

## **XV - FOSFORO**

### **XV1- DETERMINAZIONE DEL FOSFORO TOTALE**

**Metodo XV1.1 Mineralizzazione con attacco acido a caldo**

**Metodo XV1.2. Fusione alcalina in Na-K carbonato**

**Metodo XV.2**

**DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ORGANICO**

**Metodo XV.3**

**DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ASSIMILABILE (METODO OLSEN)**

**Metodo XV.4**

**DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ASSIMILABILE (METODO BRAY E KURTZ)**

**Metodo XV.5**

**DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ASSIMILABILE (METODO MEHLICH 3)**

**Metodo XV.6**

**DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ESTRAIBILE CON RESINA ANIONICA**

**Metodo XV.7**

**DETERMINAZIONE DELL'ADSORBIMENTO FOSFATICO**

## XV - FOSFORO

### Introduzione

Il Fosforo (P) non è tra gli elementi più abbondanti nella roccia terrestre ma anche se presente in piccole quantità ma ha un ruolo molto importante nel suolo per la nutrizione delle piante e per l'alimentazione degli organismi animali, dell'uomo e nei cicli biogeochimici. Il Fosforo ha la capacità di formare numerosi legami covalenti con composti organici ed inorganici formando molecole di importanza fondamentale per alcune funzioni vitali della cellula come l'ATP ed il DNA. La caratterizzazione delle forme di P nel suolo è stato oggetto di numerosi studi già dal 1940 per quantificare le esigenze nutritive delle piante per stabilire le corrette fertilizzazioni. Oggi gli aspetti nutritivi sono anche legati alle trasformazioni pedogenetiche ed al rischio di inquinamento ambientale. Il P perso per erosione dal suolo è considerato uno dei maggiori responsabili della eutrofizzazione delle acque superficiali.

Molti minerali primari contengono P e sono stabili all'alterazione chimica (il più abbondante è l'apatite un ortofosfato di calcio) e rappresentano la forma principale di P che si libera nel suolo a seguito dell'alterazione delle rocce. Nei suoli agricoli il P deriva anche da numerosi prodotti che vengono aggiunti al suolo come i fertilizzanti, fanghi di depurazione, rifiuti organici di origine umana o animale, pesticidi, detergenti e materiali plastici di ogni tipo. Questi composti sono dispersi nell'ambiente a seguito delle numerose attività svolte dall'uomo ed hanno un forte impatto negli ecosistemi naturali ed antropici. Questi apporti antropici di fosforo rappresentano un problema per la determinazione l'analisi di questo elemento perchè può essere presente anche in forme che non esistono negli ambienti naturali come i polifosfati ma che sono il prodotto della antropizzazione del suolo.

Il fosforo viene assimilato dalle radici delle piante in forma inorganica di ortofosfato direttamente dalla soluzione del suolo. La forma più abbondante del P nel suolo è organica (50-75%) che rappresenta la principale riserva ed è in continua trasformazione. Il ciclo biogeochimico del fosforo è controllato dai processi di immobilizzazione e di mineralizzazione del P organico-inorganico che dipendono dal pH, dal potenziale redox, dall'idrolisi enzimatica (fosfatasi) e dalle condizioni climatiche. Le forme inorganiche del P sono l'anione ortofosfato monoacido  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  che è stabile in condizione di acidità e l'anione orto fosfato biacido  $\text{HPO}_4^{2-}$  che è stabile a pH leggermente alcalino. L'attività dei due ioni è uguale a pH 7.2, la forma indissociata  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (acido fosforico) predomina a valori di pH inferiori di 3.5 e la forma completamente dissociata  $\text{PO}_4^{3-}$  è stabile a pH superiore a 11. Nel suolo le reazioni del fosforo sono molto più complesse e la disponibilità del fosforo per le piante è controllata non solo dal pH ma anche da numerosi composti minerali (ossidi ed ossidrossidi di ferro e di alluminio e carbonato di calcio) che tendono facilmente a reagire con il P ed a farlo precipitare in forme poco solubili e pertanto poco assimilabili dalla piante. La disponibilità del fosforo nei suoli acidi, dove le specie di alluminio e di ferro sono più solubili, è controllata dalla presenza di alluminio o ferro di scambio e generalmente la disponibilità del fosforo (definito anche fosforo assimilabile) diminuisce con il diminuire del pH perché si formano sali insolubili di

fosfati di ferro o di alluminio. Nei suoli sub alcalini l'abbondanza di calcio di scambio o di carbonato di calcio determinano bassi valori di fosforo "assimilabile" per la rapida precipitazione del fosforo come fosfato di calcio insolubile.

Lo scopo di questo capitolo è quello di elencare differenti metodi di analisi utilizzati per valutare le principali forme del P nel suolo che sono considerate con diversa gradualità disponibili nel breve e nel lungo periodo. Le terminologie che verranno utilizzate per le diverse forme di P provengono da numerosi studi dove è stato stabilito che: il P totale rappresenta tutte le forme presenti nel suolo (inorganiche ed organiche), il fosforo organico è il P contenuto nelle sostanze umiche e nella frazione non umica, il P assimilabile è il quello estratto con estraenti chimici blandi e stima il P assimilato dalla pianta (Bowman R. A. 1988; 1989). Altre terminologie che si riferiscono ad altre forme estraibili non sono trattate in questo capitolo perché sono oggetto di ricerche di carattere specialistico e pertanto esulano dallo scopo delle metodologie di analisi chimiche del suolo di routine.

## Metodo XV1 DETERMINAZIONE DEL FOSFORO TOTALE

La determinazione del fosforo totale del suolo sono principalmente due: la fusione alcalina con  $\text{NaHCO}_3$  (Jackson, 1958) e la mineralizzazione con acido solforico  $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{HF}$  a caldo (Bowman, 1988). La fusione alcalina è un metodo utilizzato per la determinazione degli elementi totali e può essere anche applicato per il fosforo totale nel suolo, il secondo metodo può essere adottato nel caso si debba fare solo il fosforo totale. La mineralizzazione con acidi forti richiede che preliminarmente tutta la frazione organica venga completamente ossidata con acqua ossigenata e successivamente si è effettuata una digestione a caldo con acido solforico in presenza di fluoridrico per solubilizzare i silicati. L'uso dell'acido fluoridrico comporta che non venga utilizzata vetreria comune e che la mineralizzazione avvenga in contenitore di PTFE (Teflon).

### Metodo XV1.1 Mineralizzazione con attacco acido a caldo

#### 1. Principio

Il campione viene trattato preventivamente con  $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{O}_2$  fino a totale ossidazione della sostanza organica, successivamente si effettua una digestione a caldo  $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{HF}$ . Il contenuto di fosforo è determinato per spettrofotometria con il metodo colorimetrico utilizzando il complesso solfo-molibdico in presenza di acido ascorbico.

#### 2. Reagenti

- **Acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrato [96%  $\rho = 1,835$ ]**
- **Perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [30 % m/m  $\rho = 1,122$ ]**
- **Acido fluoridrico (HF) [50%  $\rho = 1,155$ ]**
- **Soluzione (5 moli  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) di sodio idrossido**  
Sciogliere in  $\text{H}_2\text{O}$ , in matraccio tarato da 1000 mL, 200 g di sodio idrossido ( $\text{NaOH}$ ). Mescolare e, dopo raffreddamento, portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ .
- **Soluzione (0,25%) di p-nitrofenolo**  
Sciogliere in  $\text{H}_2\text{O}$ , in matraccio tarato da 100 mL, 0,25 g di p-nitrofenolo ( $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ). Portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ .
- **Soluzione (2,5 moli  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) di acido solforico**  
Aggiungere, lentamente, in matraccio tarato da 1000 mL contenente circa 500 mL di  $\text{H}_2\text{O}$ , 140 mL di acido solforico concentrato ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [96%  $\rho = 1,835$ ]. Mescolare e, dopo raffreddamento, portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ .
- **Soluzione (40 g  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) di ammonio molibdato**  
Sciogliere in  $\text{H}_2\text{O}$ , in matraccio tarato da 1000 mL, 40 g di ammonio molibdato [ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ]. Portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ . Conservare la soluzione in recipiente di vetro scuro.
- **Soluzione (1 mg di Sb  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ) di antimonio potassio tartrato**  
Sciogliere in  $\text{H}_2\text{O}$ , in matraccio tarato da 100 mL, 0,2728 g di antimonio potassio tartrato [ $(\text{K}(\text{SbO}) \cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O})$ ]. Portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ .
- **Soluzione (0,1 moli  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) di acido ascorbico**  
Sciogliere in  $\text{H}_2\text{O}$ , in matraccio tarato da 100 mL, 1,76 g di acido ascorbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ). Portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ . Preparare la soluzione al momento dell'uso.

- **Soluzione (0,8 moli · L<sup>-1</sup>) di acido boricco**  
Sciogliere in H<sub>2</sub>O, in matraccio tarato da 1000 mL, 50 g di acido boricco (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)  
Portare a volume con H<sub>2</sub>O.
- **Reagente solfomolibdico**  
Mescolare, al momento dell'uso, 50 mL della soluzione (2,5 moli · L<sup>-1</sup>) di acido solforico, 15 mL della soluzione (40 g · L<sup>-1</sup>) di ammonio molibdato, 30 mL della soluzione (0,1 moli · L<sup>-1</sup>) di acido ascorbico e 5 mL della soluzione (1 mg di Sb · mL<sup>-1</sup>) di antimonio potassio tartrato.
- **Soluzione standard (1000 mg · L<sup>-1</sup>) di fosforo (P)**  
Trasferire in matraccio tarato da 1000 mL, contenente circa 500 mL di H<sub>2</sub>O, 4,3938 g di potassio diidrogeno fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) essiccato in stufa a 40°C.  
Dopo solubilizzazione del sale, portare a volume con H<sub>2</sub>O.
- **Soluzione standard diluita di fosforo (P)**  
Prelevare con buretta di precisione 10 mL della soluzione standard (1000 mg · L<sup>-1</sup>) di fosforo e trasferire in matraccio tarato da 1000 mL.  
Portare a volume con H<sub>2</sub>O.  
In questa soluzione la concentrazione del fosforo è di 10 mg · L<sup>-1</sup>.

### 3. Apparecchiatura

Attrezzatura da laboratorio di uso comune.

In particolare:

- bicchieri di PTFE (Teflon) da 100 mL;
- piastra riscaldante;
- spettrofotometro.

### 4. Procedimento

#### 4.1. Mineralizzazione con attacco acido a caldo

Trasferire 0,5 g del campione di terra fine, setacciata a 0,2 mm, in bicchiere di PTFE (Teflon) da 100 mL. Aggiungere 5 mL di acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) [96% ρ<sub>20</sub> = 1,835] e agitare lentamente per portare in sospensione le particelle di suolo aderenti al fondo del bicchiere. Operando sotto cappa, aggiungere, in quantità successive di 0,5 mL, 3 mL di idrogeno perossido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Agitare bene dopo ogni aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per facilitare la reazione di ossidazione. Evitare la fuoriuscita di schiuma, possibile, in particolare, nel caso di campioni di suolo caratterizzati da elevato contenuto di sostanza organica.

Dopo qualche tempo, utilizzando pipetta di polipropilene, aggiungere, in quantità successive da 0,5 mL, 1 mL di acido fluoridrico.

Mescolare e, per eliminare l'eccesso di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tenere il bicchiere su piastra preriscaldata a 150°C per 10 - 12 minuti.

Dopo raffreddamento, trasferire quantitativamente il contenuto del bicchiere in matraccio tarato da 50 mL (V1) Portare a volume con H<sub>2</sub>O, omogeneizzare e filtrare per carta Whatman® n° 42. Preparare la prova in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione di suolo.

#### 4.2. Determinazione colorimetrica

Prelevare, una aliquota della soluzione limpida (V2) contenente da 2 a 40 g di P e trasferirla in matraccio tarato da 50 mL. Aggiungere 5 gocce della soluzione di pnitrofenolo e, goccia a goccia, una quantità della soluzione ( $5 \text{ moli} \cdot \text{L}^{-1}$ ) di NaOH sufficiente a far virare al giallo il colore dell'indicatore.

Se necessario, per eliminare le interferenze dello ione fluoruro, aggiungere 15 mL di soluzione ( $0,8 \text{ moli} \cdot \text{L}^{-1}$ ) di acido bórico.

Diluire a circa 25 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  e aggiungere 8 mL del reagente solfomolibdico.

Portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ .

Dopo 10 minuti leggere allo spettrofotometro il valore di estinzione a 882 nm contro un bianco che contenga tutti i reagenti esclusa la soluzione di fosforo.

### 4.3. Preparazione della curva di taratura

Prelevare 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mL della soluzione standard diluita ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) di fosforo e trasferirla in sei matracci tarati da 50 mL. Diluire a circa 25 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  e aggiungere 8 mL del reagente solfomolibdico.

Portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ .

In ciascuna delle sei soluzioni la concentrazione del fosforo è, rispettivamente, di 0, 1, 2, 3, 4 e  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Dopo 10 minuti leggere allo spettrofotometro il valore di estinzione a 882 nm contro un bianco che contenga tutti i reattivi esclusa la soluzione di fosforo.

### 5. Espressione dei risultati

Il contenuto di fosforo totale viene espresso in  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , con una cifra decimale.

Per il calcolo viene utilizzata l'espressione

$$C = (A-B) \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{50}{M}$$

dove

C = contenuto di fosforo totale nel suolo, espresso in  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

A = concentrazione di fosforo nella soluzione del campione, espressa in  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

B = concentrazione di fosforo nella soluzione della prova in bianco, espressa in  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

$V_1$  = volume dell'estratto acido (50 mL)

$V_2$  = volume della soluzione del campione utilizzata per la determinazione colorimetrica

M = massa del campione di suolo, espressa in grammi.

### 6. Note

L'impiego di campione di suolo setacciato a 0,2 mm facilita il trattamento con  $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{HF}$  e consente una migliore riproducibilità dei risultati. Le quantità di fosforo totale nel suolo determinate con i metodi che utilizzano il trattamento con acido perclorico (Jackson, 1958) e l'ossidazione con sodio ipobromito seguita da solubilizzazione in acido solforico diluito (Dick e Tabatabai, 1977) risultano inferiori a quelle accertate con il metodo XV1.2. Metodo della fusione alcalina e dal metodo descritto (Bowman, 1988). L'impiego dell'acido ascorbico come agente riducente (Murphy e Riley, 1962) presenta il vantaggio, rispetto alla utilizzazione dello stagno cloruro (oso) (Jackson, 1958), di una più lunga stabilità del colore

blu (oltre 24 ore) e di una maggiore tolleranza ad elevate concentrazioni di sali e di  $\text{Fe}^{3+}$  (oltre  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Tutti i prodotti utilizzati devono essere privi di silicio, tenuto conto della reattività di questo elemento con il reagente solfomolibdico. Per lo stesso motivo, è preferibile utilizzare acqua distillata dal momento che l'acqua deionizzata può contenere silice.

## **7. Bibliografia**

Bowman R. A. 1988. A rapid method to determine total phosphorus in soils. Soil Sci Soc. Am. J. 52:1301-1304.

Dick W. A, Tabatabai M. A. 1977. An alkaline oxidation method for determination of total phosphorus in soils. Soil Sci Soc. Am. J. 41: 511-514.

Jackson M. L. 1958. Soil Chemical Analysis. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.

Murphy J., Riley H. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphorus in natural waters. Anal.Chem. Acta. 27: 31-36

### **XV1.2. Metodo della fusione alcalina in Na-K carbonato**

Si rimanda al capitolo della determinazione degli elementi totali per fusione alcalina in Na-K-carbonato (Metodo XX).

## Metodo XV.2

### DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ORGANICO

Per la determinazione del fosforo organico (Po) è necessario idrolizzare completamente forme del fosforo molto stabili come l'inositolfosfato, i fosfolipidi, gli acidi nucleici, le fosfoproteine e diversi fosfato zuccheri con un acido forte. Per facilitare la decomposizione del fosforo organico e la successiva idrolisi il suolo viene trattato termicamente ad alta temperatura (550 ° C).

#### 1. Principio

Il fosforo organico viene convertito in inorganico per calcinazione del suolo a 550° C in ambiente acido. Il contenuto di fosforo organico (Po) viene stimato sottraendo dalla quantità di fosforo estratta con acido solforico da un campione di suolo dopo calcinazione (Pt) la quantità estratta, sempre con acido solforico, da un campione non trattato termicamente (Pn). Il contenuto di fosforo è determinato per spettrofotometria con il metodo all'acido ascorbico.

#### 2. Reagenti

- **Soluzione (0,5 moli · L<sup>-1</sup>) di acido solforico**

Aggiungere, lentamente, in matraccio tarato da 1000 mL contenente circa 500 mL di H<sub>2</sub>O, 27,8 mL di acido solforico concentrato (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) [96% ρ<sub>20</sub> = 1,835].

Mescolare e, dopo raffreddamento, portare a volume con H<sub>2</sub>O.

#### 3. Apparecchiatura

Attrezzatura da laboratorio di uso comune. In particolare:

- capsule di porcellana a fondo tondo (Ø = 13 cm);
- forno a muffola;
- centrifuga a 3000 giri · minuto<sup>-1</sup>;
- agitatore oscillante a 120÷140 cicli · minuto<sup>-1</sup>;
- piastra riscaldante;
- spettrofotometro.

#### 4. Procedimento

##### 4.1. Trattamento termico

Trasferire in capsula di porcellana 2 g del campione di terra fine, setacciata a 0,2 mm. Inserire la capsula in forno a muffola freddo. Portare la temperatura a 550°C e protrarre il riscaldamento per 1 ora.

##### 4.2. Estrazione acida

Dopo raffreddamento, trasferire il campione trattato termicamente in un tubo da centrifuga da 100 mL. Trasferire in un altro tubo da centrifuga da 100 mL 2 g del campione di terra fine, setacciato a 0,2 mm. Aggiungere a ciascun tubo da centrifuga 50 mL della soluzione (0,5 moli

· L<sup>-1</sup>) di acido solforico e, dopo aver tenuto in agitazione per 16 ore, centrifugare. Preparare la prova in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione di suolo.

### 4.3. Determinazione colorimetrica

Si rimanda al Metodo XV1, paragrafo 4.2, 4.3 della determinazione colorimetrica del fosforo con il metodo solfomolibdico e con acido ascorbico.

### 5. Espressione dei risultati

Per il calcolo viene utilizzata l'espressione

$$C = (A-B) \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{50}{M}$$

dove

C = contenuto di fosforo organico nel campione di suolo trattato (Pt) e non trattato (Pn) termicamente, espresso in mg · kg<sup>-1</sup>

A = concentrazione di fosforo nella soluzione del campione, espressa in mg · L<sup>-1</sup>

B = concentrazione di fosforo nella soluzione della prova in bianco, espressa in mg · L<sup>-1</sup>

V<sub>1</sub> = volume dell'estratto acido (50 mL)

V<sub>2</sub> = volume della soluzione del campione utilizzata per la determinazione colorimetrica.

M = massa del campione di suolo, espressa in grammi

Il fosforo organico (Po) si calcola per differenza tra fosforo nel campione di suolo trattato (Pt) e non trattato (Pn) termicamente:

$$Po = Pt - Pn$$

### 6. Note

Il trattamento termico a 550°C deve essere realizzato in condizioni di buona ossigenazione per evitare reazioni di riduzione che possono avvenire sotto i 400°C con volatilizzazione del fosforo (H<sub>3</sub>P). La temperatura finale va tenuta costante, senza superarla, per evitare di modificare la solubilità di alcuni composti del fosforo. La presenza di ossidi di ferro e di alluminio può portare a sovrastimare il contenuto di P organico. Cause di sottostima possono essere, invece, l'incompleta idrolisi di composti quali l'inositolfosfato e l'RNA e le perdite per volatilizzazione che risultano particolarmente significative per le torbe. Tutti i prodotti utilizzati devono essere privi di silicio, tenuto conto della reattività di questo elemento con il reagente solfomolibdico. Per lo stesso motivo, è preferibile utilizzare acqua distillata dal momento che l'acqua deionizzata può contenere silice.

### 7. Bibliografia

- Bowman, R.A. 1989. A sequential extraction procedure with concentrated sulfuric acid and dilute base for soil organic phosphorus. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 53:362-366.
- Kuo, S. 1996. Phosphorus. In: D.L. Sparks (ed.) *Methods of soil analysis. Agronomy 9.* ASA-SSSA, Madison, WI.

## Metodo XV.3

### DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ASSIMILABILE (METODO OLSEN)

#### 1. Principio

Il metodo è applicabile sia ai suoli acidi che alcalini e suoli con presenza di calcio carbonato. La presenza nella soluzione di ioni carbonato riduce l'attività di  $\text{Ca}^{2+}$  e di  $\text{Al}^{3+}$  con conseguente incremento della solubilità del fosforo. Nei suoli calcarei l'aggiunta di ioni carbonato riduce l'attività del  $\text{Ca}^{2+}$  che precipita in forma di  $\text{CaCO}_3$ , in questo modo la solubilità del fosfato di calcio aumenta con il diminuire del  $\text{Ca}^{2+}$  in soluzione. Nei suoli acidi o neutri, la solubilità dei fosfati di alluminio e di ferro (strengite e variscite) aumenta con l'aumento del pH che determina la precipitazione dell' $\text{Al}^{3+}$  e del  $\text{Fe}^{3+}$  sottoforma di ossidi. Nei suoli acidi la presenza del tampone carbonato determina valori di pH compresi tra 6 e 7 dove il fosforo è presente in uguale quantità nelle due forme  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ . A pH elevato, può verificarsi un desorbimento del fosforo per l'aumento delle cariche negative degli ossidi di alluminio e di ferro. Il contenuto di fosforo viene determinato per spettrofotometria con il complesso solfo molibdico e con aggiunta di acido ascorbico.

#### 2. Reagenti

- **Soluzione (2,5 moli · L-1) di acido solforico**  
Aggiungere, lentamente, in matraccio tarato da 1000 mL contenente circa 500 mL di  $\text{H}_2\text{O}$ , 140 mL di acido solforico concentrato ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [96%  $\rho = 1,835$ ]. Mescolare e, dopo raffreddamento, portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ .
- **Soluzione (0,5 moli · L-1) di sodio bicarbonato**  
Sciogliere in un bicchiere, contenente circa 900 mL di  $\text{H}_2\text{O}$ , 42 g di sodio bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ , mw = 84.01): Aggiungendo goccia a goccia la soluzione (1 mole · L<sup>-1</sup>) di sodio idrossido, portare il pH al valore di 8,5. Trasferire in matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con  $\text{H}_2\text{O}$ .
- **Carbone attivo, libero da fosforo**  
Questo reagente va lavato preventivamente con la soluzione (0,5 moli · L<sup>-1</sup>) di sodio bicarbonato. In presenza di fosforo, lavare più volte con la stessa soluzione fino a livelli di P non rilevabili per spettrofotometria.
- **Soluzione (0,25%) di p-nitrofenolo**  
Sciogliere in  $\text{H}_2\text{O}$ , in matraccio tarato da 100 mL, 0,25 g di p-nitrofenolo ( $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ).

#### 3. Apparecchiatura

Attrezzatura da laboratorio di uso comune.

In particolare:

- pH-metro con compensatore della temperatura, elettrodo di vetro con elettrodo di riferimento o elettrodi combinati;
- agitatore oscillante a 120÷140 cicli · minuto<sup>-1</sup>;
- filtro tipo Whatman® n°42;
- spettrofotometro.

#### 4. Procedimento

#### **4.1. Estrazione**

Trasferire 2 g del campione di terra fine in contenitore di materiale plastico da 100 mL o un tubo da centrifuga da 125 ml. Aggiungere 0,5 g di carbone attivo e 40 mL ( $V_1$ ) della soluzione ( $0,5 \text{ moli} \cdot \text{L}^{-1}$ ) di sodio bicarbonato a pH 8,5. Tenere in agitazione per 30 minuti e filtrare la soluzione con filtro tipo Whatman® n°42 raccogliendo il filtrato in contenitore di materiale plastico munito di tappo. Se necessario, per soluzioni molto scure, si aggiunge il carbone attivo per ridurre l'interferenza della sostanza organica solubile. Preparare la prova in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione di suolo.

#### **4.2. Determinazione colorimetrica**

Per la determinazione colorimetrica del fosforo si rimanda al Metodo XV1, paragrafo 4.2, 4.3 con il metodo solfomolibdico e con acido ascorbico e utilizzando la formula riportata nel paragrafo 5. Espressione dei risultati, tenendo in considerazione che  $V_1$  è il volume della soluzione estraente di 40 ml e  $V_2$  è il volume dell'estratto utilizzato per la determinazione colorimetrica.

#### **7. Bibliografia**

Olsen S. R., Cole C.V., Watanabe F. S., Dean L. A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA circular 939. U.S. Gov. Print. Office, Washington, D.C.

## Metodo XV.4

### DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ASSIMILABILE (METODO BRAY E KURTZ)

#### 1. Principio

Il metodo di Bray e Kurtz, 1945, si basa sulla estrazione del fosforo con una soluzione leggermente acida (0.025 M HCl e 0.03 M NH<sub>4</sub>F) che effettua una rimozione selettiva del fosforo legato al ferro ed all'alluminio per complessazione di questi ioni con ammonio fluoruro. Il fluoruro riesce anche a prevenire il riadsorbimento sui colloidi del suolo del fosforo estratto. Il contenuto del fosforo viene determinato per spettrofotometria con il metodo all'acido ascorbico. Questo metodo di estrazione del fosforo è stato sviluppato per suoli con pH moderatamente acidi e non si può usare su suoli calcarei o alcalini perché si verifica la dissoluzione del carbonato di calcio che riprecipita come calcio fluoruro.

#### 2. Reagenti

- **Soluzione (1 moli · L<sup>-1</sup>) di ammonio fluoruro**  
Sciogliere in H<sub>2</sub>O, in matraccio tarato da 1000 mL, 37,04 g di ammonio fluoruro (NH<sub>4</sub>F). Portare a volume con H<sub>2</sub>O. Conservare la soluzione in un contenitore di materiale plastico.
- **Soluzione (5 moli · L<sup>-1</sup>) di acido cloridrico**  
Aggiungere, con cautela, in matraccio tarato da 1000 mL, contenente circa 400 mL di H<sub>2</sub>O, 435 mL di acido cloridrico (HCl) [37% ( ρ=1,186)]. Mescolare e, dopo raffreddamento, portare a volume con H<sub>2</sub>O.
- **Soluzione (0,03 moli · L<sup>-1</sup>) di ammonio fluoruro e (0,025 moli·L<sup>-1</sup>) di acido cloridrico**  
Prelevare e trasferire, in successione, in matraccio tarato da 1000 mL 30 mL della soluzione (1 moli · L<sup>-1</sup>) di ammonio fluoruro e 5 mL della soluzione (5 moli · L<sup>-1</sup>) di acido cloridrico. Portare a volume con H<sub>2</sub>O.

#### 3. Apparecchiatura

Attrezzatura da laboratorio di uso comune.

In particolare:

- contenitori in materiale plastico muniti di tappo;
- agitatore oscillante a 120÷140 cicli · minuto<sup>-1</sup>;
- centrifuga;
- spettrofotometro;
- cronometro.

#### 4. Procedimento

##### 4.1. Preparazione della estrazione

Trasferire 5 g del campione di terra fine in tubo da centrifuga da 250 mL. Aggiungere 50 mL (V1) di soluzione (0,03 moli · L<sup>-1</sup>) di ammonio fluoruro e (0,025 moli · L<sup>-1</sup>) di acido cloridrico. Agitare per un minuto esatto, controllando con il cronometro il tempo controllando che la

temperatura sia prossima a 25°C. Centrifugare immediatamente e trasferire il surnatante in contenitore di materiale plastico munito di tappo. Preparare la prova in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione di suolo.

#### **4.2. Determinazione colorimetrica**

Per la determinazione colorimetrica del fosforo si rimanda al Metodo XV1, paragrafo 4.2, 4.3 con il metodo solfomolibdico e con acido ascorbico e utilizzando la formula riportata nel paragrafo 5. Espressione dei risultati, tenendo in considerazione che  $V_1$  è il volume della soluzione estraente di 50 ml e  $V_2$  è il volume dell'estratto utilizzato per la determinazione colorimetrica.

#### **6. Note**

Il metodo non è utilizzabile per i suoli calcarei sia per la neutralizzazione del sistema da parte dei calcio o magnesio carbonati presenti sia per la formazione di  $\text{CaF}_2$  che reagisce con il fosfato estratto con formazione di precipitati secondari. Non è utilizzabile per suoli molto argillosi con elevata saturazione in basi. Tutti i prodotti utilizzati devono essere privi di silicio, tenuto conto della reattività di questo elemento con il reagente solfomolibdico. Per lo stesso motivo, è preferibile utilizzare acqua distillata dal momento che l'acqua deionizzata può contenere silice.

#### **7. Bibliografia**

Bray R.H., Kurz L.T. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. Soil Sci. 59: 39-45.

## Metodo XV.5

### DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ASSIMILABILE (METODO MEHLICH 3)

#### 1. Principio

Il metodo di estrazione Mehlich 3 è stato sviluppato da Mehlich nel 1984 come metodo di estrazione multielemento per effettuare in un'unica operazione la determinazione del P, K, Ca, Mn, Cu, Fe, Mn, e Zn (Mehlich, 1984). Oggi questo metodo è utilizzato dagli Stati Uniti e dal Canada come principale metodo di estrazione per suoli moderatamente acidi o molto acidi, ma può essere applicato un ampio spettro di suoli ed è stato calibrato per la misura del fosforo assimilabile (Tucker, 1992). Il principio del metodo è simile a quello di Bray e Kurtz, 1945 perché la soluzione estraente è formata da un acido debole (acido acetico) in presenza di ammonio fluoruro. L'acido acetico è un estraente in grado di determinare il desorbimento del fosforo in molti suoli. Il fosforo assimilabile determinato con questo metodo è molto simile a quello determinato con i metodi Bray and Kurtz, 1945 e Olsen (Sims, 1989; Tran et al., 1990). Valori di fosforo assimilabile di 45-50 mg P/kg di suolo sono generalmente considerate ottimali per la crescita delle piante e per la produzione delle maggiore colture.

#### 2. Reagenti

- **Soluzione (3,5 moli · L<sup>-1</sup>) di ammonio fluoruro e (0,25 moli · L<sup>-1</sup>) EDTA [(HOOCCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N]**

Sciogliere in 1200 di H<sub>2</sub>O, in matraccio tarato non di vetro da 2000 mL, 277.8 g di ammonio fluoruro (NH<sub>4</sub>F) e aggiungere 146.1 g EDTA [(HOOCCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N] e portare a volume con H<sub>2</sub>O. Conservare la soluzione in un contenitore di materiale plastico ( la soluzione si può utilizzare per 10000 determinazioni).

- **Soluzione (5 moli · L<sup>-1</sup>) di acido cloridrico**

Aggiungere, con cautela, in matraccio tarato da 1000 mL, contenente circa 400 mL di H<sub>2</sub>O, 435 mL di acido cloridrico (HCl) [37% ( ρ=1,186)]. Mescolare e, dopo raffreddamento, portare a volume con H<sub>2</sub>O.

- **Soluzione di acido acetico (0,2 moli · L<sup>-1</sup>), di nitrato di ammonio (0,25 moli · L<sup>-1</sup>), ammonio fluoruro (0,015 moli · L<sup>-1</sup>), di acido nitrico (0,013 moli·L<sup>-1</sup>), EDTA [(HOOCCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N] (0,001 moli · L<sup>-1</sup>).**

In un baker da 1000 mL sciogliere 20 g di nitrato di ammonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) in circa 400 mL di H<sub>2</sub>O distillata e aggiungere la soluzione in matraccio tarato da 1000 mL. Prelevare e trasferire, in successione 4 mL della soluzione (3,5 moli · L<sup>-1</sup>) di ammonio fluoruro e (0,25 moli · L<sup>-1</sup>) EDTA, 11,5 mL di acido acetico glaciale (99.5%, ρ=1,05) e 0,82 mL di acido nitrico concentrato (HNO<sub>3</sub>, 70 %, ρ=1,52).

Portare a volume con H<sub>2</sub>O e controllare il pH che dovrebbe essere 2,5 ± 0.1, la soluzione è pronta per la determinazione di 40 campioni.

#### 3. Apparecchiatura

Attrezzatura da laboratorio di uso comune.

In particolare:

- contenitori in materiale plastico muniti di tappo;
- agitatore oscillante a 120÷140 cicli · minuto<sup>-1</sup>;
- centrifuga;

- spettrofotometro;

## **4. Procedimento**

### **4.1. Preparazione della estrazione**

Trasferire 5 g del campione di terra fine in tubo da centrifuga da 100 mL. Aggiungere 50 mL ( $V_1$ ) di soluzione estraente Mehlich 3 (acido acetico ( $0,2 \text{ moli} \cdot \text{L}^{-1}$ ), di nitrato di ammonio ( $0,25 \text{ moli} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ammonio fluoruro ( $0,015 \text{ moli} \cdot \text{L}^{-1}$ ), di acido nitrico ( $0,013 \text{ moli} \cdot \text{L}^{-1}$ ), EDTA ( $0,001 \text{ moli} \cdot \text{L}^{-1}$ )). Agitare per 5 minuti con l'agitatore oscillante, controllando che la temperatura sia prossima a  $25^\circ\text{C}$ . Centrifugare immediatamente e trasferire il surnatante in contenitore di materiale plastico munito di tappo. Preparare la prova in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione di suolo.

### **4.2. Determinazione colorimetrica**

Per la determinazione colorimetrica del fosforo si rimanda al Metodo XV1, paragrafo 4.2, 4.3 con il metodo solfomolibdico e con acido ascorbico e utilizzando la formula riportata nel paragrafo 5. Espressione dei risultati, tenendo in considerazione che  $V_1$  è il volume della soluzione estraente 40 ml e  $V_2$  è il volume dell'estratto utilizzato per la determinazione colorimetrica.

## **6. Note**

Il metodo non è utilizzabile per i suoli calcarei sia per la neutralizzazione del sistema da parte dei calcio o magnesio carbonati presenti sia per la formazione di  $\text{CaF}_2$  che reagisce con il fosfato estratto con formazione di precipitati secondari. Non è utilizzabile per suoli molto argillosi con elevata saturazione in basi. Tutti i prodotti utilizzati devono essere privi di silicio, tenuto conto della reattività di questo elemento con il reagente solfomolibdico. Per lo stesso motivo, è preferibile utilizzare acqua distillata dal momento che l'acqua deionizzata può contenere silice.

## **7. Bibliografia**

- Bray R.H., Kurz L.T. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Mehlich, A. 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of the Mehlich 2 extractant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15:1409-1416.
- Tucker, M.R., 1992. Determination of phosphorus by Mehlich 3 extractant. In Donohue, S.J. (ed.) *Reference Soil and Media Diagnostic procedure for the southern region of the United States*. So. Coop. Series Bulletin 374. Va. Agric. Exp. Station, Blacksburg, VA. p. 9-12.
- Sims, J. T. 1989. Comparison of Mehlich 1 and Mehlich 3 extractants for P, K, Ca, Mg, Mn, Cu, and Zn in Atlantic Coastal Plain soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20:1707-1726.
- Tran, T. Sen and R.R. Simard. 1993. Mehlich 3 extractable elements. p. 43-49. In M.R. Carter (ed.) *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Can. Soc. Soil Sci., Ottawa, Ontario.

## **Metodo XV.6**

### **DETERMINAZIONE DEL FOSFORO ESTRAIBILE CON RESINA ANIONICA**

#### **1. Principio**

La resina a scambio anionica è utilizzata per l'estrazione di molte forme biologiche di fosforo tra cui anche forme organiche. L'estrazione del P dipende dal tempo di contatto solido soluzione e può anche dare informazioni sulla cinetica di rilascio. Si impiegano resine a scambio anionico con dimensioni più grandi di 0.5 mm.

#### **2. Reagenti**

- **Resina a scambio anionico (Dowex 2) in forma di cloruro.**

La resina dovrebbe avere una dimensione delle particelle uguale o maggiore di 0.5 mm, conviene controllare le particelle con un setaccio a 0.5 mm scartando quelle di dimensioni inferiori.

- **Soluzione al 10 % di sodio cloruro**

Sciogliere in 100 g di NaCl di H<sub>2</sub>O, in matraccio tarato da 1000 mL.

#### **3. Apparecchiatura**

Attrezzatura da laboratorio di uso comune. In particolare:

- filtro di tela sintetica con fori inferiori a 0,25 mm;
- agitatore oscillante a 120÷140 cicli · minuto<sup>-1</sup>;
- spettrofotometro.

#### **4. Procedimento**

##### **4.1. Preparazione della estrazione**

Trasferire 0,5 g del campione di terra fine, setacciata a 0,2 mm in un contenitore da centrifuga da 100 mL e aggiungere 5 g di resina setacciata. Si aggiungono 50 ml di acqua deionizzata e si agita per 16 ore. La resina viene separata con una tela con fori inferiori a 0,25 mm filtro, viene lavata energicamente con acqua in modo da allontanare il suolo utilizzando una spruzzetta munita di beccuccio. Si trasferisce la resina in un beaker da 50 ml e si elimina l'acqua per decantazione, una volta ripulita la resina dai residui di suolo si aggiungono 25 ml della soluzione di NaCl al 10% e si riscalda a 80°C per 45 minuti. La sospensione viene fatta raffreddare e decantare in un matraccio da 50 ml da cui si prelevano una aliquota da 5 a 10 ml per la determinazione del fosforo con il metodo colorimetrico descritto nel Metodo XV1.

##### **4.2. Determinazione colorimetrica**

Per la determinazione colorimetrica del fosforo si rimanda al Metodo XV1, paragrafo 4.2, 4.3 con il metodo solfomolibdico e con acido ascorbico e utilizzando la formula riportata nel paragrafo 5. Espressione dei risultati, tenendo in considerazione che V<sub>1</sub> è il volume della

soluzione estraente di 40 ml e  $V_2$  è il volume dell'estratto utilizzato per la determinazione colorimetrica.

## **5. Note**

Il metodo della estrazione del fosforo con la resina anionica è l'unico metodo che si avvicina alla assimilazione del fosforo da parte delle radici perché non determina nessuna alterazione del campione di suolo, non modifica il pH della soluzione. Aumentando il tempo di contatto tra il campione di suolo e la resina si può avere una migliore e precisa informazione sulla quantità di P disponibile e sulla sua cinetica di desorbimento. Per questa applicazione è necessario un tempo più prolungato di contatto superiore alle 48 ore fino a 3 settimane o tempi anche superiori.

## **6. Bibliografia**

Larsen S (1952) The use of  $^{32}\text{P}$  in studies on the uptake of phosphorous by plants. *Plant and Soil*, 4, 1–10  
Bowman R. A. e Olsen S.R. 1979. A reevaluation of phosphorus-32 and resin methods in calcareous soils. *Soil Sci Soc. Am. J.* 43:121-124.

## Metodo XV.7

### DETERMINAZIONE DELL'ADSORBIMENTO FOSFATICO

#### 1. Principio

Si fa reagire il campione di suolo con una soluzione contenente una quantità definita di soluzione di potassio di idrogeno fosfato a pH 4,6. Il contenuto di fosforo che rimane in soluzione viene determinato per spettrofotometria con il metodo all'acido ascorbico. La quantità di fosforo adsorbita è calcolata per differenza.

#### 2. Reagenti

- **Soluzione (1000 mg · L<sup>-1</sup>) di potassio diidrogeno fosfato a pH 4,6**  
Sciogliere in matraccio tarato da 1000 mL, contenente circa 800 mL di H<sub>2</sub>O, 4,3937 g di potassio diidrogeno fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 16,4 g di sodio acetato (CH<sub>3</sub>COONa). Aggiungere 11,5 mL di acido acetico glaciale (CH<sub>3</sub>COOH).  
Il pH dovrebbe risultare uguale a 4,6±0,1.

Prelevare con buretta di precisione e trasferire in matraccio tarato da 1000 mL 10 mL della soluzione (1000 mg · L<sup>-1</sup>) di fosforo.

Portare a volume con H<sub>2</sub>O.

In questa soluzione la concentrazione del fosforo è di 10 mg · L<sup>-1</sup>.

#### 3. Apparecchiatura

Attrezzatura da laboratorio di uso comune

In particolare:

- pH-metro con compensatore della temperatura, elettrodo di vetro con elettrodo di riferimento o elettrodi combinati;
- tubi da centrifuga da 250 mL muniti di tappo;
- agitatore oscillante a 120÷140 cicli · minuto<sup>-1</sup>;
- centrifuga;
- spettrofotometro.

#### 4. Procedimento

##### 4.1. Adsorbimento del fosfato

Trasferire in un tubo da centrifuga da 250 mL 5 g del campione di terra fine. Aggiungere 25 mL (V1) di soluzione (1000 mg · L<sup>-1</sup>) di potassio diidrogeno fosfato a pH 4,6 ed alcune gocce di cloroformio per inibire l'attività microbica. Tenere in agitazione per 16 ore a 25°C e centrifugare. Decantare il surnatante in un contenitore di materiale plastico. Preparare la prova in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione di suolo.

##### 4.2. Determinazione colorimetrica

Per la determinazione colorimetrica del fosforo si rimanda al Metodo XV1, paragrafo 4.2, 4.3 con il metodo solfomolibdico e con acido ascorbico e utilizzando la formula riportata nel

paragrafo 5. Espressione dei risultati, tenendo in considerazione che  $V_1$  è il volume della soluzione utilizzata di 25 ml e  $V_2$  è il volume dell'estratto utilizzato per la determinazione colorimetrica.

## 5. Espressione dei risultati

Il contenuto di fosforo adsorbito dal campione di suolo viene espresso in  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .  
Per il calcolo viene utilizzata l'espressione:

$$P_{\text{ads}} = 5000 - \left[ A - B \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{50}{M} \right]$$

dove

$P_{\text{ads}}$  = capacità di adsorbimento fosfatico, espressa in  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

5000 = quantità di fosforo aggiunta, espressa in  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

A = concentrazione di fosforo nella soluzione del suolo, espressa in  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

B = concentrazione di fosforo nella soluzione della prova in bianco, espressa in  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

$V_1$  = volume dell'estratto (25 mL)

$V_2$  = volume della soluzione utilizzato per la colorazione colorimetrica

M = massa del campione di suolo, espressa in grammi.

## 6. Note

Nella classificazione dei suoli proposta dalla USDA, Soil Taxonomy, la ritenzione in fosforo dei suoli è un criterio diagnostico delle proprietà andiche (Soil Survey Staff, 2010). I suoli vulcanici ed in particolare gli Andisuoli possono contenere elevate quantità di materiale allofanico ed altri minerali amorfi in grado di legare il fosforo con elevata forza (Gebhardt and Coleman, 1984). L'allofane e l'imogolite sono riconosciuti tra i minerali che maggiormente contribuiscono alla ritenzione in fosforo negli Andisuoli (Wada, 1985). La ritenzione in fosforo spesso chiamata adsorbimento fosfatico o capacità di fissazione del fosforo resta il metodo più efficace per evidenziare la presenza di questi minerali e caratterizzare le proprietà andiche. Tutti i prodotti utilizzati devono essere privi di silicio, tenuto conto della reattività di questo elemento con il reagente solfomolibdico. Per lo stesso motivo, è preferibile utilizzare acqua distillata dal momento che l'acqua deionizzata può contenere silice.

## 7. Bibliografia

Blakemore, L. C., Searle P. L., Daly B. K. 1987. Methods for Chemical Analysis of Soils. N.Z. Soil Bureau Sci. Rep. 80. Soil Bureau, Lower Hutt. New Zealand.

Buurman, P., van Lagen, B., Velthorst E. J. 1996. Manual for Soil and Water Analysis. Backhuys Publishers Leiden, The Netherlands.

Gebhardt, H., and N.T. Coleman. 1984. Anion adsorption of allophanic tropical soils: III. Phosphate adsorption. p. 237-248. In K.H. Tan (ed.) Andosols. Benchmark papers in soil science series. Van Nostrand Reinhold, Co., Melbourne, Australia.

Soil Survey Staff. 2010. Key of Soil taxonomy. 11<sup>th</sup> ed. USDA-NRCS Natural Resources Conservation Services NRCS. Govt. Print. Office, Washington DC.

Wada, K. 1985. The distinctive properties of Andosols. p. 173-229. In B.A. Stewart (ed.) Advances in Soil Science. Springer-Verlag, New York, NY.