

# Sviluppo di un metodo analitico per la determinazione del Carbonio Organico Totale in sedimenti marini e approccio isotopico per la validazione del dato





**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



Sistema Nazionale  
per la Protezione  
dell'Ambiente

# Sviluppo di un metodo analitico per la determinazione del Carbonio Organico Totale in sedimenti marini e approccio isotopico per la validazione del dato

**QUADERNI  
LABORATORIO**

**10 / 2026**

---

## **Informazioni legali**

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

Le persone che agiscono per conto dell'Istituto 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](http://www.isprambiente.gov.it)

ISPRA, Quaderni di Laboratorio 10/2026  
ISBN978-88-448-0358-2

Riproduzione autorizzata citando la fonte

## **Elaborazione grafica**

Grafica di copertina: Sonia Poponessi - ISPRA – Area Comunicazione Ufficio Grafica  
Foto di copertina: elaborazione grafica con Gemini IA

Se on line (solo questo):

Coordinamento pubblicazione online:

Area Comunicazione Ufficio Grafica

ISPRA – Area Comunicazione

---

## **Autori**

Federico Rampazzo (ISPRA BIO ACAM), Nicoletta Lezuo (Istituto Zooprofilattico delle tre Venezie, IZS), Claudia Gion (ISPRA BIO ACAM), Malgorzata Marcelina Formalewicz (ISPRA BIO ACAM), Sara Augusti (CNR-IAS), Umberto Traldi (IRMS Italia), Nicoletta Calace (ISPRA CN COS ODC; CNR-ISP), Patrolecco Luisa (CNR-ISP), Daniela Berto (ISPRA BIO ACAM; CN COS ODC; CNR-ISP).

## ***Ringraziamenti***

Si ringrazia il personale scientifico della campagna PER 24 e l'equipaggio della R/V "Gaia Blu" per la disponibilità ed il supporto alle attività scientifiche.

Un ringraziamento particolare al personale CNR-IRBIM, UNIVPM, FMC, UNIURB, ISPRA, CNR-ISMAR, CNR-ISP, UNIVE:

De Marco Rocco, Annibaldi Anna, Avanzato Gaspare, Coci Manuela, Cristallo Carla, Di Cola Alessandro, Evangelista Chiara, Falco Pierpaolo, Fanelli Matteo, Frapiccini Emanuela, Freddi Angela, Frontalini Fabrizio, Giuliani Silvia, Grilli Federica, Illuminati Silvia, Krauzig Naomi, Manini Elena, Massi Lorenzo, Minetti Loris Emanuele, Paris Eleonora, Penna Pierluigi, Pizzini Sarah, Prosciutti Giulia, Rebecchi Federica, Rossi Francesco, Tassetti Anna Nora, Zambrano Miller, Zangrando Roberta, Spagnoli Federico.

Un ringraziamento, inoltre, alla Dott. ssa Carmen Losasso dell'Istituto Zooprofilattico delle tre Venezie (IZS) per il supporto scientifico e logistico.

---

## Sommario

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introduzione</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Carbonio in matrice sedimentaria ambientale                                  | 1         |
| 1.2      | Carbonio organico totale e carbonio inorganico                               | 2         |
| 1.3      | Determinazione del carbonio organico   | 4         |
| 1.3.1    | Standard normativi e approcci analitici                                      | 4         |
| 1.3.2    | Metodi di caratterizzazione: qualitativi, semiquantitativi, quantitativi     | 5         |
| 1.4      | Metodi in uso  | 7         |
| 1.5      | Fondamenti della biogeochimica isotopica                                     | 8         |
| 1.5.1    | Biogeochimica isotopica del carbonio   | 10        |
| 1.6      | L'approccio integrato: analisi elementare e isotopica                        | 15        |
| <b>2</b> | <b>Materiali e metodi</b>  | <b>16</b> |
| 2.1      | Campioni di sedimento utilizzati per validazione del protocollo analitico    | 16        |
| 2.2      | Preparazione dei campioni di sedimento marino e protocollo di acidificazione | 17        |
| 2.3      | Strumentazione   | 19        |
| <b>3</b> | <b>Risultati e discussione</b>   | <b>22</b> |
| 3.1      | Caratterizzazione elementare dei materiali certificati PACS-1 e MESS-2       | 22        |
| 3.2      | Analisi isotopica dei materiali certificati PACS-1 e MESS-2                  | 25        |
| 3.3      | Caratterizzazione elementare di quattro campioni di sedimento                | 30        |
| 3.4      | Analisi isotopica dei quattro campioni di sedimento                          | 33        |
| <b>4</b> | <b>Caso studio: sedimenti del Sud Adriatico</b>                              | <b>37</b> |
| <b>5</b> | <b>Conclusioni</b>   | <b>45</b> |
| <b>6</b> | <b>Bibliografia</b>  | <b>47</b> |

---

---

## Prefazione

Il presente studio mira a ottimizzare un protocollo di acidificazione dei sedimenti marini per un'accurata determinazione del carbonio organico totale (TOC), superando i limiti intrinseci delle metodologie tradizionali quali la fumigazione o l'acidificazione sequenziale. Tali procedure risultano spesso inficiate da uno squilibrio analitico poiché una rimozione incompleta della frazione inorganica comporta un'inevitabile sovrastima del TOC, mentre un'acidificazione eccessivamente aggressiva rischia di degradare la componente organica più labile, il tutto aggravato da un'elevata manipolazione dei campioni che accresce il rischio di contaminazione.

Per ovviare a queste criticità, il nostro studio ha sviluppato un metodo di acidificazione diretta integrato all'analisi EA-IRMS (*Elemental Analyzer - Isotope Ratio Mass Spectrometry*), approccio che permette di affiancare alla quantificazione elementare l'analisi della composizione isotopica del carbonio. Il monitoraggio della firma isotopica consente di verificare con estrema sensibilità l'efficacia della decarbonatazione. La validazione e l'ottimizzazione del protocollo sono state articolate in due fasi sinergiche e complementari, iniziando dall'impiego di Materiali di Riferimento Certificati (CRM) necessari per valutare l'accuratezza e la precisione della procedura in oggetto. Parallelamente, l'ottimizzazione su matrici reali attraverso il test di quattro campioni di sedimento a differente tenore carbonatico ha permesso, variando in modo controllato concentrazione e volume di acido, di identificare il set-up ottimale capace di garantire la completa rimozione della frazione inorganica preservando integralmente la firma isotopica della frazione organica del campione.

L'importanza di perfezionare metodiche analitiche assume una rilevanza strategica nelle moderne politiche ambientali. Disporre di protocolli analitici standardizzati è fondamentale in un panorama normativo sempre più orientato alla transizione ecologica e al monitoraggio rigoroso degli ecosistemi, la capacità di fornire dati scientifici accurati permette ai decisori politici di basare le normative su solide evidenze scientifiche.

---

# 1 Introduzione

## 1.1 Carbonio in matrice sedimentaria ambientale

Il carbonio nei campioni ambientali (suoli, sedimenti o fanghi) è presente sotto forma di un'ampia varietà di composti: proteine, carboidrati, sostanze umiche e idrocarburi. La sostanza organica (OM - *Organic Matter*) è definita come l'insieme complesso di componenti organiche, sia viventi che non viventi, presenti nella matrice sedimentaria ambientale in differenti stadi di decomposizione. È una miscela complessa e dinamica derivante da residui vegetali e animali, biomassa microbica (batteri e funghi) e prodotti di sintesi come l'humus. La concentrazione di OM nella matrice sedimentaria è estremamente variabile a seconda dell'ambiente, passando da frazioni con percentuali trascurabili nei suoli desertici a concentrazioni molto elevate nelle torbiere.

Sotto il profilo chimico, la OM comprende sia molecole a basso peso molecolare, come amminoacidi, carboidrati, zuccheri semplici, acidi organici, sia macromolecole complesse ad alto peso molecolare, quali polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, lignine, lipidi e sostanze umiche.

Dal punto di vista ecologico, la OM non è solo la fonte principale di nutrienti per il sistema vegetale, ma rappresenta anche la più grande riserva terrestre di carbonio organico. Il turnover della OM è regolato dall'equilibrio dinamico tra processi di accumulo e trasformazione, mediati principalmente dall'attività biologica, che influenzano direttamente le proprietà chimico-fisiche della matrice sedimentaria ambientale:

- **decomposizione e mineralizzazione:** i microrganismi degradano i composti organici più labili, trasformandoli in nutrienti inorganici biodisponibili per le piante;
- **umificazione:** i residui organici subiscono processi di rielaborazione, sintesi e polimerizzazione che portano alla formazione dell'humus. Questa frazione tende ad essere stabile e conferisce al suolo proprietà fondamentali, aumentandone la capacità di ritenzione idrica e lo scambio cationico.

La OM migliora la struttura, la porosità e la permeabilità dei suoli/sedimenti e svolge un ruolo chiave nei cicli biogeochimici globali, in particolare in quelli dell'azoto e del carbonio, contribuendo alla struttura della matrice del campione ambientale [1].

Il carbonio organico non rimane confinato alla matrice terrestre (sedimento, suolo, ecc.), ma viene trasferito verso gli ambienti acquatici tramite processi di erosione e trasporto fluviale, alimentando il flusso di OM verso gli ambienti marini. La OM nei

---

sedimenti marini presenta sia frazioni di origine continentale, derivate dall'erosione e dal trasporto fluviale, sia contributi autoctoni, prodotti dalla biomassa marina.

I sedimenti marini agiscono quindi come un importante serbatoio di carbonio, definito come *sink* globale, conservandolo a lungo termine, e costituiscono un archivio ambientale di fondamentale importanza sotto molteplici aspetti:

- sequestro del carbonio e dei contaminanti: in condizioni di limitata ossigenazione e in presenza di rapido seppellimento, la degradazione della OM rallenta e il carbonio viene conservato nel sedimento che lo sottrae dal ciclo atmosferico. Inoltre, la OM presenta un'elevata affinità chimica verso gli inquinanti organici di origine antropica, quali idrocarburi policiclici aromatici – IPA – e inquinanti organici persistenti – POPs, che vengono quindi accumulati e immobilizzati negli strati sedimentari;
- tracciamento delle fonti terrestri e marine: la matrice sedimentaria registra e preserva le impronte biogeochimiche degli input alloctoni (continentali) e autoctoni (marini), che possono quindi essere tracciati. I primi sono veicolati dal trasporto fluviale ed eolico (minerali argillosi, pollini, residui vegetali), e riflettono le dinamiche climatiche e l'impatto antropico sul bacino; i secondi invece sono costituiti dai resti biogenici del fitoplancton e dello zooplancton e restituiscono informazioni sulla produttività primaria e sullo stato trofico della colonna d'acqua;
- monitoraggio ambientale: la deposizione sequenziale degli strati sedimentari consente una ricostruzione cronologica temporale delle pressioni ambientali. Il confronto tra i livelli superficiali più recenti e gli strati profondi preindustriali permette di stabilire i livelli di fondo naturali, consentendo di quantificare l'entità dell'impatto antropico e di valutare l'efficacia delle strategie di gestione ambientale.

## **1.2 Carbonio organico totale e carbonio inorganico**

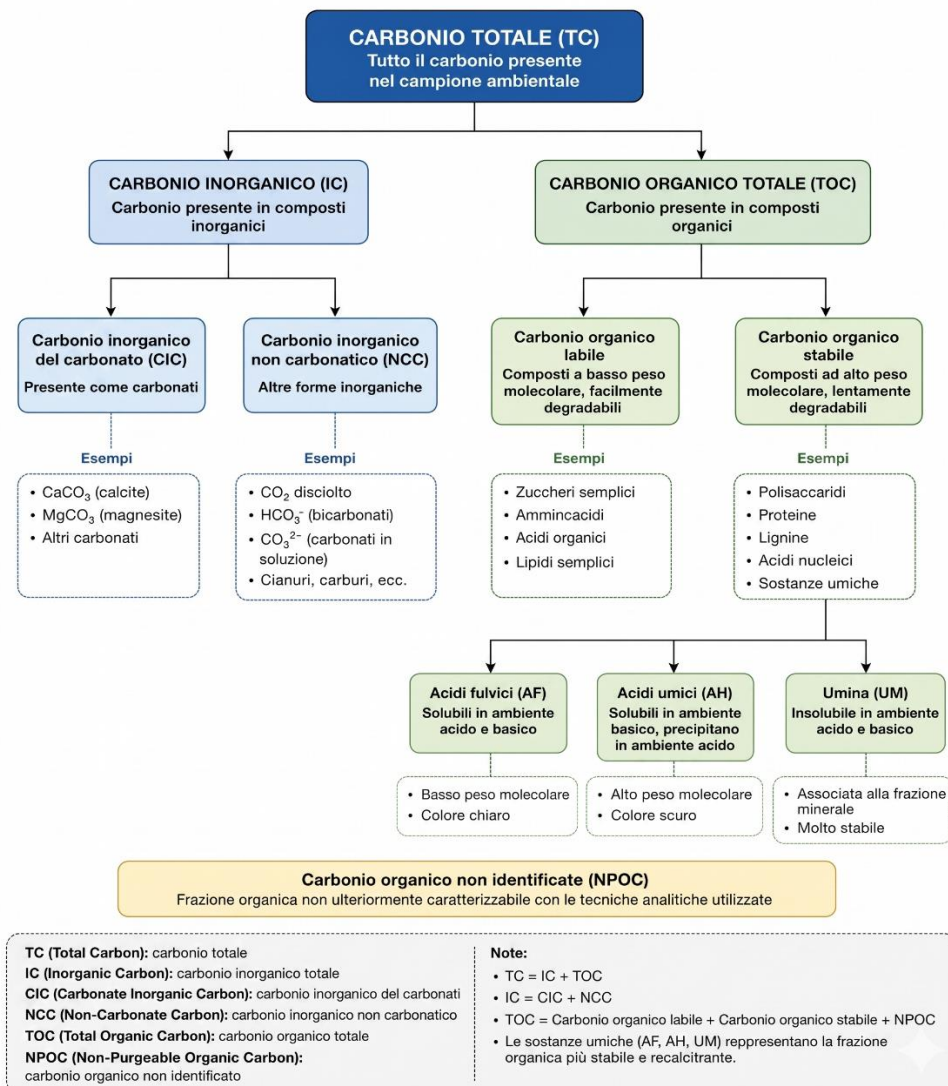
Il carbonio è il quarto elemento più diffuso nell'Universo dopo idrogeno, elio e ossigeno. Allo stato elementare, il carbonio si trova in diverse forme allotropiche, tra cui le più note in natura sono le strutture cristalline del diamante e della grafite. Nell'atmosfera terrestre è presente prevalentemente sotto forma di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), mentre nella crosta terrestre si trova stoccato nei depositi di carbonati, nel petrolio, nel gas naturale e nel carbone.

Il carbonio è l'elemento cardine della vita sulla Terra e, grazie alla sua capacità di formare catene molecolari stabili, costituisce lo scheletro di tutte le molecole organiche. Essendo un elemento biogeno, il carbonio è soggetto a continui processi

di trasformazione ciclica tra il comparto minerale e quello vivente, attraverso quello che viene definito "ciclo del carbonio".

Il carbonio presente nei suoli e nei sedimenti si trova in un'ampia varietà di composti, la cui classificazione richiede una rigorosa caratterizzazione. La distinzione tra le varie forme di carbonio si può osservare nel diagramma di flusso seguente (Fig. 1.1) che illustra le partizioni tra carbonio totale, organico e inorganico.

**Fig 1.1 – Diagramma di flusso delle principali forme di carbonio presenti nei suoli, sedimenti e fanghi ambientali**



---

Il carbonio totale (TC) è suddiviso in carbonio inorganico (IC) e carbonio organico totale (TOC).

Il carbonio inorganico comprende la frazione carbonatica (CIC), e non carbonatica (NCC). Il CIC, carbonio presente nei composti minerali, può essere liberato come CO<sub>2</sub> dopo trattamento del campione con un acido non ossidante. Nelle matrici solide, come ad esempio i sedimenti, esso è costituito prevalentemente da minerali carbonatici quali calcite (CaCO<sub>3</sub>) e dolomite (CaMg(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), che derivano dalle conchiglie di organismi marini o minerali erosi, e per tale motivo rappresenta un importante indicatore dei processi geologici e della produttività biologica passata.

Il TOC rappresenta il carbonio costituente la materia organica in ogni suo stadio di trasformazione, dalla biomassa vivente (piante, animali, microrganismi) ai residui nei diversi stadi di decomposizione. Analiticamente, esso comprende sia frazioni volatili, soggette a rapida degradazione, sia frazioni stabili, tra cui le sostanze umiche (acidi fulvici, acidi umici e umina). Il diagramma in figura 1.1. evidenzia la complessità e la diversità delle forme di carbonio presenti nei suoli, sedimenti e fanghi ambientali.

### 1.3 Determinazione del carbonio organico

La misura del TOC è fondamentale per molte applicazioni e studi di carattere ambientale. In campo pedologico è un indicatore della qualità del suolo, negli studi ambientali permette di comprendere le dinamiche di adsorbimento dei contaminanti organici e inorganici in termini di biodisponibilità. La quantità di TOC è anche importante per studiare il ciclo del carbonio, i suoi flussi nei sistemi acquatici e nello studio dei cambiamenti climatici [2].

#### 1.3.1 Standard normativi e approcci analitici

La determinazione analitica del TOC avviene attraverso l'uso di metodi strumentali rapidi, affidabili e riproducibili, regolati da normative internazionali, quali la UNI EN 13137 [3] e la UNI EN 15936 [4], che definiscono protocolli rigorosi rispettivamente per l'analisi dei campioni di sedimento ed il trattamento.

I due principali approcci metodologici basati sulla conversione di tutte le varie forme di carbonio in CO<sub>2</sub> sono i seguenti [2]:

- **metodo diretto**: consiste nella rimozione preventiva della frazione di IC tramite acidificazione (con liberazione di CO<sub>2</sub> volatile), e successiva misura diretta del TOC;
- **metodo indiretto** (per differenza): il TOC viene determinato dalla sottrazione del carbonio inorganico dal carbonio totale (TOC=TC-IC). Il TC si determina

---

per ossidazione di tutto il carbonio presente, mentre l'IC viene misurato nel gas di spurgo dopo trattamento acido o per decomposizione dopo l'eliminazione della componente organica.

Entrambi gli approcci sono validi, Il metodo diretto garantisce massima precisione e meno interferenze nella misura del TOC eliminando preventivamente il carbonio inorganico, ma comporta la perdita dei composti organici volatili (VOC), mentre quello indiretto presenta il vantaggio di riuscire a preservare i composti volatili evitando così reazioni secondarie, come le decarbossilazioni, che avvengono durante il trattamento con acido.

### 1.3.2 Metodi di caratterizzazione: qualitativi, semiquantitativi, quantitativi

Sono stati sviluppati numerosi protocolli qualitativi, semiquantitativi e quantitativi per la determinazione del TOC. La scelta della tecnica analitica più idonea è determinata dagli obiettivi della ricerca, bilanciando costi, tempi di analisi e accuratezza richiesta, considerando anche la sicurezza operativa, la produttività analitica (*throughput*) e la confrontabilità con i metodi di riferimento standard, la facilità d'uso [5].

#### 1.3.2.1 Metodi qualitativi

I metodi qualitativi consentono di identificare con precisione la tipologia di composti carboniosi presenti (ad esempio carboidrati, lignine, lipidi), fornendo informazioni sulla struttura molecolare della matrice. Tra questi si distinguono:

- **spettroscopia NMR** (*Nuclear Magnetic Resonance*): in particolare, la tecnica CPMAS (*Cross-Polarization Magic Angle Spinning*)  $^{13}\text{C}$  NMR, permette la caratterizzazione strutturale delle diverse forme di carbonio organico, discriminando la materia organica di recente formazione da quella di origine geologica senza la necessità di estrazione della stessa. Sebbene estremamente efficace, questa tecnica risulta onerosa in termini di costi e tempi di acquisizione [6] [7];
- **spettroscopia DRIFT** (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform*): è una tecnica di spettroscopia vibrazionale utilizzata per analizzare campioni solidi, in particolare polveri o materiali cristallini che accoppiata all'analisi multivariata, differenzia le frazioni inorganiche da quelle organiche, assegnando le principali bande di assorbimento IR alle vibrazioni caratteristiche dei legami molecolari [8].

---

### 1.3.2.2 Metodi semiquantitativi

Questi metodi si basano sulla rimozione di tutta la materia organica, seguita dalla determinazione gravimetrica della perdita di peso del campione. I due principali approcci sono i seguenti:

- **perdita per ignizione** (LOI - *Loss on Ignition*): comporta la distruzione termica di tutta la materia organica presente nel campione a temperature comprese tra 350 °C e 440 °C. La OM viene determinata per differenza di peso, previa correzione per il contenuto di umidità. È essenziale mantenere la temperatura al di sotto dei 440 °C per evitare la decomposizione dei carbonati inorganici. Una criticità del metodo è data dalla possibile deidrossilazione (perdita di acqua strutturale) dei minerali argillosi, che può portare ad una sovrastima del TOC. Per evitare questo è possibile trattare preventivamente il campione con acido per rimuovere la componente minerale della materia, anche se l'uso di alcuni acidi può causare la solubilizzazione di una parte della materia organica [9];
- **digestione con perossido di idrogeno** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): sfrutta l'ossidazione chimica della OM tramite l'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrato (30 % o 50 %). La reazione è accompagnata da effervescenza dovuta allo sviluppo di CO<sub>2</sub>. I limiti del metodo risiedono nell'ossidazione spesso incompleta delle frazioni organiche più recalcitranti e nella possibile perdita di composti volatili durante le fasi di pre-essiccamento.

Poiché questi metodi determinano la materia organica totale, il valore ottenuto deve essere convertito in TOC. Per i suoli si utilizza convenzionalmente un fattore di conversione pari a 1,724 (**fattore di Van Bemmelen**), basato sull'assunzione che la materia organica contenga il 58 % di carbonio organico. Tale fattore non è tuttavia universale: Broadbent, 1953 [10], ha raccomandato l'uso di un coefficiente di 1,9 per gli orizzonti più superficiali dei suoli e 2,5 per quelli più in profondità.

### 1.3.2.3 Metodi quantitativi

Le tecniche quantitative includono approcci distruttivi e non distruttivi del campione. Le tecniche non distruttive sono meno utilizzate poiché non misurano il carbonio quantificando direttamente, ma leggono un segnale fisico (luce o raggi X), che convertono poi in concentrazione. Esse necessitano quindi di essere sempre calibrate. Tra queste, quelle maggiormente utilizzate sono la Spettroscopia nel Vicino Infrarosso e Visibile (Vis-NIRS) e l'Imaging Iperspettrale (Hyperspectral Imaging - HSI).

Le tecniche distruttive prevedono invece solitamente un pretrattamento del campione seguito da:

- **ossidazione umida:** con titolazione redox con solfato ferroso ammonico  $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  o determinazione fotometrica con  $\text{Cr}^{3+}$ . Tale metodo presenta bassa selettività e può tendere alla sovrastima del dato di TOC [11] [12];
- **combustione a secco ad alta temperatura:** il campione viene combusto in eccesso di ossigeno e la  $\text{CO}_2$  liberata viene misurata strumentalmente [13].






Data la natura strettamente operativa della definizione di carbonio organico, emerge la necessità di poter disporre di metodi completamente strumentali, rapidi e privi di interferenze.

## 1.4 Metodi in uso

Le metodologie analitiche normalmente adottate nei laboratori di analisi, seguono protocolli nazionali e internazionali ufficialmente riconosciuti, al fine di garantire la riproducibilità e la confrontabilità dei dati.

La Figura 1.2 riassume le principali normative nazionali e internazionali impiegate per l'analisi del TOC in suoli, sedimenti, fanghi e rifiuti. Sono riportate le caratteristiche applicative delle norme UNI EN 13137:2002 [3], UNI EN 15936:2022 [4] e ISO 10694:1995 [14], insieme al Manuale Tecnico ICRAM-MATTM (2001) [15], riferimento metodologico italiano per le matrici marine e costiere.

**Fig 1.2 – Principali norme nazionali ed internazionali e linee guida per la determinazione del carbonio organico totale (TOC) nella matrice sedimentaria ambientale**

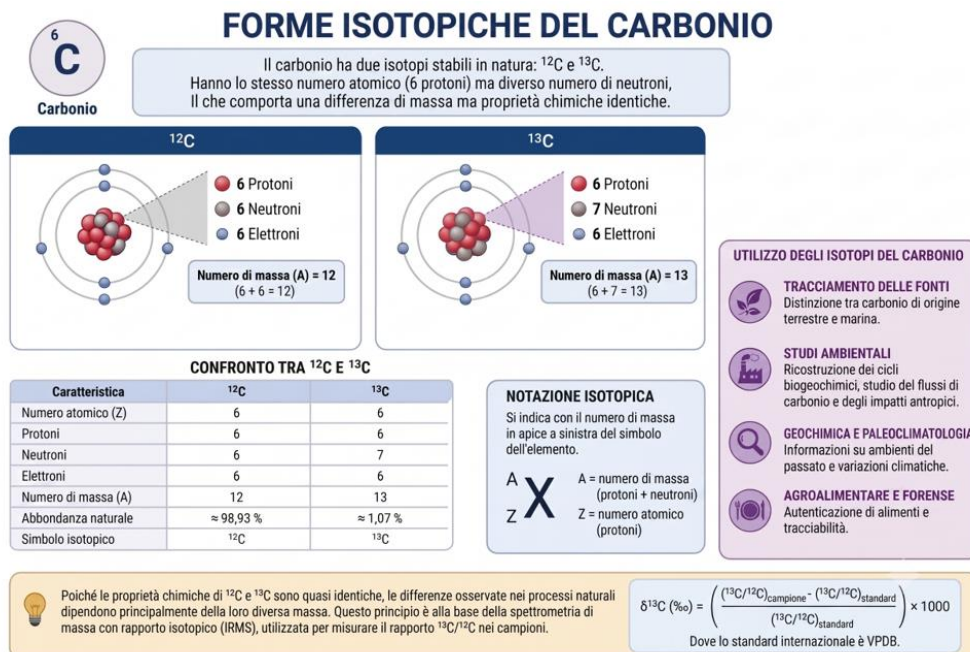
| NORME E LINEE GUIDA PER LA DETERMINAZIONE DEL CARBONIO ORGANICO TOTALE (TOC)  |  |   |
|---|--|---|
|    | <b>UNI EN 13137:2002</b><br>"Caratterizzazione dei rifiuti - Determinazione del carbonio organico totale (TOC) in rifiuti, fanghi e sedimenti"             | Questa norma specifica i metodi per la determinazione del TOC in campioni <b>non essiccati</b> con concentrazioni di carbonio superiori allo 0,1% (1 gr/kg di sostanza secca).  |
|    | <b>UNI EN 15936:2022</b><br>"Suolo, rifiuti, bio-rifiuti trattati e fanghi - Determinazione del carbonio organico totale (TOC) mediante combustione secca" | La norma rappresenta l' <b>evoluzione</b> della precedente, accorpando diverse matrici sotto un unico standard. È attualmente la <b>norma preferita</b> a livello europeo per la sua <b>versatilità</b> e per le <b>migliorie</b> apportate alla strumentazione e alle procedure di taratura. |
|    | <b>Manuale Tecnico ICRAM-MATTM (2001)</b><br>"Metodologie analitiche di riferimento", a cura di Cicero A.M. e Di Girolamo I.                               | Questo manuale rappresenta lo <b>standard italiano</b> per l'analisi delle <b>matrici marine e costiere</b> , fornendo linee guida specifiche per i sedimenti in ambito nazionale.  |
|    | <b>ISO 10694:1995</b><br>"Soil quality - Determination of organic and total carbon after dry combustion"   | La norma specifica il metodo di determinazione del TOC nel suolo mediante <b>combustione secca</b> , previa <b>rimozione o correzione dei carbonati</b> , applicabile a campioni essiccati all'aria.  |
|  TOC (Total Organic Carbon) = Carbonio Organico Totale |  |   |

## 1.5 Fondamenti della biogeochimica isotopica

Gli isotopi sono atomi di uno stesso elemento chimico che presentano lo stesso numero atomico (stesso numero di protoni ed elettroni), ma diverso numero di massa a causa di un diverso numero di neutroni nel nucleo. Tale variazione non altera le proprietà chimiche dell'elemento, ma ne modifica le proprietà fisiche e la massa atomica. In natura esistono circa 300 isotopi stabili e oltre 1200 isotopi instabili (radioattivi). Negli elementi leggeri (come idrogeno, carbonio, azoto e ossigeno), il rapporto tra neutroni e protoni è solitamente bilanciato e i loro isotopi sono detti "stabili", nel loro nucleo il rapporto tra neutroni e protoni si avvicina a uno. La formazione di isotopi pesanti è sfavorita dal punto di vista energetico ed essi sono perciò più rari e meno abbondanti. L'isotopo prevalente è in genere il più leggero, cioè quello con numero di massa minore. Nel caso del carbonio, l'isotopo  $^{12}\text{C}$  è nettamente più abbondante rispetto al pesante  $^{13}\text{C}$  [16].

La figura 1.3 illustra le caratteristiche strutturali e isotopiche dei due isotopi stabili del carbonio,  $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ , evidenziandone la differenza nel numero di neutroni e nella massa atomica. Sono inoltre riportate le rispettive abbondanze naturali, la notazione isotopica  $\delta^{13}\text{C}$  e i principali ambiti applicativi degli isotopi del carbonio negli studi ambientali, geochimici, paleoambientali e di tracciamento delle fonti di materia organica.

**Fig 1.3 – Rappresentazione delle principali forme isotopiche stabili del carbonio ( $\delta^{12}\text{C}$  e  $\delta^{13}\text{C}$ )**



---

Il rapporto isotopico  $\delta$ , tra gli isotopi stabili di un elemento, in particolare carbonio e azoto, è un parametro che viene utilizzato negli studi ambientali per tracciare l'origine della sostanza organica, ricostruire i processi biogeochimici, studiare la composizione delle reti trofiche, indagare il trasferimento di sostanza organica lungo le catene alimentari, studiare le fonti naturali o antropiche di sostanza organica, tracciare l'origine di prodotti agroalimentari.

Lo studio degli isotopi stabili spazia tra una moltitudine di discipline molto diverse e trova ampie applicazioni in svariati settori quali la geologia, la biologia, l'agricoltura, la medicina, l'archeologia e l'alimentazione. A differenza degli isotopi radioattivi, che decadono nel tempo, gli isotopi stabili permangono nel sistema, ma la loro distribuzione non è uniforme. Le variazioni nei rapporti isotopici all'interno di una matrice sono determinate dal frazionamento isotopico, ovvero l'insieme di processi fisico-chimici e biologici che portano alla redistribuzione differenziata degli isotopi pesanti e leggeri tra due fasi o tra reagenti e prodotti.

Un valore positivo di  $\delta$  indica che il campione è arricchito dell'isotopo pesante rispetto al materiale standard (Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) [17]; mentre un valore negativo sta a significare che il campione è impoverito dell'isotopo pesante [18].

Lo studio dei meccanismi che causano il frazionamento isotopico permette quindi di risalire ai processi che lo hanno generato.

In generale, le differenze di comportamento fisico e l'entità del frazionamento risultano più marcate negli elementi leggeri, a causa della maggiore differenza relativa di massa tra i loro isotopi. I principali fattori che guidano questa redistribuzione includono equilibri chimici e di fase, dinamiche cinetiche e, in misura significativa, l'attività biologica. In particolare, il frazionamento può essere di equilibrio o cinetico. Nel primo caso, tipico di scambi chimici reversibili, gli isotopi più pesanti tendono a concentrarsi nella fase più stabile. Nel secondo caso, tipico di processi biologici o fisici rapidi, gli isotopi leggeri reagiscono più velocemente, generando differenze isotopiche che riflettono i percorsi dinamici della materia [19].

Grazie all'approccio isotopico è possibile studiare l'origine dei fluidi terrestri, l'interazione tra geosfera e biosfera, comprendere la formazione dei minerali, analizzare l'origine dei meteoriti, studiare il ruolo dei processi biologici nella formazione e nell'alterazione delle rocce, ricostruire le variazioni climatiche nel corso del tempo, sia recenti che su scala geologica [20] [21] [22].

L'analisi degli isotopi stabili rappresenta oggi una tecnica consolidata ed estremamente efficace per tracciare il percorso degli elementi all'interno dei cicli biogeochimici globali. In particolare, l'impiego degli isotopi di carbonio e azoto è fondamentale per la comprensione delle dinamiche ecologiche marine e dei cicli dei

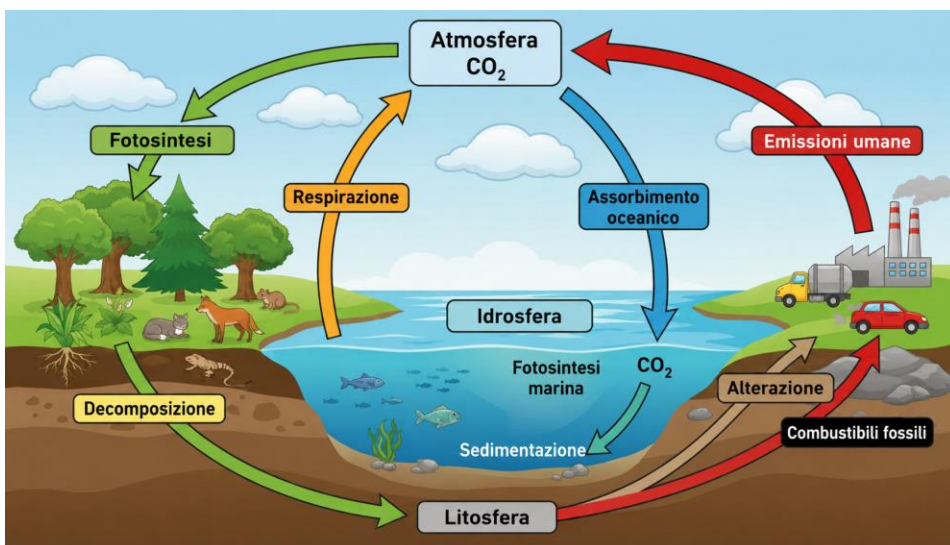
nutrienti. Queste analisi consentono di monitorare la produttività primaria algale, ricostruire le reti trofiche nelle comunità marine e studiare le variazioni stagionali dei flussi di nutrienti.

La quantificazione dei rapporti isotopici e la comprensione dei meccanismi di frazionamento permettono dunque di stabilire se composti chimicamente analoghi abbiano provenienze differenti, poiché la loro "impronta isotopica" riflette la storia del campione e i processi a cui è stato sottoposto. Grazie all'elevata precisione e accuratezza della spettrometria di massa a rapporto isotopico (EA-IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometry), queste variazioni possono essere misurate con rigore scientifico.

### 1.5.1 Biogeochimica isotopica del carbonio

Il carbonio terrestre è distribuito tra diversi serbatoi (*reservoirs*) interconnessi: l'atmosfera, dove è presente prevalentemente come  $\text{CO}_2$ ; l'idrosfera in cui si trova principalmente come carbonio inorganico disciolto ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ); la biosfera che comprende la materia organica vivente e detritica, e la litosfera che ne rappresenta il principale serbatoio a lungo termine, sotto forma di carbonati e combustibili fossili. Gli scambi tra queste riserve sono regolati da processi chimico-fisici e biologici che operano su scale temporali differenti e determinano specifiche impronte isotopiche dovute al frazionamento tra gli isotopi  $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ .

**Fig 1.4 – Ciclo biogeochimico del carbonio**



---

Il ciclo del carbonio si articola in una componente biologica a breve termine (da giorni a secoli) e in una componente geochimica a lungo termine. Il ciclo biologico comprende la fotosintesi clorofilliana, attraverso cui le piante terrestri e gli organismi fotosintetici acquatici fissano la CO<sub>2</sub> atmosferica o disciolta convertendola in materia organica, e la respirazione aerobica, processo che comporta la riossidazione della OM e il rilascio di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera.

Il ciclo geochimico, invece, si sviluppa su una scala temporale dell'ordine di milioni di anni. L'alterazione chimica dei silicati e dei carbonati continentali comporta il consumo di CO<sub>2</sub> atmosferica e il trasferimento di bicarbonato e ioni calcio verso gli oceani tramite il dilavamento fluviale. In ambiente marino, la precipitazione dei carbonati (principalmente sotto forma di CaCO<sub>3</sub>) consente il sequestro del carbonio inorganico nel serbatoio sedimentario. Parallelamente, una frazione della materia organica prodotta dalla decomposizione di organismi viventi si accumula negli strati della litosfera e viene sepolta nei sedimenti, contribuendo alla formazione di depositi di carbone, petrolio e gas naturale. Grazie all'alterazione chimica e fisica delle rocce terrestri il carbonio immagazzinato viene nuovamente rilasciato e rientra in circolo verso gli oceani.

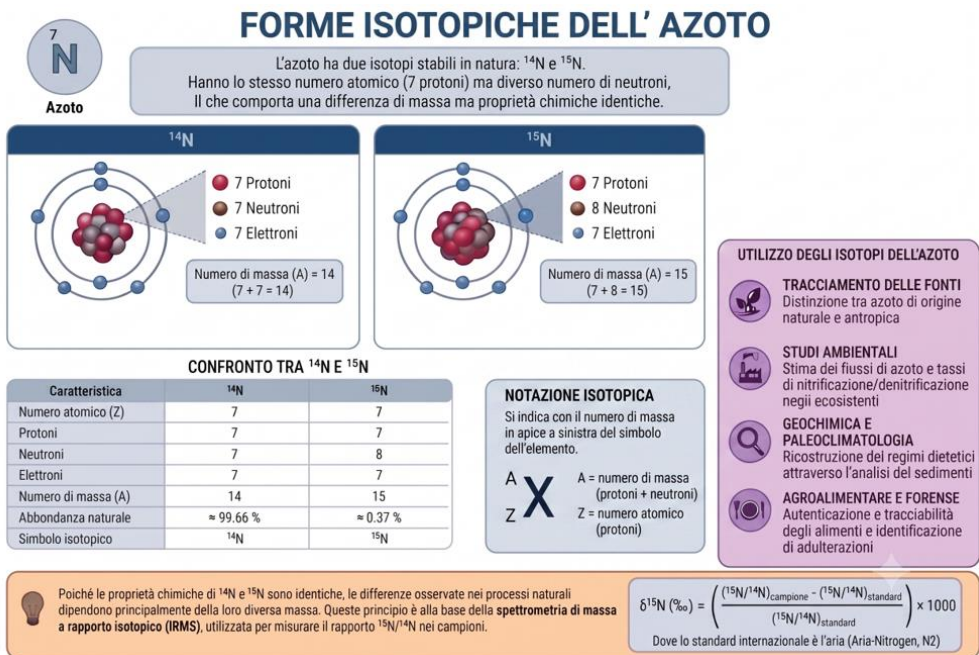
L'attività antropica, in particolare la combustione dei combustibili fossili e l'uso intensivo del suolo, ha significativamente influenzato questo equilibrio naturale, incrementando in modo significativo le concentrazioni atmosferiche di CO<sub>2</sub> e alterando i flussi tra i diversi serbatoi.

Le reazioni di equilibrio che coinvolgono la CO<sub>2</sub> atmosferica, il bicarbonato disciolto e la precipitazione dei carbonati disciolti, favoriscono generalmente l'arricchimento dell'isotopo pesante <sup>13</sup>C. Il carbonio inorganico disciolto (DIC) marino presenta un valore di δ<sup>13</sup>C prossimo allo 0 ‰, mentre nelle acque dolci e sotterranee questo valore diventa più negativo perché è influenzato dall'apporto di CO<sub>2</sub> biogenica del suolo, variando tipicamente tra -10 ‰ e -13 ‰ [23]. La formazione della sostanza organica è dominata dalla fotosintesi, un processo di frazionamento cinetico che favorisce l'isotopo leggero <sup>12</sup>C. Di conseguenza, la OM prodotta risulta impoverita in <sup>13</sup>C rispetto alla sorgente inorganica, con valori medi di δ<sup>13</sup>C intorno al -25 ‰ per le piante terrestri. Alghe e batteri acquatici utilizzano la CO<sub>2</sub> disciolta e mostrano spesso un frazionamento meno marcato rispetto ai vegetali terrestri. I combustibili fossili conservano firme isotopiche fortemente negative poiché derivano da materia organica antica [24] [25].

## Biogeochimica isotopica dell'azoto

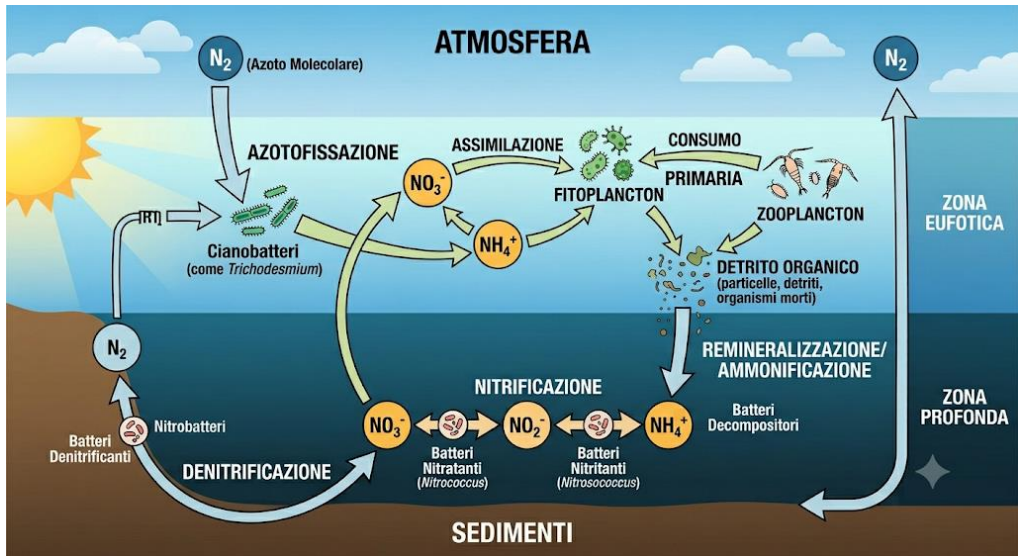
Sebbene il presente volume sia focalizzato sulla geochimica del carbonio, l'applicazione di queste tecniche nei contesti ambientali si avvale quasi sistematicamente di un approccio multi-isotopico che accoppia il carbonio all'azoto. Pertanto, pur esulando parzialmente dall'oggetto principale del testo, si propone in questo spazio un breve approfondimento dedicato ai principi fondamentali degli isotopi stabili dell'azoto, data la loro complementarità interpretativa.

**Fig 1.5 – Rappresentazione delle principali forme isotopiche stabili dell'azoto ( $\delta^{14}\text{N}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ).**



L'azoto è l'elemento predominante dell'atmosfera e funge da standard internazionale di riferimento per l'analisi isotopica, con un valore di  $\delta^{15}\text{N}$  pari a 0 ‰. Tuttavia, la maggior parte degli organismi può assimilare l'azoto solo previa conversione nelle forme reattive, quali ioni ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ), ioni nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e ioni nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), attraverso il ciclo biogeochimico mediato da microrganismi [26].

Fig 1.6 – Ciclo biogeochimico dell'azoto in ambiente marino



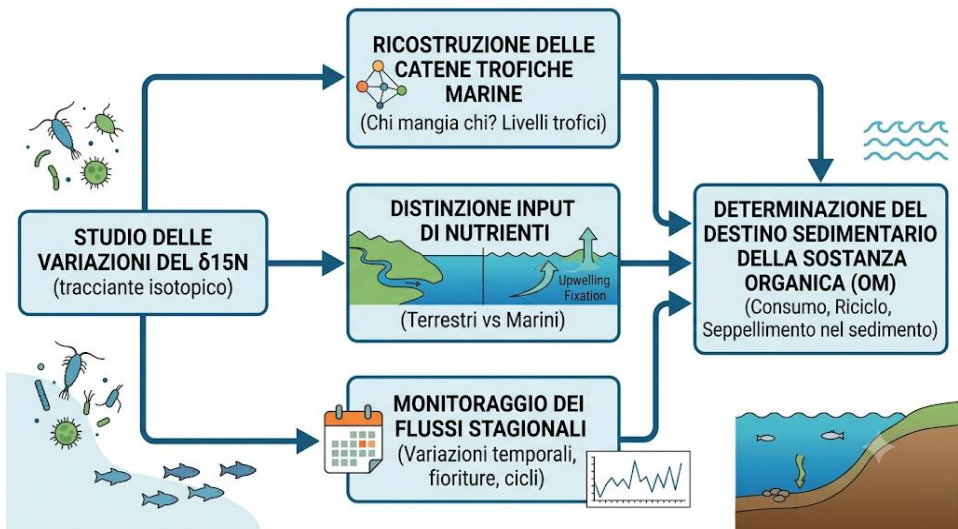
Le dinamiche isotopiche dell'azoto sono guidate da una serie di trasformazioni biochimiche, ognuna caratterizzata da un proprio grado di frazionamento. Nella fissazione dell'azoto, i microrganismi specializzati convertono l' $N_2$  atmosferico in ammonio o ammoniaca, rendendo l'azoto biologicamente disponibile. La maggior parte del processo viene svolto da microrganismi, soprattutto terrestri, ma può avvenire anche per via inorganica (scariche elettriche atmosferiche) o tramite processi di tipo industriale per la produzione di fertilizzanti ad uso agricolo. Anche l'azoto organico contenuto nella biomassa viene mineralizzato mediante il processo di ammonificazione, durante il quale la materia organica complessa viene degradata a composti monomerici più semplici e l'azoto organico viene convertito in  $NH_4^+$ . L'ammonio, in condizioni ossidanti viene trasformato in nitriti e nitrati tramite la reazione di nitrificazione, sempre mediata da microrganismi. Il nitrato costituisce una delle principali forme di azoto assimilabili dalle piante e dal fitoplancton. In ambienti a bassa disponibilità di ossigeno, il nitrato viene ridotto (denitrificazione) con formazione di composti gassosi quali azoto molecolare ( $N_2$ ), ossido di azoto ( $NO$ ) e biossido di azoto ( $NO_2$ ) che tornano in atmosfera tramite processi di volatilizzazione.

In generale tutte le reazioni enzimatiche prediligono l'utilizzo dell'isotopo leggero  $^{14}N$  e come conseguenza il substrato residuo subisce un progressivo arricchimento

in  $^{15}\text{N}$ , portando il rapporto isotopico  $\delta^{15}\text{N}$  a raggiungere valori elevati, fino anche a +30 ‰.

Ecco, quindi, che lo studio delle variazioni del  $\delta^{15}\text{N}$  costituisce uno strumento essenziale per ricostruire le catene trofiche marine, distinguere gli input di nutrienti (terrestri vs marini) e monitorare i flussi stagionali, determinando il destino sedimentario della OM.

**Fig 1.7 – Potenzialità del rapporto isotopico  $\delta^{15}\text{N}$  per gli studi in ambiente marino**



---

## 1.6 L'approccio integrato: analisi elementare e isotopica

Per comprendere in modo approfondito i processi che regolano la presenza, l'accumulo e la trasformazione della OM nei sedimenti, è fondamentale adottare un approccio integrato, che combini analisi elementare e isotopica.

La caratterizzazione elementare fornisce informazioni quantitative sulle concentrazioni di TOC presenti nei campioni ambientali. Questo parametro consente di valutare la disponibilità e la capacità del sedimento di adsorbire e immobilizzare contaminanti, come metalli pesanti e composti organici persistenti.

L'analisi isotopica ed elementare integrata, attraverso lo studio della distribuzione degli isotopi stabili, fornisce informazioni sulla provenienza della OM (terrestre vs. marina, autoctona vs. alloctona) e sui processi di trasformazione subiti durante il trasporto e la deposizione. In particolare, il valore di  $\delta^{13}\text{C}$  rappresenta un utile parametro diagnostico per verificare la completa eliminazione della frazione inorganica durante il pretrattamento di acidificazione dei campioni. Poiché i carbonati presentano una firma isotopica marcatamente più pesante rispetto alla materia organica, una loro rimozione incompleta sposta il segnale complessivo verso valori meno negativi. Monitorare il raggiungimento di un valore stabilmente negativo assicura che il segnale isotopico misurato sia attribuibile esclusivamente alla componente organica, garantendo così l'affidabilità delle determinazioni analitiche.

Grazie alla comprensione del frazionamento isotopico, è possibile distinguere tra frazioni di OM più labili e componenti più refrattarie, identificare segnali di attività biologica o chimica, e ricostruire la dinamica dei cicli del carbonio nel tempo.

La combinazione di dati elementari e isotopici consente quindi di ottenere un quadro sia quantitativo che qualitativo, descrivendo non solo la quantità di carbonio presente nei sedimenti, ma anche la sua origine, l'evoluzione e il ruolo nei processi biogeochimici.

---

## 2 Materiali e metodi

### 2.1 Campioni di sedimento utilizzati per validazione del protocollo analitico

In questo studio sono stati analizzati i seguenti materiali di riferimento certificati (CRM) PACS-1 e MESS-2 (National Research Council Canada, NRC) ampiamente utilizzati in ambito geochimico e ambientale per il controllo della qualità analitica, della validazione dei metodi e della verifica dell'accuratezza delle determinazioni sulla matrice sedimentaria marina. Tali materiali consentono inoltre di garantire la confrontabilità dei risultati tra diversi laboratori e nel tempo. Il valore del PACS-1 riportato è stato modificato, rispetto a quello certificato in seguito a dati sperimentali e bibliografici.

Il PACS-1 è un sedimento marino fortemente influenzato da contaminazione antropica, mentre il MESS-2 rappresenta un sedimento marino di riferimento con livelli di contaminazione più vicini a condizioni naturali. Entrambi contengono valori certificati per numerosi elementi maggiori e in traccia e per il carbonio totale (Tab 2.1).

**Tab 2.1 – Materiali di riferimento utilizzati con relativi valori di carbonio totale (TC)**

| CAMPIONE | TC (%) certificato | Riferimento bibliografico |
|----------|--------------------|---------------------------|
| PACS-1   | 3,59 ± 0,11        | NRC, 1999 [27]            |
| MESS-2   | 2,14 ± 0,03        | NRC, 2007 [28]            |

Sono stati analizzati per valutare la validazione della metodica analitica anche sedimenti caratterizzati da differente contenuto in carbonati, provenienti da ambienti marini e di transizione soggetti a diversi livelli di impatto antropico, tra i quali sedimenti provenienti da una piattaforma di estrazione di gas metano, da un ambiente lagunare, e un sedimento marino costiero ed uno marino offshore. I campioni derivano da attività di monitoraggio e ricerca condotte da ISPRA nel periodo 2014–2023.

In particolare:

SED\_1: sedimento superficiale proveniente dal Mar Ionio, prelevato nel 2022 e conservato liofilizzato;

SED\_2: sedimento superficiale prelevato nella laguna di Venezia, ambiente di transizione fortemente influenzato da attività antropiche, prelevato nel 2023 e conservato liofilizzato;

SED\_3: sedimento superficiale raccolto alla profondità di circa 50 m in prossimità di una piattaforma per l'estrazione di gas metano nel Mare Adriatico, prelevato nel 2016 e conservato liofilizzato;

SED\_4: sedimento derivante da una carota marina prelevata a una batimetria compresa tra 100 e 120 m lungo la costa della Sardegna nell'area del Sulcis, rappresentativa di un ambiente offshore, prelevato nel 2014 e conservato liofilizzato.

**Tab 2.2 – Sedimenti utilizzati nello sviluppo del protocollo analitico**

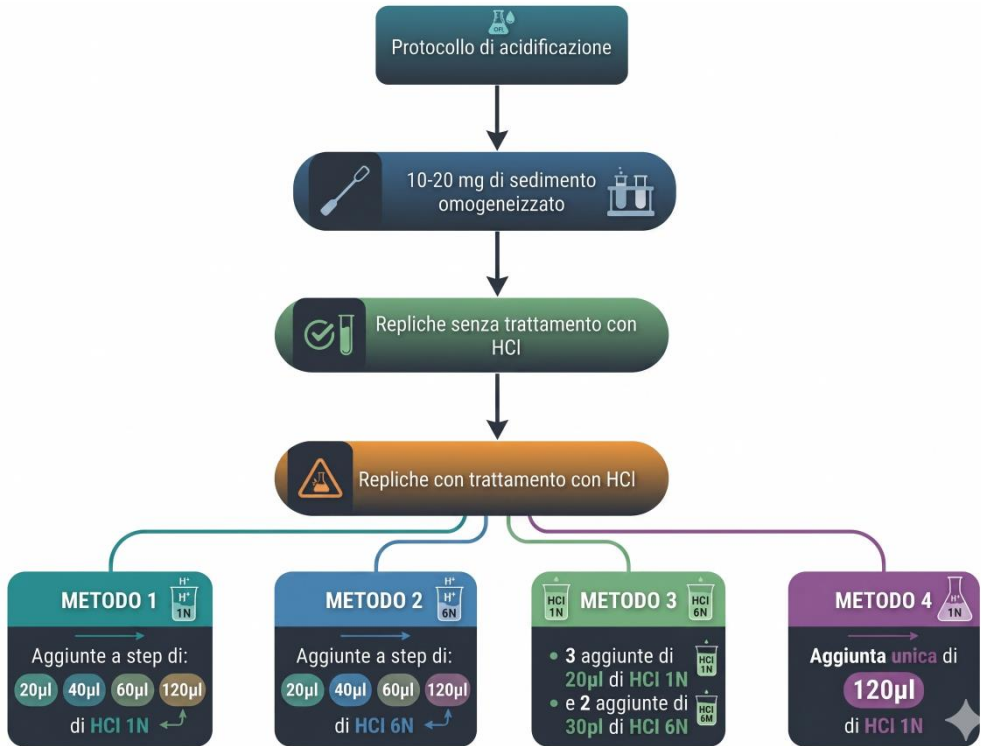
| Campione | Area                         | Anno prelievo |
|----------|------------------------------|---------------|
| SED_1    | Mar Ionio                    | 2022          |
| SED_2    | Laguna di Venezia            | 2023          |
| SED_3    | Mare Adriatico – piattaforma | 2016          |
| SED_4    | Sardegna - Sulcis            | 2014          |

## **2.2 Preparazione dei campioni di sedimento marino e protocollo di acidificazione**

Ogni campione di sedimento marino è stato liofilizzato e poi omogeneizzato in un mulino di macinazione a sfere. I campioni per la determinazione di carbonio e azoto totale sono stati pesati (10-20 mg) con una bilancia microanalitica in capsule di stagno (5 x 9 mm). Per l'analisi del carbonio organico i campioni sono stati pesati (10-20 mg) in capsule di argento (5 x 9 mm) e sono stati acidificati con acido cloridrico (HCl) a diverse concentrazioni. Di ogni campione sono state eseguite 5 repliche per la misura di carbonio e azoto totale e 5 repliche per i diversi trattamenti di acidificazione per eliminare la componente carbonatica.

Il protocollo di acidificazione è stato eseguito mediante diverse aggiunte di HCl a diversa concentrazione (1N e 6N). Dopo ogni singola aggiunta di acido i campioni sono stati messi ad essiccare in stufa a 60°C prima di procedere con l'analisi strumentale. Sono state studiate quattro diverse modalità di acidificazione, descritte in sintesi nel diagramma sottostante (Fig. 2.1). Nei primi due metodi sono state eseguite aggiunte di 20 µl ciascuna, in successione di HCl 1N e HCl 6N rispettivamente; nel terzo metodo è stato usato un approccio misto con tre aggiunte di 20 µl di HCl 1N e due aggiunte finali di 30 µl di HCl 6N; infine, nell'ultimo metodo si è provato con un'unica aggiunta di 120 µl di HCl 1N.

**Fig 2.1 – Schema riassuntivo del protocollo**



## 2.3 Strumentazione

La strumentazione utilizzata è stata la seguente:

- mulino di macinazione a sfere (SH-6, Yooning), con appositi spazi per inserire le provette con il campione. La macinazione consiste in due cicli da 20 secondi ad una velocità di 2450 rpm (Fig 2.2);
- bilancia microanalitica (Micro M2P, Sartorius): sensibilità 0.001 mg (Fig 2.2);
- spettrometro di massa isotopica (IRMS Delta V Advantage, Thermo Scientific) accoppiato con un analizzatore elementare-EA (CHN Flash 2000, Thermo Scientific) (Fig. 2.3).

**Fig 2.2 – A sinistra il mulino di macinazione a sfere. A destra la bilancia microanalitica**



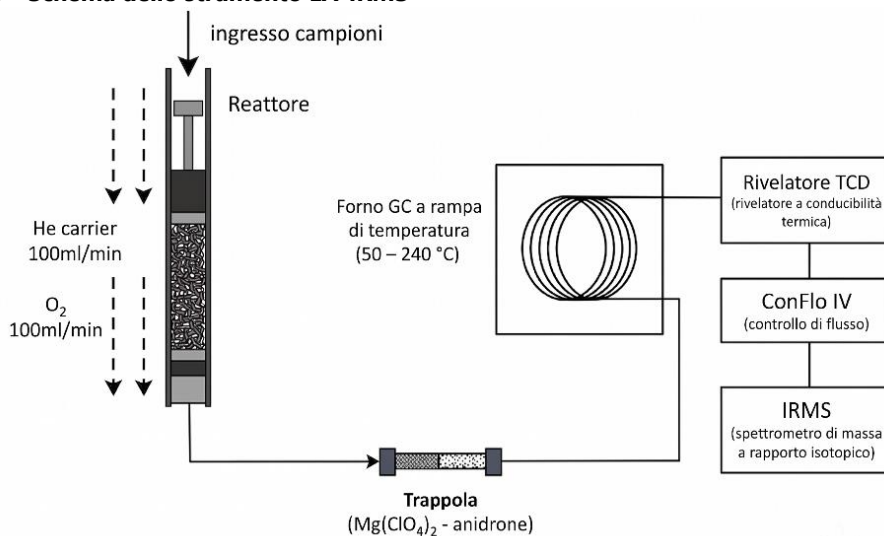
**Fig 2.3 – Strumentazione EA-IRMS: a sinistra Delta V Isotope Ratio Mass Spectrometer; a destra l'analizzatore elementare CHN Flash 2000**



I campioni prepesati nelle capsule vengono introdotti tramite un autocampionatore all'interno dell'analizzatore elementare CHN Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific). Al suo interno è presente una colonna in quarzo (reattore) che viene preparata con ossido di rame e rame metallico separati da lana di vetro, che opera ad una temperatura di 900 °C. Il campione in ingresso viene trasportato con un flusso di 100 ml/min di gas carrier, l'elio, e subisce reazioni di ossidoriduzione quando incontra un flusso di ossigeno a 100 ml/min. Il rame nella colonna serve da catalizzatore per queste reazioni e come trappola per gli alogeni eventualmente presenti nel campione. Durante la combustione, gli elementi del campione vengono convertiti nei loro gas stabili quali CO<sub>2</sub> per il carbonio e N<sub>2</sub> molecolare per l'azoto. Questi gas prodotti vengono fatti passare attraverso una trappola costituita da magnesio perclorato anidro granulare (Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> - anidrone), che elimina l'umidità in eccesso, e poi indirizzati verso la colonna gascromatografica che li separa. La quantificazione degli elementi avviene tramite il rivelatore a conducibilità termica (TCD) posto in uscita dalla colonna gascromatografica, i gas, infine, vengono indirizzati verso lo spettrometro di massa isotopica per la determinazione dei rapporti isotopici. Lo spettrometro di massa presenta un separatore magnetico e un sistema di rilevazione con triplo collettore.

Lo schema completo dello strumento è mostrato nella figura seguente (Fig 2.4).

**Fig 2.4 – Schema dello strumento EA-IRMS**



Lo strumento viene calibrato quotidianamente con uno standard esterno a peso noto, l'acetanilide (C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>ON, composizione elementare: 71,09 % di carbonio e 10,36 % di azoto) per l'analisi elementare. Vengono poi misurati i segnali delle capsule vuote, sia di stagno che di argento, considerati come bianco al fine di sottrarre il loro contributo

dai valori di carbonio e azoto sui campioni successivi. Vengono effettuate anche delle misure di controllo su sedimenti marini di riferimento, il PACS-1 e il MESS-2, certificati dal *Canadian National Research Council*, che permettono di stabilire l'accuratezza dell'analisi. Nella determinazione dei rapporti isotopici, ogni 10-15 campioni analizzati si effettuano anche delle misure di controllo su materiali standard di riferimento isotopicamente marcati, quali l'acido L-glutammico, la glicina, la caffeina, l'urea, l'acetanilide (i valori di riferimento sono riportati in Tab 2.3).

**Tab 2.3 – Materiali certificati di riferimento e valori di  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) e  $\delta^{15}\text{N}$  (‰), deviazione standard**

| Materiali certificati di riferimento                              | $\delta^{13}\text{C}$ (‰) | $\delta^{15}\text{N}$ (‰) |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Acido L-glutammico (USGS40)                                       | $-26.388 \pm 0.07$        | $-4.52 \pm 0.1$           |
| Glicina-2 (USGS65)  | $-20.29 \pm 0.04$         | $20.68 \pm 0.06$          |
| Urea (IVA Analysentechnik 33802174)                               | $-37.32 \pm 0.04$         | $-0.45 \pm 0.2$           |
| Caffeina-1 (USGS61)   | $-35.05 \pm 0.04$         | $-2.87 \pm 0.04$          |
| Acetanilide-1 (Indiana University Stable Isotope Laboratory, USA) | $-29.53 \pm 0.01$         | $1.18 \pm 0.02$           |

Le concentrazioni degli elementi vengono espresse in percentuale sul peso secco, mentre i rispettivi rapporti isotopici vengono espressi come deviazione per mille dagli standard internazionali di riferimento.

La precisione analitica della misura è 0.2 % per il carbonio e 0.5 % per l'azoto [29].

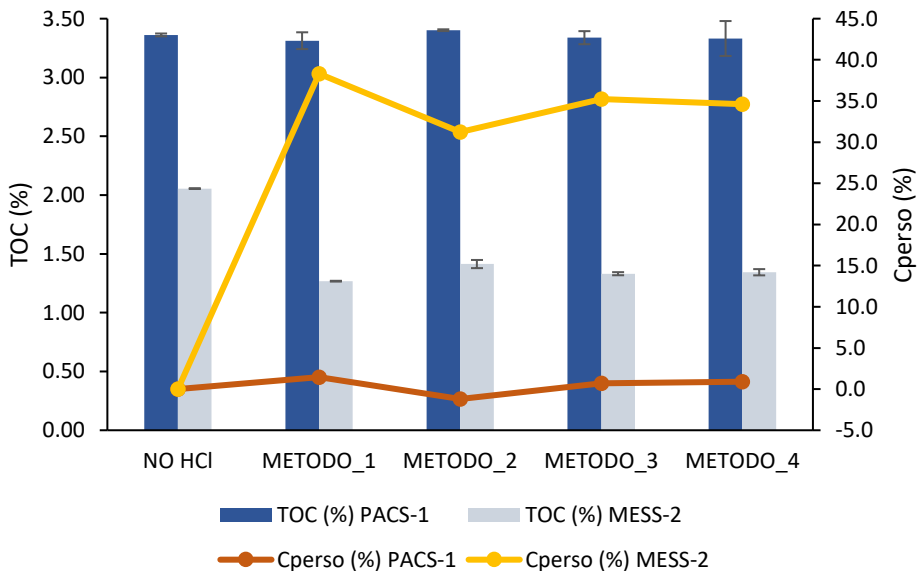


La maggior parte dei dati risulta compresa entro le due barre di errore, evidenziando una distribuzione omogenea delle misure attorno al valore certificato e indicando la stabilità del processo analitico nel tempo. Il coefficiente di variazione percentuale (CV %), pari a 3.4 %, conferma l'affidabilità e la buona ripetibilità del metodo.

La percentuale di carbonio inorganico viene determinata per differenza tra il dato acidificato e quello non acidificato ed indica sostanzialmente la percentuale di carbonio perso per acidificazione. Quest'ultima è data dal rapporto tra la quantità di carbonio determinata sul campione non acidificato (carbonio totale TC) e la quantità di carbonio misurata sul campione dopo il trattamento con acido (carbonio organico TOC), la cui differenza rappresenta il carbonio inorganico allontanato sotto forma di CO<sub>2</sub> come descritto dalla formula seguente:

$$C_{perso} \% = \left( \frac{TC - TOC}{TC} \right) * 100$$

**Fig. 3.2 – Analisi del carbonio (%) dei sedimenti PACS-1 e MESS-2 iniziale senza aggiunte di acido (NO HCl) e relativa all'aggiunta complessiva di 120 µl di HCl per i 4 metodi considerati in questo studio**



Nel grafico in figura 3.2 sono riportate le percentuali di carbonio dei due materiali certificati PACS-1 e MESS-2, ottenute dall'analisi dei rispettivi sedimenti senza

---

nessuna aggiunta di acido e con l'aggiunta totale di 120  $\mu$ l di HCl a diversa concentrazione, per le quattro metodologie testate nel presente studio.

I vari trattamenti di acidificazione applicati al sedimento PACS-1 non portano a variazioni significative dei valori (t-test,  $p < 0.05$ ), evidenziando come il materiale non contenga carbonati e quindi che il carbonio presente sia solo di origine organica.

L'acidificazione del MESS-2 ha comportato invece una diminuzione significativa del valore del carbonio (t-test,  $p < 0,001$ ), evidenziando un contenuto di carbonio inorganico nel sedimento certificato.

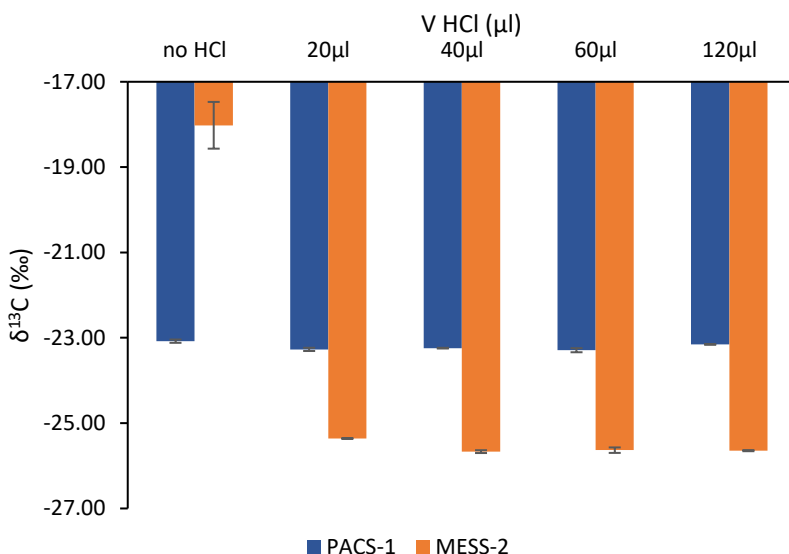
La quantità di carbonio inorganico per il PACS-1 presenta valori molto bassi, sempre al di sotto del limite di quantificazione e di conseguenza la percentuale di carbonio perso assume valori molto bassi. Il MESS-2 presenta valori di carbonio inorganico attorno al 0.7 %, con la percentuale di carbonio perso tra 30 e 40 %.

### 3.2 Analisi isotopica dei materiali certificati PACS-1 e MESS-2

Nei grafici seguenti sono riportati i risultati delle analisi del rapporto isotopico del carbonio  $\delta^{13}\text{C}$ , ottenuti per i due materiali certificati PACS-1 e MESS-2, in ognuno dei quattro protocolli di acidificazione testati nel presente studio.

La figura 3.3 mostra i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti per il PACS-1 e il MESS-2 con il METODO\_1.

**Fig. 3.3 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  di PACS-1 e MESS-2 ottenuti prima e dopo acidificazione secondo il METODO\_1**



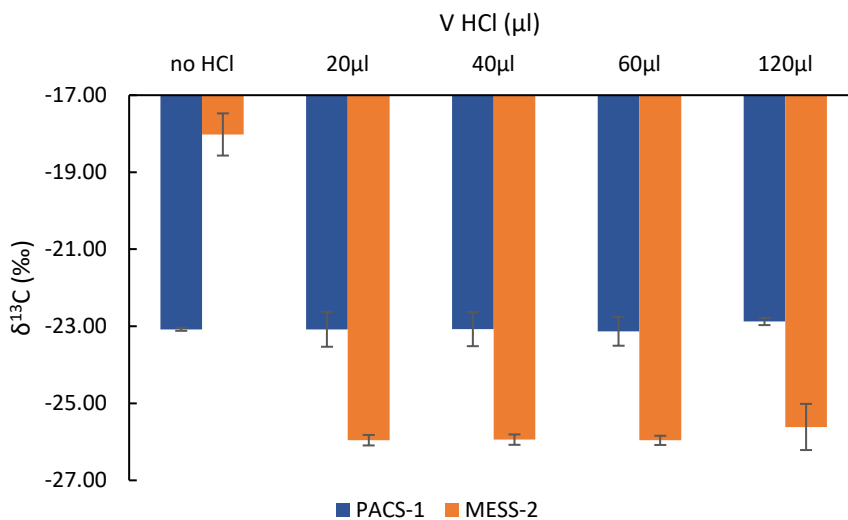
Si può osservare come per il PACS-1 il valore di  $\delta^{13}\text{C}$  non vari in modo significativo (t-test,  $p > 0.05$ ) con le aggiunte successive di HCl 1N rispetto al valore non acidificato. Tale risultato è coerente con quanto osservato per le analisi del contenuto di carbonio, che hanno evidenziato come tutto il carbonio presente sia di natura organica. Il valore di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuto (-23.155 ‰) è infatti coerente con la natura marino costiera dalla componente organica contenuta nel PACS-1.

Per il MESS-2 invece il  $\delta^{13}\text{C}$  subisce un repentino decremento del valore subito dopo la prima aggiunta di 20 µl di HCl 1N, per poi mantenersi stabile nelle aggiunte successive, fino al valore finale di -25.645 ‰. Anche in questo caso i risultati ottenuti per il rapporto  $\delta^{13}\text{C}$  confermano quanto osservato dall'analisi elementare. Il valore iniziale (-18.020 ‰) indica infatti un mescolamento tra la componente inorganica del carbonio e la parte organica presenti nel sedimento. Una volta rimossa la

componente inorganica mediante acidificazione, il valore del  $\delta^{13}\text{C}$  subisce un decremento, attestandosi a valori più negativi tipici di una sostanza organica di origine costiera/terrestre.

In figura 3.4 sono riportati i dati di  $\delta^{13}\text{C}$  dei due materiali certificati ottenuti con il METODO\_2.

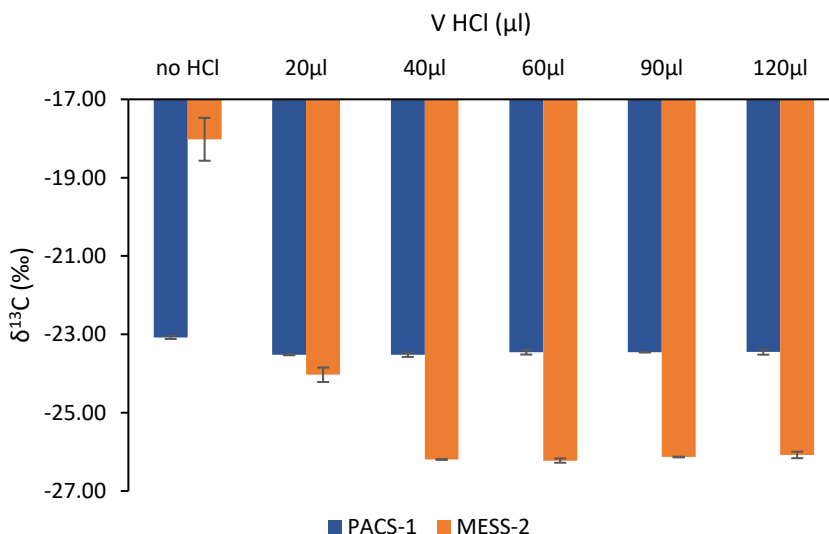
**Fig. 3.4 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  dei CRM PACS-1 e MESS-2 ottenuti prima e dopo acidificazione secondo il METODO\_2**



Nonostante la concentrazione dell'acido utilizzato (HCl 6N) sia più elevata, per quanto riguarda i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti con il METODO\_2, si osservano risultati analoghi a quanto già visto nel METODO\_1 sia per il PACS-1 che per il MESS-2, ed i valori finali sono rispettivamente -22.876 ‰ per il PACS-1 e -25.164 ‰ per il MESS-2.

In figura 3.5 sono illustrati i valori di  $\delta^{13}\text{C}$ , per i due materiali certificati, ottenuti con il METODO\_3.

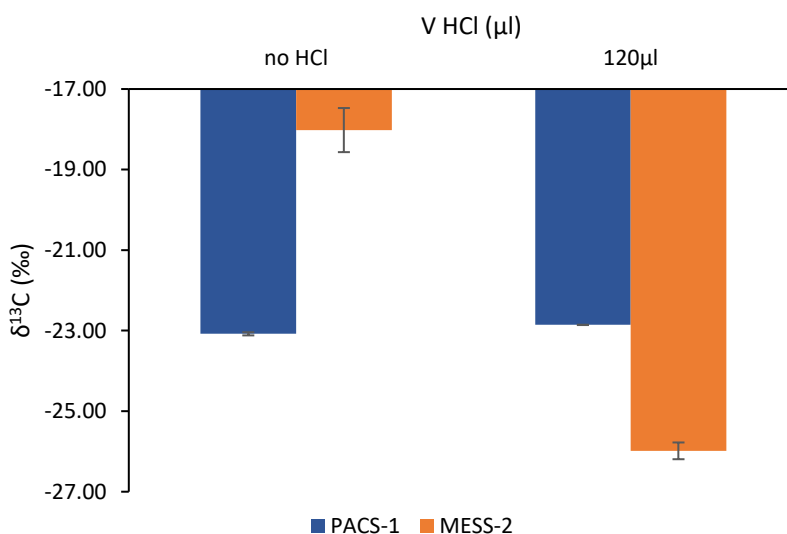
**Fig. 3.5 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  di PACS-1 e MESS-2 ottenuti prima e dopo acidificazione secondo il METODO\_3**



Il METODO\_3 comporta le prime tre aggiunte da 20 µl di HCl 1N e le successive due da 30 µl di HCl 6N. Come nei casi precedenti non si osservano differenze significative per quanto riguarda i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  del PACS-1 prima e dopo le aggiunte di acido, mentre per il MESS-2 si osserva un andamento decrescente del  $\delta^{13}\text{C}$  dopo le prime due aggiunte, alle quali non seguono ulteriori variazioni, in quanto si raggiunge il plateau. I valori finali ottenuti per il  $\delta^{13}\text{C}$  sono di -23.450 ‰ e -26.078 ‰ rispettivamente per il PACS-1 e per il MESS-2. I risultati ottenuti indicano, anche per questo metodo di acidificazione, come per il MESS-2 la componente inorganica sia completamente rimossa dopo l'aggiunta di 40 µl di acido, con il raggiungimento di valori di  $\delta^{13}\text{C}$  tipici di sostanza organica di origine costiera/terrestre, in questo caso leggermente più negativi di quelli osservati nei precedenti due casi (METODO\_1 e METODO\_2). L'aumento di concentrazione dell'acido utilizzato nelle ultime due aggiunte non contribuisce a far variare ulteriormente i valori di  $\delta^{13}\text{C}$ , indicando come 40 µl di acido 1N siano sufficienti a rimuovere completamente la componente carbonatica presente nel MESS-2.

In figura 3.6 sono indicati, infine, i dati di  $\delta^{13}\text{C}$  per i due materiali certificati, ottenuti con il METODO\_4.

**Fig. 3.6 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  di PACS-1 e MESS-2 ottenuti prima e dopo acidificazione secondo il METODO\_4**

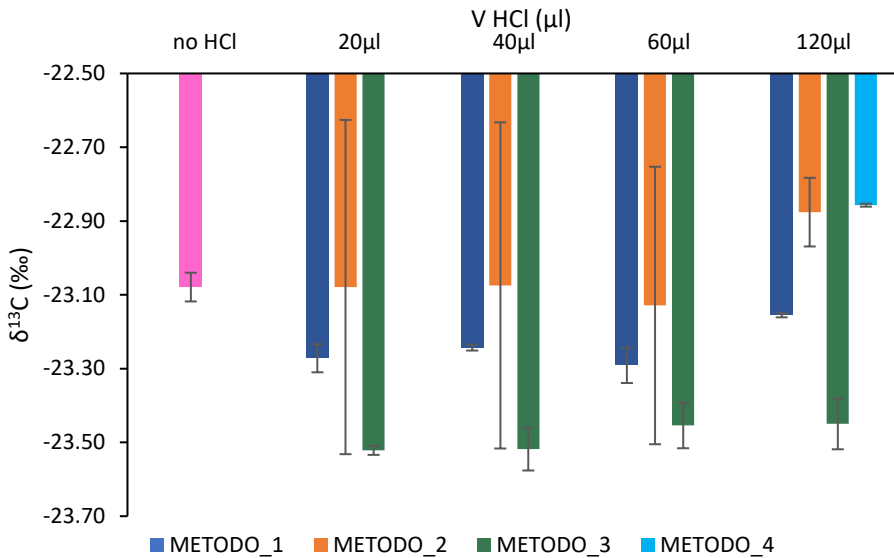


Nel METODO\_4 è stata utilizzata un'unica aggiunta da 120 µl di HCl 1N, al fine di testare un protocollo che si possa rendere funzionale ad una applicazione routinaria laboratoristica consentendo risparmio di tempo e uno snellimento della procedura.

I risultati ottenuti confermano quanto osservato già nei tre metodi precedenti. Per il  $\delta^{13}\text{C}$  i valori finali ottenuti risultano infatti paragonabili a quelli ottenuti in precedenza, rispettivamente di -22.857 ‰ per il PACS-1 e -25.985 ‰ per il MESS-2.

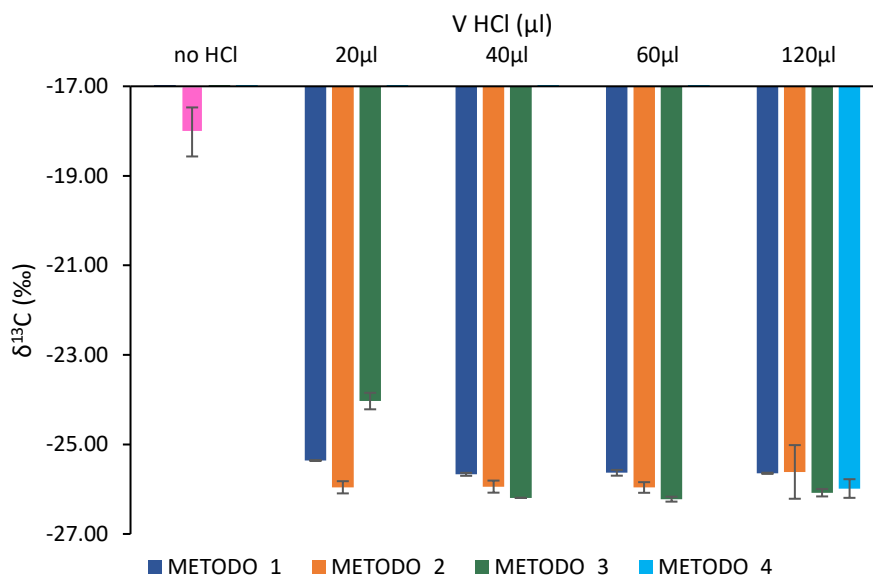
Nei grafici seguenti (figure 3.7 e 3.8) vengono messi a confronto i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti dopo ogni aggiunta di acido per ognuno dei quattro trattamenti testati nel presente studio per il PACS-1 e per il MESS-2.

**Fig. 3.7 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti per i quattro trattamenti testati per ognuna delle aggiunte di acido per il PACS-1**



Per il PACS-1, si osserva un generale decremento dei valori del  $\delta^{13}\text{C}$  già dopo la prima aggiunta di acido. Va tuttavia considerato che la differenza osservata tra i valori rientra nell'intervallo di incertezza analitico e quindi nella variabilità strumentale (3-10%). Tale dato risulta coerente con le percentuali trascurabili di carbonio inorganico già precedentemente descritte per il PACS-1.

**Fig. 3.8 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti per i quattro trattamenti testati per ognuna delle aggiunte di acido per il MESS-2**



Per quanto riguarda il MESS-2, invece, i risultati evidenziano un decremento significativo dei valori di  $\delta^{13}\text{C}$  già dopo la prima aggiunta di acido, evidenziando come la rimozione della componente carbonatica, più arricchita in  $^{13}\text{C}$ , tenda a spostare il  $\delta^{13}\text{C}$  verso valori più negativi. I valori tendono poi a rimanere costanti nelle aggiunte successive e sono indicativi di un carbonio organico di natura terrestre/costiera.

### 3.3 Caratterizzazione elementare di quattro campioni di sedimento

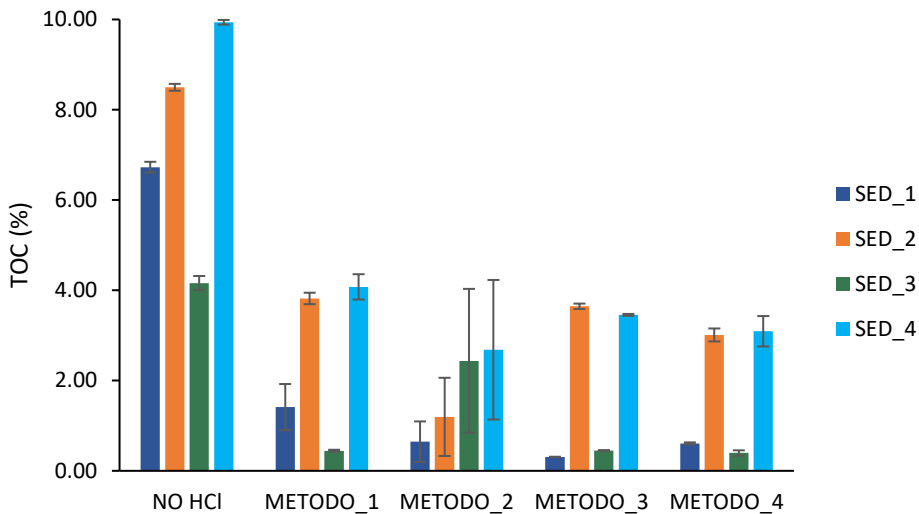
Nella tabella 3.2 sono riportati i valori di TOC (%) e  $C_{\text{inorg}}$  (%) ottenuti con i 4 diversi metodi di acidificazione, testati nei campioni di sedimento (SED\_1, SED\_2, SED\_3 e SED\_4) provenienti da aree molto diverse tra loro.

**Tab. 3.2 – Valori di TOC (%) e C<sub>inorg</sub> (%) ottenuti per i campioni di sedimento SED\_1, SED\_2, SED\_3 e SED\_4 con i diversi metodi di acidificazione testati, ds= deviazione standard calcolata sui 5 campioni analizzati**

| PROTOCOLLO DI ACIDIFICAZIONE |        | Campioni di sedimento |                        |         |                        |         |                        |         |                        |
|------------------------------|--------|-----------------------|------------------------|---------|------------------------|---------|------------------------|---------|------------------------|
|                              |        | SED_1                 |                        | SED_2   |                        | SED_3   |                        | SED_4   |                        |
|                              |        | TOC (%)               | C <sub>inorg</sub> (%) | TOC (%) | C <sub>inorg</sub> (%) | TOC (%) | C <sub>inorg</sub> (%) | TOC (%) | C <sub>inorg</sub> (%) |
| NO HCl                       | no HCl | 6,728                 |                        | 8,497   |                        | 4,161   |                        | 9,938   |                        |
|                              | ds     | 0,119                 |                        | 0,076   |                        | 0,156   |                        | 0,051   |                        |
| METODO_1                     | 20 µl  | 5,607                 | 1,121                  | 6,404   | 2,093                  | 2,910   | 1,251                  | 6,787   | 3,151                  |
|                              | ds     | 0,473                 | 0,473                  | 0,686   | 0,686                  | 0,172   | 0,172                  | 0,669   | 0,669                  |
|                              | 40 µl  | 4,615                 | 2,112                  | 5,706   | 2,791                  | 2,220   | 1,941                  | 6,852   | 3,087                  |
|                              | ds     | 0,322                 | 0,322                  | 0,915   | 0,915                  | 0,263   | 0,263                  | 0,024   | 0,024                  |
|                              | 60 µl  | 3,631                 | 3,097                  | 5,268   | 3,230                  | 1,104   | 3,056                  | 5,564   | 4,375                  |
| ds                           | 0,104  | 0,104                 | 1,011                  | 1,011   | 0,041                  | 0,041   | 0,402                  | 0,402   |                        |
| METODO_2                     | 120 µl | 1,411                 | 5,316                  | 3,819   | 4,678                  | 0,445   | 3,716                  | 4,076   | 5,863                  |
|                              | ds     | 0,511                 | 0,511                  | 0,127   | 0,127                  | 0,022   | 0,022                  | 0,280   | 0,280                  |
|                              | 20 µl  | 2,371                 | 4,356                  | 3,260   | 5,237                  | 1,086   | 3,075                  | 4,558   | 5,381                  |
|                              | ds     | 0,641                 | 0,641                  | 0,205   | 0,205                  | 0,082   | 0,082                  | 1,730   | 1,730                  |
|                              | 40 µl  | 0,373                 | 6,355                  | 3,169   | 5,329                  | 0,988   | 3,173                  | 2,738   | 7,201                  |
| ds                           | 0,035  | 0,035                 | 0,953                  | 0,953   | 0,734                  | 0,734   | 0,464                  | 0,464   |                        |
| METODO_3                     | 60 µl  | 0,922                 | 5,805                  | 2,639   | 5,858                  | 1,041   | 3,120                  | 1,809   | 8,130                  |
|                              | ds     | 0,782                 | 0,782                  | 0,719   | 0,719                  | 0,357   | 0,357                  | 0,694   | 0,694                  |
|                              | 120 µl | 0,645                 | 6,083                  | 1,195   | 7,302                  | 2,437   | 1,723                  | 2,683   | 7,256                  |
|                              | ds     | 0,450                 | 0,450                  | 0,866   | 0,866                  | 1,594   | 1,594                  | 1,547   | 1,547                  |
|                              | 20 µl  | 5,497                 | 1,231                  | 7,260   | 1,237                  | 3,304   | 0,857                  | 8,626   | 1,313                  |
| ds                           | 0,188  | 0,188                 | 0,359                  | 0,359   | 0,078                  | 0,078   | 0,465                  | 0,465   |                        |
| METODO_4                     | 40 µl  | 5,126                 | 1,602                  | 6,261   | 2,236                  | 2,566   | 1,594                  | 7,474   | 2,465                  |
|                              | ds     | 0,085                 | 0,085                  | 0,055   | 0,055                  | 0,148   | 0,148                  | 0,389   | 0,389                  |
|                              | 60 µl  | 3,569                 | 3,159                  | 5,570   | 2,927                  | 1,974   | 2,187                  | 6,688   | 3,250                  |
|                              | ds     | 0,426                 | 0,426                  | 0,292   | 0,292                  | 0,211   | 0,211                  | 0,198   | 0,198                  |
|                              | 90 µl  | 0,314                 | 6,414                  | 3,722   | 4,775                  | 0,435   | 3,726                  | 3,589   | 6,350                  |
| ds                           | 0,001  | 0,001                 | 0,304                  | 0,304   | 0,023                  | 0,023   | 0,311                  | 0,311   |                        |
| METODO_4                     | 120 µl | 0,309                 | 6,418                  | 3,645   | 4,852                  | 0,448   | 3,713                  | 3,454   | 6,484                  |
|                              | ds     | 0,001                 | 0,001                  | 0,060   | 0,060                  | 0,011   | 0,011                  | 0,022   | 0,022                  |
| METODO_4                     | 120 µl | 0,607                 | 6,120                  | 3,010   | 5,487                  | 0,395   | 3,765                  | 3,092   | 6,847                  |
|                              | ds     | 0,022                 | 0,022                  | 0,144   | 0,144                  | 0,059   | 0,059                  | 0,337   | 0,337                  |

In figura 3.9 vengono rappresentate le concentrazioni di carbonio organico totale nei quattro sedimenti studiati con le quattro modalità di acidificazione, a confronto con il dato non acidificato. Le concentrazioni dei casi acidificati fanno riferimento al dato di massima acidificazione (120 µl).

**Fig. 3.9 – Concentrazioni di TOC (%) dei quattro sedimenti prima dell'acidificazione e dopo le aggiunte complessive pari a un totale di 120 µl di HCl**



Si osserva come i quattro sedimenti siano molto diversi tra loro, caratterizzati da concentrazioni di carbonio molto variabili, che riflettono la diversità tessiturale della matrice, rendendoli quindi ideali per testare i metodi di acidificazione proposti in condizioni molto diverse, coprendo così una vasta diversità di casistiche e situazioni ragionevolmente riscontrabili in un ambiente marino naturale.

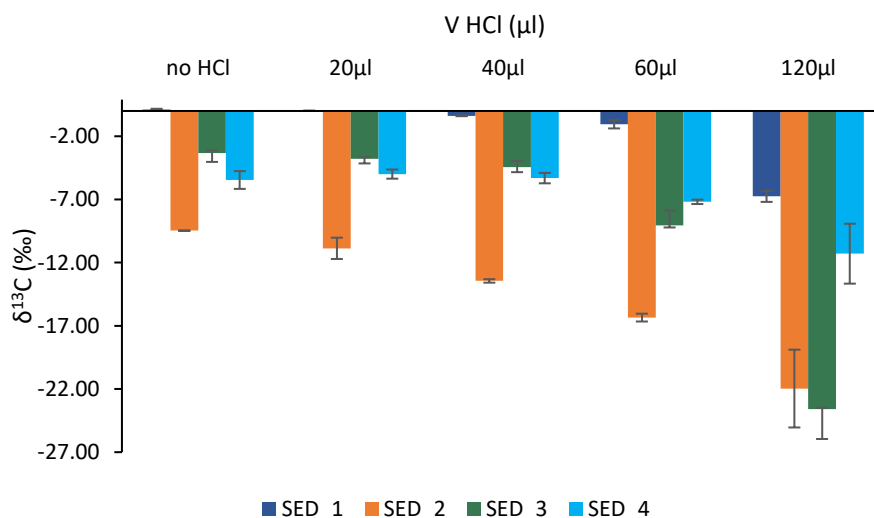
In generale è possibile osservare che le concentrazioni di carbonio diminuiscono in tutti i sedimenti dopo l'aggiunta di HCl. Per i sedimenti 1 e 3, l'acidificazione comporta una diminuzione rilevante delle concentrazioni, indicando un'elevata presenza di carbonati nel sedimento.

### 3.4 Analisi isotopica dei quattro campioni di sedimento

Nelle figure seguenti vengono riportati i grafici relativi ai valori del rapporto isotopico del carbonio  $\delta^{13}\text{C}$  per i quattro sedimenti studiati, secondo le quattro modalità di acidificazione testate.

In figura 3.10 sono mostrati i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  per i quattro sedimenti trattati con il METODO\_1.

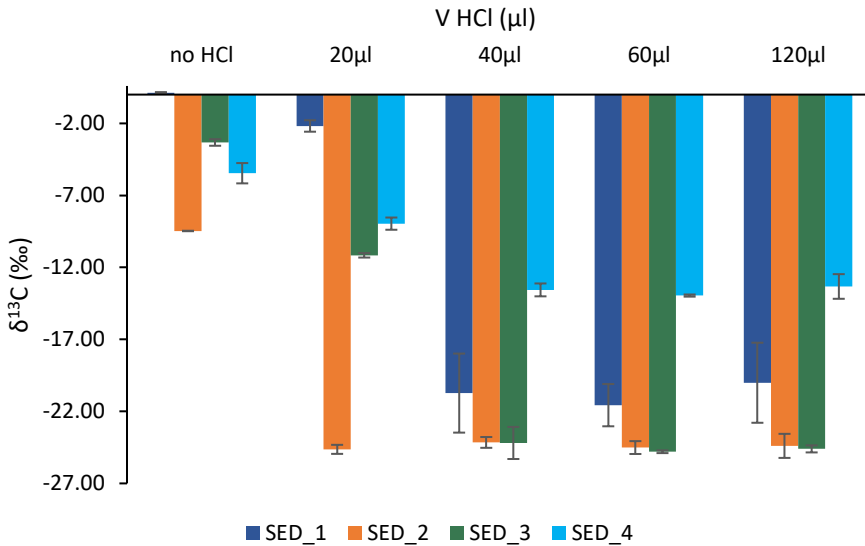
**Fig. 3.10 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti nei quattro sedimenti acidificati secondo il METODO\_1**



L'acidificazione con acido diluito 1N, utilizzata nel METODO\_1, evidenzia come i valori del rapporto isotopico  $\delta^{13}\text{C}$  tendano gradualmente a diminuire all'aumentare del volume di acido apportato, indicando come la rimozione della componente carbonatica sia graduale. È quindi necessario arrivare alla completa aggiunta dei 120 µl di HCl 1N prima di osservare valori di  $\delta^{13}\text{C}$  indicativi di una completa rimozione della componente carbonatica e tali da indicare una sostanza organica di origine marino-costiera. Questo è evidente in particolare per i sedimenti 2 e 3; mentre i sedimenti 1 e 4, pur mostrando un graduale decremento dei valori di  $\delta^{13}\text{C}$ , anche dopo 120 µl di HCl 1N evidenziano valori ancora molto poco negativi, indice di una presenza ancora rilevante di carbonato.

In figura 3.11 sono mostrati i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  nei quattro sedimenti trattati con il METODO\_2.

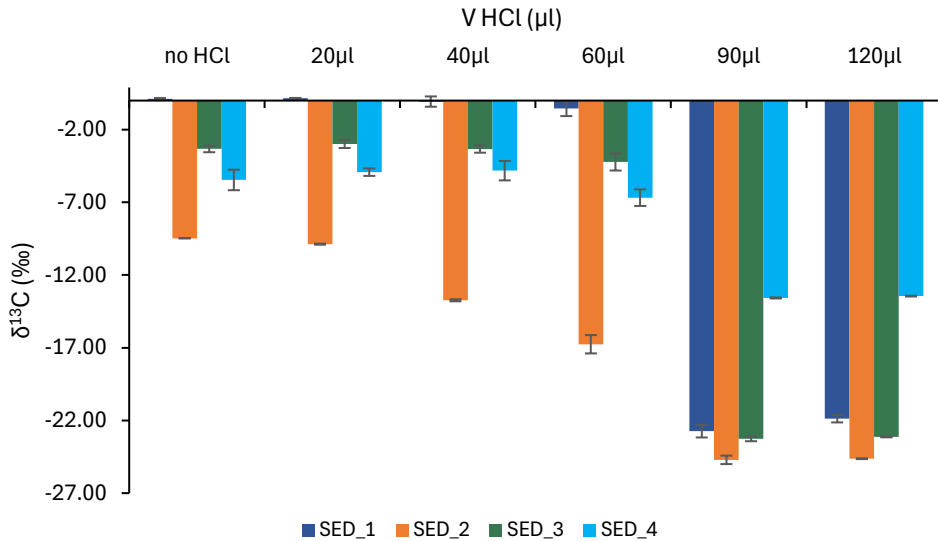
**Fig. 3.11 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti nei quattro sedimenti acidificati secondo il METODO\_2**



Osservando i valori del rapporto isotopico del carbonio  $\delta^{13}\text{C}$  nei sedimenti trattati con il METODO\_2, si nota il raggiungimento di valori più negativi già dopo i primi step di acidificazione. Il sedimento 2 raggiunge un valore di  $\delta^{13}\text{C}$  molto negativo già dopo la prima aggiunta di 20 µl di HCl 6N, mantenendosi poi costante per le successive aggiunte. Il sedimento 3 raggiunge invece il plateau dopo la seconda aggiunta di HCl. Il sedimento 1 parte da valori positivi e molto bassi di  $\delta^{13}\text{C}$  ma dopo la seconda aggiunta di HCl i carbonati risultano eliminati in modo completo. Il sedimento 4 raggiunge il plateau dopo la terza aggiunta di acido, ma il suo valore si mantiene ancora poco negativo, indicando probabilmente come anche 120 µl di acido non siano sufficienti ad eliminare completamente i carbonati.

In figura 3.12 sono mostrati i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  e nei quattro sedimenti trattati con il METODO\_3.

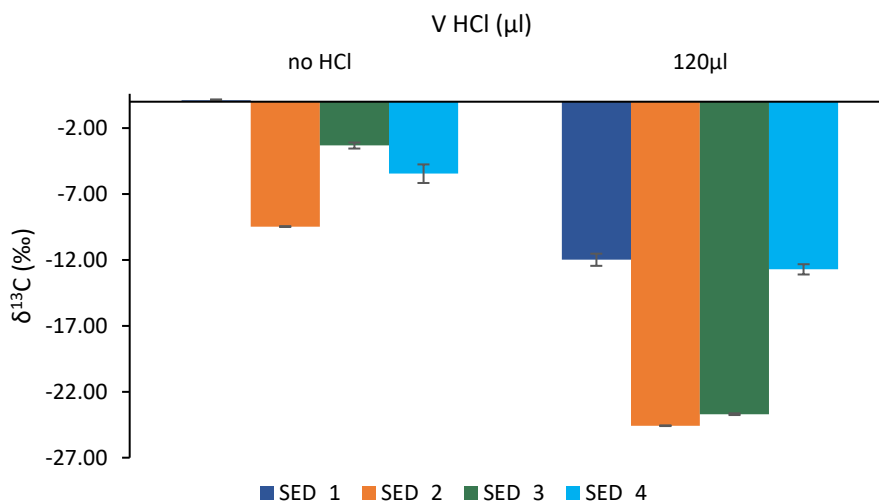
**Fig. 3.12 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti nei quattro sedimenti acidificati secondo il METODO\_3**



I valori di  $\delta^{13}\text{C}$  per tutti i sedimenti trattati con il METODO\_3, evidenziano una graduale diminuzione man mano che si procede con le aggiunte di acido. Negli ultimi due trattamenti (90 e 120 µl) i sedimenti 1, 2 e 3 raggiungono valori paragonabili a quelli osservati al plateau osservato con il METODO\_2, mentre il sedimento 4 continua a mostrare  $\delta^{13}\text{C}$  ancora poco negativi, indicando come anche con questo metodo la componente carbonatica non riesca ad essere rimossa in maniera efficiente.

Infine, in figura 3.13 sono mostrati i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  nei quattro sedimenti trattati con il METODO\_4.

**Fig. 3.13 – Valori di  $\delta^{13}\text{C}$  ottenuti nei quattro sedimenti acidificati secondo il METODO\_4**



Nel quarto metodo testato, l'aggiunta unica di 120 μl di HCl 1N ha permesso di raggiungere subito valori molto negativi per i sedimenti 2 e 3, mentre i sedimenti 1 e 4 continuano ad evidenziare valori che si attestano attorno a -11/-12 ‰. Anche con questo protocollo, il sedimento 4 non raggiunge valori più negativi, ad indicare che i carbonati sono ancora presenti in quantità non trascurabile e tale da influire sui valori del rapporto  $\delta^{13}\text{C}$ . Il solo uso di acido cloridrico diluito non risulta quindi sufficiente per una totale rimozione dei carbonati in questo tipo di sedimento: questi, infatti, potrebbero essere associati in parte anche alla matrice silicatica del sedimento che potrebbe renderli più refrattari all'attacco acido. In questi casi, di norma, è preferibile utilizzare un mix di acidi, incluso l'acido fluoridrico, al fine di intaccare la matrice silicatica e permettere la completa rimozione dei carbonati. Va comunque osservato che il sedimento 4 si presenta come "caso limite", opportunamente scelto proprio per le sue caratteristiche molto peculiari che lo rendono un esempio di matrice molto ostica dal punto di vista analitico e laboratoristico e sicuramente tale da non essere considerabile un materiale frequente e routinario nella casistica di un laboratorio che si occupa di analisi di sedimenti ambientali.

---

## 4 Caso studio: sedimenti del Sud Adriatico

### Il Mar Adriatico

Il Mar Adriatico rappresenta un bacino semichiuso lungo circa 800 km e largo in media 200 km, di particolare interesse per lo studio dei cicli biogeochimici, essendo caratterizzato da forti gradienti oceanografici e da una marcata eterogeneità degli input organici [30]. Può essere suddiviso in tre settori principali in base alla morfologia e alla dinamica di sedimentazione:

- Nord Adriatico: piattaforma poco profonda (fino a 150 m) soggetta a un'elevata influenza fluviale, principalmente legata agli apporti dei fiumi Po ed Isonzo;
- Adriatico Centrale: dominato dalla Fossa di Jabuka, una depressione profonda circa 270 m che agisce come zona di accumulo per particelle fini e nutrienti, conservando una memoria degli input alloctoni passati;
- Sud Adriatico: caratterizzato da una fossa profonda fino a 1233 m, influenzata dalla circolazione ciclonica e dalla produttività della colonna d'acqua, connessa al Mar Ionio tramite lo Stretto di Otranto.

La circolazione segue un andamento antiorario: le acque mediterranee calde e saline risalgono lungo la costa orientale, mentre le acque dolci e più fredde dei fiumi scendono lungo la costa occidentale. Si crea così un gradiente di salinità molto netto, da nord verso sud. Questa circolazione favorisce la distribuzione della OM e degli inquinanti connessi ad essa, provenienti dalla Pianura Padana, e il rimescolamento dei nutrienti depositati sul fondo.

### Distribuzione OM nel Mar Adriatico

La circolazione delle acque nei tre sottobacini (Nord, Centro e Sud) agisce favorendo una diversa distribuzione della OM. Nel settore settentrionale e lungo la costa occidentale il bacino è dominato da un'importante influenza fluviale. I fiumi trasportano carichi di materiale sospeso che alimentano un deposito fangoso lungo la costa, dominato da OM di origine terrestre (alloctona). Qui il carbonio organico raggiunge i valori più elevati in quanto le particelle fini di argilla presentano un'elevata affinità per la OM, sequestrandola nel sedimento. Le firme isotopiche del carbonio risultano arricchite dell'isotopo  $^{12}\text{C}$ , utilizzabile dai microrganismi, con valori caratteristici di  $\delta^{13}\text{C}$  più negativi (-28.0 ‰). Proseguendo verso il centro del bacino e lungo la costa orientale l'influenza terrigena diminuisce drasticamente. Infatti, qui prevale la OM di origine marina (autoctona) derivante dalla produzione primaria algale e dal fitoplancton, con firme isotopiche più pesanti, arricchite in  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$  ca -21.0 ‰) [30] [31].

---

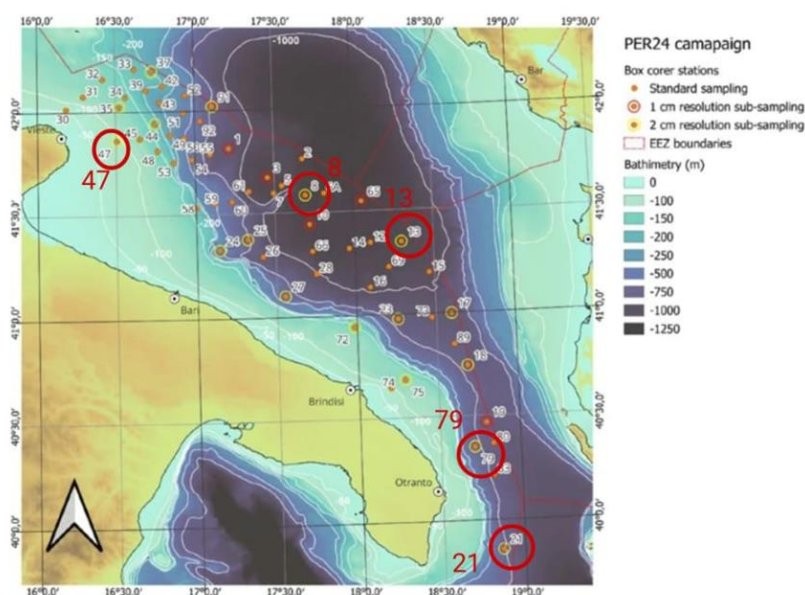
Inoltre, nel bacino del Mar Adriatico numerosi studi ([32] [33] [34]) hanno riscontrato la presenza di carbonio organico antico, identificato come cherogene. Il cherogene rappresenta la frazione solida della OM sepolta nei sedimenti e che deriva in parte dall'erosione di rocce sedimentarie preesistenti, trasportate verso l'ambiente marino dai corsi d'acqua, in particolare durante eventi di intensa precipitazione. Nel settore settentrionale dell'Adriatico, caratterizzato da sedimenti relativamente più giovani e minori profondità di seppellimento, il cherogene ha subito principalmente trasformazioni di tipo biogenico, con produzione di gas attraverso processi di degradazione batterica. Nella zona centro-meridionale, dove le rocce sono più antiche e soggette a maggiori gradienti termici, il cherogene ha invece raggiunto uno stadio di maturazione più avanzato, evolvendo in petrolio per effetto delle elevate temperature nel sottosuolo. La presenza di questo "carbonio fossile" costituisce una componente recalcitrante che si somma alla OM più recente, rendendo più complessa l'interpretazione dei segnali geochimici e isotopici, ma è anche molto utile nello studio dei cambiamenti climatici e della vegetazione. La presenza di zone di accumulo, come la Fossa di Jabuka, rende il Mar Adriatico un archivio fondamentale per la ricostruzione dei cambiamenti paleo-ambientali. Circa 15.000 anni fa, infatti, nell'Adriatico centrale si verificò un maggiore contributo terrestre dovuto all'aumento del flusso del fiume Po [30], mentre circa 9.000 anni fa l'attuale Golfo di Trieste era caratterizzato da ambienti palustri d'acqua dolce, prima della trasgressione marina olocenica [32].

Dal punto di vista composizionale, una parte significativa della OM è costituita dalle sostanze umiche che rappresentano una frazione altamente refrattaria e possono contribuire, attraverso processi diagenetici progressivi, alla formazione del cherogene. Queste sostanze sono costituite da un insieme eterogeneo complesso di macromolecole organiche ad elevato peso molecolare che si formano nelle matrici ambientali marine da processi di decomposizione di resti di piante, animali e di sintesi microbica ad opera dei microrganismi nel cosiddetto processo di umificazione. Le sostanze umiche svolgono un ruolo molto importante, grazie alla presenza dei gruppi funzionali carbossilici, fenolici e carbonilici, che presentano molte cariche negative che attraggono i cationi, mantenendoli in forma scambiabile senza che vengano dilavati dall'acqua; svolgono un effetto chelante, aiutano a mantenere stabile il pH del sedimento e agiscono da collante formando aggregati stabili con argilla e sabbia, migliorando porosità, aerazione e ritenzione idrica dei sedimenti. [35]

Nell'ottobre del 2024 è stato svolto un campionamento nel Golfo di Bari, a bordo della nave oceanografica da ricerca Gaia Blu del CNR-Consiglio nazionale delle ricerche, per studiare l'impatto antropico sulle aree costiere. Il campionamento ha previsto la raccolta di 311 campioni di sedimento, sia superficiali che profondi con carote, raccolti in punti diversi dell'area di ricerca, dalla zona più vicina alla costa a quella più lontana e profonda (Fig 4.1) [36].

In questo caso studio sono state considerate solo le stazioni cerchiare in rosso nella figura 4.1, e di ciascuna carota sono stati considerati i campioni prelevati ogni 2 cm, da 2 cm fino a 20 cm di profondità.

**Fig. 4.1 – Mappa dell'area di campionamento con scala batimetrica. Cerchiate in rosso le stazioni considerate per questo caso studio**



Di seguito sono riportati i grafici dei valori di TOC (%) e  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) relativi alle 5 stazioni selezionate per questo caso studio (Figure 4.2 e 4.3).

I dati ottenuti hanno evidenziato come la stazione 47 (situata a 100 m di profondità e più prossima alla costa) risulti quella con un maggior contributo di TOC (0.542 %) rispetto alle altre considerate.

Tali concentrazioni risultano paragonabili a quelle riportate in bibliografia per i sedimenti del Mare Adriatico, in particolare nella parte settentrionale e sud-orientale, dove si riscontra un maggiore contributo terrestre alla materia organica sedimentaria come conseguenza dell'elevato apporto fluviale [30]. Tale distribuzione risulta strettamente legata alla tessitura granulometrica dei sedimenti (principalmente silt

---

argilloso pelitico e silt) che provengono dal forte input fluviale del Po. Il sedimento fine sospeso viene trasportato dalla corrente lungo la costa e si accumula in prossimità della penisola del Gargano, portando ad un incremento dei valori di TOC in quella zona. I principali contributi al TOC del sedimento derivano perciò dagli importanti apporti fluviali e dall'elevata produzione primaria dell'area. È stato inoltre osservato che il carbonio organico terrigeno viene preferenzialmente accumulato e preservato nei sedimenti superficiali rispetto alla frazione algale più labile, evidenziando una selezione diagenetica delle diverse fonti di materia organica [34] [37] [38].

Le altre stazioni e le carote analizzate (8, 13, 79, 21) si trovano nella parte più meridionale del Mare Adriatico, le prime due nella zona bacinale e le seconde due nella zona dello stretto di Otranto, caratterizzate rispettivamente da batimetriche più profonde e dalle dinamiche di scambio tra il Mar Adriatico e il Mar Jonio. Queste zone sono caratterizzate da un basso apporto di carbonio di origine terrestre e da una sostanza organica derivante dalla sedimentazione di particolato dagli strati superiori della colonna d'acqua, caratterizzato da dinamiche di degradazione che gli conferiscono una natura prevalentemente refrattaria [39]. Questa configurazione è attribuita all'elevato tempo di residenza del materiale particolato lungo la colonna d'acqua, che favorisce processi di degradazione selettiva della componente labile e la conservazione delle frazioni più resistenti alla degradazione microbica. La zona, infatti, si trova nei pressi della Fossa Adriatica Meridionale che raggiunge la profondità di 1233 m, qui i sedimenti sono principalmente costituiti da argilla, sabbia e limo.

L'analisi dei profili verticali del TOC evidenzia una diminuzione della concentrazione all'aumentare della profondità, in quasi tutte le carote analizzate, come mostrato in figura 4.2. Fanno eccezione la stazione 8, caratterizzata da un profilo anomalo, ed anche la stazione 21 che presenta a metà della carota (circa 12 cm) un valore di 0,669 %, dovuto ad un arricchimento puntuale della sostanza organica.

Fig. 4.2 – Profilo di concentrazione di TOC (%) nelle stazioni 47, 8, 13, 79, 21

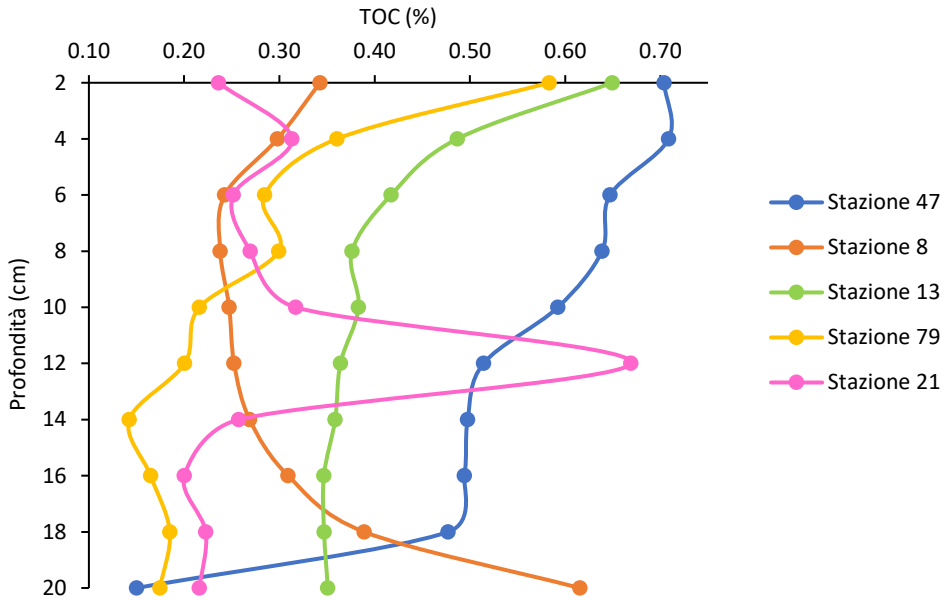
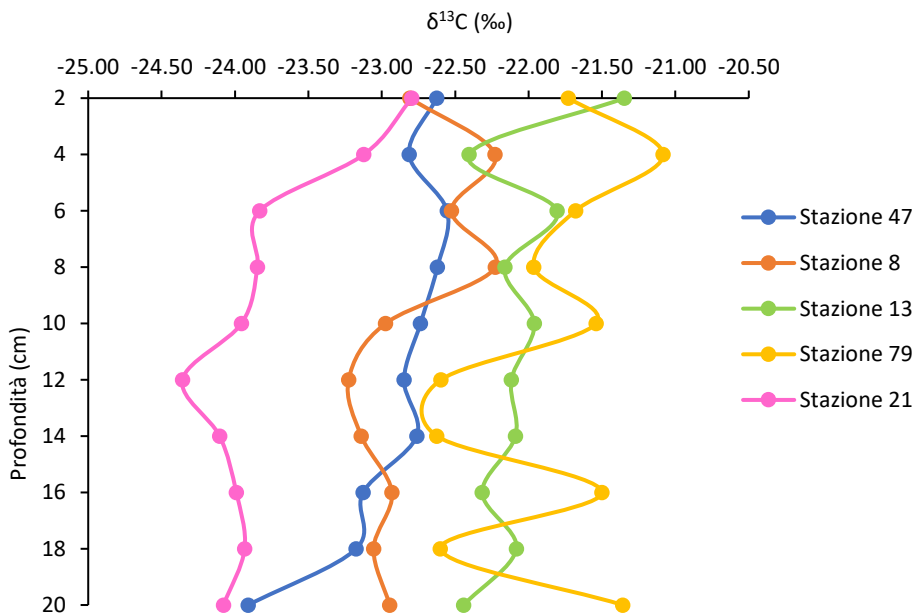


Fig. 4.3 – Profilo verticale dei valori di  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) per le stazioni 47, 8, 13, 79, 21



In figura 4.3, i valori di  $\delta^{13}\text{C}$  osservati mostrano alcune differenze tra le stazioni: le stazioni 13 e 79 presentano valori isotopici simili, attorno a  $-22.0\text{‰}$ , indicativi di una sostanza organica sedimentaria di origine prevalentemente marina. Le stazioni 47 e 8 mostrano invece valori leggermente più negativi, attorno a  $-23.0\text{‰}$ , mentre la stazione 21 registra un valore di circa  $-24.0\text{‰}$ . Tale evidenza suggerisce un maggiore apporto di materiale organico di origine terrestre per queste stazioni, tipicamente più povero in  $^{13}\text{C}$ , e di conseguenza, il sedimento risulta caratterizzato da valori di  $\delta^{13}\text{C}$  più negativi.

### Modello di mescolamento isotopico IsoSource

Il modello di mescolamento Software IsoSource [40], [41] è stato applicato al fine di quantificare il contributo delle diverse firme isotopiche della sostanza organica nei sedimenti. Questo è un modello lineare, che si basa su equazioni algebriche e consente di quantificare i diversi contributi organici costituenti il sedimento, sotto forma di distribuzione di probabilità, i quali vengono espressi mediante descrittori di tendenza centrale, quali media, moda e intervalli di confidenza.

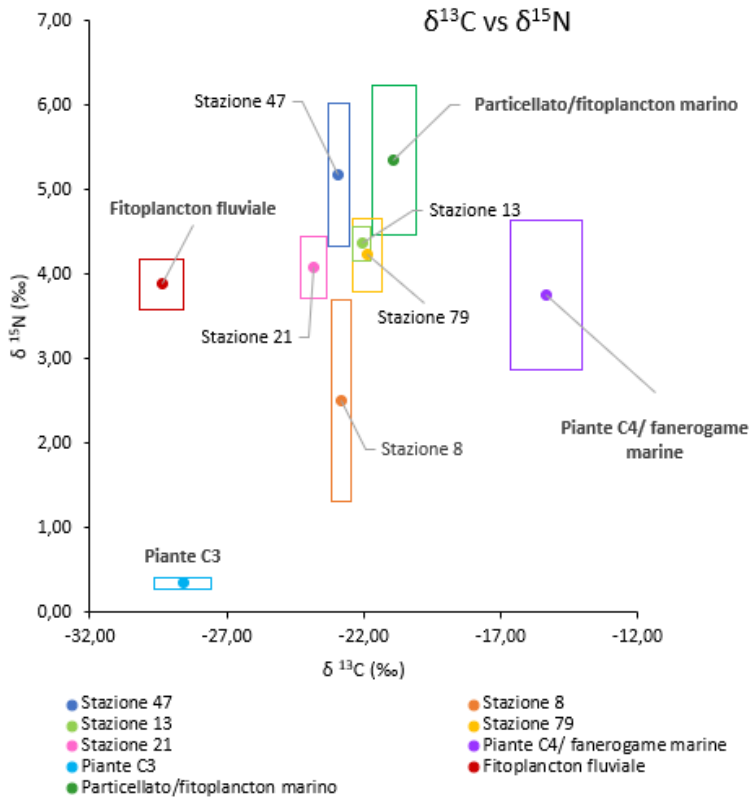
In tabella 4.1 si riportano i valori isotopici  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  dei quattro end-member selezionati: piante C4, piante C3, fitoplancton fluviale e particellato/fitoplancton marino. Tali end-member si differenziano in termini di firme isotopiche per diversi pathway di fissazione della  $\text{CO}_2$  atmosferica, con conseguenti diversi processi di frazionamento isotopico che ne conferiscono i valori caratteristici.

**Tab 4.1 – Tabella dei valori di riferimento di  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  e deviazione standard per le quattro firme isotopiche individuate**

| Firme isotopiche                 | $\delta^{13}\text{C}$ (‰) | $\delta^{15}\text{N}$ (‰) | Riferimento bibliografico |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Piante C4/fanerogame marine      | -15.33                    | 3.75                      | [24] [42] [43]            |
| ds                               | 1.33                      | 0.88                      |                           |
| Piante C3                        | -28.61                    | 0.34                      | [24] [44]                 |
| ds                               | 1.04                      | 0.07                      |                           |
| Fitoplancton fluviale            | -29.36                    | 3.88                      | [45] [46]                 |
| ds                               | 0.8                       | 0.3                       |                           |
| Particellato/fitoplancton marino | -20.89                    | 5.35                      | [25] [47]                 |
| ds                               | 0.79                      | 0.89                      |                           |

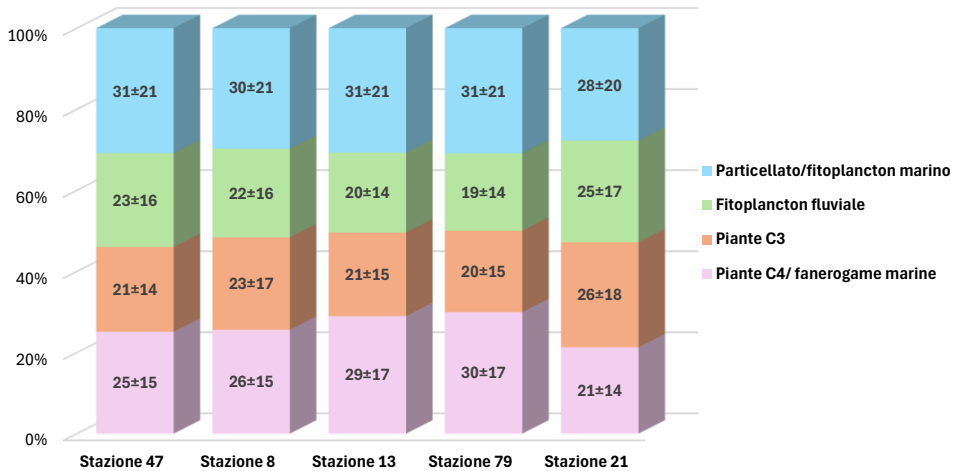
In figura 4.4 è mostrata la distribuzione dei valori di  $\delta^{13}\text{C}$  vs  $\delta^{15}\text{N}$  per le quattro firme isotopiche identificate nelle cinque stazioni analizzate. Le stazioni 47, 13 e 79 si raggruppano vicino al particellato/fitoplancton marino, indicando una produzione primaria prevalentemente marina con uno scarso contributo fluviale o terrestre. La stazione 21 si colloca a metà strada tra fitoplancton marino e fluviale, in una zona di miscelazione dove risultano significativi sia i contributi terrestri sia quelli fitoplanctonici marini. La stazione 8, invece, si distingue dalle altre: il valore di  $\delta^{13}\text{C}$  (-22.806 ‰) è simile a quello marino, mentre il  $\delta^{15}\text{N}$  (2.503 ‰) è molto basso, suggerendo un possibile apporto di materia organica differente o processi di degradazione batterica specifici in quell'area [29].

**Fig. 4.4 – Plot bidimensionale Isource  $\delta^{13}\text{C}$  vs  $\delta^{15}\text{N}$  delle stazioni studiate (media e deviazione standard) con valori per diversi end-member per il Mare Adriatico**



In figura 4.5 è riportato l'istogramma che mostra il contributo delle diverse firme isotopiche in ciascuna delle cinque stazioni considerate, calcolato mediante il software IsoSource. Questo permette di quantificare la frazione di materia organica proveniente da ciascuna fonte in ognuna delle stazioni.

**Fig. 4.5 – Contributo in percentuale delle diverse firme isotopiche presenti in ogni stazione studiata e relativa deviazione standard, stimato con il modello di mescolamento IsoSource**



I risultati mostrano che tutte le stazioni presentano una composizione eterogenea della materia organica. La componente predominante è il particellato/fitoplancton marino, con circa il 30 % in tutte le stazioni. Il fitoplancton fluviale e le piante C<sub>3</sub> contribuiscono ciascuno per il 20-25 %, mentre le piante C<sub>4</sub>/fanerogame marine, inizialmente considerate trascurabili, osservando il grafico precedente, raggiungono percentuali tra 25 e 30 %, con il massimo per la stazione 79.

Di conseguenza, la stazione 79 risulta la meno influenzata da apporti fluviali e terrestri, mentre la stazione 21 mostra un contributo maggiore fitoplancton fluviale e materia vegetale C<sub>3</sub>. Le stazioni 47, 13 e 8 presentano invece una composizione tipica delle zone costiere, dove la produzione marina si mescola con detriti terrestri.

---

## 5 Conclusioni

L'obiettivo principale del presente studio è stato la messa a punto e la validazione di un protocollo di acidificazione, ottimizzato per l'analisi elementare e isotopica del carbonio mediante il sistema EA-IRMS. Il protocollo mira a garantire la completa rimozione del carbonio inorganico minimizzando al contempo la perdita di carbonio organico labile ed il frazionamento isotopico dell'azoto.

Sono stati testati, nel presente studio, 4 diversi metodi di acidificazione utilizzando sia materiali di riferimento certificati, il PACS-1 e il MESS-2, per valutare le performance strumentali e l'accuratezza/precisione dei metodi, sia alcuni sedimenti ambientali marini di diversa tipologia, per valutare l'applicabilità e la trasferibilità dei metodi testati in condizioni di laboratorio reali e verosimili per le analisi di caratterizzazione ambientale.

Per il PACS-1, l'acidificazione con tutti i metodi testati, non ha prodotto variazioni significative nel contenuto di carbonio, confermando l'assenza di carbonati in questo materiale (TIC sotto il limite di quantificazione). Il  $\delta^{13}\text{C}$  ha confermato tale evidenza, con valori stabili nell'intorno di  $-23,15\text{‰}$ .

Per il MESS-2, invece, tutti i trattamenti hanno causato una netta diminuzione del carbonio totale (circa il 30-40 % di perdita), rivelando una frazione inorganica significativa ( $\sim 0,7\%$  TIC). Il valore di  $\delta^{13}\text{C}$  è passato da  $-18,02\text{‰}$  (segnale misto) a  $-25,65\text{‰}$ , valore tipico della sostanza organica costiera.

Relativamente ai metodi di acidificazione testati, il METODO\_3 è quello che ha fornito performance analitiche migliori. I risultati hanno infatti evidenziato come già dalla prima aggiunta di acido cloridrico (1N), i valori del  $\delta^{13}\text{C}$  tendono a diminuire per poi rimanere costanti nelle aggiunte di acido successive. Questo protocollo risulta operativamente solido ed applicabile con facilità nelle condizioni laboratoristiche standard qualora si operi con sedimenti marini ambientali. La prima aggiunta di un'esigua quantità di acido a concentrazione non troppo elevata (1N) consente infatti la rimozione "controllata" dei carbonati, mantenendo l'effervescenza monitorata e non tale da disperdere quantità di sedimento fuori dalle capsule. Le aggiunte successive garantiscono poi un'efficienza di rimozione anche in sedimenti caratterizzati da un'elevato contenuto carbonatico o da matrici mineralogicamente complesse.

Anche per i sedimenti marini ambientali, l'uso di HCl ha ridotto le concentrazioni di carbonio in tutti i campioni, con effetti più marcati nei sedimenti 1 e 3, ricchi di carbonati. Il METODO\_2 con acido a concentrazione 6 N ha permesso di raggiungere il plateau isotopico più velocemente rispetto all'acido più diluito utilizzato nel METODO\_1.

---

Nonostante i trattamenti, il sedimento 4 ha mantenuto valori di  $\delta^{13}\text{C}$  poco negativi, suggerendo la presenza di carbonati refrattari probabilmente associati alla matrice silicatica, richiedendo potenzialmente l'uso di acido fluoridrico per una rimozione totale.

Il protocollo ottimizzato, seguendo il METODO\_3, è idoneo per l'applicazione su sedimenti marini, fornendo una base analitica solida per l'analisi dei casi studio reali nel Mare Adriatico, mostrando dei limiti reali solamente in sedimenti caratterizzati da matrici molto complesse e con presenza rilevante di silicati. Per questi sedimenti, sebbene non molto comuni, ulteriori approfondimenti sono richiesti per la messa a punto di un protocollo ottimale che deve ragionevolmente comprendere aggiunte anche di acido fluoridrico per la dissoluzione della matrice silicea.

Per quanto riguarda la composizione e l'origine della sostanza organica sedimentaria nel Mare Adriatico centrale e meridionale, i risultati dimostrano che questa è il risultato dell'interazione tra apporti fluviali, produttività biologica marina, dinamiche di trasporto sedimentario e processi diagenetici.

Le concentrazioni di TOC diminuiscono con la profondità, indicando una degradazione selettiva della frazione più labile e una progressiva preservazione della componente refrattaria.

Si evidenzia l'importanza dei sedimenti adriatici come serbatoio di carbonio e archivio delle condizioni ambientali, sottolineando la necessità di approcci integrati e di indagini su scala spaziale più ampia per una comprensione più completa dei processi biogeochimici del bacino.

Il protocollo di acidificazione validato fornisce una base analitica solida per futuri studi di monitoraggio ambientale e per la comprensione dei cicli biogeochimici a scala di bacino. Ulteriori ricerche potrebbero estendere tale approccio all'analisi di altre classi di composti organici specifici, al fine di affinare la risoluzione spaziale e temporale degli "archivi sedimentari" qui analizzati.

---

## 6 Bibliografia

- [1] Baldock J.A., Nelson P.N., 2000. *Soil Organic matter*, in Sumner, M.E. (Editor-in-chief), 2000 *Handbook of Soil Science*. CRC Press, Boca Raton USA.p 825 - 884. [https://www.researchgate.net/publication/304716463\\_Soil\\_Organic\\_matter](https://www.researchgate.net/publication/304716463_Soil_Organic_matter)
- [2] Bisutti I., Hilke I., Raessler M., 2004. *Determination of total organic carbon – an overview of current methods*, Trends Anal. Chem., vol. 23, fasc. 10–11, pp. 716–726, doi: 10.1016/j.trac.2004.09.003.
- [3] UNI EN 13137:2002 - UNI Ente Italiano di Normazione. *Caratterizzazione dei rifiuti - Determinazione del carbonio organico totale (TOC) in rifiuti, fanghi e sedimenti*.
- [4] UNI EN 15936:2022 - UNI Ente Italiano di Normazione. *Suolo, rifiuti, biorifiuti trattati e fanghi - Determinazione del carbonio organico totale (TOC) mediante combustione secca*.
- [5] Schumacher B., 2002. *Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments: ecological risk assessment support center*. Method NCEA-C-1282: United States Environmental Protection Agency. 1-23.
- [6] Chen J.-S., Chiu C.-Y., 2003. *Characterization of soil organic matter in different particle-size fractions in humid subalpine soils by CP/MAS 13C NMR*, Geoderma, vol. 117, fasc. 1–2, pp. 129–141. doi: 10.1016/S0016-7061(03)00160-5.
- [7] Rumpel C., Knicker H., Kögel-Knabner I., Skjemstad J. O., Hüttl R. F., 1998. *Types and chemical composition of organic matter in reforested lignite-rich mine soils*, Geoderma, vol. 86, fasc. 1–2, pp. 123–142, doi: 10.1016/S0016-7061(98)00036-6.
- [8] Rumpel C., Janik L. J., Skjemstad J. O., Kögel-Knabner I., 2001. *Quantification of carbon derived from lignite in soils using mid-infrared spectroscopy and partial least squares*, Org. Geochem, vol. 32, fasc. 6, pp. 831–839, doi: 10.1016/S0146-6380(01)00029-8.
- [9] Schulte E. E., Hopkins B. G., 1996. *Estimation of Soil Organic Matter by Weight Loss-On-Ignition*, in *Soil Organic Matter: Analysis and Interpretation*, John Wiley & Sons Ltd, pp. 21–31. doi: 10.2136/sssaspepub46.c3.
- [10] Broadbent F.E., 1953. *The Soil Organic Fraction*, in Norman A.G. (Editor): *Advances in Agronomy*, vol. 5, Academic Press, 1953, pp. 153–183. ISBN 9780120007059, doi: 10.1016/S0065-2113(08)60229-1.
- [11] Walkley A., Black I.A., 1934. *An Examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method*. Soil Science, 37, 29-38. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>

- 
- [12] Tiessen H., Moir J.O., 1993. *Total and organic carbon*, in *Soil Sampling and Methods of Analysis*, Ed. Lewis Publishers., vol. p. 187-211, Ann Arbor MI, 1993. doi: 10.1201/9781420005271.
- [13] Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A., Loeppert R.H., Soltanpour P.N., Tabatabai M.A., Johnston C.T., Sumner M.E. (Editors), 1996. *Methods of Soil Analysis*, 1<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, Ltd, 1996. Print ISBN:9780891188254, Online ISBN:9780891188667, doi: 10.2136/sssabookser5.3.
- [14] ISO 10694:1995 - UNI Ente Italiano di Normazione. *Soil quality — Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)*.
- [15] Cicero A.M., Di Girolamo I. (Editori), 2001. *Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003). Metodologie analitiche di riferimento*. ICRAM-Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Servizio Difesa Mare.
- [16] Smith B.R., 2024. *Carbon isotopes*, EBSCO. Consultato: 18 febbraio 2026. [Online]. Disponibile su: <https://www.ebsco.com/research-starters/physics/carbon-isotopes#significance-for-climate-change>
- [17] Hoffman D. W., Rasmussen C., 2022. *Absolute Carbon Stable Isotope Ratio in the Vienna Peedee Belemnite Isotope Reference Determined by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy*, *Anal. Chem.* 2022, vol. 94, fasc. 13, pp. 5240–5247. doi: 10.1021/acs.analchem.1c04565.
- [18] Michener R., Lajtha K., 2007. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, 1<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2007. doi: 10.1002/9780470691854.
- [19] Galimov E., 2012. *The Biological Fractionation of Isotopes*. Academic Press, eBook ISBN: 9780323157858
- [20] Freudenthal T., Wagner T., Wenzhöfer F., Zabel M., Wefer G., 2001. *Early diagenesis of organic matter from sediments of the eastern subtropical Atlantic: evidence from stable nitrogen and carbon isotopes*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 65, fasc. 11, pp. 1795–1808, giu. 2001, doi: 10.1016/S0016-7037(01)00554-3.
- [21] Rumolo P., Barra M., Gherardi S., Marsella E., Sprovieri M., 2011. *Stable isotopes and C/N ratios in marine sediments as a tool for discriminating anthropogenic impact*, *J. Environ. Monit.*, vol. 13, fasc. 12, p. 3399, 2011, doi: 10.1039/c1em10568j.
- [22] Hoefs J., 2021. *Isotope Fractionation Processes of Selected Elements*, in *Stable Isotope Geochemistry*, J. Hoefs, A c. di, Cham: Springer International Publishing, 2021, pp. 49–265. doi: 10.1007/978-3-030-77692-3\_2.
- [23] Clark I. D., Fritz P., 1997. *Environmental Isotopes in Hydrogeology*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York. eBook ISBN 9780429069574. <https://doi.org/10.1201/9781482242911>

- 
- [24] O'Leary M. H., 1988. *Carbon Isotopes in Photosynthesis*, BioScience, vol. 38, fasc. 5, pp. 328–336, 1988, doi: 10.2307/1310735.
- [25] Peterson B. J., Fry B., 1987. *Stable Isotopes in Ecosystem Studies*, Annu. Rev. Ecol. Syst., vol. 18, pp. 293–320.
- [26] 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 modeling approaches*, Soil Biol. Biochem., vol. 105, pp. 121–137, feb. 2017, doi: 10.1016/j.soilbio.2016.11.015.
- [27] National Research Council Canada (NRC). (1999). PACS-1 (Marine Sediment Reference Material) – Certificate of Analysis. Ottawa, Canada: NRC Institute for Marine Biosciences.
- [28] National Research Council Canada (NRC). (2007). MESS-2 (Marine Sediment Reference Material) – Certificate of Analysis. Ottawa, Canada: NRC Institute for Marine Biosciences.
- [29] Berto D., Rampazzo F., Noventa S., Cacciatore F., Gabellini M., Bernardi Aubry F., Girolimetto A., Boscolo Brusà R., 2013. *Stable carbon and nitrogen isotope ratios as tools to evaluate the nature of particulate organic matter in the Venice lagoon*, Estuar. Coast. Shelf Sci., vol. 135, pp. 66–76. doi: 10.1016/j.ecss.2013.06.021.
- [30] Faganeli J., Pezdic J., Ogorelec B., Mišič M., Najdek M., 1994. *The origin of sedimentary organic matter in the Adriatic*, Continental Shelf Research, Volume 14, Issue 4, pp. 365–384, ISSN 0278-4343, [https://doi.org/10.1016/0278-4343\(94\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0278-4343(94)90024-8).
- [31] Spagnoli F., Dell'Anno A., De Marco A., Dinelli E., Fabiano M., Gadaleta M. V., Ianni C., Loiacono F., Manini E., Marini M., Mongelli G., Rampazzo G., Rivaro P., Vezzulli L., 2010. *Biogeochemistry, grain size and mineralogy of the central and southern Adriatic Sea sediments: a review*. Chemistry and Ecology, 26(sup1), 19–44. <https://doi.org/10.1080/02757541003689829>
- [32] Ogrinc N., Fontolan G., Faganeli J., Covelli S., 2005. *Carbon and nitrogen isotope compositions of organic matter in coastal marine sediments (the Gulf of Trieste, N Adriatic Sea): indicators of sources and preservation*, Mar. Chem., vol. 95, fasc. 3–4, pp. 163–181. doi: 10.1016/j.marchem.2004.09.003.
- [33] Blair N.E., Leithold E.L., Ford S. T., Peeler K. A., Holmes J. C., Perkey D. W., 2003. *The persistence of memory: the fate of ancient sedimentary organic carbon in a modern sedimentary system*, Geochim. Cosmochim. Acta, vol. 67, fasc. 1, pp. 63–73. doi: 10.1016/S0016-7037(02)01043-8.
- [34] Tesi T., Langone L., Goñi M. A., Turchetto M., Miserocchi S., Boldrin A., 2008. *Source and composition of organic matter in the Bari canyon (Italy): Dense water cascading versus particulate export from the upper ocean*, Deep Sea Res.

- 
- Part Oceanogr. Res. Pap., vol. 55, fasc. 7, pp. 813–831. doi: 10.1016/j.dsr.2008.03.007.
- [35] Pettit D. R. E., 2008. Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: their importance in soil fertility and plant health. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:15995040>
- [36] De Marco R., Annibaldi A., Avanzato G., Berto D., Calace N., Coci M., et al. 2024. *PER24 – Pollutants' Environmental Research 2024 – Cruise Final Report*. Book. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.27877488.v1>
- [37] Tesi T., Misericchi S., Goñi 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)*, Estuar. Coast. Shelf Sci., vol. 73, fasc. 3–4, pp. 431–446. doi: 10.1016/j.ecss.2007.02.008.
- [38] Tesi T., Misericchi S., Langone L., Boni L., Guerrini F., 2006. *Sources, Fate and Distribution of Organic Matter on the Western Adriatic Continental Shelf, Italy*, Water Air Soil Pollut. Focus, vol. 6, fasc. 5, pp. 593–603. doi: 10.1007/s11267-006-9044-3.
- [39] Giordani P., Helder W., Koning E., Misericchi S., Danovaro R., Malaguti A., 2002. *Gradients of benthic–pelagic coupling and carbon budgets in the Adriatic and Northern Ionian Sea*, J. Mar. Syst., vol. 33–34, pp. 365–387., doi: 10.1016/S0924-7963(02)00067-2.
- [40] Phillips D.L., Gregg J.W., 2003. *Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources*, Oecologia, vol. 136, fasc. 2, pp. 261–269. doi: 10.1007/s00442-003-1218-3.
- [41] Parnell A.C., Inger R., Bearhop S., Jackson A.L., 2010. *Source Partitioning Using Stable Isotopes: Coping with Too Much Variation*, PLoS ONE, vol. 5, fasc. 3, p. e9672. doi: 10.1371/journal.pone.0009672.
- [42] Smith B.N., Epstein S., 1971. *Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios for higher plants*. Plant Physiology, 47(3), 380–384. doi: 10.1104/pp.47.3.380
- [43] Vizzini S., Sarà G., Mateo M. A., Mazzola A., 2003.  *$\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  variability in *Posidonia oceanica* associated with seasonality and plant fraction*. Aquatic Botany 76(3) 195–202. doi: 10.1016/S0304-3770(03)00052-4
- [44] Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubick K.T., 1989. *Carbon isotope discrimination and photosynthesis*. Annual Review of Plant Biology, 40 (1), 503–537. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002443>
- [45] Finlay J.C., 2001. *Stable-carbon-isotope ratios of river biota: implications for energy flow in lotic food webs*. Ecology, 82: 1052–1064. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082) [1052: SCIROR]2.0.CO;2
- [46] Hecky R.E., Hesslein R.H., 1995. *Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis*. Journal of the North American

---

Benthological Society, 14 (4), 631-653. Published By: The University of Chicago Press. <https://doi.org/10.2307/1467546>

- [47] Montoya J.P., McCarthy M.D., Voss M., 2002. *Stable isotopes in marine plankton: dynamic tracers of ecological and biogeochemical processes*. In *Handbooks of Environmental Isotope Geochemistry*. Elsevier.

**QUADERNI**  
LABORATORIO

**010** /2026