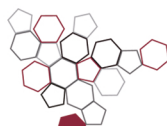


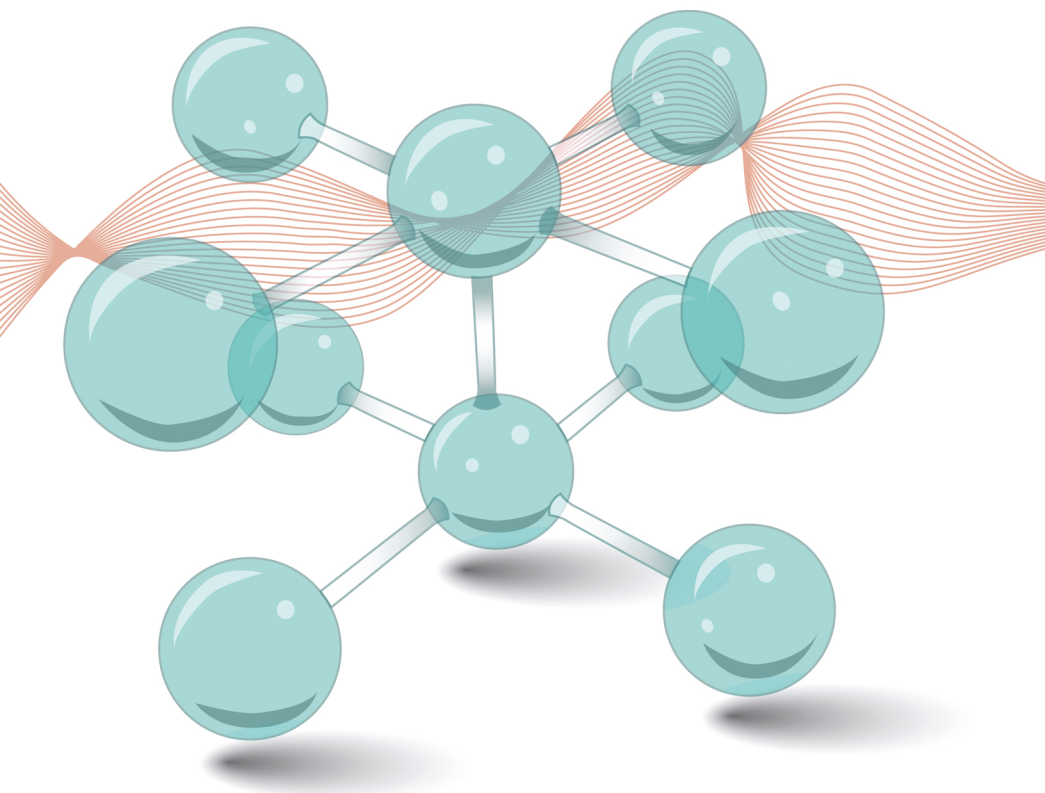


ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente



ISOTOPI: DALLA TEORIA ALLA PRATICA

LABORATORIO



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

ISOTOPI: DALLA TEORIA ALLA PRATICA

INFORMAZIONI LEGALI

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questa pubblicazione.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Quaderni – Laboratorio 2/2018
ISBN 978-88-448-0873-0

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Sonia Poponessi

Coordinamento pubblicazione on line:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

Gennaio 2018

Autori

Daniela **BERTO**, Nicoletta **CALACE**, Federico **RAMPAZZO**, Flavia **SACCOMANDI**

Hanno collaborato alla stesura

Camilla ANTONINI (ISPRA, BIO ACAM)

Giuseppe ARCANGELI (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie)

Maddalena BONANOMI (Thermo Fisher Scientific)

Lucia BONGIORNI (CNR ISMAR Venezia)

Rossella BOSCOLO BRUSA' (ISPRA, COS MLG)

Michele BOSCOLO NALE (Azienda Agricola di Chioggia)

Giuseppe BOSCOLO PALO (Consorzio di tutela del radicchio di Chioggia IGP)

Federica CACCIATORE (ISPRA, COS MLG)

Amelia DE LAZZARI (CNR ISMAR Venezia)

Tomaso FORTIBUONI (ISPRA, BIO CIT)

Guido GIAZZI (Thermo Fisher Scientific)

Claudia GION (ISPRA, COS ODC)

Giordano GIORGI (ISPRA, BIO ACAM)

Otello GIOVANARDI (ISPRA, BIO CIT)

Liliana KROTZ (Thermo Fisher Scientific)

Marcelina Malgorzata FORMALEWICZ (ISPRA, CN COS)

Ines MARINOSCI (ISPRA, GEO DES)

Seta NOVENTA (ISPRA, COS MLG)

Massimo PELEGGI (ISPRA, BIO ACID)

Roberto PIRO (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie)

Sasa RAICEVICH (ISPRA, BIO CIT)

Francesca RONCHI (ISPRA, BIO CIT)

Luca SIMONOTTI (Thermo Fisher Scientific)

Luisa STELLATO (Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli")

Federica TOSI (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie)

Umberto TRALDI (Thermo Fisher Scientific)

Personale della Capitaneria di Porto di Chioggia

PREFAZIONE

Il Quaderno vuole essere una sintesi dell'utilizzo di una tecnica di indagine versatile e innovativa i cui campi di applicazione molto vasti spaziano dagli studi geologici e idrogeologici a studi di carattere ambientale fino alla individuazione delle sofisticazioni alimentari, alla salvaguardia del patrimonio artistico e alla diagnostica medica.

Il lavoro, corredato di una parte teorica di base, prende in esame una serie di applicazioni nella valutazione della contaminazione da nitrati nelle acque interne mediante l'approccio isotopico, la tracciabilità dei prodotti agroalimentari, la caratterizzazione e lo studio dell'origine della sostanza organica, il funzionamento e la dinamica delle reti trofiche e il bioaccumulo di inquinanti in ambienti marino costieri e di transizione, la tracciabilità dei prodotti della filiera della pesca, l'implementazione nazionale degli isotopi nel contesto della direttiva quadro europea sulla strategia marina, e tecniche per l'identificazione dei polimeri plastici.

Il lavoro, frutto di sviluppate e consolidate sinergie tra il Dipartimento per il monitoraggio e la tutela dell'ambiente e per la conservazione della biodiversità e il Centro nazionale per la caratterizzazione ambientale e la protezione della fascia costiera, la climatologia marina e l'oceanografia operativa, in un linguaggio accessibile anche al vasto pubblico di non esperti, può rappresentare uno stimolo per un differente e innovativo approccio tecnico scientifico.

Emi Morroni

*Direttore del Dipartimento per il
monitoraggio e la tutela dell'ambiente e per
la conservazione della biodiversità*

Maurizio Ferla

*Responsabile del Centro nazionale per la
caratterizzazione ambientale e la protezione
della fascia costiera, la climatologia marina e
l'oceanografia operativa*

INDICE

INTRODUZIONE	8
Riferimenti bibliografici	13
1. PRINCIPALI ELEMENTI UTILIZZATI NELL'ANALISI ISOTOPICA	14
1.1 - Carbonio	14
1.2 - Azoto	16
1.3 - Ossigeno (acqua)	17
1.4 - Idrogeno	18
1.5 - Zolfo	19
1.6 - Boro	20
1.7 - Cloro	20
1.8 - Ferro	21
1.9 - Strumentazione	21
1.10 - Riferimenti bibliografici	23
2. MODELLI DI MIXING	25
2.1 - Introduzione	25
2.2 - Analisi degli isotopi stabili in R (SIAR)	26
2.3 - Riferimenti bibliografici	26
3. VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA NITRATI MEDIANTE APPROCCIO ISOTOPICO	28
3.1 - Introduzione	28
3.2 - Modello concettuale	29
3.3 - Applicazione in Pianura Padana e Friulano Veneta	31
3.4 - Riferimenti bibliografici	35
4. TRACCIABILITÀ DI PRODOTTI AGROALIMENTARI: CASO STUDIO RADICCHIO IGP DI CHIOGGIA E OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA	36
4.1 - Introduzione	36
4.2 - Studio sul radicchio IGP di Chioggia	37
4.3 - Studio sull' olio Extra Vergine di Oliva	38
4.4 - Riferimenti bibliografici	39
5. APPLICAZIONE DEGLI ISOTOPHI STABILI ALLA CARATTERIZZAZIONE E STUDIO DELL'ORIGINE DELLA SOSTANZA ORGANICA, FUNZIONAMENTO E DINAMICA	

DELLE RETI TROFICHE E BIOACCUMULO DI INQUINANTI IN AMBIENTI MARINO COSTIERI E DI TRANSIZIONE	40
5.1 - Introduzione	40
5.2 - Analisi della sostanza organica sedimentaria e particellata nella zona interessata dal delta del fiume Po	40
5.3 - Influenza degli apporti organici del delta del Po come fonte di cibo per le comunità macrobentoniche costiere	45
5.4 - Caratterizzazione qualitativa e quantitativa delle fonti antropiche di sostanza organica nella laguna di Venezia.	47
5.5 - Riferimenti bibliografici	54
6. TRACCIABILITÀ DEI PRODOTTI DELLA FILIERA DELLA PESCA MEDIANTE GLI ISOTOPI STABILI	56
6.1 - Introduzione	56
6.2 - Controllo del processo di congelamento/scongelo in seppie (<i>Sepia Officinalis</i>)	58
6.3 - Variabilità spaziale e tracciabilità del pescato	59
6.4 - Studio del bioaccumulo di contaminanti nella catena trofica nord adriatica mediante analisi degli isotopi stabili	66
6.5 - Riferimenti bibliografici	71
7. L'UTILIZZO DEGLI ISOTOPI STABILI DELL'AZOTO E DEL CARBONIO NELL'AMBITO DELL'IMPLEMENTAZIONE NAZIONALE DELLA DIRETTIVA QUADRO STRATEGIA MARINA (MSFD)	74
7.1 - Introduzione	74
7.2 - Piani di monitoraggio e analisi isotopiche	75
7.3 - Riferimenti bibliografici	76
8. IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI POLIMERI PLASTICI	78
8.1 - Introduzione	78
8.2 - Lo studio	81
8.3 - Riferimenti bibliografici	83

INTRODUZIONE

Con il termine isotopi (dal greco *iso-topos*, eguale posto), si intendono atomi dello stesso elemento chimico che hanno lo stesso numero atomico, ma sono caratterizzati da un differente numero di massa atomica. In pratica, gli isotopi hanno lo stesso numero di protoni ed elettroni (uguali proprietà chimiche) e un diverso numero di neutroni (diverse proprietà fisiche). Essi possono essere naturali o artificiali, stabili o instabili.

La quantificazione del rapporto tra due isotopi dello stesso elemento ha un notevole potenziale per stabilire se due elementi chimicamente simili hanno provenienza diversa, in relazione alla differenza delle fonti originarie. La distribuzione isotopica caratterizzante le fonti può essere influenzata da fenomeni di natura diversa che a loro volta possono determinare variazioni significative nei prodotti finali. Tali variazioni possono essere rilevate dalle tecniche di analisi degli isotopi stabili, infatti molti elementi chimici hanno isotopi utili a tali scopi (Figura I.1). Il continuo progresso della tecnologia ha permesso lo sviluppo di strumentazioni in grado di misurare piccolissime variazioni nell'abbondanza di isotopi stabili con una elevata precisione e accuratezza (spettrometria di massa). Pertanto, ad oggi, risulta disponibile una vasta gamma di misure isotopiche per le applicazioni in differenti campi della scienza.

La composizione isotopica di un campione è uguale al rapporto tra l'abbondanza della forma isotopica pesante rispetto a quella leggera, (esempio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e si esprime come deviazione, in parti per mille, da un materiale standard di riferimento individuato a livello internazionale. L'abbondanza isotopica è espressa secondo l'equazione riportata di seguito:

$$\delta(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{campione}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right) \times 1000$$

dove, indicando con R il rapporto tra le abbondanze delle masse relative all'isotopo pesante e a quello leggero, R_{campione} è R misurato nel campione e R_{standard} è R misurato per lo standard. Un valore positivo di δ indica che l'isotopo pesante è arricchito nel campione rispetto allo standard mentre un valore negativo indica che nel campione l'isotopo pesante è impoverito (Michener e Lajtha, 2007).

La possibilità di differenziare due campioni in base all'analisi isotopica è legata al fenomeno di frazionamento isotopico influenzati da processi chimici (es. nitrificazione, ammonificazione), fisici (es. evaporazione e

condensazione) e biologici (es. fotosintesi, assimilazione, escrezione). Questi possono, infatti, alterare la marcatura isotopica dei composti, provocando un frazionamento della distribuzione degli isotopi tra i reagenti e i prodotti e producendo una variazione del delta isotopico dei prodotti rispetto ai reagenti (Brand et al., 2014). Con i termini di "firma", "marcatura" o "composizione" si intendono quindi i valori isotopici che si determinano a fronte di questi processi e che caratterizzano in modo caratteristico un dato campione ambientale.

In generale possono essere distinti due tipi di frazionamento isotopico:

- 1) all'equilibrio (termodinamico): dovuto ad una differenza di energia di legame degli isotopi nei composti. Questo implica che:
 - gli isotopi pesanti si accumulano nei prodotti ossidati;
 - la reazione è favorita a basse temperature, poiché alle alte temperature le differenze tra gli isotopi si attenuano;
 - il processo non è rilevante nel caso di reazioni chimiche di sostanze gassose e di reazioni biologiche.

- 2) cinetico: dovuto a differenti velocità di reazione degli isotopi.

Nelle reazioni sopra descritte, si osserva in generale che sono favoriti i processi rapidi, irreversibili e unidirezionali, quando cioè i prodotti sono facilmente allontanati dai reagenti come ad esempio nei processi di evaporazione, diffusione, ecc., inoltre va favorita la rottura dei legami formati dagli isotopi leggeri, infine la distribuzione preferenziale degli isotopi leggeri è nei prodotti, dei pesanti è nei reagenti.

Data una sostanza chimica AB caratterizzata dalla presenza di una certa distribuzione isotopica dell'elemento X possiamo calcolare il fattore di frazionamento (α_{AB}) dividendo il rapporto del numero degli isotopi X nel prodotto A con il rapporto del numero degli isotopi X nel prodotto B.

$$\alpha_{AB} = \frac{R_A}{R_B} = 1 + \left[\frac{(\delta_A - \delta_B)}{1000} \right]$$

dove

$$R = \frac{X_p [\text{atomi dell'isotopo pesante (raro)}]}{X_l [\text{atomi dell'isotopo leggero (abbondante)}]}$$

Il fattore di frazionamento viene però normalmente sostituito dal fattore di arricchimento isotopico (ϵ) che è definito come $(\alpha^{-1}) * 1000$

L'analisi degli isotopi stabili rappresenta un metodo scientifico altamente specialistico per supportare varie discipline quali le scienze ambientali, le scienze forensi, la medicina, ecc.

Nel campo delle scienze ambientali sono numerose le applicazioni dalla geologia all'ecologia, comprendendo lo studio dei processi fisici e chimici ambientali.

Le applicazioni nel campo della geologia spaziano dagli studi idrogeologici, stratigrafici, a quelli petrologici. In campo idrogeologico, ad esempio, gli isotopi stabili della molecola d'acqua (^{18}O e ^2H) registrano l'altitudine media della zona di ricarica dell'acquifero ed eventuali fenomeni di evaporazione, permettendo la distinzione tra acque provenienti da circuiti idrogeologici diversi. Inoltre consentono di studiare l'interazione acqua-roccia. In campo stratigrafico gli isotopi del carbonio, dell'azoto, dello zolfo e del cloro permettono di ottenere informazioni sull'evoluzione del processo diagenetico del sedimento da cui provengono (carbonati solidi). Nel campo della petrologia lo studio degli isotopi permette di comprendere l'origine dei magmi e i loro processi di differenziazione. Inoltre, la determinazione della composizione isotopica dell'ossigeno e dell'idrogeno in rocce

intrusive, effusive e metamorfiche permette di studiare i processi geodinamici.

Nel campo dell'ecologia le applicazioni dell'analisi degli isotopi stabili sono numerose. Ad esempio, L'analisi del frazionamento isotopico del ferro, determinato dall'attività dei batteri, permette di tracciare l'origine di tali microorganismi. Le analisi degli isotopi del carbonio e dell'azoto permettono di studiare le relazioni trofiche e i flussi di materia tra i principali componenti di un ecosistema (es. sostanza organica, produttori primari, consumatori primari e secondari) e possono essere utilizzate anche per investigare i processi chimici e biologici che avvengono sia a livello di ecosistema che a livello di singoli organismi

L'analisi degli isotopi stabili è stata utilizzata, in alcuni casi, per determinare le cause dell'inquinamento idrico, atmosferico e dei suoli come ad esempio l'origine della contaminazione da nitrati nelle acque superficiali e sotterranee.

Lo studio degli isotopi stabili si è recentemente affermato nel campo dei controlli di qualità di alcuni prodotti alimentari (vino, olio, miele, succhi di frutta) e della sofisticazione delle acque minerali e degli zuccheri. Esso si è rivelato molto importante, soprattutto negli studi di autenticità degli alimenti: in questo caso l'analisi dei differenti rapporti isotopici di specifiche molecole presenti negli alimenti, permette di riconoscerne l'origine in quanto provenienti da materie prime diverse o elaborate con processi diversi, per esempio per sintesi biologica o industriale.

Nella Tabella I.1 sono riportati i principali elementi i cui isotopi stabili sono stati applicati per vari studi.

Tabella I. 1: Principali elementi e isotopi utilizzati in vari campi delle scienze. Sono riportate l'abbondanza naturale degli isotopi, lo standard internazionale di riferimento utilizzato nell'analisi degli isotopi stabili e la loro abbondanza isotopica certificata (la distribuzione isotopica nei materiali standard di riferimento è differente da quella naturale)

Elemento	Isotopo	Abbondanza (%)	Standard Internazionale	Abbondanza assoluta dello standard ($R_{standard}$)
Carbonio	^{12}C	98,892	Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB)	$^{13}\text{C}:^{12}\text{C} = 0,0112372$
	^{13}C	1,108		
Azoto	^{14}N	99,635	Azoto atmosferico (aria)	$^{15}\text{N}:^{14}\text{N} = 0,0036765$
	^{15}N	0,365		
Ossigeno	^{16}O	99,759	VSMOW in acqua, VPDB in CO_2 o Carbonato	VSMOW=0,0020052 VPDB=0,0020672 entrambi per $^{18}\text{O}:^{16}\text{O}$
	^{17}O	0,037		
	^{18}O	0,204		
Idrogeno	^1H ^2H (anche D)	99,985 0,0155	Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW)	$^2\text{H}:^1\text{H} = 0,00015576$
Zolfo	^{32}S	95	Vienna Cañon Diablo meteorite troilite (VCDT)	$^{34}\text{S}:^{32}\text{S} = 0,0450045$
	^{22}S	0,75		
	^{34}S	4,21		
	^{36}S	0,014		
Boro	^{10}B	19,9	Acido Borico NBS-951	$^{11}\text{B}:^{10}\text{B} = 4,0437$
	^{11}B	80,1		
Cloro	^{35}Cl	75,8	Standard Mean Ocean Chloride (SMOC)	$^{37}\text{Cl}:^{35}\text{Cl} = 0,324$
	^{37}Cl	24,2		
Ferro	^{54}Fe	5,82	Media tra le rocce terrestri e lunari	$^{56}\text{Fe}:^{54}\text{Fe} = 15,7028$
	^{56}Fe	91,66		
	^{57}Fe	2,19		
	^{58}Fe	0,33		

Riferimenti bibliografici

Brand W. A., Coplen T.B., Vogl J., Rosner M., Prohaska T., 2014. Assessment of international reference materials for isotope-ratio analysis (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem.; 86(3): 425–467

Michener R., Lajtha K., 2007. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science, Blackwell Publishing Ltd

1. PRINCIPALI ELEMENTI UTILIZZATI NELL'ANALISI ISOTOPICA

Di seguito sono riportati alcuni degli elementi chimici maggiormente utilizzati nell'analisi isotopica per scopi non solo ambientali.

1.1 - Carbonio

Le due principali riserve di carbonio in natura sono rappresentate dal carbonio organico e dai carbonati queste sono caratterizzate da differenti impronte isotopiche a causa dei diversi processi in cui sono coinvolte (Figura 1.1). Il carbonio inorganico (carbonatico) interviene negli equilibri di scambio tra: anidride carbonica atmosferica - ione bicarbonato disciolto - carbonato solido; queste reazioni di scambio portano ad un arricchimento dell'isotopo pesante nella forma carbonatica solida ($\delta^{13}\text{C}$ pari a 0‰). Viceversa, le reazioni cinetiche in cui risulta principalmente coinvolto il carbonio organico, attraverso i processi fotosintetici, determinano una concentrazione dell'isotopo più leggero nel materiale organico prodotto ($\delta^{13}\text{C}$ pari a circa -25‰) (Michener e Lajtha, 2007).

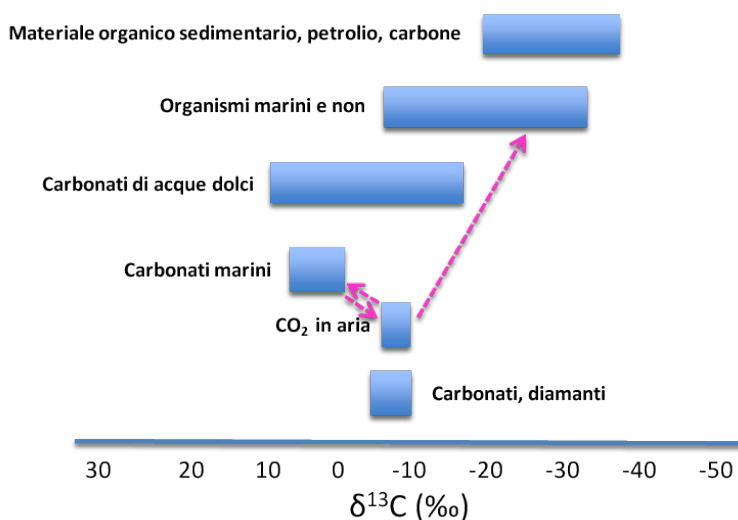


Figura 1.1: Impronta isotopica del carbonio presente in natura

Il frazionamento del carbonio organico è principalmente legato al tipo di pianta che opera la fotosintesi. Le piante terrestri, classificate come C3 e C4, seguono due vie metaboliche differenti. Entrambe generano sostanza organica caratterizzata da valori di $\delta^{13}\text{C}$ più negativi rispetto a quello dell'anidride carbonica ($\sim -7\text{‰}$), in quanto durante la fotosintesi la sostanza organica prodotta accumula l'isotopo leggero rispetto a quello pesante.

Le piante C3, caratteristiche dei climi temperati, producono un composto a tre atomi di carbonio (ciclo di Calvin) con un valore medio di $\delta^{13}\text{C}$ pari a $-26,5\text{‰}$. Le piante C4 generano un composto a 4 atomi di carbonio (ciclo di Hatch-Slack) caratterizzato da un valore di $\delta^{13}\text{C}$ intorno a $-12,5\text{‰}$.

Partendo da questo tipo di conoscenze il frazionamento del carbonio di origine organica è stato indagato per molteplici applicazioni, tra le quali lo studio delle reti trofiche (Post e al, 2002). La composizione chimica dei tessuti animali è connessa alle risorse alimentari che essi assimilano e pertanto i tessuti riflettono la composizione isotopica della dieta (De Niro & Epstein 1978, Vander & Rasmussen, 2001). L'arricchimento tra i produttori e i consumatori primari (erbivori) è stato stimato intorno al $+5\text{‰}$ mentre andando ai livelli successivi della catena trofica l'arricchimento risulta meno marcato ($+1\text{‰}$) (Tykot, 2004; Lelli, comunicazione personale). Quindi il valore isotopico rilevato nei tessuti di un organismo può essere utilizzato come indicatore della sua posizione trofica, ma dato che la variazione dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ associata ai passaggi trofici risulta relativamente modesta, questo dato è usato principalmente per rintracciare la fonte primaria di carbonio assunta (Layman et al. 2012).

Attraverso l'analisi degli isotopi stabili del carbonio è possibile anche differenziare le reti trofiche terrestri da quelle marine. Il carbonio "marino" deriva infatti dal carbonio inorganico disciolto (bicarbonato disciolto) caratterizzato da un valore isotopico pari a circa 0‰ , e quindi più alto di quello dell'anidride carbonica atmosferica, che è pari a circa -7‰ . Tale differenza è mantenuta ad ogni livello trofico sia in ambiente marino che terrestre. (Figura 1.2)

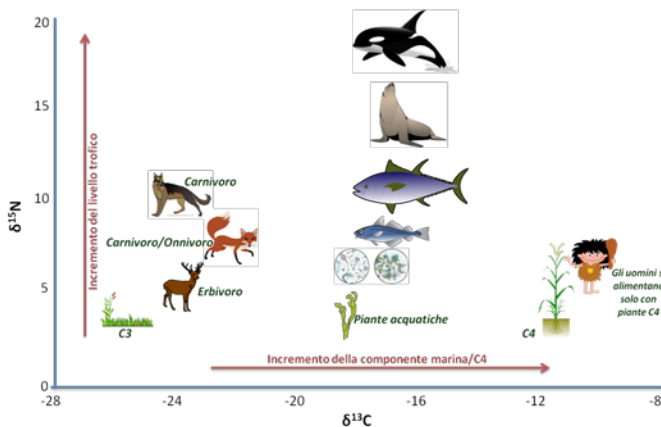


Figura 1.2: Variazioni degli isotopi del carbonio e dell'azoto (‰) in diversi organismi della catena trofica terrestre e marina

1.2 - Azoto

L'azoto è il principale elemento dell'atmosfera terrestre (circa il 78%), ma nonostante ciò la maggior parte degli organismi non sono in grado di usarlo in forma gassosa.

L'azoto atmosferico deve essere quindi convertito in forme utilizzabili e ciò avviene naturalmente attraverso una serie di reazioni chimiche mediate dai microorganismi azotofissatori che vivono sia nel suolo che nelle acque dolci e salate (*Clostridium*, *Azotobacter*, *Rhizobium leguminosarum*, attinomiceti), e che producono un frazionamento isotopico dell'azoto differenziando i valori di $\delta^{15}\text{N}$. La prima fase della fissazione (Figura 1.3) è quella che vede la formazione di azoto ammonico ($\delta^{15}\text{N}$ pari a circa 1‰) da quello molecolare atmosferico (Michener & Lajtha, 2007; Butterbach-Bahl et al., 2017).

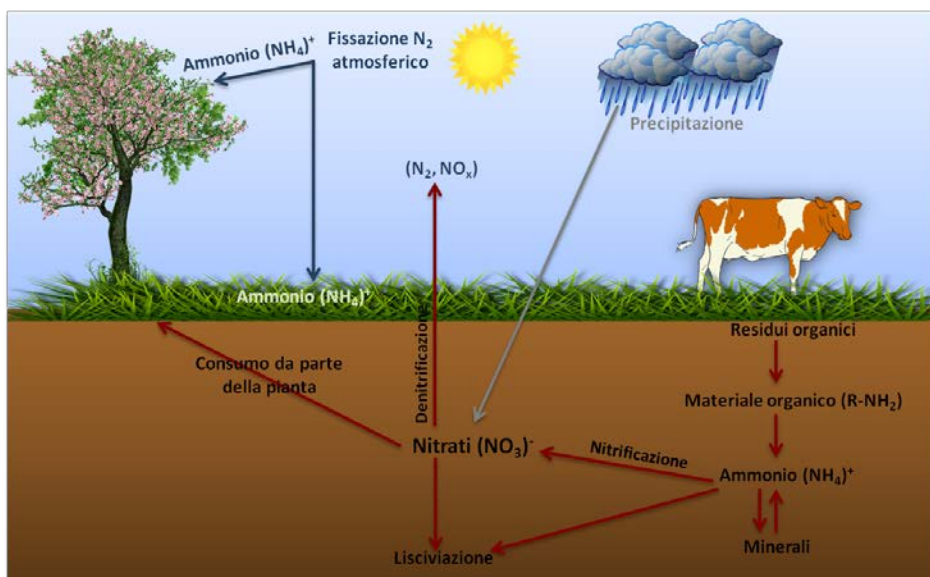


Figura 1.3: Processi naturali dell'azoto (Ciclo dell'azoto) in ambiente terrestre

Le reazioni che generano ulteriori trasformazioni dell'azoto nel suolo e nelle acque sono la mineralizzazione, la volatilizzazione, la nitrificazione e la denitrificazione, anch'esse per la maggior parte mediate da microrganismi (Figura 1.3). Ad esempio, la volatilizzazione è legata alla perdita di ammoniaca dal suolo all'atmosfera. Tale processo è caratterizzato da un elevato frazionamento che produce ammoniaca impoverita in $\delta^{15}\text{N}$, lasciando lo ione ammonio residuo presente nel suolo arricchito dell'isotopo pesante. L'intero processo di trasformazione dell'azoto in nitrato coinvolge diversi passaggi di reazione, ognuno dei quali produce un arricchimento nel substrato azotato residuo che può arrivare al 30‰.

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 un elevato frazionamento isotopico del nitrato residuo. In relazione anche alle condizioni ambientali, l'attività batterica discrimina le forme isotopiche più "leggere", determinando nel nitrato residuo un arricchimento dell'isotopo pesante rispetto all'azoto molecolare prodotto.

Nella Figura 1.4 vengono riportati i principali processi che interessano il ciclo dell'azoto in ambiente marino (Ryabenko, 2013).

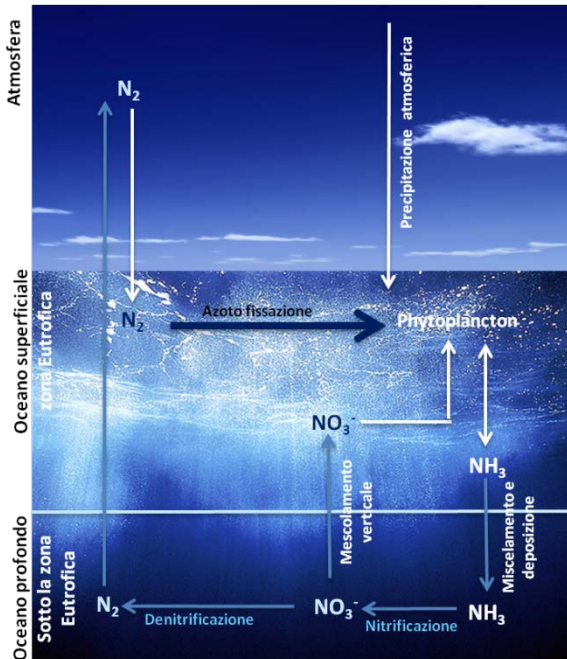


Figura 1.4: Processi naturali dell'azoto (Ciclo dell'azoto) in ambiente marino

La conoscenza dell'intero ciclo dell'azoto in termini di distribuzione isotopica, in associazione a quello del carbonio, è utile sia per comprendere le caratteristiche della catena trofica che le relazioni tra alcuni tipi di pressioni antropiche sull'ambiente e gli impatti sugli ecosistemi.

1.3 - Ossigeno (acqua)

Durante i fenomeni di evaporazione e precipitazione si verifica il frazionamento isotopico dell'ossigeno (e dell'idrogeno) (Figura 1.5).

L'entità del frazionamento dipende dalla temperatura e da altri fattori climatici e geografici come ad esempio latitudine, altitudine, stagionalità e continentalità.

L'acqua tende ad evaporare con una reazione di equilibrio regolata dalla temperatura. La fase vapore è caratterizzata da un arricchimento in ^{16}O ($\delta^{18}\text{O} < 0$) e in ^1H , essendo le molecole di $^1\text{H}^{16}\text{O}$ più leggere e quindi più favorite all'evaporazione. La fase liquida sarà viceversa più ricca in $^2\text{H}^{16}\text{O}$, $^1\text{H}^{18}\text{O}$ e $^2\text{H}^{18}\text{O}$, molecole più pesanti ($\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H} > 0$).

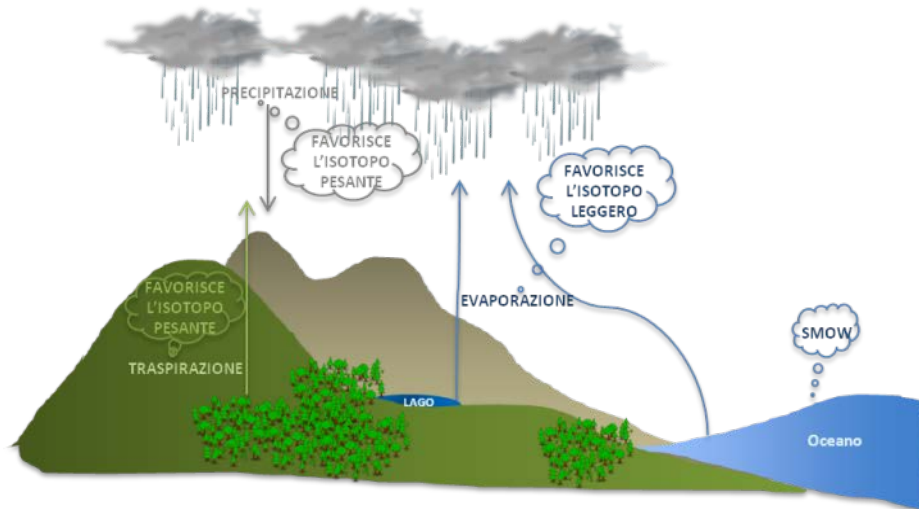


Figura 1.5: Processi naturali dell'ossigeno (Ciclo dell'acqua)

Le precipitazioni si impoveriscono dell'isotopo pesante all'aumentare della latitudine e dell'altitudine. In una stessa regione, le precipitazioni relative ai mesi freddi sono caratterizzate da composizioni isotopiche negative mentre durante i mesi caldi risultano arricchite in isotopi pesanti (δ più positivi per l'effetto stagionalità). Le precipitazioni risultano infine più arricchite dell'isotopo pesante spostandosi da regioni costiere all'entroterra.

Anche nel ciclo vegetativo delle piante, i processi di adsorbimento dell'acqua e di evapotraspirazione determinano un arricchimento degli isotopi pesanti (^2H e ^{18}O), in dipendenza dalla specie vegetale e dall'acqua "isotopicamente" diversa che le varie specie vegetali hanno a disposizione per la fotosintesi.

1.4 - Idrogeno

L'idrogeno è ubiquitario nell'ambiente ed è caratterizzato dalla più grande differenza tra i suoi isotopi stabili (idrogeno e deuterio) in termini di

massa. La distribuzione isotopica tipica di alcune matrici naturali è riportata nella Figura 1.6.

L'idrogeno insieme all'ossigeno è utilizzato per la caratterizzazione del ciclo dell'acqua a diverse altitudini e latitudini, e in alcune applicazioni relative a processi biochimici.

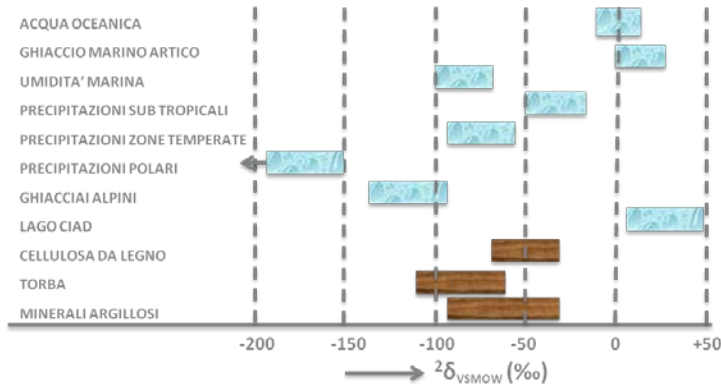
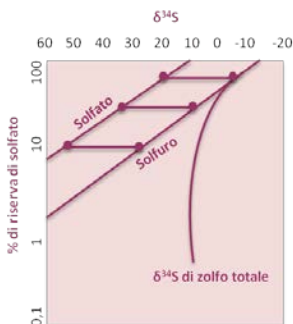


Figura 1.6: Impronta isotopica dell'idrogeno in alcune matrici naturali

1.5 - Zolfo

Lo zolfo ha quattro isotopi stabili ma generalmente il rapporto isotopico utilizzato si riferisce alle abbondanze di ^{34}S e di ^{32}S , che sono i due isotopi più abbondanti (rispettivamente 4 e 95%). Il frazionamento naturale dello zolfo avviene per effetto di processi microbici che riducono il solfato a solfuro e processi chimici di scambio tra solfato e solfuro e tra differenti solfuri (Figura 1.7).



La conoscenza del ciclo dello zolfo in termini di distribuzione isotopica è utile per gli studi sulla dieta alimentare, in associazione al carbonio e all'azoto, per comprendere le caratteristiche della catena trofica, e per la caratterizzazione biogeochimica di alcuni processi ambientali.

Figura 1.7: Frazionamento naturale dello zolfo

1.6 - Boro

Il boro è un elemento ubiquitario presente in forma disciolta nelle acque naturali in quanto altamente solubile. La sua presenza è naturale in quanto elemento crostale, ma può essere anche di origine antropica perché immesso attraverso i fertilizzanti, rifiuti ecc. Il frazionamento isotopico del boro può essere dovuto ad una varietà di processi chimici in particolare legati alla sua speciazione (Figura 1.8) (Wahab & Hussain, 2014). L'isotopo leggero è incorporato preferenzialmente nella forma $B(OH)_4^-$ rispetto a $B(OH)_3$.

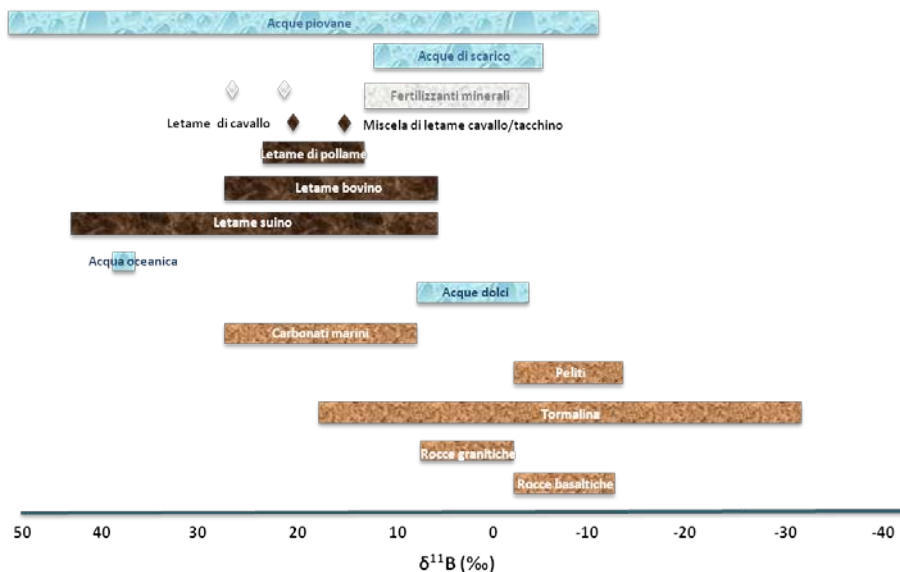


Figura 1.8: Frazionamento isotopico del boro (Stable isotope geochemistry, Hoefs, 2015; Widory, 2012)

La composizione isotopica del boro essendo un elemento conservativo ed avendo la caratteristica di migrare insieme ad altri contaminanti quali ad esempio nitrati e sostanze farmaceutiche, ecc. può essere usata insieme ad altri isotopi stabili per determinare l'origine nelle acque delle sostanze di interesse.

1.7 - Cloro

Il cloro è caratterizzato da due isotopi stabili rispettivamente di massa atomica 35 e 37. Per anni non è stato possibile misurare le piccolissime variazioni dei rapporti isotopici del cloro, ma con i recenti spettrometri di massa è possibile determinarli con una precisione pari a circa lo 0,1-0,2‰.

Nonostante non esistano molte applicazioni basate sugli isotopi stabili del cloro delle sostanze organiche clorurate, il loro potenziale ai fini della definizione delle diverse origini delle molecole e dei meccanismi di degradazione è elevato (Figura 1.9) (Annable et al., 2007; Hunkeler et al., 2012; Eggenkamp, 2014).

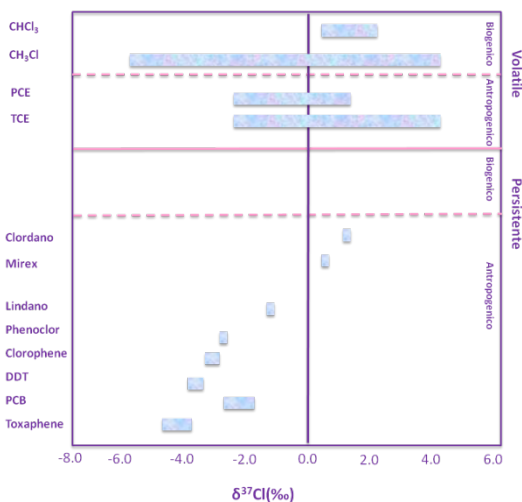


Figura 1.9: Frazionamento isotopico del Cloro (Stable isotope geochemistry, Hoefs, 2015)

1.8 - Ferro

Gli isotopi del ferro rappresentano un ottimo strumento per comprendere alcuni processi naturali tenuto conto della gamma di isotopi stabili (54, 56, 57, 58) e dell'importanza delle reazioni redox a cui partecipa il ferro nei processi biochimici e inorganici. Le reazioni redox inorganiche tra Fe(II) e Fe(III) possono produrre scostamenti dei rapporti isotopici molto più marcati di quelli generati dai processi biochimici.

1.9 - Strumentazione

La spettrometria di massa è una tecnica utilizzata per separare molecole cariche, cioè ioni, in base alla loro massa o, più correttamente, in base al rapporto massa/carica. Quindi è una tecnica in grado di distinguere isotopi dello stesso elemento e di calcolarne i rapporti isotopici.

I rapporti isotopici degli elementi leggeri (H, O, C, N, S) sono misurati con la tecnica Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) mediante trasformazione in gas puri. Un esempio di strumentazione utile per misurare rapporti isotopici con sensibilità e linearità eccellenti è

rappresentato dal Thermo Scientific Delta V Isotope Ratio Mass Spectrometer (Figura 1.10).

Si tratta di uno spettrometro di massa con separazione magnetica e rilevazioni con triplo collettore universale adatto a tutte le applicazioni standard per isotopi di N₂, CO, NO, O₂, CO₂, N₂O e SO₂.



GAS	MINOR ISOTOPE	PRECISION (1-σ)	LINEARITY
CO ₂	¹³ C	0.06 ‰	0.02 ‰ / nA
	¹⁸ O	0.08 ‰	0.02 ‰ / nA
N ₂	¹⁵ N	0.06 ‰	0.02 ‰ / nA
	¹⁸ O	0.08 ‰	0.03 ‰ / nA
O ₂	¹⁷ O	0.20 ‰	0.04 ‰ / nA
	¹⁸ O	0.15 ‰	0.04 ‰ / nA
H ₂	³ H	0.40 ‰	0.20 ‰ / nA
SO ₂	³⁴ S	0.10 ‰	0.03 ‰ / nA

Figura 1.10: Thermo Scientific Delta V Isotope Ratio Mass Spectrometer

Può collegarsi in flusso continuo con diverse periferiche quali ad esempio la Flash Elemental Analysis (EA) per l'analisi degli isotopi C, N, H, O, la GC-Isolink2 per l'analisi previa separazione gascromatografica degli isotopi C, N, H, e la LC - isolink per l'analisi previa separazione in fase liquida dell'isotopo del C. Infine può essere interfacciato all'unità Gasbench per l'analisi mediante equilibratura di isotopi C, O e mediante acidificazione per isotopi C, O in carbonati (Figura 1.11).



Figura 1.11: Thermo Scientific Delta V Isotope Ratio Mass Spectrometer e le diverse periferiche di collegamento per le diverse tipologie di analisi

Il Thermo Scientific FlashSmart Elemental Analyzer permette di ottenere analisi quantitative estremamente accurate sia a basse, pochi ppm, che ad alte concentrazioni.

L'analizzatore elementare, basato sul metodo Dumas modificato, permette di determinare C, H, N e S mediante combustione oppure O mediante pirolisi, ed offre una ampia modularità per aumentare e diversificare la produttività e l'efficienza del laboratorio.

Per altri elementi quali ad esempio B, Fe, Sr sono invece utilizzate la tecnica Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS) e la tecnica Thermal Ionization Mass Spectrometry (TIMS) nelle quali il campione è trasformato in atomi e ioni. Un esempio di strumentazione utile per misurare gli isotopi del B, Fe, ecc. è il Thermo Scientific ELEMENT Series ICP-MS (Figura 1.12). Esso è caratterizzato da ICP-MS, settore magnetico a doppia focalizzazione per la stabilità dell'analisi. Il Thermo Scientific ELEMENT 2 ICP-MS unisce ad una eccellente sensibilità, un ottimo rapporto segnale/rumore. Per le analisi isotopiche che richiedono massima precisione, risulta migliore il Neptune Plus High Resolution Multicollector ICP-MS.



Figura 1.12: Neptune Plus High Resolution Multicollector ICP-MS per analisi isotopiche ad alta precisione

1.10 - Riferimenti bibliografici

Annable. W.K., Frapce S.K., Shouakar-Stash O., Shanoff T., Drimmie R.J., Harvey F.E., 2007. ^{37}Cl , ^{15}N , ^{13}C isotopic analysis of common agrochemicals for identifying non-point source agricultural contaminants, *Applied Geochemistry* 22, 1530–1536.

Brand W. A., Coplen T.B., Vogl J., Rosner M., Prohaska T., 2014. Assessment of international reference materials for isotope-ratio analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*; 86(3): 425–467

Denk T.R.A., Mohn J., Decock C., Lewicka-Szczebak D., Harris E., Butterbach-Bahl K., Kiese R., Wolf B., 2017. The nitrogen cycle: A review

of isotope effects and isotope modelling approaches, *Soil Biology & Biochemistry* 105, 121e137

DeNiro M.J., Epstein S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geoch. Cosmoch. Acta* 42:495–506.

Eggenkamp H., 2014. *The Geochemistry of Stable Chlorine and Bromine Isotopes*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Gat, J.R., 1996. Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 24, 225-262

Hu H., Bao W., Wang T., Qu S., 2009. Experimental study on stable isotopic fractionation of evaporating water under varying temperature, *Water Science and Engineering*, 2(2): 11-18

Hunkeler D., Laier T., Breider F., Jacobsen O.S., 2012. Demonstrating a Natural Origin of Chloroform in Groundwater Using Stable Carbon Isotopes *Environ. Sci. Technol.* 46, 6096–6101

Lelli R., Ricostruzione della Paleodieta, bio.uniroma2.it/ricostruzione-della-paleodieta, Dipartimento di Biologia Università di Tor Vergata

Michener R., Lajtha K., 2007. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, Blackwell Publishing Ltd

Ryabenko E., 2013. *Stable Isotope Methods for the Study of the Nitrogen Cycle*, <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Tykot R.H., 2004. Stable isotopes and diet: you are what you eat. In: M Martini, M Milazzo and M Piacentini (eds), *Proceedings of the International School of Physics “Enrico Fermi”, Course CLIV*, IOS Press, Amsterdam.

Wahab H.S., Hussain K.I., 2014. Determination of isotopic composition and concentration of uranium and boron by thermal ionization mass spectrometric isotopic dilution technique *Am. J. App. Chem.* 2(2): 27-32

Vander Zanden M.J., Rasmussen J.B., 2001. Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnol. Oceanogr.* 46:2061-2066

2. MODELLI DI MIXING

2.1 - Introduzione

Negli ultimi decenni, la comunità scientifica interessata a studi ecologici ha proposto diversi modelli di miscelamento isotopico (Mixing Models) per identificare i contributi delle diverse fonti di cibo nelle diete dei consumatori.

Phillips & Koch (2002) proposero di utilizzare un set di equazioni algebriche (Linear Mixing Models) per identificare tali contributi. Partendo da tali equazioni Phillips e Gregg (2003) svilupparono il modello di miscelamento ISOSOURCE in grado di restituire una serie di possibili valori di ripartizione delle fonti. La limitazione principale di questo tipo di approccio risiede nel fatto di essere "conservativo": il valore isotopico associato alle diverse fonti utilizzate deve cioè rimanere costante nel tempo, condizione che in natura spesso non risulta verificata. Il modello ISOSOURCE non permette quindi di incorporare le incertezze e le variazioni che caratterizzano i dati di input (incertezza associata ai rapporti isotopici delle fonti di cibo e ai fattori di arricchimento dovuti al trasferimento lungo la catena trofica), ovvero non permette di considerare la variabilità naturale.

Al fine di 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, 2008; Parnell et al., 2010). Entrambi i modelli, considerati di nuova generazione, sono basati sulla risoluzione di un sistema di equazioni lineari indeterminato mediante l'utilizzo di tecniche di statistica Bayesiana avanzata per identificare i contributi proporzionali delle fonti di cibo utilizzate dagli organismi. I modelli Bayesiani restituiscono i valori dei contributi proporzionali di tali sorgenti sotto forma di distribuzione di probabilità, i quali vengono espressi mediante descrittori di tendenza centrale, es. media, moda, e intervalli di confidenza (Moore et al., 2006; Moore and Semmens, 2008; Jackson et al., 2009; Parnell et al., 2010; Fry, 2013). Essi consentono di introdurre oltre che le incertezze legate ai dati di input (sottoforma di medie e deviazione standard delle sorgenti) anche specifici fattori di frazionamento isotopico corredati da intervalli di variabilità ed altre eventuali informazioni disponibili a priori, rappresentandoli in maniera più realistica. Negli ultimi anni i modelli basati sulla statistica Bayesiana si sono notevolmente evoluti, apportando un notevole contributo allo studio dei problemi ambientali, quali appunto la definizione dell'apportamento dei nitrati nelle acque (Xue et al. 2009, 2014).

È necessario evidenziare che tutti i modelli di miscelamento isotopico sono soggetti ad alcune limitazioni quali:

- le sorgenti devono essere caratterizzate da intervalli isotopici il più possibile diversi tra loro; più gli intervalli isotopici sono simili, minore è la potenza del modello nel discriminare le sorgenti;
- in molti casi è necessario operare dei raggruppamenti a priori al fine di limitare l'incertezza delle soluzioni probabilistiche (e ciò è possibile solo avendo una conoscenza approfondita del sistema indagato)
- i dati di ingresso devono essere precisi e accurati
- l'utilizzo di informazioni a priori nei modelli che applicano la statistica Bayesiana può portare a risultati incerti, a seconda della natura dei dati di input (Moore and Semmens, 2008).

2.2 - Analisi degli isotopi stabili in R (SIAR)

Il modello di miscelamento isotopico mediante l'analisi degli isotopi stabili in R (SIAR) permette la quantificazione dei contributi delle differenti sorgenti di isotopi ad una miscela. Si tratta di un software installabile in ambiente R (numeri reali) (R Core Team (2014)) ed è liberamente accessibile on-line (<https://CRAN.R-project.org/package=siar>).

In generale, nel caso di sorgenti multiple isotopiche, è possibile definire un sistema di n equazioni con $n-1$ sorgenti. In molte valutazioni ambientali, però, non è sempre possibile sviluppare un tale sistema determinato, e allora subentra la necessità di risolvere un sistema di equazioni indeterminato, ovvero con un numero di variabili $n-2$ o meno, attraverso strumenti di elaborazione statistica. Il SIAR si basa sulla risoluzione di un sistema di equazioni lineari indeterminato (n equazioni e $n-2$ variabili) mediante l'utilizzo di tecniche di statistica Bayesiana per identificare i contributi proporzionali delle varie fonti in una miscela.

2.3 - Riferimenti bibliografici

Fry, B., 2013. Alternative approaches for solving underdetermined isotope mixing problems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 472, 1–13

<http://cran.r-project.org/web/packages/siar/index.html>

Jackson, A.L., R. Inger, S. Bearhop, and A. Parnell. 2009. Erroneous behaviour of MixSIR, a recently published Bayesian isotope mixing model: A discussion of Moore & Semmens (2008). *Ecol. Lett.* 12: E1–E5.

Moore, J.W., Semmens, B.X., 2008. Incorporating uncertainty and prior information into stable isotope mixing models. *Ecol. Lett.* 11, 470–480.

Moore, K.B., Ekwurzel, B., Esser, B.K., Bryant Hudson, G., Moran, J.E., 2006. Sources of ground water nitrate revealed using residence time and isotope methods. *Appl. Geochem.* 21, 1016–1029.

Parnell, A., Jackson, A., 2008. SIAR: Stable isotope analysis in R Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages/siar/index.html>

Parnell, A.C., R. Inger, S. Bearhop A., , Jackson, A.L., 2010. Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation. PLoS ONE 5(3):E9672.

Phillips, D.L., Koch, P.L., 2002. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130:114–125.

Phillips, D.L., Gregg, J.W., 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia* 136, 261–269

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

SIAR: Andrew Parnell and Andrew Jackson. 2013. SIAR: Stable Isotope Analysis in R. R package version 4.2. <https://CRAN.R-project.org/package=siar>

3. VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA NITRATI MEDIANTE APPROCCIO ISOTOPICO

3.1 - Introduzione

Nell'ambito della Convenzione MIPAAF – ISPRA, finalizzata all'individuazione e la quantificazione dell'origine del contenuto di nitrati nelle acque sotterranee e superficiali, è stata sviluppata una metodologia analitica basata su analisi isotopiche e sulla elaborazione matematica dei dati ottenuti.

Tale metodologia richiede la conoscenza delle potenziali sorgenti di nitrati di origine civile, agricola e zootecnica incidenti su un determinato territorio, la disponibilità di informazioni dettagliate sull'uso del suolo e i risultati delle attività di monitoraggio, effettuate dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente, oltre alla conoscenza dei meccanismi di migrazione e/o trasformazione chimico-fisica dell'azoto nei diversi comparti ambientali.

Numerosi studi nazionali e internazionali (Rapporto ISPRA, 2015 e bibliografia citata) hanno infatti dimostrato che le indagini isotopiche possono fornire un valido supporto per l'identificazione e valutazione dei contributi che causano la presenza di valori elevati di nitrati nelle acque sia sotterranee che superficiali. Recenti ricerche hanno dimostrato l'efficacia di tali indagini nell'identificazione e nella valutazione dei contributi derivanti da sorgenti multiple. Infatti, i nitrati generati da molteplici sorgenti di inquinamento mostrano una composizione isotopica dell'azoto e/o dell'ossigeno che è diversa a seconda della sorgente da cui sono stati originati.

Il campo di variazione della composizione isotopica dell'azoto, riportato in letteratura, è compreso tra -20‰ e 30‰. In questo intervallo ricadono i fertilizzanti azotati che hanno una composizione isotopica compresa tra -10‰ e 5‰, valori compresi tra 3‰ e 25‰ caratterizzano invece i liquami di origine zootecnica e civile (Rapporto ISPRA, 2015 e bibliografia citata in esso).

I nitrati provenienti dall'utilizzo di fertilizzanti sintetici possono quindi essere differenziati dai nitrati provenienti dagli scarichi zootecnici e civili. Inoltre la composizione isotopica dell'azoto e dell'ossigeno nel nitrato residuo misurato nel tempo in un corpo idrico permette di distinguere la denitrificazione da un processo di diluizione.

L'approccio ISONITRATE (<http://isonitrate.brgm.fr/>) è stato il modello di riferimento, che ISPRA ha inizialmente scelto, nell'ambito della

Convenzione sopra citata. Tale approccio prevede la caratterizzazione isotopica di ogni sorgente in termini di $\delta^{15}\text{N}$ e/o $\delta^{18}\text{O}$ allo scopo di discriminare il contributo relativo delle stesse nelle acque superficiali e sotterranee. A tale fine, in casi particolari, accanto alla composizione isotopica dell'azoto e/o dell'ossigeno caratteristica della sorgente da cui derivano, ISONITRATE proponeva l'utilizzo dei rapporti isotopici di altri elementi in traccia (caratterizzati da un comportamento ambientale simile a quello dei nitrati) che possono fornire informazioni aggiuntive su alcune tipologie di sorgenti. Ad esempio, la misura del rapporto isotopico del boro, $\delta^{11}\text{B}$ permette di discriminare se la sorgente sia riconducibile a scarichi civili o ad altre sorgenti minerali e zootecniche. Tenendo conto che durante lo svolgimento del progetto non è stato possibile effettuare le analisi isotopiche del boro, si è proceduto applicando il modello di mixing isotopico SIAR (Paragrafo 2.2).

3.2 - Modello concettuale

In natura esistono due isotopi stabili dell'azoto ^{14}N e ^{15}N ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 1/272$ rapporto in atmosfera) e tre dell'ossigeno ^{16}O , ^{17}O e ^{18}O (il riferimento internazionale è il valore medio dell'acqua oceanica V-SMOW ($\delta^{18}\text{O}=0$)).

Le principali reazioni che controllano le dinamiche dell'azoto nei vari comparti ambientali (suolo, acqua e aria) (Figura 3.1) sono:

- l'azotofissazione ovvero quando l'azoto elementare viene convertito in ammoniacca da parte di microrganismi sia liberi che in simbiosi con le piante;
- l'organicazione cioè quando l'ammoniaca (ione ammonio) viene incorporata nella struttura della sostanza organica;
- l'ammonizzazione ovvero quando l'azoto organico viene convertito in azoto ammoniacale (ione ammonio in equilibrio con la forma gassosa ammoniacale, processo detto anche di mineralizzazione);
- la nitrificazione ovvero l'ossidazione dell'azoto ammonico in nitrito e quindi nitrato;
- la denitrificazione ovvero la riduzione del nitrato e formazione di N_2 e N_2O ;
- la riduzione assimilativa del nitrato ovvero quando avviene la trasformazione del nitrato ad azoto ammoniacale, con il passaggio intermedio della formazione del nitrito.

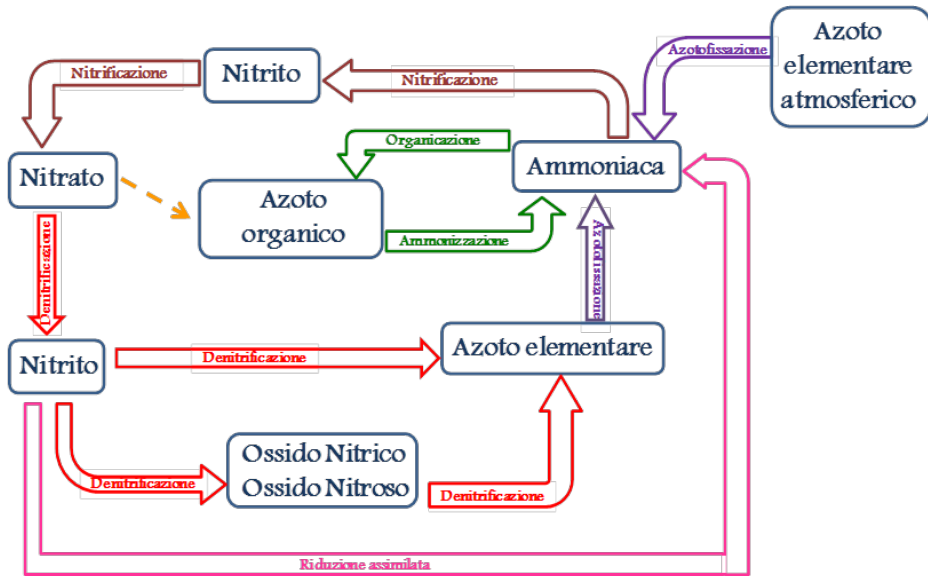


Figura 3.1: Schema del ciclo dell'azoto

Il frazionamento isotopico può avvenire a carico di tutti i vari tipi di reazione a cui partecipa l'azoto; per alcuni come nel caso della formazione di ione ammonio dalla sostanza organica esso risulta piccolissimo ($\pm 1\%$) per altri come nel caso della nitrificazione il frazionamento risulta più marcato.

In effetti la formazione di ione ammonio determina quasi istantaneamente anche la generazione di ammoniaca (equilibrio ione ammonio in soluzione e ammoniaca in fase gassosa) la cui volatilizzazione in atmosfera è caratterizzata da un elevato frazionamento, che produce ammoniaca impoverita in ^{15}N , lasciando lo ione ammonio residuo al suolo arricchito. Il fattore di arricchimento (equivalente alla differenza dei delta di substrato e prodotto) può assumere valori fino a 30‰.

Nel caso della nitrificazione, l'intero processo di trasformazione dell'azoto in nitrato produce un arricchimento nel substrato azotato residuo (reazioni di trasformazione sequenziali) e pertanto sia l'equilibrio tra ammoniaca in soluzione e quella in fase gassosa genera un arricchimento a carico della frazione solubilizzata, sia l'equilibrio in soluzione tra ione ammonio e ammoniaca genera un arricchimento a carico dello ione ammonio.

Nel passaggio da ione ammonio a nitrito si ha un ulteriore arricchimento a carico della frazione nitrosa mentre l'ulteriore ossidazione dell'azoto da nitrito a nitrato è trascurabile in termini di frazionamento isotopico.

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, ovvero la discriminazione operata dai batteri verso le specie più "leggere", può variare da 1,8‰ a 40‰ (i.e., il nitrato residuo risulta essere più arricchito nell'isotopo più pesante rispetto all'azoto molecolare prodotto).

Si deve comunque tenere presente che la velocità dei processi che coinvolgono l'azoto dipende da numerosi fattori ambientali, quali ad esempio, la tessitura e la percentuale di umidità dei suoli, ecc.

Tutte le conoscenze sui fattori di arricchimento isotopico attribuibili al ciclo dell'azoto sono fondamentali per l'applicazione dell'approccio isotopico alla determinazione dei contributi percentuali delle sorgenti al nitrato in acqua.

L'esistenza di una differenza isotopica significativa tra le potenziali sorgenti è il prerequisito per l'utilizzo di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nell'identificazione delle fonti di nitrati nelle acque sotterranee.

Il campo di variazione della composizione isotopica dell'azoto nitrico riassumendo può variare tra -20‰ e +30‰ ed in particolare:

- valori di ^{15}N intorno allo zero (-10‰; +5‰) individuano i fertilizzanti azotati (nitrici e ammoniacali) che vengono prodotti per sintesi;
- valori di ^{15}N compresi tra +3‰ e +25‰ individuano liquami di origine zootecnica e civile; l' ^{14}N viene preferenzialmente espulso con l'urina e lo ione ammonio presente nei liquami isotopicamente arricchito in ^{15}N rappresenta la frazione residua di azoto non volatilizzata: da qui il marcato arricchimento in ^{15}N .

I composti azotati di origine atmosferica (piogge) hanno campi di variazione del $\delta^{15}\text{N}$ così ampi (-20‰ a +15‰) da non poter offrire informazioni conclusive e comunque non contribuiscono sensibilmente all'aumento della concentrazione di nitrati nei terreni agricoli (Sutton et al., 2011).

I nitrati provenienti da fertilizzanti sintetici e l'azoto del suolo possono quindi essere differenziati dai nitrati provenienti da deiezioni animali o domestiche usando il $\delta^{15}\text{N}$. Inoltre l'andamento di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{15}\text{N}$ osservato nel nitrato residuo durante la denitrificazione rende tali isotopi dei traccianti utili per differenziare il processo di diluizione (miscelamento) dalla denitrificazione, processo molto importante nel ridurre le concentrazioni di nitrati in falda.

3.3 - Applicazione in Pianura Padana e Friulano Veneta

Come è stato già detto, il modello di mixing isotopico SIAR restituisce la funzione di distribuzione di probabilità della presenza di nitrato derivante da ciascuna sorgente in acqua (massa di nitrato attribuibile a una specifica sorgente/massa di nitrato totale) e per ottenere ciò è necessario stabilire:

- il numero e il tipo di sorgenti presenti nella miscela;

- i valori di marcatura isotopica delle sorgenti con le relative incertezze;
- i fattori di correzione da applicare ai valori del delta isotopico di N e O delle sorgenti;
- i valori del $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ dei nitrati disciolti nelle acque;
- le pressioni insistenti nell'area in cui ricade il punto di monitoraggio.

In generale, nel caso di presenza di nitrati nelle acque potenzialmente attribuibile a sorgenti multiple si definisce un sistema di equazioni:

$$\delta^{15}N_{mix} = f_1 \times (\delta^{15}N_1 + \varepsilon_1) + f_2 \times (\delta^{15}N_2 + \varepsilon_2) + f_3 \times (\delta^{15}N_3 + \varepsilon_3) + f_4 \times (\delta^{15}N_4 + \varepsilon_4)$$

$$\delta^{18}O_{mix} = f_1 \times (\delta^{18}O_1 + \gamma_1) + f_2 \times (\delta^{18}O_2 + \gamma_2) + f_3 \times (\delta^{18}O_3 + \gamma_3) + f_4 \times (\delta^{18}O_4 + \gamma_4)$$

$$1 = f_1 + f_2 + f_3 + f_4$$

dove:

- i pedici 1, 2, 3, 4 si riferiscono alle diverse sorgenti individuate;
- f rappresentano il contributo percentuale di ciascuna sorgente al campione d'acqua, espressi come frazione;
- $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ sono i rapporti isotopici delle sorgenti;
- $\delta^{15}N_{mix}$ e $\delta^{18}O_{mix}$ sono i rapporti isotopici dei campioni di acqua;
- ε e γ rappresentano i fattori di correzione (ovvero gli arricchimenti che gli isotopi possono subire a seguito dei processi ambientali in cui sono coinvolti).

Le sorgenti individuate ai fini dell'applicazione del modello di miscelamento isotopico sono:

- acque sotterranee: fertilizzanti minerali, reflui zootecnici, reflui civili non depurati e azoto naturalmente presente nei suoli;
- acque superficiali: fertilizzanti minerali, reflui zootecnici, scarichi civili depurati e azoto naturalmente presente nelle acque.

La maggior parte delle sorgenti sono state caratterizzate isotopicamente; in alcuni casi sono stati utilizzati dati raccolti dalla letteratura scientifica (Figura 3.2).

Diversamente da quanto riportato nella letteratura internazionale, nel presente studio sono stati discriminati i reflui civili non trattati (CivING) da quelli trattati (CivUSC); le marcature isotopiche hanno evidenziato per i reflui civili in ingresso un $\delta^{15}\text{N}$ minore rispetto ai reflui in uscita. Nel caso dei reflui civili non trattati (CivING) gli intervalli isotopici dell'azoto e dell'ossigeno del nitrato sono risultati sovrapposti a quelli dei fertilizzanti minerali ed a quelli del nitrato naturalmente presente nei suoli.

Gli intervalli definiti per gli scarichi civili trattati (CivUSC) sono risultati essere sovrapposti agli intervalli definiti per le sorgenti zootecniche. Gli intervalli relativi ai fertilizzanti minerali sono risultati anch'essi sovrapposti a quelli relativi all'azoto naturalmente presente nelle acque superficiali.

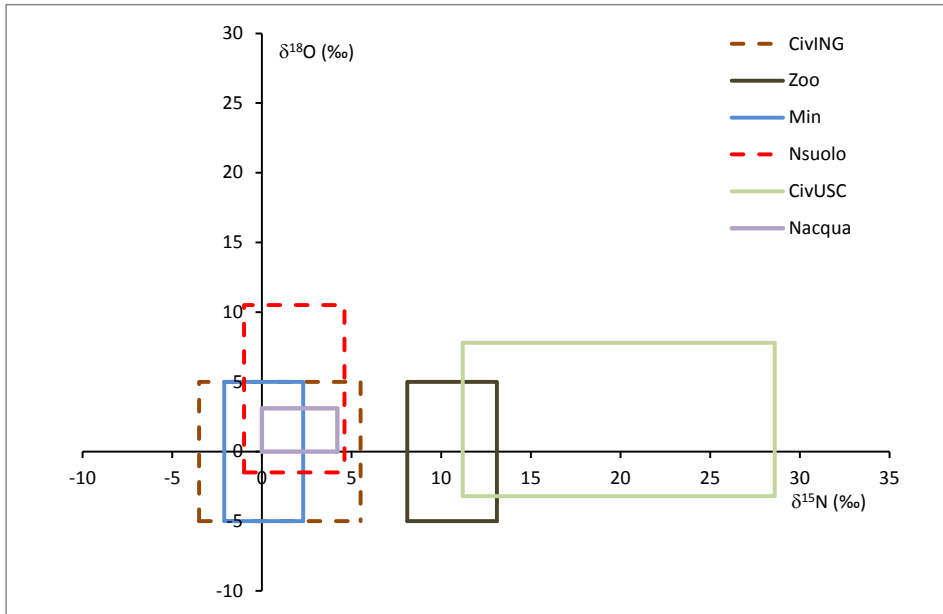


Figura 3.2: Intervalli isotopici determinati sperimentalmente [Rapporto ISPRA 217/2015] del $\delta^{15}\text{N}$ e del $\delta^{18}\text{O}$ relativi alle sorgenti dove:

CIVING = acque reflue civili in ingresso al depuratore ($\delta^{15}\text{N}$ è stato determinato sperimentalmente su 8 campioni più due dati ricavati dalla letteratura Roger, 2003 e relativi a due fosse settiche; $\delta^{18}\text{O}$ è stato ricavato dalla letteratura, Xue, 2009 e bibliografia citata in esso);

CIVUSC = acque reflue civili trattate in impianti di depurazione ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ sono stati determinati sperimentalmente su 8 campioni);

ZOO = reflui zootecnici ($\delta^{15}\text{N}$ è stato determinato sperimentalmente su 8 campioni; $\delta^{18}\text{O}$ è stato ricavato dalla letteratura, Xue, 2009 e bibliografia citata in esso);

MIN = fertilizzanti minerali ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ sono stati ricavati dalla letteratura più due campioni determinati sperimentalmente per l'azoto);

Nsuolo=azoto naturalmente presente nei suoli ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ sono stati ricavati dalla letteratura);

Nacqua = azoto naturalmente presente nelle acque superficiali ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ sono stati determinati sperimentalmente su 6 campioni).

Per quanto riguarda l'isotopo dell'ossigeno i dati sono stati ottenuti sperimentalmente sia per le sorgenti civili in uscita dagli impianti di depurazione, sia per l'azoto naturalmente presente nei suoli e nelle acque; nel caso delle altre sorgenti caratterizzate da un contenuto trascurabile della forma nitrica dell'azoto, i dati dell'ossigeno sono stati calcolati

partendo dall'assunzione che in fase di nitrificazione sono coinvolti due atomi di ossigeno dell'acqua (intervallo isotopico di caratterizzazione $-12\text{‰} \div -8\text{‰}$) e uno dell'aria ($23,5\text{‰}$).

I fattori di correzione (ϵ_i) relativi alle sorgenti minerali ($\delta^{15}\text{N}$ $5,0 \pm 1,0\text{‰}$) e zootecniche ($\delta^{15}\text{N}$ $2,7 \pm 0,2\text{‰}$) da applicare per una più accurata determinazione dei relativi contributi, sono stati determinati sulla base delle indagini effettuate e dei risultati ottenuti sugli eluati dei suoli caratterizzati dall'applicazione delle suddette sorgenti. Nel caso delle sorgenti civili e dell'azoto naturalmente presente nelle acque e nei suoli sono stati attribuiti dei fattori di correzione pari a zero. Nello specifico nel caso dei reflui civili non trattati (CivING) si è assunto che fenomeni di volatilizzazione dell'ammoniaca (principale processo che può indurre arricchimento isotopico nel substrato) possano essere trascurati dato che le eventuali perdite dai sistemi fognari piuttosto che la diffusione dalle vasche settiche avvengono direttamente nel sottosuolo. Nel caso degli scarichi civili trattati (CivUSC), i processi di trattamento generano già arricchimento nel nitrato prodotto; nel caso dell'azoto naturalmente presente nelle acque superficiali e nei suoli il rapporto isotopico attribuito alla sorgente registra già i fattori di arricchimento derivanti dalle reazioni di formazione di nitrato.

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 apporzonare. In base alla definizione del fattore di arricchimento, secondo la quale il nitrato è generalmente arricchito rispetto all'azoto reagente, i fattori di correzione andranno sommati algebricamente al rapporto isotopico della sorgente e le loro incertezze propagate. La rielaborazione degli intervalli isotopici corretti delle sorgenti è rappresentata nella Figura 3.3.

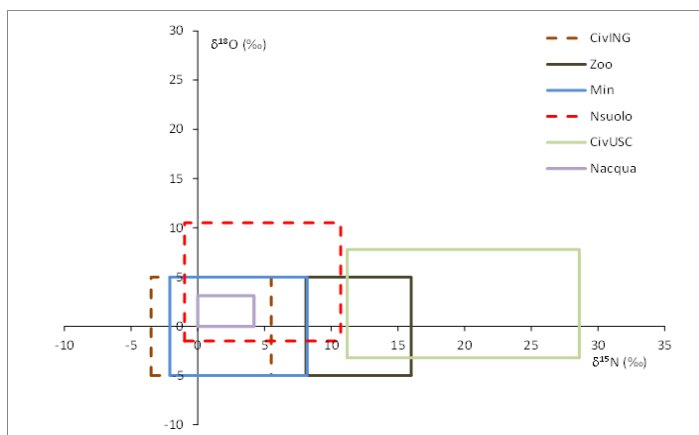


Figura 3.3: Intervalli isotopici del $\delta^{15}\text{N}$ e del $\delta^{18}\text{O}$ relativi alle sorgenti rideterminati tenendo conto dei fattori di arricchimento

L'applicazione del metodo isotopico ha dimostrato la sua efficacia per stimare, seppur in maniera probabilistica e con un certo grado d'incertezza, il contributo proporzionale delle relative sorgenti potenziali che portano alla presenza di nitrati nelle acque superficiali e sotterranee, mediante le reti di monitoraggio (essenzialmente quella ai sensi della WFD) nelle Regioni del Bacino del Po della Pianura Veneta e del Friuli Venezia Giulia.

I risultati ottenuti nelle aree indagate hanno evidenziato la presenza di un valore di fondo di nitrati imputabile al processo di mineralizzazione della sostanza organica naturalmente presente nei suoli. Hanno inoltre confermato che, in alcuni casi, un contributo di origine civile non può essere trascurato. Inoltre è stato possibile discriminare il contributo di nitrati derivante dall'utilizzo dei fertilizzanti minerali piuttosto di quelli di natura zootecnica. Infine è stato possibile evidenziare la presenza di numerose aree caratterizzate da fenomeni di denitrificazione.

3.4 - Riferimenti bibliografici

Progetto ISONITRATE <http://isonitrate.brgm.fr/>

Rapporto ISPRA, 2015. La contaminazione da nitrati nelle acque: applicazione di un modello isotopico nelle Regioni del Bacino del Po, della Pianura Veneta e del Friuli Venezia Giulia, ISPRA 217/2015

Rogers, K.M., 2003. Stable carbon and nitrogen isotope signatures indicate recovery of marine biota from sewage pollution at Moa Point, New Zealand. *Mar. Poll. Bull.* 46, 821–827

Sutton, M. A., Howard, C.M., Erisman, J.W., Billen, G., Bleeker A., Grennfelt P., Grinsven H.V., Grizzetti, B., 2011. *The European Nitrogen Assessment. Sources, Effects and Policy Perspectives*, Cambridge University Press

Xue, D., J. Botte, B. De Baets, F. Accoe, A. Nestler, P. Taylor, O. Van Cleemput, Berglund M., Boeckx P., 2009. Present limitations and future prospects of stable isotope methods for nitrate source identification in surface- and groundwater. *Water Res.* 43:1159–1170.

4. TRACCIABILITÀ DI PRODOTTI AGROALIMENTARI: CASO STUDIO RADICCHIO IGP DI CHIOGGIA E OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA

4.1 - Introduzione

Lo studio degli isotopi stabili si è recentemente affermato nel campo dei controlli di qualità alimentare di alcuni prodotti agroalimentari (quali ad esempio vino, olio, miele, succhi di frutta) e per monitorare l'eventuale sofisticazione delle acque minerali e degli zuccheri (Camin et al., 2016; Drivelos & Georgiou; Kelly et al., 2005). Questa tecnica analitica, basandosi sui differenti rapporti isotopici, permette di riconoscere atomi o molecole, presenti in alimenti, aventi la stessa struttura chimica ma provenienti da materie prime diverse o elaborate con processi diversi, come ad esempio per sintesi biologica o industriale (Tabella 4.1).

Tabella 4.1: Alcuni esempi di applicazione pratica dell'analisi isotopica in campo agroalimentare

<ul style="list-style-type: none">• <i>Riconoscimento di aromi naturali (es. vanillina) da quelli di sintesi;</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Identificazione dell'acido acetico proveniente dalla fermentazione naturale e quello ottenuto industrialmente;</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Distinzione tra i salmoni selvatici e quelli di allevamento;</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Identificazione dell'aggiunta di zuccheri diversi da quelli presenti naturalmente in diversi alimenti (miele, vino);</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Riconoscimento di un annacquamento del latte;</i>
<ul style="list-style-type: none">• <i>Valutazione della provenienza geografica e tipicizzazione di alimenti (alimenti di denominazione di origine controllata (DOC), denominazione di origine protetta (DOP), di identificazione geografica protetta (IGP)) e certificazioni biologiche.</i>

La facilità di frazionamento isotopico, dovuta alla significativa differenza di massa tra gli isotopi indagati, è allo stesso tempo il punto forte ed il limite dell'analisi isotopica applicata alla tracciabilità degli alimenti, infatti la tecnica isotopica risulta facilitare enormemente il riconoscimento per il controllo anti-adulterazione.

Per avere l'identificazione esatta di un prodotto, in riferimento alla sua provenienza geografica, è necessaria una raccolta estesa di dati. Tali dati devono tener conto di tutte le possibili variazioni naturali (stagionali, climatiche, ecc.), e delle variazioni artificiali come l'aggiunta di composti, caratterizzati da distribuzione isotopica differente (esempio i composti

fertilizzanti ed i conservanti), questi composti introdotti nel ciclo produttivo possono determinare una variabilità dei dati tale da rendere difficile la localizzazione geografica precisa del prodotto.

Per tutti questi motivi l'analisi isotopica, volta alla determinazione della provenienza della maggior parte dei prodotti agroalimentari, è ancora a livello sperimentale, anche se in altri settori si è arrivati a normare l'uso di questa tecnica nei controlli di filiera.

4.2 - Studio sul radicchio IGP di Chioggia

Nel laboratorio ISPRA è stata effettuata un'indagine preliminare per identificare la provenienza geografica di diversi *cultivar* di radicchio coltivati in differenti aree del Veneto. I campioni, provenienti dall'Azienda Agricola di Chioggia, sono stati forniti dal Consorzio di Tutela del Radicchio di Chioggia IGP.

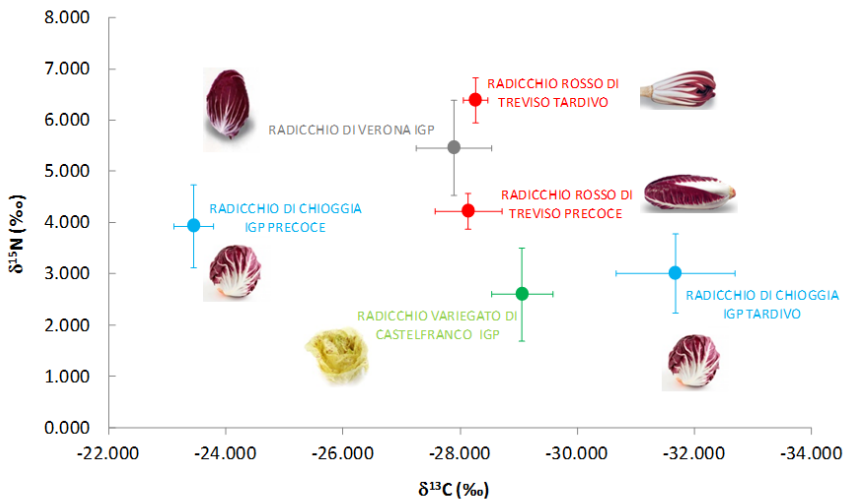


Figura 4.1: Valori isotopici del carbonio, in ascissa ($\delta^{13}\text{C}$ (‰)) e dell'azoto, in ordinata ($\delta^{15}\text{N}$ (‰)) delle diverse cultivar di radicchio venete analizzate (Radicchio di Chioggia IGP, Radicchio rosso di Treviso IGP, Radicchio di Verona IGP, Radicchio variegato di Castelfranco IGP)

Come si evince dalla Figura 4.1 le differenti *cultivar* di radicchio si diversificano per i valori dell'isotopo dell'azoto e del carbonio, sia per le diverse aree di produzione, sia per il diverso periodo di raccolta.

Si può supporre da questi risultati preliminari, che l'analisi isotopica possa essere un valido strumento per confermare la provenienza dei campioni analizzati, dando il giusto riconoscimento alla tipizzazione dei prodotti,

come ad esempio il radicchio di Chioggia IGP, evitando così eventuali frodi agroalimentari, particolarmente frequenti nei prodotti preconfezionati.

4.3 - Studio sull' olio Extra Vergine di Oliva

Il laboratorio ISPRA ha effettuato un'indagine isotopica preliminare anche sull'olio extravergine di oliva per valutare la sua possibile tracciabilità. In Figura 4.2 sono riportati i primi risultati analitici che mostrano i valori degli isotopi stabili del carbonio associati a diverse *cultivar* di olio extravergine di oliva. Dai dati ottenuti si evidenzia come alcune varietà possano essere distinte geograficamente sulla base di valori isotopici significativamente differenti. Tuttavia altre varietà presentano dei rapporti isotopici del carbonio simili tra loro, tali da rendere difficile la loro discriminazione, in particolare quando diverse *cultivar* vengono miscelate insieme per ottenere il prodotto finale. L'utilizzo di altri isotopi stabili (ad esempio idrogeno, zolfo) potrebbe essere determinante ai fini di una migliore interpretazione e quindi tracciabilità.

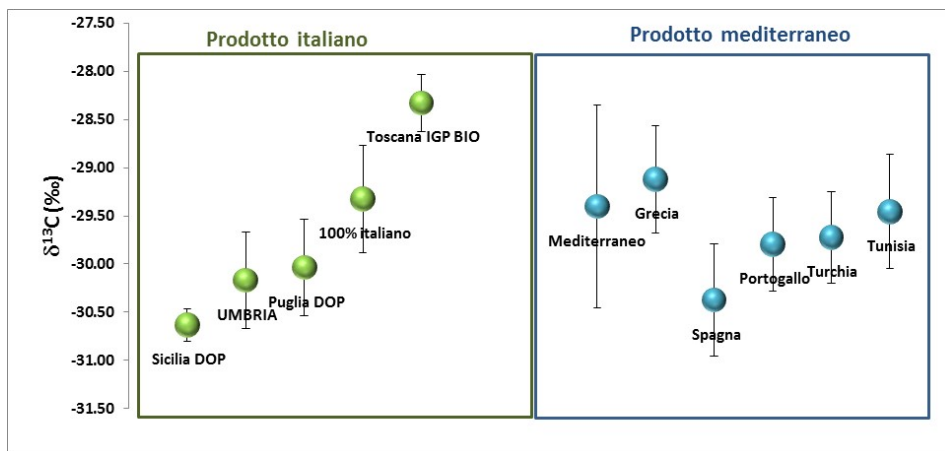


Figura 4.2: Valori isotopici del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) dell'olio extravergine di oliva di diversa provenienza geografica.

Ulteriori approfondimenti statistici e indagini per ampliare il dataset, potrebbero essere necessari per valutare le possibili differenze sia spaziali, che stagionali, o l'eventuale variazione legata al substrato di raccolta (concimi impiegati, tra cui fertilizzanti organici o inorganici) che potrebbero avere un ruolo importante nel modulare i rapporti isotopici.

Questa tecnica analitica gioca un ruolo strategico in questo particolare settore agroalimentare come strumento di validazione della normativa.

4.4 - Riferimenti bibliografici

Camin F., Bontempo, M., Perini, E., Piasentier, M., 2016. Stable Isotope Ratio Analysis for Assessing the Authenticity of Food of Animal Origin. *Compreh. Reviews Food Sci. Food Saf.* 15, 868-877.

Drivelos S.A., Georgiou C.A., 2012. Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union. *Trends Anal. Chem.* 40 38-51.

Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J., 2005. Tracing the geographical origin of food: the application of multi-element and multi-isotope analysis, *Trends Food Sci. Tech.* 16 (12) 555-567.

5. APPLICAZIONE DEGLI ISOTOPI STABILI ALLA CARATTERIZZAZIONE E STUDIO DELL'ORIGINE DELLA SOSTANZA ORGANICA, FUNZIONAMENTO E DINAMICA DELLE RETI TROFICHE E BIOACCUMULO DI INQUINANTI IN AMBIENTI MARINO COSTIERI E DI TRANSIZIONE

5.1 - Introduzione

Le differenti fonti alloctone ed autoctone di sostanza organica possono giocare un ruolo chiave nel determinare il ciclo biogeochimico del carbonio e in misura minore dell'azoto in ambiente acquatico. I rapporti degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) sono ampiamente utilizzati per determinare l'origine (autoctona - alloctona) ed il destino della sostanza organica, sia nella colonna d'acqua che nel comparto sedimentario (Fry and Sherr, 1984). I modelli di mixing isotopico applicati ai valori di $\delta^{13}\text{C}$ e al rapporto atomico tra il carbonio organico e l'azoto totale ($\text{C}_{\text{org}}/\text{N}_{\text{tot}}$) del particolato sospeso e dei sedimenti si sono dimostrati essere strumenti altamente performanti per valutare quantitativamente, oltre che qualitativamente, il contributo delle diverse fonti organiche alla composizione di sostanza organica presente in ambienti costieri interessati da apporti di acque dolci (Matson and Brinson, 1990; Thornton and McManus, 1994).

L'analisi isotopi stabili è largamente applicata anche nel campo bioecologico per descrivere i flussi di materia e le relazioni trofiche all'interno di un determinato ecosistema. Le interazioni trofiche (preda-predatore) sono considerate tra i principali regolatori delle dinamiche ecosistemiche e hanno un ruolo importante nel mediare le risposte degli ecosistemi rispetto a disturbi naturali e di natura antropica quali la pesca e la degradazione degli habitat. La descrizione delle interazioni tra i diversi comparti di una rete trofica è fondamentale quindi al fine di ottenere una fotografia dello stato dell'ecosistema, degli effetti dovuti agli impatti antropici e delle proprietà di resistenza e resilienza di un determinato ecosistema.

5.2 - Analisi della sostanza organica sedimentaria e particellata nella zona interessata dal delta del fiume Po

Diversi studi hanno mostrato che la materia organica sedimentaria depositata nella zona costiera antistante il fiume Po è il risultato di un mixing di carbonio organico di origine recente e umificato (Tesi et al., 2007, Giani et al., 2009, Giani et al., 2010).

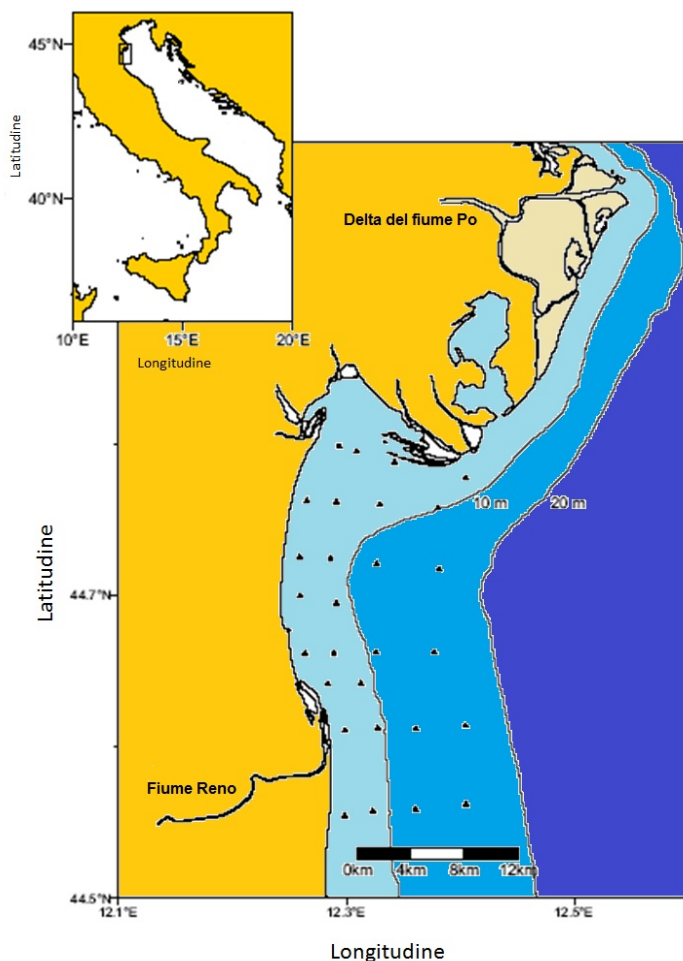


Figura 5.1: Sito di campionamento

Giani et al. (2009) hanno evidenziato come la sostanza organica particellata fluviale mostri rapporti C_{org}/N_{tot} molto simili a quelli di Redfield, tipici del fitoplancton, indicando un importante contributo della produzione primaria fluviale, soprattutto nei periodi di basso regime dei maggiori tributari che insistono nell'area (Reno e Po). La sostanza organica dei sedimenti marini antistanti il delta ha evidenziato invece valori meno negativi del $\delta^{13}C$ e più alti rapporti molari C_{org}/N_{tot} rispetto al particellato sospeso, suggerendo o la presenza di processi di degradazione durante la sedimentazione del particellato, o la deposizione di una componente rilevante di sostanza organica derivata dall'erosione dei suoli (Figura 5.2).

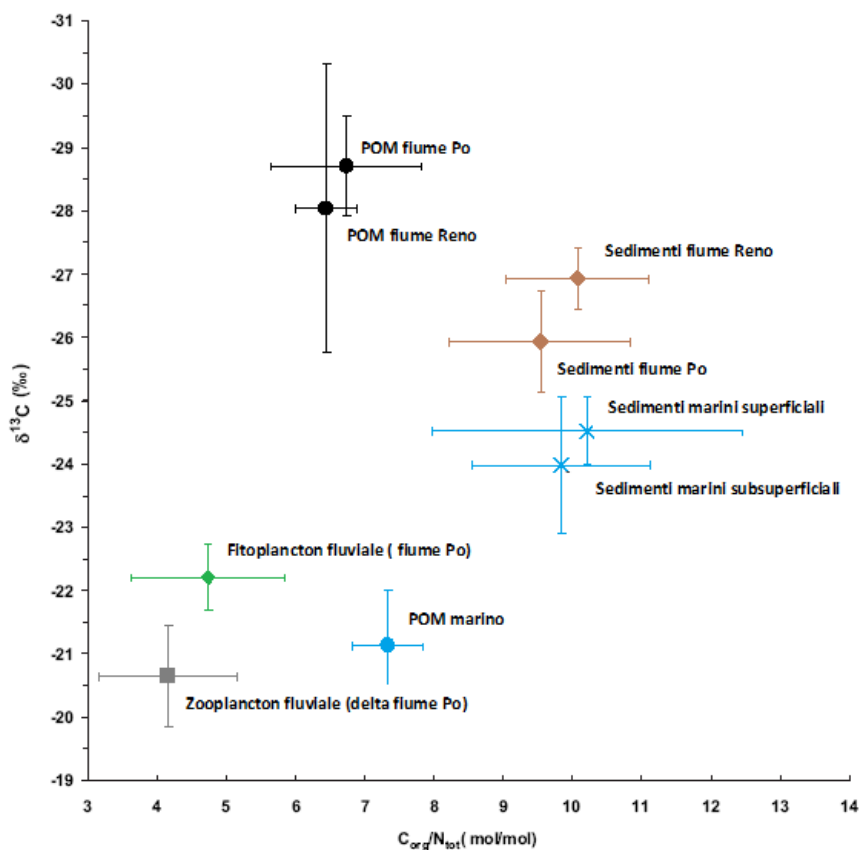


Figura 5.2: $\delta^{13}C$ vs rapporto molare C_{org}/N_{tot} per campioni di sedimento superficiale e subsuperficiale, oltre che per le diverse matrici analizzate durante lo studio

Il modello di mixing isotopico applicato ai sedimenti superficiali utilizzando i valori di $\delta^{13}C$ e il rapporto C_{org}/N_{tot} , ha mostrato un elevato contributo della sostanza organica di origine terrestre rispetto a quella fluviale e marina. Il massimo contributo della sostanza organica di origine terrestre è stato osservato parallelamente alla linea di costa, in una zona con batimetrica compresa tra 10 e 15 metri. Al contrario la frazione marina è risultata massima nei sedimenti delle stazioni più al largo e in prossimità della sacca di Goro, dove la produzione primaria è notoriamente più alta. Infine, il massimo contributo di sostanza organica fluviale è stato determinato per le stazioni localizzate in prossimità delle foci fluviali, interessate dall'apporto delle acque dolci (Figura 5.3).

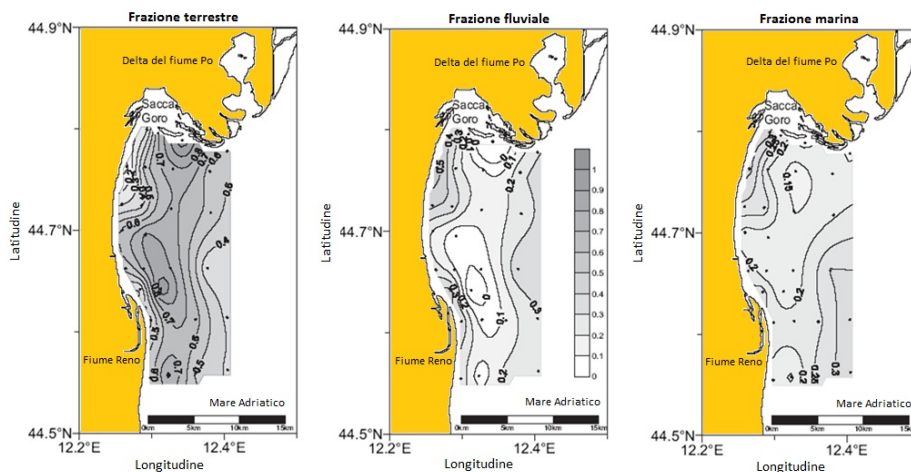


Figura 5.3: Contributo percentuale della frazione terrestre, fluviale e marina alla sostanza organica nei sedimenti superficiali utilizzando un modello di mixing isotopico. I valori sono espressi come frazione della sostanza organica totale, dove la somma delle tre frazioni è uguale a 1.

Le condizioni chimico-fisiche tipiche degli ambienti costieri interessati da rilevanti apporti fluviali, possono influenzare e favorire l'accumulo, la degradazione e la trasformazione della sostanza organica attraverso numerosi processi chimico-fisici e biologici. A questo proposito, un ruolo fondamentale è associato alle sostanze umiche in particolare acidi umici e fulvici che possono in questi ambienti rappresentare anche l'80% del *pool* di carbonio organico presente nei sedimenti marini (Rashid, 1985; Calace et al., 2006). Alcuni studi hanno dimostrato come le concentrazioni di acidi umici e fulvici¹ siano inversamente correlate alla distanza dalla costa, confermando l'ipotesi che gli apporti fluviali possano rappresentare sia una fonte di sostanze organiche umificate, sia di sostanze organiche alloctone di diversa origine.

Il contributo delle sostanze umiche al *pool* di carbonio organico totale nei sedimenti del nord Adriatico interessati dagli apporti del fiume Po, e l'origine delle sostanze umiche presenti, sono stati approfonditi mediante tecniche isotopiche, spettroscopiche ed analisi elementare degli estratti umici (Giani et al., 2010). Questo ha consentito di stimare quantitativamente il contributo degli acidi umici di origine autoctona ed alloctona. Il carbonio umico estratto dai sedimenti superficiali e subsuperficiali dell'area di studio costituisce una percentuale rilevante

¹ Gli acidi umici e fulvici sono delle sostanze naturali che si formano a seguito della ricondensazione dei residui organici derivanti dalla biodegradazione microbica di materia organica fresca (vegetale o animale).

(circa il 17%) della materia organica sedimentaria. La caratterizzazione chimica delle sostanze umiche estratte ha confermato l'ipotesi di un'origine mista: fluviale-terrestre, probabilmente legata a composti derivati dalla lignina, e marina, dalla degradazione del plancton (Figura 5.4).

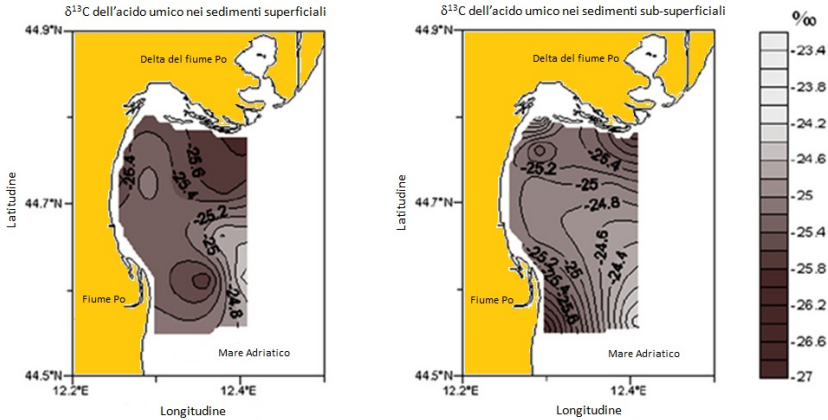


Figura 5.4: Mappa di distribuzione dei valori del rapporto isotopico del carbonio ($\delta^{13}C$) negli acidi umici estratti dai sedimenti superficiali e sub-superficiali

La correlazione positiva tra il $\delta^{13}C$ dell'acido umico e la percentuale marina di sostanza organica nei sedimenti superficiali e sub-superficiali, suggerisce come circa il 50% dell'acido umico possa derivare da sostanze organiche di origine marina.

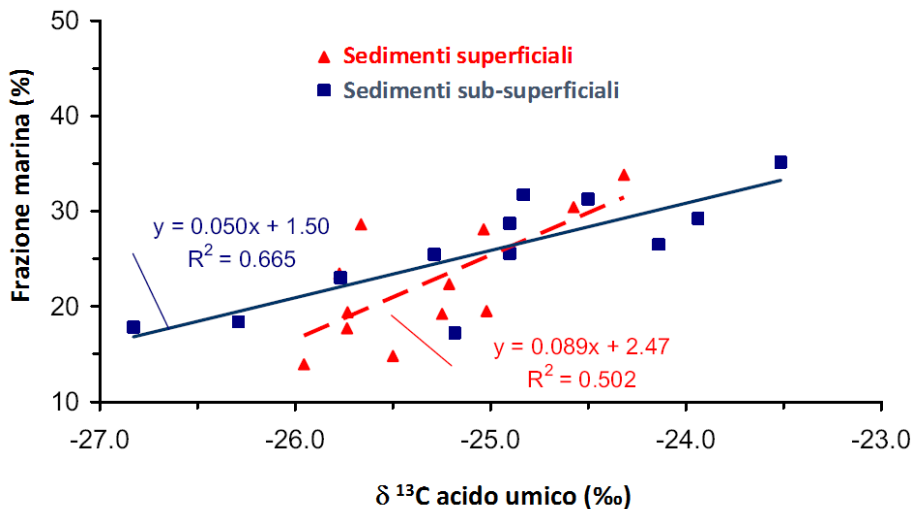
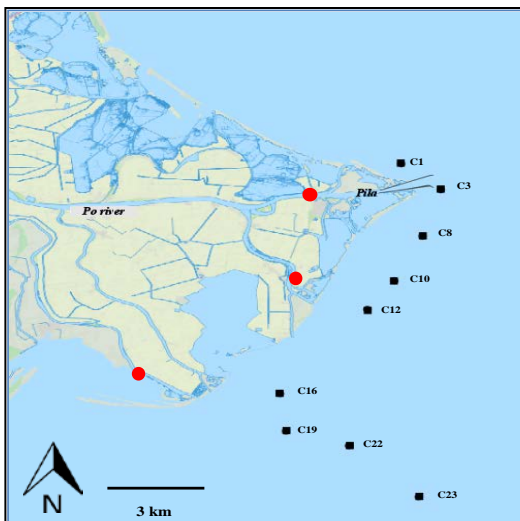


Figura 5.5: Correlazione tra il $\delta^{13}C$ dell'acido umico e la frazione marina (%) della sostanza organica in sedimenti superficiale e sub superficiale

5.3 - Influenza degli apporti organici del delta del Po come fonte di cibo per le comunità macrobentoniche costiere

L'apporto di sostanza organica e di nutrienti di origine terrestre verso le aree marine costiere può fornire una riserva potenziale di cibo in grado di influenzare la diversità e il funzionamento degli ecosistemi riceventi (ipotesi "outwelling"). Tale rifornimento può influenzare significativamente la produttività delle aree costiere, ad es. incrementando la biomassa delle risorse ittiche (Dernaude et al. 2004), e quindi supportare alcuni importanti servizi ecosistemici. Sebbene diversi studi abbiano confermato l'esistenza di connessioni trofiche tra ambienti fluviali/terrestri ed estuarini ha evidenziato l'importanza delle risorse terrestri per le comunità estuarine, l'entità di tale fenomeno è ancora poco studiata nelle aree costiere influenzate da fiumi e in special modo in sistemi complessi come quelli deltizi. L'analisi degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto risulta essere uno strumento di indagine utile per individuare le fonti di cibo, il loro contributo alla dieta dei consumatori e i livelli trofici degli organismi (Fry 2006, Layman et al. 2007).

Nel caso le caratteristiche isotopiche delle potenziali fonti organiche (piante terrestri, detrito marino, fitoplancton, ecc.) sono ben distinte, il loro relativo contributo alla dieta dei consumatori può essere calcolato utilizzando i modelli di miscelamento isotopico (ad es. SIAR; Parnell et al., 2010). Inoltre i dati isotopici, se integrati con valori di biomassa ed informazioni sulla struttura di comunità degli organismi, forniscono l'opportunità di studiare i principali flussi di materia e di valutare l'effetto di impatti multipli (Quillien et al. 2016, Bongiorno et al. 2016).



Nell'ambito di una collaborazione tra ISPRA e ISMAR-CNR di Venezia, l'ipotesi dell' "outwelling" è stata valutata nel sistema delta-prodelta del fiume Po, in relazione a piene autunno-invernali, mediante l'analisi degli isotopi stabili. Campioni di macrofauna e potenziali fonti di cibo sono stati raccolti in un'area del prodelta a distanza crescente dalla bocca principale del fiume Po lungo la *plume* (Figura 5.6).

Figura 5.6: Mappa delle stazioni di campionamento nell'area del prodelta (simboli neri) e interni al delta del Po (simboli rossi)

Fonti organiche di origine alloctona (terrigeno/fluviale) sono state inoltre raccolte in aree interne al delta e il contributo delle varie fonti (sia di origine alloctona che autoctona) alla dieta dei consumatori primari è stato stimato con modelli di miscelamento isotopico.

Considerando i gruppi trofici (sospensivori/filtratori, deposivori superficiali, deposivori subsuperficiali), i valori di $\delta^{13}\text{C}$ degli organismi sospensivori/filtratori sono risultati essere più negativi nelle stazioni a nord vicino al Po di Pila (cerchi neri, Figura 5.7) rispetto alle stazioni situate nella zona centrale (cerchi grigi).

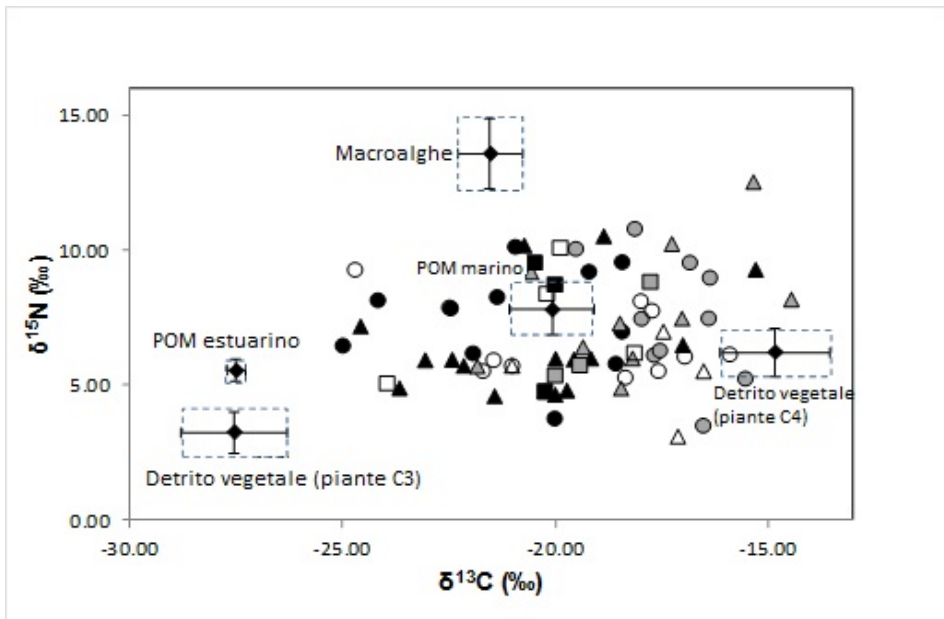


Figura 5.7: Bi-Plot dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (‰) delle fonti organiche primarie corrette per il frazionamento isotopico che avviene durante i processi di digestione e assimilazione del cibo, e valori isotopici medi nei gruppi trofici dei consumatori primari: sospensivori/filtratori (cerchi), deposivori superficiali (triangoli), deposivori subsuperficiali (quadrati). I differenti colori indicano i gruppi di stazioni identificate nel prodelta in base all'analisi della struttura di comunità e le variabili ambientali: nord (stazioni C1, C3, C8, nero), centro (C10, C12, C16, grigio), sud (C19, C22, C23, bianco)

Una simile tendenza, anche se in maniera meno evidente, è stata riscontrata per i deposivori superficiali, suggerendo un'importante influenza dell'apporto fluviale e terrigeno nella zona antistante il Po di Pila. I modelli di miscelamento isotopico applicati ai dati delle fonti organiche primarie corrette per il frazionamento isotopico che avviene durante i

processi di digestione e di assimilazione del cibo, suggeriscono che il maggiore contributo alla dieta dei diversi gruppi trofici di consumatori primari, sia dovuto alle piante ripariali del tipo C4. Inoltre, in accordo con i valori di $\delta^{13}\text{C}$ osservati, il contributo alla dieta, sia dei sospensivori/filtratori che dei depositivori superficiali, del particolato fluviale e della vegetazione di tipo C3 appare decrescere all'aumentare della distanza dal Po di Pila, mentre un trend crescente è osservato più a sud verso le stazioni più al largo. I risultati presentati suggeriscono come, in particolar modo durante stagioni autunno – invernali scarsamente produttive, e nei periodi influenzati da regimi di piena i detriti originati dalla vegetazione delle barene e degli argini, trasportati dal deflusso del fiume Po possano costituire un'importante riserva di cibo per la macrofauna bentonica, contribuendo alla produzione secondaria nelle zone costiere. I dati sembrano suggerire una stretta connettività trofica tra gli ambienti deltizi e costieri, rafforzando ulteriormente l'ottica di strategie di salvaguardia e gestione integrata di ambienti confinanti. L'importante contributo terrigeno e fluviale in termini di risorse trofiche è evidenziato dalle alte biomasse riscontrate nelle zone antistanti la bocca principale del Po, così come nei cambiamenti della composizione di comunità della macrofauna osservati lungo la *plume* (dati non mostrati). Questo studio inoltre sottolinea l'importante relazione tra granulometria, struttura della macrofauna e flussi trofici in ambienti altamente idrodinamici e variabili quali i sistemi deltizi.

5.4 - Caratterizzazione qualitativa e quantitativa delle fonti antropiche di sostanza organica nella laguna di Venezia.

La laguna di Venezia è soggetta a numerose pressioni come ad esempio le attività industriali di Porto Marghera, le attività commerciali e portuali che insistono nell'area lagunare e la presenza dei centri storici di Venezia, Chioggia e centri minori. Queste negli anni, hanno causato diversi problemi ambientali, quali l'inquinamento chimico di acqua, sedimenti e componente biologica, la risospensione dei sedimenti e fenomeni di distrofia. La laguna di Venezia è infatti caratterizzata da apporti di diversa natura, sia di origine autoctona che alloctona (principalmente fluviale, agricola, industriale, urbana, marina e atmosferica). Le fonti antropiche di pressione per la laguna di Venezia possono essere suddivise tra fonti puntuali e fonti diffuse.

Le principali fonti puntuali di inquinamento sono costituite dalle foci fluviali dei principali tributari del bacino scolante che collestano gli scarichi industriali e civili, nonché le acque dilavate dai terreni e dai centri urbani della gronda lagunare; dallo scarico del depuratore di Campalto (mentre per il depuratore di Fusina è stato recentemente realizzato uno scarico a mare); dagli scarichi diretti delle aziende di Porto Marghera, dagli scarichi

fognari del centro storico delle città di Venezia e Chioggia e delle isole lagunari.

Le fonti diffuse di inquinamento sono costituite dalle deposizioni atmosferiche dirette sulla laguna, dall'inquinamento generato dal traffico acqueo, dalle acque di ruscellamento dei centri storici lagunari e dei terreni agricoli della gronda lagunare, dal ruscellamento di acque contaminate dalle aree non ancora marginalate del Sito di Interesse nazionale (SIN) di Porto Marghera e dall'erosione diretta in laguna dei materiali contaminati che costituiscono le sponde stesse del SIN di Porto Marghera. In questo contesto l'analisi degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto rappresenta un promettente strumento di indagine che consente di identificare e caratterizzare, anche quantitativamente, le diverse fonti antropiche (urbana, agricolo-fluviale, industriale), che insistono sulla Laguna di Venezia.

Negli anni dal 2011 al 2015 sono stati condotti dall'ISPRA, nell'ambito della convenzione MATTM-ISPRA/2009, diversi campionamenti finalizzati alla caratterizzazione isotopica della sostanza organica particellata e sedimentaria di diverse stazioni lagunari e fluviali dei principali tributari della zona di gronda della laguna di Venezia.

I campionamenti hanno riguardato 28 tra le stazioni della rete di monitoraggio ecologico ai sensi della Direttiva Quadro sulle Acque (WFD) (Direttiva 2000/60/CE) distribuite su tutta la superficie lagunare (Figura 5.8).

Inoltre sono stati campionati 9 siti fluviali in prossimità della zona di gronda (Figura 5.9).

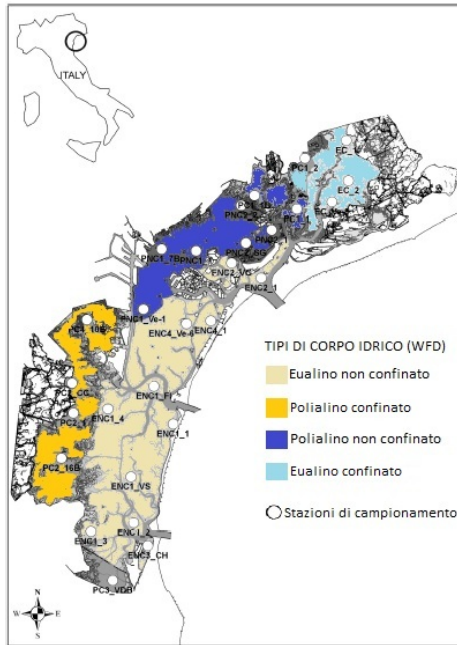
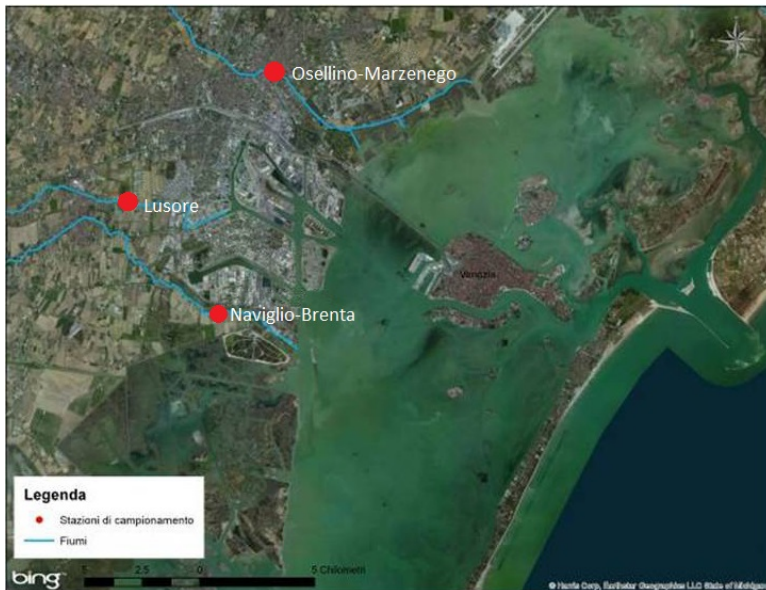


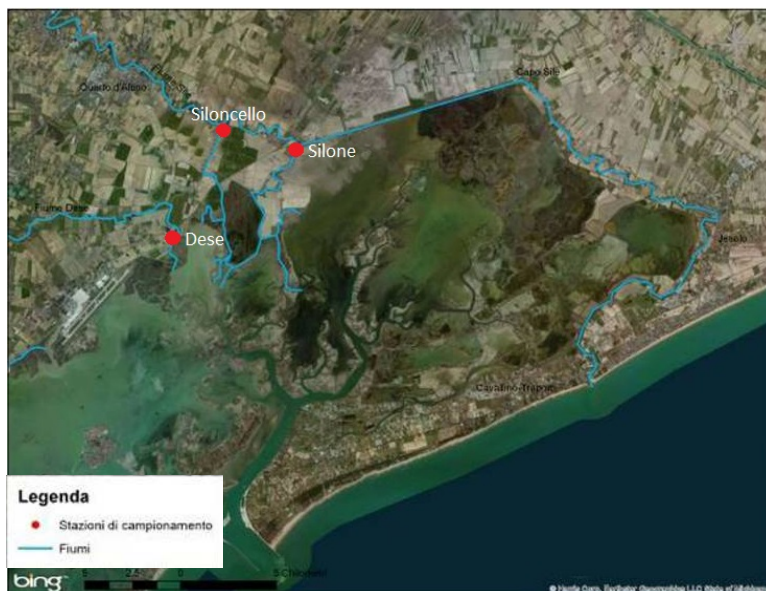
Figura 5.8: Localizzazione delle 28 stazioni di campionamento lagunari per il monitoraggio ecologico dei parametri chimico-fisici dell'acqua in accordo con la Direttiva Quadro sulle Acque (WFD) (Direttiva 2000/60/CE)

Si sono inoltre campionati 9 siti fluviali in prossimità della zona di gronda al fine di valutare la firma isotopica del particolato sospeso derivante dagli apporti di acque dolci nelle diverse zone della laguna. (Figura 5.9).

a)



b)



c)

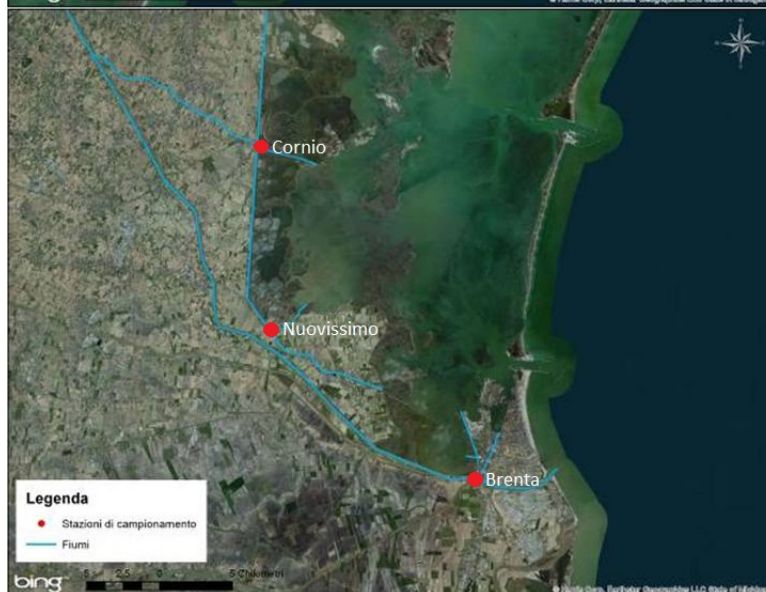


Figura 5.9: Localizzazione delle 9 stazioni di campionamento fluviale.

Infine sono stati campionati ulteriori 8 siti lagunari, in particolare tre stazioni nei canali industriali di Porto Marghera in prossimità di industrie di diversi settori produttivi (stazioni PM1, PM2, PM3), due stazioni in canali interni della città di Venezia con presenza di scarichi urbani liberi (Celestia, Murano) e due stazioni in bassifondi della laguna centrale scelti per maggior distanza dalle possibili diverse fonti (stazioni VS, FI). L'ultimo è

stato campionato nei pressi dello scarico di un depuratore che tratta i reflui della città di Chioggia (Figura 5.10).

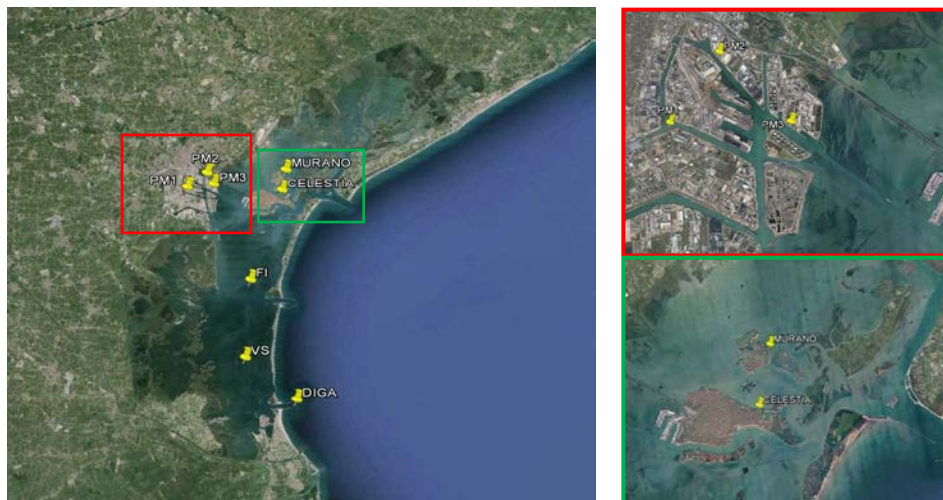


Figura 5.10: Localizzazione delle stazioni di campionamento lagunari con dettaglio sulle stazioni situate nei canali industriali e nei centri urbani di Venezia.

Le campagne hanno previsto il campionamento di acqua e sedimenti per la determinazione dei rapporti isotopici $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e di una serie di parametri a supporto (concentrazione dei nutrienti e della sostanza organica disciolta e particellata) per una miglior interpretazione dei dati isotopici.

Questo studio e quanto riportato in Berto *et al.* (2013) hanno permesso di implementare il data set dei valori isotopici del carbonio e dell'azoto del particolato lagunare, di identificare i valori riferiti alle principali fonti di sostanza organica particellata che entra in laguna di Venezia ed infine di comprendere la loro variabilità temporale. Le informazioni ottenute sono state elaborate in un modello di mixing IsoSource (Phillips and Gregg, 2003).

In Tabella 5.1 sono riportati i valori di riferimento per i due analiti considerati per ciascuna fonte scelta come sorgente (*end-member*) per il calcolo del mixing.

Tabella 5.1: Valori di $\delta^{13}\text{C}$ e di POC/TPN utilizzati come riferimento per le fonti utilizzate nel calcolo del mixing mediante IsoSource

Fonte	$\delta^{13}\text{C}$	POC/TPN	Riferimenti bibliografici
Refluo non trattato	-21.9	1.2	Berto et al., 2013
Refluo trattato	-24.9	4.5	Berto et al., 2013
POM Fluviale	-26.3	12.1	Campionamenti fiumi
Materiale organico sospeso (SOM)	-23.5	10.2	Campionamenti stazioni VS ed FI
POM Marino	-20.2	7.4	Campionamenti Stazione Diga

È importante osservare che le macrofite, sebbene rappresentino un apporto importante di sostanza organica nell'ambiente lagunare, non sono state utilizzate come *end-member* per il calcolo del mixing. L'ipotesi alla base di questa scelta consiste nel ritenere che la componente macrofittica contribuisca significativamente al particolato organico solo quando si accumula nel sedimento al termine del ciclo vitale e sia soggetta a risospensione sedimentaria in particolari condizioni di ri-movimentazione per fenomeni sia antropici che naturali. A tal proposito la stazione FI e la stazione VS hanno presentato spesso elevate coperture di macroalghe durante le campagne di campionamento e quindi sono state scelte quale stazioni come *end-member* per la risospensione sedimentaria a cui è associata anche la componente biologica esclusa dal calcolo.

In Figura 5.11 si riporta la distribuzione delle fonti e dei valori delle stazioni lagunari campionate nel plot $\delta^{13}\text{C}$ vs $C_{\text{org}}/N_{\text{tot}}$.

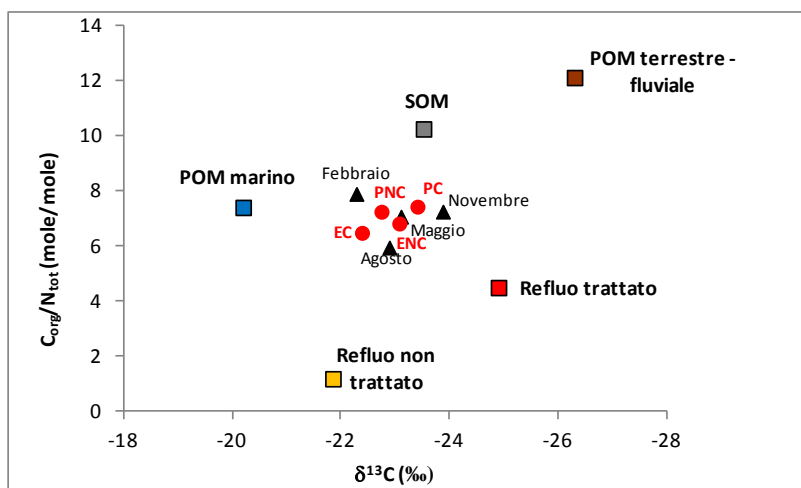


Figura 5.11: Distribuzione delle fonti nel plot $\delta^{13}\text{C}$ vs $C_{\text{org}}/N_{\text{tot}}$ e posizionamento dei dati lagunari ottenuti durante il monitoraggio effettuato da maggio 2011 a febbraio 2012 per mese e per tipo di corpo idrico

Nel grafico si evidenzia in modo chiaro come i valori ottenuti nelle stazioni lagunari si posizionano all'interno dello spazio disegnato dalle varie fonti, a conferma del fatto che, sebbene ogni stazione presenti la prevalenza di una fonte specifica (motivo della scelta iniziale), il partecellato è la risultante della mescolanza di fonti diverse.



Figura 5.12: Risultati del mixing model ottenuti durante il monitoraggio condotto da maggio 2011 a febbraio 2012 mediati per mese e per tipo di corpo idrico

I risultati ottenuti (Figura 5.12) mostrano la prevalenza del contributo dei reflui non trattati in tutti i tipi di corpi idrici, in particolare negli eualini (EC e ENC), probabilmente a causa dei tempi di ricambio delle masse d'acqua che, soprattutto nella parte settentrionale della laguna sono più elevati

favorendo quindi una minor diluizione degli apporti e la maggior tracciabilità delle fonti, in accordo con quanto riportato in Berto et al. (2013). Il contributo della fonte fluviale-terrestre presenta, come atteso, le più alte percentuali nei corpi idrici polialini, mentre il contributo marino risulta più elevato negli eualini. La frazione risospesa risulta invece mediamente simile in tutti e 4 i tipi.

I risultati ottenuti in questo lavoro, data la complessità dell'argomento, hanno bisogno di ulteriori approfondimenti al fine di meglio rappresentare ed interpretare la distribuzione e la natura della sostanza organica nell'ecosistema marino e di transizione che risulta connessa sia alla variabilità delle fonti che ai processi chimico-biologici che insistono nell'area di indagine.

5.5 - Riferimenti bibliografici

Berto, D., Rampazzo, F., Noventa, S., Cacciatore, F., Gabellini, M., Aubry, F.B., Girolimetto, A., Boscolo Brusà, R., 2013. Stable carbon and nitrogen isotopes ratios as tools to evaluate the nature of particulate organic matter in the Venice lagoon. *Estuarine, Coastal Shelf. Science* 135, 66- 76.

Bongiorni L., Fiorentino F., Auriemma R, Bernardi Aubry F., Camatti E., Camin F., Nasi F., Pansera M., Ziller L., Grall J., 2016. Food web of a confined and anthropogenically affected coastal basin (the Mar Piccolo of Taranto) revealed by carbon and nitrogen stable isotopes analyses. *Envir. Sci. Poll. Res.* 23: 12725–12738.

Calace N., Cardellicchio N., Petronio B.M., Pietrantonio M., Pietroletti M., 2006. Sedimentary humic substances in the northern Adriatic sea (Mediterranean Sea), *Mar. Environ. Res.* 61(1), 40-58

Darnaude A.M., Salen-Picard, C., Polunin, N.V.C., Harmelin-Vivien, M.L., 2004. Trophodynamic linkage between river run-off and coastal fishery yield elucidated by stable isotope data in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Oecologia* 138:325–332.

Fry, B., 2006. *Stable isotope ecology*. Springer Ed, New York, 324 pp.

Fry, B., Sherr, E.B., 1984. $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and fresh water ecosystems. *Contribution in Marine Science* 27, 13–47.

Giani, M., Berto, D., Rampazzo, F., Savelli, F., Alvisi, F., Giordano, P., Ravaioli, M., Frascari, F., Origin of sedimentary organic matter in the north-western Adriatic Sea. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 84: 573-583.

Giani, M., Rampazzo, F., Berto, D., 2010. Humic acids contribution to sedimentary organic matter on a shallow continental shelf (northern Adriatic Sea) *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 90 103-110.

Layman, C.A., Quattrochi, J.P., Peyer, C.M., Allgeier, J.E., 2007. Niche width collapse in a resilient top predator following ecosystem fragmentation. *Ecology. Letter.* 10: 937–944.

Matson, E.A., Brinson, M.M., 1990. Stable carbon isotopes and the C:N ratio in the estuaries of the Pamlico and Neuse Rivers, North Carolina. *Limnol. Oceanogr.* 35 (6), 1290–1300.

Parnell, A.C., Inger, R., Bearhop, S., Jackson, A.L., 2010. Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PLoS One* 5, e9672.

Phillips, D.L., Gregg, J.W., 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia* 136, 261–269.

Quillien, N., Nordström, M.C., Schaal, G., Bonsdorff, E., Grall, J., 2016. Opportunistic basal resource simplifies food web structure and functioning of a highly dynamic marine environment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 477: 92–102.

Tesi, T., Miserocchi, S., Gonì, M.A., Langone, L., Boldrin, A., Turchetto, M., 2007. Organic matter origin and distribution in suspended particulate materials and surficial sediments from the western Adriatic Sea (Italy). *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 73, 431–446.

Thornton, S.F., McManus, J., 1994. Application of organic carbon and nitrogen stable isotopes and OC/TN ratios as a source indicator of OM provenance in estuarine system: evidence from the Tay Estuary, Scotland. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 38, 219–233.

6. TRACCIABILITÀ DEI PRODOTTI DELLA FILIERA DELLA PESCA MEDIANTE GLI ISOTOPI STABILI

6.1 - Introduzione

La pesca e l'acquacoltura rappresentano una fonte importante di alimenti di elevato valore nutrizionale, di reddito e di occupazione. Già da tempi remotissimi il pesce ha avuto un'importanza primaria nell'alimentazione dell'uomo. La consapevolezza dell'importanza dei prodotti ittici nella dieta ha subito un notevole incremento grazie anche alla mediazione scientifica di medici e nutrizionisti. Attualmente il contributo dei prodotti ittici al regime dietetico di Nazioni sviluppate, ma anche di Paesi in via di sviluppo, è notevolmente elevato. Tutti i prodotti ittici, oltre a fornire proteine di elevato valore biologico, bilanciate nella composizione in amminoacidi essenziali, risultano caratterizzati da una particolare composizione dei grassi che li rende peculiari rispetto alle carni di animali terrestri.

Ogni specie ittica ha una sua composizione chimico-nutrizionale che subisce modificazioni più o meno marcate durante il corso dell'anno, in relazione al luogo di pesca, alla stagione, ma soprattutto al periodo riproduttivo, che può modificare la composizione in nutrienti. Per fare alcuni esempi: sardina e sgombero hanno una variazione in grasso più elevata durante l'anno rispetto ad alici, naselli e altre specie di pesce più consumate. Per un prodotto da acquacoltura, le differenti modalità di allevamento – estensivo, intensivo in gabbia in mare o in vasca, semi-intensivo – offrono prospettive di controllo della qualità del pesce prodotto. Oltre ai fattori genetici, vari fattori ambientali (temperatura, salinità, pH, ossigenazione, ecc.), il differente tipo di alimentazione (composizione e modalità), la densità dei pesci nelle vasche o nelle gabbie, le modalità di uccisione e il successivo trattamento di manipolazione e conservazione possono influenzare, a vari livelli, le caratteristiche organolettiche specifiche (colore, aroma, ecc.) delle differenti specie e, entro certi limiti, la composizione corporea dei pesci, in particolare la componente lipidica, condizionando quindi il loro valore nutrizionale. Inoltre il livello di contaminazione dell'ambiente acquatico e l'eventuale uso di farmaci influiscono sulla sicurezza d'uso del prodotto.

La richiesta di avere sempre maggiori informazioni sulla composizione chimico-nutrizionale e la provenienza delle specie ittiche non viene solo dal consumatore, ma anche dal mondo della produzione: gli operatori della pesca e acquacoltura, le aziende di prodotti trasformati per l'etichettatura nutrizionale e la GDO (Grande Distribuzione Organizzata), richiedono sempre maggiori informazioni su loro prodotto. In tale contesto, con il realizzarsi del Mercato Unico Europeo, la qualità, la sicurezza alimentare e

l'informazione del consumatore sono richiamati come temi fondamentali della politica agricola Comunitaria nel Libro Bianco sulla Sicurezza Alimentare della Commissione delle Comunità Europee (2000). Allo stesso modo, per i prodotti ittici, il Codice di Condotta per una Pesca e una Acquacoltura Responsabile (FAO, 1995) ha definito principi e norme internazionali di comportamento per garantire pratiche di pesca e acquacoltura responsabili, garantendo quindi la qualità dei prodotti attraverso la tutela dell'ambiente e della salute dell'uomo.

A tal riguardo si rende necessario il controllo dei processi di degradazione e la conservabilità, considerando i rischi connessi al consumo di prodotti ittici contaminati sia da un punto di vista biologico (batteri, virus, tossine algali, parassiti, ecc.) che chimico (metalli pesanti, mercurio, piombo, cadmio, policlorobifenili, diossine, ecc.). Un'impropria manipolazione e conservazione del prodotto, dal momento della pesca fino alla vendita al dettaglio e alla conservazione casalinga, può influire negativamente sulla qualità e sicurezza d'uso del prodotto.

Dalla considerazione della qualità relativa al solo prodotto si è arrivati all'applicazione del concetto di qualità totale applicato all'intera filiera produttiva. Ottimizzare e quindi poter controllare le procedure produttive è l'unica possibilità per poter garantire al consumatore la sicurezza e la qualità totale del prodotto che diventa quindi una logica conseguenza della validità del processo.

La globalizzazione dei mercati ha portato all'esigenza di avere certezze sull'origine dei prodotti ittici, sulla loro tracciabilità e qualità igienica, ma anche di avere sempre maggiori informazioni sulla loro qualità totale (Håstein et al., 2001). A tal riguardo le tecniche isotopiche possono fornire un valido supporto analitico ai fini di garantire la qualità del prodotto ittico in termini di identificazione del prodotto selvatico da quello allevato, dell'origine geografica, del controllo dei processi di lavorazione e conservabilità (EC Reg. 2065/2001) ed infine del potenziale bioaccumulo di contaminanti (ad esempio mercurio, diossine e composti organostannici) (Camin et al., 2016). Tuttavia la facilità di frazionamento, dovuta alla significativa differenza di massa tra isotopi, è insieme il punto forte e il limite dell'analisi isotopica applicata alla tracciabilità degli alimenti. Dal punto di vista del controllo anti adulterazione ciò facilita enormemente il metodo di riconoscimento, ma dal punto di vista della provenienza geografica è evidente che esiste una variabilità naturale dei dati che rende difficile avere riferimenti ben precisi.

A tal fine risulta fondamentale la creazione di banche dati che permettono di ottenere dei valori di riferimento robusti considerando anche tutte le fonti di variabilità che potrebbero incidere e determinare degli *shift* dei valori isotopici.

6.2 - Controllo del processo di congelamento/scongelamento in seppie (*Sepia Officinalis*)

I processi degenerativi a cui vanno incontro le carni dei prodotti ittici dopo la morte, al pari di quelle di qualsiasi altro essere animale, sono principalmente dovuti all'azione di microrganismi aerobi ed anaerobi, e solo in minima parte ad enzimi tissutali. L'applicazione delle basse temperature agisce proprio su questi due fattori, rallentandone l'azione e a volte anche bloccandola, e tutto ciò si mantiene fino a che persiste l'azione del freddo. Va precisato però che il freddo non ha un effetto sanificante, cioè non uccide i microrganismi, che rimangono vivi e vitali e riprendono la loro attività moltiplicativa non appena la temperatura si porta su valori più elevati. E' pertanto indispensabile che il processo di congelazione sia immediato e che sia mantenuta costantemente la catena del freddo. Il pesce congelato si conserva bene anche per oltre diciotto mesi. I prodotti ittici congelati correttamente conservano inalterate le loro caratteristiche nutrizionali ed organolettiche, al pari dei prodotti freschi, anzi, quando sono congelati a bordo di navi-officina, considerato che le loro caratteristiche alimentari vengono fissate in soggetti ancora allo stato di "freschissimo", sono di qualità superiore dei corrispettivi venduti freschi. L'applicazione della cosiddetta catena del freddo nei prodotti ittici, in tutte le sue fasi che vanno dalla produzione alla distribuzione e conservazione fino alla vendita, è fondamentale per assicurare un prodotto fresco e sano. Attualmente le norme da osservare per il mantenimento della catena del freddo sono stabilite dal Decreto Legislativo n. 110 del 27 gennaio 1992 a cui i produttori, i distributori e i venditori di alimenti refrigerati e congelati devono attenersi. Fondamentale è assicurare che il trasferimento dei prodotti refrigerati o congelati venga effettuato senza "interruzioni". Il tempo di conservazione del pesce e il contenuto di CO₂ nella confezione sono i due fattori principali che condizionano l'effetto della temperatura sulla formazione di istamina, la principale fonte di allarme alimentare nel pesce che dipende dalla temperatura. Nel presente caso studio sono stati analizzati e confrontati i valori di $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ di campioni di *Sepia officinalis*, di provenienza Atlantica, sia freschi che congelati, decongelati o lasciati a temperatura di 4°C per una settimana (prodotto "degradato"). I campioni sono stati prelevati presso alcune aziende di distribuzione di prodotti ittici all'ingrosso anche con la collaborazione della Capitaneria di Porto di Chioggia. I risultati hanno mostrato una variazione dei valori degli isotopi stabili principalmente evidente per il carbonio (valori di $\delta^{13}\text{C}$ più negativi per il prodotto congelato, (Fig. 6.1).

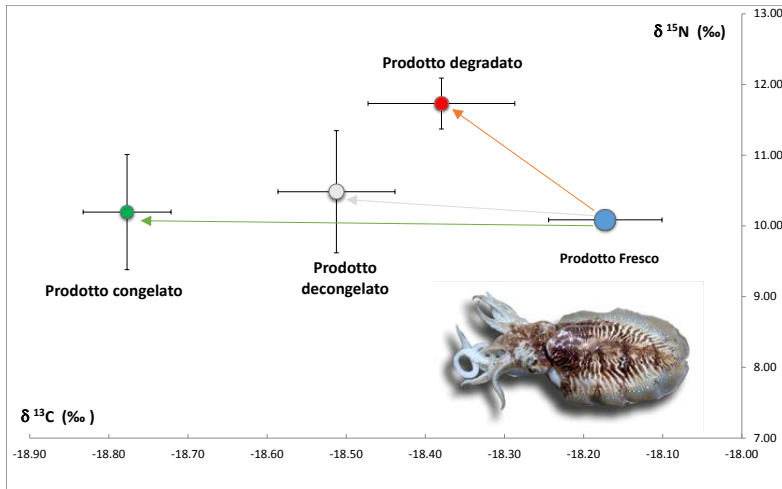


Figura 6.1: Valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ in campioni di *Sepia officinalis* freschi, congelati, decongelati e lasciati a temperatura di 4°C per una settimana (prodotto "degradato").

Questo risultato è in accordo con precedenti studi che hanno messo a confronto campioni congelati rispetto a campioni freschi (Jesus et al. 2015 e autori citati). Tale evidenza può essere giustificata sia dalla rottura delle cellule con conseguente rilascio del citoplasma, durante il processo di congelamento, sia da una possibile degradazione microbica nel caso di prodotti non congelati. Probabilmente la variazione isotopica tra il prodotto congelato e quello decongelato (con uno spostamento verso valori meno negativi) potrebbe essere legata a processi di frazionamento fisico/termodinamico la cui comprensione richiede ulteriori approfondimenti. Di interesse è sicuramente la variazione che si evidenzia in entrambi gli isotopi stabili tra il prodotto fresco e quello definito "degradato". Questa differenza, probabilmente dovuta al frazionamento isotopico conseguente la degradazione microbica (e all'istaurarsi di processi metabolici enzimatici), apre buone prospettive nell'uso degli isotopi stabili per il controllo di possibili frodi nella filiera del prodotto ittico.

6.3 - Variabilità spaziale e tracciabilità del pescato

La globalizzazione dei prodotti ittici ha incrementato notevolmente la richiesta di un'efficace e specifica tracciabilità analitica, al fine di garantire la qualità e la sicurezza degli alimenti oltre che dei consumatori. Si riportano nelle schede alcuni esempi di applicazioni utili ai fini di tracciare sia la specie che la provenienza geografica attraverso l'utilizzo degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto. L'accoppiamento anche con altre tecniche analitiche (DNA barcoding ed analisi degli acidi grassi) risulta anche di estremo interesse.

L'applicazione dell'analisi degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto in campioni di *Sepia officinalis*, *Sepia berthelot* e *Sepia pharaonis* con diversa provenienza hanno evidenziato come i valori di $\delta^{13}\text{C}$ risultino un ottimo screening al fine di tracciare le diverse specie e aree di cattura. Una significativa differenza si rileva in particolare per i campioni di *S. officinalis* di provenienza atlantica (Marocco) rispetto a quelli adriatici (Figura 6.2).

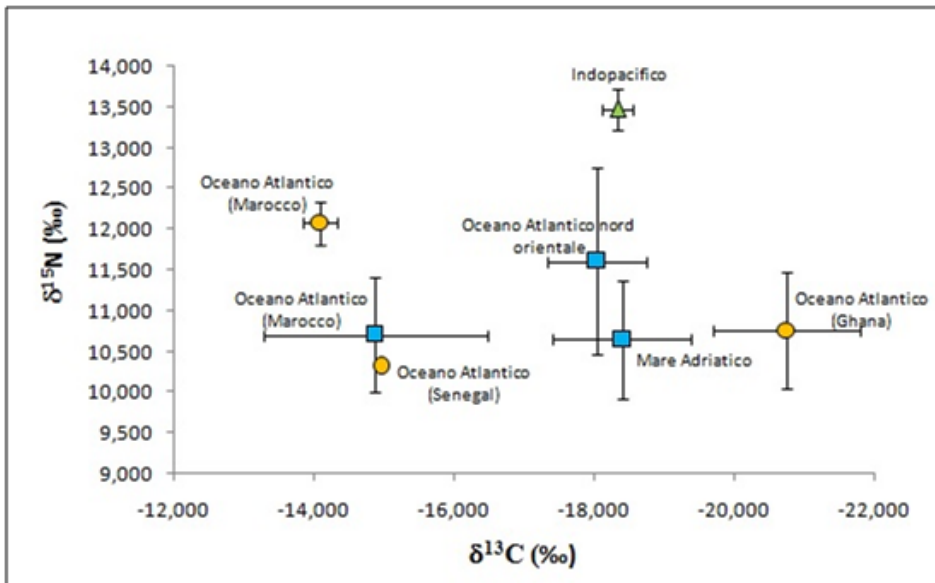


Figura 6.2: Valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ di campioni di *Sepia officinalis*, *Sepia berthelot* e *Sepia pharaonis* di diversa provenienza

La diversa latitudine potrebbe contribuire ad una variazione dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ principalmente in funzione della temperatura dell'acqua che regola la solubilità e quindi la concentrazione di CO_2 disciolto ed il relativo frazionamento isotopico. Oltre a questo, a diverse latitudini risulta differente il tasso di crescita di fitoplancton e quindi della fonte di carbonio assimilata (Takay et al., 2002 e autori citati).

Un'ulteriore potenzialità degli isotopi stabili riguarda la possibilità di discriminare in maniera significativa i prodotti allevati (A) rispetto a quelli derivanti da pesca di stock naturali (N). I dati, rappresentati nella Figura 6.3, relativi a campioni di fauna ittica di interesse commerciale (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Anguilla anguilla*) sia allevati che pescati, hanno evidenziato una differenziazione del rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$, indice della diversa alimentazione degli animali analizzati. I campioni allevati risultano essere caratterizzati da valori di $\delta^{13}\text{C}$ più negativi riflettendo il segnale isotopico degli sfarinati contenuti nei mangimi.

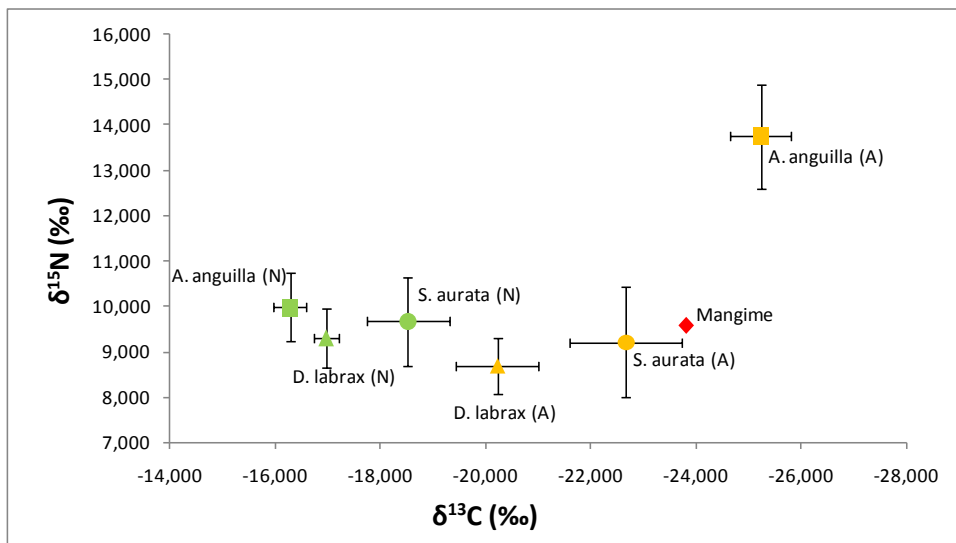


Figura 6.3: Valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ in campioni di fauna ittica di interesse commerciale (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Anguilla anguilla*). Prodotto allevato (A) e prodotto da pesca di stock naturale (N)

Tale approccio si è dimostrato interessante anche quando applicato ai molluschi bivalvi, *Ruditapes philippinarum*, raccolti in varie lagune del delta del Po (Figura 6.4) in uno studio preliminare che ha coinvolto ISPRA congiuntamente all' Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Adria.

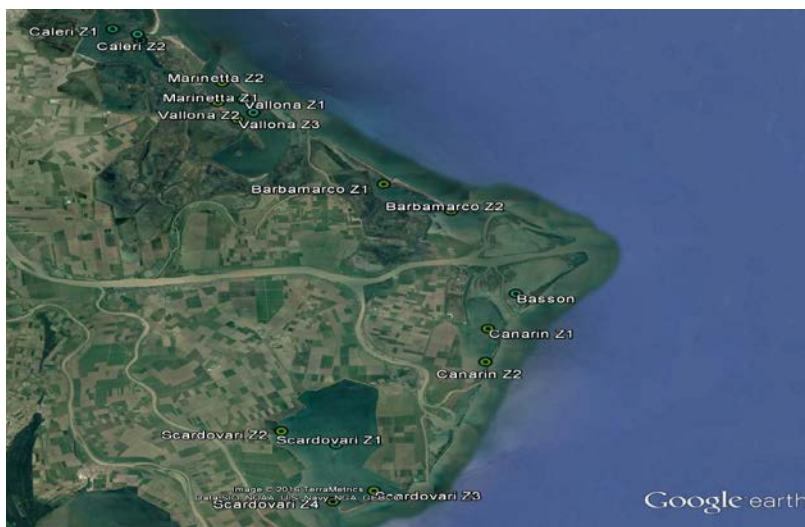
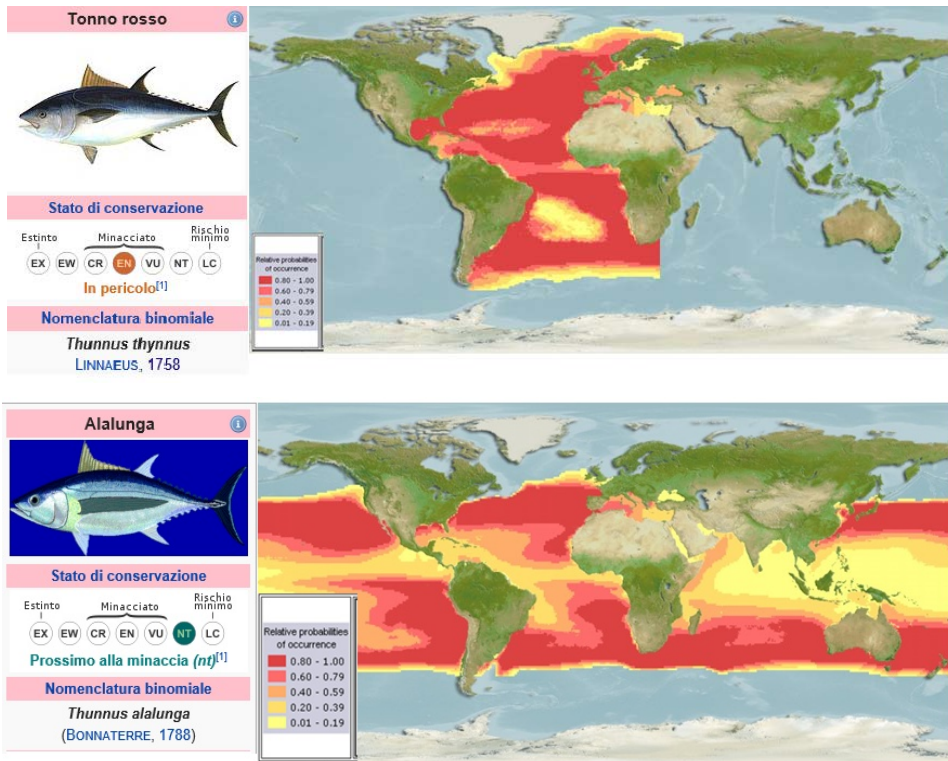


Figura 6.4: Mappa di campionamento dei molluschi bivalvi, *Ruditapes philippinarum*, raccolti in varie lagune del delta del Po

I valori di $\delta^{13}\text{C}$ determinati nelle vongole analizzate presentano un intervallo compreso tra -24.62‰ e -19.24‰ ($-22.33 \pm 1.32 \text{‰}$; media \pm dev. std.), tali valori risultano paragonabili a quelli riportati per il particellato di acque lagunari da Berto et al. (2013). Il $\delta^{15}\text{N}$, presentando un ampio range di valori compresi tra 5.33‰ e 11.25‰ ($8.13 \pm 1.23\text{‰}$; media \pm dev. std.), risulta essere molto influenzato dai processi biologici legati ai diversi input sia di nutrienti sia di apporti antropici che interessano l'area indagata. Il valore di $\delta^{13}\text{C}$ è in grado di discriminare le diverse aree lagunari, mentre il $\delta^{15}\text{N}$ presenta valori simili in tutte le zone indagate. Si osserva tuttavia una differenza significativa dei valori di $\delta^{15}\text{N}$ nell'area della sacca degli Scardovari, tra le zone 1 e 2 rispetto alle zone 3 e 4, probabilmente legata alla diversa origine dell'apporto azotato nell'area.

Un ulteriore approccio alla tracciabilità dei prodotti ittici è stato quello di integrare tre diverse tecniche analitiche (DNA barcoding, isotopi stabili del carbonio e azoto e analisi degli acidi grassi). Tale applicazione è stata sperimentata su pesci marini epipelagici della famiglia degli Scombridae (*Thunnus alalunga*, *Thunnus thynnus*, *Auxis rochei*, e *Scomber scombrus*). Nei diversi riquadri della Figura 6.6 sono riportate le specie e le mappe della loro distribuzione nativa (<http://www.aquamaps.org/>).



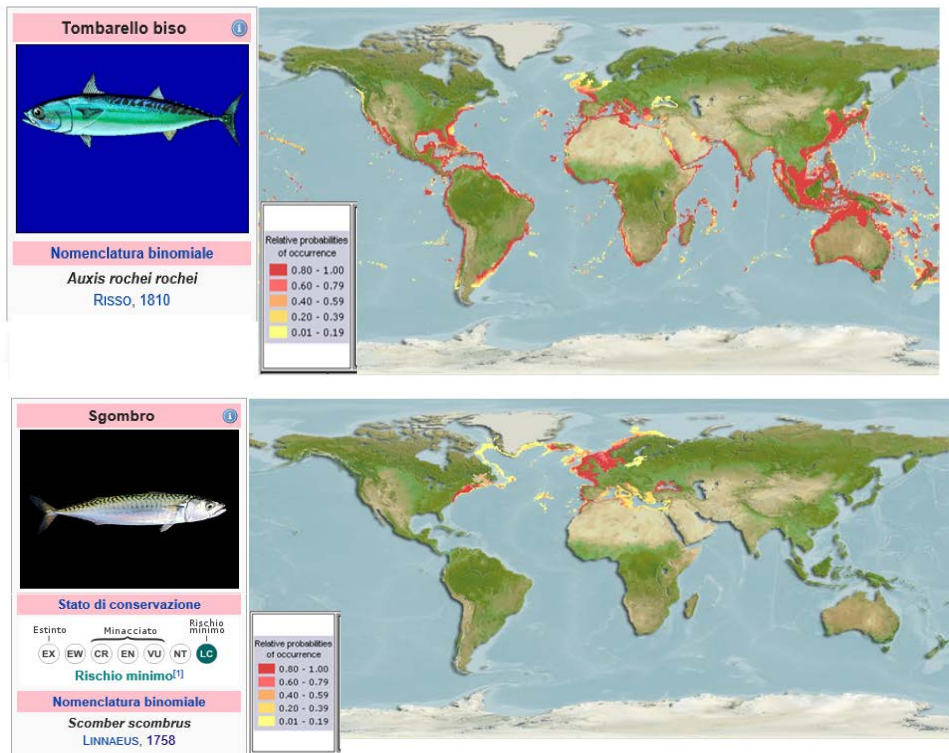


Figura 6.6: Specie analizzate (*Thunnus alalunga*, *Thunnus thynnus*, *Auxis rochei*, *Scomber scombrus*) e le mappe della loro distribuzione nativa (<http://www.aquamaps.org/>)

Lo studio ha coinvolto l'ISPRA, l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Adria e l'Università degli studi di Ferrara.

L'analisi genetica del DNA risulta limitata nella discriminazione tra *T. alalunga* e *T. thynnus* riuscendo a fornire solo la conferma a livello di genere. Ciò può essere particolarmente problematico per quanto riguarda la tracciabilità dal momento che la pesca del tonno rosso (*T. thynnus*) è regolamentata da un regime di quota ai sensi del regolamento CE n. 302/2009 e successive modifiche. L'approccio analitico integrato, che utilizza gli isotopi insieme all'analisi degli acidi grassi testati in questo studio, ha invece mostrato una buona discriminazione delle specie (Figura 6.7 a, b) e una separazione geografica spaziale tra le due specie di *Thunnus* (Figura 6.8). Tali risultati sono stati ottenuti mediante l'analisi delle componenti principali (PCA).

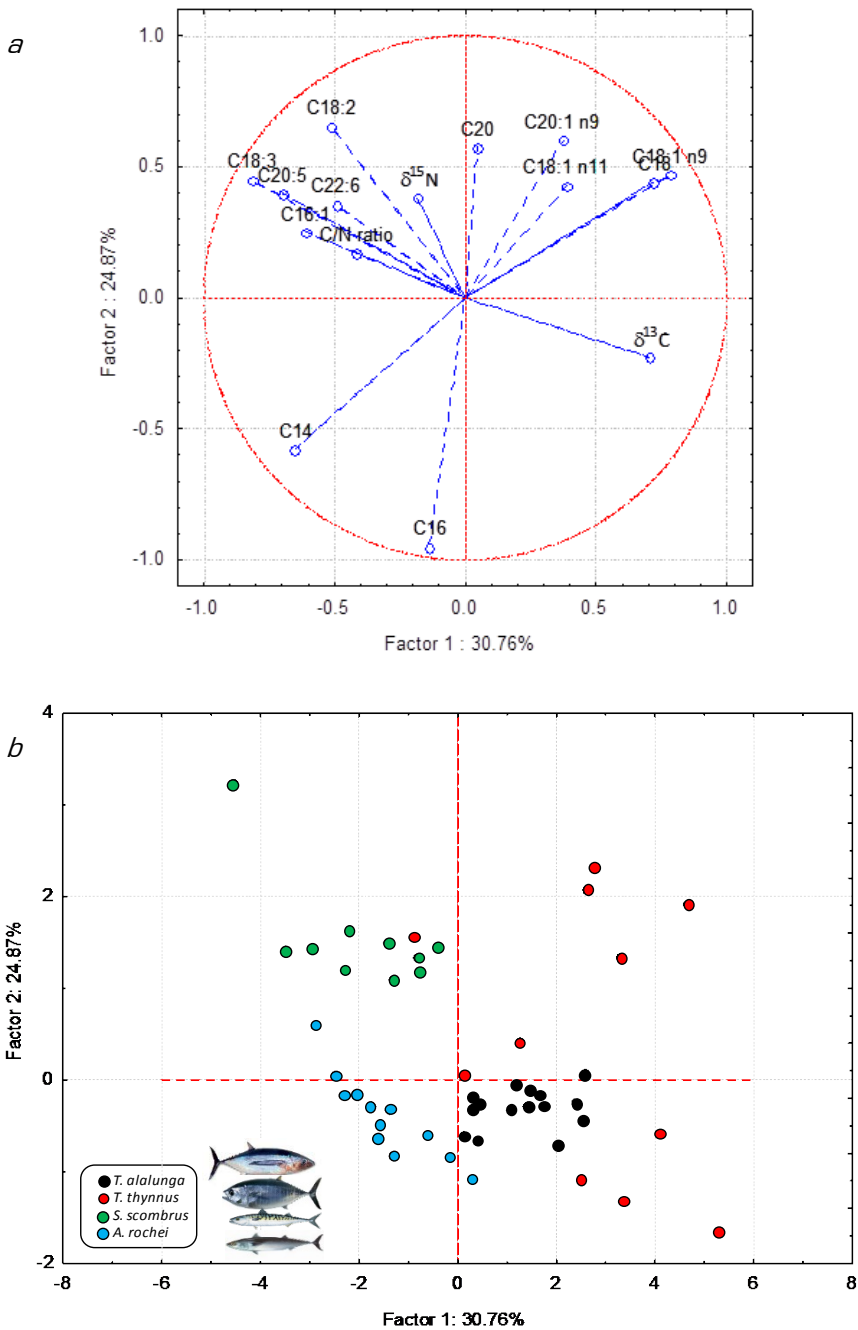


Figura 6.7: Risultati dell'analisi delle componenti principali (PCA). a) Loading plot riporta la distribuzione delle variabili caratteristiche rispetto ai Fattori 1 e 2. b) Score plot mostra la distribuzione delle specie analizzate nel plot bidimensionale Fattore 1 vs Fattore 2

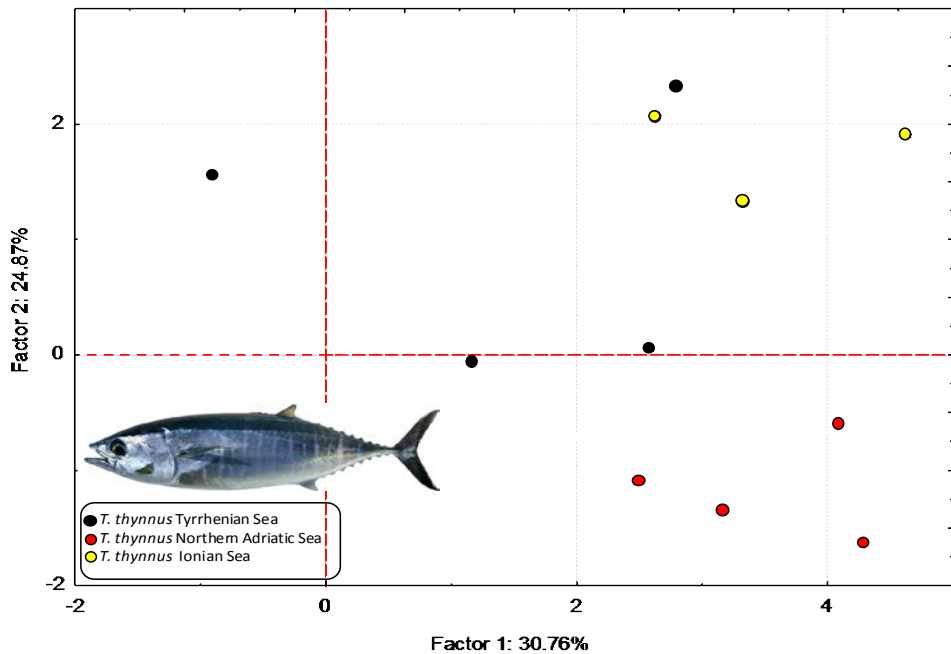


Figura 6.8: Risultati dell'analisi delle componenti principali (PCA) applicata ai campioni *Thunnus thynnus* provenienti da differenti aree geografiche

6.4 - Studio del bioaccumulo di contaminanti nella catena trofica nord adriatica mediante analisi degli isotopi stabili

È dimostrato che nei tessuti di un predatore il rapporto fra gli isotopi dell'azoto ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) cambia rispetto a quello presente nelle sue prede, con un progressivo arricchimento, stimato pari a $3\text{-}4 \pm 1\text{‰}$ tra un livello trofico e quello successivo (Vander Zanden & Rasmussen, 1999). Anche gli isotopi stabili del carbonio possono essere utilizzati per valutare la rete trofica (con un arricchimento di circa 1‰ tra due livelli trofici successivi), tuttavia la firma isotopica del carbonio è preferenzialmente utilizzata per indagare l'origine (o fonte) del carbonio nell'alimentazione dei consumatori (Darnaude, 2005) (Figura 6.9). È stato infatti dimostrato che i produttori primari terrestri sono caratterizzati da valori più negativi di $\delta^{13}\text{C}$ rispetto a quelli marini, con un progressivo aumento a distanza crescente dalla costa (Darnaude, 2005).

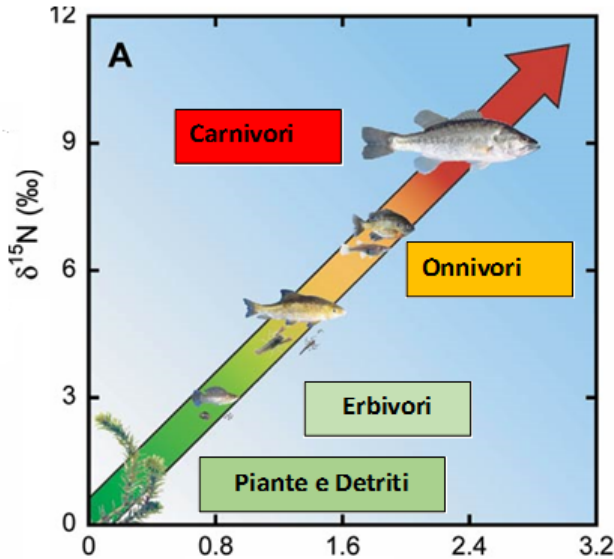


Figura 6.9: Valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ nella catena trofica marina

In sintesi la stabilità degli arricchimenti isotopici in ^{15}N e ^{13}C permette l'utilizzo dei valori di $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ come indicatori rispettivamente del livello trofico di appartenenza e della principale fonte di carbonio primario (Vander Zanden & Rasmussen, 1999).

La determinazione del livello trofico (LT) degli animali attraverso la misura del $\delta^{15}\text{N}$ si basa sul frazionamento isotopico e sulla relazione esistente tra rapporti isotopici nella fonte alimentare e nel suo consumatore (Minagawa & Wada, 1984). Il livello trofico di un organismo può essere calcolato secondo la seguente equazione (Vander Zanden et al., 1997):

$$\text{LT consumatori} = 2 + (\delta^{15}\text{N}_{\text{consumatore/pesce}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{organismo alla base della rete trofica}}) / \Delta\text{N}$$

dove ΔN è pari al tasso medio di arricchimento per livello trofico nella rete trofica considerata (3.4‰) mentre $\delta^{15}\text{N}_{\text{organismo alla base della rete trofica}}$ si riferisce agli organismi alla base della rete trofica quali produttori primari (fitoplancton) o secondari (zooplacton, molluschi bivalvi).

Utilizzando quindi l'informazione del livello trofico congiuntamente ai dati di concentrazione di contaminanti chimici è possibile effettuare studi sul bioaccumulo e sulla biomagnificazione (Minagawa & Wada, 1984; France, 1995; Fuortibuoni et al., 2013), cioè trasferimento dei contaminanti lungo le catene alimentari, attraverso la predazione, con un conseguente

aumento della concentrazione degli stessi nei livelli più alti della rete trofica.

In generale, per le sostanze soggette a biomagnificazione, le concentrazioni critiche sono raggiunte a valori di LT pari a 3/4 per i pesci di acqua dolce e LT pari a 5 per ecosistemi marini, con alcune eccezioni per le sostanze metabolizzabili (idrocarburi policiclici aromatici), e per quelle bioaccumulabili (esaclorobenzene, esaclorobutadiene, mercurio, diossine e PCB diossina-simili, ecc).

A causa dell'aumento della concentrazione dei contaminanti, in particolare bioaccumulabili, negli ecosistemi acquatici, la Direttiva 2013/39/UE, emendativa della Direttiva 2008/105/CE, ha introdotto un valore di standard di qualità ambientale (SQA) per il biota per alcune classi di contaminanti definiti prioritari (fluorantene, idrocarburi policiclici aromatici e difenileteri bromurati, dicofol, acido perfluorottansulfonico e suoi derivati, esabromociclododecano e eptacloro/eptacloro epossido). A tale scopo l'utilizzo del LT permette di definire un $SQA_{biota,x}$ specifico a seconda del livello trofico e del taxa attraverso la seguente equazione che può essere utilizzata sia per biota di acqua dolce che pelagico marino:

$$SQA_{biota,x} = SQA_{biota} / TMF^{(4-LT(x))}$$

Il TMF rappresenta il fattore di biomagnificazione trofica dei contaminanti indagati lungo la catena trofica e viene calcolato dalla pendenza (b) della regressione lineare tra le concentrazioni del contaminante (C_x) ed il LT (Fortibuoni et al., 2013):

$$C_x = a10^{bLT}$$

$$\text{Log}(C_x) = \text{Log}_{10}a + bLT$$

$$TMF = 10b$$

Una prima applicazione di tale approccio è stata effettuata nell'ambito del progetto ORGALT (*Accumulo di composti organostannici nella catena trofica ed in specie ittiche commerciali nell'Alto Adriatico 2008-2010*) con l'obiettivo principale di valutare la biomagnificazione dei composti butilstannici (TBT, DBT e MBT) lungo la rete trofica dell'Alto Adriatico, con particolare riferimento alle specie di maggiore interesse commerciale sfruttate dall'attività di pesca considerando un ampio spettro di livelli trofici, dai produttori primari ai predatori apicali. I composti organostannici (OTC), ed in particolare il tributilstagno, sono stati ampiamente utilizzati, sin dalla metà degli anni '60, come biocidi nelle vernici antivegetative. A causa del loro uso diffuso in numerose applicazioni (industriali, agricole

ecc.) e delle loro specifiche caratteristiche chimico/fisiche, tali inquinanti sono stati rilevati in tutti gli ecosistemi acquatici, con concentrazioni più elevate negli ambienti marino-costieri e lagunari (Berto & Boscolo Brusà, 2016). Attualmente, data la pericolosità di questi composti per un ampio range di organismi marini, ma anche gli esseri umani, sono stati banditi come biocidi nelle vernici antivegetative (Regolamento CE N. 782/2003) ed inclusi nella lista delle sostanze prioritarie e pericolose prioritarie (Direttiva 2008/105/CE). Parallelamente alla misura delle concentrazioni degli OTC nei tessuti sono stati determinati i relativi rapporti del $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ che hanno permesso di valutare sia il livello trofico delle specie che di delineare l'origine dell'alimento e, di conseguenza, della contaminazione (Fortibuoni et al, 2013). In questo lavoro sono state analizzate 26 specie, rappresentative per i diversi livelli trofici, dal plankton ai predatori apicali adriatici. L'analisi isotopica è stata svolta sui campioni di muscolo e di fegato, previa estrazione lipidica (Buchheister & Latour, 2010). Il livello trofico delle specie è stato stimato in base al $\delta^{15}\text{N}$ utilizzando come valore consumatore primario di livello 2 lo zooplancton invece che il fitoplancton.

I principali risultati del lavoro hanno evidenziato:

- una netta predominanza del TBT, rispetto a DBT ed MBT
- una relazione positiva significativa tra le concentrazioni degli OTC ed il LT indicando un fattore di biomagnificazione di tali composti, con un fattore di TMF > 1 (compreso tra 3.88 e 4.62 nel fegato e 2.45 nel muscolo) (Figura 6.10)
- una correlazione negativa ma non significativa è stata invece riscontrata tra $\delta^{13}\text{C}$ e la concentrazione degli OTC. Questo suggerisce che, nonostante ci possa essere un decremento nell'esposizione alimentare ai BT allontanandosi dalle fonti di inquinamento costiere, i meccanismi trofodinamici sono probabilmente i fattori più importanti per la distribuzione dei BT nella rete trofica dell'Adriatico settentrionale.

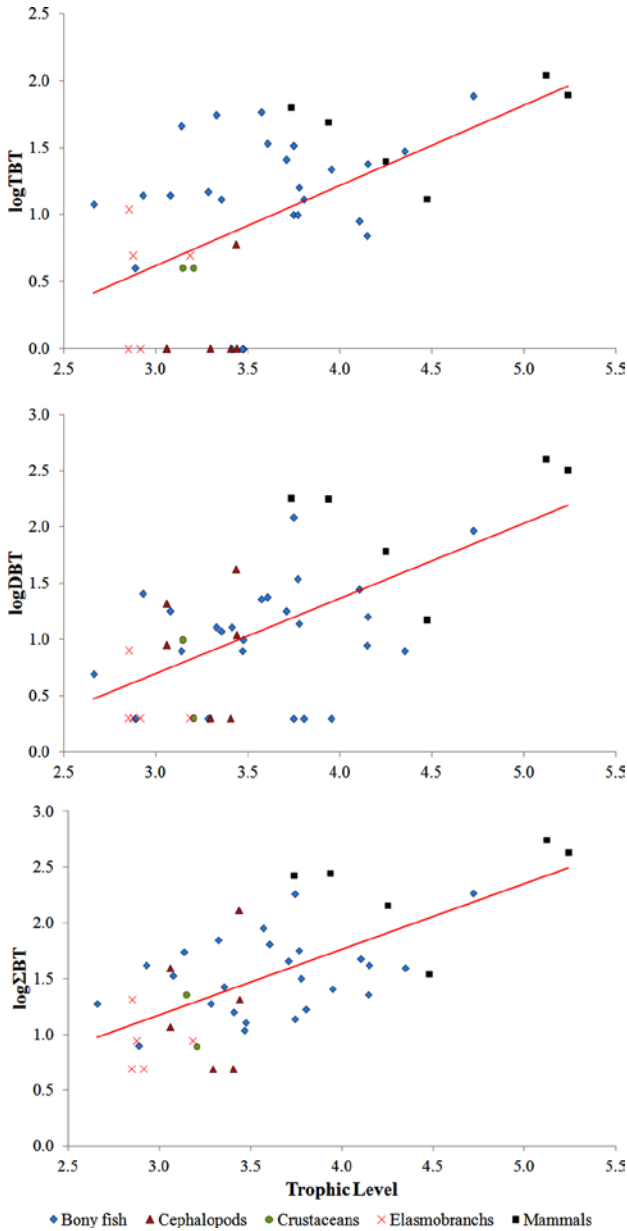


Figura 6.10: Correlazioni tra le concentrazioni dei composti organostannici (sommatoria composti butilstannici - ΣBT , tributilstagno - TBT e dibutilstagno - DBT) ed il livello trofico (LT), (da Fuortibuoni et al., 2013).

Al fine di esplorare al meglio le potenzialità offerte da questa tecnica risulta ora fondamentale ampliare quanto più possibile il data set isotopico

mediante analisi di quante più specie possibili, di diversa provenienza, considerando anche altri fattori che potenzialmente possono generare frazionamento isotopico e quindi variabilità dei valori di riferimento specie-specifica (classi di taglia, abitudini alimentari, metodi di pesca, metodi di conservazione).

Come output previsti e traggurabili si stima di arrivare alla determinazione di valori di riferimento per specie e zona di pesca tali da consentire la tracciabilità dell'origine del prodotto ittico. Ulteriori prove e verifiche vanno pianificate inoltre per la verifica della tracciabilità del metodo di pesca, oltre che dei metodi di conservazione. A tal fine si renderà necessario il reperimento di campioni di fauna ittica di accertata origine da sottoporre ad analisi per l'ampliamento del data set.

6.5 - Riferimenti bibliografici

Bearzi, G., Fortuna, C. M., Reeves, R. R., 2008. Ecology and conservation of common bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* in the Mediterranean Sea. *Mammal Rev.* 39, 92-123.

Bearzi, G., Holcer, D., Notarbartolo Di Sciara, G., 2004. The role of historical dolphin takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans. *Aquat. Conserv.* 14, 363-379.

Berto D., Boscolo Brusà R. (A cura di), 2015. I Composti Organostannici in ambiente marino e lagunare. ISPRA, QUADERNI – Ricerca Marina n. 8/2016, Roma, pp 117.

Berto, D., Giani, M., Boscolo, R., Covelli, S., Giovanardi, O., Massironi, M., Grassia, L., 2007. Organotin (TBT and DBT) in water, sediment and gastropods of the southern Venice lagoon (Italy). *Mar. Poll. Bull.* 55, 425-435.

Berto, D., Rampazzo, F., Noventa, S., Cacciatore, F., Gabellini, M., Aubry, F.B., Girolimetto, A., Boscolo Brusà, R., 2013. Stable carbon and nitrogen isotopes ratios as tools to evaluate the nature of particulate organic matter in the Venice lagoon. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 135, 66-76.

Borgå, K., Kidd, K. A., DC Muir, G., Berglund, O., Conder, J. M., APC Gobas, F., Kucklik, J., Malm, O., Powell, D. E., 2012 a. Trophic Magnification Factors: Considerations of ecology, ecosystems, and study design. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8 (1), 64-84.

Borgå, K., Fjeld, E., Kierkegard, A., McLachlan, M. S., 2012 b. Food web accumulation of cyclic siloxanes in Lake Mjøsa, Norway. *Environ. Sci. Technol.* 46 (11), 6347-6354.

Boscolo, R., Cacciatore, F., Berto, D., Marin, M. G., Giani, M., 2004. Contamination of natural and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the northern Adriatic Sea by tributyltin and dibutyltin compounds. *Appl. Organom. Chem.* 18, 614-618.

Buchheister, A., Latour, R. J., 2010. Turnover and fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in tissues of migratory coastal predator, summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 67, 445-461.

Camin, F., Bontempo, L., Perini, M., Piasentier M., 2016. Stable Isotope Ratio Analysis for assessing the Authenticity of Food of Animal Origin. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 868-877.

Coll, M., Santojanni, A., Palomera, I., Tudela, S., Arneri, E., 2007. An ecological model of the Northern and Central Adriatic Sea: Analysis of eco system structure and fishing impact. *J. Mar. Syst.* 67 (1 - 2), 119-154.

Darnuade A. M., Salen-Picard, C., Polunin, N.V.C., Harmelin-Vivien, M. L., 2004. Trophodynamic linkage between river runoff and coastal fishery yield elucidated by stable isotope data in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Oecologia* 138, 325-332.

Darnuade, A. M., 2005. Fish ecology and terrestrial carbon use in coastal areas: Implications for marine fish production. *J. Anim. Ecol.* 74, 864-876.

Domi, N., Bouquegneau, J. M., Das, K., 2005. Feeding ecology of five commercial shark species of the Celtic Sea through stable isotope and trace metal analysis. *Mar. Environ. Res.* 60, 551-569.

Fortibuoni, T., Noventa, S., Rampazzo, F., Gion, C., Formalewicz, M., Berto, D., Raicevich, S., 2013. Evidence of butyltin biomagnification along the Northern Adriatic Food-web (Mediterranean Sea) elucidated by stable isotope ratios. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3370-3377.

Franco, A., Franzoi, P., Malavasi, S., Riccato, F., Torricelli, P., Mainardi, D., 2006. Use of shallow water habitats by fish assemblages in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 66, 67-83.

Håstein, T., Hill, B.J., Berthe F., Lightner D.V., 2001. Traceability of aquatic animals. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris) 20 (2), 564-583.

Hoch, M., 2001. Organotin compounds in the environment – An overview. *Appl. Geochem.* 16, 719-743.

Hu, J., Zhen, H., Wan, Y., Gao, J., An, W., An, L., Jin, F., Jin, X., 2006. Trophic magnification of triphenyltin in a marine food web of Bohai bay, North China: Comparison to tributyltin. *Environ. Sci. Technol.* 40 (10), 3142-3147.

Jesus, F. M., Pereira, M. R., Sousa Rosa, C., Moreira M. Z., Sperber C. F., 2015. Preservation Methods Alter Carbon and Nitrogen Stable Isotope Values in Crickets (Orthoptera: Grylloidea) *PLoS One* | DOI:10.1371/journal.pone.0137650 .

Kannan, K., Senthilkumar, K., Loganathan, B. G., Takahashi, S., Odell, D. K., Tanabe, S., 1997. Elevated accumulation of tributyltin and its

breakdown products in Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found stranded along the U. S. Atlantic and Gulf Coasts. Environ. Sci. Technol. 31, 296-301.

Kannan, K., Tanabe, S., Iwata, H., Tatsukawa, R., 1995. Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. Environ. Poll. 90 (3), 279-290.

Kelly, J. F., 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. Can. J. Zool. 78, 1-27.

Lowe, C. G., Wetherbee, B. M., Crow, G. L., Tester, A. L., 1996. Ontogenetic dietary shifts and feeding behavior of the tiger shark, *Galeocerdo cuvier*, in Hawaiian waters. Environ. Biol. Fishes 47, 203-211.

Murai, R., Sugimoto, A., Tanabe, S., Takeuchi, I., 2008. Biomagnification profiles of tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) in Japanese coastal food webs elucidated by stable nitrogen isotope ratios. Chemosphere 73, 1749-1756.

Pinnegar, J. K., Polunin, N. V. C., 1999. Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: Implications for the study of trophic interactions. Function. Ecol. 13, 225-231.

Pranovi, F., Link, J. S., 2009. Ecosystem exploitation and trophodynamic indicators: A comparison between the Northern Adriatic Sea and Southern New England. Progress Oceanogr. 81, 149-164.

Strand, J., Jacobsen, J. A., 2005. Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. Sci. Total Environ. 350, 72-85.

Takai N, Mishima Y, Yorozu A, Hoshika A (2002) Carbon sources for demersal fish in the western Seto Inland Sea, Japan, examined by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analyses. Limnol. Oceanogr. 47:730-741

Vander Zanden, M. J., Cabana, G., Rasmussen, J. B., 1997. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) and literature dietary data. Can. J. Fish. Aquatic Sci. 54, 1142-1158.

Vander Zanden, M. J., Rasmussen, J. B., 1999. Primary consumer $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ and the trophic position of aquatic consumers. Ecology 80 (4), 1395-1404.

7. L'UTILIZZO DEGLI ISOTOPI STABILI DELL'AZOTO E DEL CARBONIO NELL'AMBITO DELL'IMPLEMENTAZIONE NAZIONALE DELLA DIRETTIVA QUADRO STRATEGIA MARINA (MSFD)

7.1 - Introduzione

L'analisi degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto può trovare un utilizzo pratico anche nell'ambito dell'implementazione di politiche per la protezione e conservazione dell'ambiente marino. È il caso della Direttiva Quadro sulla Strategia Marina (2008/56/CE; *Marine Strategy Framework Directive*; MSFD). Questa Direttiva ha lo scopo di conseguire il cosiddetto "Buono Stato Ambientale" per l'insieme delle acque territoriali dei paesi dell'Unione Europea entro il 2020. Per Buono Stato Ambientale si intende lo stato ambientale delle acque marine tale per cui queste preservano la diversità ecologica e la vitalità di mari, ed oceani che siano puliti, sani e produttivi" (MSFD, art. 3(5)).

Inoltre, per Buono Stato Ambientale si intende che le condizioni elencate di seguito siano raggiunte e mantenute:

- 1) l'utilizzo dell'ambiente marino sia sostenibile, salvaguardando in tal modo il potenziale per gli usi e le attività delle generazioni presenti e future;
- 2) gli ecosistemi siano pienamente funzionanti e mantengano la loro resilienza ad un cambiamento ambientale dovuto all'attività umana;
- 3) venga evitato il declino della biodiversità dovuto alle attività umane e venga salvaguardata la biodiversità;
- 4) le attività umane che introducono sostanze ed energia nell'ambiente marino non causino effetti inquinanti.

Il percorso di implementazione della Direttiva ha previsto, nel 2012, una prima Valutazione Iniziale dello stato marino, la definizione del Buono Stato Ambientale e degli indicatori associati, la definizione dei traguardi ambientali e dei piani di monitoraggio, e la definizione dei programmi di misura (per una sintesi dell'approccio complessivo applicato in Italia e del recepimento legislativo, si veda la Relazione sullo Stato dell'Ambiente 2016; MATTM, 2016).

L'implementazione della MSFD viene realizzata sulla base di 11 Descrittori qualitativi associati a una serie di criteri e indicatori, che sono stati definiti a livello europeo nell'ambito della Decisione della Commissione sui criteri e standard metodologici (2010/477/COM), che è stata recentemente integrata e rivista sulla base delle esperienze conseguite nella prima fase di implementazione della Direttiva (2017/848/COM).

Gli 11 Descrittori qualitativi sono riferiti a una serie componenti e proprietà emergenti degli ecosistemi o loro caratteristiche in termini di stato o di pressioni antropiche, quali ad esempio la biodiversità (D1), le specie aliene (D2), il prelievo selettivo di organismi marini (D3), le reti trofiche (D4) e i contaminanti presenti in specie ittiche e frutti di mare (D9). Ad essi sono associati diversi criteri e indicatori; questi ultimi devono essere popolati al fine della valutazione del Buono Stato Ambientale, andando a stabilire dei valori soglia che possano permettere di valutare se l'obiettivo sia stato raggiunto o meno.

In particolare, nell'ambito dei Descrittori relativi alla biodiversità e alle reti trofiche marine, sono presenti degli indicatori relativi al trend in termini di abbondanza e biomassa dei maggiori (o più significativi) gruppi funzionali, quali ad esempio le specie ad alta produttività o quelle ai vertici della rete trofica.

Proprio in questo contesto, ed in particolare per il Descrittore 4 relativo alle reti trofiche marine, l'utilizzo degli isotopi stabili può trovare una sua applicazione concreta, al fine della definizione di indicatori ecosistemici. In particolare tale strumento può fornire un rilevante supporto in riferimento alla definizione univoca dei gruppi funzionali (caratterizzazione del livello trofico delle specie e loro raggruppamento in gruppi trofici omogenei) ed alla valutazione del potenziale cambiamento nella dieta determinato da fattori ontogenetici (crescita).

7.2 - Piani di monitoraggio e analisi isotopiche

ISPRA, nell'ambito delle proprie funzioni di supporto tecnico scientifico al MATTM per l'implementazione dei piani di monitoraggio associati alla MSFD, ha sviluppato una proposta di architettura dei piani di monitoraggio che includeva anche lo sviluppo di indicatori ecosistemici mediante applicazione degli isotopi stabili dell'azoto e carbonio. Tale proposta, è stata successivamente recepita, integrata ed elaborata dai Gruppi di Lavoro stabiliti dal MATTM, portando alla definizione dei piani di monitoraggio la cui declinazione è stata successivamente esplicitata nel contesto dell'allegato II al D.M. dell'11 febbraio 2015 (Decreto Ministeriale, 2015).

Secondo il Piano di Monitoraggio relativo alla definizione dei gruppi funzionali (sottoprogramma 3.8) l'utilizzo degli isotopi stabili di azoto e carbonio sarà articolato in tre fasi:

- una prima fase conoscitiva "volta a definire i gruppi funzionali in base al livello trofico delle specie (...) a definire le taglie su cui effettuare le analisi isotopiche per alcune specie chiave e/o a colmare il gap conoscitivo sui livelli trofici (...)";

- una seconda fase che “prevede la vera e propria attività di monitoraggio con prelievo di tessuti per l’analisi degli isotopi stabili di carbonio ed azoto”;
- una terza fase che “dovrebbe prevedere la caratterizzazione delle specie bentoniche che svolgono un ruolo chiave nelle biocenosi presenti nei fondi strascicabili e del meso-macrozooplankton che agisce con un controllo top-down o bottom up (...) sulle comunità demersali e pelagiche”.

I risultati di queste analisi, oltre a colmare le lacune conoscitive relative ad aspetti trofici di alcune specie rilevanti dei mari italiani, concorrerà anche alle attività del sottoprogramma di monitoraggio 3.6 (Definizione, test ed applicazione indicatori ecosistemici). Questo mira “allo sviluppo di modelli/strumenti che contribuiscano al superamento di attuali gap di analisi/elaborazione, in particolare per la definizione del Buono Stato Ambientale (GES) e dei traguardi ambientali (target) di GES, e che concorrano a rendere operativi approcci di ecosistema”.

L’insieme delle attività di monitoraggio e ricerca menzionate, sulla base dell’applicazione degli isotopi stabili dell’azoto e del carbonio, dovrebbe quindi concorrere allo sviluppo complessivo di indicatori ecosistemici a livello nazionale. Ciò permetterà all’Italia di dotarsi di strumenti idonei nell’ambito della valutazione del Buono Stato Ambientale dei mari nazionali per le reti trofiche marine, un Descrittore per il quale è emersa livello comunitario la necessità di opportuni approfondimenti tecnico-scientifici per una implementazione adeguata.

7.3 - Riferimenti bibliografici

Decreto Ministeriale 2015. Decreto Ministeriale 11 Febbraio 2015 del Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Determinazione degli indicatori associati ai traguardi ambientali e dei programmi di monitoraggio, predisposto ai sensi degli articoli 10, comma 1 e 11, comma 1, del decreto legislativo n. 190/2010. (15AO1446) (GU Serie Generale n.50 del 02-03-2015)

EU-COM (2008). Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive).

EU-COM (2010). Commission Decision of 1 September 2010 on criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters (2010/477/EU).

EU-COM (2017). Commission Decision (EU) 2017/848 of 17 May 2017 laying down criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters and specifications and standardised methods for monitoring and assessment, and repealing Decision 2010/477/EU.

MATTM (2016). Relazione sullo stato dell'Ambiente anno 2016. La Strategia Marina, pp. 461-488. Disponibile al sito: www.minambiente.it/sites/default/files/archivio_immagini/Galletti/rsa_2016_170601_web_0.pdf

8. IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI POLIMERI PLASTICI

8.1 - Introduzione

La plastica è un polimero organico che si ottiene dalla lavorazione di materie prime di varia origine presenti in natura, soprattutto dal petrolio. Attraverso un processo chiamato "*cracking*" si ottiene la rottura delle catene delle molecole di idrocarburi, per poter creare gli elementi di base della plastica, i monomeri. Nel processo di polimerizzazione i monomeri vengono riaccorpati per formare delle lunghe catene che hanno ognuna differenti caratteristiche di base a seconda dei monomeri utilizzati. I vantaggi dei materiali plastici sono numerosi: elevata rigidità o grande flessibilità; impermeabilità, resistenza agli agenti atmosferici, muffe e funghi, resistenza alla corrosione; elevato isolamento acustico, termico, elettrico e dalle vibrazioni ed infine bassi costi.

La plastica è prodotta a ritmo di 300 milioni di tonnellate l'anno e proprio a causa di tali volumi, rappresenta tuttavia uno dei maggiori fattori di rischio del nostro pianeta e dei nostri mari.

Le maggiori fonti di rilascio dei rifiuti plastici nell'ecosistema marino ("Marine Litter") e il loro destino sono esemplificati in Figura 8.1.



Figura 8.1: Le maggiori fonti di rilascio dei rifiuti in mare e il loro destino negli ambienti costieri e marini (Illustrazione di Cinzia Piazza)

Nel solo Mar Mediterraneo galleggiano 500 tonnellate di rifiuti plastici, circa l'80% della spazzatura presente in mare (Figure 8.2, 8.3, 8.4, 8.5), rappresentando un serio problema per gli ecosistemi e per le specie

marine, oltre a creare enormi danni socio-economici alle comunità costiere.



*Figura 8.2: Rifiuti in materiale plastico sulla spiaggia di Boccasette (RO)
(foto di Tomaso Fortibuoni)*



*Figura 8.3: Groviglio di reti da pesca (ghost nets) a Torre Cerrano (PE)
(foto di Francesca Ronchi)*

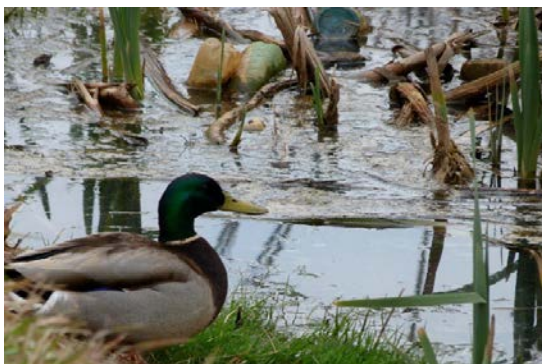


Figura 8.4: Inquinamento da plastica in ambiente di transizione (foto di Berto Daniela)



Figura 8.5: Inquinamento da plastica (foto di Bo Eide)

Gli impatti di tale contaminazione si ripercuotono infine anche sulla salute dell'uomo, in particolare quando i rifiuti plastici vengono degradati in frazioni microscopiche, le cosiddette "microplastiche", che hanno la capacità di entrare e bioaccumularsi nella catena alimentare. Le microplastiche sono quindi il problema maggiore legato alla contaminazione da polimeri di sintesi presente in mare. Le microplastiche sono micro-particelle di dimensioni inferiori ai 5 mm che si originano come prodotto della degradazione chimico-fisica e microbica della plastica e come sottoprodotto della lavorazione delle plastiche e di molte attività umane. I problemi legati a queste microparticelle sono dovuti alla loro presenza massiccia negli oceani e dal fatto che, oltre a contenere diversi additivi chimici di lavorazione, possono adsorbire e concentrare i contaminanti presenti nell'acqua (Figura 8.6) - in particolare quelli idrofobici come policlorobifenili, idrocarburi policiclici aromatici e pesticidi organo clorurati - che risultano altamente tossici per gli organismi e per l'uomo e possono potenzialmente causare effetti cronici come mutazioni genetiche, disfunzioni endocrine e possibili cancerogenesi (Berto et al. 2017 e autori citati).

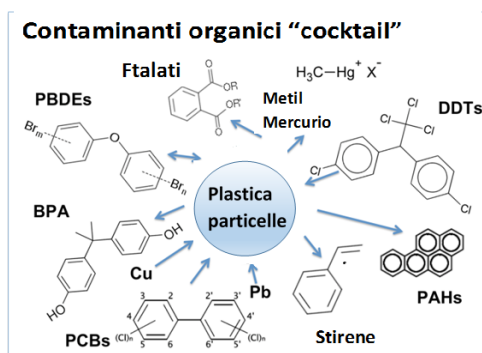


Figura 8.6: Contaminanti che possono adsorbirsi sulle micro-nano plastiche

Negli ultimi anni sono stati moltiplicati gli sforzi per sostituire la plastica derivata dal petrolio con materiali di origine vegetale (mais, riso, pomodoro, cotone, patata) e produrre quindi una "plastica" completamente biodegradabile. Le materie plastiche biodegradabili sono materiali che, grazie a microrganismi (batteri o funghi) e a fattori chimico-fisici (luce, calore) si decompongono dando come prodotti acqua, diossido di carbonio (CO₂) e alcuni biomateriali.

8.2 - Lo studio

La potenzialità dell'analisi degli isotopi stabili del carbonio come strumento per discriminare l'origine di plastiche derivate dal petrolio o di origine vegetale, anche considerando il loro potenziale utilizzo in materiali di imballaggio come buste per la spesa e bottiglie utilizzate per l'acqua minerale, è stata studiata da ISPRA con il supporto del progetto DEFISHGEAR (Derelict Fishing Gear Management System in the Adriatic Region). Nella Figura 8.7 si riporta la caratterizzazione isotopica ($\delta^{13}\text{C}$) di un grande numero di polimeri plastici di origine petrolifera e biologica, di quelli utilizzati per imballaggi di vario tipo e di possibili precursori naturali quali piante a meccanismo fotosintetico C3 e C4.

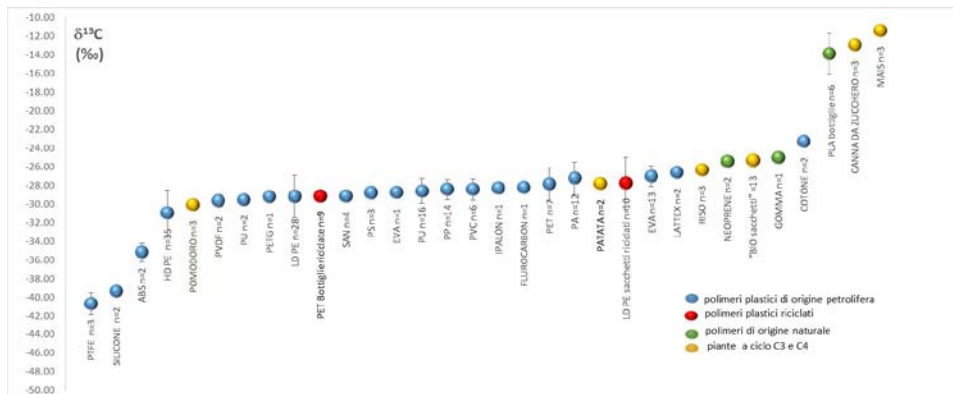


Figura 8.7 Caratterizzazione isotopica ($\delta^{13}\text{C}$) di un grande numero di polimeri plastici di origine petrolifera e biologica, di quelli utilizzati per imballaggi di vario tipo e di possibili precursori naturali quali piante a meccanismo fotosintetico C3 e C4

Questa ricerca ha presentato una panoramica preliminare dei valori isotopici del carbonio per differenti tipologie di polimeri plastici. I meccanismi di sintesi delle diverse plastiche non sembrano contribuire ad un frazionamento isotopico considerando le ridotte differenze dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ tra i maggiori gruppi di polimeri petrolio-derivati analizzati. I risultati ottenuti in questo studio dimostrano come l'analisi degli isotopi stabili del carbonio è un valido strumento per discriminare le plastiche derivate dal

petrolio rispetto a quelle sintetizzate da matrici naturali (Berto et al. 2017).

Considerando inoltre la mancanza di informazioni relative a metodologie analitiche in grado di valutare il tasso di degradazione di differenti tipi di plastiche in ambiente marino, in questo studio è stata testata la variazione del $\delta^{13}\text{C}$ in due tipologie di polimeri (sacchetti "BIO" e sacchetti in polietilene ad alta densità HD PE) (Figura 8.8).

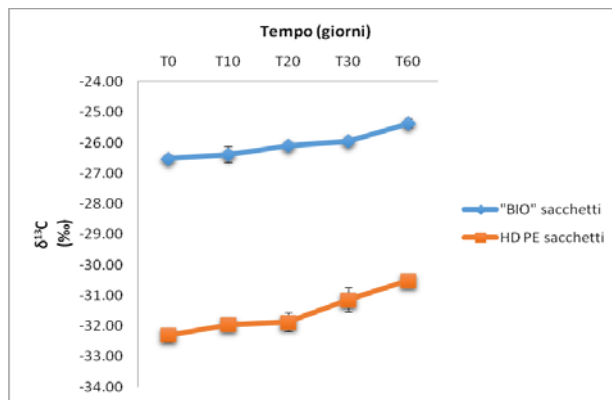


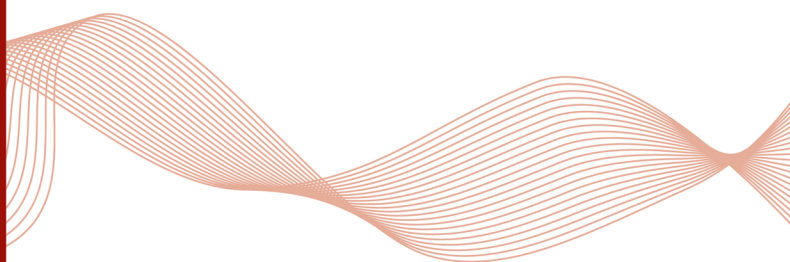
Figura 8.8: Variazione dei valori degli isotopi stabili del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) in due tipologie di polimeri (sacchetti "BIO" e sacchetti in polietilene ad alta densità HD PE) nel tempo

Lo spostamento verso valori meno negativi del $\delta^{13}\text{C}$ osservati a differenti tempi di esposizione in entrambe le matrici sembra suggerire che l'analisi isotopica del carbonio possa essere utilizzata come un valido tracciante della degradabilità delle plastiche in ambiente naturale, anche se non risulta semplice al momento stimare i tassi di degradazione ed i processi chimico-fisici e biologici che comportano tale frazionamento isotopico.

I vantaggi offerti dall'analisi isotopica rispetto ad altre tecniche analitiche utilizzate per la caratterizzazione ed il riconoscimento dei composti plastici (UV-VIS, microscopia ottica, microscopia elettronica, NIR, spettroscopia RAMAN, FT-IR) sono l'alta sensibilità, la rapidità dell'analisi, nessuna limitazione legata al colore del campione (fattore limitante per esempio nell'analisi spettroscopica) ed infine la ridotta quantità di materiale necessario per l'analisi. A tale riguardo si intravedono interessanti possibilità per future applicazioni riguardanti l'utilizzo di questa tecnica analitica per la caratterizzazione di microplastiche estratte da contenuti stomacali in organismi marini.

8.3 - Riferimenti bibliografici

Berto, D., Rampazzo, F., Gion, C., Noventa, S., Ronchi, F., Traldi, U., Giorgi, G., Cicero, A. M., Giovanardi, O., 2017. Preliminary study to characterize plastic polymers using elemental analyser/isotope ratio mass spectrometry (EA/IRMS). *Chemosphere*147, 47–56



QUADERNI

LABORATORIO
2/2018