

# IL RAPPORTO ISOTOPICO PER MISURARE LE FONTI DI NITRATI

ISPRA HA EFFETTUATO UNO STUDIO SPERIMENTALE PER DETERMINARE LA MASSA DI NITRATI RIFERIBILI ALLE DIVERSE SORGENTI NATURALI E ANTROPICHE. APPARE CONFERMATA L'EFFICACIA DEL METODO ISOTOPICO, E IN PARTICOLARE DEL MODELLO SIAR. IL CONFRONTO CON IL METODO PARAMETRICO È SODDISFACENTE, SEPPUR CON DIFFUSE INCERTEZZE.

**I**l contributo delle differenti sorgenti di nitrati nelle acque è stato determinato mediante la sperimentazione di un modello di miscelamento isotopico (apporzionamento isotopico). Gli isotopi sono atomi dello stesso elemento caratterizzati da masse diverse, il cui rapporto, ad esempio  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , è facilmente misurabile (*rapporto isotopico*). In natura esistono due isotopi stabili dell'azoto:  $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 1/272$  rapporto in atmosfera). In genere i rapporti isotopici dell'azoto sono riportati in *per mille* (‰) relativi all'azoto molecolare presente in atmosfera  $\text{N}_2$ , utilizzando il simbolo delta:  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) =  $\{[(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_x / (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{AIR}}] - 1\} \times 1000$  dove  $x$  è il campione e AIR è il gas di riferimento internazionale,  $\text{N}_2$  atmosferico ( $\delta^{15}\text{N} = 0$ ).

L'ossigeno invece, ha tre isotopi stabili:  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  e  $^{18}\text{O}$ . Il riferimento internazionale per l'ossigeno ( $\delta^{18}\text{O}$ ) è il valore medio dell'acqua oceanica V-SMOW ( $\delta^{18}\text{O} = 0$ ):  $\delta^{18}\text{O}$  (‰) =  $\{[(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_x / (^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{V-SMOW}}] - 1\} \times 1000$

## L'alterazione isotopica nei processi chimici, fisici e biologici

Processi chimici, fisici e biologici possono alterare la composizione isotopica dei composti coinvolti nelle reazioni provocando in tal modo un frazionamento isotopico tra i reagenti e i prodotti.

In generale, l'isotopo più leggero (con massa minore) reagisce più velocemente di quello pesante, dando origine a prodotti isotopicamente più leggeri dei reagenti.

Le principali reazioni che controllano le dinamiche dell'azoto nel suolo e nelle acque sotterranee sono la mineralizzazione, la volatilizzazione, la nitrificazione e la denitrificazione, per la



maggior parte mediate da microrganismi. Il processo di trasformazione dell'azoto, in gran parte organico, in nitrato è schematizzato in *figura 1*.

Il processo di mineralizzazione della sostanza organica produce ione ammoniacale che rimane nel substrato attraverso la formazione di ammoniaca che può essere coinvolta nel fenomeno di volatilizzazione. La volatilizzazione, legata alla perdita di ammoniaca in atmosfera, è caratterizzata da un elevato frazionamento che vede l'ammoniaca persa in atmosfera particolarmente impoverita in  $^{15}\text{N}$ , mentre lo ione ammonio residuo nel suolo risulta particolarmente arricchito in  $^{15}\text{N}$ . Il fattore di arricchimento del substrato assume valori fino a 30‰, con una media di circa 20‰ in funzione della cinetica del processo. Il processo di volatilizzazione è particolarmente significativo nello spandimento di fertilizzanti ureici e durante la fase di stoccaggio degli effluenti zootecnici. Un ulteriore arricchimento dell'azoto nitrato avviene durante il processo

di nitrificazione: gli atomi di azoto presenti nella molecola di nitrato provengono dall'ammonio (già parzialmente arricchito in seguito al processo di volatilizzazione) e attraverso la formazione di nitrito, prodotto intermedio della nitrificazione, arrivando fino alla formazione dello ione nitrato. L'ulteriore arricchimento dell'azoto è da imputarsi alla reazione cineticamente più lenta, cioè il passaggio da ammonio a nitrito. Gli atomi di ossigeno legati alla molecola di nitrato, invece, provengono in parte dall'aria e in parte dall'acqua, in particolare 1 atomo è preso dall'ossigeno atmosferico e 2 atomi da quello presente nell'acqua. Il rapporto isotopico dell'ossigeno è pertanto strettamente legato alle caratteristiche isotopiche dell'acqua in cui avviene il processo di nitrificazione.

La denitrificazione (i.e. l'utilizzo del nitrato al posto dell'ossigeno quale substrato per l'ossidazione della materia organica) è un processo, mediato da batteri, in grado di provocare anche un elevato frazionamento nella composizione

isotopica del nitrato residuo; in base alle condizioni ambientali il frazionamento, cioè la discriminazione operata dai batteri verso le specie più "leggere", può variare da -1,8 a -40 ‰.

## Il modello sperimentale per la misura delle fonti di nitrati

Una spiccata differenza dell'impronta isotopica delle sorgenti di partenza rappresenta il prerequisite fondamentale per l'utilizzo di  $\delta^{18}\text{O}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  nell'identificazione delle fonti di nitrati nelle acque sotterranee e superficiali, soprattutto tenuto conto che tutti i processi di trasformazione a carico dell'azoto che possono avvenire al suolo, producono arricchimenti non definibili su base matematica perché dipendenti da troppe variabili ambientali.

La cinetica dei processi che coinvolgono l'azoto dipende infatti da numerosi fattori ambientali, quali ad esempio, la tessitura, l'umidità dei suoli ecc. e pertanto l'impronta isotopica finale del nitrato misurato nelle acque dipenderà fortemente, oltre che dall'impronta isotopica delle sorgenti, anche dall'ambiente in cui il nitrato si è prodotto. Per tale ragione la procedura sperimentale applicata per la determinazione dell'apportamento dei nitrati ha previsto la determinazione: - degli *intervalli isotopici tipici delle sorgenti utilizzate sul territorio* (figura 2); tale fase di sperimentazione è stata condotta mediante l'analisi isotopica dell'azoto presente nei reflui zootecnici, nei fertilizzanti minerali, nei reflui civili trattati e non trattati negli impianti di depurazione, e dell'azoto e dell'ossigeno presenti nella molecola di nitrato misurato negli eluati di suoli e di acque superficiali non impattate da sorgenti antropiche - degli *intervalli isotopici dell'azoto nitrato prodotto nei suoli dopo l'utilizzo delle suddette sorgenti*; tale fase di sperimentazione è stata condotta mediante l'analisi dello ione nitrato presente negli eluati dei suoli analizzati sia a priori dell'utilizzo delle sorgenti che dopo trattamento; in tal modo le differenze registrate nel dato relativo all'isotopo pesante dell'azoto sono state attribuite all'arricchimento determinato dai processi di trasformazione che subisce l'azoto immesso al suolo (fattori di correzione delle impronte isotopiche delle sorgenti) - dei valori isotopici dei nitrati misurati nelle acque.

FIG. 1  
FONTI DI NITRATI

Schema del processo di trasformazione dell'azoto.

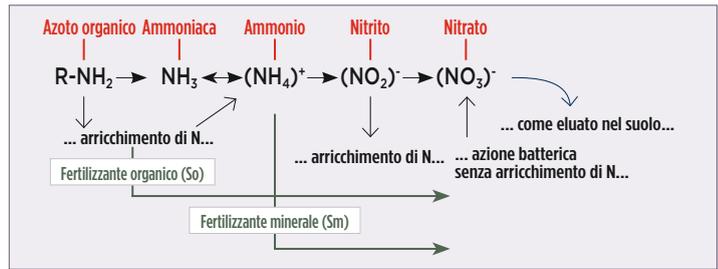
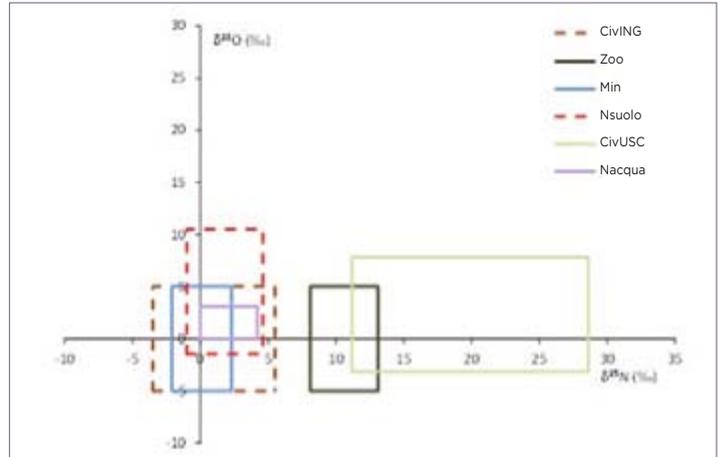


FIG. 2  
FONTI DI NITRATI

Intervalli isotopici del  $\delta^{15}\text{N}$  e del  $\delta^{18}\text{O}$  relativi alle sorgenti e determinati sperimentalmente.



## Attività analitica in laboratorio

Le analisi sui campioni di terreno prelevati nelle aree oggetto di studio sono state effettuate sia sul tal quale - per la determinazione dei parametri chimico-fisici quali tessitura, umidità, presenza di sostanza organica, capacità di scambio cationico, tenore di azoto totale - sia sull'eluato per la determinazione degli ioni principali calcio, magnesio, sodio, potassio, cloruri, solfati, bicarbonati e forme inorganiche dell'azoto.

L'eluato è stato ottenuto per aggiunta di acqua ultrapura in rapporto 1:5 al suolo seccato all'aria e setacciato a 2 mm. Dopo agitazione per 60 minuti, il campione è stato centrifugato e filtrato a 0,2  $\mu\text{m}$ . I campioni di reflui zootecnici e civili non trattati sono stati analizzati per i parametri chimico-fisici da ricercare sull'eluato. L'eluato è stato ottenuto per aggiunta di acqua ultrapura in rapporto 1:5 al liquame liofilizzato, dopo agitazione per 60 minuti.

Le indagini isotopiche sono state condotte nel caso dei *suoli* sia sul tal quale che sull'eluato, nel caso dei *reflui* solo sul tal quale, dato che la forma nitrica dell'azoto era praticamente assente o al di sotto dei limiti di rilevabilità del metodo isotopico per i nitrati.

Per lo svolgimento delle operazioni di campionamento, conservazione, filtrazione e pretrattamento delle acque da sottoporre ad analisi di rapporti isotopici dell'azoto ( $\delta^{15}\text{N}$ ) e dell'ossigeno ( $\delta^{18}\text{O}$ ) dei nitrati disciolti,

è stato applicato il protocollo analitico proposto da Silva e collaboratori (2000). La metodica consente di concentrare i nitrati disciolti nelle acque (e degli eluati dei suoli) su resine a scambio anionico, che, previo recupero dalle resine stesse, vengono quindi analizzati per il contenuto isotopico mediante spettrometria di massa.

## Modello di miscelamento isotopico

Lo step finale della metodologia sperimentale per la determinazione dell'apportamento dei nitrati in falda ha previsto l'applicazione di un modello matematico di miscelamento isotopico. Negli ultimi decenni, la comunità scientifica interessata a studi ecologici ha proposto diversi modelli di miscelamento (*Mixing Models*) isotopico per identificare i contributi delle diverse fonti di cibo nelle diete dei consumatori. Phillips (2002) propose di utilizzare un set di equazioni algebriche (*Linear Mixing Models*) per identificare tali contributi. Partendo da tali equazioni Phillips (2002) sviluppò il modello Isosource; tale modello di miscelamento è in grado di restituire una serie di possibili valori di ripartizione delle fonti. La maggior limitazione di tale modello di miscelamento isotopico consiste nel fatto che non permette di incorporare le incertezze e le variazioni che caratterizzano i dati di *input* (incertezze associate ai rapporti isotopici delle fonti

di cibo e ai fattori di arricchimento dovuti al trasferimento lungo la catena trofica), cioè non permette di considerare la variabilità naturale.

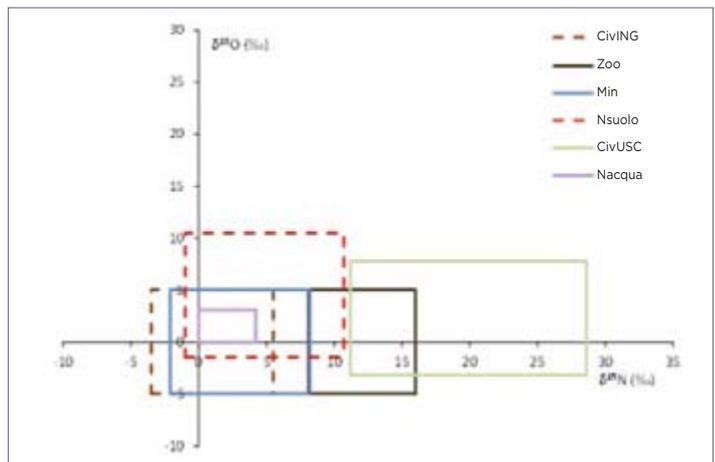
Per superare tale limitazione, sono stati sviluppati dei nuovi modelli di miscelamento isotopico quali ad esempio il MixSIR (Moore and Semmens, 2008) e il Siar (Parnell et al., 2010). Entrambi i modelli di nuova generazione sono basati sulla risoluzione di un sistema di equazioni lineari mediante l'utilizzo di tecniche di statistica Bayesiana per identificare i contributi proporzionali delle fonti di cibo. I modelli Bayesiani restituiscono i valori dei contributi proporzionali sotto forma di distribuzione di probabilità (valori di tendenza centrale e intervalli di confidenza). Per determinare l'apportamento dei nitrati nelle acque abbiamo scelto di applicare il modello di miscelamento Siar.

Il modello Siar utilizza i fattori di correzione, per costruire un dominio isotopico entro cui devono cadere i dati isotopici dei campioni d'acqua da apportionare; in base alla regola secondo la quale il nitrato è generalmente arricchito rispetto all'azoto reagente, i fattori di correzione andranno sommati al rapporto isotopico della sorgente. La rielaborazione degli intervalli isotopici corretti delle sorgenti è rappresentata nella figura 3.

Tenendo in considerazione che il modello isotopico ha particolare significato laddove sia incerta la prevalenza di una sorgente rispetto alle altre, le aree sulle quali è stato applicato lo studio isotopico sono state scelte per la maggior parte con la finalità di risolvere tale incertezza (contributo misto). I risultati dell'applicazione del modello Siar hanno confermato tale ipotesi di contributo misto, offrendo la possibilità di quantificare tale contributo, seppur con un'incertezza del dato fino al 40% (in alcuni casi). Nelle aree indagate si è evidenziato che il contributo derivante dalle attività agricole è maggiore di quello imputabile alla pressione civile (almeno nelle acque sotterranee) e che il contributo imputabile alla fertilizzazione minerale sia più alto di quello legato alla fertilizzazione zootecnica. È da tenere ben presente che le aree sperimentali indagate rappresentano il 3% della superficie dell'intero territorio e che tali risultati sono da considerarsi preliminari, in quanto vista la complessità del sistema indagato, sarà necessario aumentare la numerosità sia dei dati relativi alle sorgenti, sia dei dati relativi ai suoli e ai

FIG. 3  
FONTI DI NITRATI

Intervalli isotopici corretti del  $\delta^{15}\text{N}$  e del  $\delta^{18}\text{O}$  relativi alle sorgenti.



fattori di correzione delle sorgenti. Infine sarà necessario aumentare la frequenza del monitoraggio dei punti da indagare isotopicamente.

### Un metodo efficace, ma occorre processare altri dati

L'applicazione del metodo isotopico in generale, e in particolare del modello Siar, ha dimostrato la sua efficacia per ottenere una stima, seppur probabilistica e affetta da un'ineludibile quota d'incertezza, dell'apportamento e dell'attribuzione alle relative sorgenti potenziali che determinano la presenza di nitrati nelle acque superficiali e sotterranee rilevati con le reti di monitoraggio

(essenzialmente quella ai sensi della WFD); ciononostante risulta necessario ridurre l'incertezza dell'apportamento aumentando il numero di dati modellizzati.

La conoscenza del contributo delle varie sorgenti a integrazione dei dati derivanti dai monitoraggi delle acque superficiali e sotterranee potrà essere di supporto alla pianificazione e alla definizione di misure di tutela che promuovano lo sviluppo e l'incontro di politiche coordinate e condivise di tutela ambientale e di sviluppo rurale e territoriale sostenibile.

**Bernardo De Bernardinis**

Ispra, Istituto superiore per la protezione e la ricerca ambientale

### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Moore, J.W., and B.X. Semmens. 2008. *Incorporating uncertainty and prior information into stable isotope mixing models*. Ecol. Lett. 11:470-480.
- Parnell, A.C., R. Inger, S. Bearhop, and A.L. Jackson. 2010. *Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation*. PLoS ONE 5(3):E9672.
- Phillips, D.L., and P.L. Koch. 2002. *Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models*. Oecologia 130:114-125.
- Silva, S.R., Kendall, C., Wilkison, D.H., Ziegler, A.C., Chang, C.C.Y., Avanzino, R.J., 2000. *A new method for collection of nitrate from fresh water and the analysis of nitrogen and oxygen isotope ratios*. J. Hydrol. 228, 22-36.