



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**  
**DOTTORATO DI RICERCA IN ECOLOGIA**  
**XXII CICLO**

TESI DI DOTTORATO

**Carichi azotati generati, bilanci di massa ed export netto e  
regolazione del processo di rimozione del nitrato: una prospettiva  
a livello di bacino idrografico.**

**Relatori:**

Dott. Marco Bartoli  
Prof. Pierluigi Viaroli

**Coordinatore:**

Prof. Giulio De Leo

**Dottoranda:** Erica Racchetti

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

*A tutti i giovani ricercatori,  
in particolare a chi mi è stato vicino in questi anni...  
e a chi mi ha fatto crescere...*

Il presente lavoro di tesi è stato realizzato nell'ambito di tre progetti:

- il progetto “Fili d’acqua”, finanziato dal Parco Oglio Sud;
- il progetto di riqualificazione fluviale “Forum del fiume Oglio. STRARIFLU”, realizzato grazie al finanziamento e al supporto della Fondazione Cariplo e del Parco Oglio Sud;
- il progetto “Analisi dei carichi di nitrato nel bacino del fiume Oglio sublacuale: una proposta di studio su larga scala finalizzata ad individuare le principali sorgenti puntiformi e diffuse lungo l’asta fluviale e valutare il ruolo delle zone umide perifluviali nei processi di abbattimento”, realizzato grazie al finanziamento della Fondazione Lombardia per l’Ambiente.

In particolare desidero ringraziare per il supporto e la collaborazione forniti:

- il Parco Oglio Sud, in particolare la Dott.ssa Susanna Perlini, il Dott. Fabrizio Malaggi, il Dott. Davide Malavasi ed il Dott. Oliviero Spettoli.
- la Fondazione Lombardia per l’Ambiente, in particolari la Dott.ssa Mita Lapi.

Ringrazio con affetto il Prof. Pierluigi Viaroli e Marco Bartoli, perché hanno creduto in me, per i numerosi insegnamenti e consigli e perché mi hanno sostenuta con pazienza; il Prof. Robert Christian per i buoni suggerimenti sia in materia di ecologia che in quella di inglese; tutti gli amici dottorandi e borsisti, in particolare Monica per il sostegno psicologico, Elisa per il grande e preziosissimo aiuto e Daniele per la presenza costante e l’aiuto durante tutti i miei campionamenti. Un grazie anche agli studenti che ho seguito, Elisa, Ulisse, Filippo e Luciana.

# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>12</b>
1.1	Analisi degli studi e dei modelli esistenti sulla stima del carico azotato generato a livello di bacino imbrifero. ....	14
1.2	Il processo di denitrificazione in zone umide perfluviali come hotspot di rimozione del nitrato dalle acque a livello di bacino fluviale .....	18
1.2.1	<b>Problema metodologico nella misura dei tassi di denitrificazione</b> .....	21
1.3	Influenza della rizosfera sul chimismo delle acque interstiziali: implicazioni per la rigenerazione delle forme inorganiche dell'azoto e per i processi di nitrificazione e denitrificazione accoppiata nei sedimenti subsuperficiali.....	23
1.4	Problem statement e obiettivi del lavoro di tesi .....	26
1.5	Strumenti impiegati per affrontare gli obiettivi/problemi.....	28
1.6	Aspetti innovativi del lavoro.....	30
1.7	Organizzazione del lavoro di tesi.....	31
<b>2</b>	<b>AREA DI STUDIO</b> .....	<b>33</b>
2.1	Il bacino del fiume Oglio sublacuale .....	33
2.2	Le zone umide perfluviali di fiumi Po, Oglio sublacuale e Mincio .....	34
2.3	Tratto nord del fiume Mincio.....	38
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>41</b>
3.1	Il bilancio di massa dell'azoto a livello di bacino .....	41
3.1.1	<b>Metodologia di calcolo</b> .....	41
3.1.2	<b>Reperimento dati sulle attività agro-zootecniche, sugli insediamenti civili e sulla qualità delle acque del fiume Oglio sublacuale</b> .....	42
3.1.2.1	<i>Voci di input</i> .....	42
3.1.2.2	<i>Voci di output</i> .....	44
3.1.2.3	<i>Carico di azoto esportato dal fiume Oglio sublacuale</i> .....	45
3.1.2.4	<i>Carico di azoto generato dal comparto civile</i> .....	46
3.1.3	<b>Analisi spaziale del carico di azoto nel bacino</b> .....	46
3.2	Denitrificazione nelle zone umide perfluviali della pianura Padana .....	47
3.2.1	<b>Attività di campo</b> .....	47
3.2.2	<b>Incubazioni al buio di carote di sedimento</b> .....	47
3.2.2.1	<i>Metabolismo bentico</i> .....	48
3.2.2.2	<i>Denitrificazione</i> .....	49
3.2.3	<b>Calcolo dei flussi bentici dei gas e dei nutrienti</b> .....	50
3.2.4	<b>Calcolo dei tassi di denitrificazione</b> .....	50
3.2.5	<b>Analisi in laboratorio: caratterizzazione delle acque e dei sedimenti</b> .....	52
3.2.6	<b>Analisi statistica</b> .....	53
3.3	Trasporto di ossigeno nel sedimento e denitrificazione-nitrificazione nel tratto nord del fiume Mincio colonizzato da <i>Vallisneria spiralis</i> L. ....	54
3.3.1	<b>Colonizzazione di sedimenti organici da parte di una macrofita radicata (<i>Vallisneria spiralis</i>): implicazioni per lo stato redox del sedimento e il chimismo delle acque interstiziali</b> .....	54
3.3.1.1	<i>Attività di campo e set up sperimentale</i> .....	54
3.3.1.2	<i>Analisi in laboratorio: caratterizzazione delle acque, dei sedimenti e di <i>Vallisneria</i> sp.</i> .....	55
3.3.1.3	<i>Analisi statistica</i> .....	56
3.3.2	<b>Misura dei tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione nella rizosfera di <i>V. spiralis</i></b> .....	57
3.3.2.1	<i>Attività di campo</i> .....	57
3.3.2.2	<i>Set-up sperimentale</i> .....	58

3.3.2.3	<i>Incubazioni al buio e alla luce di carote di sedimento nudo e vegetato</i> .....	59
3.3.2.3.1	Metabolismo bentico .....	59
3.3.2.3.2	Denitrificazione accoppiata alla nitrificazione .....	60
3.3.2.3.3	Azotofissazione .....	62
3.3.2.4	<i>Flussi bentici dei gas e dei nutrienti</i> .....	62
3.3.2.5	<i>Tassi di nitrificazione-denitrificazione</i> .....	62
3.3.2.6	<i>Tassi di azoto-fissazione</i> .....	63
3.3.2.7	<i>Analisi in laboratorio: caratterizzazione delle acque, dei sedimenti e di V. spiralis</i> .....	63
3.3.2.8	<i>Analisi statistica</i> .....	64
<b>4</b>	<b><i>Bilancio di massa dell'azoto a livello di bacino</i></b> .....	<b>65</b>
4.1	Risultati .....	65
4.1.1	<b>Incidenza delle pratiche agro-zootecniche sul territorio</b> .....	65
4.1.2	<b>Voci di input e di output: carichi diffusi</b> .....	65
4.1.3	<b>Carichi puntiformi</b> .....	68
4.1.4	<b>Carichi transitanti in fiume e nei principali immissari</b> .....	69
4.2	Discussione .....	70
4.2.1	<b>Bilancio dell'azoto nel bacino dell'Oglio sublacuale ed il confronto tra carichi diffusi e puntiformi</b> .....	70
4.2.2	<b>Qual è il destino del surplus azotato?</b> .....	72
4.3	Conclusione .....	77
<b>5</b>	<b><i>Denitrificazione nelle zone umide perfluviali della pianura Padana</i></b> .....	<b>78</b>
5.1	Risultati .....	78
5.1.1	<b>Caratteristiche generali della colonna d'acqua e del sedimento superficiale</b> .....	78
5.1.2	<b>Processi bentici</b> .....	81
5.1.3	<b>Tassi di denitrificazione</b> .....	85
5.2	Discussione .....	88
5.2.1	<b>Processo di denitrificazione in zone umide eutrofiche e negli altri ecosistemi acquatici</b> .....	88
5.2.2	<b>Regolazione del processo di denitrificazione</b> .....	91
5.2.3	<b>Efficienza di denitrificazione in sedimenti di zone umide eutrofiche poco profonde: sink o source di azoto?</b> .....	94
5.2.4	<b>Denitrificazione e disponibilità di azoto per i produttori primari</b> .....	96
5.2.5	<b>Respirazione bentica e denitrificazione nelle zone umide poco profonde ed eutrofiche</b> .....	97
5.3	Conclusione .....	98
<b>6</b>	<b><i>Trasporto di ossigeno nel sedimento e denitrificazione-nitrificazione nel tratto nord del fiume Mincio colonizzato da Vallisneria spiralis L.</i></b> .....	<b>99</b>
6.1	Colonizzazione di sedimenti organici da parte di una macrofita radicata ( <i>Vallisneria spiralis</i> ): implicazioni per lo stato redox del sedimento e il chimismo delle acque interstiziali .....	99
6.1.1	<b>Risultati</b> .....	99
6.1.1.1	<i>Caratteristiche delle acque, del sedimento e della vegetazione</i> .....	99
6.1.1.2	<i>Chimica delle acque interstiziali dei sedimenti nudi e vegetati</i> .....	101
6.1.2	<b>Discussione</b> .....	106
6.1.2.1	<i>ROL e caratteristiche del sedimento dipendenti dalle condizioni redox</i> ...	106
6.1.2.2	<i>Speciazione dell'azoto e processi nella rizosfera</i> .....	108
6.2	Misura dei tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione nella rizosfera di <i>V. spiralis</i> .....	110
6.2.1	<b>Risultati</b> .....	110

6.2.1.1	<i>Condizioni fisiche e chimiche in situ e di incubazione e caratteristiche biologiche dei mesocosmi</i> .....	110
6.2.1.2	<i>Flussi dell'ossigeno e del carbonio inorganico disciolto</i> .....	111
6.2.1.3	<i>Flussi dell'azoto inorganico</i> .....	114
6.2.1.4	<i>Nitrificazione accoppiata alla denitrificazione in sedimenti vegetati ed in sedimenti nudi</i> .....	118
6.2.1.5	<i>Tassi di azotofissazione in sedimenti vegetati ed in sedimenti nudi</i> .....	119
<b>6.2.2</b>	<b>Discussione</b> .....	119
6.3	Conclusioni .....	125
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>130</b>

## Riassunto

L'eccesso di azoto nelle acque e il cambiamento dello stato trofico di ambienti fluviali, lacustri e marino-costieri sono problemi globali e come tali sono stati recentemente affrontati. In *Global Biogeochemical Cycles*, 2005, volumi 19 e 20, sono riportati i risultati di una serie di studi in cui vengono presentati modelli di genesi e trasporto dei carichi di azoto nei maggiori bacini idrografici di tutti i continenti del pianeta. Paradossalmente, le stime teoriche hanno un buon riscontro con i dati sperimentali quando le scale di analisi sono enormi (ad esempio in bacini come quello del Mississippi); un aumento degli errori si ha invece nelle analisi su media-piccola scala, a causa della scarsità delle informazioni sito-specifiche, del massiccio utilizzo di fattori di conversione e tassi ricavati dalla letteratura, molto spesso relativi ad ambienti o situazioni estremamente diverse. Uno stimolo forte derivato dal lavoro di revisione di *Global Biogeochemical Cycles* è l'analisi capillare sul territorio dei processi, un'analisi che aggiorni alle diverse realtà le dinamiche dell'azoto e permetta di realizzare quadri di sintesi accurati e realistici.

In questo contesto si inserisce il lavoro di tesi, che ha come unità territoriale di riferimento un bacino idrografico (l'Oglio sublacuale, con una estensione di 3700 km<sup>2</sup>) rappresentativo della realtà della Pianura Padana e soggetto ad elevate pressioni antropiche.

Sono stati analizzati in particolare sia processi su vasta scala (bilanci di massa dell'azoto e principali processi di trasporto e trasformazione di questo elemento) sia processi a livello microbico (gradienti redox, attività batteriche ossico-anossiche a scala submillimetrica e implicazioni per ritenzione e dissipazione dell'azoto inorganico).

I principali prodotti del lavoro di tesi sono 4:

1) *Analisi a scala di bacino dei bilanci azotati, calcolo del surplus nei suoli agricoli e dell'export dal bacino, discussione dei possibili sink interni al sistema sia nella porzione terrestre che in quella acquatica.* Sono confermati il disaccoppiamento tra agricoltura e zootecnia, l'enorme eccesso di azoto rispetto alla capacità assimilativa delle colture, l'irrilevanza dei processi dissipativi nelle aree umide ed il ruolo potenziale di sink del reticolo idrografico secondario e delle fasce riparie associate.

Elisa Soana E., **Racchetti E.**, Bartoli M., Viaroli P. Soil nitrogen budget, net export and internal sinks in lower Oglio River watershed (northern Italy). **(sottomesso a Environmental Management)**

2) *Rimozione dell'azoto in aree umide perifluviali a diverso grado di connessione idraulica con il corpo idrico principale.* Viene dimostrata l'importanza dell'alimentazione delle aree umide per garantire elevati tassi di denitrificazione: nelle aree umide perifluviali i tenori di

azoto nitrico sono infatti i principali fattori di regolazione del processo. La rimozione potenziale dell'azoto nelle aree non collegate è elevata ma inespressa.

**Racchetti E.**, Bartoli M., Soana E., Longhi D., Christian R.R., Pinardi M., Viaroli P., 2009. Influence of hydrological connectivity of riverine wetlands on denitrification and other microbial transformations of nitrogen. **(accettato con revisioni da Biogeochemistry)**

3) *Variazioni nel chimismo delle acque interstiziali in relazione alla colonizzazione di una macrofita radicata sommersa (Vallisneria spiralis L.).* La macrofita utilizzata per questi esperimenti è in grado di colonizzare substrati soffici ad elevato carico organico e di trasferire ai sedimenti grandi quantità di ossigeno attraverso la rizosfera. Sono riportati i feedback positivi sullo stato redox dei sedimenti e sulla ritenzione di azoto in biomassa.

**Racchetti E.**, Bartoli M., Ribaud C., Longhi D., Naldi M., Iacumin P., Viaroli P. Short term effects of *V. spiralis* colonisation on porewater features in river sediments **(sottomesso a Hydrobiologia)**

4) *Denitrificazione accoppiata alla nitrificazione nella rizosfera di V. spiralis.* In esperimenti condotti stagionalmente in sedimenti colonizzati da macrofite lungo un gradiente di eutrofizzazione viene dimostrato l'effetto della macrofita nel favorire la dissipazione dell'azoto inorganico mediante denitrificazione accoppiata alla nitrificazione. Questo effetto è maggiore nelle ore di luce rispetto alle ore di buio, probabilmente a seguito del maggiore trasporto di ossigeno nella rizosfera.

**Racchetti E.**, Ribaud C., Longhi D., Bartoli M. Nitrification coupled denitrification in the rhizosphere of *V. spiralis* in an mesotrophic and eutrophic river segment. **(In preparazione per Freshwater Biology)**

In definitiva, i risultati conseguiti permettono di affermare che il bacino del fiume Oglio sublacuale è fortemente impattato dall'attività agrozootecnica ma conserva importanti sink interni dell'azoto, al momento non ancora sufficientemente identificati. L'export al bacino confinante, sebbene elevato, rappresenta infatti una frazione piccola del carico totale generato. L'impiego di tecniche isotopiche potrebbe essere di aiuto nel chiarire gli aspetti lacunosi di questa ricerca. Le evidenze ottenute indicano nel riciclo dell'azoto dalle acque profonde (fontanili, risorgive) verso il reticolo secondario un loop potenzialmente importante, così come importanti appaiono i processi di assimilazione e dissipazione nel reticolo minore durante il periodo irriguo.

La forte contrazione della superficie delle aree umide e la pensilità di molti degli ambienti perfluviali relitti si traduce in quote irrilevanti di azoto perso per denitrificazione, nonostante i risultati di questo lavoro indichino che gli ambienti umidi studiati hanno tassi areali tra i maggiori riportati nella letteratura. Un aspetto applicativo che scaturisce da questo risultato sta nel garantire un adeguato approvvigionamento idrico e un collegamento laterale tra fiume e aree umide perfluviali e nell'incentivare sul territorio la creazione di aree con suoli saturi d'acqua.

Per concludere, il controllo dei carichi inquinanti, la maggiore trasparenza delle acque ed il mantenimento almeno in alcuni tra i canali del reticolo secondario dell'invaso, potrebbe permettere la ricolonizzazione di macrofite pregiate come *V. spiralis*. Questa specie stolonifera, negli esperimenti e nelle manipolazioni condotte sul campo ed in laboratorio, si è rivelata estremamente "rustica" ed in grado di sopportare trasferimenti, piantumazioni in substrati organici ed acque con tenori elevati di nutrienti. Questa pianta promuove elevata qualità dei sedimenti superficiali, rallenta il riciclo delle forme azotate inorganiche ed accelera la dissipazione del nitrato in eccesso tramite denitrificazione.

## **Abstract**

The nitrogen excess in aquatic ecosystems and the change of trophic status for streams, rivers, lagoons and estuaries are global key problems that- as such- were only recently handled. In Global Biogeochemical Cycles, 2005, volumes 19 and 20, are reported many studies about models analysing genesis and transport of nitrogen loadings in the biggest watersheds of all continents. Theoretical estimates have a good correspondence with experimental data when scales of analysis are huge (for example in watersheds like Mississippi basin) whilst errors increase for analysis on mean-small scale because of lack of site-specific, intense utilization of conversion factors and of rates referring to studies that are often related to very different environments and situations. Revision work of Global Biogeochemical Cycles gave a strong push forward in researches on the analysis of various scenarios processes on landscape in a capillary way so as to realize accurate and realistic synthesis pictures - or to review the existing - on nitrogen dynamics.

My thesis gets into this context with the purpose to study nitrogen processes at basin scale. The study area is the lower Oglio River basin (3,700 km<sup>2</sup>) which is subject to high anthropogenic pressures and representative of the entire Po River Plain.

I have studied processes on a wide scale (nitrogen mass balance and main transport and transformation processes of that element) and processes on a microbial scale (redox gradients,

oxic-anoxic microbial activities on millimetric scale and implications on inorganic nitrogen retention and removal).

The main products of this work are:

1) *A nitrogen mass balance analysis at basin scale, a calculation of surplus in lands and of nitrogen export from the basin and a discussion on possible internal sinks both in terrestrial and in aquatic compartment.* The un-coupling between agriculture and livestock holdings is confirmed, such as the huge nitrogen excess in respect of crop uptake capacity, the irrelevance of removal processes in wetlands and the potential role of sink of secondary drainage network and of associated buffer strips.

Elisa Soana E., **Racchetti E.**, Bartoli M., Viaroli P. Soil nitrogen budget, net export and internal sinks in lower Oglio River watershed (northern Italy). **(submitted to Environmental Management)**

2) *Nitrogen removal in riverine wetlands characterized by a different hydrological connectivity degree with main water body.* It is demonstrated the importance of wetlands supply to guarantee high denitrification rates: in fact in riverine wetlands nitrate concentrations are the main factors regulating the process. In isolated wetlands the potentiality for removal of nitrogen is elevated but not effective.

**Racchetti E.**, Bartoli M., Soana E., Longhi D., Christian R.R., Pinardi M., Viaroli P., 2009. Influence of hydrological connectivity of riverine wetlands on denitrification and other microbial transformations of nitrogen. **(accepted with major revisions by Biogeochemistry)**

3) *Variation in pore water chemistry in relation to the colonisation of a submerged rooted macrophyte (*Vallisneria spiralis* L.).* The macrophyte used in this experiments is able to colonise fluffy sediments characterized by high organic matter contents and to transfer to sediments high amounts of oxygen through rizosphere. Positive feedbacks on sediment redox status and on nitrogen retention in biomass are reported.

**Racchetti E.**, Bartoli M., Ribaud C., Longhi D., Brito L., Naldi M., Iacumin P., Viaroli P. Short term effects of *V. spiralis* colonisation on porewater features in river sediments **(submitted to Hydrobiologia)**

4) *Denitrification coupled to nitrification in the rizosphere of *V. spiralis*.* Macrophyte effect in promoting inorganic nitrogen removal through denitrification coupled to nitrification has been demonstrated with seasonal experiments in sediments colonised by macrophytes along an

eutrophication gradient. That effect is higher during light hours in respect of dark ones, most likely due to higher oxygen transport in the rizosphere.

**Racchetti E., Ribaldo C., Longhi D., Bartoli M.** Nitrification coupled denitrification in the rhizosphere of *V. spiralis* in an mesotrophic and eutrophic river segment. **(In preparation for Freshwater Biology)**

The achieved outcomes allow to assert that lower Oglio River basin is strongly exploited by agricultural and breeding activities but it conserves important internal sinks of nitrogen not yet sufficiently identified. The nitrogen export towards the confining basin is high however it represents a small fraction of generated total load.

Isotopic techniques could support clarifying incomplete aspects of this research. Evidence was found to indicate that nitrogen recycling from groundwaters towards secondary drainage network is an important potential loop; similarly, uptake and removal processes result in being very important in the minor network during irrigation period.

The high reduction of wetlands area and the pensile condition of many relict riverine environments determine an irrilevant quota of nitrogen removed by denitrification despite the outcomes of this work indicate that studied wetlands have areal rates of denitrification among the higher ones reported in literature. These results allow to formulate the hypothesis of possible interventions for landscape management as to guarantee a suitable water supply and a hydrological connectivity between riverine wetlands and river and to increase waterlogged areas in the landscape.

In the end, control of polluting loads, higher water transparency and water maintenance in some channels of secondary drainage network could allow the recolonisation of rare macrophytes like *V. spiralis*. In my experiments and in my manipulations made *in situ* and in laboratory the mentioned species is resulted extremely plastic and capable of undergoing transfers and transplants in organic sediments and in water characterized by high nutrient concentrations. The plant improves surficial sediment quality, slows down inorganic nitrogen recycling and accelerates nitrate removal in excess by denitrification.

## *1 INTRODUZIONE*

Negli ultimi 50 anni, la crescita della popolazione ha incrementato la domanda di risorse e la produzione di cibo promuovendo cambiamenti di destinazioni d'uso del suolo e l'utilizzo intensivo di fertilizzanti (Novothy & Olem, 1994). Rispetto al periodo pre-industriale, le moderne pratiche agricole, che prevedono l'apporto di fertilizzanti azotati ai terreni e la coltivazione di specie azoto-fissatrici, congiuntamente all'impiego di combustibili fossili, hanno più che duplicato il tasso con cui l'azoto biologicamente disponibile (azoto reattivo) entra nella biosfera terrestre (Vitousek & Matson 1993; Galloway et al., 2004; Galloway et al., 2008). La modificazione del ciclo dell'azoto, le profonde trasformazioni dell'uso del suolo nei bacini scolanti e la generale banalizzazione del territorio e degli ambiti fluviali (riduzione delle zone tampone, rettificazione, arginatura, etc.) hanno amplificato la mobilizzazione dell'azoto dal comparto terrestre al comparto acquatico, aumentandone il trasferimento dai fiumi verso gli estuari e le zone costiere (Howarth et al., 1996; Vitousek et al., 1997; Galloway, 1998; Caraco & Cole, 1999; Green et al., 2004; Bernot & Dodds, 2005). Questo ha causato l'eutrofizzazione di molti ecosistemi costieri ed estuari, generando condizioni di ipossia cronica e riduzione della biodiversità (Nixon, 1995; Smith V.H. et al., 2006; Diaz & Rosenberg, 2008; Viaroli et al., 2008). Ai processi di eutrofizzazione degli ambienti lacustri e costieri si aggiunge l'eutrofizzazione fluviale, risultante da ingenti quantità di nutrienti inorganici e sostanza organica entranti nei sistemi acquatici (input) e da interruzioni laterali e longitudinali dell'alveo, da riduzioni delle portate naturali e da derivazioni irrigue e dalla bacinizzazione (Vitousek et al., 1997, Pinay et al., 2002; Clément et al., 2003; McClain et al., 2003).

Il grande incremento degli input di azoto nei sistemi acquatici ha indotto molti gruppi di ricerca e di gestione del territorio ad indagare ed investire in progetti mirati ad implementare le conoscenze sul ciclo dell'azoto a livello di bacino, focalizzando l'interesse sull'individuazione delle sorgenti nelle zone terrestri, sui processi di trasferimento, sulle trasformazioni dell'azoto dalla sorgente al sistema fluviale e negli ambienti acquatici stessi e sull'export di azoto agli ecosistemi fluviali adiacenti o a quelli costieri (Schaller et al., 2004; Arango et al., 2008; Boyer et al., 2006; Howarth et al., 1996; Seitzinger & Kroeze, 1998;

Garnier et al., 2001; Boyer et al., 2002; Garnier et al., 2002; Seitzinger et al., 2002a; Galloway et al., 2004; Green et al., 2004; Bouwman et al., 2005).

Due sono sostanzialmente gli approcci scelti dalla comunità scientifica per affrontare questo problema: 1) l'utilizzo di modelli per descrivere gli input di azoto dalle sorgenti puntiformi e diffuse e per stimare il destino dell'azoto nei bacini idrografici fino alla foce del fiume; 2) lo studio dei fattori regolanti i processi del ciclo dell'azoto e la loro quantificazione negli ambiti fluviali e perifluviale: uptake biologico, sedimentazione, nitrificazione, ammonificazione, riduzione del nitrato ad ammonio, denitrificazione e ossidazione anaerobica dell'ammonio (Brandes et al. 2007; Burgin & Hamilton 2007; Jetten 2008).

Alla luce della complessità del problema generato dalle attività antropiche a livello globale, la comunità scientifica ha risposto con ricerche mirate alla stima di bilanci di massa a livello globale, continentale, regionale, di nazione e di bacino, al fine di considerare tutti gli input e gli output di azoto del sistema preso in esame e di stimare il contributo relativo dei processi di trasformazione dell'azoto rispetto all'eccesso di azoto. In tutti gli studi l'analisi dell'export di azoto dal sistema è risultata chiave, determinante per capire se il sistema è in grado di metabolizzare l'azoto in eccesso. Molte riviste internazionali, *Biogeochemistry* e *Global Biogeochemical Cycles*, riportano ricerche basate su diversi tipi di modelli con grado di complessità differente in risposta alla necessità di comprendere la funzionalità degli ecosistemi acquatici e l'importanza dei processi di ritenzione e rimozione dell'azoto per sviluppare strategie di gestione e controllo di questo nutriente (Bashkin et al., 2002; Dumont et al., 2005; Seitzinger et al., 2005; Van Drecht et al., 2005; Borbor-Cordova et al., 2006; Boyer et al., 2006; Grizzetti et al., 2008). Nonostante i modelli diano la possibilità di analizzare situazioni complesse, Van Drecht et al. (2005) evidenziano che la mancanza di alcune stime e coefficienti sito-specifici (es: tassi di azoto fissazione, deposizione atmosferica di azoto) insieme a scelte di informazioni datate e a volte improprie genera un errore nel calcolo del bilancio, errore che risulta inversamente proporzionale alla scala di indagine con cui si ripartiscono le informazioni; da qui scaturisce la necessità di affinare lo studio delle dinamiche dell'azoto a risoluzione spaziale minore -bacino idrografico- utilizzando fonte dei dati di natura sito-specifica.

Tra i processi dell'azoto, l'unico in grado di controllare e ridurre l'azoto alloctono introdotto dalle attività antropiche nell'ecosistema fluviale è il processo di denitrificazione: esso rimuove in modo definitivo il nitrato dal comparto acquatico convertendolo nella forma gassosa ( $N_2$ ), riducendo perciò il carico di azoto destinato alle zone di transizione costiere e controllando il processo di eutrofizzazione. L'importanza di questo processo è tale che, a

partire dagli anni '90 ed ancora oggi, la ricerca scientifica apporta continue implementazioni sia sullo stato di conoscenza del processo e dei fattori che lo regolano nei diversi ecosistemi, sia nelle metodologie adottate per la sua quantificazione (Seitzinger, 1988; Davidson & Seitzinger, 2006; Groffman et al., 2006; Seitzinger et al. 2006; Smith L.K. et al., 2006, Kulkarni et al., 2008). Le problematiche sulla comprensione del processo di denitrificazione sono molteplici: elevato background di  $N_2$  in atmosfera ed in acqua e quindi difficoltà analitica nel rilevare piccoli incrementi di  $N_2$ ; eterogeneità spaziale e temporale della produzione di  $N_2$  in diversi ambienti e quindi difficoltà nel capire quali fattori possano regolare il processo a scala ecosistemica; mancanza di comunicazione tra le discipline scientifiche che si occupano di tassi di produzione di  $N_2$  e quindi mancanza di condivisione delle conoscenze sulla denitrificazione che potrebbero apportare innovazioni metodologiche e tecnologiche. Tali problematiche e la necessità di diffondere nuove metodiche ( per esempio  $N_2:Ar$ ) nei vari gruppi di ricerca in modo da poter effettuare in futuro confronti tra studi diversi ma realizzati con la stessa metodica, ha scaturito nel 2005 una network “Denitrification Research Coordination Network” a livello internazionale. Essa prevede di raggruppare e fare interagire tutti gli scienziati che trattano il processo di denitrificazione nei diversi campi scientifici (biologia molecolare, scienze ecologiche, scienze della terra, oceanografia, etc.), con lo scopo di proseguire le indagini nei diversi ecosistemi terrestri e acquatici riguardanti la quantificazione dei tassi di denitrificazione, lo sviluppo di relazioni quantitative basate sui processi tra i tassi di denitrificazione e i fattori che la controllano, la produzione di modelli - basati sui processi- che possano essere usati per aumentare misure sito specifiche a scala ecosistemica, regionale e globale. La condivisione delle conoscenze permetterà non solo di implementare le tecniche di misura, ma anche l’elaborazione di modelli, la coordinazione di attività e programmi di ricerca in ecosistemi e regioni geografiche sottocampionati, ed infine la sintesi delle conoscenze del processo a scala ecosistemica, regionale e globale ([www.denitrification.org](http://www.denitrification.org)).

## **1.1 Analisi degli studi e dei modelli esistenti sulla stima del carico azotato generato a livello di bacino imbrifero.**

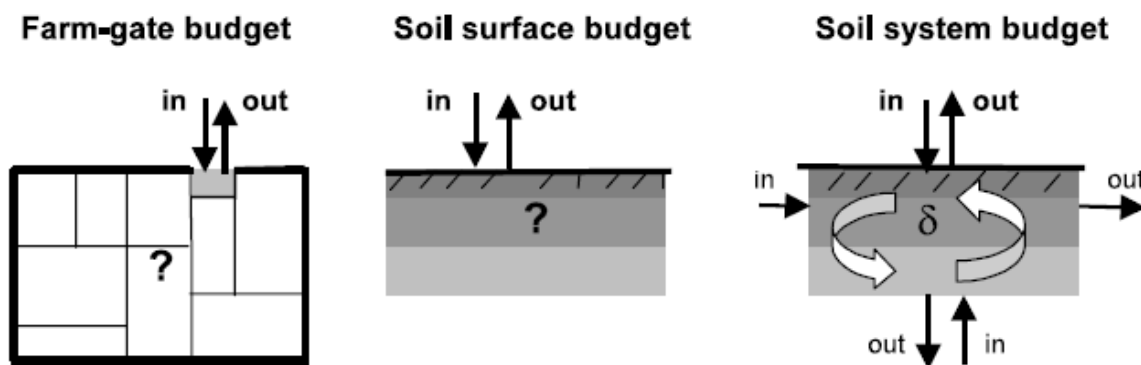
Vari modelli sono stati sviluppati per studiare il problema del destino dei nutrienti, soprattutto azoto e fosforo, nei bacini idrografici. Essi differiscono nella descrizione del processo, nella scala di indagine e nei requisiti dei dati di input:

1. gli approcci statistici consistono principalmente nella regressione tra carichi di nutrienti e sorgenti e tra carichi di nutrienti e caratteristiche del bacino, come l'uso del suolo o i parametri idrologici. Sono stati usati a piccola (Rekolainen, 1989; Tufford et al., 1998; Bouraoui et al., 1999), media (Jones et al., 2001) e grande scala (Howarth et al., 1996; Smith et al., 1997; Behrendt & Opitz, 2000; Viney et al., 2000; De Wit, 2001; Van Breemen et al., 2002; Seitzinger et al., 2002b; Alexander et al., 2002; Van Drecht et al., 2003);
2. altri approcci si basano sull'utilizzo di coefficienti di export o tassi di perdita dell'azoto da ogni sorgente identificata all'interno della rete idrografica del bacino (Johnes, 1996; Grimvall & Stalnacke, 1996; Hetling et al., 1999);
3. i bilanci di massa consistono nella sommatoria algebrica degli input e degli output di nutrienti rispetto ad un determinato sistema per un definito periodo di tempo (Oenema et al., 2003);
4. i modelli teorici basati su parametri fisici descrivono tutti i processi coinvolti nella trasformazione e nel trasporto dell'azoto alla chiusura del bacino (Arnold et al., 1998; Whitehead et al., 1998; Arheimer & Brandt, 1998; Billen & Garnier, 1999; Krysanova & Haberlandt, 2002); necessitano però di una notevole mole di dati e presentano numerosi requisiti di implementazione che incrementano con la risoluzione spaziale.

I sistemi di informazione geografica (GIS) sono spesso usati per trasferire l'informazione da una piccola ad una grande scala, basandosi sul bilancio di massa, sui coefficienti di export o su semplici regressioni (Beusen et al., 1995; Adamus & Bergman, 1995; Skop & Srensen, 1998; Refsgaard et al., 1999; Pieterse et al., 2003).

Tra questi diversi approcci il bilancio di massa è risultato il più adatto nel contesto del presente lavoro, perché permette di effettuare considerazioni sui processi di rimozione e di trasformazione dell'azoto a livello di bacino. Numerosi sono gli aspetti positivi derivanti dall'utilizzo dei "nutrient budget": risultando dalla sommatoria di grandi quantità di dati sintetizzati in diagrammi di input-output trasparenti e facili da capire, sono una metodica flessibile e di immediato utilizzo, trasferibile anche ad enti di gestione del territorio; i dati possono essere recuperati piuttosto agevolmente e, nel caso di dati mancanti, si possono effettuare approssimazioni che poi possono essere facilmente ridefinite quando diventano disponibili informazioni aggiuntive. Watson & Atkinson (1999) ed Oenema & Heinen (1999) hanno distinto tre approcci di base negli studi dei "nutrient budget" (fig. 1.1), sebbene esistano delle varianti all'interno di ciascuno di essi:

1. “farm-gate budget”, approccio black-box, che prende in considerazione le quantità di nutrienti che entrano e che escono dall’azienda in tutti i tipi di prodotti. Il surplus/deficit, ovvero la differenza tra input ed output, è una misura delle perdite di quel nutriente corrette per i possibili cambiamenti nello stoccaggio all’interno del sistema agro-aziendale.
2. “soil surface budget” considera tutti i nutrienti che entrano nel suolo attraverso la superficie e che lasciano il suolo attraverso l’assimilazione delle colture. Nel caso dell’azoto, gli input, quali fertilizzanti chimici ed effluenti zootecnici, sono corretti per le perdite da volatilizzazione dell’ammoniaca: in questo caso il surplus/deficit indica la perdita totale del nutriente dal suolo corretto per i possibili cambiamenti nello stoccaggio nel suolo.
3. “soil system budget” considera tutti gli input e gli output dei nutrienti, gli incrementi e le perdite all’interno del suolo e da esso. L’approccio permette anche la suddivisione tra i diversi pathway di perdita e l’accumulo e/o il consumo all’interno del sistema. Il surplus/deficit diviene la misura dell’impoverimento ( $output > input$ ) o dell’arricchimento netto ( $output < input$ ) del sistema, o semplicemente della frazione dei nutrienti definita “mancante”.



**Figura 1.1** Differenze concettuali nel confine del sistema considerato e nei flussi dei nutrienti dei tre nutrient budget: farm-gate budget, soil surface budget and soil systems budget (Oenema et al., 2003).

Tra questi tre tipi di approccio, il “soil system budget” è il più utilizzato in studi di ricerca mirati ad identificare il destino del surplus dei nutrienti: esso infatti tiene conto degli input e degli output dei nutrienti, del riciclo dei nutrienti all’interno del sistema suolo, dei pathway di rimozione e trasformazione dei nutrienti e dei cambiamenti dei pool dei nutrienti

nel suolo. Questo approccio permette quindi di ottenere un bilancio il più dettagliato possibile, utile anche nelle politiche di gestione e nella promozione di azioni mirate al controllo e all'abbattimento dei carichi di nutrienti. Il "soil surface budget" permette invece di avere una semplice stima del carico netto dei nutrienti nel suolo; il "farm-gate budget" infine potrebbe essere utilizzato come indicatore di performance ambientale, in quanto letto come una buona stima della pressione ambientale dell'attività agrozootecnica.

In questo lavoro di tesi è stato scelto di utilizzare un "nutrient budget" a livello di agroecosistema in quanto il bacino del fiume Oglio sublacuale ricade all'interno della Pianura Padana, la zona più produttiva d'Italia dal punto di vista delle attività agrozootecniche. È sembrato quindi importante partire da un bilancio di massa che considerasse il comparto ambientale maggiormente compromesso dagli input antropici di azoto, ovvero la superficie del suolo del bacino. Tra i tre tipi di approcci è stato scelto il "soil system budget" perchè la quantificazione degli input e degli output di azoto attraverso la superficie del suolo agrario (Oenema et al., 2003) permette l'individuazione del surplus azotato (differenza tra la sommatoria degli input e quella degli output), generando quindi un indicatore del potenziale rischio di inquinamento da composti azotati degli ecosistemi acquatici confinanti, ovvero una misura dell'efficienza di utilizzo dell'azoto nel sistema (Schröder et al., 2004). L'analisi dei possibili destini del surplus azotato a livello del suolo agricolo ha di fatto preso in considerazione l'interazione tra comparto suolo e comparto acquatico, introducendo come elemento essenziale per la comprensione dei diversi processi di trasformazione e di rimozione dell'azoto a livello di bacino fluviale il carico azotato trasportato dal fiume Oglio al fiume Po (export).

Anche se la metodologia del bilancio di massa dell'azoto è stata ampiamente utilizzata, solo pochi ricercatori hanno stimato gli errori associati ad ogni termine del bilancio (McKee & Eyre, 2000; Isidoro et al., 2006). Nella maggior parte degli studi la frazione di azoto "mancante" per la chiusura dei bilanci include tutti i termini difficili da stimare in modo accurato (i.e. cambiamenti nel pool del suolo, ritenzione negli ecosistemi acquatici) e gli errori di tutti i termini di input ed output (van Breemen et al., 2002). L'aspetto innovativo di questo lavoro di tesi è stata l'introduzione degli errori associati ad ogni termine del bilancio, calcolati attraverso la propagazione delle incertezze dei parametri usati per la stima di ogni specifico termine. Sono state omesse le incertezze associate ai dati derivanti da censimenti perché l'errore durante l'acquisizione dei dati è in genere molto piccolo (Kroeze et al., 2003).

## 1.2 Il processo di denitrificazione in zone umide perifluviali come hotspot di rimozione del nitrato dalle acque a livello di bacino fluviale

Le trasformazioni dell'azoto risultano da diversi processi biogeochimici quali assimilazione biologica, sedimentazione abiotica, nitrificazione, ammonificazione, riduzione del nitrato ad ammonio – DNRA-, denitrificazione e ossidazione anaerobica dell'ammonio – anammox- (Brandes et al., 2007; Burgin & Hamilton, 2007; Jetten, 2008). Tra questi, la denitrificazione e l'anammox sono i soli processi che rimuovono l'azoto inorganico dal suolo e dalle acque e lo trasferiscono in atmosfera (Seitzinger et al. 2006; Schubert et al. 2006). Studi che riportano misure simultanee di questi due processi in ambienti eutrofici di acqua dolce sono molto pochi, ma indicano che il contributo della denitrificazione ai flussi totali di  $N_2$  è in genere maggiore del 90% (Trimmer et al., 2003; Schubert et al., 2006; Koop-Jakobsen & Giblin, 2009).

La denitrificazione è una reazione di ossidazione della sostanza organica mediata da batteri in cui il nitrato è l'accettore finale di elettroni: è un processo eterotrofo di respirazione anaerobica condotto da batteri facoltativi. Questi ultimi sono ubiquitari, sono in grado di vivere in qualsiasi sistema ambientale caratterizzato dalle condizioni ambientali che permettono il processo: disponibilità di nitrato e di sostanza organica, basse concentrazioni di ossigeno ( $< 0.2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ ). Il controsenso è che ciò che limita la denitrificazione è proprio il processo che produce nitrato, la nitrificazione, perchè richiede la presenza di ossigeno. La coesistenza di entrambi i processi sussiste quando avvengono in zone distinte adiacenti o in fasi temporali differenti (fasi periodiche di anossia) (Seitzinger et al., 2006).

Numerosi studi a livello internazionale hanno evidenziato come la riduzione dissimilativa del nitrato  $N_2$  sia il principale sink dell'azoto di molti ecosistemi acquatici (Smith et al., 1985; Billen et al., 1985; Christensen et al., 1987; Seitzinger, 1988; Degobbis & Gilmartin, 1990; Seitzinger et al., 2006): i tassi stimati variano tra 1 e 171  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  per i sedimenti dei laghi, tra 0 e 345  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  per i sedimenti dei fiumi e tra 50 e 250  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  per i sedimenti marini costieri. Il processo è particolarmente efficace in ambienti di acqua dolce, dove rimuove percentuali di azoto mineralizzato comprese tra il 76 ed il 100%; negli ambienti marini costieri queste percentuali sono state stimate in un intervallo tra il 15 ed il 70% (Seitzinger, 1988).

Altri autori hanno focalizzato la loro attenzione sui fattori che regolano il processo: approvvigionamento di sostanza organica, nitrato nella colonna d'acqua, processo di

nitrificazione, produzione di microalghe bentiche, presenza di macrofite, presenza di fauna bentica (bioturbazione) e proprietà del sedimento (Christensen et al., 1990; Rysgaard et al., 1994; Risgaard-Peterson et al., 1994; Svensson et al., 1996; Rivera-Monroy et al., 1996; Nijburg et al., 1997; Sevnsson, 1997; Gilbert et al., 1998; Risgaard-Peterson, 2003; Bartoli et al., 2003).

Tra gli ecosistemi di acqua dolce e marini, le zone umide presentano una maggiore efficienza di rimozione del nitrato in quanto caratterizzate da accumulo di sostanza organica ed anossia dei sedimenti e delle acque e di fatto sono state riconosciute essere hot spot per tale processo (Seitzinger, 1988; Bachand & Horne, 2000; Saunders & Kalff, 2001; Johnston et al., 2001; McClain et al., 2003; Day et al., 2004). Non tutte le zone umide funzionano nello stesso modo (Brinson et al., 1993a; Brinson et al., 1993b; Brinson et al., 1998; Mitsch & Gosselink, 2000; Lin, 2006), è necessario quindi capire come le diverse classi di zone umide contribuiscono alla trasformazioni e rimozione dell'azoto.

Le condizioni idrogeomorfologiche delle zone umide influenzano le caratteristiche chimico-fisiche delle acque e dei sedimenti che a loro volta regolano il processo di denitrificazione e di rimozione dell'azoto. Idrologia, clima e geomorfologia del bacino sono le componenti principali che generano lo stabilirsi e il mantenersi dell'idrogeomorfologia di una zona umida (Brinson et al., 1993a; Brinson et al., 1993b; Mitsch & Gosselink, 2000). I suoli saturi che producono condizioni riducenti e anossiche, la materia organica autoctona e la disponibilità di nitrato sono fattori essenziali per il processo di denitrificazione, ma non sono sufficienti a stabilire una efficienza di rimozione significativa. La morfologia e la posizione topografica nel paesaggio insieme alla distribuzione delle sorgenti di acqua (acque di falda, flusso superficiale o precipitazione), il tempo di turnover e l'idrodinamismo influenzano il grado con il quale i composti chimici sono trasportati alle o dalle zone umide (Brinson et al., 1993a; Brinson et al., 1993b; Brinson et al., 1998).

Sebbene le zone umide d'acqua dolce siano riconosciute come siti importanti per il controllo e l'abbattimento dei carichi di azoto, manca ancora ad oggi un quadro di sintesi dei tassi di denitrificazione e adeguate conoscenze dei fattori che regolano questo processo.

Uno dei maggiori determinanti ambientali è la temperatura: sia le zone umide naturali sia quelle artificiali mostrano un incremento dei tassi di denitrificazione con l'aumentare della temperatura (Bachand & Horne, 2000; Sirivedhin & Gray, 2006; Hernandez & Mitsch, 2007). Questo è dovuto all'influenza diretta sui tassi metabolici ma anche alla stimolazione indiretta di altre reazioni biogeochimiche come l'ammonificazione, la nitrificazione e la respirazione bentica. Simultaneamente l'incremento della temperatura stimola la produzione macrofittica e

microfitobentonica e quindi la domanda di azoto da parte dei produttori primari, favorendo un rapporto di competizione con i batteri nitrificanti e denitrificanti per il medesimo substrato (Sundbäck et al., 2000; Bartoli et al., 2003; Risgaard-Petersen, 2004). Passando ad un'ulteriore complessità di risposta, la bassa solubilità dell'ossigeno e gli elevati tassi di respirazione aerobica ad alti valori di temperatura determinano un deficit di ossigeno e promuovono processi anaerobici di mineralizzazione, così come la riduzione del solfato, che potrebbe inibire l'attività dei batteri denitrificanti e favorire la riduzione del nitrato ad ammonio (Brunet & Garcia-Gil, 1996; Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas, 2006). In generale, la contemporaneità dei processi rende difficile separare il solo effetto del fattore temperatura sul processo di denitrificazione.

Altri fattori ambientali che potenzialmente controllano la denitrificazione sono il pH, la disponibilità di sostanza organica ed i nutrienti. Il pH dell'acqua è preso in considerazione in pochi studi perché in molte zone umide non è considerato dannoso al metabolismo denitrificante (Kadlec & Knight, 1996). In generale, i processi di rimozione del nitrato nelle zone umide non sono semplicemente limitati dalla disponibilità di sostanza organica, ma anche dalla sua qualità macromolecolare (Bastviken et al., 2005; Sirivedhin & Gray, 2006). È stato dimostrato che l'efficienza di rimozione del nitrato è inversamente correlata con il rapporto tra il carbonio del sedimento e la concentrazione di nitrato nella colonna d'acqua (Ingersoll & Baker, 1998). La disponibilità di nitrato è uno dei fattori di controllo della denitrificazione più importanti, essendoci una correlazione positiva tra le concentrazioni di nitrato e i tassi di denitrificazione (Reinhardt et al., 2006; Sirivedhin & Gray, 2006). Il nitrato è fornito al sedimento attraverso il processo di nitrificazione o attraverso il processo diffusivo dalla colonna d'acqua. Nei sedimenti anaerobici di una zona umida, il processo accoppiato nitrificazione-denitrificazione è generalmente limitato, così che la respirazione anaerobica potrebbe essere supportata da input esterni di nitrato (es. dilavamento dai terreni agricoli o effluenti degli scarichi precedentemente nitrificati, Verhoeven et al., 2006). Anche l'approvvigionamento di nitrato dalle acque di falda è una sorgente importante in aree con acquiferi contaminati (Seitzinger et al., 2006). Infine, i fattori ambientali spesso interagiscono dinamicamente rendendo difficile l'identificazione di un fattore come quello prevalente, se ciò di fatto accade.

Un ulteriore ostacolo nella comprensione di ciò che controlla la rimozione del nitrato e la denitrificazione è quello metodologico. La rimozione del nitrato è stata esaminata da Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas (2006) e da Seitzinger et al. (2006). Il maggiore problema in queste review è che i tassi riportati sono ottenuti con differenti metodiche, quali blocco

dell'acetilene, flusso di  $N_2$ ,  $N_2:Ar$ , bilanci di massa o metodi isotopici (Groffman et al., 2006). L'utilizzo di approcci differenti nelle stesse condizioni di indagine e nello stesso sito hanno rivelato grandi discrepanze nei tassi misurati messi a confronto (Lohse et al., 1996; Van Luijn et al., 1996; Groffman et al., 2006).

### ***1.2.1 Problema metodologico nella misura dei tassi di denitrificazione***

Il problema predominante della stima del processo di denitrificazione consiste nella misura diretta del prodotto  $N_2$ , visto l'alto background di concentrazione presente in atmosfera e in acqua (77% e oltre 600  $\mu M$  rispettivamente). Durante gli anni diverse metodiche sono state sviluppate per la quantificazione dei tassi di denitrificazione, con il risultato di avere, per uno stesso ecosistema, tassi non sempre confrontabili e in alcuni casi potenziali. La metodica gascromatografica basata sul blocco dell'acetilene, ampiamente utilizzata in passato, è stata sostituita da metodiche isotopiche, decisamente più accurate e replicabili. Seitzinger et al. (1993) hanno evidenziato come la tecnica basata sul blocco dell'acetilene sottostimi grandemente i tassi di denitrificazione rispetto alla metodica dei flussi di  $N_2$  e a quella dell'aggiunta di azoto marcato, perché non solo inibisce il processo di nitrificazione, e quindi non stima la componente di denitrificazione derivata dall'ossidazione dell'azoto ammoniacale, ma non blocca nemmeno completamente la riduzione di  $N_2O$  a  $N_2$ , stimando solo la metà della denitrificazione dovuta alla diffusione del nitrato dalla colonna d'acqua. Studi successivi hanno mostrato come anche la tecnica dell'aggiunta di nitrato e azoto ammoniacale marcato non stimi i tassi derivati dall'accoppiamento nitrificazione-denitrificazione e come la misura diretta dei flussi di  $N_2$  prodotti richieda strumentazioni molto sensibili e tempi di pre-incubazioni di settimane a causa della piccola produzione di  $N_2$  rispetto al background (Steingruber et al., 2001; Groffman et al., 2006). Negli anni '90 la metodica maggiormente utilizzata per la capacità di determinare il tasso totale di denitrificazione ( $D_{tot}$ ), ripartito nella componente del nitrato che diffonde dalla colonna d'acqua ( $D_w$ ) e in quella del nitrato che deriva dal processo di nitrificazione all'interno del sedimento ( $D_n$ ) (accoppiamento dei processi di nitrificazione-denitrificazione), è stata l'isotope pairing technique (IPT) (Nielsen, 1992; Steingruber et al., 2001). Essa si basa su quattro assunzioni: 1) l'aggiunta di  $^{15}NO_3^-$  non interferisce con il processo di denitrificazione del  $^{14}NO_3^-$  *in situ* ( $D_n$ ); 2) il tasso di denitrificazione del nitrato derivante dalla colonna d'acqua ( $D_w$ ) dovrebbe incrementare in modo lineare con la concentrazione di nitrato; 3) il mescolamento tra il  $^{14}NO_3^-$  *in situ* e il  $^{15}NO_3^-$  nella colonna d'acqua e nel sedimento è uniforme/omogeneo; 4) si dovrebbe creare un gradiente di concentrazione stabile di  $NO_3^-$

all'interfaccia acqua sedimento in breve tempo dopo l'aggiunta di  $^{15}\text{NO}_3^-$ . Questa metodica è stata applicata in differenti disegni sperimentali ed il confronto con quelle precedenti ha prodotto in alcuni casi risultati contrastanti: ad esempio, se confrontata con la tecnica sul blocco dell'acetilene, la stima dei tassi con l'IPT è risultata da 2 a 8 volte maggiore (Lohse et al., 1996; Svensson, 1997); se confrontata con la tecnica del flusso di  $\text{N}_2$  si sono ottenuti risultati differenti. Risgaard-Petersen et al. (1998a) ha osservato una buona corrispondenza mentre van Luijn et al. (1996) hanno misurato tassi molto più bassi con l'IPT. Anche il confronto con la metodica del calcolo del bilancio di massa dell'azoto ha condotto a risultati differenti: Nielsen (1995) ha trovato un buon accordo tra le due tecniche applicandole ad un estuario; van Luijn et al. (1996) invece hanno evidenziato una netta sottostima nei sedimenti di un lago con l'IPT, spiegata dalla presenza dell'accoppiamento nitrificazione-denitrificazione nei micrositi all'interno dello strato ossico; infine Steingruber (2001) ha misurato tassi più elevati in una zona umida con la tecnica dell'isotope pairing technique. Come per le precedenti metodiche, anche la tecnica IPT può avere dei limiti nella stima dei tassi di denitrificazione dovuti essenzialmente al non rispetto di una delle assunzioni richieste dalla metodica. Spesso è l'assunzione quattro a non essere verificata, ovvero si ha un mixing non omogeneo tra il nitrato marcato e quello *in situ* a causa dell'eterogeneità della struttura dei sedimenti. Tale eterogeneità è dovuta essenzialmente alla presenza di micro-nicchie anaerobiche attraverso zone di nitrificazione aerobiche o alla presenza di tane e canali della fauna bentica (bioturbazione), che creano differenze tra i tassi di diffusione del nitrato marcato rispetto ai tassi di approvvigionamento dello stesso derivante dalla nitrificazione in quelle depressioni (van Luijn et al., 1996; Ferguson et al., 2007). La metodica IPT risulta quindi sottostimare i tassi di denitrificazione in ambienti con basse concentrazioni di nitrato *in situ*, con sedimenti oligotrofici (povero di sostanza organica) e bioturbati. Le tane e i canali della fauna bentica rappresentano dei siti di denitrificazione potenziale che incrementano notevolmente la componente  $D_n$  rispetto alla  $D_w$  e creano una zonazione redox tridimensionale all'interno dello strato ossico. Al contrario la metodica IPT si è ormai consolidata a livello internazionale (ultimi anni '90 e primi anni del 2000) come una delle tecniche più efficaci nella stima dei tassi di denitrificazione in ambienti caratterizzati da elevate concentrazioni di nitrato con sedimenti di tipo limoso organico, privi di bioturbazione. In questo caso avviene un mixing omogeneo tra il nitrato marcato e quello non marcato all'interno della colonna d'acqua e del sedimento, il processo di denitrificazione avviene nei due strati -uno ossico e l'altro atossico- del sedimento (zonazione bidimensionale), con un prevalere della componente  $D_w$  rispetto alla  $D_n$ . Per il momento la tecnica dell'IPT risulta

essere una tra le più potenti nella quantificazione dei tassi di denitrificazione in ambienti acquatici se applicata attentamente. In particolare il disegno sperimentale batch-mode assay, o incubazione di carote intatte di sedimento in acqua del sito, rispettando le condizioni di temperatura naturale, in ambienti acquatici marini e d'acqua dolce lentiche come estuari, laghi e zone umide risulta essere molto efficiente per l'affidabilità del metodo, la velocità nell'applicazione (tempi di pre-incubazione e incubazione brevi) e la facilità nello stimare i tassi di denitrificazione nelle due componenti  $D_w$  e  $D_n$ .

Per quanto riguarda gli ecosistemi fluviali, diversi studi hanno dimostrato la potenzialità del processo di denitrificazione (Seitzinger, 1988; Holmes et al., 1996; Martin et al., 2001; Steinhart et al., 2001) con tassi da 0 a  $345 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Anche in questo caso sono state utilizzate diverse metodiche, tutte con il limite di essere stime di bilanci di massa o di alterare le condizioni *in situ* che risultano essere determinanti negli ecosistemi lotici, perché i gradienti fisici e chimici nei sedimenti fluviali variano in funzione della velocità di corrente (Huettel & Gust, 1992). Solo recentemente Laursen e Seitzinger (2002) hanno mostrato l'efficienza della nuova metodica che misura direttamente la concentrazione del gas disciolto  $\text{N}_2$  (il prodotto della reazione): essa si basa sulla stima del rapporto  $\text{N}_2:\text{Ar}$  disciolto in acqua con uno spettrometro di massa ad iniezione a membrana (MIMS) per ottenere la quantità di  $\text{N}_2$  prodotto, che viene poi corretto considerando gli scambi con l'atmosfera. L'approccio utilizzato è quindi basato sulla variazione della concentrazione dell' $\text{N}_2$  disciolto seguendo una parcella di acqua di una data sezione che si muove verso valle (serie di stazioni di campionamento lungo un tratto fluviale). I risultati sono di un ordine di grandezza più alto rispetto alle precedenti stime, con tassi che variano da 0.3 a  $15 \text{ mmol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

### **1.3 Influenza della rizosfera sul chimismo delle acque interstiziali: implicazioni per la rigenerazione delle forme inorganiche dell'azoto e per i processi di nitrificazione e denitrificazione accoppiata nei sedimenti subsuperficiali.**

Come conseguenza di effetti diretti e indiretti, le radici della vegetazione macrofita cambiano i microambienti all'interno dei sedimenti superficiali e profondi che colonizzano (Reddy et al., 1989; Risgaard-Petersen & Jensen, 1997; Vartapetian & Jakson, 1997; Van Der Nat & Middelburg, 1998; Ottosen et al., 1999; Armstrong et al., 2000; Caraco et al., 2006; Soda et al., 2007).

L'assimilazione radicale dei nutrienti può essere un pathway primario per l'azoto e il fosforo inorganici, poiché la concentrazione del nutriente disponibile è generalmente molto più alta nelle acque interstiziali che nella colonna d'acqua (Carignan, 1982; Chambers et al., 1989; Barko et al., 1991; Carr & Chambers, 1998). I sedimenti vegetati esibiscono concentrazioni di nutrienti inorganici -soprattutto ammonio- più basse nelle acque interstiziali durante il periodo di crescita della vegetazione macrofita e questo influenza i gradienti di concentrazione che attenuano i tassi di efflusso dei nutrienti e la loro disponibilità in colonna d'acqua per altri produttori primari (Wigand et al., 2000); al contrario nei sedimenti e nei suoli saturi di acqua non vegetati si accumula ammonio (Ponnamperuma, 1972). Nei siti oligotrofici l'assimilazione dell'azoto compete con altri processi quali la nitrificazione e la denitrificazione, che sono di solito inibiti dall'attività delle piante. Nei siti eutrofici i nutrienti non limitano i processi assimilativi e dissimilativi ma altri switch di regolazione possono essere coinvolti (Burgin & Hamilton, 2007).

Le angiosperme radicate sono in grado di trasportare quantità variabili di O<sub>2</sub> dalle foglie alle radici attraverso i sistemi parenchimatici, determinando un rilascio di ossigeno (ROL= radial oxygen loss) attraverso l'epidermide delle radici, dalle quali l'O<sub>2</sub> può quindi diffondersi al sedimento (Sand-Jensen et al., 1982; Christensen et al., 1994). Questo è un modo per detossificare le acque interstiziali e creare micronicchie ossiche necessarie per la respirazione e per la sopravvivenza delle radici delle piante. Il ROL produce anche una serie di effetti a cascata sui diversi processi biogeochimici redox dipendenti come la nitrificazione e la denitrificazione, ma anche l'ossidazione del ferro e del manganese e la metanotrofia (Carpenter et al., 1983; Jaynes & Carpenter, 1986; Caffrey & Kemp, 1992; Flessa, 1994; Christensen & Andersen, 1996; Christensen et al., 1997; Risgaard-Petersen & Jensen, 1997; Wigand et al., 1997; Heilman & Carlton, 2001).

Secondo Caffrey e Kemp (1990), i sedimenti vegetati degli ambienti di estuario hanno mostrato un aumento dei tassi di nitrificazione e di denitrificazione rispetto ai sedimenti non vegetati. Christensen e Sorensen (1986) hanno concluso che i tassi di denitrificazione più alti nei sedimenti vegetati erano dovuti al trasporto di O<sub>2</sub> nella zona radicale che stimola il processo di nitrificazione.

Grandi quantità di materia organica prodotta dalle macrofite acquatiche o la materia organica disciolta rilasciata dalle radici durante la fotosintesi può stimolare processi anaerobici all'interno dei sedimenti come la riduzione del solfato (se il solfato è disponibile) o, più comune in ambienti di acqua dolce, la metanogenesi, determinando la saturazione del metano nelle acque interstiziali (Capone & Kiene, 1988; Schütz et al., 1991; Chanton &

Whiting, 1995). Simultaneamente, durante la fase di crescita attiva, le macrofite emergenti possono ridurre la metanogenesi o aumentare la metanotrofia innalzando il potenziale redox grazie al rilascio di ossigeno dalle radici (Schipper & Reddy, 1996). Alternativamente la produzione di metano può essere inibita, poiché altri pool degli accettori di elettroni più energetici sono mantenuti o rigenerati dal rilascio di ossigeno (es. nitrato, Mn(IV) or Fe(III), Van Der nat & Middelburg, 1998). I sedimenti sono più ossidati e più acidi quando la vegetazione è presente (Howes et al., 1981; Luther & Church, 1988; Cacador et al., 1996; Madureira et al., 1997; Koretsky et al., 2008). Le macrofite possono comunque anche promuovere condizioni più riducenti nei sedimenti aumentando la disponibilità della sostanza organica ridotta. Le foglie delle macrofite trattengono delle particelle organiche labili e ne aumentano la sedimentazione (Sand-Jensen, 1998). Le radici vive possono rilasciare composti organici labili (essudati), mentre le radici in decomposizione, gli steli e le foglie sono una sorgente sia di composti organici labili che refrattari (Hines et al., 1989; Hines et al., 1999; Karjalainen et al., 2001; Lomstein et al., 2006).

È ormai noto che il processo fotosintetico di queste piante dipende in primo luogo dalla CO<sub>2</sub> derivata dal sedimento, perché le concentrazioni di CO<sub>2</sub> nel sedimento sono di solito diverse volte più alte che le concentrazioni in colonna d'acqua (Wium-Andersen & Andersen, 1972). Tutti gli organismi ed i processi che consumano ossigeno competeranno per l'ossigeno disponibile nei sedimenti, laddove invece la disponibilità di ammoniaca sarà determinata soprattutto dall'assimilazione delle piante e dal consumo batterico (Bodelier et al., 1998). Un altro importante fattore nei sedimenti delle zone umide è la competizione per i substrati organici tra batteri metanogeni e degli altri processi di respirazione anaerobica (Kiene, 1991).

Differenze nel numero di batteri, nella composizione della comunità batterica e nelle trasformazioni sono state osservate in comunità microbiche di zone umide salmastre associate alla vegetazione (Ravit et al., 2003; Ravit et al., 2005; Burke et al., 2002; Nielsen et al., 2001; Bagwell et al., 2001; Daane et al., 2001; Hines et al., 1999). Weiss et al. (2004) trovarono maggiori densità di batteri Fe(III)-riducenti (FeRB) nella rizosfera che nei suoli senza vegetazione, deducendo da questo che c'è una variabilità sostanziale ad una piccola risoluzione spaziale nella mineralogia del Fe(III), nella disponibilità di carbonio e nella composizione della comunità microbica che può essere attribuita alle radici della pianta.

I processi della rizosfera sono quindi controllati dal metabolismo delle macrofite, che però a sua volta è sensibile alle condizioni ambientali in cui vive. Il grado di eutrofizzazione è infatti un fattore chiave nel controllare i processi mediati dalle macrofite. In condizioni di alti

contenuti di sostanza organica del sedimento, i tassi di mineralizzazione possono saturare la capacità di assimilazione della pianta determinando un accumulo di nutrienti nelle acque interstiziali (Sand-Jensen et al., 2005). Quando le concentrazioni dei nutrienti superano determinati valori soglia in colonna d'acqua, l'assimilazione dalle fronde viene favorita mantenendo di bassa entità l'assimilazione dalle acque interstiziali (Barko et al., 1991; Bedford et al., 1991). Inoltre l'elevato consumo chimico e batterico di ossigeno nei sedimenti altamente organici minimizza lo spessore degli strati ossici attorno alle radici e attenua gli effetti delle piante sulle condizioni redox del sedimento e sulla precipitazione dei metalli e del fosforo (Jaynes & Carpenter, 1986). Pochi sono gli articoli che hanno confrontato il processo di assimilazione delle piante e quello batterico di denitrificazione accoppiato alla nitrificazione in sedimenti vegetati (Risgaard-Petersen et al., 1998b), tra i pochi studi effettuati sugli effetti del rilascio di ossigeno sul processo accoppiato denitrificazione-nitrificazione (Reddy et al., 1989; Caffrey & Kemp, 1992; Risgaard-Petersen & Jensen, 1997; Shieh & Yang 1997; Arth et al., 1998; Risgaard-Petersen et al., 1998b; Ottosen et al., 1999; Nicolaisen et al., 2004), nessuno ha effettuato esperimenti in sedimenti vegetati caratterizzati da diverso contenuto di sostanza organica nel sedimento e differente disponibilità di nitrato in colonna d'acqua.

#### **1.4 Problem statement e obiettivi del lavoro di tesi**

Negli anni '90 la Comunità Europea ha finanziato decine di progetti mirati allo studio delle cause e degli effetti dell'eutrofizzazione costiera, delle dinamiche delle fioriture algali e della distrofia. Nell'alto Adriatico, così come in tutte le aree litoranee interessate da apporti dulcicoli, lo ione nitrato è stato riconosciuto come il macroinquinante più abbondante e la probabile causa del regime shift nelle comunità dei produttori primari. Questo ione viene dilavato e trasportato dal reticolo idrografico secondario e principale alla zona costiera; una apposita direttiva europea, la "Direttiva Nitrati (91/676/CEE)", è stata realizzata per limitare il rischio di contaminazione da nitrati delle falde e delle acque superficiali. Con grande ritardo l'Italia sta applicando questa direttiva, riconoscendo le aree vulnerabili e reindirizzando alcune pratiche agricole verso una maggiore sostenibilità.

La conoscenza delle sorgenti, dei processi di trasporto e delle trasformazioni dello ione nitrato assumono un'importanza fondamentale per la tutela degli ecosistemi acquatici, sia di acque interne che di acque costiere. Questo lavoro di tesi, in modo innovativo, analizza quale unità territoriale un intero bacino idrografico, il bacino del fiume Oglio sublacuale (per

un'estensione totale di circa 3700 km<sup>2</sup>). Gli obiettivi principali del lavoro sono tre e rispondono alle seguenti domande:

- 1) Qual è il bilancio dell'azoto nel bacino del fiume Oglio e in particolare quanto è l'export rispetto al carico generato?

Realizzare un bilancio di massa per l'azoto a livello di bacino, che includa la stima delle potenziali voci di input (origine zootecnica, chimica, civile, atmosferica e naturale – azotofissazione-) e output (uptake da parte delle colture, denitrificazione, export) e permetta di verificare il livello di vulnerabilità di questo bacino. Tale livello sarà espresso mediante il rapporto tra l'azoto potenzialmente generato e l'azoto esportato verso il Po (maggiore è il rapporto e minore è la vulnerabilità).

*L'ipotesi alla base di questo obiettivo è che il disaccoppiamento tra agricoltura e zootecnia e la banalizzazione del paesaggio rendano bacini come quello dell'Oglio, estremamente rappresentativi della realtà della Pianura Padana, grandi sorgenti di nitrato per le acque di falda e superficiali e per i corpi idrici confinanti (il fiume Po). (Pinay et al., 2002; Laursen & Seitzinger, 2005; Arango et al., 2008; Bowen et al., 2007; Galloway et al., 2008, Herrman et al., 2008).*

- 2) Quali sono i fattori che regolano il processo di denitrificazione in zone umide perfluviali? La connettività idraulica è un fattore importante?

Analizzare la regolazione del processo batterico di denitrificazione, l'unico in grado di rimuovere permanentemente l'azoto dai sistemi acquatici, in una serie di aree umide marginali presenti nel bacino dell'Oglio a diverso grado di connessione idraulica con il fiume.

*L'ipotesi alla base di questo obiettivo è che la pensilizzazione e la mancanza di interazioni laterali fiume-area umida perfluviale determini una minore rimozione dell'azoto e inneschi meccanismi di feedback che promuovono la rigenerazione dai sedimenti dell'ammonio e l'eccessiva proliferazione algale, accelerino cioè ulteriormente l'interramento e la scomparsa delle aree umide residue.*

(Seitzinger, 1988; Risgaard-Petersen, 2003; Pina-Ochoa & Cobelas, 2006; Seitzinger et al., 2006; McCutchan et al., 2008).

- 3) Quali sono gli effetti netti della presenza di macrofite radicate sommerse in un sistema fluviale sul ciclo dell'azoto ed in particolare sull'equilibrio tra uptake e nitrificazione-denitrificazione?

Stimare le capacità di trasporto di ossigeno verso la rizosfera e i sedimenti di una macrofita in passato abbondante in Pianura Padana e nel bacino dell'Oglio, *Vallisneria spiralis* L., e le implicazioni che queste capacità hanno sui processi accoppiati di nitrificazione e denitrificazione.

*L'ipotesi di questo obiettivo nasce da osservazioni di risultati pubblicati relativi ai quozienti fotosintetici di V. spiralis, decisamente inferiori all'unità, che indicano probabili grandi capacità di trasporto di ossigeno verso il basso. In ambienti non limitati da azoto questo si potrebbe tradurre in elevati tassi di denitrificazione profonda, ipotesi della ricerca. La dimostrazione di questo importante aspetto dell'ecofisiologia di Vallisneria avrebbe implicazioni sulla conservazione delle praterie di questa fanerogama. (Reddy et al., 1989; Caffrey & Kemp, 1992; Risgaard-Petersen & Jensen, 1997).*

## **1.5 Strumenti impiegati per affrontare gli obiettivi/problemi**

La metodologia applicata per raggiungere l'obiettivo 1 ha previsto l'applicazione del semplice modello matematico "soil system budget", proposto da Oenema et al. (2003), che si basa sulla sommatoria algebrica degli input e degli output di azoto a livello della superficie agricola del bacino. Diverse fonti bibliografiche inerenti al bacino idrografico di indagine hanno permesso la stima dei vari termini del bilancio e del surplus/deficit di azoto a livello della superficie agricola. Il surplus azotato è stato integrato con i risultati delle campagne di monitoraggio delle acque del fiume Oglio sublacuale nel periodo estivo ed invernale del 2007 e del 2008; in particolare le misure di portata e di concentrazione dell'azoto delle acque presso la foce del fiume Oglio sublacuale nel fiume Po hanno consentito di stimare il carico azotato uscente dal bacino del fiume Oglio (export) e di analizzare il surplus azotato al netto dello stesso. Sono state delineate quindi considerazioni sulla capacità metabolica del sistema fluviale e del bacino drenante, prendendo in considerazione i possibili destini dell'azoto a livello di bacino: percolazione nella falda superficiale, assimilazione da parte della vegetazione, rimozione via denitrificazione. Di particolare interesse è stata la stima del contributo relativo del processo di denitrificazione nei diversi comparti acquatici e all'interfaccia suolo-fiume del bacino stesso: reticolo idrografico secondario, zone umide perifluviali, zona iporreica e fasce riparie.

L'importanza del processo di denitrificazione nel bilancio dell'azoto a livello di bacino ed in particolare la presenza di zone umide perfluviali, riconosciute essere hot spot per tale processo, ha ridotto la scala di indagine dall'intero bacino (da circa 3700 km<sup>2</sup>) ad alcuni patch dello stesso (1000-100000 m<sup>2</sup>). Sono stati realizzati esperimenti di incubazioni al buio di carote intatte di sedimento, secondo metodiche standard per ambienti lentici (Nielsen, 1992; Dalsgaard et al., 2000), scegliendo due condizioni sperimentali: la stagione e il grado di connessione delle zone umide al corpo idrico. La stima del metabolismo bentico (scambi dei gas e dei nutrienti all'interfaccia acqua e sedimento) e dei tassi di denitrificazione nella stagione estiva ed invernale, in ambienti isolati e connessi al corso d'acqua, ha definito i fattori di regolazione del processo di denitrificazione in zone umide perfluviali a diverso grado di connessione e quali siano le condizioni ottimali dello stesso (obiettivo 2).

L'ultimo obiettivo-problema (3) è stato affrontato con due progetti sperimentali in due siti del fiume Mincio colonizzati dalla macrofita radicata *V. spiralis* e caratterizzati da diverse concentrazioni di azoto nitrico nelle acque (~10 µM il tratto settentrionale, ~70 µM il tratto meridionale). In questi esperimenti i pathways dell'azoto inorganico sono stati studiati con un approccio prettamente meccanicistico, riducendo nuovamente la scala di indagine (50 cm<sup>2</sup>). Il primo esperimento è durato 3 settimane ed è consistito nella misura delle concentrazioni dei nutrienti azotati, del fosforo reattivo solubile, della silice, dello ione ferroso, dei gas (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>), del potenziale redox nelle acque interstiziali di microcosmi impaccati da sedimento omogeneizzato e di microcosmi in cui sono stati trapiantati individui di *V. spiralis*. Ogni 2-3 giorni sono stati sacrificati sei microcosmi per sito (3 con pianta e 3 senza) in modo da capire come e con quale entità la colonizzazione da parte di una macrofita in due tratti fluviali caratterizzati da differente grado di trofia induca modificazioni chimiche dirette (uptake) e indirette (trasporto di O<sub>2</sub>) nelle acque interstiziali, con alterazione del potenziale redox e dei processi redox-dipendenti prevalenti.

L'ultimo esperimento è stato condotto sempre nei due siti del fiume Mincio e in tre periodi dell'anno (nel momento di massima crescita, di massima biomassa e di senescenza di *V. spiralis*) attraverso una serie di esperimenti di incubazione (al buio e alla luce). L'incubazione di carote intatte di sedimento nudo e di carote con *V. spiralis* previa infiltrazione di ammoniaca marcata nell'intera carota di sedimento ha permesso di quantificare il processo accoppiato nitrificazione-denitrificazione negli strati profondi della carota di sedimento e di delineare la presenza di competizione tra piante e batteri per la medesima risorsa in acque mesotrofiche ed eutrofiche.

## 1.6 Aspetti innovativi del lavoro

Diversi sono gli aspetti innovativi di questo lavoro di tesi, a partire dall'approccio metodologico utilizzato, dal sito d'indagine scelto come oggetto di studio, dal pathway del ciclo dell'azoto scelto come argomento specifico. Il lavoro di tesi si inserisce tra gli studi scientifici mirati ad indagare quali siano le sorgenti di azoto in un bacino idrografico e quali siano i processi di trasporto e di trasformazione di questo elemento dal territorio del bacino all'ambito fluviale e da questo alla foce, ovvero la capacità di metabolizzazione dei nutrienti da parte dell'ecosistema fluviale. La complessità del sistema fluviale, l'utilizzo di modelli articolati per la stima di un bilancio di massa e di coefficienti datati e non sito-specifici per la stima di alcuni termini del bilancio (es. azoto fissazione, deposizione atmosferica) genera una conoscenza molto approssimativa sulla reale funzionalità dell'ecosistema studiato, dovuta soprattutto alla difficoltà nella quantificazione dei pathway dell'azoto. Data tale premessa, il lavoro presentato contribuisce a colmare alcune lacune attraverso:

- la scelta del bacino del fiume Oglio sublacuale. Tutto il bacino del fiume Po, in cui si inserisce il bacino studiato, rappresenta un buon esempio dello sfruttamento agrozootecnico del territorio, che ha originato un aumento del carico azotato e la modificazione del territorio con lo sviluppo di un fitto reticolo idrografico secondario di canali di bonifica e di drenaggio. Numerosi sono gli studi sugli effetti dell'aumento dei nutrienti azotati nelle zone costiere dell'Alto Adriatico (eutrofizzazione costiera), assenti sono invece gli studi mirati ad individuare le principali sorgenti di azoto a livello di bacino idrografico del fiume Po e dei suoi affluenti e a capire le dinamiche dell'azoto e quantificarne i processi dal reticolo secondario artificiale e dal sistema fluviale al sistema costiero.
- il problem statement è stato affrontato inizialmente con un approccio olistico (la stima del bilancio di massa a livello di bacino e la comparazione con gli export di azoto dal fiume) e successivamente con un approccio meccanicistico, cercando di quantificare in ambienti perfluviali un processo del ciclo dell'azoto, la denitrificazione, e cercando di individuare i fattori di regolazione e le condizioni che lo favoriscono. Nettamente meccanicistica è stata infine l'ultima indagine mirata alla quantificazione del processo accoppiato nitrificazione e denitrificazione negli strati profondi del sedimento fluviale promossi dal trasporto di ossigeno di una macrofita radicata. Di conseguenza risulta innovativo come lo studio dal macro ( $\text{km}^2$ ) al micro ( $\text{cm}^2\text{-mm}^2$ ) abbia ripercussioni sul livello di conoscenza a livello olistico: le condizioni ideali e i fattori di regolazione di

un processo, nonché la quantificazione dello stesso, danno risposte sulle funzionalità del sistema fluviale e contribuiscono a colmare alcune lacune di conoscenza dei processi a livello di ecosistema fluviale e di bacino idrografico riscontrate con l'utilizzo di bilanci di massa.

- il bilancio di massa dell'azoto è stato calcolato a partire da fonti di dati a dettaglio comunale e quindi dall'aggregazione di bilanci di massa a piccola scala. Innovativo risulta il grado di dettaglio e l'errore associato ai termini del bilancio.
- la combinazione tra l'analisi di dati bibliografici e l'applicazione di un modello molto semplice ed i risultati di attività sperimentali.
- il processo di denitrificazione. Le problematiche sulla comprensione del processo di denitrificazione sono molteplici: elevato background di  $N_2$  in atmosfera e in acqua e quindi difficoltà analitica nel rilevare piccoli incrementi di  $N_2$ ; eterogeneità spaziale e temporale della produzione di  $N_2$  in diversi ambienti e quindi difficoltà nel capire quali fattori possano regolare il processo a scala ecosistemica; mancanza di comunicazione tra le discipline scientifiche che si occupano di tassi di produzione di  $N_2$  e quindi mancanza di condivisione delle conoscenze sulla denitrificazione che potrebbero apportare innovazioni metodologiche e tecnologiche.

## 1.7 Organizzazione del lavoro di tesi

Il lavoro di tesi è organizzato da un capitolo introduttivo dove vengono illustrati il “problem statement” e gli obiettivi della tesi, da un capitolo che inquadra l'area di studio e da uno in cui vengono descritti i materiali e metodi utilizzati durante i tre anni di studio. Questi ultimi due capitoli sono suddivisi in tre paragrafi indicanti i siti e le metodologie specifiche per raggiungere i tre obiettivi di ricerca. I risultati dei tre argomenti di ricerca sono invece trattati in capitoli distinti:

1. Il bilancio di massa dell'azoto a livello di bacino
2. Denitrificazione nelle zone umide perifluviali della pianura Padana
3. Trasporto di ossigeno nel sedimento e denitrificazione-nitrificazione nel tratto nord del fiume Mincio colonizzato da *Vallisneria spiralis* L.

Nell'ultimo capitolo della tesi sarà presentato un quadro di sintesi in cui, alla luce dei “confini” stabiliti dai bilanci di massa dell'azoto nei comparti terrestri ed acquatico, verrà discussa l'importanza relativa dei processi di trasporto e trasformazione di questo elemento.

Verranno formulati scenari relativi a future possibili gestioni del territorio mirate a minimizzare i trasferimenti dell'azoto nitrico nelle acque superficiali o a massimizzarne l'abbattimento. Saranno considerati simultaneamente interventi macro, a livello di intero bacino, come la riqualificazione del reticolo idrografico secondario e la riconnessione degli ambienti laterali, sia interventi micro, come la reintroduzione di macrofite pregiate in grado di stabilizzare i processi del ciclo dell'azoto e promuoverne la ritenzione in biomassa e la dissipazione in atmosfera.

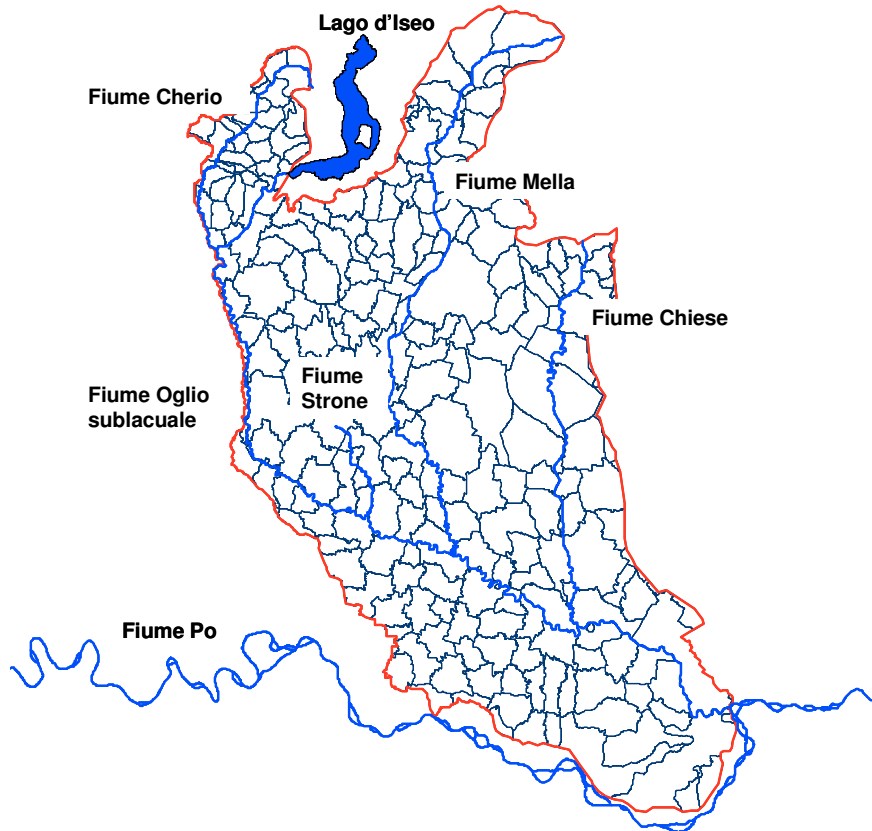
## 2.1 Il bacino del fiume Oglio sublacuale

Il corso del fiume Oglio nasce dal Corno dei tre signori (3360 m), al confine tra Lombardia e Trentino Alto Adige, e scorre interamente in territorio lombardo per circa 280 km prima di sfociare nel fiume Po in località torre d'Oglio (MN). Il tratto sublacuale si origina all'uscita dal Lago d'Iseo in coincidenza della diga di Sarnico, che ne gestisce le portate regolando il deflusso dal lago stesso; dopo avere attraversato le province di Brescia, Bergamo, Cremona e Mantova per un percorso di oltre 154 km sfocia nel fiume Po, coprendo un bacino imbrifero di circa 3.700 km<sup>2</sup> (fig. 2.1).

La conformazione geomorfologica cambia lungo l'asta del fiume, passando dai terreni ghiaiosi e sabbiosi caratterizzanti il tratto a nord, in cui il fiume scorre incassato al di sotto del livello fondamentale della pianura (dislivello di 35 m s.l.m), ai fondi marnosi e alluvionali di pianura dopo l'abitato di Roccafranca (dislivello dalla pianura di 7 metri). Oltre il 50% dei comuni appartenenti al bacino si trova in territorio pianeggiante, mentre la frazione restante è equamente ripartita fra collina e montagna.

Il deflusso idrico è regolato dall'erogazione delle acque del lago d'Iseo dalla diga di Sarnico e risulta fortemente influenzato da derivazioni a scopo idroelettrico ed irriguo, che ne determinano fluttuazioni stagionali e giornaliere in base ai cicli produttivi: i primi 30 km di fiume sono infatti caratterizzati da 7 centrali idroelettriche e 25 canalizzazioni artificiali di prelievo delle acque per uso irriguo ed industriale.

I due principali affluenti sono il fiume Mella ed il fiume Chiese; tra i tributari minori figurano il torrente Cherio, il fiume Strone ed i canali artificiali che confluiscono in Oglio nella porzione del medio-basso corso e che provengono da zone ad alta vocazione agricola (campagne cremonesi, mantovane e bresciane). Anche lungo il corso degli affluenti sono presenti diversi punti di presa d'impianti minori, sia per la produzione d'energia sia per l'approvvigionamento ad uso potabile dei centri abitati, oltre che per l'uso irriguo agricolo (prelievi di idrovore e trattori).



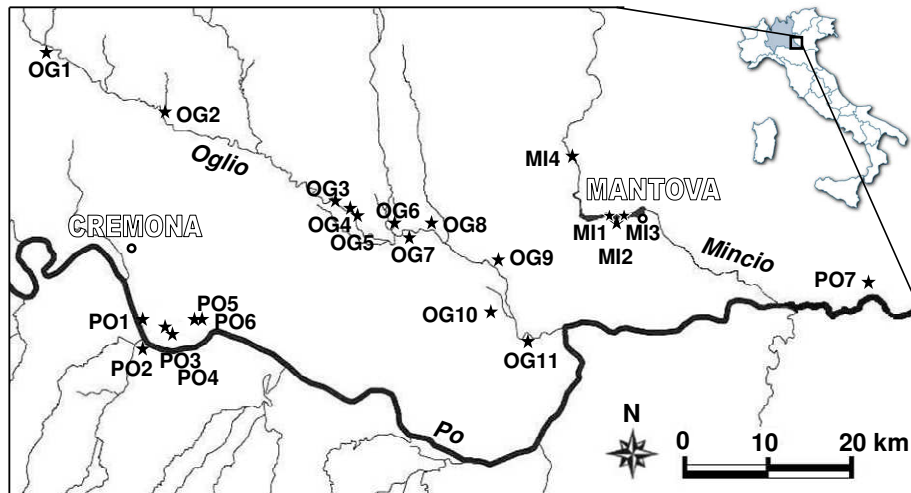
**Figura 2.1** Bacino del fiume Oglio sublacuale. La linea rossa indica il confine del bacino idrografico, mentre le linee nere i confini comunali. Oltre al fiume Oglio sublacuale sono rappresentati i quattro affluenti (Cherio, Strone, Mella e Chiese), la sorgente e la foce del fiume, il lago d’Iseo e il fiume Po.

Le porzioni di territorio limitrofe all’asta fluviale e all’interno degli argini maestri sono gestite e tutelate da due parchi regionali, Parco dell’Oglio Nord e Parco dell’Oglio Sud, rispettivamente fondati nel 2003 e nel 1998, con sede a Soncino e Calvatone, e con superficie di 141 e di 128 km<sup>2</sup>.

## **2.2 Le zone umide perifluviali di fiumi Po, Oglio sublacuale e Mincio**

Tra i numerosi ecosistemi lentici appartenenti al bacino del fiume Po, del fiume Oglio sublacuale e del fiume Mincio, in questo progetto di ricerca sono state studiate 22 zone umide perifluviali localizzate nelle province di Cremona e Mantova e appartenenti ai Parchi Oglio Nord, Oglio Sud e Mincio (fig. 2.2, tab. 2.1). Questi ambienti rappresentano alcune delle aree umide relitte che ancora oggi esistono in Pianura Padana, testimonianza dell’evoluzione degli

ambiti fluviali, importanti ecosistemi filtro e corridoi ecologici, spot isolati di naturalità in un contesto fortemente antropizzato, minacciati da frammentazione, eutrofizzazione e interramento, fattori che ne stanno determinando una scomparsa sempre più rapida con la connessa perdita di biodiversità.



**Figura 2.2** Zone umide perifluviali oggetto di studio.

Le tipologie di ambienti umidi maggiormente rappresentate sono quelle 1) delle lanche, ecosistemi perifluviali caratteristici del tratto pianiziale e meandriforme, originatisi in seguito al fenomeno del “salto di meandro” (Castiglioni, 1991); 2) delle torbiere, aree un tempo destinate all’estrazione della torba, oggi divenute zone umide (paludi, canneti, stagni) per affioramento della falda; 3) dei bodri (o “budrio”, termini della tradizione cremonese-casalasca), originatisi in relazione a episodi di sfondamento o tracimazione degli argini in occasione di eccezionali eventi di piena (D’Auria & Zavagno, 1999). A queste tipologie di ambienti è stato annesso anche il bacino lacustre, lago di Mezzo, appartenente al sistema fluviale Mincio: date le caratteristiche limnologiche, profondità media ridotta e velocità di corrente limitata, esso è assimilabile ecologicamente a corpi idrici eutrofici di pianura più che a un vero e proprio lago, contraddistinti da valori elevati di clorofilla e torbidità delle acque; la scarsa profondità, in ragione degli intensi processi di deposizione di materiali fini, permette la colonizzazione dei sedimenti e la proliferazione di densi tappeti di macrofite.

Tutti questi ambienti sono colonizzati da piante acquatiche (macrofite emergenti, sommerse, fluttanti e pleustofite) e sono caratterizzati dalla presenza permanentemente di acqua (profondità della colonna d’acqua maggiore di 0.25 cm).

Presentando un diverso grado di connessione idraulica con i fiumi adiacenti (tab. 2.1), le zone umide studiate sono state suddivise in due gruppi attraverso la “Hydrogeomorphic

Classification” (Brinson et al., 1998; Mitsch & Gosselink, 2000; Lin, 2006) e la “Functional Classification of European Wetlands” (Simpson, 2002). Dieci siti sono connessi in modo permanente ai corpi idrici: gli ambienti umidi da OG1 a OG6 e MI4 sono alimentati dal fiume da un canale, mentre quelli da MI1 a MI3 rappresentano una digressione del fiume, con movimento unidirezionale dell’acqua. Queste 10 zone umide sono state classificate come “Riverine wetland with surface inflow and unidirectional flow” (Brinson et al., 1998; Mitsch & Gosselink, 2000; Lin, 2006) o come “Eastern Continental River Marginal Wetlands belonging to unconfined channel sub-type (ECRM2H3P)” (Simpson, 2002). Le rimanenti 12 zone umide sono invece isolate a causa di interventi antropici che le hanno separate dalla pianura alluvionale. Le sorgenti d’acqua principale in questi ambienti sono le acque di falda, le precipitazioni e le acque di dilavamento, il movimento dell’acqua risulta a fluttuazioni verticali. Essi sono classificati come “Isolated depression supplied by groundwater discharge and characterized by vertical fluctuation” (Brinson et al., 1998; Mitsch & Gosselink, 2000; Lin, 2006) o come “Eastern Continental River Marginal Wetlands belonging to separated channel sub-type (ECRM3H2P)” (Simpson, 2002).

Tra le caratteristiche unificanti si ritrovano: instabilità spaziale e temporale, scarsa profondità della lama d’acqua soggetta a forti variazioni stagionali, assenza di corrente, cicli stagionali marcati con produzione primaverile-estiva, senescenza e decomposizione estiva-autunnale.

**Tabella 2.1** Caratteristiche delle zone umide perifluviali campionate; nella seconda colonna, C ed I indicano le zone umide connesse ed isolate.

Sito (Codice)	Connessione idraulica e sorgente di acqua	Tipologia	Coordinate Geografiche (Gauss –Boaga)		Superficie (m <sup>2</sup> )	Profondità media (m)	Macrofite
			Latitu.	Longitu.			
GABBIONETA (OG1)	C Fiume Oglio, flusso superficiale	lanca	5008085	1595982	80700	0.05	<i>Phragmites australis</i> , <i>Typha latifolia</i> , <i>Carex spp</i>
GAMBARA (OG2)	C Fiume Oglio e Gambara, flusso superficiale	stagno	5004875	1602192	4100	0.05	<i>Typha latifolia</i> , <i>Carex spp</i>
GERRE GAVAZZI (OG3)	C Fiume Oglio, flusso	lanca	5002880	1605969	38500	1.05	<i>Phragmites australis</i>

		superficiale						
RUNATE DX (OG4)	C Fiume Oglio, flusso superficiale	lanca	5002809	1606494	1800	0.08	<i>Nuphar luteum</i>	
RUNATE SN (OG5)	C Fiume Oglio, flusso superficiale	lanca	5002813	1606636	2900	0.09	<i>Nuphar luteum</i>	
CÀ NUOVE BERNINI (OG6)	C Fiume Oglio, flusso superficiale	stagno	5003055	1610524	6600	1.02	<i>Ceratophyllum demersum</i> , <i>Nuphar luteum</i> , <i>Phragmites australis</i>	
LAGO DI MEZZO1 (MI1)	C Fiume Mincio, flusso superficiale	lago eutrofico poco profondo	5003314	1640814	12400	1.05	<i>Nuphar luteum</i> , <i>Nymphaea alba</i> , <i>Trapa natane</i>	
LAGO DI MEZZO2 (MI2)	C Fiume Mincio, flusso superficiale	lago eutrofico poco profondo	5002980	1641376	16800	2.05	-	
LAGO DI MEZZO3 (MI3)	C Fiume Mincio, flusso superficiale	lago eutrofico poco profondo	5002742	1641882	25000	1.05	<i>Trapa natane</i>	
GOITO (MI4)	C Fiume Mincio, flusso superficiale	zona umida perifluviale	5015602	1634774	5500	0.06	<i>Vallisneria spiralis</i>	
BINE (OG7)	I Acque di falda	lanca	4999079	1612876	120800	1	<i>Phragmites australis</i> , <i>Carex spp</i>	
MOSIO (OG8)	I Acque di falda	palude (antica torbiera)	4999276	1617484	2300	0.03	<i>Phragmites australis</i> , <i>Typha latifolia</i> , <i>Carex spp</i>	
MARCARIA (OG9)	I Acque di falda	palude (antica torbiera)	4997260	1621140	10900	0.05	<i>Phragmites australis</i> , <i>Carex spp</i>	
BELFORTE (OG10)	I Acque di falda	palude (antica torbiera)	4992786	1621023	3900	0.02	<i>Nuphar luteum</i> , <i>Nymphaea alba</i> , <i>Phragmites australis</i> , <i>Typha latifolia</i> , <i>Carex spp</i>	
BOGINA (OG11)	I Acque di falda	zona umida perifluviale	4986548	1625592	66200	0.05	<i>Phragmites australis</i> , <i>Typha latifolia</i> , <i>Carex spp</i>	
GERRE DE' CAPRIOLI (PO1)	I Acque di falda	lanca	4992209	1582474	1500	0.05	<i>Phragmites australis</i> ,	
LANCONE (PO2)	I Acque di falda	lanca	4986916	1582437	61900	0.04	<i>Trapa natane</i>	

LAZZARETTO (PO3)	I Acque di falda	stagno	4991424	1584958	12500	1.05	<i>Spirodela polyrrhiza</i> , <i>Lemna gibba</i> , <i>Wolffia arrhiza</i> <i>Ceratophyllum demersum</i> ,
GERRE UGOLANI (PO4)	I Acque di falda	stagno	4989539	1584997	3900	0.5-1	<i>Myriophyllum spicatum</i> , <i>Potamogeton crispus</i> <i>Spirodela polyrrhiza</i> ,
CÀ DE' GATTI (PO5)	I Acque di falda	stagno	4991353	1589282	2800	1.04	<i>Lemna minor</i> , <i>Lemna gibba</i> , <i>Wolffia arrhiza</i>
CASCINA S. MARGHERITA (PO6)	I Acque di falda	stagno	4991 274	1590295	2000	0.07	<i>Nuphar luteum</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> <i>Phragmites australis</i> ,
OSTIGLIA (PO7)	I Acque di falda	palude	4996157	1665868	14800	0.09	<i>Typha spp.</i> <i>Carex spp</i>

## 2.3 Tratto nord del fiume Mincio

Il fiume Mincio, affluente di sinistra del fiume Po, si origina dal Lago di Garda presso Peschiera e attraversa per circa 75 km un territorio caratterizzato da colline moreniche a nord e zona alluvionale a sud prima di immettersi nel fiume Po all'altezza di Governolo. Come il fiume Oglio sublacuale, anche il fiume Mincio è caratterizzato dalla presenza di numerose opere idrauliche e canali artificiali, che regolano il deflusso di tutto il corso del fiume con lo scopo principale di distribuire l'acqua nei periodi irrigui e di proteggere la città di Mantova dai deflussi del lago di Garda e dai rigurgiti di piena del Po: diga di Monzambano, diversivo a Casale di Sacca, fornice di Formigosa e chiuse a Governolo.

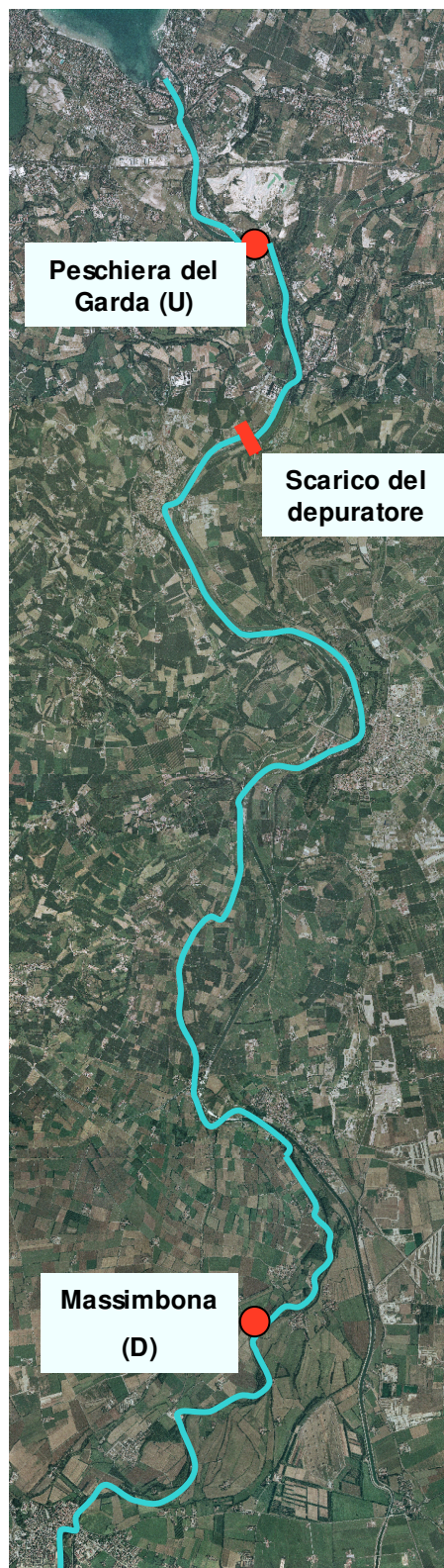
Il regime idrologico del fiume Mincio dipende dall'erogazione delle acque del Lago di Garda dalla diga di Monzambano, costruita per mantenere i livelli di invaso del lago necessari a rispondere alle esigenze turistiche del lago stesso e a quelle dei comparti agricolo (irrigazione) ed industriale (produzione di energia elettrica). Nei mesi invernali l'acqua è trattenuta per invasare il lago di Garda ed in Mincio scorrono  $10-12 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ , mentre nel periodo estivo i rilasci arrivano a  $50-70 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ , di cui circa il 25-30% defluisce nell'alveo naturale del Mincio, mentre la quota restante è immediatamente derivata da canali artificiali.

L'alveo fluviale del tratto nord, lungo circa 30 km, è costituito da materiale ciottoloso ed è colonizzato lungo le sponde da banchi di vegetazione naturale. Le zone marginali sono invece ricoperte da sedimento limoso e fangoso che permette la crescita e l'espansione di letti di macrofite sommerse tra cui *Vallisneria spiralis*, *Potamogeton crispus*, *P. trichoides*, *P. perfoliatus*, *P. pectinatus*, *Myriophyllum spicatum*, *M. verticillatum*, *Ranunculus trichophyllus*, *Elodea canadensis*.

La macrofita dominante è la specie stolonifera *Vallisneria spiralis*, capace di crescere rapidamente per estensione clonale e in grado di dare origine a praterie molto estese (Hauxwell et al., 2007). Questa pianta fino a trent'anni fa era confinata nei tratti più meridionali, caratterizzati da una scarsa velocità della corrente; ora invece questi tratti risultano dominati da comunità fitoplanctoniche e le praterie di macrofite sommerse stanno "migrando" verso nord.

I due siti di indagine appartengono al tratto nord del fiume Mincio, presso le località di Peschiera e Massimbona (fig. 2.3). Il sito di Peschiera (U) rispetto al sito di Massimbona (D) si trova a monte della diga di Monzambano e del depuratore delle acque reflue urbane di Peschiera (330.000 A.E.) che scarica direttamente in Mincio, di conseguenza sia le caratteristiche del sedimento che la qualità e quantità delle acque dei due siti differiscono.

In entrambi i siti il sedimento è limoso ed organico, ma lo scarico del depuratore comporta un maggiore trasporto e deposito di particolato da Monzambano a Massimbona che va ad influenzare il sedimento della stazione D, rendendolo più organico e ricco di nutrienti. I nutrienti disciolti nelle acque differiscono tra i due siti a causa della presenza dello stesso scarico del depuratore, ma anche perché il fiume attraversa un territorio fortemente sfruttato dall'attività agro-zootecnica e di natura ghiaiosa e permeabile risultando vulnerabile all'inquinamento da nitrati. Il sito D può essere definito mesotrofico con concentrazione di azoto inorganico maggiori di 50  $\mu\text{M}$ , mentre il sito U presenta acque a basso tenore di azoto inorganico ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ).



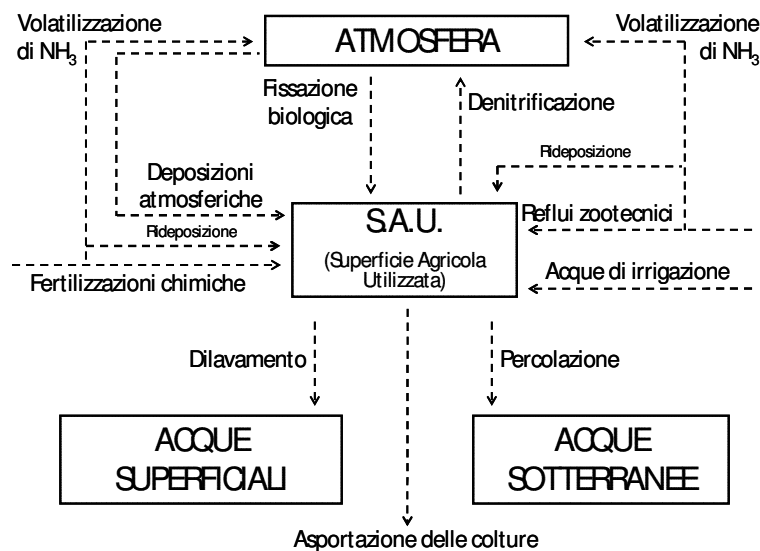
**Figura 2.3** Tratto nord del fiume Mincio. Siti di indagine a monte (U) e a valle (D) dello scarico del depuratore di Peschiera.

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 Il bilancio di massa dell'azoto a livello di bacino

##### 3.1.1 Metodologia di calcolo

Il bilancio di massa dell'azoto è stato calcolato secondo la metodologia di Oenema et al. (2003) del "soil system budget", quantificando gli apporti (zootecnia, fertilizzazioni azotate, fissazione biologica, deposizione atmosferiche, acque di irrigazione) e le perdite di azoto (asportazione da parte delle colture, volatilizzazione dell'ammoniaca, denitrificazione nei suoli) rispetto alla superficie agricola (SAU, Superficie Agricola Utilizzata) (fig. 3.1).



**Figura 3.1. Soil system budget attraverso la S.A.U. (Superficie Agricola Utilizzata) da Oenema et al. (2003).**

Questo approccio non considera le trasformazioni da una forma azotata ad un'altra all'interno del sistema considerato, ma esclusivamente gli input e gli output trasferiti direttamente verso o dalla superficie agricola. Non vengono quindi esaminati gli input azotati dalle sorgenti urbane. Questi sono stati calcolati comunque per confrontare a livello di ordine di grandezza sorgenti diffuse e puntiforme.

Il bilancio è stato condotto relativamente all'anno 2000, l'ultimo per cui sono disponibili dati di censimenti nazionali con risoluzione comunale. Quando possibile, sono stati impiegati coefficienti tratti dalla realtà locale al fine di tenere conto delle specificità territoriali.

A differenza di molti studi che hanno utilizzato questa metodologia, in questo lavoro di tesi sono stati stimati gli errori associati ai termini del bilancio, riflettendo la variabilità intrinseca nei parametri usati per calcolare i termini stessi (propagazione degli errori dei parametri usati per la stima di ogni specifico termine). Sono state omesse le incertezze associate ai dati derivanti da censimenti perché l'errore durante l'acquisizione dei dati è in genere molto piccolo (Kroeze et al., 2003).

Il surplus di azoto a livello di bacino (budget) è stato poi confrontato con il carico di azoto esportato annualmente dal fiume Oglio.

### ***3.1.2 Reperimento dati sulle attività agro-zootecniche, sugli insediamenti civili e sulla qualità delle acque del fiume Oglio sublacuale***

La stima del bilancio azotato del bacino del fiume Oglio sublacuale ha previsto la raccolta e l'integrazione dei dati inerenti alle sorgenti di origine antropica, quali attività agro-zootecniche e scarichi civili, ai sink di azoto ed alla qualità idrochimica del fiume dall'uscita dal Lago d'Iseo (Sarnico, BG) alla confluenza in Po (S. Matteo delle Chiaviche, MN). Le fonti di riferimento e la metodologia di calcolo sono state varie ed espresse in dettaglio nei paragrafi seguenti in base alle voci di input e di output del bilancio. Sono inoltre descritte le fonti per la stima del carico puntiforme di origine civile e del carico esportato dal fiume Oglio sublacuale ed immesso nel fiume Po.

#### ***3.1.2.1 Voci di input***

Il carico potenziale di azoto generato dall'attività zootecnica è stato calcolato sulla base di: 1) consistenza del patrimonio allevato a livello comunale (V Censimento Generale dell'Agricoltura, ISTAT, 2000), suddiviso in categorie di animali di interesse zootecnico secondo il genere, l'età e la destinazione, 2) pesi vivi medi delle diverse categorie, e 3) coefficienti di produzione di azoto dipendenti dalla tipologia di animale (avicoli, bovini, suini, equini, ovicaprini, bufalini, cunicoli, struzzi). I fattori utilizzati, analoghi a quelli adottati dalla normativa regionale vigente nell'ambito della disciplina di utilizzazione agronomica degli

effluenti di allevamento (D.G.R. 21/11/2007 n° 8/5868), forniscono un valore medio di azoto prodotto annualmente per unità di peso vivo.

Il contenuto di azoto negli effluenti di allevamento varia enormemente dipendendo da diversi fattori: tipo di animale, età, alimentazione, condizioni dello stoccaggio degli effluenti etc.: il termine medio di incertezza scelto da assegnare ai coefficienti di produzione di azoto è stato il 30% (Grignani & Zavattaro, 1999).

L'assunzione di base è che gli effluenti zootecnici siano utilizzati esclusivamente a fini di spandimento e che vengano applicati ai terreni all'interno del comune dove è ubicata l'azienda che li ha prodotti. Questa ipotesi non è in realtà pienamente verificata, ma sulla base dei dati ISTAT ad oggi disponibili non è possibile quantificare i flussi di reflui zootecnici tra aziende.

I dati sulle vendite di fertilizzanti chimici (Tavole Provinciali su Agricoltura e Zootecnia, ISTAT, 2000) e i range del contenuto di azoto per ogni tipologia di fertilizzante (Vitosh, 1996) sono stati usati per quantificare l'input di azoto dalle pratiche agricole. Essendo disponibili informazioni aggregate a livello provinciale, la ripartizione a scala comunale è stata operata in base alla disponibilità di terreni potenzialmente soggetti a concimazioni chimiche, ovvero seminativi e coltivazioni legnose agrarie, ipotizzando che questa sia proporzionale alla necessità di fertilizzanti azotati.

I dati riguardanti l'estensione della Superficie Agricola Utile e la ripartizione su base comunale nelle diverse destinazioni d'uso (colture) sono stati tratti dal V Censimento Generale dell'Agricoltura dell'ISTAT (2000).

La stima dell'input di azoto da fissazione biologica è stata effettuata moltiplicando l'area di ogni coltura azoto-fissatrice (V Censimento Generale dell'Agricoltura, ISTAT, 2000) per i range dei tassi di fissazione riportati in letteratura. Fonti di azoto mediante fissazione biologica sono state considerate le estensioni destinate a specie coltivate azoto-fissatrici (erba medica, soia, fagiolo e altri legumi, tra cui pisello e fava) e a pascoli (Herridge et al., 2008; McKee & Eyre, 2000; Smil, 1999).

L'apporto di azoto imputabile alle deposizioni atmosferiche umide è stato considerato secondo quanto riportato dal Codice di Buona Pratica Agricola (decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, 19 Aprile 1999) per la Pianura Padana, in media tra 10 e 15 kg N ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup>. Dai risultati del programma CON.ECO.FOR (Petriccione & Pompei, 2002), l'azoto ammoniacale e le forme ossidate dell'azoto rappresentano di solito rispettivamente il 45 % e il 35% del contenuto di azoto totale delle piogge in Lombardia, mentre la frazione rimanente è costituita da specie organiche (Tagliaferri et al., 2006). In questa voce di input

sono stati considerati solo l'azoto nitrico ed il contenuto organico (circa 54% della deposizione totale) assumendo che tutto il contenuto di azoto ammoniacale venga prodotto localmente dal processo di volatilizzazione, quindi incluso nel termine di rideposizione dell'ammoniaca volatilizzata.

L'input di azoto ai terreni coltivati derivante dalle acque di irrigazione è una voce non sempre presa in considerazione nei bilanci di massa, fatti in sistemi agricoli, in quanto spesso trascurabile. Nella presente ricerca si è deciso di includerla, data la peculiarità dell'area di studio: la fonte principale di approvvigionamento idrico nei territori ad elevata vocazione agricola del bacino in esame è rappresentata infatti dalle acque superficiali, ovvero quelle dell'Oglio e dei principali affluenti, dove i monitoraggi condotti hanno evidenziato elevati tenori di azoto. Il carico di azoto dovuto alle acque di irrigazione è stato calcolato dalle medie dei volumi di irrigazioni annuali (basati sulla domanda di acqua da parte delle colture) (Buzzacchi et al., 2008) e dalla concentrazione media dell'azoto totale nelle acque di irrigazione ( $4 \pm 1,5 \text{ mg N l}^{-1}$ ).

### *3.1.2.2 Voci di output*

La stima dell'asportazione di azoto ad opera delle colture è stata ottenuta sulla base di: 1) estensione delle superfici agricole destinate alle diverse colture (V Censimento Generale dell'Agricoltura, ISTAT, 2000), 2) rese medie annuali e 3) coefficienti di asportazione dell'azoto (Piano di Sviluppo Rurale 2007-2013, Regione Lombardia). Le rese medie annuali sono state calcolate dai dati provinciali di produzione delle diverse colture negli ultimi nove anni (ISTAT, 2000-2008c). Sono state escluse dai calcoli le coltivazioni occupanti meno dell'1% delle superfici comunali.

Il contenuto di azoto nelle diverse colture dipende da molti fattori quali varietà della coltura, condizioni climatiche, proprietà del suolo e pratiche agricole (van Dreht et al., 2005): la variazione interannuale nei coefficienti di uptake di azoto è stata assunta essere dell'ordine del 25% (Kroeze et al., 2003). Le radici ed i fusti delle colture lasciati al suolo e la biomassa ipogea delle colture azoto-fissatrici non sono state considerate all'interno di questa voce di output: una grande porzione dell'azoto totale fissato è infatti contenuto nelle radici, nei noduli e nei prodotti della loro necrosi, non asportati con i raccolti. I valori pubblicati di contenuto di azoto nella frazione ipogea delle colture (BGN, Below Ground Nitrogen) sono estremamente variabili, riflettendo gli effetti della specie, delle proprietà suolo e delle condizioni climatiche sulla ripartizione dell'azoto all'interno della pianta. I valori di BGN dalla letteratura, espressi come percentuale dell'azoto totale nella pianta, sono 22-66% per le

leguminose (fagioli, soia, piselli, etc.) e 34-68% per i prati di leguminose (i.e. erba medica) (Herridge et al., 2008).

Le perdite per volatilizzazione durante e successivamente le operazioni di conferimento in campo dei fertilizzanti (organici o chimici) risultano influenzate da diversi fattori, principalmente pedologici (tessitura, pH, capacità di scambio cationico), climatici (temperatura, precipitazioni, ventosità) e agronomici (modalità di distribuzione, quantità e caratteristiche del fertilizzante, epoca di spandimento) (Schlesinger & Hartley, 1992; Bussink & Oenema, 1998). In assenza di misure dirette di volatilizzazione di ammoniaca i valori impiegati sono stati tratti dalla letteratura. La perdita di azoto per volatilizzazione a partire dagli effluenti zootecnici è stata quantificata in un range tra il 5 e il 60% dell'input effettivo apportato alle terre coltivate. Per le fertilizzazioni chimiche è stato invece fissato un range tra 5 e 30%, considerando le perdite imputabili a concimazioni operate sotto forma di urea e sotto forma di nitrato di ammonio (Schlesinger & Hartley, 1992; Ferm, 1998; Ventura et al., 2008), i composti che sono maggiormente impiegati nell'area indagata. I quantitativi di azoto perso per emissione di ammoniaca sono stati infine corretti considerando che, come evidenziato da modelli di dispersione riportati in letteratura, circa il 60% viene mediamente ridepositato entro 2 km dalla sorgente di emissione (Asman, 1998).

Il processo di denitrificazione in suoli agricoli risulta influenzato da numerosi fattori, tra cui disponibilità di nitrato e ossigeno, tenore di carbonio organico e temperatura (Hofstra & Bouwman, 2005): i tassi sono quindi difficili da misurare con precisione e le stime soggette ad estrema variabilità. In una review sulla denitrificazione, Stevens & Laughlin (1998) riportano tassi di denitrificazione in suoli occupati da diverse tipologie di coltivazione, esplicitando tenore di umidità e temperatura misurate in campo, nonché apporti di azoto da fertilizzazioni. Non avendo a disposizione dati a livello così specifico di dettaglio per il bacino in esame si è scelto di quantificare l'output di azoto per denitrificazione come perdita percentuale degli apporti da spandimenti e fertilizzazioni chimiche, variabile tra il 5 e il 15% (Smil, 1999).

### *3.1.2.3 Carico di azoto esportato dal fiume Oglio sublacuale*

La stima dei carichi di azoto in transito in fiume e dell'export annuale è stata effettuata sulla base di dati idrochimici e misure di portata forniti rispettivamente dall'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (2000-2007) e dal Consorzio dell'Oglio, integrati con i risultati delle campagne di campionamento effettuate del Dipartimento di Scienze Ambientali nel biennio 2007-2008 durante il periodo irriguo e non irriguo (progetto

STRARIFLU-Oglio: Strategia di Riqualficazione Fluviale Partecipata del fiume Oglio sublacuale). Quest'ultimo monitoraggio ha interessato 20 stazioni fluviali e oltre 60 tra scarichi di depuratori civili, immissari, derivazioni irrigue, industriali e idroelettriche.

L'export annuale dal bacino mediante trasporto fluviale è stato quantificato in base alle serie storiche di portate e concentrazioni di azoto totale (TN) alla stazione ARPA di chiusura del bacino (nei pressi di Marcaria, MN).

#### *3.1.2.4 Carico di azoto generato dal comparto civile*

Il carico potenziale di azoto generato dal comparto civile è stato stimato sulla base della consistenza della popolazione (residente e fluttuante) dei comuni appartenenti al bacino (XXIV Censimento Generale della Popolazione e delle Abitazioni, ISTAT, 2001) e di un coefficiente che esprime la produzione giornaliera di azoto totale dell'Abitante Equivalente ( $12,5 \pm 0,5 \text{ mg N d}^{-1}$ ) (Provini et al., 1998). Informazioni relative al sistema degli impianti di depurazione nel bacino dell'Oglio sublacuale (numero di impianti, localizzazione, capacità, trattamenti) sono state tratte dalle Banche Dati del PTUA (Regione Lombardia, 2006) (Elenco dei depuratori esistenti al 2003).

#### *3.1.3 Analisi spaziale del carico di azoto nel bacino*

Come fonti cartografiche sono state impiegate le Carte Tecniche Regionali (scala 1:10.000, Regione Lombardia) e gli shape-file dei confini dei sottobacini del fiume Po e dei confini amministrativi comunali (Autorità di Bacino del fiume Po).

Le informazioni sulle attività agro-zootecniche e sul comparto civile sono state raccolte in un database, funzionale al calcolo del bilancio e alla sua rappresentazione spaziale mediante il software ArcView GIS 3.2.. L'analisi spaziale ha permesso di stabilire relazioni tra i dati tabellari e le corrispondenti entità geografiche (comuni), attribuendo alle diverse porzioni di bacino i valori corrispondenti dei termini del bilancio. Le voci del bilancio a scala comunale sono state corrette sulla base della frazione di area comunale compresa entro i confini del bacino. La risoluzione spaziale a livello comunale ha permesso di individuare in modo immediato le aree a maggiore surplus azotato; l'aggregazione di tutti i dati ha consentito poi il calcolo del bilancio dell'azoto a livello di intero bacino. Sono state realizzate le seguenti cartografie dei termini del bilancio: carico puntiforme di origine civile, carico zootecnico, carico generato dall'uso di fertilizzanti, uptake da parte delle colture, il carico totale generato e quello totale asportato dal suolo agricolo ed infine il surplus.

## 3.2 Denitrificazione nelle zone umide perifluviali della pianura Padana

### 3.2.1 *Attività di campo*

Durante la stagione invernale (gennaio-aprile) ed estiva (giugno-agosto) 2007 sono stati effettuati due campionamenti di sedimento e di acqua di fondo in 22 zone umide perifluviali del bacino del fiume Oglio sublacuale, del fiume Po e del fiume Mincio. Per ogni sito, sono state raccolte carote intatte di sedimento con cilindri di plexiglass trasparenti a diverse dimensioni per la caratterizzazione dei sedimenti (5 x 30 cm, n=3) e per la misura del metabolismo bentico e dei tassi di denitrificazione (8 x 40 cm, n=4). Il prelievo è stato effettuato a mano, nel caso in cui l'altezza della lama d'acqua fosse modesta, o mediante l'ausilio di un carotatore. Tutte le carote sono state trasferite in un box con acqua prelevata *in situ* e portate in laboratorio dopo poche ore dalla raccolta. Da ciascun sito sono stati inoltre prelevati circa 100 litri di acqua necessari al mantenimento delle carote nelle fasi di preincubazione e di incubazione e campioni di acque di fondo per la determinazione delle concentrazioni del carbonio inorganico totale e del nitrato, che sono stati immediatamente filtrati rispettivamente in vials di vetro e in boccetti di plastica. In campo sono stati misurati i valori di temperatura, pH e ossigeno disciolto nell'acqua mediante sonda multiparametrica (YSI modello 556 MPS).

È stata prestata particolare attenzione nell'effettuare il campionamento estivo nelle immediate vicinanze del punto di prelievo invernale, in modo da minimizzare la variabilità nelle caratteristiche dei sedimenti, riscontrabile anche in siti di ridotta estensione. In alcune occasioni questo non è stato possibile, in particolare dove le variazioni stagionali del livello idrico si sono rivelate consistenti.

### 3.2.2 *Incubazioni al buio di carote di sedimento*

In laboratorio, le carote sono state immediatamente sommerse senza tappo in superficie in vasche di incubazione contenenti acqua del sito ben rimescolata e aerata e alla stessa temperatura registrata in campo (8-12 °C in inverno e 22-27 °C in estate) mediante camera termostata. Durante il periodo di preincubazione (circa 12 ore), l'acqua delle vasche è stata mantenuta areata mediante un sistema di agitazione costituito da tubi e pompe da acquario al

fine di garantire il rinnovo continuo dell'acqua all'interno delle carote e l'ossigenazione dei sedimenti. Per impedire la stratificazione dell'acqua contenuta nelle carote, ogni carota è stata dotata di una barretta magnetica di teflon sospesa ad alcuni cm sopra l'interfaccia sedimento-acqua e fatta ruotare ad una velocità di circa 40 rpm da un sistema di magneti guidati da un motore esterno, per minimizzare la risospensione del sedimento.

Il giorno successivo il campionamento l'acqua delle vasche è stata sostituita parzialmente con altra acqua del sito e le carote sono state incubate per la stima del metabolismo benthico (misura dei flussi di O<sub>2</sub> (SOD), carbonio inorganico disciolto (DIC) e azoto inorganico disciolto (DIN= $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ )) utilizzando la metodica standard di Dalsgaard et al., 2000. Una seconda incubazione mediante la metodica di Nielsen (1992) dell'«<sup>15</sup>N Isotope Pairing Technique» (IPT, Tecnica dell'Accoppiamento Isotopico) è stata effettuato sullo stesso set di carote per la stima dei tassi di denitrificazione. Le due incubazioni sono state separate da un intervallo di circa 2 ore con una fase di sommersione-preincubazione, durante la quale è stata ancora sostituita parzialmente l'acqua delle vasche.

#### 3.2.2.1 *Metabolismo benthico*

Le incubazioni sono incominciate con il prelievo di campioni d'acqua prima direttamente dalle vasche per la determinazione delle concentrazioni iniziali di gas e nutrienti azotati (3 repliche per sito), e poi dall'abbassamento del livello dell'acqua appena al di sotto della superficie delle carote con chiusura delle stesse mediante tappi galleggianti in plexiglas trasparente a tenuta di gas ( $t_0$ , tempo iniziale di incubazione). Le carote sono state incubate al buio alla temperatura *in situ* per circa 2 - 5 ore, con un continuo mescolamento della colonna d'acqua; il tempo di incubazione è stato deciso al fine di ottenere concentrazioni finali di ossigeno che fossero circa il 20% del valore iniziale (Dalsgaard et al., 2000). Nel momento di chiusura e apertura delle carote si è misurata la temperatura dell'acqua.

Il termine dell'incubazione ha previsto l'apertura delle carote ( $t_f$ ) e il prelievo di campioni di acqua all'interno di ciascuna carote ( $n=4$  per sito). I campioni  $t_0$  e  $t_f$  sono stati trasferiti in provette di vetro (Exetainers, Labco, High Wycombe, UK) per la determinazione delle concentrazioni di ossigeno disciolto e carbonio inorganico disciolto. Circa 50 ml di campione sono stati filtrati (filtro a fibre di vetro Whatman GF/F) e trasferiti in vials di plastica per la determinazione delle diverse forme del pool dell'azoto inorganico disciolto (DIN= $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ). Le analisi dei gas disciolti sono state effettuate immediatamente dopo il prelievo, mentre i campioni per le analisi dei nutrienti sono stati congelati e analizzati in un secondo momento. Per il calcolo dei flussi si rimanda al paragrafo 3.2.3.

### 3.2.2.2 Denitrificazione

La tecnica IPT permette di distinguere la denitrificazione totale ( $D_{tot}$ ) nelle due componenti: denitrificazione del nitrato che diffonde al sedimento anossico dalla colonna d'acqua ( $D_W$ ) e denitrificazione del nitrato prodotto all'interno del sedimento dal processo di nitrificazione ( $D_N$ ). All'inizio dell'esperimento, il livello dell'acqua nelle vasche è stato abbassato appena al di sotto della superficie delle carote e sottocampioni di acqua (20ml) sono stati prelevati da ogni carota per la determinazione della concentrazione iniziale di  $NO_3^-$ . Differenti quantità di  $^{15}NO_3^-$  da una soluzione 15 mM  $Na^{15}NO_3^-$  sono state poi aggiunte alla colonna d'acqua di ognuna delle 4 carote per sito al fine di effettuare un esperimento di "serie di concentrazioni" (Dalsgaard et al., 2000) e di valutare la capacità denitrificante in relazione alla disponibilità di substrato; le aliquote da aggiungere sono state stabilite sulla base delle concentrazioni di nitrato riscontrate in sito dall'analisi dei campioni di acque di fondo. Il nitrato marcato è stato aggiunto alle carote in modo da ottenere un arricchimento in  $^{15}NO_3^-$  di almeno il 30% rispetto al pool di  $^{14}NO_3^-$ . Dopo 10-15 minuti dall'aggiunta di  $^{15}NO_3^-$  un altro campione di acqua è stato prelevato da ogni carota per calcolare il rapporto  $^{14}N/^{15}N$  nel pool di  $NO_3^-$ . Tale tempo di attesa è necessario per consentire al  $^{15}NO_3^-$  di diffondersi nella zona anossica ed omogeneizzarsi con quello presente nell'acqua interstiziale ed è generalmente sufficiente in sedimenti che presentano una penetrazione dell'ossigeno minore di 1mm, condizione comune in ecosistemi umidi. Le carote sono poi state chiuse sempre con i tappi galleggianti in plexiglas ed è iniziata l'incubazione. La temperatura dell'acqua è stata misurata all'inizio e alla fine dell'incubazione. Dopo circa 3 ore di incubazione, si è aggiunto 5 - 10 ml di  $ZnCl_2$  (7 M) alla fase acquosa per porre fine al processo di denitrificazione mediante shock osmotico alla comunità batterica e ogni carota è stata distrutta mescolando acqua e sedimento e generando uno slurry. Un'aliquota dello slurry è stata trasferita in vial a tenuta di gas di 12.5 ml con l'aggiunta di 100  $\mu$ l di  $ZnCl_2$ . Per ogni ambiente è stato prelevato un campione d'acqua dalle vasche di incubazione, avvelenato anch'esso con 100  $\mu$ l di  $ZnCl_2$  per la determinazione della composizione isotopica dell' $N_2$  *in situ*.

I campioni, conservati al buio a 4°C, sono stati analizzati presso il National Environmental Research Institute, Department of Marine Ecology, Silkeborg (Danimarca), mediante gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa, per la stima della composizione isotopica dell' $N_2$  prodotto per denitrificazione. I tassi di denitrificazione sono stati calcolati in accordo alle equazioni e assunzioni di Nielsen (1992), riportate nel paragrafo 3.2.4.

L'IPT permette di quantificare la produzione di  $N_2$  in sedimenti intatti ma non può discriminare se la sorgente di  $N_2$  è il processo di denitrificazione o quello di ossidazione

anaerobica dell'ammonio o anammox. Studi recenti mostrano come l'anammox possa contribuire per il 50% o più alla produzione di N<sub>2</sub> in ambienti costieri e nel mare profondo (Dalsgaard et al., 2005; Trimmer et al., 2006), e come invece rappresenti solo una piccola frazione dell' N<sub>2</sub> prodotto in ecosistemi d'acqua dolce (Schubert et al., 2006). Per questo motivo e per il fatto che il processo potrebbe essere inibito dai composti organici labili, che caratterizzano gli ambienti studiati, ho considerato che l'N<sub>2</sub> misurato fosse dovuto solo al processo di denitrificazione (Trimmer et al. 2003; Risgaard-Petersen et al. 2003; Schubert et al. 2006; Koop-Jakobsen & Giblin 2009).

### ***3.2.3 Calcolo dei flussi bentici dei gas e dei nutrienti***

I flussi all'interfaccia acqua-sedimento, indice dell'attività metabolica del comparto bentico, sono stati determinati come variazione nel tempo della concentrazione del composto in esame e calcolati tramite la seguente formula:

$$\text{Flux [X]} = \frac{(C_f - C_i)}{A \cdot \Delta t} \cdot V \cdot 10.000 = \frac{(C_f - C_i) \cdot h \cdot 10}{\Delta t}$$

- Flux [X] : flusso del composto in esame (mmoli m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> per i flussi di ossigeno disciolto e carbonio inorganico disciolto; μmoli m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> per i flussi dei nutrienti azotati)
- C<sub>i</sub>, C<sub>f</sub>: concentrazione iniziale e finale del composto (mM o μM)
- V : volume dell'acqua nella carota (l)
- A : area della superficie del sedimento nella carota (cm<sup>2</sup>)
- h : altezza della colonna d'acqua nella carota (cm)
- Δt : tempo di incubazione (h)

Considerando i flussi dal punto di vista del comparto acquatico, i flussi negativi indicano la richiesta del sedimento di nutrienti o gas dalla colonna d'acqua (influssi), mentre i flussi positivi rappresentano degli efflussi e quindi il rilascio di nutrienti o gas dal sedimento verso la colonna d'acqua.

### ***3.2.4 Calcolo dei tassi di denitrificazione***

I tassi di denitrificazione sono stati ricavati con riferimento ai principi metodologici e alle equazioni sviluppate da Nielsen (1992), riportate anche nel protocollo NICE (Nitrogen Cycling in Estuaries, Dalsgaard et al., 2000).

I tassi di produzione di  $^{29}\text{N}_2$  e  $^{30}\text{N}_2$  per unità di area (indicati in generale come  $p(^{xx}\text{N}_2)$  ed espressi in  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) sono stati calcolati come segue:

$$p(^{xx}\text{N}_2) = \frac{AM_f - AM_i}{A \cdot \Delta t}$$

- $AM_i$ ,  $AM_f$  : quantità iniziale e finale di  $^{xx}\text{N}_2$  ( $\mu\text{mol N}$ )
- $A$  : area della carota di sedimento ( $\approx 0,005 \text{ m}^2$ )
- $\Delta t$  : tempo di incubazione (h)

I tassi di denitrificazione di  $^{15}\text{NO}_3^-$  ( $D_{15}$ ) e  $^{14}\text{NO}_3^-$  ( $D_{14}$ , tasso di denitrificazione in situ), sono stati espressi come segue:

$$D_{15} = p(^{29}\text{N}_2) + 2p(^{30}\text{N}_2)$$

$$D_{14} = \frac{p(^{29}\text{N}_2)}{2p(^{30}\text{N}_2)} \cdot D_{15}$$

La quota di  $D_{14}$  sostenuta dal nitrato in fase acquosa ( $D_w$ ) è stata calcolata dal  $D_{15}$  e dal rapporto tra le due forme di nitrato in acqua ( $^{14}\text{N}:^{15}\text{N}$ ):

$$D_w = D_{15} \cdot \frac{[^{14}\text{NO}_3^-]_w}{[^{15}\text{NO}_3^-]_w}$$

- $[^{14}\text{NO}_3^-]_w$ ;  $[^{15}\text{NO}_3^-]_w$  : concentrazioni di  $^{15}\text{NO}_3^-$  e  $^{14}\text{NO}_3^-$  in acqua

Il tasso di denitrificazione accoppiato alla nitrificazione ( $D_n$ ) è stato ottenuto per differenza, sottraendo a  $D_{14}$  il contributo di  $D_w$ :

$$D_n = D_{14} - D_w$$

I tassi di denitrificazione  $D_w$  così calcolati sono stati poi confrontati con i tassi teorici di denitrificazione  $D_w$  stimati secondo l'equazione proposta da Christensen et al. (1990), per i quali i tassi  $D_w$  sono direttamente proporzionali alla domanda sedimentaria di ossigeno e alla concentrazione di nitrato nelle acque di fondo ed inversamente proporzionale alla concentrazione di ossigeno disciolto nelle acque di fondo in ambienti non colonizzati da fanerogame e non bioturbati:

$$D_w = F_{O_2} \cdot \alpha \cdot \left[ \sqrt{\left( 1 + \frac{D_{NO_3^-}}{D_{O_2}} \cdot \frac{C_{NO_3^-}}{C_{O_2}} \cdot \frac{1}{\alpha} \right)} - 1 \right]$$

- $F_{O_2}$  : la domanda sedimentaria di ossigeno al buio
- $\alpha$ : il rapporto tra la denitrificazione profondità-specifica e l'attività di consumo di ossigeno ( $\sim 0.8$ )
- $D_{NO_3^-}$  e  $D_{O_2}$  : coefficienti di diffusione del nitrato e dell'ossigeno
- $C_{NO_3^-}$  e  $C_{O_2}$  : concentrazioni di nitrato e di ossigeno disciolto nella colonna d'acqua

### ***3.2.5 Analisi in laboratorio: caratterizzazione delle acque e dei sedimenti***

In laboratorio sono state misurate le concentrazioni di ossigeno disciolto, carbonio inorganico totale e nutrienti nei campioni acquosi prelevati *in situ* e in quelli riferiti ai tempi iniziali e finali delle incubazioni. Di seguito sono riportate le metodiche analitiche:

- Ossigeno disciolto. Titolazione iodometrica secondo il metodo Winkler, punto finale apprezzato mediante viraggio dell'indicatore salda d'amido (A.P.H.A., 1981).
- Carbonio inorganico disciolto ( $CO_{2(aqu)} + H_2CO_3 + HCO_3^- + CO_3^{2-}$ ). Titolazione potenziometrica con acido cloridrico 0,1 N, a 6 punti negli intervalli  $7.7 \div 6.6$  e  $4.4 \div 3.7$  unità di pH (Anderson et al., 1986).
- Azoto ammoniacale. Reazione dello ione ammonio con formazione di indofenolo, spettrofotometria di assorbimento molecolare, visibile 690 nm (A.P.H.A., 1981).
- Azoto nitroso. Reazione di copulazione e diazotazione, spettrofotometria di assorbimento molecolare, visibile 543 nm (A.P.H.A., 1981).
- Azoto nitrico. Riduzione dei nitrati a nitriti mediante cadmio granulare, impaccato in colonne di vetro; successiva determinazione dei nitriti tramite reazione di copulazione e diazotazione, spettrofotometria di assorbimento molecolare, visibile a 543 nm (A.P.H.A., 1981).

La caratterizzazione del sedimento ha previsto l'estrusione tramite pistone del primo centimetro di sedimento e la successiva omogeneizzazione con una spatola. Sono stati quindi prelevati due sottocampioni, uno di 5 ml raccolti in vaschetta d'alluminio, precedentemente pesata, per la determinazione di densità, porosità, contenuto di sostanza organica (analisi su sedimento secco) e uno di 1 ml raccolto in provetta di teflon per la determinazione di clorofilla microfitobentonica (analisi su sedimento fresco). Nello specifico:

- Densità ( $g\ ml^{-1}$ , ovvero  $g\ cm^{-3}$ ). Rapporto tra il peso di un sottocampione di sedimento fresco (g) e il volume del sottocampione stesso (5 ml).

- Porosità. Rapporto tra la differenza del peso fresco e secco, dopo essiccamento in stufa a 70°C, di un sottocampione di sedimento (g) e il volume del sottocampione di sedimento fresco (5 ml).
- Contenuto di sostanza organica (%). Perdita in peso per incenerimento in muffola a 400°C per un tempo di 3 ore di un'aliquota di campione (circa 0,2 ÷ 0,3 g), precedentemente essiccata in stufa, polverizzata in un mortaio e trasferita in un crogiolino di ceramica.
- Contenuto di C e N totale. Analisi di un sottocampione di sedimento secco con analizzatore elementare (CHNS-O EA 1108 Carlo Erba).
- Clorofilla-a microfitobentonica ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Estrazione da campione di sedimento a 4°C al buio con soluzione di acetone al 90% per 24 ore, centrifugazione e lettura spettrofotometrica in cuvette di quarzo con metodo tricromatico secondo Parson e Strickland (Lorenzen, 1967; A.P.H.A., 1981).

### ***3.2.6 Analisi statistica***

Attraverso il software SPSS (versione 16.0) sono state testate le differenze tra stagioni di campionamento, estate ed inverno, e tra grado di connessione idrologica delle zone umide al corpo d'acqua, isolate o connesse. I test inferenziali sono stati applicati ad ogni variabile misurata: temperatura, domanda sedimentaria di ossigeno, flussi del carbonio inorganico totale, quoziente respiratorio, flussi dell'ammonio e delle forme ossidate dell'azoto inorganico, contenuto di sostanza organica, densità del sedimento, biomassa microalgale bentonica e tassi di denitrificazione. Per ogni sito le 4 repliche per variabile (4 carote) sono state considerate come pseudo-repliche, perché il campionamento è stato eseguito nella stessa posizione all'interno della zona umida. Per questo motivo nelle analisi statistiche è stato calcolato ed è stato utilizzato il valore medio di ogni variabile, considerando quindi 4 distribuzioni di dati originate dai due fattori, stagione e grado di connessione (es. inverno-isolate, inverno-connesse, estate-isolate, estate-connesse).

La violazione delle assunzioni di normalità (Kolmogorov-Smirnov test con correzione di Lilliefors) e dell'omogeneità della varianza (Levene test) ha impedito l'utilizzo della statistica parametrica. Anche dopo l'applicazione del metodo Cox-Box per la trasformazione logaritmica delle distribuzioni dei dati, la normalità non è stata verificata a causa della presenza di numerosi outlier.

Il test T non parametrico di Wilcoxon è stato quindi utilizzato per testare le differenze tra le distribuzioni invernali ed estive ( $n_1=n_2=22$ ), mentre l'U di Mann-Whitney per testare le differenze tra le zone umide isolate e quelle connesse ( $n_1=24$  and  $n_2=20$ ). Se la variabile testata mostrava significatività stagionale, la differenza tra il grado di connessione (U di Mann-Whitney) è stata analizzata separando i dati tra periodo estivo ed invernale ( $n_1=12$  and  $n_2=10$ ). Le relazioni di correlazione tra le variabili sono state identificate con il coefficiente di correlazione ( $\rho$ ) di Spearman. Per ogni test, le differenze sono state considerate non significative per  $P>0.05$ . I risultati sono espressi in mediana e range.

### **3.3 Trasporto di ossigeno nel sedimento e denitrificazione-nitrificazione nel tratto nord del fiume Mincio colonizzato da *Vallisneria spiralis* L.**

#### ***3.3.1 Colonizzazione di sedimenti organici da parte di una macrofita radicata (Vallisneria spiralis): implicazioni per lo stato redox del sedimento e il chimismo delle acque interstiziali***

##### *3.3.1.1 Attività di campo e set up sperimentale*

Campioni di sedimento e di acqua ed individui della specie *V. spiralis* sono stati raccolti da due siti del fiume Mincio, a monte (U) e a valle (D) dello scarico dell'impianto di trattamento delle acque reflue urbane della città di Peschiera (330.000 abitanti equivalenti). In ogni sito sono stati prelevati circa 200 litri di acqua, 5 litri di sedimento non vegetato attraverso cilindri di plexiglass, e 100 individui di *V. spiralis*, raccolti a mano al fine di mantenere intatto l'apparato radicale.

In laboratorio, nelle due ore successive al campionamento, il sedimento di ogni sito è stato setacciato per rimuovere macroinvertebrati e frammenti di piante (maglia del setaccio: 0.2 cm) e poi omogeneizzato e lo slurry ottenuto è stato trasferito in microcosmi di plexiglass cilindrici (diametro 3 cm, altezza 10 cm,  $n=42$ ). Individui di *V. spiralis* di dimensioni simili sono stati lavati con acqua del sito per rimuovere gli epifiti e le particelle di sedimento dalla rizosfera e sono stati trapiantati in metà microcosmi. Tutti i microcosmi dello stesso sito (con e senza *V. spiralis*,  $n_{\text{with}}=n_{\text{without}}=21$ ) sono stati poi trasferiti in una vasca di incubazione contenente acqua del sito alla temperatura ambientale e sono stati esposti ad un ciclo

giorno/notte di 12h (radiazione luminosa  $300 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , lampade alogene). Pompe d'acquario sono state utilizzate per mantenere ben rimescolata ed ossigenata l'acqua nelle due vasche di incubazione (U e D), fornendo condizioni di crescita favorevole allo sviluppo della pianta.

All'inizio dell'esperimento e dopo 3, 6, 11, 14, 18, 21 e 25 giorni, 3 repliche di ogni trattamento (con e senza pianta) da ogni sito (U e D) sono state sacrificate per un totale di 12 sottocampioni. In particolare, le foglie di *V. spiralis*, nei microcosmi con la pianta, sono state tagliate alla base, il sedimento superficiale (0-5 cm) è stato estruso e centrifugato in ambiente anossico ( $\text{N}_2$ ). L'acqua contenuta nei pori interstiziali così ottenuta è stata immediatamente analizzata per pH, Eh,  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_x^-$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Le foglie e le radici (estratte dai sedimenti) sono state recuperate, lavate con acqua del sito, seccate a  $50^\circ\text{C}$ , pesate e analizzate per il contenuto di C, N e P e per il  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ .

Simultaneamente alle analisi delle acque interstiziali, l'acqua delle vasche è stata monitorata per la determinazione delle concentrazioni di azoto e fosforo inorganico ed il 20% del volume dell'acqua è stato sostituito con acqua fresca del sito. Le concentrazioni di azoto e fosforo inorganico sono state mantenute costanti aggiungendo piccole quantità di soluzioni concentrate di  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ .

### 3.3.1.2 *Analisi in laboratorio: caratterizzazione delle acque, dei sedimenti e di Vallisneria sp.*

La concentrazione di  $\text{O}_2$  disciolto, il pH e il potenziale redox sono stati misurati con micro sensori polarografici (Unisense, DK) e con elettrodi potenziometrici (Radiometer, DK) connessi ad un picoamperometro (PA2000, Unisense, DK) e a un millivoltmetro ad alta impedenza (Crison micro pH 2002, ES).

Le concentrazioni delle tre forme dell'azoto inorganico disciolto, del fosforo reattivo solubile e del carbonio inorganico totale (DIC) sono state determinate secondo le metodiche riportate nel paragrafo 3.2.5 e di seguito:

- $\text{CO}_2$  disciolta. Calcolata dai valori di pH e di DIC secondo Lewis and Wallace (1998).
- Fosforo reattivo solubile. Riduzione del complesso fosfomolibdico con acido ascorbico, spettrofotometria di assorbimento molecolare, visibile a 882 nm (Valderrama, 1977).
- Metano. Gas-cromatografia con il rilevatore FID (flame ionization detector) (Fisons, GC 9000 series).
- Silice. Reazione con molibdato di sodio e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , spettrofotometria di assorbimento molecolare, visibile a 562 nm (Golterman et al., 1978).

- Ferro ferroso. Reazione con ferrozina, spettrofotometria di assorbimento molecolare, visibile a 815 nm (Stookey, 1970).

Sul sedimento è stata determinata la densità, il contenuto di sostanza organica e il contenuto di C e N secondo le metodologie presentate nel paragrafo 3.2.5. Il contenuto di fosforo totale è stato misurato spettrofotometricamente secondo Aspila et al. (1976) su un campione secco di sedimento. Su un'aliquota di sedimento (tra 5 e 10 mg) è stata determinata la firma isotopica dell'azoto, come spiegato per le foglie e le radici della pianta.

Foglie e radici di *V. spiralis* sono state essiccate in stufa a 50°C fino a peso costante, polverizzate e setacciate per assicurare l'omogeneità del campione. Su ogni campione si sono eseguite le seguenti analisi:

- Contenuto di C e N totale. Analizzatore elementare (EA 1110, Carlo Erba) previa pesata di 0.05 mg di campione per il carbonio e 2 mg di campione per l'azoto.
- Firma isotopica  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ . Analizzatore elementare (EA 1110, Carlo Erba) accoppiato con uno spettrometro di massa (delta plus XP, ThermoFinnigan) previa pesata di 0.05 mg di campione per il carbonio e 2 mg di campione per l'azoto. L'abbondanza dell'isotopo di carbonio e azoto è riportata come  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  e calcolata come:

$$\delta(\text{‰}) = [(R_{\text{sample}}/ R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$$

dove R è il rapporto  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  e il rapporto  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  nel campione e nello standard. Lo standard è un carbonato marino (V-PDB) per il  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\text{N}_2$  (AIR) atmosferico per la determinazione del  $\delta^{15}\text{N}$ . La deviazione standard delle repliche è risultata migliore di  $\pm 0.2\text{‰}$  sia per entrambe le misure di  $\delta^{15}\text{N}$  e di  $\delta^{13}\text{C}$ .

### 3.3.1.3 Analisi statistica

Le differenze tra le piante e i sedimenti raccolti dal sito U e D sono state testate attraverso l'ANOVA ad una via.

L'evoluzione temporale delle variabili dell'acqua interstiziale nei sedimenti vegetati ed in quelli non vegetati di entrambi i siti è stata confrontata attraverso l'ANCOVA: la covarianza delle variabili (pH,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , Eh,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SiO}_2$ ) versus il tempo è stata testata per le quattro condizioni sperimentali (US, UV, DS, DV) con il pacchetto statistico R (R

Development Core Team, 2005). I contrasti a priori sono stati utilizzati per confrontare le pendenze e le intercette dei modelli lineari.

### ***3.3.2 Misura dei tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione nella rizosfera di *V. spiralis****

#### *3.3.2.1 Attività di campo*

Sedimento e piante della specie di macrofita radicata sommersa *V. spiralis* sono stati raccolti in un sito mesotrofico del fiume Mincio, Peschiera, caratterizzato da acque a basso tenore di azoto inorganico ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ) e in un sito eutrofico del fiume, Massimbona, ( $\sim 70 \mu\text{M}$ ) a valle del depuratore di Peschiera in tre periodi dell'anno 2008: primavera (aprile-maggio), estate (luglio-agosto) ed autunno (ottobre-novembre). La scelta di queste tre stagioni è stata dettata dal ciclo vitale della pianta, al fine di studiare l'influenza della pianta sulle dinamiche dell'azoto nel momento di massima crescita, di massima biomassa e di senescenza della pianta stessa.

Per ogni sito e per ogni stagione studiata sono stati svolti due campionamenti. Il primo ha previsto la raccolta ed il setacciamento del sedimento fluviale con setaccio da 0.5 cm di maglia per rimuovere i macroinvertebrati e le particelle grossolane; la raccolta e la pulizia fogliare da epifiti di piante di *V. spiralis* avendo cura di sceglierle di simile dimensione; l'impaccamento di 32 microcosmi di cui 16 con solo sedimento setacciato come controllo e 16 con sedimento setacciato e trapianto di 4 individui di *V. spiralis* per microcosmo; l'immersione in fiume per il posizionamento ed ancoraggio dei mesocosmi sul fondo del fiume (circa 2 m a Peschiera e 1 m a Massimbona) dove le piante potessero essere esposte alle condizioni naturali di luce, temperatura e regime di nutrienti. Un'aliquota di sedimento setacciato è stato trasferito in laboratorio per l'analisi della densità, porosità, contenuto di sostanza organica e ammoniaca scambiabile.

Un periodo di acclimatazione di 20 giorni ha permesso lo stabilirsi dell'apparato radicale e la crescita naturale delle piante così come della comunità microbica. Dopo tale lasso di tempo tramite il secondo campionamento sono stati recuperati i microcosmi, misurata la temperatura dell'acqua (termometro) e prelevati circa 200 litri di acqua del sito utili alle fasi di preinbucazione e di incubazione. Circa 100 ml di acqua del sito è stata filtrata in campo in boccetti di plastica e refrigerata per le analisi dell'azoto inorganico disciolto, utili alla scelta

delle aggiunte di nitrato e ammoniaca marcati per le successive incubazioni. Sono inoltre state raccolte alcune piante di *V. spiralis* per la determinazione della biomassa e del contenuto di carbonio e azoto elementare *in situ*. I microcosmi sono realizzati in plexiglass e hanno dimensioni compatibili con carote intatte utilizzate per stime di flussi: diametro carote 8 cm, diametro microcosmi 7 cm; sono dotati di 4 serie di fori verticali, siliconati (n=36), che permettono di modificare il chimismo delle acque interstiziali. Tutte le carote-microcosmi sono stati trasferiti in un box con acqua prelevata *in situ* e portate in laboratorio dopo poche ore dalla raccolta.

### 3.3.2.2 Set-up sperimentale

Di seguito e in figura 3.1 si riassume il set-up sperimentale per ogni sito, eutrofico e mesotrofico:

Fase 1: raccolta piante e sedimenti, setacciamento dei sedimenti *in situ*, impiccamento di 32 microcosmi, trapianto di 4 individui per microcosmo in 16 microcosmi e posizionamento-ancoraggio dei mesocosmi sul fondo del fiume (a, b, c, d, e).

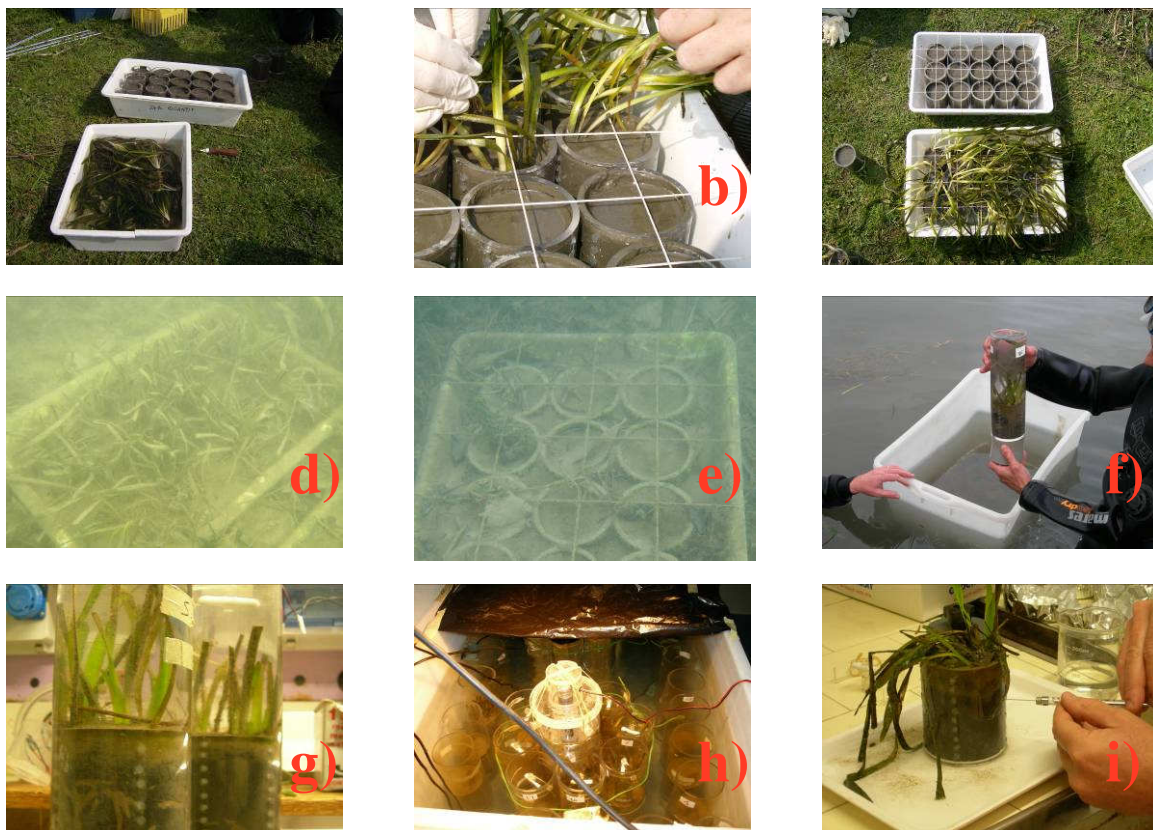


Figura 3.1 Set-up sperimentale.

Fase 2: recupero dei mesocosmi, trasferimento carote e trasporto in laboratorio (f, g, h).

Fase 3a: incubazione per misure dei flussi di gas e nutrienti azotati su 16 microcosmi (al buio: 4 controlli e 4 con pianta; alla luce: 4 controlli e 4 con pianta) (h).

Fase 3b: iniezione di  $^{15}\text{NH}_4^+$  nelle acque interstiziali e incubazione per misure dei tassi di denitrificazione associata alla nitrificazione sullo stesso set di microcosmi-carote e nelle stesse condizioni della fase 3a (Nielsen, 1992; Caffrey & Kemp, 1992) (i).

Fase 3c: iniezione di acqua satura di acetilene nelle acque interstiziali per misure di azoto fissazione sul nuovo set di 16 microcosmi-carote con le stesse condizioni sperimentali della fase 3a (McRoy et al., 1973; Howarth et al., 1988a e b) (i).

Nel sito mesotrofico la sequenza di operazioni è stata effettuata nelle date di 22 aprile, 13, 14, 15 e 16 maggio; 29 luglio, 19, 20, 21 e 22 agosto; 28 ottobre, 17, 18, 19 e 20 novembre.

Nel sito eutrofico le date sono 18 marzo, 9, 10, 11 e 12 aprile; 1 luglio, 21, 22, 23 e 24 luglio; 30 settembre, 21, 22, 23 e 24 ottobre.

### *3.3.2.3 Incubazioni al buio e alla luce di carote di sedimento nudo e vegetato*

In laboratorio ogni microcosmo è stato estruso dalla carota ed è stato rivestito da uno strato di carta di alluminio al fine di mantenere al buio il sedimento. Tutti i microcosmi sono stati quindi reintrodotti nelle carote di plexiglass trasparente (8 cm di diametro, 1 microcosmo per carota per un totale di 16 carote di controllo e 16 con piante) e posizionati e sommersi con acqua del sito in una vasca di incubazione alla temperatura *in situ* (primavera 17°C; estate 24°C; autunno 14°C). Durante la fase di pre-incubazione (12 ore) l'acqua della vasca è stata ben areata attraverso un sistema di tubi e di pompe al fine di evitare la stagnazione della stessa nelle carote e promuovere una buona ossigenazione dei sedimenti. Ciò è stato garantito anche dall'utilizzo delle barrette magnetiche teflonate all'interno delle carote, fatte ruotare ad una velocità di circa 40 rpm da un sistema di magneti guidati da un motore esterno. Come riportato nel paragrafo precedente si sono effettuate 3 incubazioni intervallate da fasi di preincubazione di 12 ore e di ricambio dell'acqua nella vasca per stimare il metabolismo bentico, i tassi di denitrificazione accoppiati alla nitrificazione ed i tassi di azotofissazione.

#### *3.3.2.3.1 Metabolismo bentico*

La metodica di incubazione è già stata riportata nel paragrafo 3.2.2.1, qui si riportano alcune differenze. I tempi iniziali sono stati prelevati all'interno della vasca (5 t0) e i tempi finali direttamente nelle 16 carote (16 tf). Le ore di incubazione sono variate in base alla stagione al

fine di ottenere concentrazioni finali di ossigeno che fossero circa il 20% del valore iniziale: 3-5 ore in primavera, 3 ore in estate, 4-5 ore in autunno. L'incubazione al buio su 4 controlli e 4 carote con pianta è stata effettuata contemporaneamente a quella alla luce, sempre su 4 controlli e 4 carote con piante, rivestendo le carote con carta di alluminio. Le incubazioni alla luce sono state eseguite usando lampade alogene riproducenti la radiazione media giornaliera del periodo di campionamento:  $\sim 600 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in primavera;  $\sim 1100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in estate;  $\sim 300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in autunno. Oltre agli scambi all'interfaccia acqua-sedimento dei gas e dei nutrienti azotati disciolti, si è misurato anche il flusso del fosforo reattivo solubile e del metano.

#### 3.3.2.3.2 Denitrificazione accoppiata alla nitrificazione

La seconda incubazione è stata realizzata sullo stesso set di carote e nelle stesse condizioni dell'esperimento precedente: 8 carote rivestite di alluminio per la simulazione del buio, 4 controlli e 4 con pianta, e 8 carote sottoposte alla radiazione luminosa, 4 controlli e 4 con pianta. La metodica utilizzata è una versione modificata dell'IPT, nella quale si assume che il nitrato che alimenta il processo di denitrificazione a diversi centimetri al di sotto della superficie del sedimento è prodotto dal processo di nitrificazione all'interno del sedimento stesso e quindi che l'ossigeno richiesto per la nitrificazione potrebbe, a questa profondità, non provenire per diffusione dalla superficie ma essere rilasciato dall'apparato radicale della macrofita. L'aggiunta di  $^{15}\text{NH}_4^+$  permetterebbe quindi di quantificare la formazione di  $^{15}\text{N}_2$  dal processo accoppiato nitrificazione-denitrificazione. Dopo avere sostituito l'acqua della vasca e averne abbassato il livello qualche centimetro al di sotto della superficie della carota sono stati estrusi uno per volta i microcosmi dalle carote ed è incominciata la fase di iniezione di  $^{15}\text{NH}_4^+$ . Attraverso una siringa di vetro è stato iniettato un volume di 250  $\mu\text{l}$  di soluzione anossica 10mM di  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (98 atom %  $^{15}\text{N}$ ) in ognuno dei 36 setti siliconati del microcosmo per un totale di 90  $\mu\text{M}$  (9 ml), facendo attenzione a prelevarla molto lentamente per evitare la formazione di bolle di gas (fig. 3.2). Ogni microcosmo è stato quindi rivestito con carta di alluminio e reintrodotta nella vasca di incubazione all'interno della carota di plexiglass. Le operazioni di recupero e di rimmersione dei microcosmi sono state compiute con delicatezza al fine di evitare la risospensione del sedimento superficiale una volta a contatto con l'acqua. Dopo circa 15 minuti dall'iniezione, è iniziata l'incubazione tappando le carote con tappi di plexiglass trasparenti a tenuta di gas in modo da avere uno sfasamento temporale tra una carota e l'altra. Anche in questo caso il tempo di incubazione è variato in base alla stagione: 7-9 ore in primavera; 4-5 ore in estate; 5-6 ore in autunno.

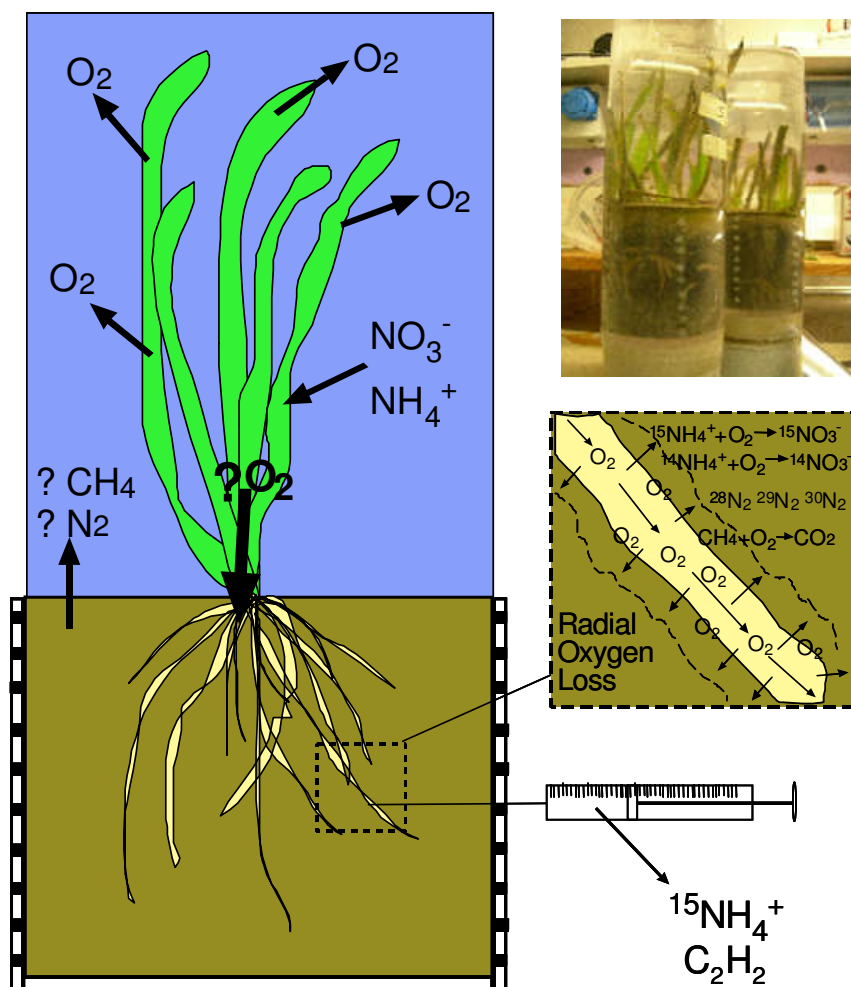


Figura 3.2 Iniezione di  $^{15}\text{NH}_4^+$  o  $\text{C}_2\text{H}_2$  in ognuno dei 36 setti siliconati.

Il termine dell'incubazione ha previsto la distruzione delle 16 carote-microcosmi mescolando acqua e sedimento per generare uno slurry. Un'aliquota dello slurry è stata trasferita in vial a tenuta di gas di 12.5 ml con l'aggiunta di 200  $\mu\text{l}$  di  $\text{ZnCl}_2$ . E' stato inoltre prelevato un campione d'acqua dalla vasca di incubazione, avvelenato anch'esso con 200  $\mu\text{l}$  di  $\text{ZnCl}_2$ , per la determinazione della composizione isotopica dell' $\text{N}_2$  *in situ*. I campioni, conservati al buio a 4°C, sono stati analizzati presso il National Environmental Research Institute, Department of Marine Ecology, Silkeborg (Danimarca), mediante gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa, per la stima della composizione isotopica dell' $\text{N}_2$  prodotto per denitrificazione.

Le carote contenenti microcosmi con 3 o 4 individui di *Vallisneria sp.* sono state filtrate su setaccio da 0.2 cm. Le foglie e le radici di ogni carota sono state quindi risciacquate con acqua del sito, seccate separatamente in stufa a 50° C fino al raggiungimento di un peso costante; successivamente sono state macinate per la determinazione del contenuto elementare del carbonio e dell'azoto e per l'analisi delle firme isotopiche dell' $^{15}\text{N}$ .

#### 3.3.2.3.3 Azotofissazione

La terza ed ultima incubazione è stata effettuata seguendo il procedimento e le stesse condizioni sperimentali della precedente; in questo caso, volendo stimare i tassi di azotofissazione, è stata iniettata acqua bidistillata e del sito satura di acetilene. In ogni microcosmo è stato iniettato un volume di 9 ml di acqua bidistillata satura di acetilene (250 µl x 36 setti) in modo da non introdurre un'altra sorgente di nitrato nelle acque interstiziali. Prima di chiudere le carote con i tappi galleggianti per iniziare l'incubazione è stata sostituita un'aliquota dell'acqua della carota con acqua del sito satura di acetilene, al fine di ottenere una saturazione dell'acqua totale all'interno della carota del 10% (80 ml per le carote da 8 cm). Come nell'incubazione precedente, alla fine dell'esperimento sono stati prelevati da ogni carota campioni di slurry per l'analisi di C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> e si sono pulite ed essiccate le piante di *V. spiralis* per la stima della biomassa per carota.

#### 3.3.2.4 *Flussi bentici dei gas e dei nutrienti*

Per i calcoli dei flussi di ossigeno, del carbonio inorganico disciolto e delle 3 forme dell'azoto inorganico disciolto e del fosforo reattivo solubile si rimanda al paragrafo 3.2.3.

#### 3.3.2.5 *Tassi di nitrificazione-denitrificazione*

I tassi di denitrificazione accoppiati alla nitrificazione sono stati ricavati da una variante della metodologia di Nielsen (1992), riportata anche nel protocollo NICE (Nitrogen Cycling in Estuaries, Dalsgaard et al., 2000), ma si basano sulle stesse assunzioni e principi di calcolo. A differenza della metodica classica che traccia il processo di denitrificazione con l'aggiunta di <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e distingue le componenti Dw e Dn (paragrafo 3.2.4), nel nostro caso l'aggiunta di <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a livello dei pori interstiziali permette di indagare solo il processo accoppiato nitrificazione-denitrificazione e quindi la componente Dn. Per la stima della produzione di <sup>29</sup>N<sub>2</sub> e <sup>30</sup>N<sub>2</sub> e dei tassi D<sub>15</sub> e D<sub>14</sub> si rimanda al paragrafo 3.2.4. Il processo accoppiato totale Dn è dato dalla somma dei tassi D<sub>15</sub> e D<sub>14</sub>:

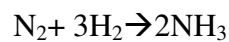
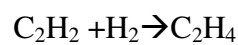
$$Dn = D_{15} + D_{14}$$

La componente Dw è stata ricavata utilizzando il modello teorico di Christensen et al. (1990) ed i parametri delle carote di sedimento in condizione di buio. Il confronto tra i Dw teorici e quelli misurati nelle carote di sedimento nudo delle zone umide perifluviali studiati in questo lavoro e in quelle del fiume Mincio (Pinardi et al., 2009) ha dimostrato che i tassi di

denitrificazione sono predittibili sulla base della domanda sedimentaria di ossigeno e del rapporto tra concentrazioni di nitrato e ossigeno nelle acque di fondo e quindi dal modello stesso.

### 3.3.2.6 Tassi di azoto-fissazione

I tassi di azoto fissazione sono stati calcolati considerando una relazione teorica di 3:1 tra le moli di  $C_2H_2$  ridotte dall'enzima nitrogenasi in etilene e quelle dell' $N_2$  ridotte dall'enzima nitrogenasi in ammoniaca. Dalle moli di etilene prodotte si è risalito alle moli di acetilene ridotte e di conseguenza dividendo per tre a quelle di  $N_2$ :



Infine conoscendo la concentrazione di  $N_2$  ridotta e il tempo di incubazione, l'area del sedimento e il volume della colonna d'acqua della carota studiata si risale ai tassi di azoto fissazione dall'equazione di calcolo dei flussi del paragrafo 3.2.3.

### 3.3.2.7 Analisi in laboratorio: caratterizzazione delle acque, dei sedimenti e di *V. spiralis*

Le metodiche analitiche utilizzate sono state illustrate in parte nei paragrafi 3.2.5 e 3.3.1.2. Di seguito sono solamente riportate quelle aggiunte in questo esperimento:

- Ammoniaca scambiabile. Estrazione dell'ammoniaca scambiabile con potassio cloruro  $10\mu M$ , spettrofotometria di assorbimento molecolare, visibile a 690 nm (APHA, 1981).
- Anidride carbonica. Gas-cromatografia con il rilevatore TCD (thermal conductivity detector) (ThermoFinnigan, Trace GC).
- Biomassa macrofita. Peso secco della biomassa presente in ogni carota-microcosmo (essiccamento in stufa a  $50^\circ C$ ) rapportato alla superficie della carota stessa ( $g$  peso secco  $m^{-2}$ ).

### 3.3.2.8 *Analisi statistica*

Il disegno sperimentale è stato costruito al fine di testare 4 fattori: differenze tra i due siti, differenze tra la presenza e l'assenza di *V.spiralis*, differenze tra le tre stagioni e differenze tra condizioni di luce e di buio. È stata quindi applicata con il pacchetto statistico R (R Development Core Team, 2005) un'ANOVA a quattro vie per quanto riguarda i tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione ed i nutrienti, mentre un'ANOVA a tre vie è stata utilizzata per testare le differenze sui fattori sito, stagione e presenza/assenza della pianta per i flussi dell'ossigeno e del carbonio inorganico disciolto: testare il fattore luce/buio risulta inutile data l'importanza del processo fotosintetico della macrofita e del microfitobenthos. È stata inoltre stimata, sia per i flussi dell'ossigeno che per quelli del carbonio inorganico disciolto, la produzione e la respirazione della pianta al netto della produzione e della respirazione del sedimento nudo e normalizzata per la biomassa totale. Su tali tassi è stata applicata un'ANOVA a due vie per testare le differenze tra siti e tra stagioni. L'influenza della biomassa sul processo fotosintetico e quindi sui flussi di ossigeno e carbonio inorganico disciolto è stata testata applicando un'ANOVA alla regressione lineare tra flussi, biomassa e irradianza. Le differenze tra i due siti per i parametri fisici e chimici in situ sono state testate con il test T di Student.

## **4 BILANCIO DI MASSA DELL'AZOTO A LIVELLO DI BACINO**

### **4.1 Risultati**

#### ***4.1.1 Incidenza delle pratiche agro-zootecniche sul territorio***

A livello di bacino le superfici adibite a pratiche agricole costituiscono in media oltre il 60%, con valori superiori all'80% nei comuni di pianura, il che evidenzia l'incidenza del settore agricolo in termini di presidio sul territorio, e con valori minimi nelle aree montano-collinari e nella zona della città di Brescia a causa dell'alta densità abitativa (circa 2130 abitanti km<sup>-2</sup>). I comuni della zona montano-collinare presentano quote anche oltre il 90% della SAU destinate a prati permanenti e pascoli, con i seminativi che ricoprono un ruolo secondario, mentre le frazioni si invertono nelle aree di pianura.

Il carico zootecnico di un'unità territoriale, definibile come il rapporto tra la consistenza del patrimonio zootecnico, espressa in termini di peso vivo (t) e la SAU, fornisce una prima indicazione dei potenziali apporti azotati connessi alle pratiche di spandimento dei reflui. Il regolamento attuativo della Legge Regionale n°37/1993 (BU Regione Lombardia n°40/1996) stabilisce la classificazione in comuni ad alto o basso carico zootecnico, fissando la soglia di 1,5 t di peso vivo per ettaro. Nel bacino dell'Oglio sublacuale circa il 30% dei comuni risultano classificabili ad alto carico zootecnico, con i valori più elevati nel territorio bresciano compreso tra i tributari Mella e Chiese (Isorella 4,03 t p.v. ha<sup>-1</sup>, Calvisano e Visano 3,40 t p.v. ha<sup>-1</sup>), mentre a livello di intero bacino la media si attesta ad oltre 1,47 t p.v. ha<sup>-1</sup>.

#### ***4.1.2 Voci di input e di output: carichi diffusi***

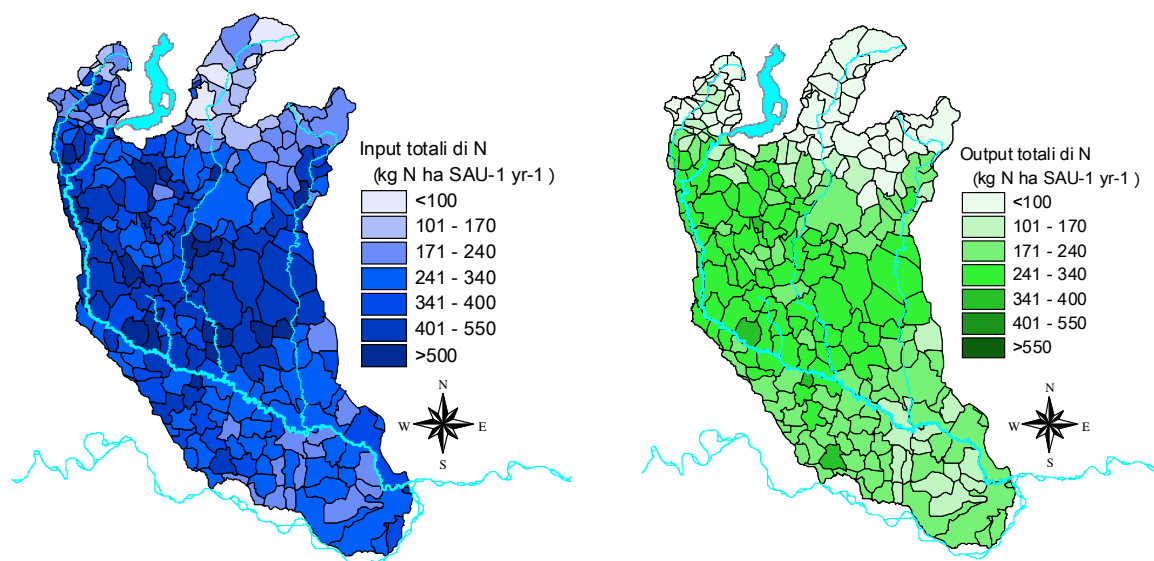
L'input totale di azoto prodotto nel bacino del fiume Oglio sublacuale ammonta a 84.055±1.078 t N yr<sup>-1</sup>. Annualmente il comparto zootecnico è il maggior responsabile degli input totali con 42.521±752 t, di cui le quote maggiori sono imputabili all'allevamento bovino (55%) e suino (30%). L'input di azoto dal comparto zootecnico rispetto alla superficie agricola varia tra 1 e 519 kg N ha SAU<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> secondo la distribuzione spaziale delle aziende

agricole e complessivamente il tasso medio è di  $187 \text{ kg N ha SAU}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ . La distribuzione su base comunale del carico risulta pressoché analoga a quella del patrimonio allevato, con i valori maggiori registrati nel territorio bresciano compreso tra gli affluenti Mella e Chiese (Montichiari  $1.600 \text{ t N yr}^{-1}$ , Calvisano  $1.450 \text{ t N yr}^{-1}$  e Leno  $1.400 \text{ t N yr}^{-1}$ ) e nel tratto nord del corso dell'Oglio sublacuale al confine tra le province di Brescia e Cremona (Orzinuovi  $1.184 \text{ t N yr}^{-1}$ ). Queste zone risultano anche quelle caratterizzate dai carichi azotati maggiori derivanti da fertilizzazioni chimiche, a conferma che l'elevata vocazione zootecnica consegue la richiesta di produzioni agricole destinate all'alimentazione del bestiame. A livello di intero bacino l'input annuale connesso alle concimazioni chimiche ammonta a  $27.640 \pm 749 \text{ t N}$ . L'input di azoto derivante dai concimi chimici rispetto alla superficie agricola presenta un intervallo tra 1 e  $229 \text{ kg N ha SAU}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  -tasso medio di input di  $121 \text{ kg N ha SAU}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ -secondo le richieste di azoto delle colture prevalenti.

Un ruolo secondario negli input di azoto è giocato dalla fissazione biologica da parte di seminativi e pascoli con un apporto di  $7.975 \pm 149 \text{ t N yr}^{-1}$  a livello dell'intero bacino, di cui oltre il 41% attribuibile all'erba medica, data la prevalenza in termini di estensioni coltivate rispetto alle altre colture azoto-fissatrici, nonché al tasso maggiore di fissazione.

Marginali rispetto al carico agro-zootecnico risultano infine gli altri due input calcolati: gli apporti di azoto derivanti dalle deposizioni atmosferiche ( $1.845 \pm 58 \text{ t N yr}^{-1}$ ) e dalle acque di irrigazione ( $4.074 \pm 105 \text{ t N yr}^{-1}$ ).

L'input totale di azoto rispetto alla superficie agricola nei comuni del bacino risulta tra 54 e  $749 \text{ kg N ha SAU}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  e in generale il valore medio è di  $369 \text{ kg N ha SAU}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  (fig. 4.1).



**Figura 4.1 Input totali ed output totali di azoto a livello comunale nel bacino del fiume Oglio sublacuale, espressi in chilogrammi di azoto per ettaro all'anno.**

L'output totale di azoto dalla superficie agricola ammonta a  $51.422 \pm 968$  t N yr<sup>-1</sup> di cui l'asportazione annuale di azoto imputabile all'uptake delle colture rappresenta il maggiore sink  $34.259 \pm 594$  t N yr<sup>-1</sup> (67% del totale), con il mais che contribuisce ad oltre il 58% all'asportazione totale, in quanto coltivazione dominante in termini di estensione, nonché particolarmente esigente in quanto ad azoto nel terreno.

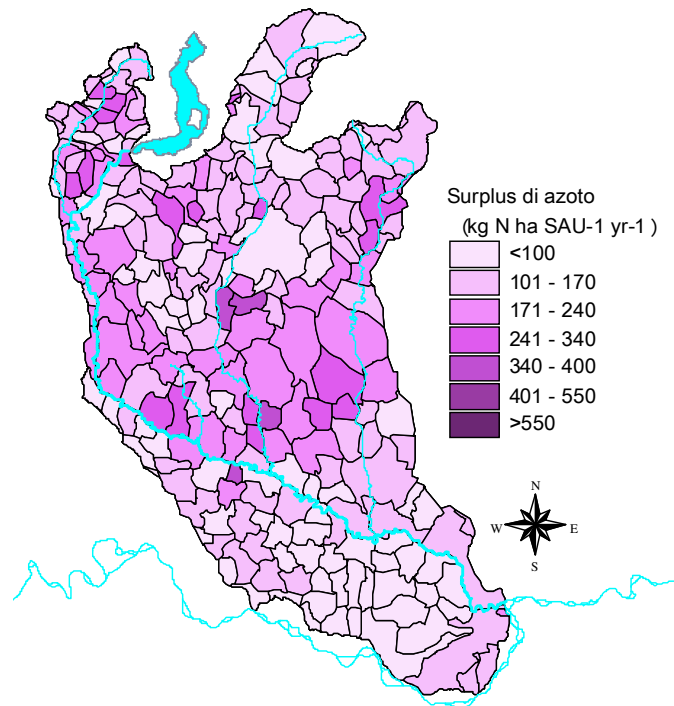
Gli altri output azotati, calcolati sulla base di dati tratti dalla letteratura, ammontano a  $10.147 \pm 713$  e  $7.016 \pm 273$  t N yr<sup>-1</sup> rispettivamente per la volatilizzazione di ammoniaca e la denitrificazione.

L'output totale di azoto rispetto alla superficie agricola nei comuni del bacino risulta tra 3 e 394 kg N ha SAU<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> e in generale il valore medio è di 226 kg N ha SAU<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> (fig. 4.1).

In tabella 4.1 sono riassunti i valori dei singoli termini del bilancio dell'azoto condotto a livello del suolo agrario dell'intero bacino dell'Oglio sublacuale. Il bilancio dell'azoto negli agro-ecosistemi del bacino del fiume Oglio sublacuale è positivo, con gli input che eccedono le asportazioni di oltre  $32.633 \pm 1.449$  t N yr<sup>-1</sup>, e risulta in un surplus medio rispetto alla SAU di circa 143 kg N ha SAU<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>. Tutti i comuni mostrano una condizione di surplus di azoto, ma gli andamenti degli input e degli output variano spazialmente all'interno del bacino (fig. 4.2).

**Tabella 4.1 Bilancio dell'azoto a livello del suolo agrario nel bacino dell'Oglio sublacuale (t N yr<sup>-1</sup>).**

<b>Termine del bilancio</b>	<b>t N yr<sup>-1</sup></b>
<b>INPUT</b>	
Spandimento di effluenti zootecnici	42.521±752
Fertilizzazioni	27.640±749
Fissazione biologica	7.975±149
Irrigazione	4.074±105
Deposizioni atmosferiche	1.845±58
<b>Σ input</b>	<b>84.055±1.078</b>
<b>OUTPUT</b>	
Asportazione delle colture	34.259±594
Volatilizzazione ammoniaca	10.147±713
Denitrificazione	7.016±273
<b>Σ output</b>	<b>51.422±968</b>
<b>Bilancio</b>	<b>32.633±1.449</b>

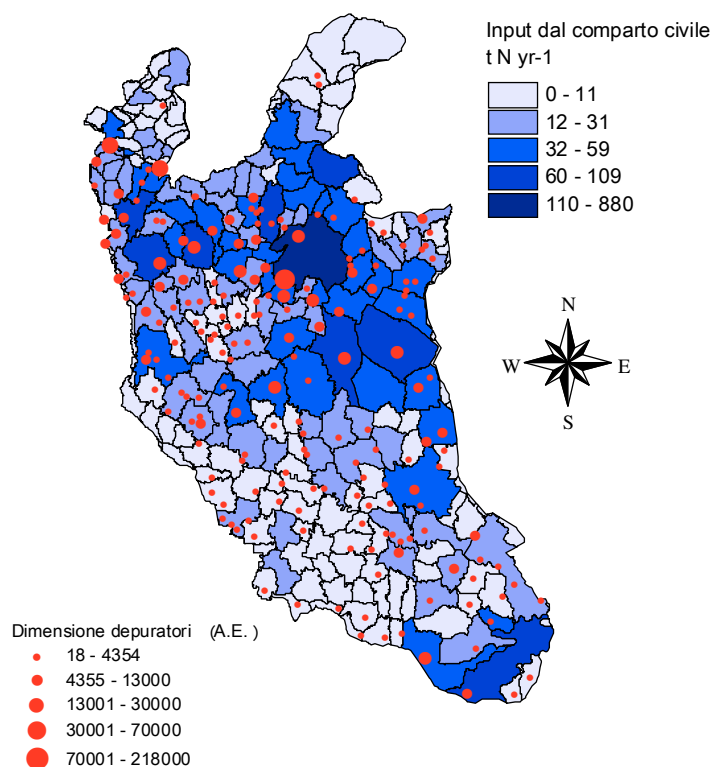


**Figura 4.2 Bilancio dell'azoto (surplus) a livello comunale nel bacino del fiume Oglio sublacuale, espresso in chilogrammi di azoto per ettaro all'anno.**

#### ***4.1.3 Carichi puntiformi***

Il carico generato dal comparto civile nel bacino dell'Oglio sublacuale ammonta a circa  $5.245 \pm 39$  t N yr<sup>-1</sup>, di cui il 97% imputabile alla popolazione residente e per la frazione rimanente a quella fluttuante, concentrata prevalentemente nella zona presso il Lago d'Iseo, data la sua vocazione turistica. Il carico azotato calcolato è quello effettivamente prodotto dal comparto civile, ovvero quello conferito al sistema degli impianti di trattamento dei reflui civili, senza considerare gli abbattimenti imputabili ai processi di depurazione.

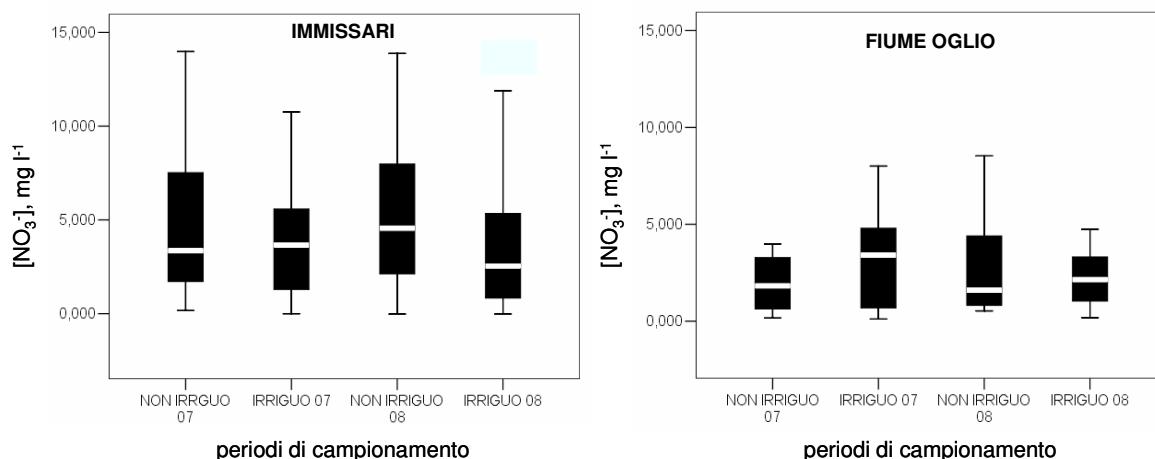
Data la formula di calcolo, la produzione azotata di ciascun comune risulta proporzionale alla consistenza della popolazione. Contributo predominante è quello della città di Brescia che, con oltre 192.000 abitanti, genera un carico di circa 880 t N yr<sup>-1</sup>, rappresentando il 17% del carico totale nell'intero bacino (fig. 4.3).



**Figura 4.3 Contributi dei singoli comuni al carico di azoto di origine civile (t N yr<sup>-1</sup>) e localizzazione dei depuratori esistenti al 2003, suddivisi per classi dimensionali di A.E. (PTUA, 2006).**

#### ***4.1.4 Carichi transitanti in fiume e nei principali immissari***

I campionamenti effettuati nel biennio 2007-2008 hanno evidenziato che le concentrazioni dell'azoto totale (TN) risultano relativamente variabili nelle stazioni fluviali nei diversi periodi di campionamento, sebbene sia sempre evidente una tendenza generale all'aumento da monte a valle. Le concentrazioni degli immissari, pur estremamente eterogenee tra siti e tra date di prelievo, sono generalmente maggiori di quelle rilevate nelle stazioni fluviali. L'analisi della speciazione dell'azoto sottolinea l'importanza della forma nitrica nel determinare le concentrazioni di TN, indipendentemente dal periodo di campionamento: sia nel fiume che negli immissari lo ione nitrato costituisce infatti la forma prevalente dell'azoto totale, che per oltre il 90% è presente in fase disciolta (fig. 4.4).



**Figura 4.4** Box-plot rappresentanti le concentrazioni di nitrato nel fiume Oglio sublacuale e negli immissari relative al biennio 2007-2008.

L'export annuale dal bacino mediante trasporto fluviale è stato stimato in circa 9.200 t. Nel periodo non irriguo l'export giornaliero di azoto totale (TN) dal lago d'Iseo ammonta a circa 2,3 t: il carico tende quindi ad aumentare in modo costante verso valle raggiungendo un valore tra 50 e 70 t d<sup>-1</sup> alla confluenza in Po. I carichi relativi agli ingressi si presentano solitamente anche di due ordini di grandezza inferiori rispetto a quelli fluviali, con alcune eccezioni rappresentate dagli immissari di grandi dimensioni, Strone (6,5 t d<sup>-1</sup>), Mella (11 t d<sup>-1</sup>) e Chiese (4,2 t d<sup>-1</sup>). Nel periodo estivo invece già le stazioni dei primi 30 km dalla diga di Sarnico registrano il transito di carichi elevati di azoto totale (fino a 13 t d<sup>-1</sup>), sostenuti principalmente dalle notevoli portate rilasciate dal lago per far fronte alle richieste irrigue del settore agricolo; l'export in Po ammonta a circa 17 t d<sup>-1</sup>.

Dai dati dell'ultima stazione ARPA presso Marcara, l'export di azoto totale dal bacino è risultato di 16.045±1691 t N yr<sup>-1</sup>, con oltre l'87% in forma di NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

## 4.2 Discussione

### 4.2.1 Bilancio dell'azoto nel bacino dell'Oglio sublacuale ed il confronto tra carichi diffusi e puntiformi

La disponibilità teorica di azoto a livello del suolo agrario drenato dal fiume Oglio sublacuale risulta ampiamente in eccesso rispetto alla domanda teorica delle colture, da cui deriva un surplus di 32.633±1.449 t N yr<sup>-1</sup>. Il surplus areale medio a livello di bacino risulta di 190 kg N ha SAU<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>, con picchi fino a circa 400 kg N ha SAU<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>, indice di una situazione di

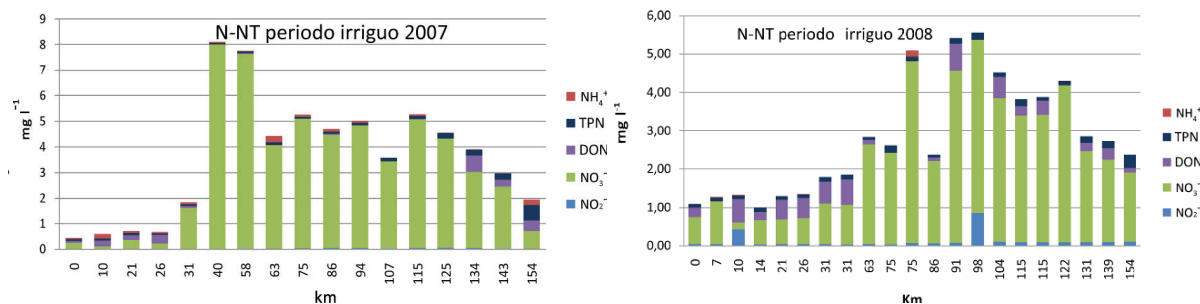
grave sbilanciamento tra generazione e asportazione (fig. 4.2). La condizione critica che contraddistingue il bacino esaminato è stata evidenziata anche dal calcolo di una misura di efficienza del sistema agro-zootecnico in termini di utilizzo dell'azoto (NUE, Nitrogen Use Efficiency), ottenuta rapportando la quota asportata mediante i raccolti all'input complessivo verso le terre coltivate (Liu et al., 2008). A livello di intero bacino risulta un valore medio pari al 37%, indicando una scarsa efficienza e una condizione di estrema vulnerabilità degli ecosistemi acquatici confinanti a causa dell'alta probabilità di percolazione e dilavamento di composti azotati. Quindi, anche se il surplus stesso di azoto non potrebbe essere utilizzato per stimare in modo diretto l'impatto del sistema agrozootecnico sull'ambiente, esso è un buon indicatore dei rischi di inquinamento da azoto degli ecosistemi acquatici (Schröder et al., 2004).

L'analisi condotta con dettaglio comunale evidenzia che oltre il 75% dei comuni presenta un surplus superiore a  $100 \text{ kg N ha SAU}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ , valore generalmente assunto quale limite per il rischio di dilavamento di nitrati in acque superficiali e di falda (Parris, 1998).

Il confronto tra la disponibilità media di azoto a livello di bacino ed i valori limite di concime naturale (reflui zootecnici) applicabile alle zone vulnerabili e non vulnerabili (rispettivamente  $340$  e  $170 \text{ kg N ha SAU}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ) stabiliti dalla Direttiva Nitrati ha messo in luce in quale situazione critica si trovi il bacino del fiume Oglio sublacuale.

La zona di maggiore preoccupazione risulta essere la porzione centrale del bacino dove si concentrano i comuni aventi surplus di oltre  $300 \text{ kg N ha SAU}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ . Questa area è compresa nei sottobacini degli affluenti Mella e Chiese, la cui somma dei carichi azotati prodotti rappresenta quasi la metà di quello generato nell'intero bacino dell'Oglio sublacuale. Queste zone sono caratterizzate dalla più alta disponibilità di azoto derivante sia dall'applicazione di effluenti zootecnici che di fertilizzanti sintetici.

I risultati delle campagne sperimentali condotte nel biennio 2007-2008 evidenziano una buona corrispondenza tra le realtà più critiche in termini di surplus azotato e i tratti dell'Oglio sublacuale contraddistinti dai tenori maggiori di azoto nelle acque. Le stazioni tra l'immissione del Chiese e del Mella (fig. 4.5, stazioni km 75 - km 115) hanno infatti rivelato incrementi significativi dell'azoto totale non riconducibili unicamente all'immissione di scarichi puntiformi, quindi presumibilmente imputabili al carico diffuso, come conferma anche l'importanza relativa maggiore del nitrato sulle altre specie azotate, in quanto forma principale con cui l'azoto viene dilavato dalle superfici agricole e conferito agli ecosistemi acquatici confinanti.



**Figura 4.5 Andamento monte-valle delle concentrazioni di azoto totale nel fiume Oglio sublacuale (periodo irriguo, 2007 e 2008) (TPN = azoto totale particellato, DON = azoto organico disciolto,  $\text{NO}_3^-$  = azoto nitrico,  $\text{NO}_2^-$  = azoto nitroso,  $\text{NH}_4^+$  = azoto ammoniacale).**

Il confronto tra carico diffuso e carico puntiforme evidenzia come quest'ultimo risulti pressoché trascurabile, rappresentando circa il 5% del primo, comparabile in termini di entità solo con i contributi ritenuti secondari nel bilancio. Il ruolo marginale degli apporti puntiformi nella generazione dei carichi azotati transitori in Oglio risulta evidente ipotizzando un abbattimento medio dell'azoto del 70-80% (Dlvo n°152/2006, Allegato 5 alla Parte III, Tabella 2 "Limite di emissione degli impianti di trattamento di acque reflue urbane") attuato presso gli impianti di depurazione. È stato stimato però che circa il 10% del carico prodotto dal settore civile possa giungere tal quale al reticolo idrografico superficiale, alla luce di un rapporto di 0.9 tra abitanti collettati e popolazione totale. Sebbene i carichi azotati generati dal comparto civile risultino circa 20 volte inferiori a quelli prodotti dal comparto agrozootecnico, a differenza di questi, sono direttamente sversati negli ecosistemi acquatici e determinano apporti localizzati di composti eutrofizzanti; l'impatto della loro immissione nel reticolo idrografico (direttamente in Oglio o in canali che poi confluiscono in fiume) risulta più rilevante nella parte alta del corso dell'Oglio sublacuale, in relazione alla distribuzione spaziale degli impianti di depurazione nel bacino, che evidenzia come in questa zona si collochino i depuratori di maggiore portata (es. Paratico 70.000 A.E. che scarica in Oglio, Brescia 218.000 A.E. che scarica nel Mella).

#### **4.2.2 Qual è il destino del surplus azotato?**

L'analisi dell'export di azoto dai sistemi fluviali rappresenta un punto chiave al fine di stimare il contributo relativo dei processi di trasformazione dell'azoto rispetto all'eccesso di questo elemento, ovvero per valutare la capacità di metabolizzazione da parte del sistema.

Bilanci di massa, effettuati su risoluzione spaziale elevata e sulla base di serie storiche di dati, hanno stimato che oltre il 75% del carico di azoto generato all'interno dei bacini fluviali non è esportato dal fiume stesso (Seitzinger et al., 2006; Boyer et al., 2006; Schlesinger, 2009). Anche in questo studio, gli output totali dal suolo agrario sono stati circa il 60% degli input totali ed oltre un terzo degli input di origine antropica sembrano essersi persi durante il trasporto verso la chiusura del bacino.

L'export annuale di azoto del bacino del fiume Oglio sublacuale (16.045 t) risulta pari al 20% del carico generato nel bacino, valore ricadente all'interno dell'intervallo riportato in studi relativi a bacini americani, dove il trasporto fluviale rappresenta una quota tra il 10 e il 40% degli input azotati (Boyer et al., 2006). La grande variabilità nella percentuale di input esportati dai fiumi riflette la complessità e l'interconnettività dei fattori responsabili della ritenzione dell'azoto. Risulta comunque difficile il confronto con altri studi a causa delle differenze nelle metodologie utilizzate per stimare i bilanci e nella definizione dei sistemi confinanti.

Considerando l'export fluviale come un termine di output del bilancio, esso diminuisce il surplus di circa il 50% e indica che circa 16.588 t N yr<sup>-1</sup> sono potenzialmente soggette a processi di ritenzione e di trasformazione, suggerendo la presenza di importanti sink dell'azoto all'interno del sistema bacino, sebbene appaia difficile stabilirne con precisione il contributo relativo data la complessità dei processi biogeochimici che coinvolgono l'azoto.

I possibili processi di ritenzione di questa aliquota di azoto, definita "missing N" da van Breemen et al. (2002), sono l'accumulo nel sistema suolo e nella vegetazione, la percolazione nella falda superficiale, la sedimentazione e la denitrificazione negli ecosistemi acquatici. L'importanza del processo di denitrificazione nel controllare e rimuovere i carichi azotati a diverse risoluzioni spaziali (piccolo ecosistema, paesaggio, regione e mondo) è riconosciuta a livello mondiale dalla comunità scientifica (Seitzinger et al., 2006). Per questo motivo attraverso dati sperimentali inerenti agli ecosistemi acquatici del bacino del fiume Oglio sublacuale raccolti durante questi tre anni di ricerca ho cercato di quantificare il contributo all'abbattimento del surplus azotato del processo di denitrificazione in diversi comparti acquatici ed all'interfaccia suolo agrario-fiume (zone umide, reticolo idrografico, suolo, falda superficiale, etc.).

Nel 2007 sono state condotte in oltre 20 ambienti perifluviali dell'Oglio sublacuale misure sperimentali di tassi di denitrificazione (Racchetti et al., sottomesso a Biogeochemistry; capitolo 5 di questo lavoro di tesi), tramite incubazioni di carote intatte di sedimento secondo metodiche standard (Nielsen, 1992; Dalsgaard et al., 2000). Lo studio ha evidenziato come le

zone umide collegate idraulicamente al fiume possano rimuovere mediamente  $400 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  (range  $150\div 1260 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ), quantità pari a circa il doppio di quella generalmente impiegata per la fertilizzazione del mais, una tra le colture più azoto-esigenti. Tra gli ecosistemi d'acqua dolce e marini, le zone umide sono state infatti ampiamente riconosciute come “hot spot” per la denitrificazione, in quanto caratterizzate da accumulo di sostanza organica e ipossia-anossia dei sedimenti e delle acque (Saunders & Kalff, 2001; McClain et al., 2003). Il contributo di questi ecosistemi alla rimozione dei carichi azotati nel bacino dell'Oglio risulta però ridotto, dato il rapporto altamente sbilanciato tra le superfici coltivate (~ 230.000 ha) e quelle degli ambienti umidi naturali (~ 200 ha). La letteratura scientifica di settore indica come l'entità dei carichi esportati dai bacini risulti relazionata all'area interna occupata da ambienti umidi, i quali contribuiscono all'aumento del tempo di ritenzione e promuovono processi di rimozione (Alvarez-Cobelas et al., 2008). Solo nel caso in cui questi ambienti coprano almeno il 10% dell'area del bacino, il miglioramento della qualità idrochimica appare però evidente (Verhoeven et al., 2006). Supponendo che tutte le zone umide nel bacino dell'Oglio presentino tassi di denitrificazione prossimi al dato medio misurato, la loro rimozione teorica annuale ammonterebbe a circa 83 t N, valore di ben tre ordini di grandezza inferiore al surplus annuale del bacino. Più realisticamente però l'abbattimento imputabile a questi ambienti risulta minore, data la condizione di frammentazione e isolamento idraulico in cui si trovano molte di esse. La forte contrazione della superficie e la pensilità di molti degli ambienti perfluviali relitti si traduce infatti in quote irrilevanti di azoto perso per denitrificazione, nonostante le evidenze sperimentali abbiano indicato per questi ambienti tassi areali tra i maggiori riportati in letteratura (Pina-Ochoa & Alvarez-Cobelas, 2006).

Il fiume Oglio scorre quasi interamente entro argini artificiali e i movimenti e le interazioni con la piana laterale risultano fortemente limitate. Le aree potenzialmente esondabili sono stimabili in circa 3.200 ha (shape-file ERSAF Regione Lombardia, 2000. Basi informative ambientali della pianura ERSAF, 2000), ovvero meno dell'1% dell'intera superficie del bacino e il loro contributo all'abbattimento dei carichi azotati appare ridotto, data anche la connessione idraulica non permanente.

Misure dirette di tassi di denitrificazione in Oglio non sono ad oggi disponibili, ma il ruolo degli ecosistemi lotici quali sink di azoto è ampiamente documentato in letteratura (Pina-Ochoa & Alvarez-Cobelas, 2006). Un contributo rilevante in termini di rimozione potrebbe essere imputabile al reticolo idrografico secondario (canali di irrigazione e bonifica) e alle connesse fasce tampone, in considerazione della notevole estensione lineare (oltre 12.500 km,

densità media di circa 5,5 km/km<sup>2</sup> SAU). Sulla base di dati idrochimici (serie storiche ARPA 2000-2008, monitoraggi condotti nell'ambito del progetto STRA.RI.FLU. Oglio) e applicando un modello di letteratura per la stima del potenziale di denitrificazione (Christensen et al., 1990), sono stati calcolati tassi medi fino a 2.000  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  e una rimozione teorica nell'intero bacino di oltre 5.500 t N durante il periodo in cui il reticolo è attivo per l'irrigazione (maggio-settembre). Sebbene questa stima possa essere accompagnata da un forte grado di incertezza, data l'estrema variabilità associata ai tassi di abbattimento dell'azoto negli ecosistemi lotici, rende conto del destino di una quota importante del surplus azotato a livello di bacino. Piccoli fiumi e canali risultano infatti più efficienti nel processamento e nella ritenzione dell'azoto rispetto ad ambienti di maggiori dimensioni: le ridotte profondità determinano rapporti tra area del letto fluviale e volume della massa d'acqua sovrastante particolarmente elevati, quindi una stretta connessione tra comparto sedimentario e acquatico (Alexander et al., 2000; Mulholland et al., 2008). All'interno del bacino dell'Oglio oltre il 95% della lunghezza totale del reticolo idrografico è costituita da corsi d'acqua di basso ordine.

L'impiego di fasce boscate interposte tra terreni coltivati e corpi d'acqua risulta ormai consolidato quale strumento per la protezione della qualità idrochimica. Numerose ricerche hanno investigato l'efficienza nella rimozione dell'azoto, ottenendo valori medi di abbattimento fino al 70-95%, supportato principalmente da denitrificazione nel caso di suoli organici e saturi in acqua di climi temperati (Martin et al., 1999; Sabater et al., 2003). I tassi di denitrificazione risultano estremamente variabili, in relazione a parametri idrologici, geomorfologici e biologici, ma raggiungono anche 1600 kg N ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> (Mander et al., 1997). Nonostante il paesaggio del bacino dell'Oglio appaia abbastanza monotono, fasce vegetate sono ancora presenti, sebbene in condizione di estrema frammentazione. Dati di uso del suolo hanno permesso di stimare una lunghezza lineare di oltre 9.500 km tra siepi e filari adiacenti al reticolo idrografico secondario (DUSAF-Destinazione d'Uso dei Suoli Agricoli e Forestali, Regione Lombardia, 2007). Supponendo i tassi maggiori di denitrificazione ritrovabili in letteratura e una larghezza media di 1,5 m, queste aree risulterebbero potenzialmente in grado di rimuovere fino a 2.300 t N l'anno. Questa analisi, seppur accompagnata da un ampio margine di incertezza, evidenzia come le perdite per denitrificazione nelle acque superficiali (sistemi acquatici permanenti, zone umide perfluviali e reticolo idrografico secondario) possano spiegare una quota importante del surplus azotato. Anche altre porzioni di bacino possono però contribuire alla ritenzione-rimozione di azoto.

Sebbene la denitrificazione nei suoli agricoli sia già stata considerata tra i termini del bilancio, il calcolo è stato effettuato impiegando range di perdite medie dell'azoto apportato mediante le pratiche di fertilizzazione tratte dalla letteratura. È possibile che nei suoli del bacino le perdite siano però maggiori dati gli elevati tenore di azoto e carbonio organico. Fertilizzazioni azotate frequenti eccedenti le necessità delle colture risultano nell'accumulo di un pool di azoto organico mineralizzabile nel suolo avente un tempo di turnover superiore all'anno (Grimvall et al., 2000). La stima del quantitativo di azoto potenzialmente conservato nel sistema suolo del bacino dell'Oglio sublacuale, condotta sulla base dei contenuti di azoto dei residui vegetali non asportati dalle terre coltivate, ammonta ad oltre 7.000 t N (Herridge et al., 2008). Essendo le zone maggiormente critiche del bacino in termini di surplus azotato coincidenti con molte delle aree definite "vulnerabili da nitrati di provenienza agro-zootecnica" secondo la Carta regionale della Vulnerabilità (Regione Lombardia, 2006), è ipotizzabile che una quota rilevante del nitrato dilavato dalle terre coltivate possa giungere nelle falde superficiali. Studi a livello internazionale hanno evidenziato come la denitrificazione possa rappresentare un importante pathway di rimozione dell'azoto in acquiferi sovrastati da terreni agrari (Singleton et al., 2007). Questo sink presenta potenzialmente una capacità notevole dati i lunghi tempi di ricambio, ma è ancora poco conosciuto. Risultati preliminari di campionamenti di risorgive e fontanili nel bacino dell'Oglio hanno evidenziato tenori di nitrato anche  $> 10 \text{ mg l}^{-1}$  e concentrazioni di  $\text{N}_2\text{O}$  di gran lunga superiori alla saturazione (tra 1.000 e 10.000%). La produzione di  $\text{N}_2\text{O}$  negli ecosistemi d'acqua dolce deriva prevalentemente dal processo di denitrificazione ed in modo stechiometrico dalla produzione di  $\text{N}_2$ , con un rapporto  $\text{N}_2\text{O}:\text{N}_2$  generalmente compreso tra 0.1 e 0.5% (Seitzinger, 1988). Il contenuto di  $\text{N}_2\text{O}$  risulta un proxy dell'attività denitrificante: le concentrazioni elevate riscontrate nei fontanili lasciano supporre che la denitrificazione nelle acque sotterranee possa contribuire in termini rilevanti all'abbattimento dei carichi, sebbene rimanga ad oggi di difficile quantificazione. Il riciclo dell'azoto dalle acque profonde (fontanili, risorgive) verso il reticolo secondario appare inoltre un loop potenzialmente importante. Questi ecosistemi sono infatti in grado di rifornire idraulicamente il reticolo minore anche durante la stagione non irrigua quando altrimenti risulterebbe inattivo, supportando la rimozione dell'azoto durante l'intero anno, vista anche la temperatura pressoché costante dell'acqua in uscita.

### 4.3 Conclusione

La presente ricerca ha evidenziato l'importanza dell'approccio del bilancio di massa per la valutazione della sostenibilità di un sistema antropico e la buona corrispondenza tra considerazioni teoriche ed evidenze sperimentali, nonostante il margine di incertezza associato alle stime. L'analisi condotta con dettaglio comunale indica un'estrema eterogeneità delle situazioni sul territorio, il che sottolinea l'importanza di interventi di riqualificazione sito-specifici. La riqualificazione fluviale non può però essere svincolata dalla riqualificazione del bacino scolante e dovrebbe prevedere innanzitutto interventi atti a ridurre a monte i quantitativi di azoto che giungono in ambito fluviale, nonché azioni di ripristino delle funzioni ecologiche proprie delle aree marginali e del reticolo secondario. Considerato lo sviluppo lineare di quest'ultimo nelle aree di pianura, risulta evidente che una gestione pianificata di superfici così vaste potrebbe garantire un contributo chiave nel controllo dell'export di azoto.

Sebbene la metodologia del bilancio di massa sia ampiamente applicata in letteratura, solo pochi studi hanno previsto una stima degli errori (McKee & Eyre, 2000). Nonostante il bilancio di massa qui presentato tenda a colmare questa lacuna, ad ogni voce del bilancio ne è stato infatti calcolato l'errore, talvolta non è stato possibile utilizzare database ad alta risoluzione spaziale e coefficienti sito-specifici del bacino del fiume Oglio. Di conseguenza occorre considerare con la dovuta cautela le stime presentate, in quanto accompagnate da margini di errore dovuti sia alla metodica (affidabilità dei database iniziali, assunzioni metodologiche, applicabilità di valori da letteratura, etc.), sia alla complessità dei processi biogeochimici che coinvolgono l'azoto negli ecosistemi terrestri ed acquatici.

Rimangono indispensabili, per future implementazioni di questa indagine, monitoraggi stagionali delle variabili ambientali (quantità e qualità idrochimica dei deflussi fluviali, delle acque di falda e delle precipitazioni) e misure *in situ* di attività microbiche chiave, quali denitrificazione e azoto-fissazione nei terreni agricoli, indispensabili per chiarire le dinamiche dell'azoto nel bacino ed individuare la destinazione ultima del surplus azotato, il che rappresenta un presupposto fondamentale alla realizzazione di azioni efficaci sul territorio mirate al contenimento dell'inquinamento diffuso.

## ***5 DENITRIFICAZIONE NELLE ZONE UMIDE PERIFLUVIALI DELLA PIANURA PADANA***

### **5.1 Risultati**

#### ***5.1.1 Caratteristiche generali della colonna d'acqua e del sedimento superficiale***

In concomitanza alla stima dei tassi di denitrificazione e dei flussi dei gas e dei nutrienti sono state misurate le caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua e dei sedimenti (tab. 5.1 e 5.2). Le campagne di campionamento sono state effettuate in inverno ed in estate e per queste stagioni è stato misurato un valore di temperatura dell'acqua, espresso come mediana, di circa 10°C (intervallo tra 5 e 13°C) e 25°C (intervallo tra 22 e 27 °C). In entrambe le stagioni il pH della colonna d'acqua è risultato alcalino con un intervallo tra 7.21 e 8.57. Le concentrazioni del carbonio inorganico disciolto (DIC) sono variate tra 1.90 e 7.07 mM in inverno e tra 2.07 e 6.63 mM in estate; nessuna differenza significativa è stata trovata tra stagioni e tra siti connessi ed isolati. La saturazione della CO<sub>2</sub> disciolta, calcolata dai dati di temperatura, pH e DIC, ha mostrato una generale sovra saturazione in colonna d'acqua con differenze significative tra il periodo invernale e quello estivo (rispettivamente, mediana 217% e intervallo tra 147 e 464% e mediana 581% e intervallo tra 155 e 4137%; P<0.001, test T di Wilcoxon). In particolare, per la stagione estiva, valori più alti di saturazione sono risultati nei siti isolati rispetto a quelli connessi (P<0.05, test U di Mann-Whitney).

**Tabella 5.1 Variabili idrochimiche misurate in campioni d'acqua raccolti in inverno ed in estate 2007 da 22 siti di campionamento; nella seconda colonna C ed I indicano le zone umide connesse e quelle isolate. Tutti i campioni sono stati raccolti vicino al sedimento superficiale.**

Siti	Connessione idrologica	PH		[DIC], (mM)		CO <sub>2</sub> sat (%)		[O <sub>2</sub> ], (μM)		O <sub>2</sub> sat (%)		[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], (μM)		[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]:[O <sub>2</sub> ]	
		inverno	estate	inverno	estate	inverno	estate	inverno	estate	inverno	estate	inverno	estate	inverno	estate
OG1	C	8.36	8.12	6.07	6.10	326	791	377	119	107	45	355	363	1.34	3.05
OG2	C	8.29	8.38	6.14	7.03	388	520	408	147	116	56	364	479	1.29	3.26
OG3	C	8.35	8.01	6.52	6.39	328	1011	161	87	46	33	1133	681	7.04	8.23
OG4	C	8.20	8.25	5.21	5.29	352	516	365	317	103	120	819	370	2.24	1.17
OG5	C	8.13	8.36	6.16	5.08	464	909	300	602	85	227	821	689	3.14	1.14
OG6	C	8.35	8.04	6.09	4.54	325	756	289	252	82	95	571	960	2.38	4.21
MI1	C	8.25	8.57	3.03	3.32	178	155	304	297	86	112	60	51	0.20	0.17
MI2	C	8.26	8.54	3.25	3.31	187	164	302	289	86	109	60	58	0.20	0.20
MI3	C	8.23	8.51	3.03	3.26	182	173	301	292	85	110	57	28	0.19	0.10
MI4	C	8.19	8.12	2.24	2.31	263	330	320	219	91	83	71	111	0.22	0.51
OG7	I	8.57	8.26	7.03	6.21	213	642	181	192	51	73	3	1	0.02	0.01
OG8	I	8.36	7.21	5.38	4.07	276	4173	323	136	92	51	6	10	0.02	0.07
OG9	I	8.34	8.24	7.07	4.38	387	419	353	141	100	53	13	113	0.04	1.20
OG10	I	8.43	8.09	5.08	4.39	212	652	310	240	88	91	13	1	0.04	0.00
OG11	I	8.46	7.31	6.06	3.16	221	2299	224	545	64	206	80	9	0.36	0.02
PO1	I	8.20	8.29	3.15	3.05	259	1071	401	245	114	93	31	1	0.08	0.00
PO2	I	8.13	8.13	2.30	3.33	163	1035	344	108	98	41	4	2	0.01	0.02
PO3	I	8.44	8.01	4.28	4.01	163	754	500	71	142	27	3	1	0.01	0.01
PO4	I	8.37	8.26	3.37	2.07	147	197	482	291	137	110	13	1	0.03	0.00
PO5	I	8.36	8.08	3.01	3.20	153	461	485	63	137	24	4	21	0.01	0.33
PO6	I	8.13	8.06	3.01	6.38	201	264	343	115	97	43	6	2	0.02	0.02
PO7	I	8.20	8.26	3.04	3.16	198	331	300	247	85	93	114	9	0.38	0.04

**Tabella 5.2 Mediana ed intervallo (in parentesi) del contenuto di materia organica (OM), della densità del sedimento (d), della concentrazione di clorofilla-*a* (Chl-*a*) ed del rapporto molare C:N misurati nei campioni di sedimento superficiale (0-1 cm) (n=10 per le zone umide connesse al fiume e n=12 per quelle isolate).**

Variabile	Zone umide connesse al fiume		Zone umide isolate	
	inverno	estate	inverno	estate
	OM (%)	10.4 (2.3-14.1)	10.6 (1.5-16.9)	15.9 (5.2-34.5)
d (g cm <sup>-3</sup> )	1.2 (1.0-1.5)	1.1 (1-1.7)	1.0 (0.9-1.4)	0.9 (0.9-1.2)
Chl- <i>a</i> (µg cm <sup>-3</sup> )	24.7 (22.9-48.9)	25.6 (14.4-32.5)	23.75 (11.8-37.2)	23.15 (13.1-35.9)
C:N (mol:mol)	22.4 (10.7-27)	20.8 (10.9-25.7)	14.9 (10.9-21)	15.4 (11-24.8)

Le concentrazioni di nitrato sono risultate estremamente variabili e non significativamente diverse tra stagioni (P=0.3, test T di Wilcoxon) (tab. 5.1). Nelle zone umide connesse in modo permanente al fiume, le concentrazioni di nitrato (valori mediani) sono di 360 e 367 µM rispettivamente in inverno ed in estate, e risultano significativamente più alte di quelle misurate nei siti isolati (rispettivamente P<0.001 e P<0.001, test U di Mann-Whitney). I siti isolati tendono ad avere un contenuto di nitrato più alto in inverno rispetto all'estate (rispettivamente 10 and 2 µM). Secondo le previsioni del modello proposto da Christensen et al. (1990), il rapporto NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:O<sub>2</sub> nell'acqua di fondo dei siti connessi è teoricamente favorevole al processo di denitrificazione, con una disponibilità di nitrato simile o maggiore rispetto a quella dell'ossigeno (tab. 5.1).

Il contenuto di sostanza organica del sedimento (OM), le concentrazioni di Chl- *a* e la densità sono risultate statisticamente diverse tra le due stagioni (tab. 5.2). Gli intervalli del OM e della densità sono tipici di ambienti caratterizzati da elevati tassi di sedimentazione, da sedimento soffice e riducente e da un metabolismo di tipo anaerobico. Il contenuto di OM del sedimento è statisticamente più alto nelle zone umide isolate comparato a quelle connesse, il contrario risulta per il parametro densità (rispettivamente P<0.01 e P<0.001, test U di Mann-Whitney), probabilmente dovuto alla loro condizione stagnante e di pensilità. I valori più alti di OM sono stati osservati nelle paludi (old peat bogs) e negli stagni caratterizzati da comunità pleustofitiche. Le concentrazioni di Chl-*a* sono elevate e simili tra le due tipologie di siti e le due stagioni. Il rapporto C:N dei sedimenti risulta estremamente variabile tra siti e non è risultato significativamente diverso considerando sia le due tipologie di zone umide sia la stagione invernale ed estiva.

### 5.1.2 *Processi bentici*

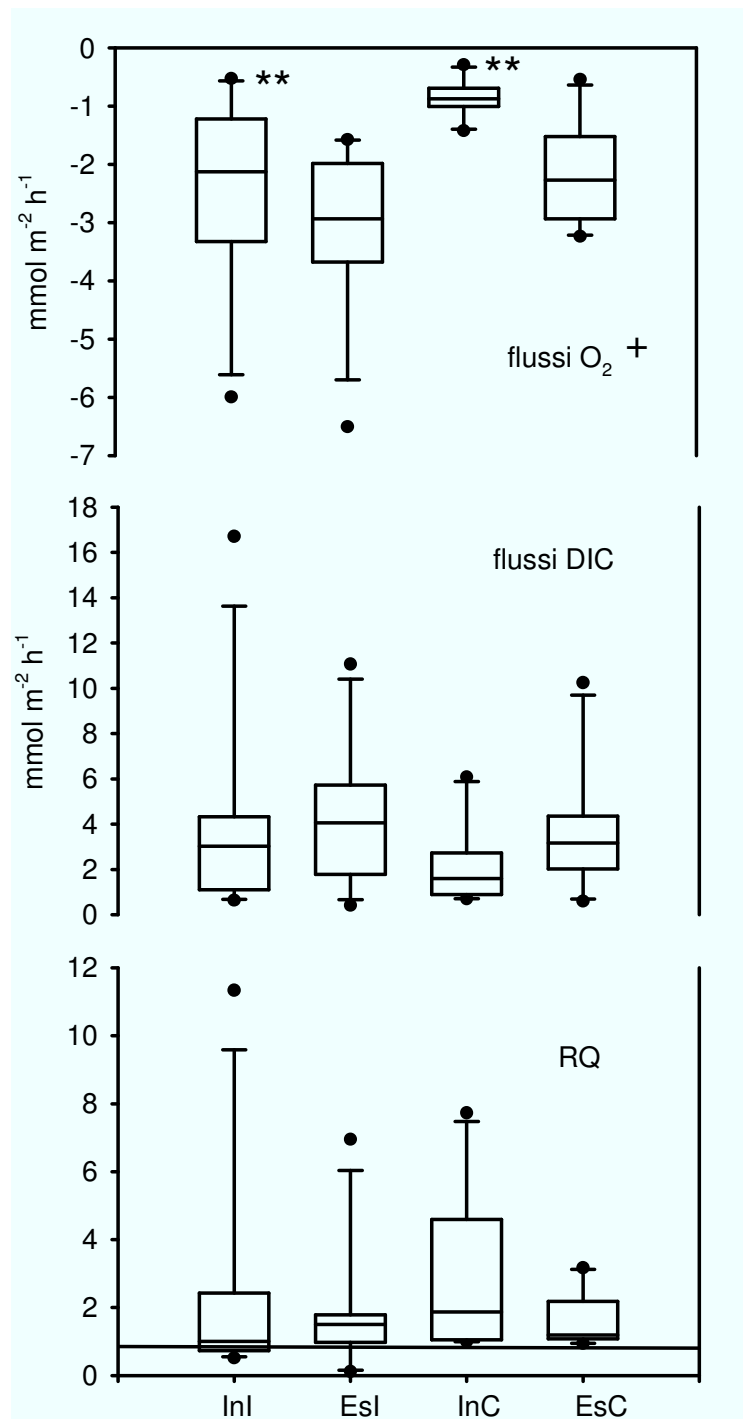
Come atteso, la stagione ha influenzato i processi bentici, che probabilmente sono risultati relazionati alle diverse temperature stagionali. La domanda sedimentaria di ossigeno (SOD) è risultata significativamente correlata con la temperatura dell'acqua ( $\rho=-0.379$ ,  $P<0.05$ ,  $\rho$  di Spearman) e con la densità del sedimento, ma non con il contenuto di sostanza organica nei sedimenti; la SOD è divenuta più negativa al passaggio dall'inverno all'estate (valori mediани rispettivamente di 1.14 and -2.54 mmol O<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) ( $P<0.05$ , test T di Wilcoxon) (fig. 5.1). Differenze significative dei tassi di SOD tra le zone umide isolate e quelle connesse sono state trovate solo nel periodo invernale ( $P<0.01$ , test U di Mann-Whitney), al contrario nessuna differenza statistica è risultata in estate ( $P=0.1$ ) (fig. 5.1).

In un certo numero di siti gli efflussi di DIC sono aumentati dall'inverno all'estate, ma non sono risultati significativamente correlati con la temperatura dell'acqua ( $\rho=0.193$ ,  $P=0.3$ ,  $\rho$  di Spearman). Anche le differenze tra le due stagioni non sono significative ( $P=0.2$ , test T di Wilcoxon), con valori mediани di 1.95 mmol DIC m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (intervallo tra 0.64 e 16.70 mmol DIC m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) in inverno e di 3.61 mmol DIC m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (intervallo 0.41 e 11.06 mmol DIC m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) in estate. Gli efflussi di carbonio inorganico corrispondenti ai flussi di SOD nel tempo e nello spazio sono risultati in quozienti respiratori variabili in entrambe le stagioni (RQ) (fig. 5.1); le mediane di RQ sono leggermente al di sopra dell'unità sia in inverno che in estate, rispettivamente con valori di 1.21 (intervallo tra 0.52 e 11.33) e 1.29 (intervallo tra 0.11 e 6.95) ( $P=0.5$ , test T di Wilcoxon).

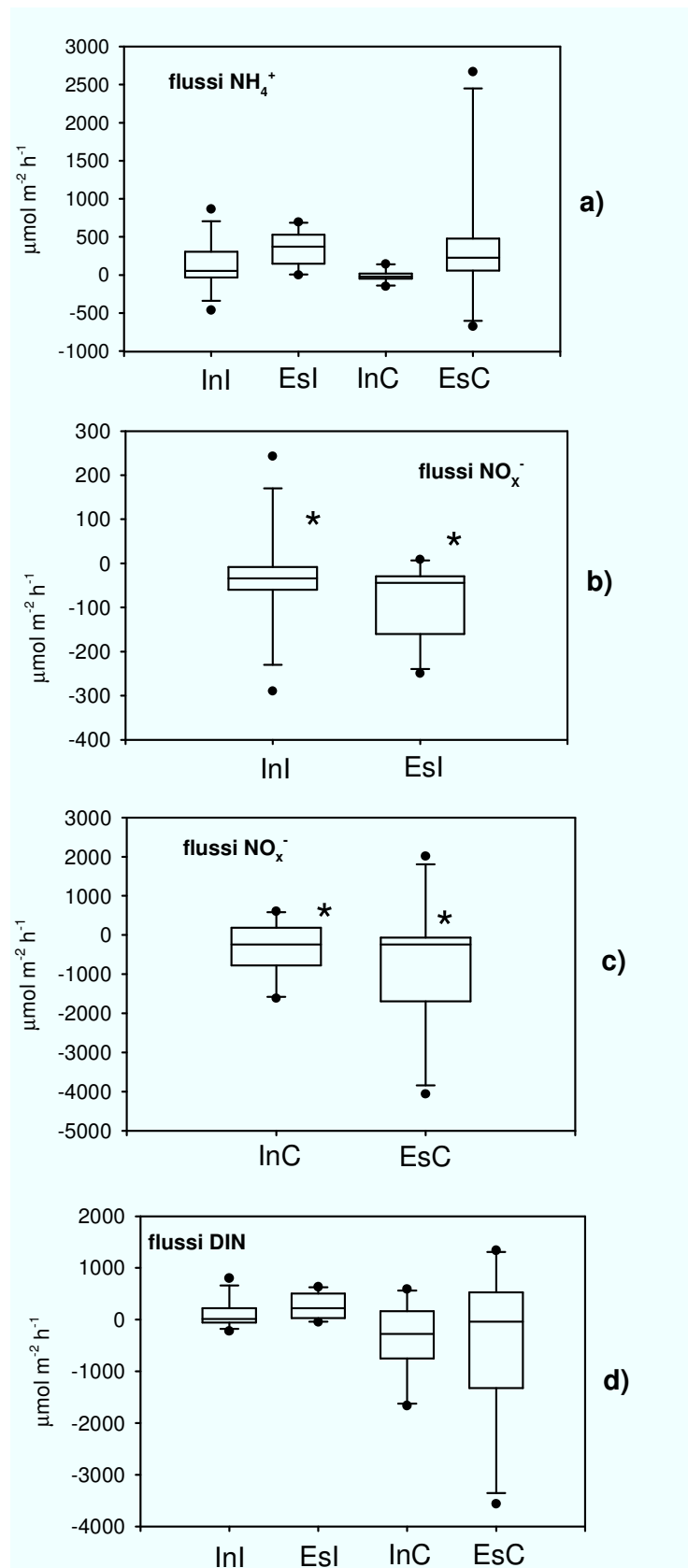
I flussi delle 3 forme di azoto inorganico sono stati analizzati considerando la stagione e la connessione idrologica (fig. 5.2). I flussi dell'ammonio (da -674 a 2670  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) sono per lo più diretti dal sedimento alla colonna d'acqua e sono significativamente diversi tra l'inverno e l'estate ( $P<0.05$ , test T di Wilcoxon), rispettivamente con valori mediани di -5 (intervallo tra -462 e 864) e di 345 (intervallo tra -676 e 2670)  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  (fig. 5.2). Nessuna differenza è stata rilevata tra le tipologie di zone umide, sebbene nei siti connessi in inverno i flussi di ammonio sono risultati diretti dalla colonna d'acqua al sedimento ( $P=0.1$ , test U di Mann-Whitney). Significativa è risultata la correlazione tra il rilascio di ammonio ed i flussi di SOD ( $\rho=0.480$ ,  $P<0.01$ ,  $\rho$  di Spearman), tra il rilascio di ammonio e la temperatura ( $\rho=0.452$ ,  $P<0.01$ ,  $\rho$  di Spearman) e tra il rilascio di ammonio e la densità sedimentaria ( $\rho=-0.386$ ,  $P<0.05$ ,  $\rho$  di Spearman). Nonostante non sia stata rilevata una correlazione con l'OM, è stato supposto che gli ambienti con valori bassi di densità sedimentaria, di solito più organici, rispondano all'incremento di temperatura, poiché aumentano i processi di mineralizzazione della sostanza organica e dell'azoto organico solubile.

Come tendenza generale, i flussi delle forme ossidate dell'azoto inorganico sono risultate dirette dalla colonna d'acqua verso il sedimento superficiale. I flussi dello ione

nitroso (da  $-131$  a  $188 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , mediana  $-1 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) sono compresi tra lo 0 e il 24% degli scambi bentici del  $\text{NO}_x^-$  ( $=\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ). I valori mediani dei flussi del  $\text{NO}_x^-$  sono  $44 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  con intervallo tra  $-1616$  e  $608 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  in inverno e  $-68 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  con intervallo tra  $-4062$  e  $2014 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  in estate (fig. 5.2). La domanda sedimentaria di  $\text{NO}_x^-$  è aumentata in estate rispetto all'inverno in solo 14 siti di campionamento ( $P=0.1$ , test U di Mann-Whitney). La tipologia di zone umide ha invece influenzato i flussi di  $\text{NO}_x^-$  ( $P<0.05$ , test U di Mann-Whitney) (fig. 5.2). Negli ambienti connessi ai corpi idrici principali gli influssi sono più alti in estate ( $P<0.05$ , test U di Mann-Whitney) che in inverno ( $P=0.5$ , test U di Mann-Whitney). Una correlazione positiva è stata trovata tra la domanda sedimentaria di  $\text{NO}_x^-$  e la concentrazione di  $\text{NO}_3^-$  ( $\rho=0.575$ ,  $P<0.001$ ,  $\rho$  di Spearman) e tra la domanda sedimentaria di  $\text{NO}_x^-$  e la saturazione di  $\text{CO}_2$  disciolta in colonna d'acqua ( $\rho=0.323$ ,  $P<0.05$ ,  $\rho$  di Spearman). Questi risultati suggeriscono l'importanza del nitrato come accettore di  $e^-$  per la mineralizzazione della OM. Nessuna differenza significativa è risultata tra le stagioni e tra le tipologie di zone umide per i flussi di DIN ( $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_x^-$ ) (fig.5.2).



**Figura 5.1** Domanda sedimentaria di ossigeno (SOD), flussi del carbonio inorganico disciolto (DIC) e quoziente respiratorio (RQ) misurati nei 22 siti di campionamento e suddivisi considerando la stagione invernale (In) ed estiva (Es) e la tipologia delle zone umide connesse (C) ed isolate (I). Le differenze stagionali ( $^+P<0.05$ ,  $^{++}P<0.01$ ,  $^{+++}P<0.001$ ) sono state testate con il test T di Wilcoxon; le differenze di connessione idrologica ( $^*P<0.05$ ,  $^{**}P<0.01$ ,  $^{***}P<0.001$ ) sono state testate con il test U di Mann-Whitney.



**Figura 5.2** Flussi al buio di  $\text{NH}_4^+$  (a),  $\text{NO}_x^-$  ( $=\text{NO}_2^-+\text{NO}_3^-$ ) (b e c) e DIN (d) misurati attraverso incubazioni di carote intatte di sedimento dei 22 siti di campionamento e suddivisi considerando le stagioni inverno (In) ed estate (Es) e le tipologie di zone umide connesse (C) e isolate (I). I flussi di  $\text{NO}_x^-$  sono riportati in due grafici con scale diverse. Le differenze stagionali (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ) sono state testate con il test T di Wilcoxon; le differenze di connessione idrologica (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ) sono state testate con il test U di Mann-Whitney.

### 5.1.3 Tassi di denitrificazione

La rimozione dell'azoto attraverso il processo di denitrificazione è stata influenzata dal periodo di campionamento. I tassi di denitrificazione totale sono estremamente variabili e compresi tra  $<5$  e  $\sim 2000 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ; gli efflussi di  $\text{N}_2$  sono significativamente più alti in estate che in inverno ( $P < 0.01$ , test T di Wilcoxon) (fig. 5.3). I  $D_{\text{tot}}$  risultano per lo più supportati dal nitrato che diffonde dalla colonna d'acqua al sedimento ( $D_{\text{W}}$ ) ed esibiscono i valori più alti nei siti connessi in entrambe le stagioni (rispettivamente  $P < 0.001$  in estate e  $P < 0.001$  in inverno, test U di Mann-Whitney). I tassi di denitrificazione  $D_{\text{W}}$  e  $D_{\text{N}}$  risultano più bassi in inverno che in estate (per entrambi  $P < 0.05$ , test T di Wilcoxon).  $D_{\text{W}}$  presenta un intervallo compreso tra 2 e  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  in inverno e tra 3 e  $1888 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  in estate supportando il  $90 \pm 18$  e  $71 \pm 26\%$  del  $D_{\text{tot}}$  rispettivamente per i due periodi indagati. I tassi di  $D_{\text{N}}$  cadono nell'intervallo da 0 a  $67 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  in inverno e da 0 a  $205 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  in estate.

Il processo di denitrificazione è risultato dipendente dalla tipologia di zona umida e correlato con diversi fattori ambientali. Confrontando i tassi tra le due tipologie di zone umide, i tassi  $D_{\text{W}}$  sono risultati più bassi nei siti isolati in entrambe le stagioni ( $P < 0.01$  in inverno e  $P < 0.001$  in estate, test U di Mann-Whitney). I tassi  $D_{\text{N}}$  sono significativamente più bassi solo in inverno ( $P < 0.05$ , test U di Mann-Whitney). I tassi  $D_{\text{tot}}$  risultano correlati positivamente con la concentrazione di  $\text{NO}_3^-$  ( $\rho = 0.748$ ,  $P < 0.001$ ,  $\rho$  di Spearman), con la domanda sedimentaria di  $\text{NO}_x^-$  ( $\rho = 0.691$ ,  $P < 0.001$ ,  $\rho$  di Spearman), con la concentrazione del carbonio inorganico disciolto ( $\rho = 0.339$ ,  $P < 0.05$ ,  $\rho$  di Spearman) e con la densità sedimentaria ( $\rho = 0.341$ ,  $P < 0.05$ ,  $\rho$  di Spearman).  $D_{\text{tot}}$  non è risultato correlato con il contenuto di sostanza organica. Relazioni simili sono state trovate per i tassi  $D_{\text{W}}$ , riflettendo la netta importanza di questa frazione sulla denitrificazione totale rispetto al  $D_{\text{N}}$ . I tassi di  $D_{\text{N}}$  presentano una correlazione significativa solo con la temperatura ( $\rho = 0.368$ ,  $P < 0.05$ ,  $\rho$  di Spearman) poiché questa favorisce il processo di ammonificazione e quindi la disponibilità di  $\text{NH}_4^+$  nelle acque interstiziali.

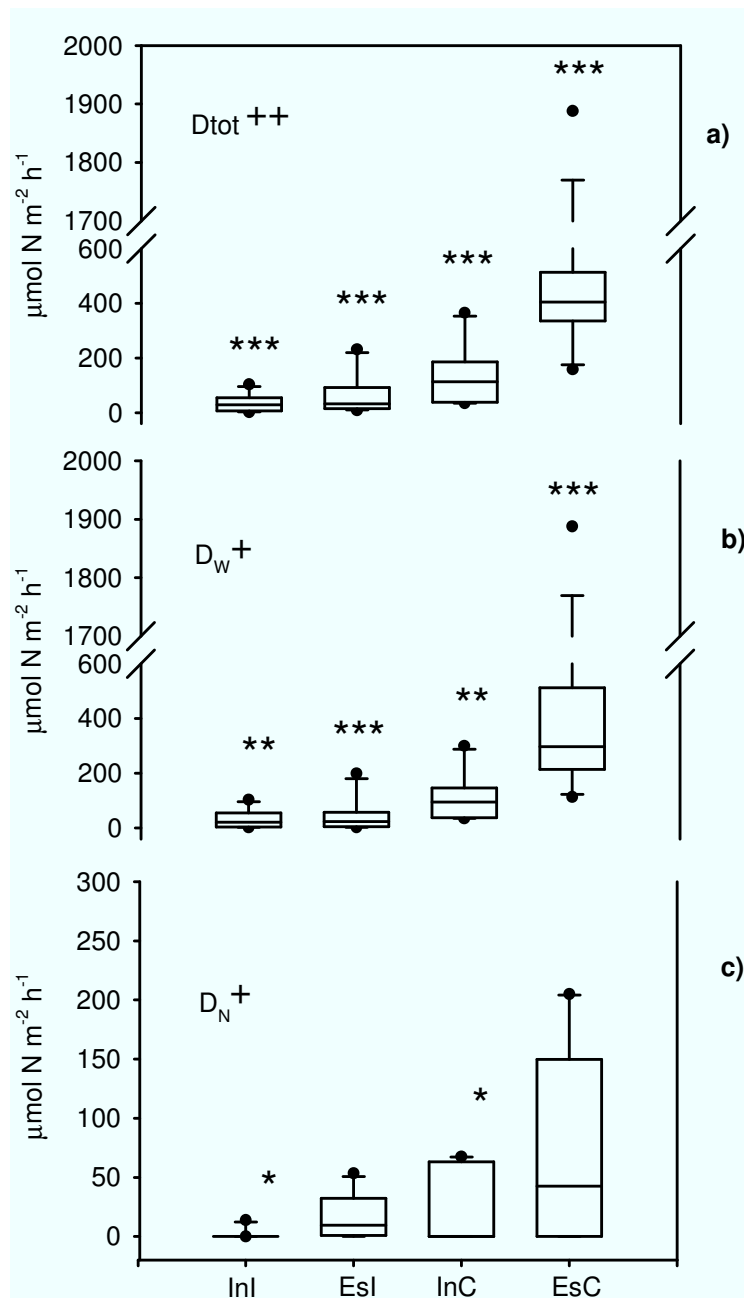
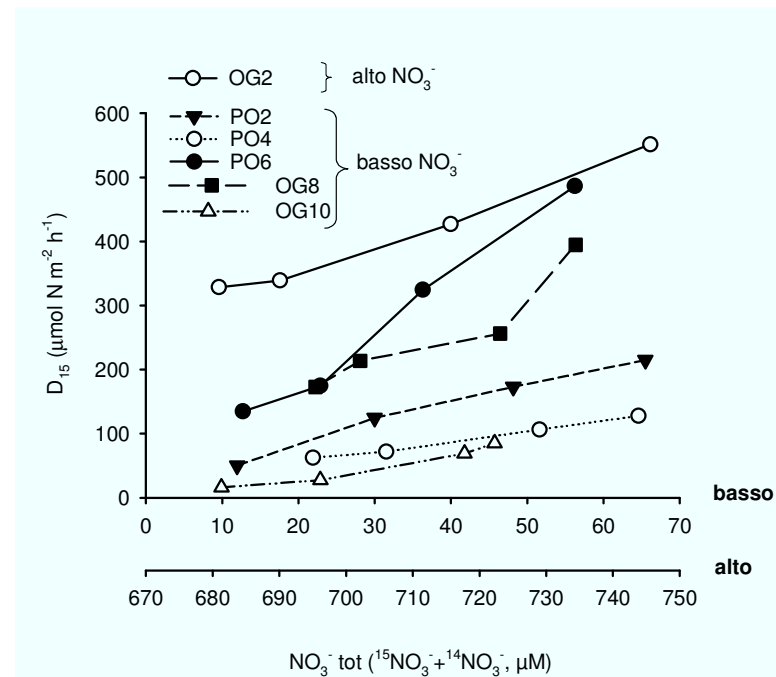


Figura 5.3 Tassi di denitrificazione misurati con la tecnica dell'isotope pairing nei 22 siti indagati nel periodo invernale ed estivo del 2007. I dati sono raggruppati in valori invernali (I) ed estivi (E) delle due tipologie di zone umide, connesse (C) e isolate (I) e mostrano i tassi di denitrificazione totale ( $D_{\text{tot}}$ , a), i tassi di denitrificazione del nitrato che diffonde al sedimento anossico dalla colonna d'acqua ( $D_{\text{W}}$ , b) e i tassi di denitrificazione del nitrato prodotto all'interno dei sedimenti dal processo di nitrificazione ( $D_{\text{N}}$ , c). Le differenze stagionali ( $^+P<0.05$ ,  $^{++}P<0.01$ ,  $^{+++}P<0.001$ ) sono state testate con il test T di Wilcoxon; le differenze di connessione idrologica ( $^*P<0.05$ ,  $^{**}P<0.01$ ,  $^{***}P<0.001$ ) sono state testate con il test U di Mann-Whitney.

I risultati dei test statistici hanno evidenziato soprattutto differenze tra siti isolati e connessi. Negli ambienti isolati i tassi  $D_{\text{W}}$  e  $D_{\text{N}}$  sono risultati bassi a causa delle concentrazioni limitanti del nitrato in colonna d'acqua e potenzialmente a causa della scarsa entità del

processo di nitrificazione. Tassi di denitrificazione più alti sono stati trovati nei siti connessi, perché il nitrato non è risultato un fattore limitante il processo o nel caso lo è stato solo in minima parte. L'aggiunta di concentrazioni crescenti di  $^{15}\text{NO}_3^-$  ha determinato infatti lo stimolo immediato dei tassi di denitrificazione come  $D_{15}$  (i.e. denitrificazione del  $^{15}\text{NO}_3^-$  aggiunto alla colonna d'acqua). Gli incrementi nei tassi sono risultati lineari all'arricchimento di nitrato, sia nelle zone umide isolate con bassa concentrazione di nitrato sia nelle zone umide connesse e ricche di nitrato (fig. 5.4).

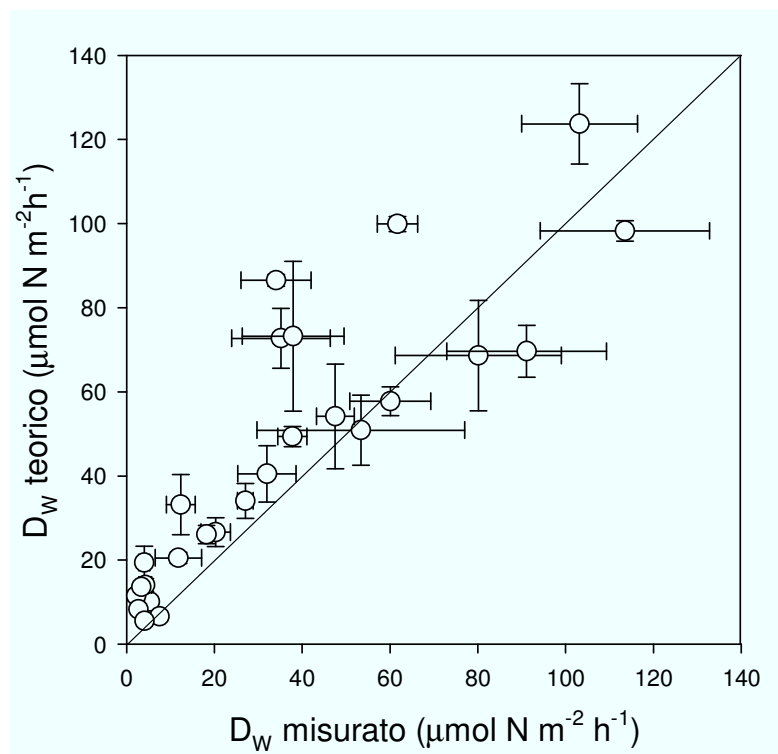


**Figura 5.4 Risultati degli esperimenti a “serie di concentrazioni” nei quali quantità crescenti di nitrato marcato sono state aggiunte alla fase acquosa delle carote intatte di sedimento. Sono riportati i siti in cui l’incremento di concentrazioni di  $^{15}\text{NO}_3^-$  ha determinato tassi di denitrificazione più alti.  $D_w$  è risultato in generale stimolato a significare che, nei siti con basse concentrazioni di nitrato in colonna d’acqua, il potenziale di denitrificazione è elevato ma solo parzialmente espresso.**

La correlazione positive tra i tassi  $D_{tot}$  e la concentrazione di DIC potrebbe riflettere l’importanza del processo di denitrificazione nell’ossidazione della materia organica. Allo stesso tempo le zone umide connesse presentano più alti valori di DIC suggerendo una più intensa eterotrofia.

Infine, ho applicato il modello di Christensen et al. (1990) usando come dati di input la concentrazione di  $\text{NO}_3^-$  e di  $\text{O}_2$  in acqua (tab. 5.1) e i flussi di  $\text{O}_2$  misurati durante l’incubazione al buio di carote di sedimento. Il modello è unidimensionale, funziona in sedimenti che non sono bioturbati e non sono colonizzati da fanerogame e predice solo i tassi di denitrificazione supportati dal nitrato della colonna d’acqua ( $D_w$ ). I valori teorici  $D_w$  calcolati per le 22 zone umide (l’insieme dei dati invernali ed estivi) hanno mostrato un’ottima corrispondenza con i  $D_w$  misurati attraverso l’isotope pairing ( $\rho=0.847$ ,  $P<0.01$ ,  $\rho$  di

Spearman) solo in un intervallo limitato dei tassi ( $0-140 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) (fig. 5.5). I risultati del modello sono in buono accordo con i risultati sperimentali delle zone umide caratterizzate da basso tenore di  $\text{NO}_3^-$  in acqua; al contrario i tassi predetti sono molto più alti rispetto a quelli misurati per i siti con elevate concentrazioni di nitrato.



**Figura 5.5** Relazione tra i tassi  $D_w$ , calcolati secondo il modello di Christensen et al. (1990), e i tassi misurati nei siti con basso contenuto di nitrato in colonna d'acqua. Dove le concentrazioni di nitrato sono elevate, i tassi predetti sono molto più alti di quelli misurati (dati non mostrati).

## 5.2 Discussione

### *5.2.1 Processo di denitrificazione in zone umide eutrofiche e negli altri ecosistemi acquatici.*

Il processo di rimozione dell'azoto in zone umide d'acqua dolce è ampiamente discusso in letteratura (Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas, 2006), ma rispetto ad altri ambienti acquatici poche sono le misure dirette dei tassi di denitrificazione in tali ecosistemi. La tabella 5.3 riassume studi recenti che hanno misurato il processo di denitrificazione. Un confronto diretto con i nostri dati risulta in qualche modo limitato, perché gli studi si differenziano per il disegno sperimentale ed il metodo di misura utilizzato. I tassi riportati variano tra  $1$  e  $3188 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  ed il valore medio dei tassi misurati in questo lavoro di tesi sia delle zone umide isolate,  $49 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , sia di quelle connesse,  $340 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , ricade all'interno di questo intervallo (i valori di mediana sono  $30 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  per i siti isolati e

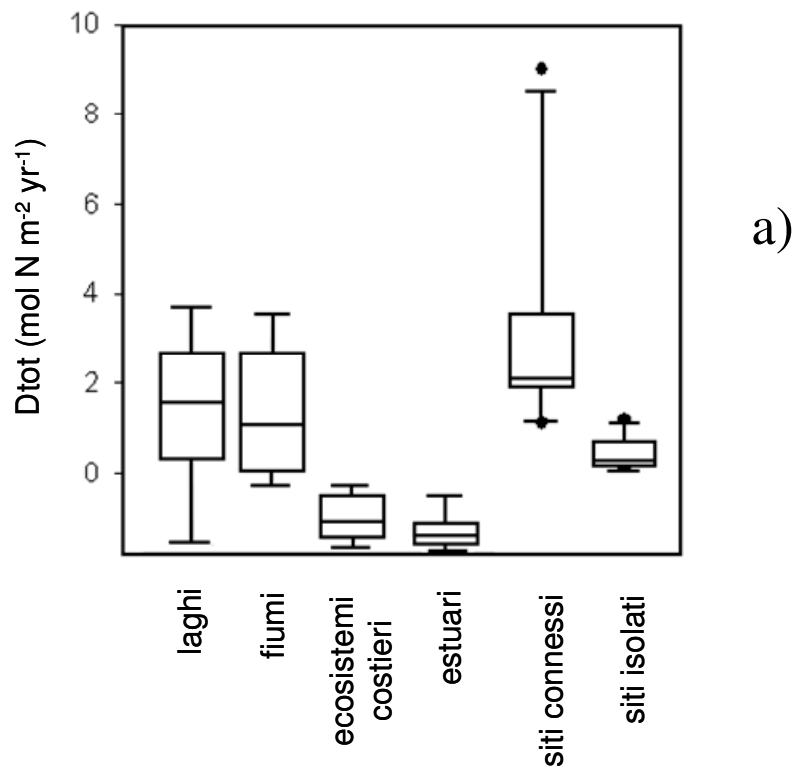
286  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  per i siti connessi). I tassi di denitrificazione delle zone umide isolate appartenenti al bacino del fiume Po sono paragonabili a quelli di altre zone umide ripariali e di alcune zone umide artificiali (tab. 5.3). I siti connessi al fiume hanno invece tassi di denitrificazione più alti e sono confrontabili con le misure riportate per zone umide artificiali in California, Svezia ed Arizona. Queste ricevono flussi di acqua pulsanti dal corpo idrico principale e la connessione idrologica potrebbe spiegare i tassi più alti presenti in letteratura (12 – 3188  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ).

**Table 5.3 Tassi di denitrificazione misurati in diversi tipi di ambienti acquatici eutrofici poco profondi di acqua dolce. Sono inclusi i risultati di questo lavoro di tesi. Eccetto per il lavoro di Seitzinger (1994), i valori riportati sono stati calcolati dai dati originali ed espressi in  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ .**

<b>Tipologia di zona umida</b>	<b>Localizzazione geografica</b>	<b>Tecnica di stima del tasso di denitrificazione</b>	<b>Tasso di denitrificazione (<math>\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}</math>)</b>	<b>Bibliografia</b>
zona umida ripariali	New Jersey (USA)	flussi di $\text{N}_2$	< 20 - 260	Seitzinger, 1994
Zona umida artificiale riceventi acqua dal fiume	California (USA)	bilancio di massa	12 - 3188	Reilly et al., 2002
Zona umida artificiale per il trattamento dei reflui	Paesi Bassi	blocco con acetilene	1 - 360	Toet et al., 2003
zona umida artificiale per il trattamento dei reflui	Svezia	blocco con acetilene	714 - 1786	Bastviken et al., 2005
Zona buffer ripariale	Estonia	flussi di $\text{N}_2$	14 - 571	Teiter & Mander, 2005
zona umida artificiale	Svizzera	bilancio di massa con isotopi	3 - 661	Reinhardt et al., 2006
palude costiera d'acqua dolce	Louisiana (USA)	rapporti isotopici - spettrometro di massa (IRMS)	179 - 679	Yu et al., 2006
zona umida ricevente apporti fluviali	Ohio (USA)	blocco con acetilene	14 - 129	Hernandez & Mitsch, 2007
zona umida artificiale ricevente apporti fluviali	Texas (USA)	$\text{N}_2/\text{Ar}$ (MIMS)	54 - 278	Scott et al., 2008
zona umida artificiale ricevente acqua da un canale di drenaggio	Indiana (USA)	accoppiamento isotopico (IPT)	40 - 175	Herrman & White, 2008
zona umida artificiale	Arizona (USA)	bilancio di massa	677 - 1248	Kadlec, 2008
zona umida ricevente apporti fluviali	Giappone	blocco con acetilene	149 - 185	Zhou & Hosomi, 2008

zona umida isolata	Italia	accoppiamento isotopico (IPT)	2 - 231	Questo studio
zona umida connessa al fiume	Italia	accoppiamento isotopico (IPT)	35 - 1888	Questo studio

Lo studio di Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas (2006) permette inoltre il confronto dei tassi di denitrificazione delle zone umide d'acqua dolce studiate con quelli di diversi ecosistemi acquatici (fig. 5.6). Essi hanno revisionato un set di dati eterogeneo di 136 misure di tassi di denitrificazione attraverso una meta-analisi. I dati sono stati analizzati su base annuale e durante il periodo di massima temperatura dell'acqua prendendo in considerazione 5 tipologie di ambienti acquatici (laghi, fiumi, ecosistemi costieri, estuari ed oceani). Le zone umide connesse mostrano una capacità denitrificante, su base annuale, più alta rispetto a quella trovata in ambienti marini e paragonabile a quella di ambienti di acqua dolce, in particolare nei fiumi. In ogni modo gli estremi superiori delle zone umide studiate sono più alti di quelli riportati da Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas (2006). I tassi di denitrificazione degli ambienti isolati studiati sono invece simili ai tassi di ambienti marini (fig. 5.6a). Considerando solo i dati misurati nel periodo estivo, la mediana dei siti connessi è più alta di quella delle altre tipologie di ambiente (fig. 5.6b). Su base annuale, la mediana e l'intervallo dei tassi misurati nei siti isolati sono simili a quelli degli ecosistemi costieri. Quindi le zone umide connesse al corpo idrico principale studiate in questo lavoro sono tra gli ecosistemi con i più alti tassi di denitrificazione.



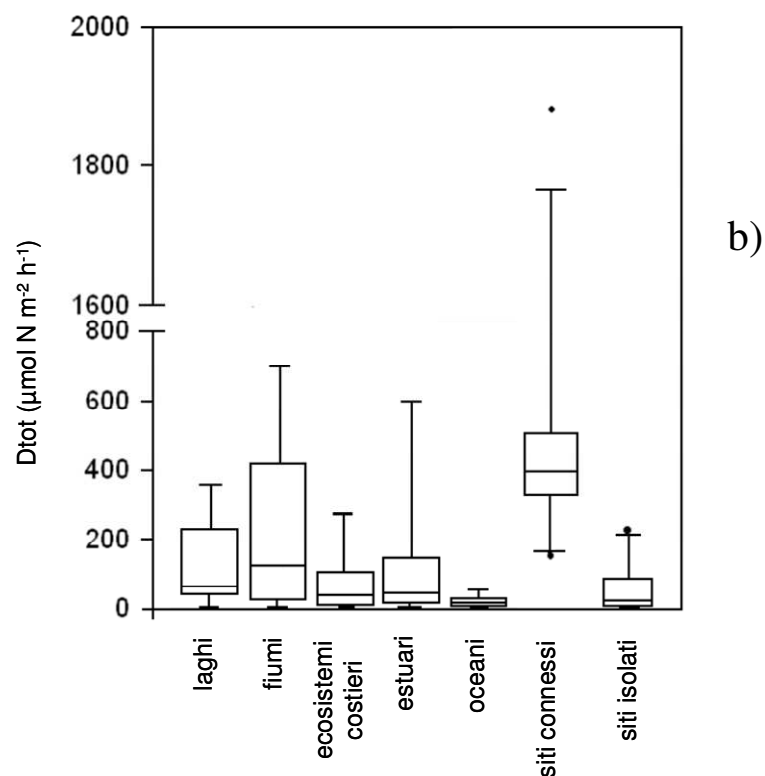


Figura 5.6 (a) Tassi di denitrificazione annuali in differenti ambienti acquatici riportati da Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas (2006); le categorie “siti connessi” e “siti isolate” sono stati aggiunti al grafico originale e si riferiscono ai dati di questo studio. (b) Tassi di denitrificazione misurati alle più alte temperature dell’acqua (modificato da Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas (2006)).

### 5.2.2 Regolazione del processo di denitrificazione

Le misure dei tassi di denitrificazione sono state analizzate considerando due fattori dominanti: la stagione e la connessione idrologica. Le caratteristiche ambientali che sono state riconosciute essere fattori chiave nel determinare l’intensità e la variazione stagionale dei tassi di denitrificazione sono la concentrazione del nitrato in colonna d’acqua, la temperatura, la concentrazione dell’ossigeno disciolto e il contenuto di sostanza organica (Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas, 2006; Seitzinger et al., 2006). Per comprendere l’importanza della connessione idrologica sulla rimozione dell’azoto in una zona umida, ho cercato di valutare quale di questi fattori possa regolare la denitrificazione negli ambienti studiati isolati e connessi. In questo studio il processo di denitrificazione è risultato correlato alla concentrazione di nitrato ed è risultato favorito nei siti connessi dove sono state trovate concentrazioni più alte e maggiore disponibilità di nitrato in entrambe le stagioni (tab. 5.1 e fig. 5.3). Le concentrazioni di  $\text{NO}_3^-$  in colonna d’acqua dei siti connessi sono comparabili a

quelle misurate nei fiumi adiacenti (fiume Mincio, circa 150  $\mu\text{M}$ , e fiume Oglio, circa 400  $\mu\text{M}$ ), mentre le zone umide isolate presentano concentrazioni molto più basse. I tassi misurati in ambienti idraulicamente connessi ai fiumi sono di 1-2 ordini di grandezza più alti di quelli misurati nelle zone umide isolate (fig. 5.3). Come ampiamente riportato in letteratura, in molti ecosistemi la concentrazione di nitrato in colonna d'acqua è il principale fattore di controllo della cinetica del processo di denitrificazione (Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas, 2006; Seitzinger et al., 2006). Di fatto come regola generale in questo studio la frazione  $D_w$  ha contribuito quasi del tutto alla  $D_{\text{tot}}$ . In zone umide caratterizzate da un elevato carico di sostanza organica il processo di nitrificazione è limitato dalla disponibilità di ossigeno e di conseguenza la nitrificazione risulta una sorgente di nitrato di debole entità per la denitrificazione accoppiata. Alcune eccezioni sono state registrate in pochi ambienti isolati in cui, durante la stagione estiva, l'assenza o la poca disponibilità di nitrato in colonna d'acqua e una sufficiente quantità di ossigeno hanno favorito il processo di nitrificazione. Tendenze simili, riportate da Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas (2006), confermano che il nitrato in colonna d'acqua regola il rapporto tra  $D_w$  e  $D_N$ .

In questo studio gli esperimenti a “serie crescenti di concentrazioni” (quantità crescenti di  $^{15}\text{NO}_3^-$  aggiunto alle carote di sedimento) hanno dimostrato che la maggior parte dei siti esibiscono un alto potenziale di denitrificazione ( $D_{15}$ ) e che il processo non è saturo. Ciò è risultato vero per quasi tutte le zone umide isolate nelle quali il processo *in situ* è probabilmente limitato dall'azoto a causa delle condizioni stagnanti e del mancato approvvigionamento di nutrienti attraverso flussi pulsanti di acqua dal fiume. Negli ambienti connessi con concentrazioni estremamente elevate di nitrato ( $>500 \mu\text{M}$ ), non è stato misurato un incremento corrispondente di  $D_{15}$  e ciò è indicativo della saturazione del substrato; sono state registrate solo poche eccezioni (fig. 5.4). Come riportato in letteratura, la cinetica del processo di denitrificazione è più incerta quando le concentrazioni di nitrato sono vicine alla saturazione e altri fattori possono limitare la reazione (e.g. disponibilità di carbonio organico labile) (Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas, 2006). Anche in quegli ambienti dove le concentrazioni di nitrato non sono cambiate significativamente nei due periodi di campionamento, i tassi di denitrificazione sono aumentati dall'inverno all'estate, indicando che la temperatura dell'acqua è un altro importante fattore di regolazione. Molti studi riportano un incremento repentino nell'andamento dei tassi di denitrificazione in relazione alla temperatura (Focht & Verstraete, 1977; Hénault & Germon, 2000). In sedimenti di palude, Addy et al. (2005) hanno rilevato che questo punto è a 12 °C essendosi trovati tassi di denitrificazione significativamente più alti al di sopra di questa temperatura. Nei siti studiati le incubazioni estive determinarono tassi significativamente più alti rispetto a quelle invernali, caratterizzate rispettivamente da valori mediani di temperatura di 25 e 9.5 °C.

Ci sono diversi nessi potenziali tra la denitrificazione e le altre misure di metabolismo nei sedimenti, la SOD. La domanda sedimentaria di ossigeno misurata in questo studio risulta ricadere all'interno dei tassi più alti riportati in letteratura per zone umide, laghi eutrofici e fiumi (Christensen et al., 1990; Nielsen et al., 1990; Seitzinger, 1994; Scott et al., 2008). La temperatura stagionale è un fattore chiave per i flussi di SOD, ma a differenza di altri studi non è stata trovata una correlazione significativa tra i flussi di SOD e  $D_{tot}$  (Seitzinger, 1994; Eyre & Ferguson, 2002). Secondo il semplice ma robusto modello proposto da Christensen et al. (1990), la denitrificazione può essere predetta dalla combinazione dei flussi di SOD e del rapporto  $NO_3^-:O_2$ . Gli ambienti di acque poco profonde atossici, con elevati tassi di SOD, ed elevate concentrazioni di nitrato dovrebbero quindi possedere un alto potenziale di rimozione dell'azoto attraverso la denitrificazione. Il modello è stato sviluppato originariamente per siti nord europei caratterizzati da più bassi valori di SOD e di  $NO_3^-:O_2$ , ma sembra essere in generale applicabile anche agli ambienti studiati in questo lavoro. Comunque, in alcuni siti connessi dove le concentrazioni di nitrato sono molto alte, i tassi predetti sono risultati molto più alti dei misurati: ciò potrebbe essere dovuto alla saturazione del processo di denitrificazione oppure alla non linearità del modello a valori estremi di SOD o di  $NO_3^-:O_2$  o ancora alla sottostima dei tassi reali misurati causata da un'insufficiente marcatura con  $^{15}NO_3^-$ .

I tassi di denitrificazione non sono risultati correlati con il contenuto di sostanza organica sedimentaria (~10% o più), anche se questa variabile è ampiamente riconosciuta come un importante regolatore del processo (Ingersoll & Baker, 1998; Piña-Ochoa & Álvarez-Cobelas, 2006; Seitzinger et al., 2006). La rimozione dell'azoto non è nemmeno correlata con il contenuto di Chl-*a* nei sedimenti, anche se questo rappresenta una sorgente di carbonio organico labile e facilmente degradabile. L'eccesso di materia organica disponibile nei siti studiati può mascherare l'effetto di questi fattori.

La dipendenza del processo di denitrificazione verso la concentrazione di nitrato ha implicazioni significative sulla qualità delle acque e sulla gestione delle zone umide. La rimozione dell'azoto sembra essere altamente influenzata sia dalla disponibilità di nitrato sia dalla temperatura. Le zone umide connesse mostrano i tassi di denitrificazione più alti grazie al continuo approvvigionamento di nitrato dai corpi idrici. Il potenziale per incrementare la denitrificazione nelle zone umide isolate è stato dimostrato attraverso una serie di aggiunte di concentrazioni crescenti di nitrato. Se questi ambienti fossero connessi e ricevessero flussi pulsanti di acqua dal fiume, dovrebbero essere in grado di rimuovere grandi quantità di nitrato dalla colonna d'acqua ed assolvere un importante ruolo nella rimozione dell'azoto.

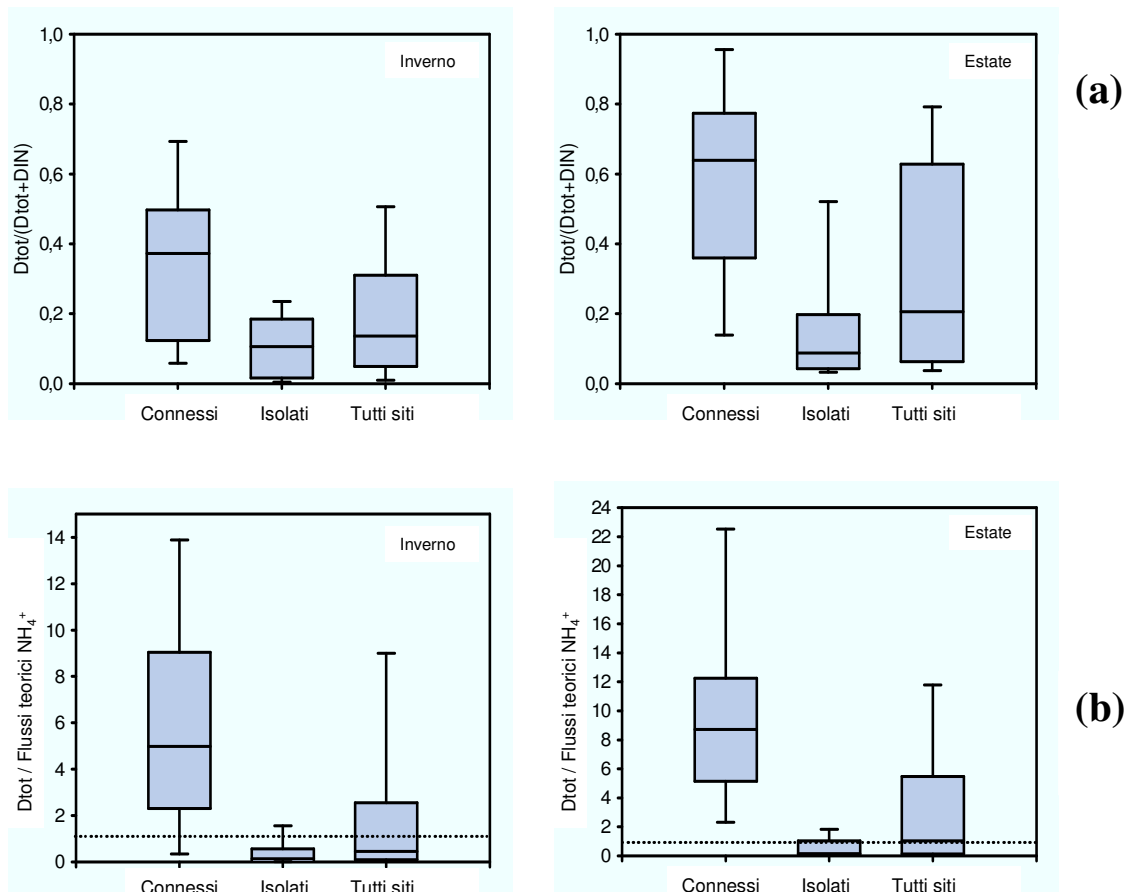
### ***5.2.3 Efficienza di denitrificazione in sedimenti di zone umide eutrofiche poco profonde: sink o source di azoto?***

La connessione idrologica delle zone umide perfluviali influenza l'efficienza di rimozione dell'azoto in diversi modi rispetto al semplice incremento della concentrazione di nitrato. L'efficienza di denitrificazione è calcolata come rapporto tra i tassi di denitrificazione e gli efflussi di azoto inorganico attraverso l'interfaccia sedimento-acqua ( $D_{tot}/(D_{tot}+DIN)$ ) e rappresenta la percentuale dell'azoto inorganico totale processato durante la decomposizione della sostanza organica, rilasciato come  $N_2$  (Eyre & Ferguson, 2002). Questo rapporto include l'ammonio prodotto dal processo di riduzione dissimilativa del nitrato ad ammonio che non è stata direttamente misurata in questo studio. Il maggiore prodotto finale della denitrificazione in zone umide è stato riconosciuto essere l'azoto molecolare. Schlesinger (2009) ha analizzato il rapporto tra gli efflussi di  $N_2O$  e  $N_2+N_2O$  da una varietà di ecosistemi e ha riportato i valori più bassi per ambienti anaerobici come le zone umide ( $0.082\pm 0.024$ ). Secondo Eyre e Ferguson (2002), efficienze vicino a 1 significano che l'azoto è completamente perso in forma gassosa dal sistema, mentre valori vicino a 0 indicano che gli ioni di azoto inorganico sono riciclati alla colonna d'acqua e potrebbero sostenere di nuovo la produzione primaria. Le efficienze di denitrificazione calcolate per le 10 zone umide studiate connesse e per le 12 isolate sono riportate nella figura 5.7a. In entrambe le stagioni, l'efficienza di denitrificazione nei siti isolati risulta al di sotto di 0.2, con una netta predominanza degli efflussi di DIN. Le zone umide connesse tendono invece ad essere source di DIN per la colonna d'acqua in inverno, con rapporti al di sotto di 0.5, mentre in estate tendono ad essere dei sink di azoto (valore mediano 0.65, intervallo 0.4-0.8). Eyre e Ferguson (2002) hanno sviluppato quest'approccio in ambienti con limitati tassi  $D_w$  e con un'elevata proporzione di  $D_N$  rispetto a  $D_{tot}$ ; il loro approccio non ha considerato flussi di azoto inorganico negativi (i.e. dall'acqua al sedimento) che sono frequenti nei siti considerati in questo studio.

L'efficienza di denitrificazione è stata anche calcolata come rapporto tra  $D_{tot}$  e il processo di ammonificazione. Quest'ultimo, non misurato in questo studio, è stato stimato dai flussi di SOD e dai dati dei rapporti C:N del sedimento superficiale. Non sono stati utilizzati gli efflussi di ammonio poiché essi rappresentano la somma netta di tutti i processi che avvengono (e.g. ammonificazione, assimilazione al buio, nitrificazione, adsorbimento, riduzione dissimilativa del nitrato ad ammonio). Per stimare l'ammonificazione, i flussi di SOD sono stati convertiti in produzione di carbonio inorganico assumendo un RQ di 1.2 e la produzione di  $CO_2$  così calcolata è stata poi divisa per il rapporto C:N del sedimento.

I rapporti tra  $D_{tot}$  e ammonificazione teorica, calcolati per i siti connessi ed isolati, sono riportati in figura 5.7b. Le zone umide idraulicamente connesse mostrano un rapporto  $D_{tot} : \text{flussi } NH_4^+ > 1$  indicando che tendono ad essere dei sink di azoto. Il prevalere del processo di denitrificazione è risultato di maggiore entità in estate rispetto all'inverno. Al

contrario, gli ambienti isolati tendono ad essere source di azoto inorganico con il prevalere del processo di ammonificazione (o di riduzione dissimilativa del nitrato ad ammonio) su quello di denitrificazione (Gardner & McCarthy, 2009). Questi ultimi siti tendono a mantenere le condizioni di eutrofia-ipereutrofia attraverso il ciclo tra produzione primaria planctonica o macrofittica, deposizione della materia organica, veloce rigenerazione della frazione labile e interrimento. Il ciclo dell'azoto bentico in questi ambienti sembra essere semplificato da processi di nitrificazione/denitrificazione trascurabili e dalla limitata disponibilità di forme dell'azoto inorganico ossidate.



**Figura 5.7** Efficienze di denitrificazione calcolate secondo Eyre & Ferguson (2002) (a) e confrontando l'azoto rimosso attraverso il processo di denitrificazione e l'azoto teoricamente rigenerato dai sedimenti (vedere il testo per maggiori dettagli) (b).

L'efficienza di denitrificazione calcolata dal rapporto tra  $D_{tot}$  e la rigenerazione teorica di azoto potrebbe essere sovrastimata: gli efflussi di azoto inorganico misurati mediante incubazione di carote intatte di sedimento ( $NH_4^+ + NO_x^-$  (solo valori positivi) +  $N_2$  (da  $D_N$ )) sono infatti significativamente più alti ( $P < 0.05$ ) dei tassi di rigenerazione teorica dell'ammonio, calcolati dai flussi di SOD. Questo è probabilmente dovuto a più bassi rapporti C:N derivanti dal pool organico più labile dei sedimenti superficiali rispetto a quelli riportati nella tabella 5.2 (10.7 to 27.0). I sedimenti superficiali potrebbero includere lo strato superiore 0-1 cm e i frammenti delle particelle più refrattarie derivanti dalle macrofite. Il

microfitobenthos, gli epifiti e il plancton, che sono abbondanti nei siti studiati, sono generalmente caratterizzati da rapporti C:N più bassi, verosimilmente tra 6 e 9 (Sundbäck et al., 2000).

#### ***5.2.4 Denitrificazione e disponibilità di azoto per i produttori primari***

Sulla base dei risultati di questo lavoro di tesi, le zone umide isolate sono principalmente dei source di azoto a causa dell'accoppiamento tra alto tasso di rigenerazione dell'ammonio e basso tasso dei processi di nitrificazione e denitrificazione. È stato supposto lo stabilirsi di un feedback positivo: l'eccesso di azoto favorisce un'elevata produttività primaria e, a sua volta, la biomassa vegetale va ad alimentare il riciclo dell'ammonio. Al contrario, nelle zone umide connesse gli elevati tassi di denitrificazione rimuovono le grandi quantità di azoto inorganico potenzialmente disponibile per l'assimilazione da parte dei produttori primari.

Questa ipotesi è stata testata confrontando i dati pubblicati della produttività primaria lorda (GPP) e la rimozione dell'azoto attraverso il processo di denitrificazione nel sito isolato PO2, che è dominato dalla specie pleustofitica *Trapa natans* (Bolpagni et al., 2007), e nel sito connesso MI4, che è colonizzato da un'ampia prateria della rizofita *V. spiralis* (Pinardi et al., 2009).

Nel sito PO2, la GPP è risultata di  $25 \text{ mol C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$  e la perdita di azoto tramite denitrificazione di  $0.05 \text{ mol N m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ , che corrisponde ad una produzione di  $0.7 \text{ mol C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ . Nel sito MI4 invece la GPP è risultata  $17 \text{ mol C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$  e la perdita di azoto tramite denitrificazione ( $1.22 \text{ mol N m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ ) equivalente ad una produzione di  $14.6 \text{ mol C m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ . In generale, la perdita di azoto tramite denitrificazione corrispondeva a circa il 3% della GPP reale nel sito PO2, mentre nel sito MI4 a circa l'85% della GPP.

Nei siti connessi come MI4, con acque ricche di nitrato, una grande frazione di azoto disponibile è stato processato, attraverso il processo di denitrificazione, con un maggiore controllo potenziale sulla produzione primaria.

Nei siti isolati come PO2, i tassi di denitrificazione sono risultati troppo bassi tali da non potere controllare la disponibilità di azoto per la vegetazione bentica, che invece è stata alimentata dal riciclo dell'ammonio.

Il riciclo dell'azoto seleziona forme di piante opportuniste, così come le pleustofite, che tipicamente colonizzano bacini d'acqua poca profondi e stagnanti ricchi di nutrienti (Scheffer et al., 2003). In molti siti del gruppo delle zone umide isolate il ciclo dell'azoto e la tipologia di vegetazione confermano questo pattern.

In conclusione, nei siti isolati il riciclo dell'azoto promuove la condizione di anossia dovuta all'eccessiva produzione primaria e alla sedimentazione, ulteriormente limita il

processo accoppiato di nitrificazione-denitrificazione e conduce all'interramento e alla scomparsa di questa tipologia di zona umida perifluviale.

### ***5.2.5 Respirazione bentica e denitrificazione nelle zone umide poco profonde ed eutrofiche.***

Quest'ultima sezione intende chiarire il ruolo del processo di denitrificazione nella mineralizzazione della materia organica alla luce del metabolismo bentico misurato e delle riflessioni sulla connessione idrologica e sulla rimozione dell'azoto.

I tassi elevati del consumo di ossigeno e la bassa riserva di ossigeno in colonna d'acqua misurati nelle zone umide poco profonde della Pianura Padana sono tipici di ambienti che rischiano l'anossia. È stato calcolato che nella stagione estiva le zone umide isolate possono diventare ipossiche ed anossiche in meno di 10 ore, soprattutto durante la notte in assenza del processo fotosintetico. Il rapporto tra flussi di SOD e di DIC permette di valutare l'importanza del metabolismo anaerobico. I flussi di SOD, corretti per la domanda di ossigeno dovuta al processo di nitrificazione, sono stechiometricamente comparabili o significativamente al di sotto dei flussi di DIC. In media circa il 77% ed il 59% dei flussi misurati di DIC, rispettivamente in estate ed in inverno, sono disaccoppiati con i corrispondenti tassi di assimilazione di O<sub>2</sub>. Gli sbilanci negli efflussi di SOD e di DIC sono tipici di ambienti acquatici eutrofici e distrofici e sono associati all'accumulo di composti ridotti nelle acque interstiziali (Ingvorsen & Brock, 1982; Capone & Kiene, 1988).

In termini di rapporto molare la denitrificazione nelle zone umide isolate rappresenta in media il 9 ed il 12% dei flussi di SOD, rispettivamente in inverno ed in estate. Negli ambienti connessi, queste percentuali aumentano al 19 ed al 25% ed in alcuni siti le moli di N<sub>2</sub> prodotto dalla denitrificazione sono comparabili alle moli di O<sub>2</sub> respirato.

L'ossigeno consumato dalla nitrificazione, calcolato come sommatoria di (2\*D<sub>N</sub> + 2\*efflussi di NO<sub>x</sub><sup>-</sup>), rappresenta una piccola frazione dei flussi di SOD: in media è circa l'11 ed il 3% dell'SOD rispettivamente in inverno ed in estate e solo il 2 e il 14% dei flussi di SOD nei siti isolati e in quelli connessi. Il consumo di ossigeno è quindi dovuto essenzialmente alla mineralizzazione aerobica del carbonio ed alla riossidazione dei prodotti finali del metabolismo anaerobico.

L'ossidazione del carbonio tramite denitrificazione, assumendo un rapporto C:N di 1.25 C: 1 N (mol:mol) (Richards, 1965), è stata stimata per valutare il contributo della denitrificazione nella mineralizzazione della sostanza organica. Non è stato considerato il processo di riduzione dissimilativa del nitrato ad ammonio perché la stechiometria del D<sub>w</sub> e della richiesta di NO<sub>x</sub><sup>-</sup> è risultata vicino ad 1, ad indicare che la respirazione del nitrato ad ammonio è un processo probabilmente di minore entità nelle aree studiate. I tassi di

denitrificazione totale misurati sono responsabili per una produzione estremamente variabile del carbonio inorganico, variando tra  $<5$  e  $450 \mu\text{mol C m}^{-2} \text{h}^{-1}$  in inverno (media dell'insieme di dati  $98 \pm 23 \mu\text{mol C m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) e tra  $11$  e  $2369 \mu\text{mol C m}^{-2} \text{h}^{-1}$  in estate (media dell'insieme di dati  $355 \pm 108 \mu\text{mol C m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ). Assumendo che i flussi di DIC rappresentino un indicatore della mineralizzazione del carbonio organico, è stato stimato che la frazione dell'ossidazione del carbonio dovuta alla denitrificazione varia tra  $<1$  e  $83\%$ , con valori medi invernale ed estivi rispettivamente di  $7.7$  e  $13\%$ . Nei siti connessi questa frazione è risultata ecologicamente significativa ( $10$  to  $83\%$ ), mentre in quelli isolati è trascurabile, minore del  $5\%$ . Da queste evidenze consegue che nelle zone umide perifluviali connesse la denitrificazione è un processo significativo (1) per la rimozione dell'azoto da acque inquinate da  $\text{NO}_3^-$  e (2) come processo respiratorio responsabile di una frazione significativa della mineralizzazione del carbonio. Risultati simili sono stati riportati da Yoon & Benner (1992) e da Laursen & Seitzinger (2002) per estuari ed ambienti marini poco profondi e per zone umide d'acqua dolce ripariali (Seitzinger, 1994).

### 5.3 Conclusione

Il processo di denitrificazione può essere un importante pathway nel ciclo dell'azoto e una componente significativa della respirazione bentica in zone umide perifluviali poco profonde connesse ai fiumi. In questo lavoro la denitrificazione è risultata essere sostenuta quasi del tutto dalla diffusione del nitrato verso i sedimenti anossici dalla colonna d'acqua, che è in primo luogo regolata dalla disponibilità di nitrato e dalla temperatura. I valori misurati si sovrappongono a quelli riportati in letteratura e per un ampio intervallo di tassi (da  $<5$  a  $140 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) possono essere predetti da un semplice modello di diffusione. La denitrificazione accoppiata alla nitrificazione è risultata in genere bassa, probabilmente a causa della scarsa disponibilità di ossigeno all'interno dei sedimenti.

Nei siti idrologicamente isolati, la denitrificazione è risultata un processo trascurabile con il prevalere del processo di rigenerazione dell'ammonio rispetto a quello di rimozione del nitrato. Questo può incrementare la produttività primaria, l'interramento e forse alla fine il cambiamento di questi ambienti temporanei verso condizioni più terrestri, perché il processo di esportazione/rimozione della materia organica nuovamente generata è molto basso.

Carichi pulsanti di nitrato hanno stimolato immediatamente il processo indicando che tutti gli ambienti studiati possiedono un potenziale più o meno espresso per una più alta rimozione dell'azoto. In aree come la Pianura Padana, dove la contaminazione da nitrato delle acque superficiali e di falda è una questione chiave, le azioni di gestione dovrebbero essere indirizzate a facilitare la connessione laterale tra fiumi e habitat acquatici perifluviali al fine di migliorare la rimozione dell'azoto tramite denitrificazione.

## **6 TRASPORTO DI OSSIGENO NEL SEDIMENTO E DENITRIFICAZIONE-NITRIFICAZIONE NEL TRATTO NORD DEL FIUME MINCIO COLONIZZATO DA VALLISNERIA SPIRALIS L.**

### **6.1 Colonizzazione di sedimenti organici da parte di una macrofita radicata (*Vallisneria spiralis*): implicazioni per lo stato redox del sedimento e il chimismo delle acque interstiziali**

#### **6.1.1 Risultati**

##### *6.1.1.1 Caratteristiche delle acque, del sedimento e della vegetazione*

La qualità delle acque nelle due vasche di incubazione è rimasta piuttosto costante durante tutto il periodo dell'esperimento (tab. 6.1). Le concentrazioni di  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SiO}_2$ , DIC,  $\text{O}_2$ , l'Eh ed il pH non sono risultate statisticamente diverse tra le due vasche; al contrario la concentrazioni del  $\text{NO}_3^-$  è risultata 4 volte più alta nel sito D rispetto al sito U, probabilmente a causa del rilascio di acque ricche di nitrato dall'impianto di trattamento delle acque reflue urbane. Lo ione ammoniacale ha rappresentato una frazione minima dell'azoto inorganico disciolto (DIN) ed in particolare il 4 e il 10% del DIN, rispettivamente per il sito D e per il sito U. Nonostante il continuo rimescolamento delle acque, la  $\text{CO}_2$  è risultata costantemente sovra satura in entrambi i siti con valori più alti nel sito D. Le acque delle due vasche sono risultate ben ossigenate, con potenziali redox positivi e concentrazioni di  $\text{CH}_4$  disciolto non rilevabili (dati non riportati).

**Tabella 6.1** Caratteristiche chimico-fisiche delle acque nelle due vasche di incubazione. Sono riportate le medie e gli errori standard dell'insieme di dati (n=8) dell'intero periodo dell'esperimento.

	<b>T</b> (°C)	<b>pH</b>	<b>CO<sub>2</sub></b> (%)	<b>O<sub>2</sub></b> (%)	<b>Eh</b> (mV)	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> (µM)	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> (µM)	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b> (µM)	<b>SiO<sub>2</sub></b> (µM)
U	19.6±0.6	8.3±0.1	506±47	95.5±1.7	260.4±20.8	18.4±1.9	2.4±1.3	0.3±0.3	15.3±0.7
D	19.4±0.6	8.1±0.1	872±69	90.6±0.8	249.4±9.9	77.8±2.6	2.9±1.6	0.4±0.2	23.6±0.5

In entrambi i siti di campionamento i sedimenti di natura fangosa hanno presentato valori simili di densità; quelli del sito a valle dell'impianto di depurazione sono risultati più organici e caratterizzati da un contenuto di azoto e fosforo più alto così come l'abbondanza isotopica  $\delta^{15}\text{N}$  rispetto ai sedimenti del sito a monte (tab. 6.2).

**Tabella 6.2** Caratteristiche del sedimento usato per i microcosmi (media±errore standard, n=3).

	<b>Densità (g cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Porosità</b>	<b>OM (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b><math>\delta^{15}\text{N}</math> (‰)</b>	<b>P (%)</b>
U	1.2±0.0	0.4±0.0	6.2±0.3	0.23±0.01	3.91±0.60	0.05±0.00
D	1.3±0.0	0.4±0.0	11.0±0.1	0.58±0.01	7.14±0.02	0.07±0.00

Come risultato netto della perdita e del rinnovo delle foglie, la biomassa di *V. spiralis* non è cambiata durante l'incubazione, ma è rimasta piuttosto costante e simile nelle due condizioni sperimentali (tab. 6.3); anche i rapporti tra radici e foglie sono stati simili ed in media di 0.42±0.13. Non è stata trovata nessuna differenza significativa tra il contenuto di carbonio ed di azoto nella pianta tra i due siti di indagine ( $P>0.05$ , ANOVA); in generale il contenuto di azoto nelle radici è risultato più basso rispetto a quello nelle foglie. I rapporti C:N nel tessuto della macrofita non sono cambiati in modo significativo durante l'esperimento indicando che la crescita della pianta è stata garantita dalla sufficiente disponibilità di azoto in colonna d'acqua e nelle acque interstiziali e che non ci sono stati fenomeni di diluizione del contenuto di azoto all'interno della biomassa della pianta.

Gli individui di *V. spiralis* raccolti a valle dell'impianto di depurazione hanno mostrato valori significativamente più alti di  $\delta^{15}\text{N}$  sia nelle foglie che nelle radici, evidenziando un arricchimento dell'azoto determinato dall'assimilazione del pool arricchito- $^{15}\text{N}$  del nitrato rilasciato dalle acque di scarico dell'impianto di depurazione in fiume. Anche il contenuto totale di fosforo è risultato significativamente più alto nelle foglie e nelle radici delle piante raccolte nella stazione D rispetto alla stazione U ( $P<0.05$ , ANOVA, tab. 6.3).

**Tabella 6.3** Biomassa, contenuto totale di carbonio, azoto e fosforo,  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  e rapporto molare nelle foglie e nelle radici di *V. spiralis* raccolta dai microcosmi di U e di D (media±errore standard, n=7). UL= stazione a monte, foglie; UR= stazione a monte, radici; DL= stazione a valle, foglie, DR= stazione a valle, radici.

	<b>Biomassa</b> (g <sub>dw</sub> )	<b>C</b> (%)	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b> (‰)	<b>N</b> (%)	<b><math>\delta^{15}\text{N}</math></b> (‰)	<b>P</b> (%)	<b>C:N:P</b> (mol:mol)
UL	0.15±0.02	31.6±1.7	-16.3±0.6	3.0±0.1	4.4±0.3	0.31±0.0	264:21:1
UR	0.06±0.01	31.6±0.9	-16.1±0.6	2.5±0.2	3.9±0.5	0.29±0.0	281:19:1
DL	0.16±0.02	33.8±0.9	-20.2±0.3	3.1±0.1	9.9±0.4	0.48±0.1	182:14:1
DR	0.06±0.01	33.3±1.5	-19.1±0.6	2.6±0.1	11.1±0.7	0.50±0.1	172:12:1

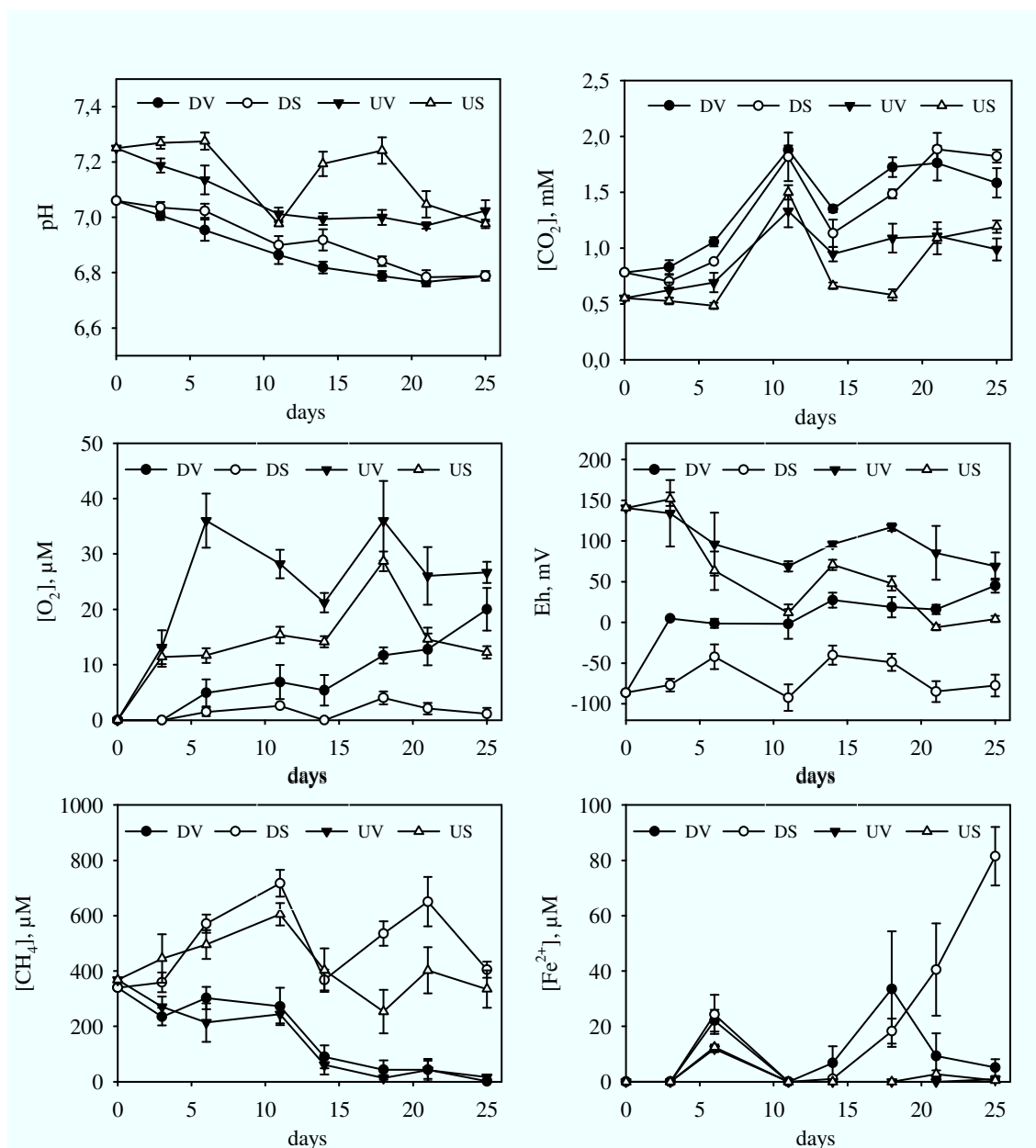
#### 6.1.1.2 Chimica delle acque interstiziali dei sedimenti nudi e vegetati

Tutti i dati relativi all'acqua interstiziale integrano lo strato di sedimento dei primi 5 cm, che in generale include lo strato ossico all'interfaccia sedimento-acqua e la maggior parte della rizosfera. Cambiamenti temporali delle variabili principali sono riportate nelle figure 6.1 e 6.2. I risultati statistici sono riassunti nelle tabelle 6.4 e 6.5.

Durante l'incubazione, il pH è diminuito leggermente in tutti i trattamenti, con valori più bassi nei sedimenti vegetati e nel sito a valle. Di conseguenza le concentrazioni di CO<sub>2</sub> disciolta, calcolate dai dati del carbonio inorganico disciolto e del pH, sono state più alte nel sito D e nei sedimenti vegetati rispetto a quelli nudi.

Sia il carico della sostanza organica del sedimento sia la colonizzazione di *V. spiralis* hanno influenzato significativamente l'evoluzione dell'O<sub>2</sub> nelle acque interstiziali come evidenziato dalle chiare differenze tra trattamenti e stazioni di campionamento: UV>US>DV>DS.

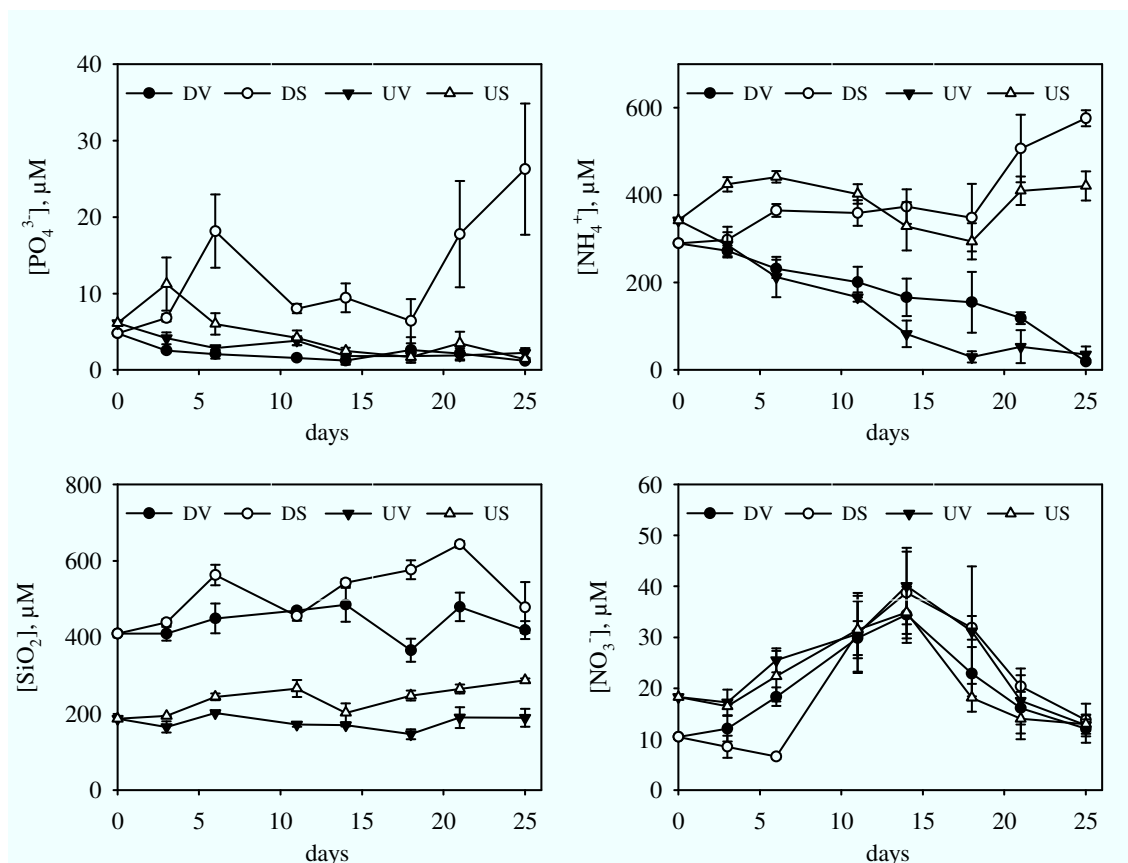
Nei microcosmi UV, la concentrazione media dell'O<sub>2</sub> delle acque interstiziali è variata tra 20 e 40 µM, mentre quelle nei microcosmi DV è aumentata in modo quasi lineare da 0 fino a 20 µM. Al contrario nei microcosmi DS l'O<sub>2</sub> è rimasto al di sotto di 5 µM. I valori Eh hanno mostrato andamenti simili con una chiara distinzione tra sito a valle e quello a monte, e tra sedimento nudo e sedimento vegetato. Complessivamente, nei microcosmi DS le condizioni riducenti hanno determinato un Eh < -50mV, mentre nei microcosmi UV l'Eh è sempre rimasto maggiore di +50 mV data la condizione stabile di ossidazione.



**Figura 6.1** Evoluzione dei parametri pH, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, Eh, CH<sub>4</sub> and Fe<sup>2+</sup> nelle acque interstiziali durante il periodo di incubazione di 25 giorni. DV= stazione a valle, sedimento vegetato; DS= stazione a valle, sedimento nudo; UV= stazione a valle, sedimento vegetato; US= stazione a valle, sedimento nudo (media±errore standard, n=3).

In entrambi i siti D ed U, le concentrazioni del CH<sub>4</sub> disciolto hanno seguito un pattern differente tra il sedimento nudo e quello vegetato, con valori piuttosto costanti ed elevati nelle acque interstiziali dei sedimenti senza piante, fino a 700 μM, ed una progressiva scomparsa del gas nei sedimenti colonizzati da *V. spiralis* (fig. 6.1, tab. 6.4 e tab. 6.5). Le macrofite hanno esercitato un controllo significativo anche sulle concentrazioni di NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: in UV ed in DV l'andamento è risultato decrescente e le concentrazioni hanno raggiunto valori prossimi al limite di rilevabilità; al contrario in US and DS esse sono rimaste piuttosto costanti.

Le concentrazioni di  $\text{Fe}^{2+}$  e di  $\text{PO}_4^{3-}$  disciolti sono risultate non quantificabili od estremamente basse nella maggior parte dei campioni analizzati. Il pattern del  $\text{Fe}^{2+}$  è apparso piuttosto irregolare per DV, UV ed US, con un accumulo occasionale nel corso dell'esperimento; nel sito DS, invece, la concentrazione dello ione è aumentata progressivamente dal giorno 14 alla fine dell'esperimento. Le concentrazioni di  $\text{PO}_4^{3-}$  sono risultate in genere al di sotto di  $5 \mu\text{M}$  con una tendenza alla diminuzione verso  $1 \mu\text{M}$  nelle acque interstiziali di DV, UV e US. Come per il  $\text{Fe}^{2+}$ , nei microcosmi DS le concentrazioni di  $\text{PO}_4^{3-}$  sono risultate più alte ed hanno mostrato un pattern crescente nell'ultima parte dell'esperimento, sovrapponendosi a quello del  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura 6.2** Evoluzione delle concentrazioni di  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{NO}_3^-$  nelle acque interstiziali durante il periodo di incubazione di 25 giorni. DV= stazione a valle, sedimento vegetato; DS= stazione a valle, sedimento nudo; UV= stazione a valle, sedimento vegetato; US= stazione a valle, sedimento nudo (media $\pm$ errore standard, n=3).

Le concentrazioni della  $\text{SiO}_2$  disciolta sono risultate circa due volte più alte nella stazione D rispetto alla U; durante l'esperimento i valori sono incrementati nei sedimenti nudi e sono rimasti costanti nei sedimenti vegetati.

Le concentrazioni di  $\text{NO}_3^-$  sono aumentate fino a  $40 \mu\text{M}$  nella prima metà del periodo di incubazione per poi diminuire ai valori iniziali di circa  $10 \mu\text{M}$ . Nessuna differenza

statisticamente significativa è stata trovata tra i siti e tra i trattamenti, così come non è stata evidenziata nessuna relazione con la presenza della macrofita.

Per riassumere, in entrambi i siti *V. spiralis* ha controllato le concentrazioni nelle acque interstiziali di  $\text{CH}_4$  e  $\text{NH}_4^+$  e ha promosso condizioni ossidanti dei sedimenti, prevenendo l'accumulo di  $\text{PO}_4^{3-}$  e di  $\text{Fe}^{2+}$  all'interno degli stessi. L'evoluzione di Eh,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  nelle acque interstiziali dei sedimenti nudi sono state differenti tra i due siti di campionamento, suggerendo più alti tassi di respirazione e condizioni più riducenti a valle, in accordo con il contenuto di sostanza organica significativamente più alto.

**Tabella 6.4** Regressione lineare tra le variabili dell'acqua ed il tempo nelle quattro condizioni sperimentali (US= a monte, sedimento; UV= a monte, sedimento con *V. spiralis*; DS= a valle, sedimento, DV= a valle, sedimento con *V. spiralis*; NS= non significativo).

	Condizione	Intercetta	Pendenza	P	R <sup>2</sup>
pH	US	7.27	-0.01	<0.01	0.35
	UV	7.20	-0.01	<0.001	0.62
	DS	7.07	-0.01	<0.001	0.85
	DV	7.03	-0.01	<0.001	0.82
CO <sub>2</sub>	US	0.54	0.02	<0.01	0.24
	UV	0.65	0.02	<0.01	0.35
	DS	0.72	0.05	<0.001	0.64
	DV	0.89	0.04	<0.001	0.58
O <sub>2</sub>	US	7.38	0.50	<0.01	0.27
	UV	13.87	0.78	<0.05	0.23
	DS	-	-	NS	-
	DV	0	0.73	<0.001	0.69
Eh	US	130	-5.69	<0.001	0.65
	UV	127	-2.14	<0.05	0.14
	DS	-	-	NS	-
	DV	-39	3.43	<0.001	0.51
CH <sub>4</sub>	US	-	-	NS	-
	UV	329	-14.29	<0.001	0.73
	DS	-	-	NS	-
	DV	338	-14.08	<0.001	0.72
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	US	-	-	NS	-
	UV	310	-12.96	<0.001	0.81
	DS	270	9.79	<0.001	0.50
	DV	300	-9.61	<0.001	0.70
SiO <sub>2</sub>	US	0.20	0.003	<0.001	0.44
	UV	-	-	NS	-
	DS	0.45	0.005	<0.05	0.22
	DV	-	-	NS	-

**Tabella 6.5 Livelli di significatività dell'analisi dei contrasti: sedimento vegetato versus sedimento nudo (V vs S); sedimento vegetato del sito a monte versus quello del sito a valle dell'impianto di depurazione (UV vs DV) e sedimento nudo del sito a monte versus quello del sito a valle dell'impianto di depurazione (US vs DS). Le pendenze confrontate nell'analisi dei contrasti, calcolate mediante l'ANCOVA, sono riportate in tabella 6.4.**

	V vs S	UV vs DV	US vs DS
pH	n.s.	n.s.	n.s.
CO <sub>2</sub>	n.s.	n.s.	<0.05
O <sub>2</sub>	<0.01	n.s.	n.s.
Eh	<0.001	<0.001	<0.001
CH <sub>4</sub>	<0.001	n.s.	<0.05
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<0.001	n.s.	<0.001
SiO <sub>2</sub>	<0.01	n.s.	n.s.

## 6.1.2 *Discussione*

### 6.1.2.1 *ROL e caratteristiche del sedimento dipendenti dalle condizioni redox*

Nel fiume Mincio *V. spiralis* colonizza i substrati fangosi dove l'arricchimento in sostanza organica alimenta attività di respirazione intense (Pinardi et al., 2009). In queste condizioni la sopravvivenza delle macrofite sommerse dipende dalla stessa abilità delle piante nel trasportare ossigeno verso la rizosfera. La perdita di ossigeno dalle radici attraverso l'arenchima (ROL, radial oxygen loss) avviene con meccanismi diversi in piante acquatiche emergenti, flottanti e sommerse (Armstrong, 1964; Armstrong, 1971; Vartapetian et al., 1970; Dacey, 1980; Sand-Jensen et al., 1982; Carpenter et al., 1983; Smith et al., 1984; Moorhead & Reddy, 1988; Laskov et al., 2006; Soda et al., 2007). Il ROL delle piante flottanti od emergenti è in genere più intenso di quello di macrofite sommerse a causa dell'alta pressione parziale dell'ossigeno atmosferico (Dacey, 1980; Armstrong & Armstrong 1988; Große, 1996). Nelle piante sommerse, il ROL rappresenta una piccola frazione dell'ossigeno totale prodotto dal processo fotosintetico, perché queste piante utilizzano una grande quota di ossigeno per la respirazione delle radici e dei tessuti sommersi (Sand-Jensen & Prah, 1982; Kemp et al., 1986).

A mia conoscenza, il trasporto di ossigeno verso le radici non è ancora stato misurato per la specie *V. spiralis*, sebbene Pinardi et al. (2009) abbiano già fornito, attraverso il calcolo dei quozienti fotosintetici, una stima indiretta del trasporto di ossigeno verso la rizosfera di *V. spiralis*. Nel presente lavoro, misure dirette di ossigeno nelle acque interstiziali hanno dimostrato che le concentrazioni sono significativamente più alte nei sedimenti vegetati rispetto ai sedimenti nudi. Nelle praterie di *V. spiralis* uno strato di sedimento chiaro è stato

evidenziato intorno ai peli radicali, con uno spessore da 1 a 2 cm, contrastando con il colore scuro e marrone del sedimento circostante (osservazioni visive).

Le concentrazioni di ossigeno più basse nelle acque interstiziali del sito D sono probabilmente dovute all'arricchimento organico generato dallo scarico dell'impianto di depurazione. Qui la decomposizione della sostanza organica ha causato condizioni di ipossia e soprattutto nel sedimento nudo ha generato potenziali redox negativi, accompagnati dal rilascio di  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  verso le acque interstiziali, caratteristica tipica dei sedimenti altamente riducenti (Hejris et al., 2000; Azzoni et al., 2005). Nel complesso la concentrazione di ossigeno ed il potenziale redox sono risultati significativamente più alti nei sedimenti vegetati mostrando, che il ROL di *V. spiralis* è stato in grado di mantenere condizioni ossiche nella rizosfera.

Il ROL ha una varietà di effetti secondari sull'acqua interstiziale tra cui l'aumento dei tassi di ossidazione del  $\text{CH}_4$  (Carpenter et al., 1983; Jespersen et al., 1998; Gerard & Chanton, 1993; van der Nat & Middelburg, 1998; Heilman & Carlton, 2001), del ferro e del manganese, con formazione di deposizioni metalliche sulle radici della piante e in parallelo sequestro e precipitazione del fosforo reattivo solubile, principalmente con idrossidi di ferro (Roden & Wetzel, 1996; Wigand et al., 1997).

Wigand et al. (2000) hanno dimostrato che *Vallisneria americana* Michaux presenta un elevato ROL che incrementa i valori di Eh fino a +125mV, permettendo la formazione di deposizioni di ferro sulle radici. Il fosforo inorganico viene quindi legato dagli ossidi di ferro e precipita dall'acqua interstiziale. Inoltre, in condizioni ossiche le associazioni simbiotiche tra le radici di *V. americana* e i funghi facilitano anche l'assimilazione di fosforo generando un vantaggio competitivo per *V. americana* (Wigand et al., 1997).

I risultati di questo lavoro sono coerenti con le precedenti conclusioni e indicano che la colonizzazione di *V. spiralis* influisce in modo significativo sullo stato redox del sedimento, limitando sia gli efflussi di  $\text{CH}_4$  sia il rilascio di  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{NH}_4^+$  dalle acque interstiziali verso la colonna d'acqua.

Questi risultati sono stati dimostrati per i sedimenti vegetati di entrambi i siti, che differiscono in modo consistente per il contenuto di sostanza organica. Indagini precedenti hanno dimostrato che la vegetazione bentica può controllare i processi biogeochimici del sedimento solo in sistemi oligotrofici, al contrario in condizioni eutrofiche si è pensato che il ROL fosse compensato da una elevata domanda respiratoria (Sand-Jensen & Borum, 1991; Hemminga, 1998). I risultati di questo studio mettono in discussione queste conclusioni, poiché gli effetti di *V. spiralis* sulle caratteristiche delle acque interstiziali sembrano non dipendere dal carico organico.

Studi sui processi biogeochimici della silice a livello di sedimento sono piuttosto scarsi ed in genere indirizzati alla relazione con le diatomee bentiche (Sigmon & Cahoon, 1997) e con poche specie macrofite (Ma et al., 2001). In ecosistemi dominati da macrofite il ciclo della

silice è principalmente controllato dall'assimilazione, dalla ritenzione e dal processo di decomposizione (Struyf & Conley, 2009). In questo studio, le concentrazioni più elevate nel sito D sono probabilmente dovute all'effetto del trasporto a valle del materiale prodotto internamente al fiume (e.g. diatomee), sebbene non sia da trascurare l'impatto degli effluenti dell'impianto di depurazione. Differenze tra sedimenti vegetati e non vegetati potrebbero essere dovute alla mobilitazione della silice dal particolato, processo dipendente dalle condizioni redox (Michalopoulos & Aller, 1995) o dall'assimilazione da parte delle piante.

#### 6.1.2.2 *Speciazione dell'azoto e processi nella rizosfera*

In genere le macrofite acquatiche assimilano  $\text{NH}_4^+$  dalle acque interstiziali, dove questo ione rappresenta la forma dominante di azoto. Ciononostante in acque ricche di  $\text{NO}_3^-$  la vegetazione sommersa può assimilare anche  $\text{NO}_3^-$  dalle fronde (Cedergreen & Madsen, 2003). Le piante di *V. spiralis* usate in questo esperimento sono state raccolte in due siti caratterizzati da diverse concentrazioni di  $\text{NO}_3^-$  nella colonna d'acqua (quattro volte più alte nella stazione D) e sono state incubate simulando la disponibilità di azoto in condizioni naturali. Una delle ipotesi di questo esperimento è stata testare se in un sistema di acqua corrente caratterizzato da un'elevata disponibilità di  $\text{NO}_3^-$ , l'assimilazione da parte delle foglie potesse essere stimolata e quindi ridurre l'importanza delle radici nell'assimilazione dell' $\text{NH}_4^+$  dalle acque interstiziali. Durante l'esperimento, l' $\text{NH}_4^+$  nelle acque interstiziali è diminuito a valori non rilevabili, senza alcuna differenza significativa tra il sito a monte e quello a valle dell'impianto di depurazione. Questo risultato ha indicato che la più alta disponibilità di  $\text{NO}_3^-$  in colonna d'acqua nella stazione D non ha influenzato l'assimilazione dell' $\text{NH}_4^+$  nella rizosfera. Nel sedimento nudo, l' $\text{NH}_4^+$  delle acque interstiziali ha probabilmente rappresentato la risultante netta dei processi di ammonificazione e di nitrificazione. Comunque, nei sedimenti vegetati sia il processo di ammonificazione che quello di nitrificazione dell'ammonio potrebbero essere stimolati dal ROL (Risgaard-Petersen & Jensen, 1997). Il  $\text{NO}_3^-$  invece è stato inizialmente accumulato nelle acque interstiziali e successivamente è diminuito senza andamenti diversi tra sedimenti vegetati e sedimenti nudi e tra i due siti. Questi risultati suggeriscono che il processo di nitrificazione associato alla rizosfera non è stato quantitativamente rilevante oppure che, se è stato stimolato dalla ROL, allora c'è stato uno stretto accoppiamento tra nitrificazione e denitrificazione. In condizioni naturali, l'ammonificazione può anche essere stimolata all'interno dei letti della macrofita perché le fronde agiscono da trappola del particolato organico favorendo la sua sedimentazione e la successiva decomposizione nel sedimento superficiale (Sand-Jensen, 1998). Nei microcosmi in laboratorio, gli input del materiale particolato sono stati molto più bassi rispetto alle condizioni naturali, quindi l'ammonificazione della materia organica importata può essere risultata trascurabile, senza alcuna differenza tra sedimento vegetato e nudo.

Il confronto della firma isotopica dei tessuti della pianta ha evidenziato differenze tra siti a monte e a valle dell'impianto di depurazione, che hanno suggerito una possibile assimilazione dell'azoto da parte delle foglie. Le acque reflue urbane possiedono una marcatura isotopica diversa dallo standard atmosferico a causa della volatilizzazione preferenziale dell'isotopo  $^{14}\text{NH}_3$  durante il processo di depurazione delle acque. Per questo motivo, il  $\text{NO}_3^-$  risultante dai processi di ossidazione presenta un arricchimento in  $^{15}\text{N}$ , in media tra +2 e +30‰ (Macko & Orstom, 1994). Questo potrebbe essere la ragione dell'elevato  $\delta^{15}\text{N}$  della biomassa di *V. spiralis* nel sito D, che può essere dovuto all'assimilazione da parte delle foglie del nitrato derivante dagli effluenti dell'impianto di trattamento arricchito in  $^{15}\text{N}$ . L'influenza di questa sorgente antropica di azoto nel sito a valle è stata anche riscontrata nei diversi valori di  $\delta^{13}\text{C}$  (Grice et al., 1996), indicando che la produttività primaria è stata probabilmente stimolata nel sito D.

Un arricchimento significativo di  $^{15}\text{N}$  è stato evidenziato anche nelle particelle del sedimento del sito D che riceve effluenti dell'impianto di depurazione da più di venti anni, rendendo il sedimento stesso una possibile sorgente di  $^{15}\text{N}$  per *V. spiralis*. Allo stesso tempo anche le microalghe epifitiche possono assimilare  $^{15}\text{N}$  dalla colonna d'acqua e l'azoto contenuto nella biomassa può essere compreso nell'azoto totale del sedimento misurato.

Attualmente i dati non sono sufficienti per distinguere tra assimilazione da parte delle foglie ed assimilazione da parte delle radici. E' possibile comunque presupporre che l'assimilazione fogliare dell'azoto dalla colonna d'acqua avvenga anche in uno stadio avanzato del processo di colonizzazione, quando la richiesta di azoto da parte della macrofita eccede la sua disponibilità nelle acque interstiziali.

In base a questi risultati è possibile supporre che l'assimilazione dell' $\text{NH}_4^+$  da parte delle radici di *V. spiralis* sia stata la principale causa della diminuzione della concentrazione di  $\text{NH}_4^+$  nelle acque interstiziali. E' possibile anche ipotizzare che, come riportato per molte altre macrofite acquatiche, *V. spiralis* abbia assimilato in via preferenziale  $\text{NH}_4^+$  anche se esposta ad elevate concentrazioni di  $\text{NO}_3^-$  nella colonna d'acqua. Nei primi stadi della colonizzazione del sedimento *V. spiralis* ha quindi avuto un ruolo importante nel controllare  $\text{NH}_4^+$ , attenuando in questo modo il suo contenuto nelle acque interstiziali e la sua possibile rilascio verso la colonna d'acqua. *V. spiralis* ha evidenziato la capacità di controllare i processi nelle acque interstiziali anche nella stazione D caratterizzata da un elevato carico organico, simile ad ambienti altamente eutrofici. Discutendo le precedenti indagini che hanno ipotizzato che la vegetazione sommersa può controllare i processi bentici solo in condizioni oligotrofiche, questi risultati suggeriscono che *V. spiralis* ha la capacità di colonizzare sedimenti eutrofici, operando come agente attivo in grado di modificare e controllare la composizione delle acque interstiziali.

## 6.2 Misura dei tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione nella rizosfera di *V. spiralis*

### 6.2.1 Risultati

#### 6.2.1.1 Condizioni fisiche e chimiche *in situ* e di incubazione e caratteristiche biologiche dei mesocosmi

La temperatura delle acque di fondo e l'intensità luminosa a cui sono stati incubati i mesocosmi rispecchia quella misurata *in situ* durante i campionamenti nelle stagioni primavera, estate ed autunno alle ore 12.00 (tab. 6.6).

**Tabella 6.6** Temperatura dell'acqua di fondo e intensità luminosa *in situ* riprodotta durante l'incubazione dei mesocosmi nel sito U e D per le tre stagioni di campionamento. Per gli stessi periodi sono riportati le concentrazioni dell'azoto ammoniacale e nitrico in colonna d'acqua, il valore medio del contenuto di sostanza organica nel sedimento (OM) e della biomassa fogliare e di quella radicale (media±errore standard, n=4).

Sito	Stagione	Temperatura	Irradianza	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	OM	Biomassa fogliare	Biomassa radicale
		(°C)	(μE m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	(μM)	(μM)	%	(g dw m <sup>-2</sup> )	(g dw m <sup>-2</sup> )
U	Primavera	17	600	75.3	8.9	6.6±0.2	303.4 ± 28.9	193.9 ± 14.3
	Estate	24	1100	62.9	2.9	6.1±0.1	324.3 ± 72.7	55.6 ± 9.8
	Autunno	14	300	310.5	2.3	6.4±0.1	243.5 ± 37.9	119.8 ± 25.5
D	Primavera	17	600	13.5	4.9	10.3±0.3	154.7 ± 14.4	126.9 ± 17.2
	Estate	24	1100	3.7	2.8	10.5±0.2	503.4 ± 65.4	85.8 ± 13.4
	Autunno	14	300	58.6	6.2	9.9±0.2	186.8 ± 36.5	77.9 ± 12.3

L'andamento della temperatura risulta influenzato dall'intensità luminosa stagionale, le concentrazioni di azoto nitrico sono minori in estate e raggiungono un massimo in autunno, riflettendo lo sfruttamento prettamente agricolo e zootecnico del territorio circostante. Il sito D possiede concentrazioni di nitrato e di contenuto di sostanza organica significativamente maggiore rispetto al sito U (rispettivamente P<0.05 e P<0.001, t di Student). La concentrazione di ammoniaca non presenta alcun andamento stagionale e nessuna differenza tra siti. Dopo 20 giorni di acclimatazione dei mesocosmi *in situ*, il valore medio della biomassa totale di *V. spiralis* nel sito U ha una tendenza a diminuire dalla primavera all'estate, al contrario nel sito D il massimo di biomassa è raggiunto in estate (589.2±76.3 g dw m<sup>-2</sup>). Comunque in entrambi i siti risulta che nella stagione estiva la frazione di biomassa

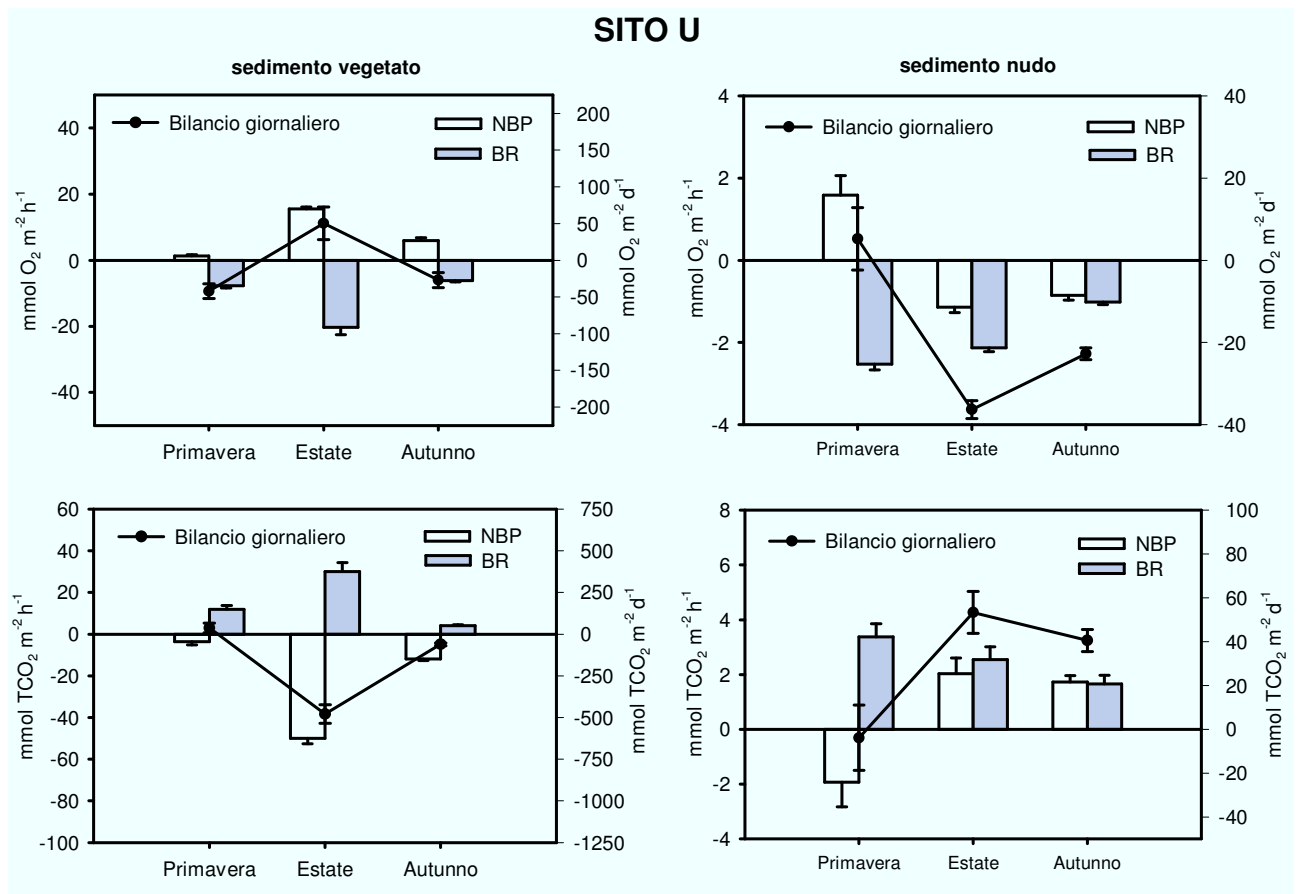
radicale rappresenti circa il 18% della biomassa totale, quando nelle restanti stagioni tale frazione è sempre maggiore del 50%.

#### 6.2.1.2 *Flussi dell'ossigeno e del carbonio inorganico disciolto*

La respirazione bentica (BR) e la produzione bentica netta (NBP) sono rappresentate in figura 6.3 e 6.4, rispettivamente per il sito U e per il sito D, distinguendo i processi tra sedimento vegetato da *V. spiralis* e sedimento nudo per le tre stagioni di campionamento. I flussi di ossigeno e del carbonio inorganico disciolto risultano dipendere da molteplici fattori, dato che i termini di interazione sono altamente significativi (tabella 6.7). In ogni periodo di campionamento i flussi del sedimento vegetato sono risultati più alti di un ordine di grandezza rispetto a quelli del sedimento nudo e hanno mostrato valori massimi nella stagione estiva (fig. 6.3, fig. 6.4 e tabella 6.7).

Nel sito U, la respirazione bentica del sedimento nudo è variata tra  $-2.52 \pm 0.14 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  e  $-1.01 \pm 0.06 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , rispettivamente in primavera ed in autunno; mentre nel sito D ha raggiunto il valore massimo in estate,  $-2.58 \pm 0.20 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , e quello minimo in primavera,  $-0.86 \pm 0.06 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Durante la stagione primaverile la produzione bentica netta è risultata opposta e comparabile ai tassi di respirazione, probabilmente a causa del prevalere del processo fotosintetico del microfitobenthos rispetto alla respirazione bentica in condizioni di luce. Il bilancio giornaliero dell'ossigeno ha avuto un andamento stagionale con il deficit massimo misurato in estate e coincidente con il più alto valore di temperatura ( $-36.8 \pm 2.14 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  nel sito U e  $-33.53 \pm 3.02 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  nel sito D).

Nei sedimenti colonizzati da *V. spiralis* i bilanci giornalieri dell'ossigeno sono risultati massimi durante il periodo estivo con valori pari a  $50.3 \pm 22.1$  e  $151.8 \pm 21.9 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  misurati rispettivamente nel sito U e nel sito D. In tutte le date di campionamento, nelle incubazioni alla luce, la stechiometria  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (quoziente fotosintetico, PQ) indica una produzione di ossigeno in colonna d'acqua decisamente inferiore alle quantità di carbonio fissata. Questo risultato è probabilmente dovuto al trasporto di ossigeno attraverso il tessuto parenchimatico all'apparato radicale e quindi alla rizosfera negli strati più profondi del sedimento.

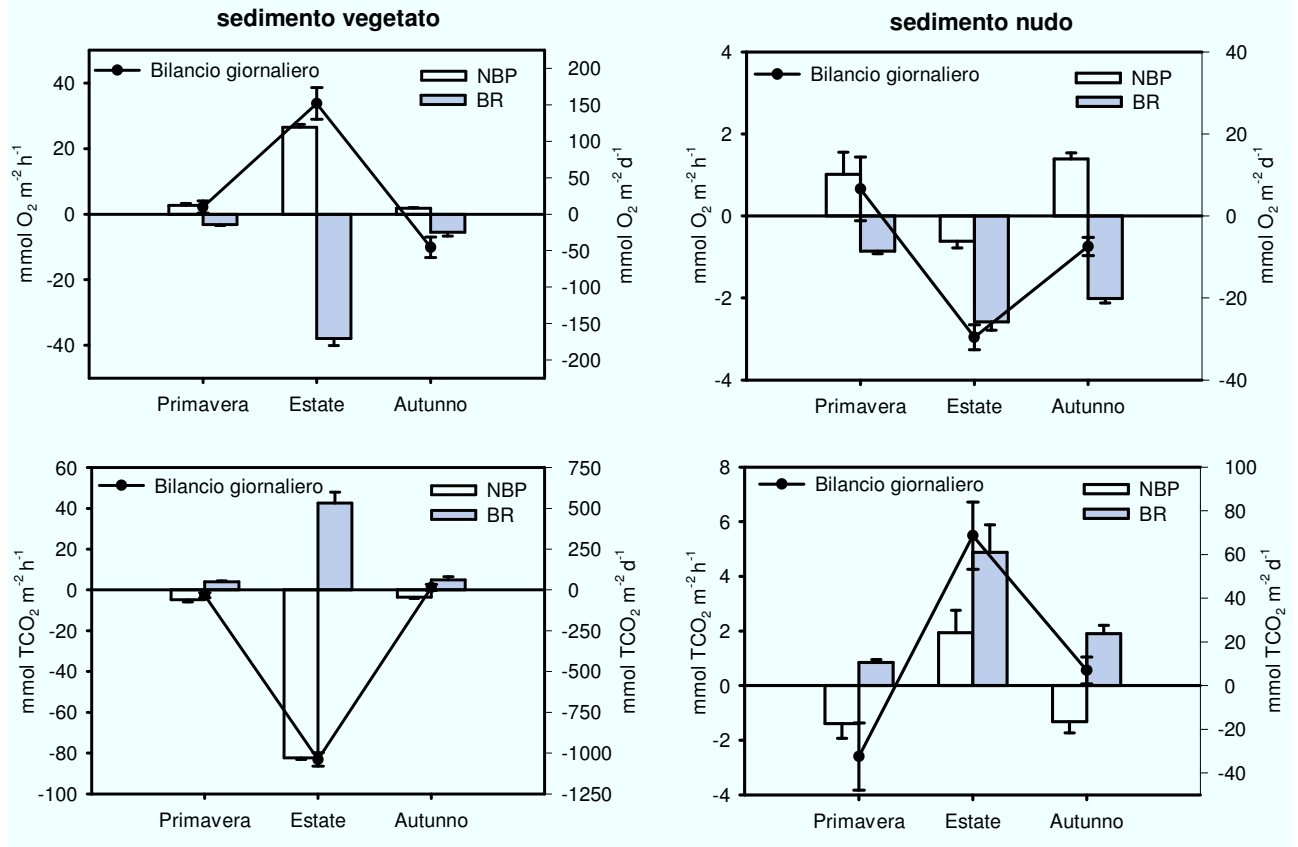


**Figura 6.3** Produzione bentica netta oraria (NBP), respirazione bentica oraria (BR) e bilancio giornaliero nei sedimenti in presenza ed in assenza di *V. spiralis* appartenenti al sito U (a monte dell'impianto di depurazione di Peschiera) del fiume Mincio. Le misure derivano da flussi di ossigeno disciolto (O<sub>2</sub>) e flussi di carbonio inorganico disciolto (DIC) attraverso incubazioni di carote intatte alla luce ed al buio. Notare le scale differenti tra sedimenti vegetati e non. I valori sono riportati come media±errore standard (n=4).

Le percentuali di ossigeno rilasciate nella colonna d'acqua sono circa 34%, 31% e 49% dell'ossigeno prodotto attraverso la fotosintesi nel sito U e 57%, 32% e 49% nel sito D, rispettivamente per la stagione primaverile, estiva ed autunnale per entrambi i siti. I flussi di ossigeno e del carbonio inorganico disciolto alla luce sono risultati significativamente differenti nelle tre stagioni di campionamento in relazione alla biomassa totale e alla disponibilità di luce (rispettivamente  $P < 0.05$  e  $P < 0.5$ , ANOVA a due vie), dai quali dipendono secondo un modello lineare (rispettivamente  $R^2 = 0.67$  e  $R^2 = 0.65$ ).

Anche i tassi di produzione netta e di respirazione della sola macrofita *V. spiralis*, ottenuti correggendo i flussi totali per il contributo dei sedimenti e normalizzando per la biomassa, risultano differire per il fattore stagione ( $P < 0.001$  alla luce e  $P < 0.01$  al buio, ANOVA a due vie); il fattore sito non è risultato discriminare alcuna differenza significativa tra i flussi.

## SITO D



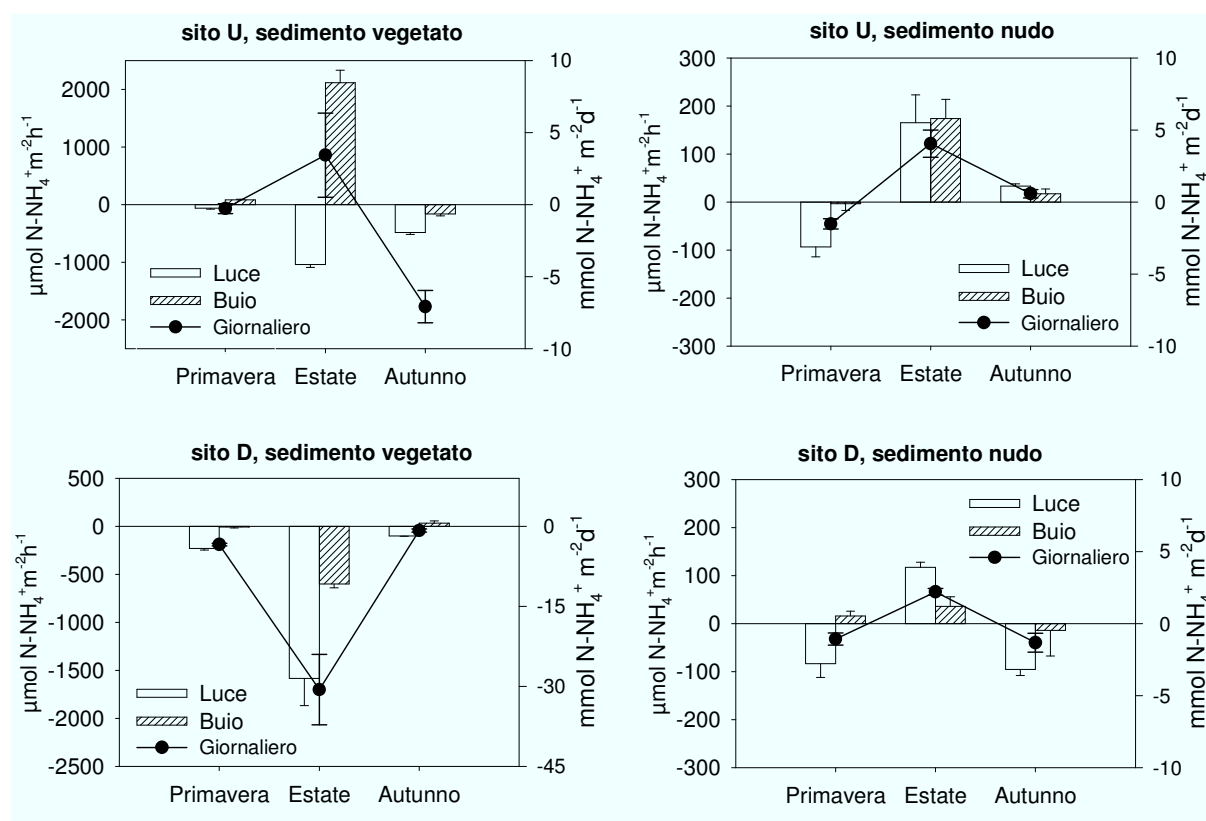
**Figura 6.4** Produzione bentica netta oraria (NBP), respirazione bentica oraria (BR) e bilancio giornaliero nei sedimenti in presenza ed in assenza di *V. spiralis* appartenenti al sito D (a valle dell'impianto di depurazione di Peschiera) del fiume Mincio. Le misure derivano da flussi di ossigeno disciolto (O<sub>2</sub>) e flussi di carbonio inorganico disciolto (DIC) attraverso incubazioni di carote intatte alla luce ed al buio. Notare le scale differenti tra sedimenti vegetati e non. I valori sono riportati come media±errore standard (n=4).

**Tabella 6.7** Anova a tre vie per i flussi di ossigeno e di carbonio inorganico disciolto suddivisi per l'incubazioni alla luce e quella al buio. Differenze testate per i fattori sito, stagione e presenza di *V. spiralis* (n=48). Sono riportati i gradi di libertà (df), il valore del test F e la significatività Pr (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, n.s. non significativo).

Fattori	df	Incubazione alla luce				Incubazione al buio			
		O <sub>2</sub> (mmol m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )		TCO <sub>2</sub> (mmol m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )		O <sub>2</sub> (mmol m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )		TCO <sub>2</sub> (mmol m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	
		F	Pr	F	Pr	F	Pr	F	Pr
Sito	1	24.29	***	38.5	***	10.74	**	2.3	n.s.
Stagione	2	168.09	***	502.1	***	170.69	***	63.0	***
Presenza	1	438.13	***	827.1	***	345.31	***	105.6	***
SitoxStag.	2	29.53	***	58.2	***	33.53	***	10.9	***
SitoxPresen.	1	8.64	**	20.2	***	11.31	**	2.0	n.s.
Stag.xPresen.	2	249.81	***	544.5	***	147.95	***	50.0	***
SitoxStag.xPresen.	2	39.30	***	49.4	***	26.01	***	5.8	**

### 6.2.1.3 Flussi dell'azoto inorganico

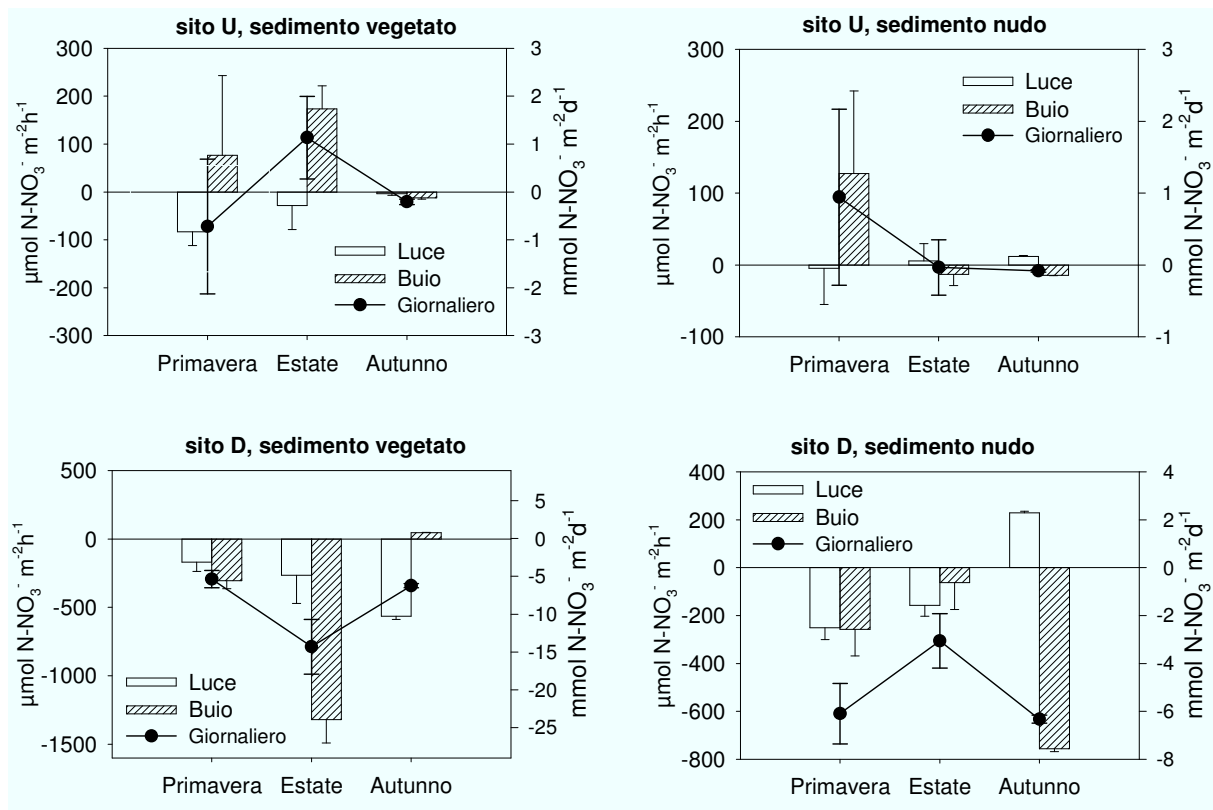
In tutte le incubazioni alla luce, i flussi dell'ammonio sono diretti verso il sedimento in presenza di *V. spiralis* con un andamento simile nei due siti e con valori compresi tra  $-58 \pm 20$  (sito U, estate) e  $-1584 \pm 282 \mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{m}^{-2}\text{h}^{-1}$  (sito D, estate) (fig. 6.5). Nel sedimento vegetato è stata misurata una rigenerazione significativa dell'ammonio verso la colonna d'acqua solo in un'occasione, durante il campionamento estivo nel sito U ( $2116 \pm 216 \mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ). I flussi dell'ammonio sono risultati negativi o vicino allo zero in tutte le altre date. L'assimilazione di ammonio al buio, quando misurata, è risultata sempre significativamente più bassa di quella misurata alla luce. Nel sito U i sedimenti nudi incubati al buio e alla luce sono risultati un netto source di ammonio per la colonna d'acqua in estate ed in autunno (da  $17 \pm 10$  a  $173 \pm 40 \mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) ed un sink in primavera; mentre i sedimenti non vegetati del sito D hanno esibito flussi negativi alla luce in primavera ed in autunno (circa  $-84 \pm 28$  e  $-96 \pm 12 \mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) e una rilevante rigenerazione in estate ( $117 \pm 11 \mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ).



**Figura 6.5** Flussi orari e flusso giornaliero dell'ammonio nei sedimenti in presenza ed in assenza di *V. spiralis* appartenenti al sito U (a monte dell'impianto di depurazione di Peschiera) ed al sito D (a valle dell'impianto di depurazione di Peschiera) del fiume Mincio. Le misure derivano da flussi di  $\text{N-NH}_4^+$  misurati con incubazioni di carote intatte alla luce ed al buio. Notare le scale differenti tra sedimenti vegetati e non. I valori sono riportati come  $\text{media} \pm \text{errore standard}$  ( $n=4$ ).

In generale, su base giornaliera, nella stazione U il sedimento colonizzato da *V. spiralis* è risultato un netto sink di ammonio in autunno ( $-7.08 \pm 1.12 \text{ mmol N-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ), mentre l'attività microfitobentonica ha reso il sedimento nudo un sink dell'azoto solo in primavera ( $-1.53 \pm 0.35 \text{ mmol N-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). I sedimenti vegetati del sito D sono sempre risultati essere delle trappole per l'ammonio con un picco estivo di  $-30.62 \pm 6.59 \text{ mmol N-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . Il sedimento nudo è stato un sink per l'azoto solo in primavera ed in autunno, mostrando una netta rigenerazione dell'ammonio in estate ( $2.20 \pm 0.23 \text{ mmol N-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ).

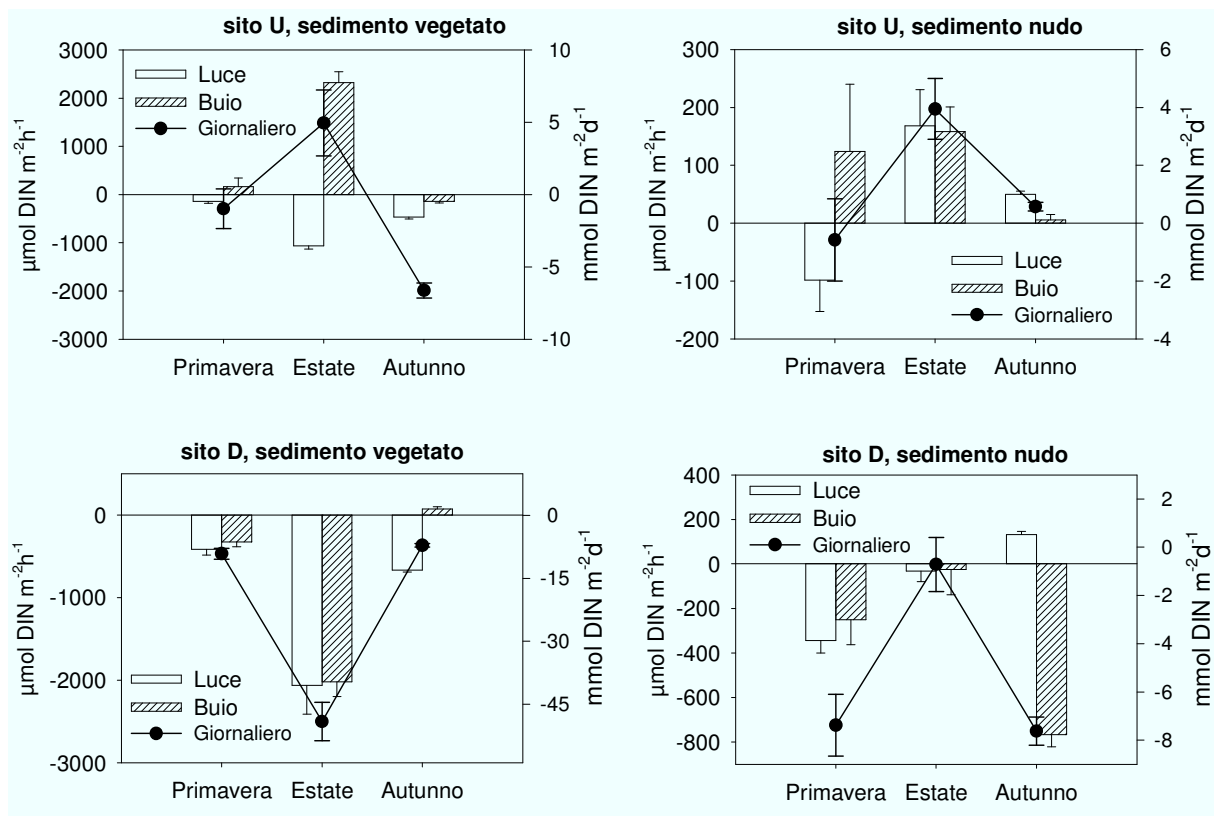
In entrambi i siti ed in tutte le incubazione alla luce, i flussi del nitrato sono risultati negativi e quindi diretti verso il sedimento vegetato, variando da  $-3 \pm 4 \text{ } \mu\text{mol N-NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  (sito U, autunno) a  $-564 \pm 22 \text{ } \mu\text{mol N-NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  (sito D, autunno) e mostrando un andamento stagionale opposto tra i due siti (fig. 6.6). Nella stazione U i flussi del nitrato nel sedimento nudo sono risultati prossimi allo zero, mentre nella stazione D c'è stata domanda sedimentaria di nitrato sia nella stagione primaverile che in quella estiva, ed un flusso positivo in autunno.



**Figura 6.6** Flussi orari e flusso giornaliero dello ione nitrico nei sedimenti in presenza ed in assenza di *V. spiralis* appartenenti al sito U (a monte dell'impianto di depurazione di Peschiera) ed al sito D (a valle dell'impianto di depurazione di Peschiera) del fiume Mincio. Le misure derivano da flussi di  $\text{N-NO}_3^-$  misurati con incubazioni di carote intatte alla luce ed al buio. Notare le scale differenti tra sedimenti vegetati e non. I valori sono riportati come  $\text{media} \pm \text{errore standard}$  ( $n=4$ ).

Nelle incubazioni al buio i flussi di nitrato sono risultati diretti verso il sedimento nudo e verso quello vegetato solo negli esperimenti del sito D, con picchi significativi rispettivamente in autunno  $-756 \pm 12 \mu\text{mol N-NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  ed in estate  $-1320 \pm 171 \mu\text{mol N-NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Il sedimento vegetato e quello nudo del sito U hanno invece rilasciato in colonna d'acqua un flusso di nitrato dello stesso ordine di grandezza nella stagione primaverile; il sedimento con *V. spiralis* ha inoltre rigenerato azoto nitrico durante l'incubazione estiva. Analizzando i tassi giornalieri, il sedimento colonizzato da *V. spiralis* è risultato un netto source di nitrato solo in estate nel sito U ( $1.13 \pm 0.86 \text{ mmol N-NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) ed un netto sink in tutte le stagioni campionate nel sito D. In entrambi i siti il sedimento nudo si è comportato da trappola dell'azoto, eccetto in primavera nel sito U ( $0.94 \pm 1.22 \text{ mmol N-NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ).

I flussi di azoto inorganico disciolto ( $\text{DIN} = \text{N-NO}_x^- + \text{N-NH}_4^+$ ) hanno mostrato come i sedimenti dei due siti rispondano in modo diverso alla rimozione dell'azoto dalla colonna d'acqua (fig. 6.7).



**Figura 6.7** Flussi orari e flusso giornaliero dell'azoto inorganico disciolto ( $\text{DIN} = \text{N-NO}_x^- + \text{N-NH}_4^+$ ) nei sedimenti in presenza ed in assenza di *V. spiralis* appartenenti al sito U (a monte dell'impianto di depurazione di Peschiera) ed al sito D (a valle dell'impianto di depurazione di Peschiera) del fiume Mincio. Le misure derivano dalla sommatoria dei flussi di  $\text{N-NO}_x^-$ ,  $\text{N-NH}_4^+$  misurati con incubazioni di carote intatte alla luce ed al buio. Notare le scale differenti tra sedimenti vegetati e non. I valori sono riportati come  $\text{media} \pm \text{errore standard}$  ( $n=4$ ).

Nel sito U il sedimento vegetato è risultato un sink di azoto solo in autunno ( $-469 \pm 41 \mu\text{mol DIN m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  nell'incubazione alla luce,  $-138 \pm 34 \mu\text{mol DIN m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  nell'incubazione al buio con

un tasso giornaliero di  $-6.63 \pm 0.53 \text{ mmol DIN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). Nelle incubazioni del sedimento vegetato nelle rimanenti stagioni e in quelle del sedimento nudo i flussi sono risultati prossimi allo zero o positivi con un picco in estate:  $4.94 \pm 2.28 \text{ mmol DIN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  per il sedimento vegetato e  $3.95 \pm 1.05 \text{ mmol DIN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  per il sedimento nudo. Nel sito D, i sedimenti colonizzati da *V. spiralis* sono risultati essere sink dell'azoto inorganico con un valore massimo in estate ( $-49.15 \pm 4.56 \text{ mmol DIN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). Anche il sedimento nudo ha mostrato una tendenza a comportarsi da trappola per l'azoto, ma al contrario del sedimento vegetato durante l'estate è stato misurato il valore minimo ( $-0.72 \pm 1.13 \text{ mmol DIN m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ).

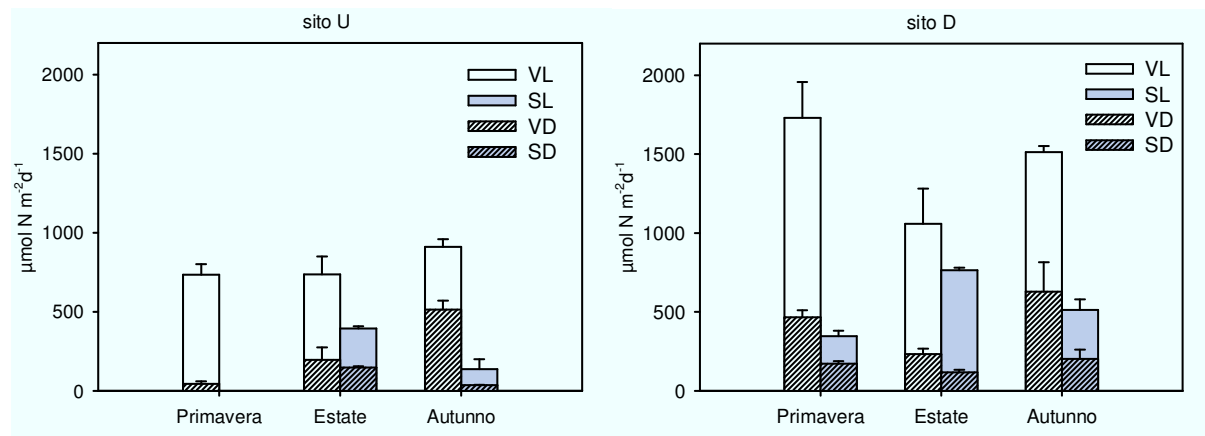
L'analisi statistica riportata in tabella 6.8 mostra come i flussi dei nutrienti non dipendano da fattori singoli, ma prevalga l'interazione tra i quattro fattori testati e quindi dipendano dalla combinazioni di più fattori. Nonostante questo test statistico, sia d'obbligo data la natura del disegno sperimentale, risulta evidente la difficoltà di interpretazione dello stesso. Osservando i grafici risultano spontanee alcune conclusioni rispetto ai fattori singoli, come ad esempio la differenza tra sedimento vegetato e sedimento nudo per cui basta notare gli ordini di grandezza; la differenza tra i flussi alla luce ed al buio; la differenza tra siti dettata principalmente dalla stagione estiva ed autunnale.

**Tabella 6.8 Anova a quattro vie per i flussi dei nutrienti azotati inorganici e per i flussi di  $\text{N}_2$  prodotto dal processo accoppiato di denitrificazione-nitrificazione (Dn). Differenze testate per i fattori sito, stagione, condizione (luce/buio) e presenza di *V. spiralis* (n=96). Sono riportati i gradi di libertà (df), il valore del test F e la significatività Pr (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, n.s. non significativo).**

Fattori	df	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )		N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )		DIN ( $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )		D <sub>N</sub> ( $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )	
		F	Pr	F	Pr	F	Pr	F	Pr
Sito	1	73.8	***	104.2	***	225.7	***	57.1	***
Stagione	2	0.8	n.s	3.3	*	4.5	*	1.4	n.s
Presenza	1	36.7	***	10.8	**	55.6	***	120.6	***
Condizione	1	183.5	***	6.7	*	68.0	***	27.3	***
SitoxStag.	2	89.2	***	4.9	*	83.5	***	3.8	*
SitoxPresen.	1	48.0	***	11.2	**	71.8	***	6.0	*
Stag.xPresen.	2	12.7	***	8.6	***	27.9	***	9.6	***
SitoxCon.	1	65.6	***	23.1	***	63.1	***	1.8	n.s
Stag.xCon.	2	86.9	***	4.1	*	34.7	***	0.6	n.s
Presen.xCon.	1	158.5	***	2.2	n.s.	114.2	***	9.6	**
SitoxStag.xPresen.	2	81.1	***	16.5	***	104.3	***	2.4	n.s
SitoxStag.xCon.	2	35.7	***	3.6	*	32.2	***	0.9	n.s
SitoxPresen.xCon.	1	36.8	***	0.0	n.s.	17.7	***	0.0	n.s
Stag.xPresen.xCon.	2	108.0	***	31.7	***	31.7	***	5.2	**
SitoxStag.xPresen.xCon.	2	27.8	***	41.4	***	63.4	***	1.0	n.s

#### 6.2.1.4 Nitrificazione accoppiata alla denitrificazione in sedimenti vegetati ed in sedimenti nudi

L'ammonio marcato ( $^{15}\text{NH}_4^+$ ) è stata l'unica forma di azoto marcato aggiunto ai sedimenti delle carote incubate, di conseguenza il gas  $\text{N}_2$  marcato prodotto durante l'esperimento è stato generato dal processo accoppiato di nitrificazione-denitrificazione. Segnali rilevabili hanno permesso il calcolo dei tassi in tutte le date di campionamento, in presenza ed in assenza di *V. spiralis*, con una sola eccezione (sito U, sedimento nudo, campionamento primaverile) (fig. 6.8).



**Figura 6.8 Tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione nei sedimenti in presenza ed in assenza di *V. spiralis* appartenenti al sito U (a monte dell'impianto di depurazione di Peschiera) ed al sito D (a valle dell'impianto di depurazione di Peschiera) del fiume Mincio. I valori sono riportati come media±errore standard (n=4).**

In generale, i tassi sono risultati più alti nel sito D ( $P < 0.001$ , ANOVA a quattro vie), nei sedimenti vegetati ( $P < 0.001$ , ANOVA a quattro vie) e durante le incubazioni alla luce ( $P < 0.001$ , ANOVA a quattro vie) (tab. 6.8). La nitrificazione accoppiata alla denitrificazione è stata misurata anche nel sedimento nudo, probabilmente a causa della diffusione dell'ossigeno dalla colonna d'acqua verso gli strati superficiali del sedimento, rendendoli ossicici e di conseguenza favorendo il processo di ossidazione dell'ammonio o a causa di fenomeni di bioturbazione, che hanno aumentato il trasporto di ossigeno verso i sedimenti profondi anossici.

Nel sedimento vegetato, i tassi del processo accoppiato nitrificazione-denitrificazione sono variati tra  $657.8 \pm 79.8$  e  $911.5 \pm 106.0 \mu\text{mol N m}^{-2}\text{d}^{-1}$  nel sito U e tra  $1019.5 \pm 240.9$  e  $1709.9 \pm 268.1 \mu\text{mol N m}^{-2}\text{d}^{-1}$  nel sito D. Nei sedimenti colonizzati da *V. spiralis*, il rapporto tra le misure nella fase di luce ed in quella di buio sono risultate significativamente maggiori di 1 in entrambi i siti durante i campionamenti primaverili ed estivi e vicino all'unità in autunno; nei sedimenti nudi i tassi della denitrificazione accoppiata alla nitrificazione sono

risultati più alti nel sito U in condizioni di luce nelle due date di campionamento in cui il processo è stato misurato, mentre i tassi del sito D sono risultati più alti solo in estate.

I tassi misurati nei sedimenti vegetati sono risultati da 2 a 6 volte più alti nel sito U e da 1.5 a 5 volte più alte nel sito D rispetto ai rispettivi sedimenti nudi.

Dalla tabella 6.8 risulta evidente che il set dei tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione siano significativamente differenti se confrontati semplicemente tra i due siti, tra le incubazioni alla luce e al buio ed infine considerando la presenza ed assenza di *V. spiralis*. L'analisi della possibile combinazione dei diversi fattori sui tassi misurati mostra la significatività di un'interazione tripla, escludendo l'importanza dell'influenza del fattore sito ed includendo invece quella del fattore stagione, che da solo non risultava distinguere in modo significativo i tassi. Dalla tabella 6.8 si nota inoltre l'importanza dei fattori stagione e la presenza della pianta nel determinare sia la significatività delle interazioni doppie che di quella tripla.

#### 6.2.1.5 Tassi di azotofissazione in sedimenti vegetati ed in sedimenti nudi

A differenza dei tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione la fissazione batterica di  $N_2$  è risultata non rilevabile in tutti gli esperimenti effettuati nelle tre stagioni di campionamento ed in entrambi i siti. Questo risultato non deve sorprendere in siti con elevata disponibilità di azoto inorganico sia in acqua che nei sedimenti come quelli investigati nel presente lavoro.

### 6.2.2 *Discussione*

La stima dei tassi di denitrificazione accoppiati alla nitrificazione in sedimenti popolati da comunità vegetali e di conseguenza, lo studio dell'influenza del rilascio di ossigeno attraverso l'apparato radicale di differenti tipologie di macrofite sui processi redox del sedimento, come la nitrificazione e la denitrificazione, sono stati studiati a partire dalla fine degli anni '80. In tabella 6.9 sono riassunti i tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione di questi principali studi. Il confronto con i valori di questo lavoro di tesi deve essere effettuato considerando differenze nel disegno sperimentale, nella metodica di misura e nella tipologia di macrofita studiata. La maggior parte delle metodologie applicate risultano sottostimare i tassi reali o *in situ* perché alcune stimano i valori potenziali o sono misure indirette del processo, come i bilanci di massa e le incubazioni di slurry, altre invece sono state utilizzate in condizioni di eterogeneità dei sedimenti, come la diffusione e l'iniezione di ammonio marcato, non prendendo quindi in considerazione tutte le zone ossiche-anossiche in cui può avvenire il processo di denitrificazione. La tecnica della perfusione di ammonio marcato nelle acque interstiziali a partire dallo strato più profondo del sedimento in carote di sedimento

sembra essere la metodica più promettente. Tale tecnica risulta però essere ideale per ambienti caratterizzati da sedimenti sabbiosi, per i quali è stata di fatto messa a punto (Risgaard-Petersen et al., 1998b; Ottosen et al., 1998); nel caso di ambienti eutrofici, con sedimenti ricchi di sostanza organica e quindi fangosi, essa diviene di difficile applicazione. I siti studiati in questo lavoro rientrano in quest'ultima categoria: è stato quindi deciso di effettuare stime di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione utilizzando una tecnica diretta, iniezione di ammonio marcato, con la consapevolezza di poter sottostimare i tassi reali.

La tabella 6.9 evidenzia differenze nei tassi misurati tra macrofite sommerse e macrofite emergenti. Le specie sommerse presentano valori che variano tra 24 e 2232  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , mentre i tassi misurati per le specie emergenti sono di un ordine di grandezza superiori, tra 240 e 15312  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ . I tassi di denitrificazione accoppiati alla nitrificazione, misurati per *V. spiralis*, rientrano nell'intervallo delle specie macrofite sommerse (384 – 2235  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ed in particolare paragonabile ai tassi dell'isoetite *Lobelia dortmanna*. Numerosi sono gli studi sul trasporto di ossigeno verso il sedimento (2060  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) e sulla stimolazione dei tassi di denitrificazioni accoppiati alla nitrificazioni per la macrofita *Lobelia dortmanna* (Sand-Jensen & Prahl, 1982; Pedersen et al., 1995; Risgaard-Petersen & Jensen, 1997; Ottosen et al., 1998; Sand-Jensen et al., 2005), carenti sono invece gli studi effettuati riguardanti l'influenza di *V. spiralis* sui processi redox nel comparto sedimentario. *Lobelia dortmanna* è fisiologicamente adattata a crescere in sedimenti con bassa capacità riducente e a rilasciare tutto l'ossigeno prodotto per fotosintesi attraverso il sistema aerenchimatico delle radici, al fine di ossidare il sedimento e facilitare l'assimilazione di  $\text{CO}_2$  dalle acque interstiziali (Sand-Jensen & Prahl, 1982). In ambienti oligotrofici questo processo è a supporto dell'assimilazione della stessa dalla colonna d'acqua, caratterizzata da basse concentrazioni di  $\text{CO}_2$  (Sand-Jensen & Sondergaard, 1979), e promuove il processo accoppiato di denitrificazione e nitrificazione associato alla rizosfera e quindi agli strati profondi del sedimento. Evidenze del trasporto di ossigeno di *V. spiralis* verso la rizosfera sono state riscontrate da Pinardi et al. (2009) e in questo lavoro (capitolo 6, paragrafo 6.1). Pinardi et al. (2009) riportano una stima indiretta di questo fenomeno attraverso il calcolo del quoziente fotosintetico (circa 0.55), che è stato calcolato anche in questo lavoro di tesi.

Le concentrazioni di ossigeno nelle acque interstiziali sono state invece misurate in maniera diretta nell'esperimento descritto nel paragrafo 6.1, dove è riportato un valore medio di 20  $\mu\text{M}$  nel sedimento con *V. spiralis* contro il valore medio di 5  $\mu\text{M}$  misurato nel sedimento nudo. I quozienti fotosintetici (PQ) calcolati in questo lavoro di tesi per la stagione primaverile (0.58 per il sito U e 0.64 per il sito D) ed autunnale (0.59 per il sito U e 0.69 per il sito D) sono in linea con quelli riportati da Pinardi et al. (2009), mentre nella stagione estiva mostrano un valore più basso (0.32 per il sito U e 0.33 per il sito D).

**Tabella 6.9 Tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione misurati per diversi tipi di macrofite. Sono inclusi i risultati di questo lavoro di tesi. I valori riportati sono stati calcolati dai dati originali ed espressi in  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{d}^{-1}$ .**

Specie macrofittiche	Tipologia	Tecnica sperimentale	Stagione	Tasso $D_N$ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$	Bibliografia
<i>Vallisneria spiralis</i>	Sommersa	Iniezione di $^{15}\text{NH}_4^+$	Primavera	533-2235	Questo studio
			Estate	384-1544	
			Autunno	854-1936	
<i>Zostera marina</i>	Sommersa	Perfusione di $^{15}\text{NH}_4^+$	Primavera	$90 \pm 60$	Risgaard-Petersen et al., 1998b
			Estate	nd	
<i>Lobelia dortmanna</i>	Sommersa	Diffusione	Autunno	$716 \pm 126$	Risgaard-Petersen & Jensen, 1997
<i>Zostera marina</i>	Sommersa	Perfusione di $^{15}\text{NH}_4^+$	-	$31.9 \pm 5.8$	Ottosen et al., 1999
<i>Lobelia dortmanna</i>	Sommersa			$590.4 \pm 0$	
<i>Littorella uniflora</i>	Sommersa			$722.4 \pm 184.1$	
<i>Potamogeton pectinatus</i>	Sommersa			$129.6 \pm 57.8$	
<i>Zostera marina</i>	Sommersa	Incubazione slurry	-	24 - 288	Ottosen et al., 1999
<i>Lobelia dortmanna</i>	Sommersa			2232	
<i>Oryza sativa L.</i>	Emergente	Iniezione di $^{15}\text{NH}_4^+$	-	8071	Reddy et al., 1989
<i>Pontederia cordata L.</i>	Emergente			8714	
<i>Juncus effusus L.</i>	Emergente			7286	
<i>Zostera marina</i>	Sommersa	Incubazione slurry	Primavera	$5016 \pm 528$	Caffrey & Kemp, 1990
			Estate	$1608 \pm 648$	
			Autunno	$2376 \pm 384$	
<i>Potamogeton perfoliatus</i>	Emergente	Incubazione slurry	Primavera	$15312 \pm 2640$	Caffrey & Kemp, 1990
			Estate	$240 \pm 24$	
			Autunno	$6288 \pm 360$	
<i>Oryza sativa</i>	-	Iniezione di $^{15}\text{NH}_4^+$	Autunno	240-7200	Nicolaisen et al., 2004
<i>Zostera marina</i>	Sommersa	Bilancio di massa	-	1548	Flindt, 1994

Tale valore risulta essere in accordo con il massimo di biomassa fogliare registrato in quella stagione, ad indicare la consistenza del processo fotosintetico e quindi del rilascio di ossigeno nel comparto radicale. Una quantità variabile di ossigeno tra il 40 ed il 70% di quella prodotta per fotosintesi potrebbe quindi promuovere processi aerobici, come la nitrificazione, sotto i

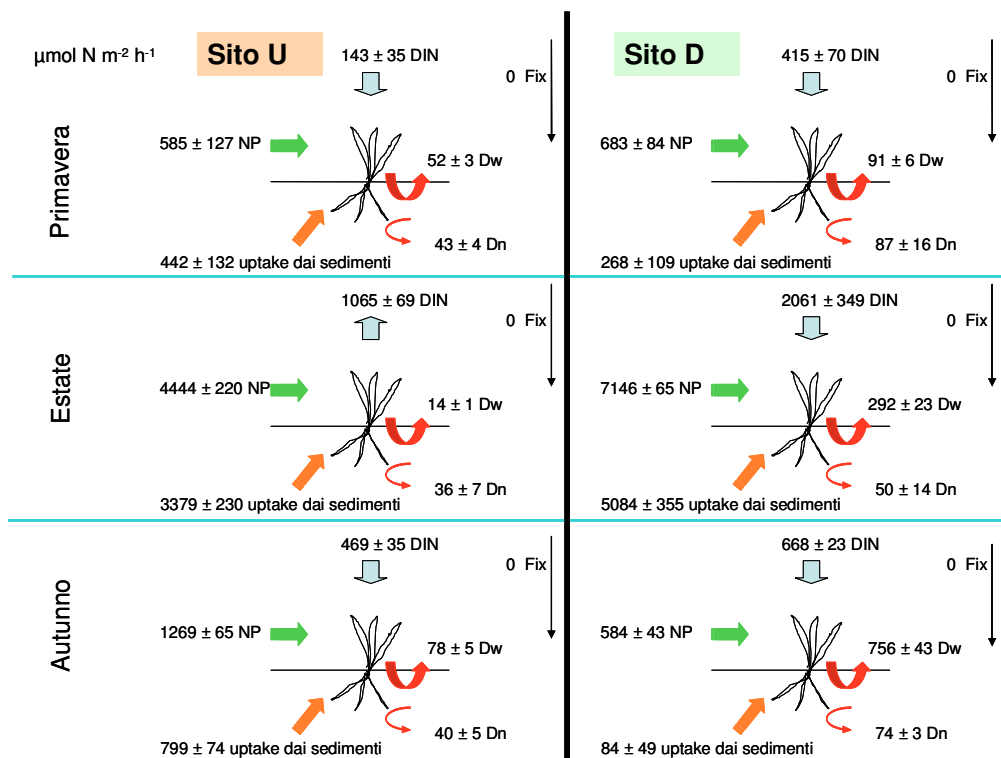
primi centimetri di sedimento. A differenza della specie sommersa *Lobelia dortmanna*, *V. spiralis* ha mostrato grande plasticità nell'adattarsi a sistemi con elevato stato di trofia. Sand-Jensen et al. (2005) hanno infatti dimostrato che il trasporto di ossigeno alle radici e quindi la crescita di *L. dortmanna*, tipica di ambienti oligotrofici caratterizzati da sedimenti sabbiosi con bassi tassi di domanda sedimentaria di ossigeno (SOD), si riduce drasticamente all'aumentare delle condizioni riducenti nel sedimento dettate dall'aumentare del contenuto di sostanza organica nei sedimenti (da 0.3 a 2.46 %) e del SOD, nonostante aumenti la disponibilità di azoto, fosforo e carbonio inorganico disciolto (Sand-Jensen et al., 2005). Il sito U ed il sito D sono caratterizzati da uno stato di trofia da meso ad eutrofico, avendo concentrazioni di nitrato nelle acque rispettivamente minore di 15 $\mu$ M e maggiore di 60 $\mu$ M, concentrazioni di ammonio nelle acque rispettivamente di ~3 $\mu$ M e ~5 $\mu$ M e contenuto percentuale di sostanza organica nel sedimento rispettivamente di ~6 e ~10%. Dai quozienti fotosintetici, dai valori di biomassa e dai tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione risulta evidente come il più alto contenuto di sostanza organica nei sedimenti del sito D non abbia effetti sulla crescita di *V. spiralis* e sulla sua capacità di controllare lo stato di ossidazione dell'acqua interstiziale. Ad esclusione della stagione estiva, i tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione del sito D sono il doppio di quelli del sito U sia alla luce sia al buio. Il processo batterico è massimo in primavera ed in autunno, risultando dipendere più dal substrato che dalla temperatura. La competizione tra batteri e pianta per la stessa risorsa, l'azoto, rende infatti minimi i tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione nella stagione estiva, quando il processo di assimilazione da parte della pianta è massimo. Questa competizione non determina però, come accade nei siti oligotrofici del nord Europa colonizzati da macrofite, un tasso di denitrificazione-nitrificazione minore durante la fase luminosa rispetto a quello della fase al buio (Risgaard-Petersen & Jensen, 1997). La disponibilità di nutrienti nei siti U e D è tale che in tutte le stagioni i processi di uptake dell'azoto da parte della rizosfera nella fase luminosa non limitano il processo batterico, che rimane quindi di maggiore intensità rispetto alla condizione di buio.

In questo studio non è stato misurato l'uptake di azoto inorganico da parte della macrofita: è stato invece calcolato utilizzando il rapporto molare C/N di 12 (Pinardi et al., 2009) e la produzione primaria netta (i flussi del carbonio inorganico disciolto). Studi precedenti sulla stima della produzione primaria di *V. spiralis* (Pinardi et al., 2009) attraverso la combinazione di due metodiche differenti, il leaf marking e le incubazioni intatte di carote in laboratorio, hanno mostrato che il processo di produzione risulta fortemente sottostimato utilizzando la variazione dell'O<sub>2</sub> disciolto in colonna d'acqua, mentre risultati simili sono dati dalla metodica del leaf marking e dalla stima della variazione di CO<sub>2</sub> in colonna d'acqua. Questo risultato è la probabile conseguenza della grande capacità di trasporto dell'ossigeno della pianta verso la rizosfera. Il trasporto di ossigeno al sedimento comporta e favorisce il

processo di nitrificazione e quindi anche i processi accoppiati di nitrificazione e denitrificazione, tuttavia i processi stessi sono regolati dalla disponibilità di azoto nel sedimento e dalla necessità metabolica della macrofita. Due processi quindi rimuovono l'azoto inorganico disponibile dal sistema: l'assimilazione della pianta e il processo di denitrificazione ( $D_W + D_N$ ). L'assimilazione teorica di azoto, calcolata sulla base della produzione primaria, i tassi netti misurati mediante incubazione di carote intatte, la dissipazione superficiale ( $D_W$ ) e profonda ( $D_N$ ) di azoto tramite denitrificazione sono riportati sinteticamente in tabella 6.10 ed in figura 6.9. Le proporzioni relative dei processi, rispetto al totale metabolizzato da piante e batteri, sono invece mostrate in figura 6.10. Anche i tassi di denitrificazione  $D_W$ , sostenuti dal nitrato della colonna d'acqua, sono stati calcolati inserendo i flussi di ossigeno al buio e le concentrazioni di ossigeno e di nitrato nelle acque di fondo nell'equazione proposta da Christensen et al. (1990). In entrambi i siti l'elevata disponibilità di azoto in colonna d'acqua non sembra spostare la principale fonte di azoto per l'assimilazione da parte della pianta dal comparto sedimentario a quello acquatico: l'uptake dal sedimento risulta maggiore del 70% in tutte le stagioni. La richiesta di azoto della pianta è stata stimata tra  $\sim 500$  e  $\sim 7000 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , con valori massimi nella stagione estiva. Questi valori risultano essere di un ordine di grandezza rispetto ai tassi di denitrificazione totale, ad eccezione della stagione autunnale del sito D, dove la concentrazione di nitrato in colonna d'acqua ha raggiunto i  $300 \mu\text{M}$  e ha stimolato il processo  $D_W$ , che è risultato maggiore dell'uptake teorico della pianta (tabella 6.10).

**Tabella 6.10 Richiesta teorica di azoto da parte della pianta, flusso netto medio dell'azoto inorganico (DIN), tassi di denitrificazione alimentati dal nitrato in colonna d'acqua ( $D_W$ ) e tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione negli strati profondi del sedimento ( $D_N$ ). La richiesta di azoto della pianta è calcolata dalla produzione primaria netta (flussi  $\text{CO}_2$  alla luce) e dal rapporto C/N di 12 mol. I tassi  $D_W$  sono stati calcolati secondo il modello di Christensen et al. (1990). Tutti i valori sono espressi in  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  misurati nella fase luminosa.**

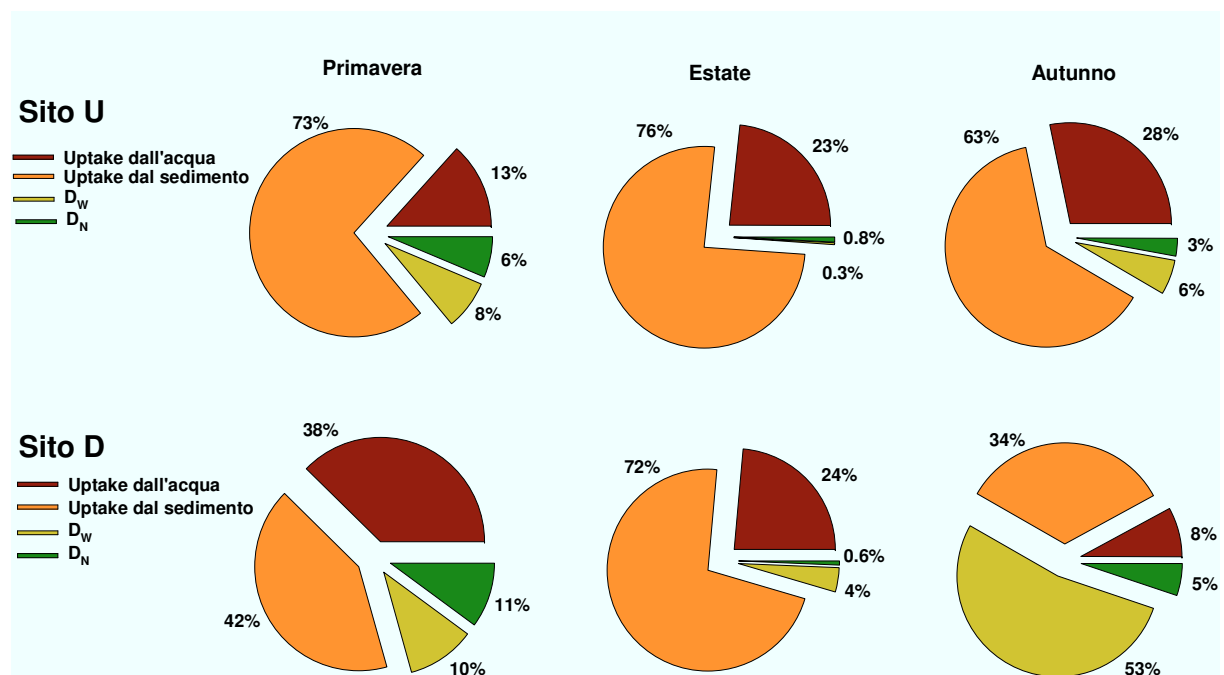
Sito	Periodo	Domanda di azoto di <i>V. spiralis</i> ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{h}^{-1}$ )	Flusso DIN ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{h}^{-1}$ )	$D_W$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{h}^{-1}$ )	$D_N$ ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{h}^{-1}$ )
U	primavera	$585.4 \pm 127.5$	$-142.9 \pm 35.2$	$52.0 \pm 2.9$	$43.2 \pm 4.2$
	estate	$4444.4 \pm 219.5$	$-1064.9 \pm 68.7$	$13.7 \pm 0.6$	$36.1 \pm 7.4$
	autunno	$1269.2 \pm 65.5$	$-469.4 \pm 35.2$	$77.7 \pm 4.9$	$39.6 \pm 4.9$
D	primavera	$683.7 \pm 83.9$	$-415.9 \pm 69.9$	$91.4 \pm 6.0$	$87.1 \pm 15.7$
	estate	$7146.2 \pm 64.9$	$-2061.5 \pm 348.9$	$291.7 \pm 22.5$	$49.9 \pm 13.5$
	autunno	$584.3 \pm 42.7$	$-667.9 \pm 23.1$	$756.1 \pm 43.5$	$73.8 \pm 3.2$



**Figura 6.9** L'assimilazione teorica di azoto, calcolata sulla base della produzione primaria, i tassi netti misurati mediante incubazione di carote intatte (DIN), la dissipazione superficiale (Dw), calcolata dal modello di Christensen et al. (1990), e la dissipazione profonda (Dn) di azoto tramite denitrificazione per i tre periodi di indagine e per i due siti studiati. I valori sono espressi in  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ .

Tra i due processi, nel sito U, l'uptake della pianta risulta rimuovere dal sistema e quindi incorporare circa l'86, il 99 ed il 91% dell'azoto inorganico disponibile rispettivamente per le stagioni primavera, estate ed autunno. Anche nel sito D, la pianta assimila l'80 ed il 96% dell'azoto dal sistema, rispettivamente in primavera ed in estate, mentre nella stagione autunnale prevale il processo di denitrificazione (58%), in particolare nella componente Dw (53%). In entrambi i siti, durante la stagione estiva, l'assimilazione di azoto della pianta dal sedimento risulta massima (76% e del 72%, rispettivamente per il sito U e per il sito D) e la competizione per l'azoto tra batteri e piante riduce drasticamente l'entità del processo di denitrificazione (1% nel sito U e 4.6% nel sito D). Nel sito U i tassi di denitrificazione in estate sono diminuiti del 93 e dell'89% rispetto alla stagione primavera ed autunno, ovvero ai periodi in cui i tassi di produzione della pianta sono minori e quindi si presuppone una minore competizione. Percentuali analoghe di diminuzione sono state stimate per il sito D (76 e 91%). Infine, osservando i grafici di figura 6.9, si nota come siano consistenti in sedimenti vegetati i tassi di denitrificazione accoppiata alla nitrificazione. È chiaro che se avessimo utilizzato l'isotope pairing technique (IPT), messa a punto per sedimenti non vegetati, avremmo potuto sottostimare questa componente importante rispetto alla denitrificazione

totale: in primavera ad esempio  $D_N$  ha rappresentato il 75 ed il 50% della denitrificazione totale rispettivamente nel sito U e nel sito D.



**Figura 6.10** Le proporzioni relative dei processi di assimilazione della pianta (uptake dall'acqua + uptake dal sedimento) e di denitrificazione ( $D_W+D_N$ ) rispetto al totale metabolizzato da piante e batteri, riportate per i due siti studiati nei tre periodi di indagine.

### 6.3 Conclusioni

A differenza di altre macrofite studiate dalla comunità scientifica, *V. spiralis* ha mostrato una grande plasticità nell'adattarsi a condizioni riducenti caratterizzate da elevato carico organico e di nutrienti, tipiche di ambienti altamente eutrofici. In entrambi i siti le maggiori concentrazioni di ossigeno nelle acque interstiziali dei sedimenti vegetati e di conseguenza i potenziali redox positivi hanno evidenziato come la pianta sia in grado di modificare l'ambiente in cui vive, detossificando la composizione delle acque interstiziali attraverso il rilascio di ossigeno dalle radici; gli effetti di *V. spiralis* sulle caratteristiche delle acque interstiziali sembrano quindi non dipendere dal carico organico. Di conseguenza la colonizzazione di *V. spiralis* influisce in modo significativo sui processi redox dipendenti che avvengono nei sedimenti profondi: essa è in grado di controllare e limitare sia gli efflussi di  $CH_4$  sia il rilascio di  $PO_4^{3-}$  e di  $NH_4^+$  dalle acque interstiziali verso la colonna d'acqua. La più alta disponibilità di  $NO_3^-$  in colonna d'acqua nel sito eutrofico rispetto a quello mesotrofico non ha influenzato l'assimilazione dell' $NH_4^+$  nella rizosfera, che è risultata la fonte principale di approvvigionamento della pianta in entrambi i siti e ha reso quindi trascurabile l'assimilazione di  $NO_3^-$  attraverso le fronde. La presenza della pianta risulta sia favorire che

sfavorire i processi batterici aerobici: il rilascio di ossigeno sostiene il processo di nitrificazione e quindi di denitrificazione, ma allo stesso tempo potrebbe verificarsi competizione per l'ammonio tra i batteri nitrificanti e la pianta. La disponibilità di nutrienti in entrambi i siti è tale che in tutte le stagioni i processi di uptake dell'azoto da parte della rizosfera nella fase luminosa non limitano il processo accoppiato di nitrificazione e denitrificazione, che rimane quindi di maggiore intensità rispetto alla condizione di buio e risulta massimo sia in primavera che in autunno (75% ed il 50% della denitrificazione totale nel sito meso e nel sito eutrofico). Solo nella stagione estiva l'effetto congiunto della stagione e della presenza della pianta ha determinato tassi minimi di denitrificazione; questa competizione non determina però, come accade nei siti oligotrofici del nord Europa, valori minori dei tassi di denitrificazione-nitrificazione durante la fase luminosa rispetto a quelli della fase al buio. La maggiore disponibilità di nutrienti e di sostanza organica nel sito eutrofico determina tassi di denitrificazione maggiori rispetto a quelli del sito mesotrofico.

## 7 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi alcuni aspetti del ciclo dell'azoto sono stati studiati a diverse scale spaziali e temporali. Il bilancio di questo elemento a livello di bacino idrografico evidenzia una situazione probabilmente paradigmatica per aree antropizzate a forte vocazione agricola come la Pianura Padana, in cui gli input azotati superano gli output. I risultati salienti di questa indagine indicano che il carico zootecnico sul territorio genera una quantità di azoto superiore a quella assimilabile dalle colture o metabolizzabile dalle comunità batteriche, di conseguenza una frazione del surplus azotato è esportata dal bacino e va a sostenere i processi di eutrofizzazione del corpo idrico recettore. Simultaneamente i bilanci suggeriscono la presenza di sink di azoto interni al bacino idrografico di notevole importanza e poco esplorati dalla letteratura scientifica. Una nota di originalità del lavoro sta nell'aver cercato di individuare i processi responsabili della rimozione di questo elemento, analizzando la riduzione dissimilativa dell'azoto nitrico. Dai calcoli effettuati emerge come, nel solo periodo irriguo, la denitrificazione nel reticolo idrografico secondario possa spiegare fino al 50% delle perdite di azoto. Questo risultato è imputabile alla grande estensione chilometrica del reticolo stesso e, banalmente, al rinnovo continuo delle acque sui substrati. I canali minori diventano quindi di primaria importanza in ambito applicativo quali elementi da gestire al fine di ottimizzare i processi che intercettano e rimuovono l'azoto. La comunità scientifica internazionale ha riconosciuto recentemente la valenza di questi sistemi acquatici minori, ma si tratta più di una intuizione che di un consolidato risultato di indagini rigorose. Mancano infatti applicazioni su vasta scala di metodi di misura affidabili per sistemi che interagiscono lateralmente con il territorio, che in molti casi hanno una funzione drenante. In piccolo, le carenze di tipo metodologico sono le stesse che riguardano i grandi fiumi; al momento misure dirette di denitrificazione in ambienti lotici possono essere effettuate solo con una metodica che si basa sulla variazione monte-valle dei rapporti  $N_2/Ar$ . Si tratta di una metodica non ancora consolidata che appare però estremamente promettente.

Se da un lato parte del surplus azotato può essere rimosso dai canali del reticolo minore, dall'altro lato una quota importante dell'azoto segue vie completamente sconosciute. Le ipotesi al riguardo indicano l'arricchimento del nitrato nelle acque delle falde superficiali e profonde e quindi l'accumulo nel sottosuolo. A mia conoscenza non esistono studi in cui l'importanza relativa di questo pool sia stata quantificata a livello di bacino idrografico; le competenze in gioco devono sicuramente includere la idrogeologia e potrebbero evidenziare come i confini geografici di un bacino idrografico non abbiano corrispondenze nel sottosuolo,

complicando ulteriormente le ricerche. Ancora una volta gli aspetti metodologici sono da implementare: non è facile infatti misurare sperimentalmente i processi che avvengono durante la percolazione in profondità delle acque superficiali. Analisi di soluti e analisi isotopiche indicano arricchimenti tipicamente associati con processi di nitrificazione e denitrificazione, ma mancano misure quantitative dirette.

I bilanci dell'azoto nel bacino del fiume Oglio sublacuale escludono la denitrificazione nelle aree umide dalle voci rilevanti del calcolo complessivo. I tassi misurati sperimentalmente (quantità di azoto rimossa per unità di superficie nel tempo) confermano che le aree umide perfluviali sono estremamente reattive a causa dei substrati organici e della richiesta continua di accettori di elettroni per i processi di ossidazione della sostanza organica. Le aree umide rimuovono quindi grandi quantità di azoto dalle acque ma sono limitate nella loro azione da due fattori: la mancanza in alcuni casi di collegamento idraulico con il corpo idrico principale e la superficie irrilevante che hanno nel territorio. Lo studio che ho effettuato su oltre venti ambienti umidi marginali indica come il rifornimento costante o pulsante di acque sia indispensabile per avere una efficienza di denitrificazione elevata. Le aree umide relitte sono frammenti minuscoli di territorio rimasti più per una combinazione di fattori casuali che per un disegno di pianificazione territoriale; l'isolamento porta a pensilità, mancanza di acqua, accumulo di materia organica indecomposta e, soprattutto, incentiva il riciclo dell'azoto rispetto alla dissipazione.

La superficie totale delle aree umide perfluviali è inoltre decisamente ridotta rispetto alle superfici destinate all'agricoltura e, a meno di un fallimento o di una forte contrazione di questa attività, è difficile immaginare una inversione di tendenza con creazione di nuove aree umide nel territorio.

Aspetti particolari del ciclo dell'azoto, che riguardano una scala spaziale estremamente piccola, sono stati studiati a livello della rizosfera di una macrofita sommersa. Lo studio ha evidenziato come in ambiente lotico le praterie di macrofite siano in grado di trattenere grandi quantità di materiale particellato e di alterare di conseguenza le caratteristiche chimico-fisiche del substrato. In specifico, la macrofita considerata dimostra una grande plasticità poiché, a fronte dei cambiamenti del substrato verso tenori maggiori di sostanza organica e condizioni più riducenti, è in grado di variare la quota di ossigeno trasferita ai sedimenti e quindi di detossificare il substrato che colonizza. Se quindi sedimenti non vegetati con carico organico differente hanno acque interstiziali chimicamente distinte, questo non accade per i sedimenti vegetati, almeno nel range considerato di sostanza organica (3-10%).

La presenza di ossigeno a livello di sedimenti subsuperficiali, veicolato dalle radici delle macrofite, stimola i processi accoppiati di nitrificazione e denitrificazione e quindi la perdita di azoto dai sedimenti. Questa ipotesi è stata testata mediante una serie di esperimenti stagionali condotti in due siti a differente carico organico. Esperimenti analoghi sono stati

condotti prevalentemente con macrofite marine nell'ambito di progetti mirati a contenere i carichi eutrofizzanti in ambito costiero o con macrofite di acqua dolce che hanno adattamenti fisiologici estremamente particolari in quanto evolvono interamente l'ossigeno prodotto durante la fotosintesi verso i sedimenti.

I risultati degli esperimenti riportati in letteratura indicano per le macrofite marine una scarsissima capacità di ossigenare i sedimenti, con trasferimenti dell'ossigeno prodotto per fotosintesi generalmente inferiori al 5%. Questo è probabilmente il motivo per cui, all'aumentare dello stato trofico delle aree costiere che le ospitano, le praterie di fanerogame regrediscono fino a scomparire. Le quantità di azoto rimosse per denitrificazione associata alla nitrificazione sono di conseguenza di scarsa rilevanza. Le macrofite di acqua dolce con elevato trasporto di ossigeno alla rizosfera colonizzano tipicamente ambienti oligotrofici e i processi di nitrificazione-denitrificazione sono limitati dalla disponibilità di azoto inorganico e dalla forte competizione tra macrofite e comunità batteriche.

Negli esperimenti condotti con *V. spiralis* le misure di quoziente fotosintetico suggeriscono per questa macrofita buone capacità di trasporto di gas verso i sedimenti ed i tassi di rimozione dell'azoto misurati sperimentalmente sono tra i più alti tra quelli riportati in letteratura. È stato dimostrato che nei sedimenti organici colonizzati da questa macrofita i processi di rimozione dell'azoto sono stimolati più alla luce che al buio, probabilmente per la mancanza di competizione tra macrofite e batteri. Emerge da questo studio l'importanza di incentivare e di mantenere substrati vegetati, in particolare nel reticolo idrografico minore.

Rimangono da implementare studi legati alla fisiologia di questa e di altre macrofite sommerse che si riscontrano in ambienti eutrofici di pianura, volti a chiarire i meccanismi di detossificazione dei sedimenti e, indirettamente, le relazioni con le comunità batteriche. Appare interessante approfondire aspetti legati alla ottimizzazione dei processi di assimilazione e di riduzione dissimilativa, in relazione ai carichi organici dei substrati e alla disponibilità di azoto inorganico nella colonna d'acqua.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., 1981. Standard methods for the examination of water and wastewater. A.P.H.A., Washington, 1134 pp.
- Adamus C.L. & Bergmann MJ., 1995. Estimating nonpoint source pollution loads with a GIS screening model. *Water Resources Bull.*, 31: 647-655.
- Addy K., Gold A., Nowicki B., McKenna J., Stolt M. & Groffman P., 2005. Denitrification capacity in a subterranean estuary below a Rhode Island fringing marsh. *Estuaries*, 28: 896-908.
- Alexander R.B, Smith R.A & Schwarz G.E., 2000. Effect of stream channel size on the delivery of nitrogen to the Gulf of Mexico. *Nature*, 403: 758-761.
- Alexander R.B., Johnes P.J., Boyer E.W. & Smith R.A., 2002. A comparison of models for estimating the riverine export of nitrogen from large watersheds. *Biogeochemistry*, 57/58: 295-339.
- Alvarez-Cobelas M., Angeler D.G. & Sánchez-Carrillo S., 2008. Export of nitrogen from catchments: A worldwide analysis. *Environmental Pollution*, 156: 261-9.
- Anderson L.G., Hall P.O.J., Iverfeldt A., van der Loeff M.M.R., Sundby B. & Westerlund S.F.G., 1986. Benthic respiration measured by total carbonate production. *Limnology and Oceanography*, 31: 319-329.
- Arango C.P., Tank J.L., Johnson L.T. & Hamilton S.K., 2008. Assimilatory uptake rather than nitrification and denitrification determines nitrogen removal patterns in streams of varying land use. *Limnology and Oceanography*, 53: 2558-2572.
- Arheimer B. & Brandt M., 1998. Modelling nitrogen transport and retention in the catchments of southern Sweden. *Ambio*, 27(6): 471-480.
- Armstrong W., 1964. Oxygen diffusion from the roots of some British bog plants. *Nature*, 204: 801-802.
- Armstrong W., 1971. Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration and waterlogging. *Physiologica Plantarum*, 25: 192-197.
- Armstrong J. & Armstrong W., 1988. *Phragmites australis*: a preliminary study of soil-oxidising sites and internal gas transport pathways. *New Phytologist*, 108: 373-382.
- Armstrong W., Cousins D., Armstrong J., Turner D.W. & Beckett P.M., 2000. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Annals of Botany*, 86: 687-703.
- Arnold J.G., Srinivasan R., Muttiah R. S. & Williams J. R., 1998. Large-area hydrologic modeling and assessment: Part I. Model development. *Journal of the American Water Resources Association*, 34: 73-89.
- Arth I., Frenzel P. & Conrad R., 1998. Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 509-515.
- Asman W.A.H., 1998. Factors influencing local dry deposition of gases with special reference to ammonia. *Atmospheric Environment*, 32(3): 415-421.
- Aspila K.I., Agemian H. & Chau A.S.Y., 1976. A semiautomated method for the determination of inorganic, organic and total phosphate in sediments. *Analyst*, 101: 187-197.
- Azzoni R., Giordani G. & Viaroli P., 2005. Iron-sulphur-phosphorus interactions: implications for sediment buffering capacity in a mediterranean eutrophic lagoon (Sacca di Goro, Italy). *Hydrobiologia*, 550: 131-148.

- Bachand P.A.M. & Horne A.J., 2000. Denitrification in constructed free-water surface wetlands: I. Very high nitrate removal rates in a macrocosm study. *Ecological Engineering*, 14: 9–15.
- Bagwell C.E., Dantzer M., Bergholz P.W. & Lovell C.R., 2001. Host-specific ecotype of rhizoplane diazotrophs of the perennial glasswort *Salicornia virginica* and selected salt marsh grasses. *Aquatic Microbial Ecology*, 23: 293–300.
- Barko J.W., Gunnison G. & Carpenter S.R., 1991. Sediment interactions with submersed macrophyte growth and community dynamics. *Aquatic Botany*, 41: 41–65.
- Bartoli M., Nizzoli D. & Viaroli P., 2003. Microphytobenthos activity and fluxes at the sediment-water interface: interactions and spatial variability. *Aquatic Ecology*, 37: 341–349.
- Bashkin V.N., Park S.U., Choi M.S. & Lee C.B., 2002. Nitrogen budgets for the Republic of Korea and the Yellow Sea region. *Biogeochemistry*, 57/58: 387–403.
- Bastviken S.K., Eriksson P.G., Premrov A. & Tonderski K., 2005. Potential denitrification in wetland sediments with different plant species detritus. *Ecological Engineering*, 25: 183–190.
- Bedford B.L., Bouldin D.R. & Beliveau B.D., 1991. Net oxygen and carbon-dioxide balances in solutions bathing roots of wetland plants. *Journal of Ecology*, 79: 943–959.
- Behrendt H. & Opitz D., 2000. Retention of nutrients in river systems: dependence on specific runoff and hydraulic load. *Hydrobiologia*, 410: 111–122.
- Bernot M.J. & Dodds W.K., 2005. Nitrogen retention, removal, and saturation in lotic ecosystems. *Ecosystems*, 8: 442–453.
- Beusen A.H.W., Klepper O. & Meinardi C.R., 1995. Modelling the flow of nitrogen and phosphorus in Europe: from loads to coastal seas. *Water, Science and Technology*, 31(8): 141–145.
- Billen G., Somville M., DeBecker E. & Servais P., 1985. A nitrogen budget of the Scheldt hydrographical basin. *Netherlands Journal of Sea Research*, 19:223 – 230.
- Billen G. & Garnier J., 1999. Nitrogen transfer through the Seine drainage network: a budget based on the application of the RIVERSTRAHLER Model. *Hydrobiologia*, 410: 139–150.
- Bodelier P.L.E., Duyts H., Blom C.W.P.M. & Laanbroek H. J., 1998. Interactions between nitrifying and denitrifying bacteria in gnotobiotic microcosms planted with the emergent macrophyte *Glyceria maxima*. *FEMS Microbiology Ecology*, 25:63–78.
- Bolpagni R., Pierobon E., Longhi D., Nizzoli D., Bartoli M., Tomaselli M. & Viaroli P., 2007. Diurnal exchanges of CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> across the water–atmosphere interface in a water chestnut meadow (*Trapa natans* L.). *Aquatic Botany*, 87: 43–48.
- Borbor-Cordova M.J., Boyer E.W., McDowell W.H. & Hall C.A., 2006. Nitrogen and phosphorus budgets for a tropical watershed impacted by agricultural land use: Guayas, Ecuador. *Biogeochemistry*, 79: 135–161.
- Bouraoui F., Turpin N. & Boerlen P., 1999. Trend Analysis of Nutrient Concentrations and Loads in Surface Water in an Intensively Fertilized Watershed. *Journal of Environmental Quality*, 28:1878–1885.
- Bouwman A. F., Van Drecht G., Knoop J.M., Beusen A.H.W. & Meinardi C. R., 2005. Exploring changes in river nitrogen export to the world's oceans. *Global Biogeochem. Cycles*, 19: GB1002, doi:10.1029/2004GB002314.
- Bowen J.L., Ramstack J.M., Mazzilli S. & Valelia I., 2007. NLOAD: an interactive web-based modeling tool for nitrogen management in estuaries. *Ecological Applications*, 17(5): S17–S30.
- Boyer E.W., Goodale C.L., Jaworski N.A. & Howarth R., 2002. Anthropogenic nitrogen sources and relationships to riverine nitrogen export in the northeastern U.S.A. *Biogeochemistry*, 57/58: 137–169.

- Boyer E.W., Howarth R.W., Galloway J.N., Dentener F.J., Green P.A. & Vörösmarty C.J., 2006. Riverine nitrogen export from the continents to the coasts. *Global Biogeochemical Cycles* 20: GB1S91, doi:10.1029/2005GB002537.
- Brandes J.A., Devol A.H. & Deutsch C., 2007. New developments in the marine nitrogen cycle. *Chemical Reviews*, 107: 577-589.
- Brinson M.M., 1993a. Changes in the functioning of wetlands along environmental gradients. *Wetlands*, 13: 65-74.
- Brinson M.M., 1993b. A hydrogeomorphic classification for wetlands. Technical report WRP-DE-4, U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS.
- Brinson M.M., Smith R.D., Whigham D.F., Lee L.C., Rheinhardt R.D. & Nutter W.L., 1998. Progress in development of the hydrogeomorphic approach for assessing the functioning of wetlands. Paper presented at INTECOL's V International Wetland Conference, Perth, Australia, 22-28 September 1998.
- Brunet R.C. & Garcia-Gil L.J., 1996. Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 21: 131-38.
- Burgin A.J. & Hamilton S.K., 2007. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5: 89-96.
- Burke D.J., Hamerlynck E.P. & Hahn D., 2002. Interactions among plant species and microorganisms in salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1157-1164.
- Bussink D.W. & Oenema O., 1998. Ammonia volatilization from dairy farming systems in temperate areas: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51: 19-33.
- Buzzacchi C., Ferraresi M., Galli M. & Magri P., 2008. Stima dei fabbisogni irrigui ottimali dei consorzi di bonifica utenti del Lago di Garda. Relazione per Consorzio di bonifica Fozza di Pozzolo, Consorzio di bonifica Sud-Ovest Mantova, Consorzio di bonifica Alta e Media Painuta Mantovana, Consorzio di bonifica Colli Morenici del Garda, 25 p.
- Cacador I., Vale C. & Caterino F., 1996. Accumulation of Zn, Pb, Cu, Cr and Ni in sediments between roots of Tagus Estuary Salt Marshes, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 42: 393-403.
- Caffrey J.M. & Kemp W.M., 1990. Nitrogen cycling in sediments with estuarine populations of *Potamogeton perfoliatus* and *Zoostera marina*. *Marine Ecology Progress Series*, 66:147-160.
- Caffrey J. M. & Kemp W. M., 1992. Influence of the submersed plant, *Potamogeton perfoliatus* L., on nitrogen cycling in estuarine sediments. *Limnology and Oceanography*, 37:1483-1495.
- Capone D.G. & Kiene R.P., 1988. Comparison of microbial dynamics in freshwater and marine environments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnology and Oceanography*, 33: 725-749.
- Caraco N.F. & Cole J.J., 1999. Human impact on aquatic nitrogen loads: A regional scale study using large river basins. *Ambio*, 28: 167-170.
- Caraco N., Cole J., Findlay S. & Wigand C., 2006. Vascular Plants as engineers of oxygen in aquatic systems. *BioScience*, 56: 219-225.
- Carignan R., 1982. An experimental model to estimate the relative importance of roots in P uptake by aquatic macrophytes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39: 243-247.
- Carpenter S.R., Elser J.J. & K.M. Olson, 1983. Effects of roots of *Myriophyllum verticillatum* L. on sediment redox conditions. *Aquatic Botany*, 17: 243-249.
- Carr G.M. & Chambers P.A., 1998. Macrophyte growth and sediment phosphorus and nitrogen in a Canadian prairie river. *Freshwater Biology*, 39: 525-536.
- Castiglioni G.B., 1991. *Geomorfologia*. UTET, Torino, 436 pp.

- Cedergreen N. & Madsen T.V., 2003. Nitrate reductase activity in roots and shoots of aquatic macrophytes. *Aquatic Botany*, 76: 203-212.
- Chambers P.A., Prepas E.E., Bothwell M.L. & Hamilton H.R., 1989. Roots versus shoots in nutrient uptake by aquatic macrophytes in flowing waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46: 435–439.
- Chanton J.P. & Whiting G.J., 1995. Trace gas exchange in freshwater and coastal marine systems: ebullition and plant transport. In: Matson P., Harriss R. (Eds). *Methods in Ecology: Trace Gases*. Blackwell, pp. 98-125.
- Christensen J.P., Murray J.W., Devol A.H. & Codispoti L.A., 1987. Denitrification in continental shelf sediments has major impact on the oceanic nitrogen budget. *Global Biogeochemical Cycles*, 1: 97 – 116.
- Christensen K.K. & Andersen F.Ø., 1996. Influence of *Littorella uniflora* on phosphorus retention in sediment supplied with artificial porewater. *Aquatic Botany*, 55: 183-197.
- Christensen K.K., Andersen F.Ø. & Jensen H.S., 1997. Comparison of iron, manganese, and phosphorus retention in freshwater littoral sediment with growth of *Littorella uniflora* and benthic microalgae. *Biochemistry*, 38: 149-171.
- Christensen P. B. & Sorensen J., 1986. Temporal variations of denitrification activity in plant-covered, littoral sediment from Lake Hampen, Denmark. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 1174-1179.
- Christensen P.B., Nielsen L.P., Sorensen J. & Revsbech N.P., 1990. Denitrification in nitrate-rich streams: diurnal and seasonal variations related to benthic oxygen metabolism. *Limnology and Oceanography*, 35: 640–651.
- Christensen P.B., Revsbech N.P. & Sand-Jensen K., 1994. Microsensor analysis of oxygen in the rhizosphere of the aquatic macrophyte *Littorella uniflora* (L.) ascherson. *Plant Physiology*, 105:847-852.
- Clément J.C., Holmes R.M., Peterson B.J. & Pinay G., 2003. Isotopic investigation of denitrification in a riparian ecosystem in western France. *Journal of Applied Ecology*, 40: 1035-1048.
- D’Auria G. & Zavagno F., 1999. Indagine sui “bodri” della provincia di Cremona. Ed. Provincia di Cremona, *Monografie di Pianura* 3, 230 pp.
- Daane L.L., Harjono I., Zylstra G.J. & Häggblom M.M., 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2683–2691.
- Dacey J.W.M., 1980. Internal winds in the water-lilies: an adaptation for life in anaerobic sediments. *Science*, 210: 1017-1019.
- Dalsgaard T., Nielsen L.P., Brotas V., Viaroli P., Underwood G.J.C., Nedwell D.B., Sundbäck K., Rysgaard S., Miles A., Bartoli M., Dong L., Thornton D.C.O., Ottosen L.D.M., Castaldelli G. & Risgaard-Petersen N., 2000. Protocol handbook for NICE-Nitrogen cycling in estuaries: a project under the EU research programme. *Marine Science and Technology (MAST III)*. National Environmental Research Institute, Silkeborg, Denmark, 62 p.
- Dalsgaard T., Thamdrup B. & Canfield D.E., 2005. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology*, 156: 457–464.
- Davidson E.A. & Seitzinger S.P., 2006. The Enigma of Progress in Denitrification Research. *Ecological Applications*, 16(6): 2057-2063.
- Day J.W., Ko J.J., Rybczyk J., Sabins D., Bean R., Berthelot G., Brantley C., Cardoch L., Conner W., Day J.N., Englande A.J., Feaglei S., Hyfield E., Lane R., Lindsey J., Mistch J., Reyes E. & Twilley R. 2004. The use of wetlands in the Mississippi delta for wastewater assimilation: a review. *Ocean & Coastal Management*, 47: 671-691.

- De Wit M.J.M., 2001. Nutrient fluxes at the river basin scale. I. The PolFlow model. *Hydrological Processes*, 15: 743–759.
- Degobbi D. & Gilmartin M., 1990. Nitrogen, phosphorous, and biogenic silicon budget for the northern Adriatic Sea. *Oceanologica Acta*, 13: 31 – 45.
- Diaz R.J. & Rosenberg R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321: 926-929.
- Dumont E., Harrison J. A., Kroeze C., Bakker E. J. & Seitzinger S. P., 2005. Global distribution and sources of dissolved inorganic nitrogen export to the coastal zone: Results from a spatially explicit, global model. *Global Biogeochemical Cycles*, 19: GB4S02, doi:10.1029/2005GB002488.
- Eyre B.D. & Ferguson A.J.P., 2002. Comparison of carbon production and ecomposition, benthic nutrient fluxes and denitrification in seagrass, phytoplankton, benthic microalgae and macroalgae dominated warm-temperate Australian lagoons. *Marine Ecology Progress Series*, 229: 43–59.
- Ferguson A.J. P. & Eyre B.D., 2007. Seasonal discrepancies in denitrification measured by isotope pairing and N<sub>2</sub>:Ar techniques. *Marine Ecology Progress Series*, 350: 19–27.
- Ferm M., 1998. Atmospheric ammonia and ammonium transport in Europe and critical loads: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51: 5-17.
- Flessa H., 1994. Plant-induced changes in the redox potential of the rhizospheres of the submerged vascular macrophytes *Myriophyllum verticillatum* L. and *Ranunculus circinatus* L.. *Aquatic Botany*, 47: 119-129.
- Flindt M.R., 1994. Measurements of nutrient fluxes and mass balances by on-line in situ dialysis in a *Zostera marina* bed culture. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 25: 2259–2264.
- Focht D.D. & Verstraete W., 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Advances in Microbial Ecology*, 1: 135–214.
- Galloway J.N., 1998. The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environmental Pollution*, 102 (1): 15-24.
- Galloway J.N., Dentener F.J., Capone D.G., Boyer E.W., Howarth R.W., Seitzinger S.P., Asner G.P., Cleveland C.C., Green P.A., Holland E.A., Karl D.M., Michaels A.F., Porter J.H., Townsend A.R. & Vörösmarty C.J., 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70: 153–226.
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erisman J.W., Bekunda M., Cai Z., Freney J.R., Martinelli L.A., Seitzinger S.P. & Sutton M.A., 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science*, 320 (5878): 889 – 892. DOI: 10.1126/science.1136674
- Gardner W.S. & McCarthy M.J., 2009. Nitrogen dynamics at the sediment–water interface in shallow, sub-tropical Florida Bay: why denitrification efficiency may decrease with increased eutrophication. *Biogeochemistry*, 95: 185–198.
- Garnier J., Servais P., Billen G., Akopian M. & Brion N., 2001. Lower Seine River and Estuary (France) Carbon and Oxygen Budgets During Low Flow. *Estuaries*, 24: 964–976.
- Garnier J., Billen G., Hannon E., Fonbonne S., Videnina Y. & Soulie M., 2002. Modelling the transfer and retention of nutrients in the drainage network of the Danube River. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 54(3): 285–308.
- Gerard G. & Chanton J., 1993. Quantification of methane oxidation in the rhizosphere of emergent aquatic macrophytes: defining upper limits. *Biogeochemistry*, 23: 79-97.

- Gilbert F., Stora G. & Bonin P., 1998. Influence of bioturbation on denitrification activity in Mediterranean coastal sediments: an in situ experimental approach. *Marine Ecology Progress Series*, 163: 99 – 107.
- Golterman H.L., Clymo R.S. & Ohnstand M.A.M., 1978. Methods for physical and chemical analysis of fresh waters. I.B.P. Handbook Nr. 8, Blackwell, Oxford, 213 p.
- Green P.A., Vorosmarty C.J., Meybeck M., Galloway J.N., Peterson B.J. & Boyer E.W., 2004. Pre-industrial and contemporary fluxes of nitrogen through rivers: a global assessment based on typology. *Biogeochemistry*, 68: 71–105.
- Grice A.M., Loneragan N.R. & Dennison W.C., 1996. Light intensity and the interactions between physiology, morphology and stable isotope ratios in five species of seagrass. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 195: 91-110.
- Grignani C. & Zavattaro L., 1999. Reflui zootecnici. L'importanza di una corretta distribuzione sotto l'aspetto agronomico e ambientale. Quaderni della Regione Piemonte – Agricoltura n° 19, dicembre 1999.
- Grimvall A. & Stålnacke P., 1996. Statistical methods for source apportionment of riverine loads of pollutants. *Environmetrics*, 7: 201–213.
- Grimvall A., Stålnacke P. & Tonderski A., 2000. Time scales of nutrient losses from land to sea – a European perspective. *Ecological Engineering*, 14: 363-371.
- Grizzetti B., Bouraoui F. & De Marsily G., 2008. Assessing nitrogen pressures on European surface water. *Global Biogeochemical Cycles*, 22: GB4023, doi:10.1029/2007GB003085.
- Groffman P.M., Altabet M.A., Böerhke J.K., Butterbach-Bahl K., David M.B., Firestone M.K., Giblin A.E., Kana T.M., Nielsen L.P. & Voytek M.A., 2006. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications*, 16: 2091–2122.
- Große W., 1996. The mechanism of thermal transpiration (thermal osmosis). *Aquatic Botany*, 54: 101-110.
- Hauxwell J., Frazer T.K. & Osenberg C.W., 2007. An annual cycle of biomass and productivity of *Vallisneria Americana* in a subtropical spring-fed estuary. *Aquatic Botany*, 87: 61-68.
- Heijs S.K., Azzoni R., Giordani G., Jonkers H.M., Nizzoli D., Viaroli P. & van Gemerden H., 2000. Sulphide-induced release of phosphate from sediments of coastal lagoons and the possible relation to the disappearance of *Ruppia* sp. *Aquatic Microbial Ecology*, 23: 85-95.
- Heilman M. & Carlton R.G., 2001. Methane oxidation associated with submerged vascular macrophytes and its impact on plant diffusive methane flux. *Biogeochemistry*, 52: 207-224.
- Hemminga M.A., 1998. The root/rhizome system of seagrasses: an asset and a burden. *Journal of Sea Research*, 39: 183-196.
- Hénault C. & Germon J.C., 2000. NEMIS, a predictive model of denitrification on the field scale. *Eur. Journal of Soil Science*, 51: 257–270.
- Hernandez M.E. & Mitsch W.J., 2007. Denitrification in created riverine wetlands: influence of hydrology and season. *Ecological Engineering*, 30: 78–88.
- Herridge D.F., Peoples M.B. & Boddey R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311: 1-18.
- Herrman K.S. & White J.R., 2008. Denitrification in intact sediment cores from a constructed wetland: examining the isotope pairing technique. *Applied Geochemistry*, DOI 10.1016/j.apgeochem.2008.04.024
- Herrman K.S., Bouchard V. & Moore R.H., 2008. An assessment of nitrogen removal from headwater streams in an agricultural watershed, northeast Ohio, U.S.A. *Limnology and Oceanography*, 53(6): 2573–2582.

- Hetling L.J., Jaworski N.A. & Garretson D.J., 1999. Comparison of nutrient input loading and riverine export fluxes in large watersheds. *Water Science and Technology*, 39: 189–196.
- Hines M.E., Knollmeyer S.L. & Tugel J.B., 1989. Sulfate reduction and other sedimentary biogeochemistry in a northern New England salt marsh. *Limnology and Oceanography*, 34 (3): 578-590.
- Hines M.E., Evans R.S., Genthner B.R.S., Willis S.G., Friedman S., Rooney-Varga J.N. & Devereux R., 1999. Molecular phylogenetic and biogeochemical studies of sulfate-reducing bacteria in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied and Environment Microbiology*, 65 (5): 2209-2216.
- Hofstra N. & Bouwan A.F., 2005. Denitrification in agricultural soils: summarizing published data and estimating global annual rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 72: 267-278.
- Holmes R.M., Jones J.B., Fisher S.G., Grimm N.B., 1996. Denitrification in a nitrogen-limited ecosystem. *Biogeochemistry* 33: 125–146.
- Howarth R.W., Marino R. & Cole J.J., 1988a. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. *Limnology and Oceanography*, 33: 688-701.
- Howarth R.W., Marino R., Lane J., & Cole J.J., 1988b. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 1. Rates and importance. *Limnology and Oceanography*, 33: 669-687.
- Howarth R.W., Billen G., Swaney D., Townsend A.T., Jaworski N., Lajtha K., Downing J.A., Elmgren R., Caraco N., Jordan T., Berendse E., Freney J., Kudeyarov V., Murdoch P. & Zhao-liang Z., 1996. Regional nitrogen budgets and riverine N e P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: natural and human influences. *Biogeochemistry*, 35: 75-139.
- Howes B.L., Howarth R.W., Teal J.M. & Valiela L., 1981. Oxidation-reduction potentials in a salt-marsh: spatial patterns and interactions with primary production. *Limnology and Oceanography*, 26 (2): 350-360.
- Huettel M. & Gust G., 1992. Solute release mechanisms from confined sediment cores in stirred benthic chambers and flume flows. *Marine Ecology Progress Series*, 82: 187–197.
- Ingersoll T.L. & Baker L.A., 1998. Nitrate removal in wetland microcosms. *Water Research*, 32: 677–684.
- Ingvorsen K. & Brock T.D., 1982. Electron flow via sulphate reduction and methanogenesis in the anaerobic hypolimnion of Lake Mendota. *Limnology and Oceanography*, 27: 559–564.
- Isidoro D., Quíez D. & Aragüés R., 2006. Environmental impact of irrigation in La Violada District (Spain): II. Nitrogen fertilization and nitrate export patterns in drainage. *Journal of Environmental Quality*, 35:776–785.
- Jaynes M.L. & Carpenter S.R., 1986. Effects of vascular and nonvascular macrophytes on sediment and solute dynamics. *Ecology*, 67: 875-882.
- Jespersen D.N., Sorrell B.K. & Brix H., 1998. Growth and root oxygen release by *Typha latifolia* and its effects on sediment methanogenesis. *Aquatic Botany*, 61: 165-180.
- Jetten M.S.M., 2008. The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology*. 10: 2903-2909.
- Johnes P.J., 1996. Evaluation and management of the impact of land use change on the nitrogen and phosphorus load delivered to surface waters: the export coefficient modelling approach. *Journal of Hydrology*, 183: 323–349.
- Johnston C.A., Bridgham S.D. & Schubauer-Berigan J.P., 2001. Nutrient Dynamics in Relation to Geomorphology of Riverine Wetlands Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 65:557–577.
- Jones K.B., Neale A.C., Nash M.S., Van Remortel R.D., Wickham J.D., Riitters K.H. & O'Neill R.V., 2001. Predicting nutrient and sediment loadings to streams from landscape metrics: A multiple watershed study from the United States Mid-Atlantic Region Landscape. *Ecology*, 16: 301–312.

- Kadlec R.H. & Knight R.L., 1996. Treatment Wetlands. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kadlec R.H., 2008. The effects of wetland vegetation and morphology on nitrogen processing. *Ecological Engineering*, 33: 126–141.
- Karjalainen H., Stefansdottir G., Tuominen L. & Kairesalo T., 2001. Do submerged plants enhance microbial activity in sediment? *Aquatic Botany*, 69: 1-13.
- Kemp W.M., Lewis M.R. & Jones T. W., 1986. Comparison of methods for measuring production by the submerged macrophyte *Potamogeton perfoliatus* L. *Limnology and Oceanography*, 31: 1322-1334.
- Keine R.P., 1991. Production and consumption of methane in aquatic systems. In: Rogers J.E. & Whitman W.B. (Ed). *Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases, Methane, Nitrogen Oxides, and Halomethanes*. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC (1991), pp. 111–146.
- Koop-Jakobsen K & Giblin A.E., 2009. Anammox in tidal marsh sediments: the role of salinity, nitrogen loading, and marsh vegetation. *Estuaries Coasts*, 32: 238–245.
- Koretsky C.M., Beuving L., Cuellar A., Haveman M., Shattuck T. & Wagner M., 2008. Influence of *Spartina* and *Juncus* on saltmarsh sediments. II. Trace element geochemistry. *Chemical Geology*, 255: 100-113.
- Kroeze C., Aerts R., van Breemen N., van Dam D., van der Hoek D., Hofschreuder P., Hoosbeek M., de Klein J., Kros H., van Oene H., Oenema O., Tietema A., van der Veeren R. & de Vries W., 2003. Uncertainties in the fate of nitrogen I: An overview of sources of uncertainty illustrated with a Dutch case study. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 66: 43–69.
- Krysanova V. & Haberlandt U., 2002. Assessment of nitrogen leaching from arable land in large river basins - Part I. Simulation experiments using a process-based model. *Ecological Modelling*, 150 (3): 255-275.
- Kulkarni M.V., Groffman P.M. & Yavitt J.B., 2008. Solving the global nitrogen problem: it's a gas!. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4:199–206.
- Laskov C., Horn O. & Hupfer M., 2006. Environmental factors regulating the radial oxygen loss from roots of *Myriophyllum spicatum* and *Potamogeton crispus*. *Aquatic Botany*, 84: 333-340.
- Laursen A.E. & Seitzinger S.P., 2002. Measurement of denitrification in rivers: an integrated, whole reach approach. *Hydrobiologia*, 485: 67–81.
- Laursen A.E. & Seitzinger S.P., 2005. Limitations to measuring riverine denitrification at the whole-reach scale: effects of channel geometry, wind velocity, sampling interval, and temperature and inputs of N<sub>2</sub>-enriched groundwater. *Hydrobiologia*, 545:225-236.
- Lewis E. & Wallace D.W.R., 1998. Program Developed for CO<sub>2</sub> System Calculations. ORNL/CDIAC-105. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee.
- Lin J.F., 2006. A Regional Guidebook for Applying the Hydrogeomorphic Approach to Assessing Wetland Functions of Depressional Wetlands in the Upper Des Plaines River Basin. Final report ERDC/EL TR-06-4, US Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS, p 18-22.
- Liu C., Watanabe M. & Wang Q., 2008. Changes in nitrogen budgets and nitrogen use efficiency in the agroecosystems of the Changjiang River basin between 1980 and 2000. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 80: 19-37.
- Lohse L., Kloosterhuis H.T., van Raaphorst W. & Heldere W., 1996. Denitrification rates as measured by the isotope pairing method and by the acetylene inhibition technique in continental shelf sediments of the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 29: 169-179.
- Lomstein B.A., Bonne Guldborg L., Amtoft Neubauer A.T., Hansen J., Donnelly A., Herbert R.A., Viaroli P., Giordani G., Azzoni R., de Wit R. & Finster K. 2006. Benthic decomposition of *Ulva lactuca*: a controlled laboratory experiment. *Aquatic Botany*, 85: 271-281.

- Lorenzen C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 12: 343–346.
- Luther G.W. & Church T.M., 1988. Seasonal cycling of sulfur and iron in porewaters of a Delaware salt marsh. *Marine Chemistry*, 23: 295-309.
- Ma F.G., Goto S., Tamai K. & Ichii M., 2001. Role of root hairs and lateral roots in silicon uptake by rice. *Plant Physiology*, 127: 1773-1780.
- Macko S.A. & Orstom N.E., 1994. Pollution studies using nitrogen isotopes. In: Lajtha K., Michener M.M. (Ed). *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Scientific, Oxford, UK, pp. 45-62.
- Madureira M.J., Vale C. & Goncalves M.L.S., 1997. Effect of plants on sulphur geochemistry in the Tagus salt-marshes sediments. *Marine Chemistry*, 58: 27-37.
- Mander U., Kuusemets V., Lohmus K. & Muring T., 1997. Efficiency and dimensioning of riparian buffer zones in agricultural catchments. *Ecological Engineering*, 8: 299-324.
- Martin L.A., Mulholland P.J., Webster J.R. & Valett H.M., 2001. Denitrification potential in sediments of headwater streams in the southern Appalachian Mountains, USA. *Journal of the North American Benthological Society*, 20: 505–519.
- Martin T.L., Kaushik N.K., Trevors J.T. & Whiteley H.R., 1999. Review: denitrification in temperate climate riparian zones. *Water Air Soil Pollution*, 111: 171–186.
- McClain M.E., Boyer E.W., Dent C.L., Gergel S.E., Grimm N.B, Groffman P.M., Hart S.C., Harvey J.W., Johnston C.A., Mayorga E., McDowell W.H. & Pinay G. 2003. Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems*, 6: 301-312.
- McCutchan Jr. J.H. & Lewis W.M.Jr., 2008. Spatial and temporal patterns of denitrification in an effluent-dominated plains river. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 30(2): 323–328.
- McKee L.J. & Eyre B.D., 2000. Nitrogen and phosphorus budgets for the sub-tropical Richmond River catchment, Australia. *Biogeochemistry*, 50: 207-239.
- McRoy C.P., Goering J.I., Chaney B., 1973. Nitrogen fixation associated with seagrasses. *Limnology and Oceanography*, 18: 998-1002.
- Michalopoulos P. & Aller R.C., 1995. Rapid clay mineral formation in Amazon Delta sediments: reverse weathering and oceanic elemental cycles. *Science*, 270: 614-617.
- Mitsch W.J. & Gosselink J.G., 2000. *Wetlands*. Third Edition, John Wiley & Sons Inc, NY Inc, 920 p.
- Moorhead K.K. & Reddy K.R., 1988. Oxygen transport through selected aquatic macrophytes. *Journal of Environmental Quality*, 17: 138-142.
- Mulholland P.J., Helton A.M., Poole G.C., Hall R.O. JR, Hamilton S.K., Peterson B.J., Tank J.L., Ashkenas L.R., Cooper L.W., Dahm C.N., Dodds W.K., Findlay S.E.G., Gregory S.V., Grimm N.B., Johnson S.L., McDowell W.H., Meyer J.L., Valett H.M., Webster J.R., Arango C.P., Beaulieu J.J., Bernot M.J., Burgin A.J., Crenshaw C.L., Johnson L.T., Niederlehner B.R., O'Brien J.M., Potter J.D., Sheibley R.W., Sobota D.J. & Thomas S.M., 2008. Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading. *Nature*, 452: 202-205.
- Nicolaisen M.H., Risgaard-Petersen N., Revsbech N.P., Reichardt W. & Ramsing N.B., 2004. Nitrification-denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 359-369.
- Nielsen L.B., Finster K., Welsh D.T., Donnelly A., Herbert R.A., de Wit R. & Lomstein B.A., 2001. Sulphate reduction and nitrogen fixation rates associated with roots, rhizomes and sediments from *Zostera noltii* and *Spartina maritime* meadows. *Environmental Microbiology*, 3: 63–71.

- Nielsen L. P., 1992. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol Ecology, 86: 357-362.
- Nielsen L.P., Christensen P.B., Revsbech N.P. & Sørensen J., 1990. Denitrification and photosynthesis in stream sediment studied with microsensor and whole-core techniques. Limnology and Oceanography, 35: 1135–1144.
- Nielsen K., Nielsen L. P. & Rasmussen P., 1995. Estuarine nitrogen retention independently estimated by the denitrification rate and mass-balance method: a study of Norsminde Fjord, Denmark. Marine Ecology Progress Series, 119:275–283.
- Nijburg J.W. & Laanbroek H.J., 1997. The fate of <sup>15</sup>N-nitrate in healthy and declining *Phragmites australis* stands. Microbiol Ecology, 34: 254 – 262.
- Nixon S. W., 1995. Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. Ophelia, 41: 199–219.
- Novotny V. & Olem H., 1994. Water Quality: prevention, identification and management of diffuse pollution. Van Nostrand-Reinhold Publ., Wiley & Sons, New York (NY), 1054 p.
- Oenema O. & Heinen M., 1999. Uncertainties in nutrient budget due to biases and errors. In: Smaling E.M.A., Oenema O., Fresco L.O. (Eds.). Nutrient Disequilibria in Agroecosystems: Concepts and Case Studies. CAB International, Wallingford, pp. 75-97.
- Oenema O., Kros H. & De Vries W., 2003. Approaches and uncertainties in nutrient budgets: implications for nutrient management and environmental policies. European Journal of Agronomy, 20: 3-16.
- Ottosen L.D.M., Risgaard-Petersen N. & Nielsen L.P., 1999. Direct and indirect measurements of nitrification and denitrification in the rhizosphere of aquatic macrophytes. Aquatic Microbial Ecology, 19: 81–91.
- Parris K., 1998. Agricultural nutrient balances as agri-environmental indicators: an OECD perspective. Environmental Pollution, 102: 219-225.
- Pedersen O., Sand-Jensen K. & Revsbech N.P., 1995. Diel pulses of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in sandy sediments inhabited by *Lobelia dortmanna*. Ecology, 76 : 1536–1545.
- Petriccione B. & Pompei E., 2002. The CONECOFOR Programme: general presentation, aims and coordination. Journal of Limnology, 61 (1): 3-11.
- Pieterse N.M., Bleuten W. & Jørgensen S.E., 2003. Contribution of point sources and diffuse sources to nitrogen and phosphorus loads in lowland river tributaries. Journal of Hydrology, 271: 213–225.
- Piña-Ochoa E. & Álvarez-Cobelas M., 2006. Denitrification in aquatic environments: a cross-system analysis. Biogeochemistry, 81: 111–130.
- Pinardi M., Bartoli M., Longhi D., Marzocchi U., Laini A., Ribaud C. & Viaroli P., 2009. Benthic metabolism and denitrification in a river reach: a comparison between vegetated and bare sediments. Journal of Limnology, 68: 133-145.
- Pinay G., Clement C.J. & Naiman R.J., 2002. Basic principles and ecological consequences of changing water regimes on nitrogen cycling in fluvial systems. Environmental Management, 30: 481–491.
- Ponnamperuma F. N. 1972. The chemistry of submerged soils. Advances in Agronomy, 24:29-96.
- Provini A., Galassi S. & Marchetti R., 1998. Ecologia Applicata. Città Studi Edizioni, Torino, 1190 pp.
- R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ravit B., Ehrenfeld J.G. & Häggblom M.M., 2003. A comparison of sediment microbial communities associated with *Phragmites australis* and *Spartina alterniflora* in two brackish wetlands of New Jersey. Estuaries, 26(2B): 465–474.

- Ravit B., 2005. Macrophytes and microbes: *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis* affect brackish sediment microbial community structure and function. Dissertation Abstracts International Part B: Science and Engineering, 66 (5): 2488 p.
- Reddy K.R., Patrick W.H. Jr & Lindau C.W., 1989. Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands. *Limnology and Oceanography*, 34: 1004–1013.
- Refsgaard J.C., Thorsen M., Jensen J.B., Kleeschulte S. & Hansen S., 1999. Large scale modelling of groundwater contamination from nitrate leaching. *Journal of Hydrology*, 211: 117–140.
- Regione Lombardia, 2006. Piano di Tutela ed Uso delle Acque. In: Regione Lombardia Risorse Idriche. Disponibile al: [http://www.ors.regione.lombardia.it/cm/pagina.jhtml;jsessionid=A3FBBF524D5D5049F2F850837245675D.nod e1?param1\\_1=N11e3afc18be8ce5ad6f](http://www.ors.regione.lombardia.it/cm/pagina.jhtml;jsessionid=A3FBBF524D5D5049F2F850837245675D.nod e1?param1_1=N11e3afc18be8ce5ad6f). Ultimo accesso 1 marzo 2007.
- Reilly J.F., Horne A.J. & Miller C.D., 2000. Nitrate removal from a drinking water supply with large free-surface constructed wetlands prior to groundwater recharge. *Ecological Engineering*, 14: 33–47.
- Reinhardt M., Müller B., Gächter R. & Wehrli B., 2006. Nitrogen removal in a small constructed wetland: an isotope mass balance approach. *Environmental Science and Technology*, 40: 3313–3319.
- Rekolainen S., 1989. Phosphorus and nitrogen load from forest and agricultural areas in Finland. *Aqua Fennica*, 19(2):95–107.
- Richards F.A., 1965. Anoxic basins and fjords. In: Ryley JP, Skirrow G (eds) *Chemical Oceanography*. Academic Press, London, p 611–645.
- Risgaard-Petersen N., 2003. Coupled nitrification–denitrification in autotrophic and heterotrophic estuarine sediments: On the influence of benthic microalgae. *Limnology and Oceanography*, 48(1): 93–105.
- Risgaard-Petersen N., 2004. Denitrification. S. Nielsen, G. Banta and M. Pedersen (eds.), *Estuarine Nutrient Cycling: The Influence of Primary Producers*, 263–280.
- Risgaard-Petersen N., Rysgaard S., Nielsen L.P. & Revsbech N.P., 1994. Diurnal variation of denitrification and nitrification in sediments colonized by benthic microphytes. *Limnology and Oceanography*, 39(3): 573 – 579.
- Risgaard-Petersen N. & Jensen K., 1997. Nitrification and denitrification in the rhizosphere of the aquatic macrophyte *Lobelia dortmanna* L. *Limnology and Oceanography*, 42: 529–537.
- Risgaard-Petersen N., Nielsen L. P. & Blackburn T. H., 1998a. Simultaneous measurement of benthic denitrification, with the isotope pairing technique and the N<sub>2</sub> flux method in a continuous flow-through system. *Water Research*, 32: 3371–3377.
- Risgaard-Petersen N., Dalsgaard T., Rysgaard S., Christensen P.B., Borum J., McGlathery K. & Nielsen L.P., 1998b. Nitrogen balance of a temperate eelgrass *Zostera marina* bed. *Marine Ecology Progress Series*, 174: 281–291.
- Rivera-Monroy V.H. & Twilley R.R., 1996. The relative role of denitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Terminos Lagoon, Mexico). *Limnology and Oceanography*, 41(2): 284 – 296.
- Roden E.E. & Wetzel R.G., 1996. Organic carbon oxidation and suppression of methane production by microbial Fe(III) oxide reduction in vegetated and unvegetated freshwater wetland sediments. *Limnology and Oceanography*, 41: 1733–1748.
- Rysgaard S., Risgaard-Petersen N., Sloth N.P., Jensen K. & Nielsen L.P., 1994. Oxygen regulation of nitrification and denitrification in sediments. *Limnology and Oceanography*, 39(7): 1643 – 1652.

- Sabater S., Butturini A., Clement J.C., Burt T., Dowrick D., Hefting M., Maitre V., Pinay G., Postolache C., Rzepecki M. & Sabater F., 2003. Nitrogen Removal by Riparian Buffers along a European Climatic Gradient: Patterns and Factors of Variation. *Ecosystems*, 6: 20-30.
- Sand-Jensen K., 1998. Influence of submerged macrophytes on sediment composition and near-bed flow in lowland streams. *Freshwater Biology*, 39: 663-679.
- Sand-Jensen K. & Søndergaard M., 1979. Distribution and quantitative development of aquatic macrophytes in relation to sediment characteristics in oligotrophic Lake Kalgaard, Denmark. *Freshwater Biology*, 9: 1–11.
- Sand-Jensen K. & Prah C., 1982. Oxygen exchange with the lacunae and across leaves and roots of the submerged vascular macrophyte, *Lobelia dortmanna* L. *New Phytologist*, 91: 103-120.
- Sand-Jensen K., Prah C. & Stockholm H., 1982. Oxygen release from roots of submerged aquatic macrophytes. *Oikos*, 38: 349-354.
- Sand-Jensen K. & Borum J., 1991. Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate freshwater and estuaries. *Aquatic Botany*, 41: 137-175.
- Sand-Jensen K., Borum J. & Binzer T., 2005. Oxygen stress and reduced growth of *Lobelia dortmanna* in sandy lake sediments subject to organic enrichment. *Freshwater Biology*, 50: 1034-1048.
- Saunders D.L. & Kalff J., 2001. Nitrogen retention in wetlands, lakes and rivers. *Hydrobiologia*, 443: 205-212.
- Schaller J.L., Royer T.V., David M.B. & Tank J.L., 2004. Denitrification associated with plants and sediments in an agricultural stream. *Journal of the North American Benthological Society*, 23: 667–676.
- Scheffer M., Szabo S., Graganani A., van Nes E.H., Rinaldi S., Kautsky N., Noeberg J., Roijackers R.M.M. & Franken R.J.M., 2003. Floating plant dominance as a stable state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 4040–4045.
- Schipper L.A. & Reddy K.P., 1996. Determination of methane oxidation in the rhizosphere of *Sagittaria lancifolia* using methyl fluoride. *Soil Science Society of America Journal*, 60: 611-616.
- Schlesinger W.H., 2009. On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 203-208.
- Schlesinger W.H. & Hartley A.E., 1992. A global budget for atmospheric NH<sub>3</sub>. *Biogeochemistry*, 15: 191-211.
- Schröder J.J., Scholefield D., Cabral F. & Hofman G., 2004. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in developing indicators for regulation. *Environmental Science e Policy*, 7: 15-23.
- Schubert C.J., Durisch-Kaiser E., Wehrli B., Thamdrup B., Lam P. & Kuypers M.M.M., 2006. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environmental Microbiology*, 8: 1857–1863.
- Schütz H., Schröder P. & Rennenberg H., 1991. Role of plants in regulation the methane flux to the atmosphere. In: Sharje T., Holland E., Mooney H. (Eds). *Trace Gas Emissions by Plants*. Academic Press, San Diego, pp. 29-63.
- Scott T.J., McCarthy M.J., Gardner W.S. & Doyle R.D., 2008. Denitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and nitrogen fixation along a nitrate concentration gradient in a created freshwater wetland. *Biogeochemistry*, 87: 99–111.
- Seitzinger S.P., 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography*, 33: 702–724.

- Seitzinger S.P., 1994. Linkages between organic matter mineralization and denitrification in eight riparian wetlands. *Biogeochemistry*, 25: 19–39.
- Seitzinger S.P., Nielsen L.P., Caffrey J. & Christensen P.B., 1993. Denitrification measurements in aquatic sediments: a comparison of three methods. *Biogeochemistry*, 23: 147-167.
- Seitzinger S.P. & Kroeze C., 1998. Global distribution of nitrous oxide production and N inputs in freshwater and coastal marine ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 12(1): 93-113.
- Seitzinger S.P., Kroeze C., Bouwman A.F., Caraco N., Dentener F. & Styles R.V., 2002a. Global patterns of dissolved inorganic and particulate nitrogen inputs to coastal systems: recent conditions and future projections. *Estuaries*, 25: 640–655.
- Seitzinger S.P., Styles R.V., Boyer E.W., Alexander R.B., Billen G., Howarth R.W., Mayer B. & van Breemen N., 2002b. Nitrogen retention in rivers: model development and application to watersheds in the northeastern USA. *Biogeochemistry*, 57/58: 199–237.
- Seitzinger S. P., Harrison J. A., Dumont E., Beusen A.H.W. & Bouwman A.F., 2005. Sources and delivery of carbon, nitrogen, and phosphorus to the coastal zone: An overview of Global Nutrient Export from Watersheds (NEWS) models and their application. *Global Biogeochemical Cycles*, 19: GB4S01, doi:10.1029/2005GB002606.
- Seitzinger S., Harrison J.A., Bohlke J.K., Bouwman A.F., Lowrance R., Peterson B., Tobias C. & van Drecht G., 2006. Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecological Applications*, 16: 2064–2090.
- Shieh W.Y. & Yang L.T., 1997. Denitrification in the rhizosphere of the two seagrasses *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers and *Halodule uninervis* (Forsk.) Aschers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 218: 229-241.
- Sigmon D.E. & Cahoon L.B., 1997. Comparative effects of benthic microalgae and phytoplankton on dissolved silica fluxes. *Aquatic Microbial Ecology*, 13: 275-284.
- Simpson M.R., 2002. A proposed classification of European wetlands: development and testing. PhD Dissertation, University of London.
- Singleton M.J., Esser B.K., Moran J. E., Hudson G.B., McNab W.W. & Harter T., 2007. Saturated zone denitrification : Potential for natural attenuation of nitrate contamination in shallow groundwater under dairy operations. *Environmental Science and Technology*, 41: 759-765.
- Sirivedhin T. & Gray K.A., 2006. Factors affecting denitrification rates in experimental wetlands: field and laboratory studies. *Ecological Engineering*, 26: 167–181.
- Skop E. & Sorensen P.B., 1998. GIS-based modelling of solute fluxes at the catchment scale: a case study of the agricultural contribution to the riverine nitrogen loading in the Vejle Fjord catchment, Denmark. *Ecological Modelling*, 106 (2): 291-310.
- Smil V., 1999. Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles*, 13: 647-62.
- Smith C.J., DeLaune R.D. & Patrick W.H., 1985. Fate of riverine nitrate entering an estuary: 1. Denitrification and nitrogen burial. *Estuaries*, 8:15-21.
- Smith L.K., Voytek M.A., Bohke J.K. & Harvey J.W., 2006. Denitrification in nitrate-rich streams: application of N<sub>2</sub>:Ar and <sup>15</sup>N-tracer methods in intact cores. *Ecological Applications*, 16(6): 2191-2207.
- Smith R.A., Schwarz G.E. & Alexander R.B., 1997. Regional interpretation of water-quality monitoring data. *Water Resources Research*, 33 (12): 2781–2798.
- Smith, R.D., Dennison, W.C. & Alberte, R.S., 1984. Role of seagrass photosynthesis in root aerobic processes. *Plant Physiology*, 74: 1055-1058.

- Smith V.H., Joye S.B. & Howarth R.W., 2006. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 51: 351–355.
- Soda S., Ike M., Ogasawara Y., Yoshinaka M., Mishima D. & Fujita M., 2007. Effects of light intensity and water temperature on oxygen release from roots into water lettuce rhizosphere. *Water Research*, 41: 487–491.
- Steingruber S.M., Friedrich J., Gächter R. & Wehrli B., 2001. Measurement of denitrification in sediments with the  $^{15}\text{N}$  isotope pairing technique. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9): 3771–3778.
- Steinhart G.S., Likens G.E. & Groffman P.M., 2001. Denitrification in stream sediments of five northeastern (USA) streams. *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 27: 1331–1336.
- Stevens R.J. & Laughlin R.J., 1998. Measurement of nitrous oxide and di-nitrogen emissions from agricultural soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52: 131–139.
- Stookey L.L., 1970. Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, 42: 779–781.
- Struyf E. & Conley D.J., 2009. Silica: an essential nutrient in wetland biogeochemistry. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7: 88–94.
- Sundbäck K., Miles A. & Göransson E., 2000. Nitrogen fluxes, denitrification and the role of microphytobenthos in microtidal shallow-water sediments: an annual study. *Marine Ecology Progress Series*, 200: 59–76.
- Svensson J.M. & Leonardson L., 1996. Effects of bioturbation by tube-dwelling chironomid larvae on oxygen uptake and denitrification in eutrophic lake sediments. *Freshwater Biology*, 35: 289 – 300.
- Svensson J.M., 1997. Influence of *Chironomus plumosus* larvae on ammonium flux and denitrification (measured by the acetylene blockage- and the isotope pairing-technique) in eutrophic lake sediment. *Hydrobiologia*, 346: 157 – 168.
- Tagliaferri A., Berizzi D., Bianchi A. Arese C., Balestrini R. & Del Conte C. 2007. Gestione aree di studio sulle condizioni dei boschi (CON.ECO.FOR). Relazione tecnico scientifica conclusiva, anno 2006.
- Teiter S. & Mander U., 2005. Emission of  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ , and  $\text{CO}_2$  from constructed wetlands for wastewater treatment and from riparian buffer zones. *Ecological Engineering*, 25: 528–541.
- Toet S., Huibers L.H.F.A., Richard S.P. & Verhoeven J.T.A., 2003. Denitrification in the periphyton associated with plant shoots and in the sediment of a wetland system supplied with sewage treatment plant effluent. *Hydrobiologia*, 501: 29–44.
- Trimmer M., Nicholls J.C. & Deflandre B., 2003. Anaerobic Ammonium Oxidation Measured in Sediments along the Thames Estuary, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6447–6454.
- Trimmer M., Risgaard-Petersen N., Nicholls J.C. & Engstrom P., 2006. Direct measurements of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification in intact sediment cores. *Marine Ecology Progress Series*, 326: 37–47.
- Tufford D.L., McKellar H.N. & Hussey Jr. J.R., 1998. In-Stream Nonpoint Source Nutrient Prediction with Land-Use Proximity and Seasonality. *Journal of Environmental Quality*, 27:100–111.
- Valderrama J.C., 1977. Methods used by the hydrographica department of the national board of fisheries. Goteborg, Sweden.
- van Breemen N., Boyer E.W., Goodale C.L., Jaworski N.A., Paustian K., Seitzinger S.P., Lajtha K., Mayer B., Vandam D., Howarth R.W., Nadelhoffer K.J., Eve M. & Billen G., 2002. Where did all the nitrogen go? Fate of nitrogen inputs to large watersheds in the northeastern U.S.A. *Biogeochemistry* 57/58: 267–293.

- Van der Nat F.J.W.A. & Middelburg J.J., 1998. Effects of two common macrophytes on methane dynamics in freshwater sediments. *Biogeochemistry*, 43: 79–104.
- Van Drecht G., Bouwman A.F., Knoop J.M., Beusen A.H.W. & Meinardi C.R., 2003. Global modelling of the fate of nitrogen from point and non point sources in soils, groundwater, and surface water. *Global Biogeochemical Cycles*, 17(4): 1115, doi:10.1029/2003GB002060.
- Van Drecht G., Bouwman A.F., Boyer E.W., Green P. & Siebert S., 2005. A comparison of global spatial distributions of nitrogen inputs for nonpoint sources and effects on river nitrogen export. *Global Biogeochem. Cycles*, 19: GB4S06, doi:10.1029/2005GB002454.
- van Luijn F., Boers P.C.M. & Lijklema L., 1996. Comparison of denitrification rates in lake sediments obtained by the N<sub>2</sub> flux method, the <sup>15</sup>N isotope pairing technique and the mass-balance approach. *Water Research*, 30: 893–900.
- Vartapetian B.B. & Jackson M.B., 1997. Plant Adaptations to Anaerobic Stress. *Annals of Botany*, 79(Supplement A): 3-20.
- Ventura M., Scandellari F., Ventura F., Guzzon B., Ross Pisa P. & Tagliavini M., 2008. Nitrogen balance and losses through drainage waters in an agricultural watershed of the Po Valley (Italy). *European Journal of Agronomy*, 29: 108-115.
- Verhoeven J.T.A., Arheimer B., Yin C. & Hefting M.M., 2006. Regional and global concerns over wetlands and water quality. *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 96–103.
- Viaroli P., Bartoli M., Giordani G., Naldi M., Orfanidis S. & Zaldivar J.M., 2008. Community shifts, alternative stable states, biogeochemical controls and feedbacks in eutrophic coastal lagoons: a brief overview. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18:105-117.
- Viney N.R., Sivapalan M. & Deeley D., 2000. A conceptual model of nutrient mobilisation and transport applicable at large catchment scales. *Journal of Hydrology*, 240: 23-44.
- Vitosh M.L., 1996. NPK fertilizers. Michigan, University Press.
- Vitousek P.M. & Matson P.A., 1993. Agriculture, the global nitrogen cycle, and trace gas flux, p. 193-208. In: Oremland, R (Ed) *Biogeochemistry of Global Change: Radiatively Active trace Gases*. Chapman and Hall, NY.
- Vitousek P.M., Aber J.D., Howarth R.W., Likens G.E., Matson P.A., Schindler D.W., Schlesinger W.H. & Tilman D.G., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7: 737-750.
- Watson C.A. & Atkinson D., 1999. Using nitrogen budget to indicate nitrogen use efficiency and losses from whole farming systems: a comparison of three methodological approaches. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 53: 259- 267.
- Weiss J.V., Emerson D. & Megonigal J.P., 2004. Geochemical control of microbial Fe(III) reduction potential in wetlands: Comparison of the rhizosphere to non-rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 48:89–100.
- Whitehead P.G., Wilson E. J. & Butterfield D., 1998. A semi-distributed Integrated Nitrogen model for multiple source assessment in Catchments (INCA): Part I-model structure and process equations. *The Science of the Total Environment*, 210/211: 547-558.
- Wigand C., Stevenson J.C. & Cornwell J.C., 1997. Effects of different submerged macrophytes on sediment biogeochemistry. *Aquatic Botany*, 56: 233-244.
- Wigand C., Wehr J., Limburg K., Gorham B., Longergan S. & Findlay S., 2000. Effect of *Vallisneria americana* (L.) on community structure and ecosystem function in lake mesocosms. *Hydrobiologia*, 418: 137-146.

Wium-Andersen S. & Andersen J.M., 1972. Carbon dioxide content of the interstitial water in the sediment of Grane Langsø, a Danish Lobelia lake. *Limnology and Oceanography*, 17: 943-947.

[www.denitrification.org](http://www.denitrification.org)

Yoon W.B. & Benner R., 1992. Denitrification and oxygen consumption in sediments of two south Texas estuaries. *Marine Ecology Progress Series*, 90: 157-167.

Yu K., DeLaune R.D. & Boeckx P., 2006. Direct measurement of denitrification activity in a Gulf coast freshwater marsh receiving diverted Mississippi River water. *Chemosphere*, 65: 2449–2455.

Zhou S. & Hosomi M., 2008. Nitrogen transformations and balance in a constructed wetland for nutrient-polluted river water treatment using forage rice in Japan. *Ecological Engineering*, 32: 147–155.

)