che tratti preferibilmente la frazione organica dei rifiuti solidi urbani. Il compost deve essere omogeneo e privo di inerti, vetro, pietre, metallo. Prima dell'uso il compost deve essere setacciato a 0,5-1 cm di luce di maglia. Il tempo di compostaggio deve essere compresa tra 3 e 4 mesi.

Determinare i solidi totali (essiccamento in stufa a 105°C) e volatili (calcinazione in muffola a 550°C). I solidi totali dovrebbero essere circa il 50% del peso del compost umido, mentre i solidi volatili dovrebbero essere circa il 30% del peso secco. Il pH dell'inoculo, misurato in una sospensione preparata miscelando 1 parte di compost e 5 parti di acqua distillata, dovrebbe essere tra 7 e 9.

5.3.2. Preparazione del reattore

In un caso tipico si riempie il reattore con 600 g di inoculo, al quale viene miscelato il materiale di prova o di riferimento.

5.3.3. Materiale di prova

E' consigliabile provare il materiale sotto forma di polvere, in modo da rendere più veloce il processo di biodegradazione. La polvere dovrebbe essere la più fine possibile. In alternativa può essere utilizzato un film di basso spessore. La quantità da inserire in ciascun reattore dovrebbe essere tra i 50 e i 100 g. Determinare la quantità di carbonio.

5.3.4. Materiale di riferimento

Il materiale di riferimento da utilizzare è la cellulosa microcristallina AVICEL[®] prodotta da Merck. Determinare la quantità di carbonio presente nel materiale di riferimento.

5.3.5. Ambiente di prova

La prova deve essere condotta alla temperatura di 58(±2)°C in una stufa o in un bagno termostatico.

5.3.6. Modo di operare

Per l'analisi di un campione è necessario allestire i seguenti reattori:

- 3 reattori "bianchi" contenenti solamente il terreno di coltura e l'inoculo;
- 3 reattori per il materiale di prova;
- 3 reattori con il materiale di riferimento (cellulosa microcristallina Avicel).

Lo schema della prova è riassunto in tabella 2:

Tabella 2

Reattore	Materiale di Prova	Materiale di riferimento	Inoculo
Bianco	-	-	+
Bianco	-	-	+
Bianco	-	-	+
Materiale di prova	+	-	+
Materiale di prova	+	-	+
Materiale di prova	+	-	+
Riferimento	-	+	+
Riferimento	-	+	+
Riferimento	-	+	+

Riempire i reattori con 600 g di compost umido e collegarli alla linea di decarbonatazione (opzionale) mediante l'uso di tubi di gomma. Verificare che la temperatura dei reattori sia di 58°C e iniziare a far fluire aria. Il flusso di aria attraverso i reattori deve essere sufficiente a garantire una quantità di ossigeno sufficiente per la prova, normalmente tra i 10 ed i 15 l/h. Ad intervalli regolari, sull'aria in uscita dai reattori viene misurata la concentrazione di CO₂.

5.4. *Espressione dei risultati*

La biodegradabilità dei campioni (% B) viene calcolata rapportando il valore cumulativo totale di CO₂ prodotta [(CO₂)c] alla CO₂ teorica (T CO₂). Quest'ultima rappresenta la quantità massima di anidride carbonica che il campione in esame sarebbe in grado di liberare se tutto il suo carbonio fosse ossidato a CO₂.

$$\% B = \frac{(\text{CO}_2)_c - (\text{CO}_2)_b}{T \text{ CO}_2} \times 100$$

dove:

(CO₂)c = grammi di anidride carbonica prodotti nel reattore contenente il materiale di prova

(CO₂)b = grammi di anidride carbonica prodotti nel reattore contenente il solo inoculo (prova in bianco; media di tre repliche)

T CO₂ = grammi di anidride carbonica teoricamente prodotti dal campione se tutto il carbonio venisse ossidato a CO₂

La biodegradazione relativa è il rapporto percentuale tra la biodegradazione media del materiale di prova e la biodegradazione media del materiale di riferimento.

$$\text{Biodegradazione relativa} = \frac{\% B (\text{materiale di prova})}{\% B (\text{cellulosa})} \times 100$$

5.5. *Validità dei risultati*

Il test è considerato valido se:

- il grado di biodegradazione del materiale di riferimento è > 70% dopo 45 giorni di prova;
- la quantità di CO₂ prodotta dai reattori bianchi dopo 10 giorni di test è compresa tra i 50 e i 150 mg di CO₂ per grammo di solidi volatili.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 10/04/06, n. 84, DM 15/03/06, Suppl. n.9

Posizione internazionale:

Assente

Metodi X.13

Separazione delle resine anioniche/cationiche, determinazione del rapporto resine anioniche/cationiche e della capacità di scambio cationico

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per:

- la separazione delle resine anioniche/cationiche;
- la determinazione del rapporto resine anioniche/cationiche;
- la determinazione della capacità di scambio cationico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli ammendanti e correttivi diversi "Resina sintetica insolubile a scambio cationico" e per i futuri fertilizzanti inseriti in legge caratterizzati da scambio cationico.

3. Principio

La separazione delle resine anioniche da quelle cationiche viene effettuata per precipitazione in presenza di NaOH.

Il rapporto fra i due tipi di resine viene calcolato come rapporto in peso fra le resine anioniche e le resine cationiche nelle forme desaturate (rispettivamente, OH^- e H^+).

La determinazione della capacità di scambio cationico viene effettuata per titolazione con HCl 0,1 M utilizzando un titolatore automatico dotato di un elettrodo a pH e come punto finale della titolazione pH 7.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua deionizzata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Acido cloridrico, HCl, al 35%.

4.2. *HCl, soluzione 0,1 M*

Diluire 8,3 ml di HCl (4.1.) in 1.000 ml di acqua, omogeneizzare. Se correttamente conservata questa soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.3. Sodio idrossido, NaOH, > 99%.

4.4. *Sodio idrossido, NaOH soluzione 0,1 M*

Pesare 4 g di NaOH (4.3.) con una precisione di 0,01 g e porlo in un pallone tarato da 1.000 ml, aggiungere circa 600 ml di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a +4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.5. *Idrossido di sodio, NaOH, soluzione 5 M*

Pesare 200 g di NaOH (4.3.) con una precisione di 0,01 g e porlo in un pallone tarato da 1.000 ml, aggiungere circa 600 ml di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a +4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

5. Apparecchiatura

Nel corso dell'analisi utilizzare corrente attrezzatura e vetreria da laboratorio e in particolare:

- 5.1. Pesafiltro in vetro.
- 5.2. Bilancia analitica.
- 5.3. Stufa per umidità (105 °C).
- 5.4. Essiccatore.
- 5.5. Imbuto separatore da 1000 ml.
- 5.6. Colonna cromatografica lunga 30 cm con diametro interno di 2,5 cm.
- 5.7. pH-metro.
- 5.8. Crogioli filtranti con setto poroso da 50 ml.
- 5.9. Pompa a vuoto.

6. Procedimento

6.1. *Determinazione della sostanza secca*

In un pesafiltro (5.1.) tarato a 105 °C, pesare su bilancia analitica (5.2.) circa 5 g di campione e annotare la pesata. Porre il pesafiltro in stufa (5.3.) e portare la temperatura a 80 °C per 2 ore, poi alzare la temperatura fino a 105 °C per 6 ore. Quindi, mettere il pesafiltro in un essiccatore (5.4.) e dopo il raffreddamento pesarlo su bilancia analitica. Il contenuto in sostanza secca (SS%) viene così calcolato:

$$SS (\%) = \frac{PS - T}{P} \cdot 100$$

dove:

PS = peso del pesafiltro con il campione essiccato (g),

T = peso del pesafiltro (g),

P = peso iniziale del campione (g).

6.2. *Determinazione del rapporto fra resine anioniche e cationiche*

In un beacker di vetro pesare circa 10 g di campione e, aiutandosi con 200 ml circa di una soluzione di NaOH 5 M (4.5.), travasare quantitativamente in un imbuto separatore (5.5.). Agitare il tutto per 3 minuti, quindi, lavando accuratamente le pareti dell'imbuto separatore aggiungere 300 ml circa di NaOH 5 M (4.5.). Le resine cationiche si depositano sul fondo in circa 10-15 minuti, mentre le anioniche affiorano in superficie. Raccogliere, quindi, le resine anioniche e cationiche, rispettivamente, in due colonne cromatografiche (5.6.). Desaturare le resine cationiche nella colonna cromatografica (5.6.) procedendo ad un lavaggio con acqua deionizzata fino a quando l'eluato non ha raggiunto pH 7 (5.7.). Successivamente, caricare la colonna (5.6.) con 500 ml di HCl 0,1 M (4.2.) lasciando filtrare la soluzione acida lungo la colonna (5.6.) alla velocità di circa 100 ml/h (1,5 ml/min). Terminata tale operazione caricare la colonna (5.6.) con acqua deionizzata e lavare fino a quando l'eluato che fuoriesce non ha raggiunto pH 7 (5.7.). Caricare le resine anioniche con 500 ml di NaOH 0,1 M (4.4.), lasciando scendere la soluzione alla velocità di 100 ml/h (1,5 ml/min). Terminata tale operazione caricare la colonna (5.6.) con acqua deionizzata e lavare fino a quando l'eluato che fuoriesce non ha raggiunto pH 7 (5.7.). Travasare quindi le resine con l'aiuto di acqua deionizzata in due crogioli filtranti (5.8.), preventivamente tarati a 105 °C (T). Fissare i crogioli su una beuta a collo d'oca

e collegare alla beuta una pompa a vuoto aspirante (5.9.) che, terminato il travaso delle resine, si lascia collegata per altri 5 minuti circa. Le resine vengono quindi disidratate in stufa (5.3.) secondo la metodologia descritta in 6.1. Terminato l'essiccamento determinare il peso secco delle resine anioniche e cationiche. Il rapporto resine anioniche/cationiche (R) viene così espresso:

$$R = \frac{PSa}{PSc}$$

dove:

PSa = peso secco resine anioniche,

PSc = peso secco resine cationiche.

6.3. *Determinazione della capacità di scambio cationico*

Nota il contenuto in resine cationiche della miscela, pesare su bilancia analitica (5.2.) un'aliquota di campione contenente circa 2 g di resine cationiche e annotare la pesata. Procedere quindi alla separazione delle resine cationiche dalle anioniche e alla desaturazione delle sole resine cationiche come descritto nel paragrafo 6.2. Alla parte terminale della colonna (5.6.), collegare una pompa a vuoto aspirante (5.9.) per 10 minuti in modo da poter eliminare tutta l'acqua in eccesso. Caricare ora la colonna con NaOH 0,1 M (4.4.), lasciare scendere la soluzione ad una velocità di 100 ml/h (1,5 ml/min) e raccogliere l'eluato in un matraccio tarato da 500 ml fino al suo riempimento. Dalla soluzione raccolta, dopo opportuna omogeneizzazione, prelevare con pipetta tarata 50 ml di soluzione e porla in una beuta da 250 ml. Titolare la soluzione con HCl 0,1 M (4.2.) utilizzando come indicatore la fenolftaleina (vedi nota 1). In alternativa, impiegare un pHmetro (5.7.) programmando come punto finale della titolazione pH = 7. Contemporaneamente effettuare la titolazione di 50 ml di NaOH 0,1 M (4.4.) utilizzato per l'eluizione delle resine come bianco. La capacità di scambio cationico (CSC) del prodotto sul peso secco viene così calcolata:

$$CSC \text{ (meq / 100 g)} = 100 \cdot (A - B) \cdot M \cdot f / P \cdot SS$$

dove:

A = ml di HCl 0,1 M usati per la titolazione del bianco;

B = ml di HCl 0,1 M usati per la titolazione dell'eluato;

M = molarità corretta dell'HCl 0,1 M secondo il seguente calcolo:

$$M = \frac{\text{mL NaOH} \cdot \text{molarità NaOH}}{A} = \frac{50 \cdot 0,1}{A}$$

f = fattore di diluizione (500 ml / 50 ml = 10);

P = massa in grammi del campione di resina;

100 = fattore di correzione (g@100 g);

SS = peso secco della resina (%).

7. **Nota**

La capacità di scambio cationico (CSC) viene espressa in millequivalenti (meq) rispetto a 100 g di peso secco della resina saturata nella forma commercializzata (meq/100 g). Nel Sistema Internazionale, per esprimere la capacità di scambio cationico (CSC), si utilizza la centimole carica per kg di materiale (cmolc kg⁻¹), tuttavia, si ricorda che esiste una perfetta equivalenza fra le due unità di misura.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 10/04/06, n. 84, DM 15/03/06, Suppl. n.9

Posizione internazionale:

Assente

Metodi X.14

Determinazione della solubilità degli elementi nutritivi in acqua nei fertilizzanti a matrice vetrosa

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione degli elementi nutritivi (macro e micro elementi) solubili in acqua.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile ai fertilizzanti a matrice vetrosa.

3. Principio

Il principio del metodo si basa sull'estrazione degli elementi nutritivi in acqua mediante agitazione in condizioni controllate, a temperatura ambiente.

4. Reattivi

4.1 Acqua demineralizzata di purezza equivalente e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

5. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

- 5.1. Bilancia tecnica elettronica
- 5.2. Agitatore meccanico
- 5.3. Ancoretta magnetica
- 5.4. Beaker in vetro da 200 ml
- 5.5. Filtro a pieghe in cellulosa pura

6. Procedimento

6.1. Preparazione dei campioni per l'analisi

Il campione solido deve essere preparato secondo quanto previsto dal metodo I.4.

6.2. Pesata

Pesare, con un'approssimazione di 0,0001 g, una quantità di campione pari ad 1 g (il diametro delle particelle del campione è inferiore a 100 micron), e trasferirlo in un beaker da 200 ml.

6.3. Estrazione

Aggiungere al campione 100 ml di acqua demineralizzata.

Porre ad agitare su agitatore meccanico (5.2) con ancoretta magnetica (5.3) a 300 giri/min., per 30 minuti. Trascorso questo tempo, filtrare su filtro a pieghe asciutto.

7. Espressione dei risultati

La determinazione degli elementi nutritivi presenti, macro e micro-elementi, viene effettuata su una parte aliquota della soluzione filtrata, secondo i metodi ufficiali previsti per ciascun elemento.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 10/04/06, n. 84, DM 15/03/06, Suppl. n.9

Posizione internazionale:

Assente

Metodi X.15

Determinazione della solubilità degli elementi nutritivi in HCl 1%

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione degli elementi nutritivi (macro e micro elementi) solubili in HCl 1%.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile ai fertilizzanti a matrice vetrosa.

3. Principio

Il principio del metodo si basa sull'estrazione degli elementi nutritivi in acido diluito mediante agitazione in condizioni controllate, a temperatura ambiente.

4. Reattivi

- 4.1. Acqua demineralizzata di purezza equivalente e reattivi di qualità analitica riconosciuta.
- 4.2. Acido cloridrico diluito, soluzione all'1%.

5. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

- 5.1. Bilancia tecnica elettronica
- 5.2. Agitatore meccanico
- 5.3. Ancoretta magnetica
- 5.4. Beaker in vetro da 500 ml
- 5.5. Filtro a pieghe in cellulosa pura

6. Procedimento

6.1. Preparazione dei campioni per l'analisi

Il campione solido deve essere preparato secondo quanto previsto dal metodo I.4.

6.2. Pesata

Pesare, con un'approssimazione di 0,0001 g, una quantità di campione pari ad 1 g (il diametro delle particelle del campione è inferiore a 100 micron), e trasferirlo in un beaker da 500 ml.

6.3. Estrazione

Aggiungere al campione 250 ml di acido cloridrico al 1%.

Porre ad agitare su agitatore meccanico (5.2) con ancoretta magnetica (5.3) a 300 giri/min., per 30 minuti. Trascorso questo tempo, filtrare su filtro a pieghe asciutto.

7. Espressione dei risultati

La determinazione degli elementi nutritivi presenti, macro e micro-elementi, viene effettuata su una parte aliquota della soluzione filtrata, secondo i metodi ufficiali previsti per ciascun elemento.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 10/04/06, n. 84, DM 15/03/06, Suppl. n.9

Posizione internazionale:

Assente

Metodi X.16

Determinazione della solubilità degli elementi nutritivi in acido citrico al 2% nei fertilizzanti a matrice vetrosa

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione degli elementi nutritivi (macro e micro elementi) solubili in acido citrico al 2%.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile ai fertilizzanti a matrice vetrosa.

3. Principio

Il principio del metodo si basa sull'estrazione degli elementi nutritivi in acido citrico mediante agitazione in condizioni controllate, a temperatura ambiente.

4. Reattivi

- 4.1. Acqua demineralizzata di purezza equivalente e reattivi di qualità analitica riconosciuta.
- 4.2. Acido citrico diluito, soluzione al 2%.

5. Apparecchiatura

Normale attrezzatura di laboratorio, ed in particolare:

- 5.1. Bilancia tecnica elettronica
- 5.2. Agitatore meccanico
- 5.3. Ancoretta magnetica
- 5.4. Beaker in vetro da 500 ml
- 5.5. Filtro a pieghe in cellulosa pura

6. Procedimento

6.1. Preparazione dei campioni per l'analisi

Il campione solido deve essere preparato secondo quanto previsto dal metodo I.4.

6.2. Pesata

Pesare, con un'approssimazione di 0,0001 g, una quantità di campione pari ad 1 g (il diametro delle particelle del campione è inferiore a 100 micron), e trasferirlo in un beaker da 500 ml.

6.3. Estrazione

Aggiungere al campione 125 ml di acido citrico al 2%.

Porre ad agitare su agitatore meccanico (5.2) con ancoretta magnetica (5.3) a 300 giri/min., per 30 minuti. Trascorso questo tempo, filtrare su filtro a pieghe asciutto.

7. Espressione dei risultati

La determinazione degli elementi nutritivi presenti, macro e micro-elementi, viene effettuata su una parte aliquota della soluzione filtrata, secondo i metodi ufficiali previsti per ciascun elemento.

Posizione nazionale:

Gazzetta Ufficiale del 10/04/06, n. 84, DM 15/03/06, Suppl. n.9

Posizione internazionale:

Assente

Metodi X.17

Determinazione qualitativa e semi-quantitativa delle pellicole di pacciamatura a base di amido plastificato per spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione qualitativa e semi-quantitativa della pellicola di pacciamatura a base di amido plastificato.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo è applicabile ai prodotti ammendanti a base di pellicole di pacciamatura a base di amido plastificato.

3. Principio

Il campione viene irraggiato all'infrarosso in trasformata di Fourier (FT-IR) a tutte le frequenze di interesse, determinando le lunghezze d'onda assorbite.

4. Apparecchiatura

4.1. Forbici

4.2. Slitta portacampioni in alluminio, con foro centrale di diametro 1-2 cm

4.3. Spettrofotometro infrarosso in trasformata di Fourier (FT-IR), con un intervallo di frequenze da 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} (da 2,5 mm a 25 mm).

5. Procedimento

5.1. Preparazione del campione

Con delle forbici si ritaglia un quadrato di pellicola di pacciamatura di circa 5 cm di lato. Lo si stira manualmente in entrambe le direzioni per ridurne lo spessore. Nel caso di teli di 15mm è sufficiente un piccolo stiro, mentre per teli più spessi, lo stiro deve essere maggiore.

Si utilizza una slitta per campioni sotto forma di film, apparato che consiste in una lastra, generalmente in alluminio, che reca al centro un foro di diametro 1-2 cm. Il film viene montato sulla slitta in modo da ricoprire il foro. Una volta introdotta la slitta nello spettrometro, il campione viene così a trovarsi in posizione tale da essere colpito e attraversato dal raggio di eccitazione IR.

Lo spessore delle pellicole di pacciamatura è in genere tale da portare a saturazione lo spettro. Per questo motivo è necessario operare uno stiro manuale del campione prima di assicurarlo alla slitta.

Il campione stirato viene assicurato alla slitta porta-campioni con del nastro adesivo (fare attenzione che il nastro non venga a trovarsi sopra al foro) e inserito nello spettrometro. Si registra uno spettro rapido (una sola scansione manuale) per controllare che lo stiro fatto per evitare la saturazione sia sufficiente. La condizione di non saturazione è da considerarsi soddisfatta quando tutte le bande dello spettro, ad eccezione di una banda caratteristica a 1725 cm^{-1} , troppo intensa per non andare in saturazione, presentano un livello

di trasmittanza maggiore del 5%. Se la condizione non è soddisfatta occorre ripetere la procedura di stiro su un nuovo campione aumentando il livello di stiro.

5.2. *Calibrazione*

La lunghezza d'onda e l'assorbimento dovrebbero essere calibrati utilizzando degli standard raccomandati dal fornitore dello strumento (es: film di polistirene).

5.3. *Registrazione dello spettro*

Il test viene eseguito a temperatura ambiente (23 ± 2)°C, ponendo la cella di misura sotto flusso di azoto. Ciò favorisce l'allontanamento della CO₂ atmosferica.

Parametri di registrazione dello spettro:

- Risoluzione: 4,00 cm⁻¹
- Velocità: 0,2 cm/s (12 cm/min)
- Numero di scansioni: 16
- Gain: 1

Intervallo di registrazione: (4000 - 400) cm⁻¹

Prima di registrare lo spettro assicurarsi, mediante l'esecuzione di una singola scansione manuale, che il segnale della CO₂ atmosferica (doppietto a circa 2300 cm⁻¹) sia scomparso o ridotto al minimo. In caso negativo, attendere un tempo sufficiente affinché il flusso di azoto nella cella di misura allontani la CO₂ residua.

5.4. *Analisi qualitativa per l'identificazione della pellicola di pacciamatura in A base di amido plastificato*

L'analisi qualitativa viene preceduta da una serie di operazioni matematiche effettuate sullo spettro del campione e su quello di riferimento, in modo da rendere più facile la comparazione dei due.

Le operazioni consistono in:

- correzione della linea di base, che può subire distorsioni legate a fenomeni di scattering del raggio IR (ad esempio a causa della rugosità superficiale del campione). Questa operazione viene eseguita mediante una routine automatica (denominata in genere Baseline correction).
- normalizzazione dello spettro, in modo da ottenere intensità di bande simili anche per spettri ottenuti a partire da campioni di spessore leggermente diverso. Viene eseguita da una routine automatica (denominata in genere Abex, acronimo di Absorbance expansion).
- trasformazione dello spettro in unità di assorbanza. Viene eseguita da una routine automatica (denominata in genere Absorbance).

5.4.1. *Correzione della linea di base*

Si richiama lo spettro registrato e lo si normalizza sull'intero intervallo (4000 - 400) cm⁻¹ utilizzando la funzione automatica Abex. Si utilizza in genere per tutti gli spettri un valore di Abex pari a 1,5.

In Fig.1 è riportato un esempio di un tipico spettro FT-IR di una pellicola di pacciamatura in A base di amido plastificato, così come appare dopo la normalizzazione.

La correzione della linea di base si esegue fornendo alla routine di calcolo (Baseline correction) una serie di punti dello spettro da portare al 100% del valore di trasmittanza. Nello spettro di Fig.1 i punti da portare al 100% di trasmittanza vengono scelti all'interno di intervalli definiti secondo il seguente schema:

da 4000 a 3650 cm ⁻¹ :	almeno 4 punti
da 2600 a 1850 cm ⁻¹ :	almeno 8 punti
da 1650 a 1550 cm ⁻¹ :	almeno 2 punti
da 450 a 400 cm ⁻¹ :	almeno 1 punto

In figura 2 è riportato lo spettro di Fig. 1 dopo correzione della linea di base.

5.4.2. Trasformazione dello spettro in unità di assorbanza

Lo spettro viene trasformato in assorbanza mediante esecuzione dell'apposita routine (Absorbance). In Fig. 3 è riportato lo spettro di Fig. 2 trasformato in assorbanza.

5.4.3. Identificazione del telo per pacciamatura in A base di amido plastificato

L'identificazione qualitativa del materiale avviene mediante comparazione dello spettro del campione ad uno spettro di riferimento, entrambi elaborati come descritto ai punti 5.4.1., 5.4.2 e 5.4.3). Viene confrontato l'andamento generale dello spettro e, in particolare, vengono verificate l'esistenza e la corretta posizione di una serie di bande relative allo spettro di riferimento.

Le bande da confrontare si dividono in due gruppi:

- bande fisse, che devono essere tutte presenti;
- bande variabili, non sempre presenti e dovute all'eventuale utilizzo di alcuni di additivi di processo.

Affinché il telo per pacciamatura risulti conforme alla norma di biodegradabilità, l'intensità delle bande variabili non deve superare un certo limite. L'intensità di tali bande va pertanto sottoposta ad analisi semiquantitativa per verificare che sia nei limiti consentiti. In Fig. 4 è riportato lo spettro di riferimento. Sono indicate le posizioni delle bande da confrontare. Le bande a intensità variabile assorbono alle seguenti lunghezze d'onda:

2993 cm^{-1} (spalla della banda principale a 2947 cm^{-1})

2920 cm^{-1}

2850 cm^{-1}

1755 cm^{-1} (spalla della banda principale a 2725 cm^{-1})

1181 cm^{-1} (spalla della banda principale a 1165 cm^{-1})

5.5. Analisi semiquantitativa

L'analisi semiquantitativa viene applicata alla porzione di spettro FT-IR compresa fra 3035 cm^{-1} e 2600 cm^{-1} . Non tutte le bande variabili identificate al punto 5.4.3 vengono prese in considerazione. E' sufficiente analizzarne solamente due, unitamente ad una fissa di riferimento. Le lunghezze d'onda delle bande che si prendono in considerazione sono:

2956 cm^{-1} : banda fissa di riferimento (R)

2850 cm^{-1} : prima banda variabile (V1)

2993 cm^{-1} : seconda banda variabile (V2)

5.5.1 Elaborazione degli spettri

Si richiama lo spettro registrato e si forniscono alla routine Interpolate i valori degli estremi dell'intervallo di lunghezze d'onda definito al punto 5.5. L'operazione taglia le porzioni di spettro esterne all'intervallo scelto. In questo modo viene creato uno spettro identico a quello di partenza, ma limitato all'intervallo di lunghezze d'onda definito.

Si utilizza la routine di calcolo Baseline come al punto 5.4.1. Si portano al 100% di trasmittanza due soli punti, aventi lunghezza d'onda il più possibile vicino ai due estremi dell'intervallo di analisi (rispettivamente 3035 cm^{-1} e 2600 cm^{-1}).

La porzione di spettro viene trasformata in assorbanza mediante esecuzione dell'apposita routine (Absorbance).

Lo spettro viene normalizzato utilizzando la funzione automatica Abex. Per avere un'agevole lettura dell'intensità delle bande, il parametro di normalizzazione Abex va scelto in modo che, dopo normalizzazione, l'intensità della banda di riferimento R a 2956 cm^{-1} cada nell'intervallo [0,6÷0,8].

In Fig. 5 viene riportata ad esempio una serie di spettri dopo elaborazione come descritta Al punto 5.5.1. Nella stessa Fig. 5 sono anche indicate le posizioni delle bande R, V1 e V2.

6. Espressione dei risultati

La lettura delle intensità in assorbanza delle bande viene eseguita in modo automatico dalla routine di calcolo. Con riferimento alla Fig. 5, vengono misurate le altezze delle bande R, V1 e V2 così da definire:

I_R : Intensità della banda R

I_{V1} : Intensità della banda V1

I_{V2} : Intensità della banda V2

Si calcolano i seguenti rapporti di intensità:

$$I_1 = \frac{I_{V1}}{I_R}$$

$$I_2 = \frac{I_{V2}}{I_R}$$

7. Definizione degli intervalli di tolleranza

Intervallo di tolleranza per il rapporto I_1 : da 0,10 a 0,70

Intervallo di tolleranza per il rapporto I_2 : da 0,05 a 0,32

Il test semiquantitativo è da considerarsi superato quando entrambi i rapporti I_1 e I_2 verificano le rispettive condizioni. A titolo di esempio, si sottolinea come due degli spettri di Fig. 5 non superano il test. Si tratta degli spettri che presentano la più alta assorbanza in corrispondenza delle bande V1 e V2.

8. Note

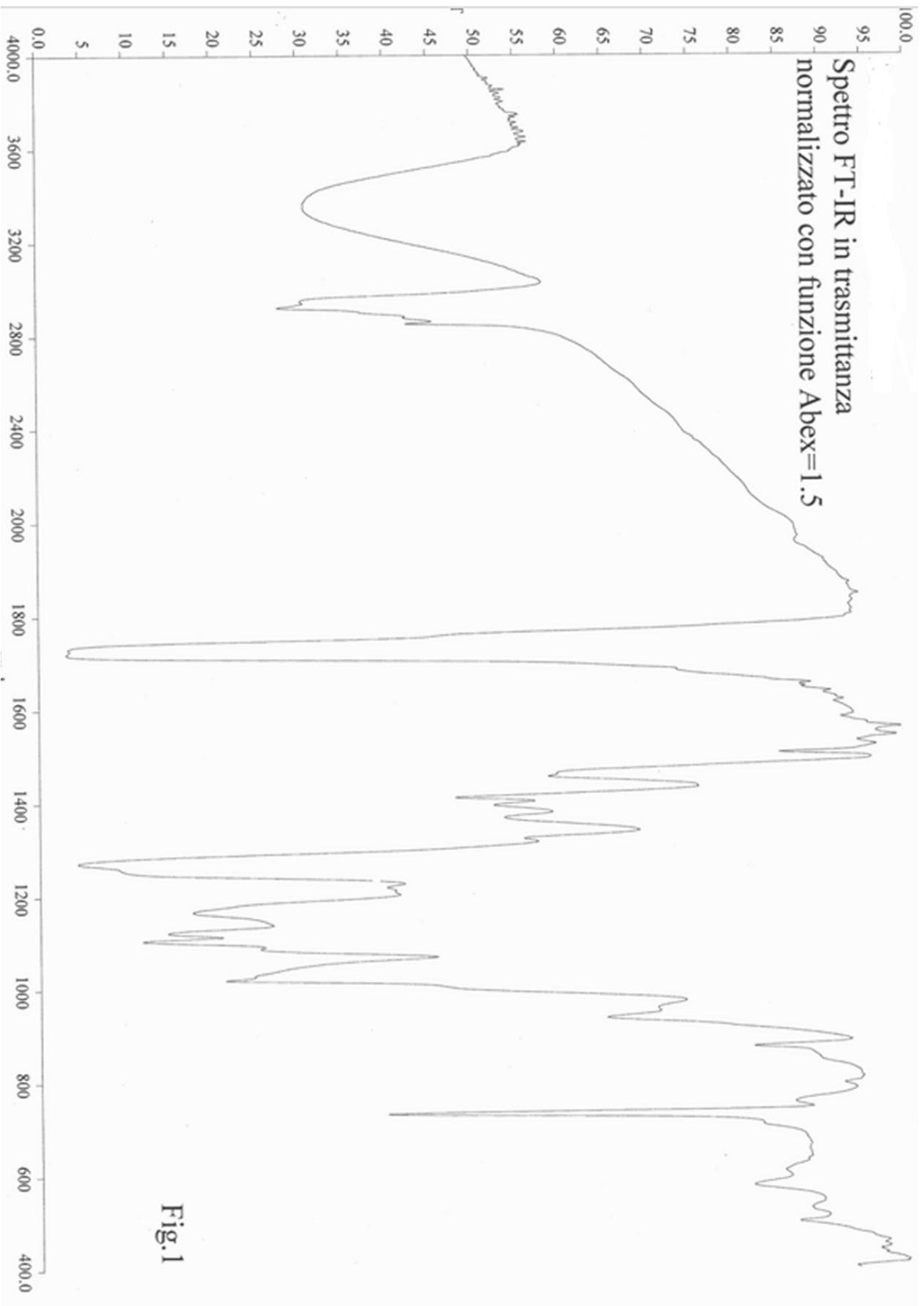
I campioni da sottoporre ad analisi devono essere conservati in condizioni tali da non indurre cambiamenti nel tempo che intercorre fra il campionamento e l'analisi o fra due analisi successive. Si consiglia lo stoccaggio a temperatura ambiente in sacchetti di polietilene.

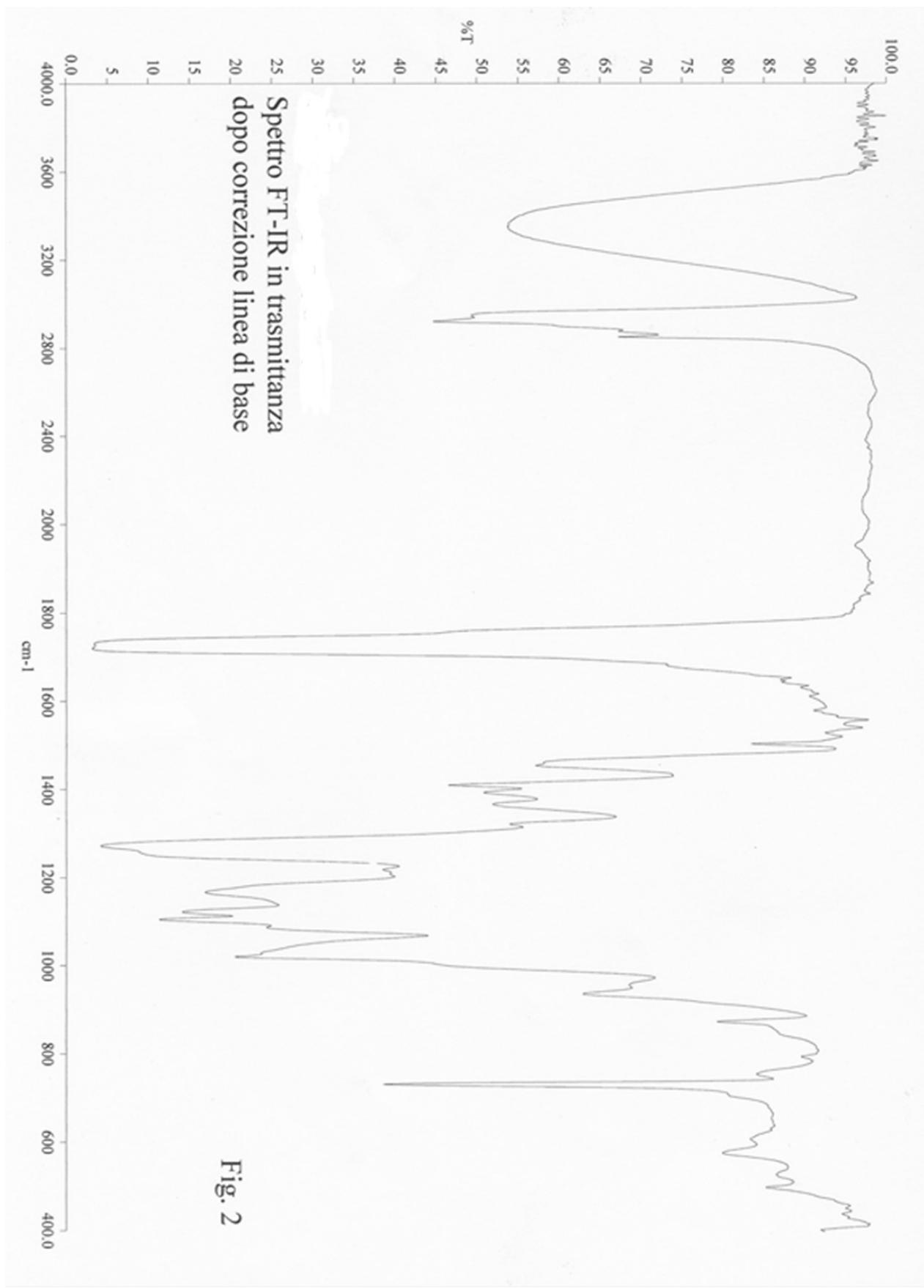
Posizione nazionale:

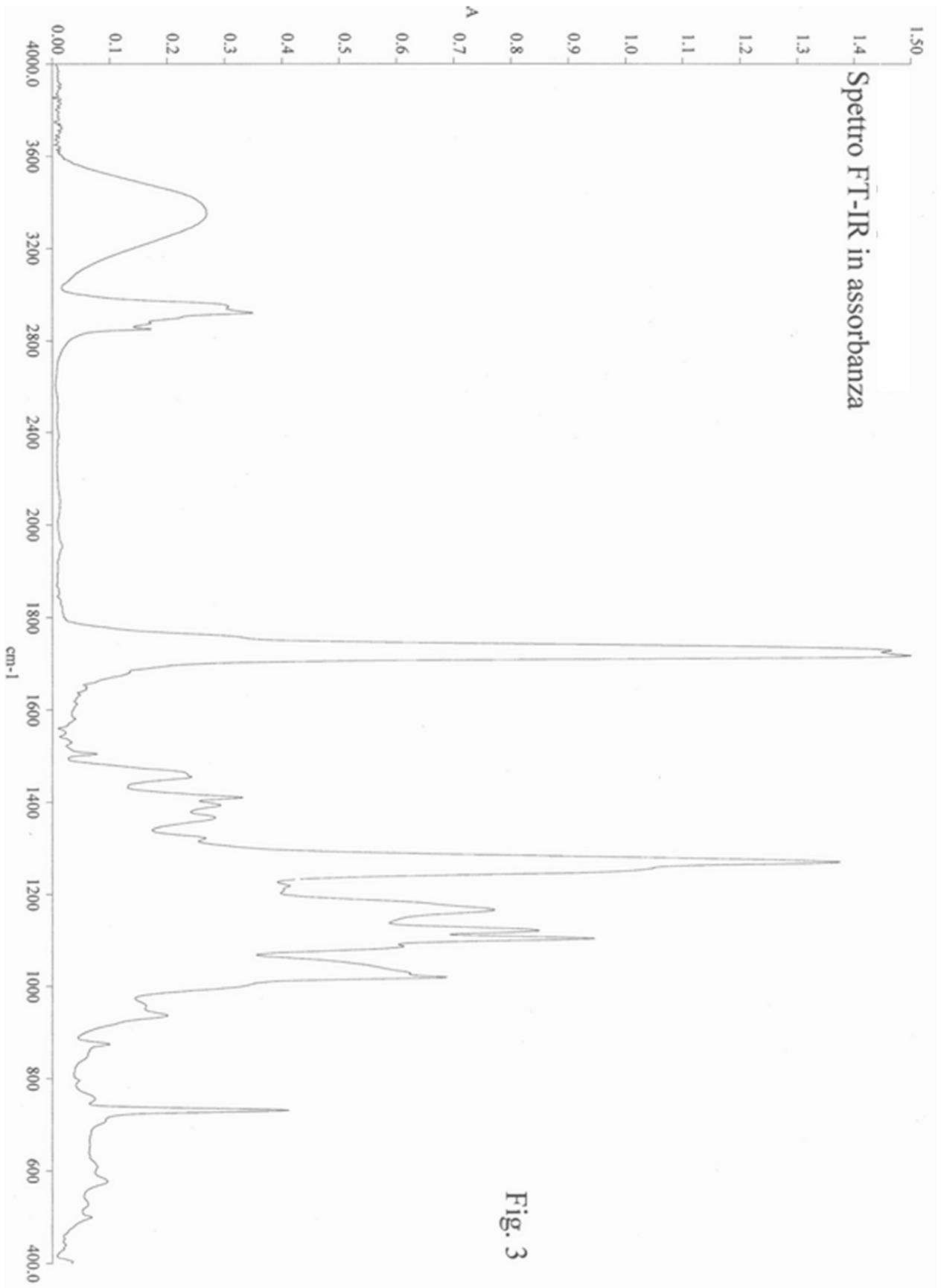
Gazzetta Ufficiale del 10/04/06, n. 84, DM 15/03/06, Suppl. n.9

Posizione internazionale:

Assente







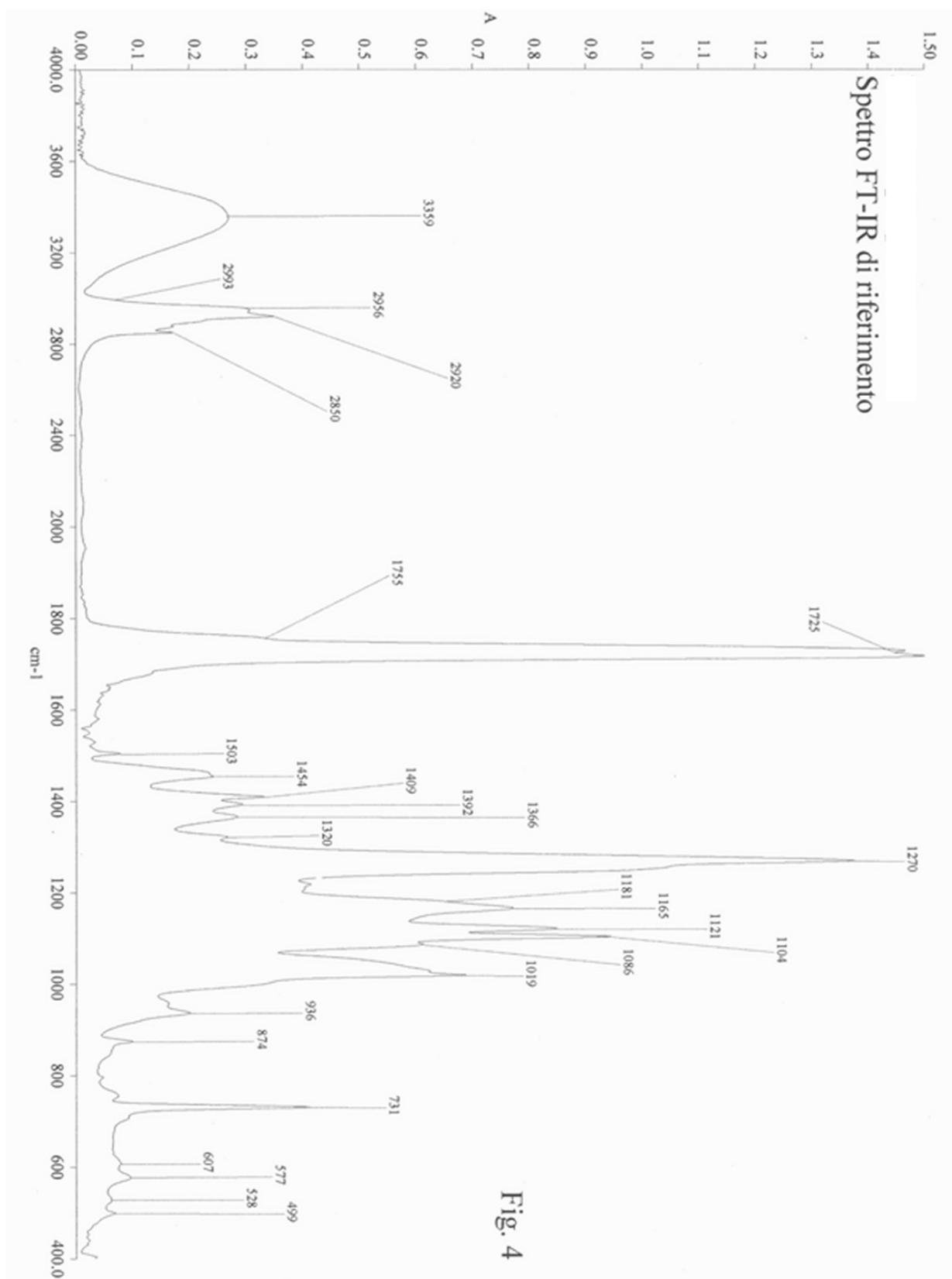


Fig. 4

