

# Izotopi dušika u istraživanju okoliša

---

Kreč, Hrvoje

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Geotechnical Engineering / Sveučilište u Zagrebu, Geotehnički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:130:986149>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Geotechnical Engineering - Theses and Dissertations](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
GEOTEHNIČKI FAKULTET

HRVOJE KREČ

IZOTOPI DUŠIKA U ISTRAŽIVANJU OKOLIŠA

ZAVRŠNI RAD

VARAŽDIN, 2021.

Sazivam članove ispitnog povjerenstva  
za 16. 07. 2021. u 9 sa  
Obranu ovog rada kandidat će vršiti i pred  
ispitnim povjerenstvom u Varaždinu  
Varaždin, 02. 07. 2021.

Predsjednik  
ispitnog povjerenstva:

izr. prof. dr. sc. Sanja Karac

#### Članovi povjerenstva

- 1) Prof. dr. sc. Sanja Kapelj
- 2) izr. prof. dr. sc. Anja Prizak Sivčić
- 3) izr. prof. dr. sc. Hrvoje Meaški

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
GEOTEHNIČKI FAKULTET

ZAVRŠNI RAD

IZOTOPI DUŠIKA U ISTRAŽIVANJU OKOLIŠA

KANDIDAT:

Hrvoje Kreč

*Kreč*

MENTOR:

Prof.dr.sc.SanjaKapelj

VARAŽDIN, 2021.



## ZADATAK ZA ZAVRŠNI RAD

Pristupnik: HRVOJE KREČ

Matični broj: 2759 - 2016./2017.

### NASLOV ZAVRŠNOG RADA:

IZOTOPI DUŠIKA U ISTRAŽIVANJU OKOLIŠA

Rad treba sadržati:

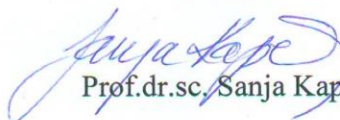
1. Uvod
2. Izotopi
3. Porijeklo izotopa dušika u okolišu
4. Metode i mjerenja
5. Primjena stabilnih izotopa dušika na primjerima
6. Zaključak

Pristupnik je dužan predati mentoru jedan uvezen primjerak završnog rada sa sažetkom. Vrijeme izrade završnog rada je od 45 do 90 dana.

Zadatak zadan: 08.03.2021.

Rok predaje: 02.07.2021.

Mentor:

  
Prof.dr.sc. Sanja Kapelj



Predsjednik Odbora za nastavu:

  
Izv.prof.dr.sc. Sanja Kovač



## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Izjavljujem i svojim potpisom potvrđujem da je završni rad pod naslovom:

### IZOTOPI DUŠIKA U ISTRAŽIVANJU OKOLIŠA

rezultat mog vlastitog rada koji se temelji na istraživanjima te objavljenoj i citiranoj literaturi te je izrađen pod mentorstvom **prof.dr.sc. Sanje Kapelj**.

Izjavljujem da nijedan dio rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz necitiranog rada te da nijedan dio rada ne krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem također, da nijedan dio rada nije iskorišten za bilo koji drugi rad u bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili obrazovnoj ustanovi.

U Varaždinu, 29.06.2021.

Hrvoje Kreč  
(Ime i prezime)



---

(Vlastoručni potpis)

## **IZJAVA MENTORA O POSTOTKU SLIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA S VEĆ OBJAVLJENIM RADOVIMA**

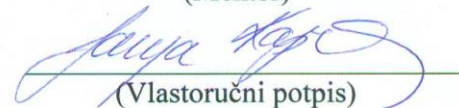
Izjavljujem i svojim potpisom potvrđujem da je završni rad pod naslovom:

### **IZOTOPI DUŠIKA U ISTRAŽIVANJU OKOLIŠA**

pregledan anti-plagijat programskim paketom PlagScan te da postotak sličnosti cjelovitog završnog rada, s već objavljenim radovima, ne prelazi 20%, kao i da pojedinačni postotak sličnosti završnog rada sa svakom literaturnom referencom pojedinačno ne prelazi 5%.

U Varaždinu, 29.06.2021.

Prof. dr. sc. Sanja Kapelj  
(Mentor)

  
(Vlastoručni potpis)

## SAŽETAK

Onečišćenje raznih sastavnica okoliša poput tla, atmosfere i površinskih, oceanskih i podzemnih voda nitratima postalo je jedan od glavnih problema okoliša. Posljednjih desetljeća, korištenje raznih izotopskih metoda poput korištenje dušikovih izotopa pokazalo se kao učinkovit način otkrivanja uzroka onečišćenja okoliša. Kompleksnost izotopske frakcionacije ograničava ove metode. U ovom radu opisane su neke metode i dani primjeri primjene izotopskih metoda na raznim sastavnicama okoliša.

Ključne riječi: dušik, izotopi dušika, masena spektrometrija, ciklus kruženja dušika

## ABSTRACT

Pollution of various environmental components such as soil, atmosphere, surface water, oceans and groundwater by nitrates has become one of the main environmental problems. In recent decades, the use of various isotopic methods such as nitrogen isotopes has proven to be an effective way to detect the causes of environmental pollution. The complexity of isotopic fractionation limits these methods. This paper describes some methods and gives examples of how isotopic methods can be used for various components of the environment.

Keywords: nitrogen, nitrogen isotopes, mass spectrometry, nitrogen cycle



# SADRŽAJ

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | UVOD .....   | 1  |
| 2.     | IZOTOPI .....  | 2  |
| 2.1.   | Općenito o izotopima .....   | 2  |
| 2.2.   | Izotopi dušika .....   | 2  |
| 3.     | PORIJEKLO IZOTOPA DUŠIKA U OKOLIŠU .....                                       | 4  |
| 3.1.   | Kruženje dušika u prirodi .....  | 5  |
| 3.2.   | Tlo .....  | 7  |
| 3.3.   | Površinske i podzemne vode .....   | 10 |
| 3.4.   | Oceani i mora .....  | 11 |
| 4.     | METODE I TEHNIKE MJERENJA .....  | 14 |
| 4.1.   | Masena spektrometrija izotopa (IRMS) .....                                     | 14 |
| 4.2.   | Izotopska frakcionacija .....  | 15 |
| 4.2.1. | Ravnotežna frakcionacija .....   | 15 |
| 4.2.2. | Kinetička frakcionacija .....  | 15 |
| 4.3.   | Analitičke metode .....  | 16 |
| 4.3.1. | Metoda izmjene iona .....  | 16 |
| 4.3.2. | Metoda denitrifikacije .....   | 16 |
| 4.3.3. | Metoda redukcije cd-azida .....  | 16 |
| 4.4.   | Uzorkovanje za mjerenja $\delta^{15}\text{N}$ .....                            | 17 |
| 4.4.1. | Čvrste čestice .....   | 17 |
| 4.4.2. | Nitrati i nitriti .....  | 17 |
| 4.4.3. | Amonij .....   | 18 |
| 4.4.4. | Ionske smole .....   | 18 |
| 4.4.5. | Dušikov (I) oksid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) i dinitrogen ( $\text{N}_2$ ) ..... | 18 |
| 5.     | PRIMJENA STABILNIH IZOTOPA DUŠIKA NA PRIMJERIMA .....                          | 20 |
| 5.1.   | Podzemne vode .....  | 20 |
| 5.2.   | Površinske vode .....  | 21 |
| 5.3.   | Povremeno poplavljene ravnice .....  | 23 |
| 5.4.   | Optimizacija korištenja gnojiva .....  | 23 |
| 6.     | ZAKLJUČAK .....  | 25 |
|        | LITERATURA .....   | 26 |
|        | POPIS SLIKA .....  | 28 |
|        | POPIS TABLICA .....  | 28 |

## 1. UVOD

Dušik ima dva stabilna i 14 radioaktivnih izotopa s poluživotom manjim od 10 minuta. Stabilni dušikovi izotopi  $^{15}\text{N}$  i  $^{14}\text{N}$  imaju korisnu primjenu za praćenje ciklusa dušika u ekosustavima i traženja izvora dušika u površinskim i podzemnim vodama. Glavna onečišćivala površinskih i podzemnih voda u svijetu su nitrati. Brojna istraživanja pokazala su da je jedan od najučinkovitijih načina kontrole onečišćenja nitratima upravo identificiranje izvora onečišćenja te smanjivanje unosa nitrata. Dušik je od iznimne važnosti kod rasta biljaka, te jedan od glavnih elemenata u procesu fotosinteze. Unosom dušikovitih gnojiva u tlo omogućava se bolji rast biljaka, no prekomjerna količina gnojiva otjecanjem odlazi u površinske i podzemne vode ili ispari u atmosferu. Metodama stabilnih izotopa dušika moguće je odrediti optimalnu količinu gnojiva te smanjiti zagađenje i troškove uzrokovane prevelikom količinom gnojiva. U ovom radu opisani su postupci mjerenja stabilnih izotopa dušika i njihova primjena u istraživanju okoliša.

## 2. IZOTOPI

### 2.1. Općenito o izotopima

Pojam izotopa kao atoma koji u periodnom sustavu zauzimaju isto mjesto, a razlikuju se po masenom broju uveo je Frederick Soddy 1913. godine (grč. isos - isti, topos - mjesto). Zbog različitog broja neutrona nemaju ista svojstva, tj. izotopni efekt. Prirodni kemijski elementi uglavnom su smjese izotopa [1].

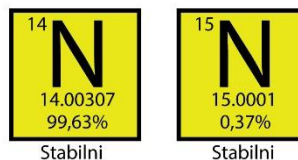
Ukupno je 263 stabilnih izotopa u 81 elementu. Ostali izotopi su radioaktivni i imaju vrijeme raspada, tj. poluraspada [2].

Ugljik, vodik, kisik, sumpor i dušik čine glavninu živih bića i svi imaju više od jednog stabilnog izotopa. Analiza omjera stabilnih izotopa daje dvije vrste informacija: podatke o frakcioniranju i izvorne informacije, tj. podatke kod kojih nam omjeri stabilnih izotopa govore o podrijetlu uzorka. Stabilni izotopi se stoga mogu koristiti u proučavanju vodenih ekosustava, te kada se istražuju sustavi površinskih i podzemnih voda mogu nam odgovoriti na pitanja koja se odnose na:

- biljne i životinjske ekofiziologije
- trofičke strukture
- interakcije između ekosustava
- hidrologiju i hidrogeologiju

### 2.2. Izotopi dušika

Dušik ima dva stabilna izotopa,  $^{14}\text{N}$  i  $^{15}\text{N}$ . Od ta dva stabilna izotopa dušika lakši  $^{14}\text{N}$  je zastupljeniji i obuhvaća 99,63% dušika u prirodi (slika 1.).



Slika 1. Zastupljenost izotopa dušika u prirodi, Preuzeto sa: <http://web.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html>, Datum pristupa: 10. svibanj 2021.

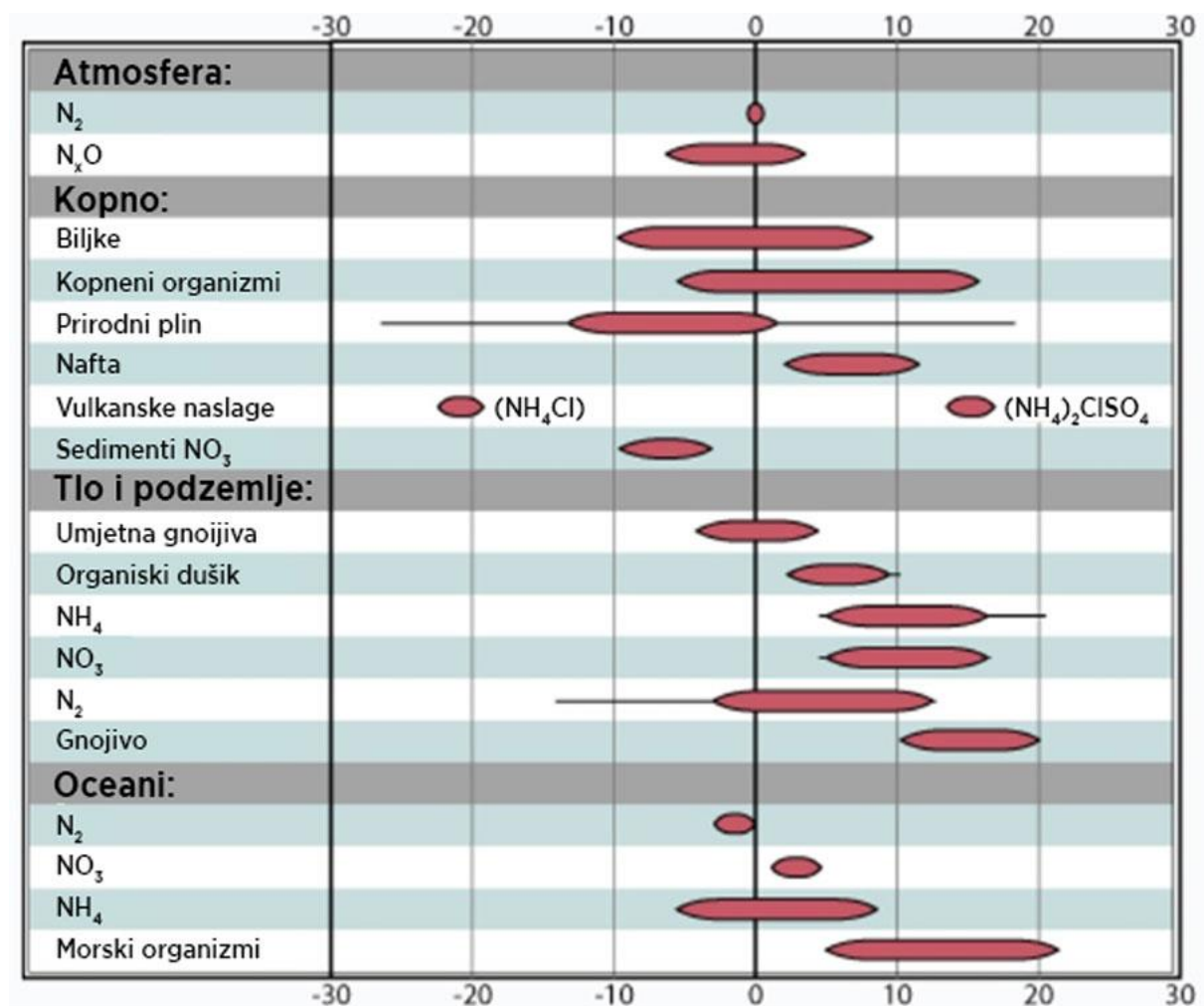
Atmosfera je najveći rezervoar dušika, a omjer težeg i lakšeg izotopa  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  iznosi 0,0036765. Zbog inertnosti molekularnog dušika taj je omjer stalan [3].

Svi dušikovi spojevi sadrže oba izotopa, ali zbog izotopske frakcionacije ugrađuju se u spojeve u različitim omjerima, ovisno o prirodi reakcija koje proizvode spojeve. Na primjer, dok se dušikovi spojevi prenose prehrambenim lancem, lakši se izotopi izlučuju urinom, a teži izotopi se zadržavaju. Dušik u životinjskom otpadu pretvara se u amonijak, a zatim u nitrat. Tijekom ovog postupka u nastalim nitratima koncentrira se veći dio težeg izotopa.

Kada se različiti izvori dušikovitih spojeva pomiješaju u površinskom otjecanju ili u vodenom tijelu, omjer lakših i težih izotopa dušika u vodi može se koristiti za procjenu relativnog udjela različitih izvora. Prirodna varijacija ovih izotopa korisna je za praćenje ciklusa dušika u ekosustavima i za traženje izvora dušika u površinskim i podzemnim vodama[4].

### 3. PORIJEKLO IZOTOPA DUŠIKA U OKOLIŠU

Svi dušični spojevi sadrže oba stabilna izotopa dušika  $^{14}\text{N}$  i  $^{15}\text{N}$ , ali se zbog izotopske frakcionacije ugrađuju u spojeve u različitim omjerima, ovisno o prirodi reakcija koje proizvode spojeve. Na primjer, dok se dušikovi spojevi prenose prehrambenim lancem, lakši izotopi izlučuju se mokraćom, a teži izotopi se zadržavaju. Dušik u životinjskom otpadu hidrolizira se u amonijak, a zatim pretvara u nitrat. Tijekom ovog postupka se u nastalim nitratima koncentrira veći dio teškog izotopa. Svaka kategorija izvora nitrata ima prepoznatljiv izotopski potpis, tj. omjer  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  [3].



Slika 2.  $\delta^{15}$  vrijednosti u odnosu na atmosferski  $\text{N}_2$ , Preuzeto sa: <http://web.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html>, Datum pristupa: 10. svibanj 2021.

### 3.1. Kruženje dušika u prirodi

Dušik ili N, element je bez boje i mirisa. Dušik je u tlu pod našim nogama, u vodi koju pijemo i u zraku koji udišemo. Sa udjelom od 78% dušik je najzastupljeniji element u Zemljinoj atmosferi. Dušik je važan za sva živa bića uključujući i nas. Velika mu je uloga i u rastu biljaka. Dušik je neophodan za našu opskrbu hranom, ali višak dušika može štetiti okolišu.

Bez dušičnih gnojiva znanstvenici procjenjuju da bismo izgubili do jedne trećine usjeva na koje se oslanjamo za hranu [5]. Uz previše dušika, biljke proizvode višak biomase ili organskih tvari, poput stabljika i lišća, ali nedovoljnu strukturu korijena. U ekstremnim slučajevima, biljke s vrlo visokom razinom dušika koje apsorbiraju iz tla mogu otrovati domaće i ostale životinje koje ih koriste za hranu. Višak dušika također može ispariti ili odvodnjom ući i zagaditi površinske i podzemne vode. Taj dušik se može nakupiti, te tako dolazi do eutrofikacije.

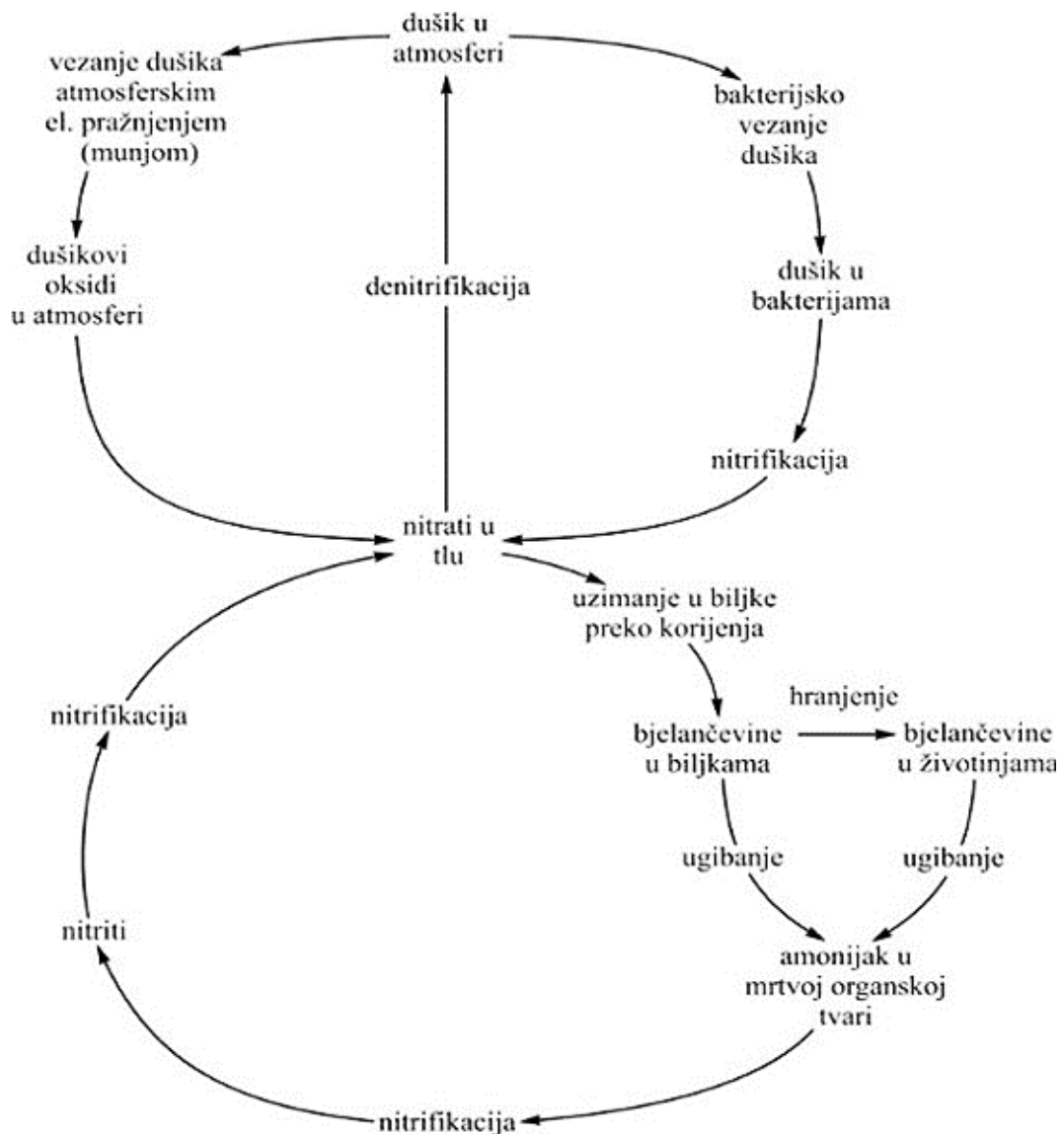
Previše dušika uzrokuje da jezero poprimi zelenu boju uz „procvat“ algi poput fitoplanktona. Kad fitoplanktoni umru, mikrobi u vodi ih razgrađuju. Proces razgradnje smanjuje količinu otopljenog kisika u vodi i to dovodi do stvaranja mrtvih zona koje nemaju dovoljno kisika da podrži većinu oblika života. Organizmi u mrtvoj zoni umiru od nedostatka kisika. Te mrtve zone mogu se dogoditi u slatkovodnim jezerima, a također i obalnom okruženju gdje se rijeke pune hranjivih sastojaka iz poljoprivrednog otjecanja ulijevaju u oceane [5].

Dušik kao dio raznih životnih procesa, pretvara se iz jednom kemijskog oblika u drugi. Transformacije kroz koje dušik prolazi dok se kreće između atmosfere, zemlje i živih bića čine ciklus dušika [6]. Pet je glavnih procesa kruženja dušika u prirodi: fiksacija dušika, asimilacija, mineralizacija dušika, nitrifikacija i denitrifikacija [7].

Fiksacija dušika je proces u kojem se dušik  $N_2$  iz atmosfere kombinira s drugim elementima i tvori reaktivnije dušikove spojeve kao što su amonijak, nitrati i nitriti [8]. Više od 90% ukupne fiksacije dušika u prirodi stvaraju mikroorganizmi [9]. Postoje dvije vrste mikroorganizma koje fiksiraju dušik: nesimbiotske bakterije, uključujući modrozeleno alge; i simbiotske bakterije koje su povezane s mahunastim biljkama i raznim žitaricama. Fiksiranje dušika postiže se i gnojenjem (umjetnim i životinjskim) koje uvelike utječe na kruženje dušika u prirodi.

Asimilacija dušika je pretvaranje nitrata i amonijaka u specifične tkivne spojeve algi i viših biljaka, koje konzumiraju životinje i probavljanjem ih pretvaraju u vlastite tjelesne spojeve [8]. Procesom mineralizacije uginule biljke i životinje su razgrađene, a produkti takve razgradnje su dušikom bogati i biljkama dostupni anorganski spojevi.

Organski dušik obuhvaća oko 90% ukupnog dušika u većini tla. Mineralizacija dušika važan je proces i vitalni dio plodnosti tla. Obrnuti proces mineralizacije je imobilizacija. Tijekom imobilizacije dušikom, mikroorganizmi asimiliraju anorganski dušik za sintezu bjelančevina i drugih organskih spojeva koji sadrže dušik [9].



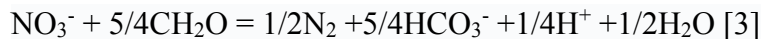
Slika 3. Kruženje dušika u prirodi, Preuzeto sa: <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/nitrogen-mineralization>, Datum pristupa: 19. travanj 2021.

Nitrifikacija je kemijski postupak koji stvara nitrat  $\text{NO}_3^-$  oksidacijom amonijaka  $\text{NH}_4^+$ . Nakon plinovitog  $\text{N}_2$ , nitrat je najstabiljniji oblik dušika i prisutan je u većini podzemnih voda. Nitrifikacija u aerobnim uvjetima:



Denitrifikacija je proces koji se odvija uz nedostatak kisika, gdje nitratni i nitritni dušik, zbog utjecaja denitrifikacijskih bakterija prelazi u slobodni dušik ili dušični oksid.

Denitrifikacija u anaerobnim uvjetima:



### 3.2. Tlo

Glavni izvor dušika u većini ekosustava je atmosfera. Biljke i organizmi fiksiraju dušik, te taj dušik ulazi u tlo. Biološki posredovane reakcije kao nitrifikacija, denitrifikacija i asimilacija dušika snažno kontroliraju dinamiku dušika u tlu. Te reakcije gotovo uvijek rezultiraju obogaćivanjem tj. osiromašenjem vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  [10]. Nitrifikacija nije izravni mehanizam koji uzrokuje obogaćivanje izotopom  $^{15}\text{N}$  u tlu po dubini. Velika pokretljivost nitrata u tlu i mogućnost da će nitrat osiromašen izotopom  $^{15}\text{N}$  ispariti, biti asimiliran od strane mikroba i biljaka ili će biti transformiran u mjesto gdje su preostali nitrati obogaćeni izotopom  $^{15}\text{N}$  otežava procjenu izotopskog doprinosa nitrifikacije u različitim slojevima tla.

S obzirom na veliku pokretljivost nitrata u tlima, najviša vjerojatnost da će nitrat osiromašen izotopom  $^{15}\text{N}$  biti transportiran niz profil tla i ondje se asimilirati ili denitrificirati. Pri vrlo velikim kišama, kad prirodna skladišta dušika u tlu postanu dostupna za denitrifikaciju, dušik se u potpunosti pretvara u  $\text{N}_2$  i  $\text{N}_2\text{O}$ . Kod završetka denitrifikacije nije moguće izotopsko razdvajanje reaktanata i produkata u tlu. U slučaju manjih količina oborina dolazi do nepotpune denitrifikacije te se tlo obogaćuje izotopom  $^{15}\text{N}$  [11].

Ostali izvori dušika u tlu su umjetna i životinjski proizvedena gnojiva. Doprinos vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  u tlu kod umjetnih gnojiva iznosi  $0 \pm 3 \text{ ‰}$ , a kod životinjskog gnojiva od  $+10$  do  $+25 \text{ ‰}$  [10]. Vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  se razlikuju i ovise o vrsti primijenjenog gnojiva, primijenjenoj količini i trajanju primjene gnojiva. Općenito kako se povećava vrijednost

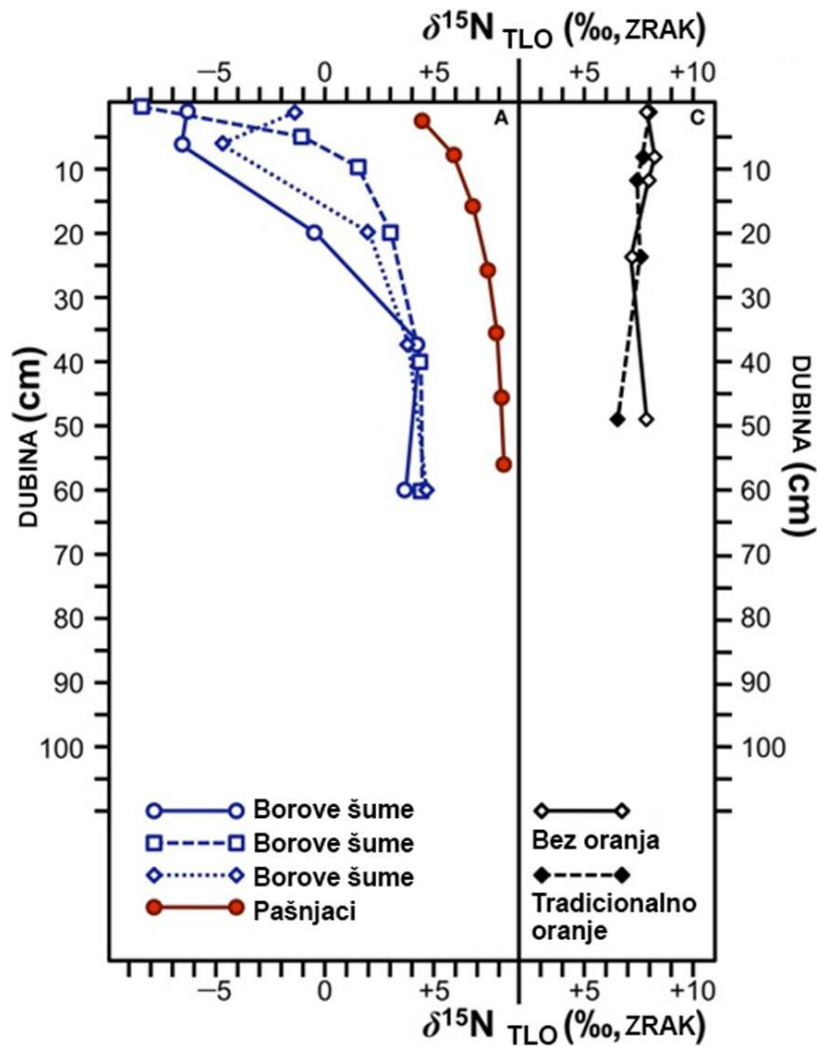


$\delta^{15}\text{N}$  stajskog gnoja, tako se povećava i vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  tla i oplođene biljke. U kojoj mjeri određeno gnojivo djeluje na N izotopski sastav biljke ovisi i o tome kako to gnojivo utječe na transformacije i gubitke (izlaze)  $^{15}\text{N}$ . Za neka gnojiva (poput goveđeg gnojiva) učinak je vrlo malen i  $\delta^{15}\text{N}$  iznosi od +2‰ do +8‰, dok je učinak svinjskog gnojiva od +15‰ do +20‰, a morskih ptica guana između +10‰ i +40‰ [12].

Na ukupan  $\delta^{15}\text{N}$  tla utječu mnogi čimbenici uključujući dubinu tla, vegetaciju, klimu, veličinu čestica itd., međutim dva čimbenika, drenaža i utjecaj otpadnih materijala u tlu imaju glavni utjecaj na vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$ . Tla na zaravnjenim površinama i u blizini slanih procjednih voda imaju veće vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  nego dobro drenirana tla, vjerojatno zato što veća denitrifikacija u močvarnijim područjima rezultira obogaćivanjem težim nitratom. Površinska tla ispod grmlja i drveća često imaju manje vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  od onih na otvorenim površinama gdje se odlaže organski otpad [10].

Oranje tla, uz izravno iznošenje mineraliziranih hranjivih sastojaka na površinu potiče i mineralizaciju organskih tvari. Povećana vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  s dubinom zabilježena je u šumama, travnjacima, tundrama i pašnjacima. Vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  u tlu raste s godinama. Kako se organska tvar podvrgava mineralizaciji, nastali amonij se nitrifikacijom pretvara u nitrat  $\text{NO}_3^-$  te se denitrifikacijom dalje reducira u  $\text{N}_2$ , i tako ostala organska tvar postaje sve više obogaćena sa  $^{15}\text{N}$ . Organska tvar se razgrađuje, smanjuje u količini i putuje/procjeđuje se niz profil tla, stvarajući karakteristični porast  $\delta^{15}\text{N}$  s dubinom. Porast vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  s dubinom primijećeno je u šumama umjerene klime koje su bogate ektomikroznim gljivama [12]. Ektomikrozne gljive poboljšavaju apsorpciju dušika te biljkama koriste za bolju ishranjenost i ubrzavaju mineralizaciju organskih tvari [13]. Na poljoprivrednim zemljištima, vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  s dubinom ne varira toliko kao u šumama.

Na slici 4 možemo vidjeti varijacije vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  u tlu s dubinom u tri borove šume. Prva i treća borova šuma označene plavom bojom se nalaze u Nizozemskoj, dok se treća borova šuma nalazi u Sjedinjenim Američkim Državama. Crvenom bojom označen je pašnjak u Australiji. Crnom ravnom linijom označena su eksperimentalna polja u Kanadi, gdje isprekidana linija predstavlja zemlju koja je preorana, a neiskprekidana linija predstavlja nepreoranu zemlju. Primjećujemo na tom primjeru da nema velike razlike u vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  s dubinom, dok to kod borovih šuma i pašnjaka nije slučaj.



Slika 4. Vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  tla s dubinom, Izvor: *Application of Nitrogen and Oxygen Isotopes for Source and Fate Identification of Nitrate Pollution in Surface Water: A Review*

U procesu čišćenja zemljišta spaljivanjem dolazi do promjena u raspodjeli i kruženju hranjivih sastojaka. Iako spaljivanje rezultira velikim gubicima N, prirodna skladišta dušikovih spojeva u tlu (posebno  $\text{NH}_4^+$ ) znatno se povećavaju nakon izgaranja. Postoji nekoliko razloga za to povećanje: (1) N se dodaje izravno doprinosom izgorjele vegetacije, iako to nije uvijek slučaj jer je sadržaj N u pepelu nizak, (2) povećana temperatura u tlu povećava mineralizaciju organskog N u tlu.

Požari s visokim temperaturama daju malo mogućnosti za frakcioniranje, jer se gotovo sav N gubi u plinovitom obliku, dok požari s niskim temperaturama koji rezultiraju pougljenenim organskim materijalima, a ne pepelom daju veću mogućnost frakcioniranja, a pougljeneni materijal može imati veću vrijednost  $^{15}\text{N}$  u odnosu na neizgorenu vegetaciju. Prema tome, tamo gdje je vegetacija relativno bogata N, a intenzitet požara

relativno nizak, mineralizirani N dobiven iz ove organske tvari može se obogatiti s  $^{15}\text{N}$ . Vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  tla i vegetacije povećavat će se u godinama neposredno nakon gorenja šuma, a potom će se vratiti na razinu prije požara [12].

### 3.3. Površinske i podzemne vode

Uobičajeni izvori nitrata u površinskim i podzemnim vodama su komercijalna gnojiva, životinjski i ljudski otpad, oborine i organski dušik u tlu. Svaka od ovih kategorija izvora nitrata ima prepoznatljiv izotopski omjer  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  [3].

Izotopski sastavi iz različitih izvora dušika razlikuju se ovisno o klimatološkim, geološkim i topografskim uvjetima. Nitrati u tlu s poljoprivrednog zemljišta dolaze u površinske vode procesima poput elucije [14]. Elucija je kemijski proces otapanja tvari adsorbiranih na krutim sredstvima [15]. Utvrđeno je da je vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  u otpadnim vodama poljoprivrednih zemljišta veća kod uporabe svinjskog gnojiva nego kod uporabe anorganskog gnojiva.  $\delta^{15}\text{N}$  u poljoprivrednom zemljištu je frakcioniran, a anorganska i stajska gnojiva glavni su izvori nitrata u otpadnim vodama poljoprivrednih zemljišta. Prilikom prijenosa nitrata dobivenog u atmosferskim oborinama, gnojivima ili prijenosom iz tla u rijeke, utjecajni čimbenici poput mikroorganizama mogu prouzročiti obogaćivanje s  $^{15}\text{N}$ .

Oborine i tlo glavni su izvori nitrata u rijekama koje teku slivovima prekrivenim šumama. Kad je oborina malo, najveći izvor povećanja koncentracije nitratama u rijekama unutar slivova prekrivenih šumama je nitrifikacija u tlu. Dušik u oborinama ne može izravno ući u rijeke jer ga presreće šumsko zemljište, te tako dušik apsorbiraju organizmi u kojima se sintetizira organski dušik. Nitrat će se dobiti mineralizacijom i nitrifikacijom organskog dušika iz tla, te će nitrat iz tla ući u površinske rijeke procesima kao što su elucija i infiltracija. Nakon analiza vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  i  $\delta^{18}\text{O}$  u površinskim vodama u slivu prekrivenom šumom na sjeveroistoku Sjedinjenih Država otkriveno je da je preko 80% nitrata generirano nitrifikacijom dušika u tlu.

Izvor nitrata u površinskim vodama uz gradska zemljišta uglavnom je iz otpadnih voda iz domaćinstava, industrijske kanalizacije, anorganskih/mineralnih i stajskih gnojiva, dušika iz tla i atmosferskih oborina. Glavni čimbenici koji utječu na izmjenu izvora nitrata površinskih voda uz gradska zemljišta su sezonske promjene i ljudske aktivnosti. Zbog

nepropusnih površina, većina oborina odlazi u rijeke, pa sezonska promjena oborina ima velik utjecaj na količinu nitrata u rijekama. Tijekom kišne sezone stopa doprinosa nitrata iz atmosferskih oborina u površinskim rijekama može doseći 50% do 67% [14].

### 3.4. Oceani i mora

Fiksiranje dušika glavni je ulaz biološkog (ili fiksiranog) dušika u ocean. Fiksaciju dušika provode  $N_2$  fiksatori, cijanobakterije i drugi mikroorganizmi koji atmosferski dušik  $N_2$  pretvaraju u amonijak ili srodne dušične spojeve u tlu i vodenim sustavima. Naknadnom remineralizacijom ove biomase, oceani se opskrbljuju novim fiksnim N. Najpoznatiji rod fiksatora  $N_2$  otvorenog oceana su cijanobakterije *Trichodesmium*, te doprinose  $\delta^{15}N$  od  $\sim -2$  do  $+0.5$  ‰. Ostali ulazi fiksnog N u morski okoliš uključuju kopneno otjecanje i atmosferske oborine. Antropogeni ulazi često povećavaju  $\delta^{15}N$  sustava jer potiču denitrifikaciju. Primijećen je širok raspon anorganskog N ( $\sim -16$  do  $10$  ‰) i organskog N ( $\sim -8$  do  $1$  ‰) u atmosferskim ulazima. U površinskom oceanu fitoplanktoni asimiliraju fiksni N (nitrate, amonij, nitrite, ureu i druge organske N spojeve) [16].

Tablica 1. Reprezentativne procjene izotopskih učinaka za procese N ciklusa, Izvor: Nitrogen isotopes in the ocean

| Proces  | Izotopski učinak | Detalji                        |
|---|------------------|--------------------------------|
| <b>Nitrifikacija (<math>NH_4^+ \rightarrow NO_2^-</math>)</b>               | 35‰              | Nitrosomonas europaea          |
|   | 15‰              | Chesapeake Bay                 |
| <b>Denitrifikacija (<math>NO_3^- \rightarrow N_2</math>)</b>                | 28‰              | Paracoccus denitrificans       |
|   | 20-30‰           | Pseudomonas stutzeri           |
|   | 13-21‰           | Pseudomonas denitrificans      |
|   | 20-30‰           | Eastern Tropical North Pacific |
| <b>Fiksacija dušika (<math>N_2 \rightarrow NH_4^+</math>)</b>               | $\sim 0$ ‰       | Trichodesmium sp.              |
|   | $\sim 0$ ‰       | Azotobacter vinlandii          |
| <b><math>NH_4^+</math> asimilacija (<math>NH_4^+ \rightarrow PN</math>)</b> | 20‰              | Skeletonema costatum           |
|   | 20‰              | Mixed culture                  |
|   | 6.5-8.0‰         | Chesapeake Bay                 |
|   | 9.1‰             | Delaware Estuary               |
| <b><math>NO_3^-</math> asimilacija (<math>NO_3^- \rightarrow PN</math>)</b> | 5‰               | Thalassiosira pseudonana       |
|   | 4-6‰             | Antarctic/Subantarctic         |
|   | 5‰               | Subarctic Pacific              |

## Otopljeni dušik

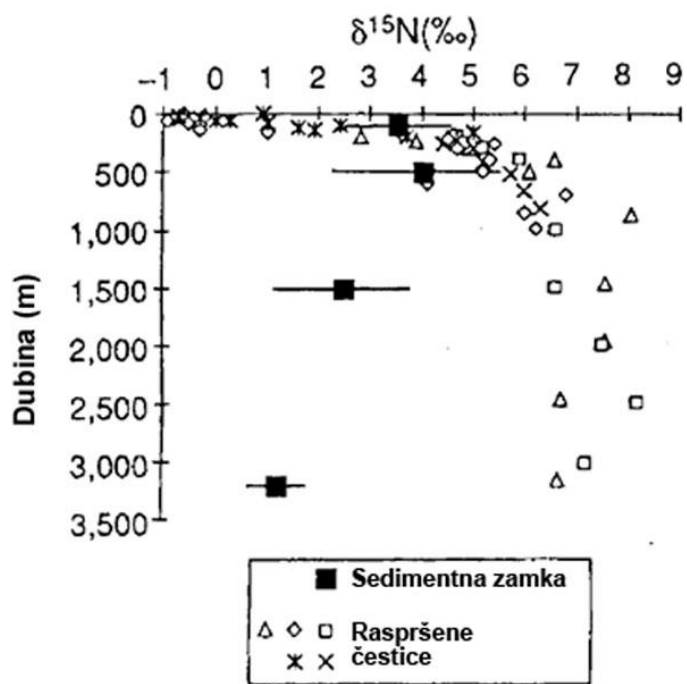
Nitrati najviše doprinose fiksiranom N u oceane. Vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  u oceanima varira između 1 i 20‰ zbog efekata  $\text{N}_2$  fiksacije, asimilacije nitrata i denitrifikacije, dok je ta vrijednost u dubokim oceanima oko 5 ‰ [16]. Asimilacija nitrata pomoću fitoplanktona dovodi do povišenih vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  nitrata u regijama oceana gdje se nitrat nepotpuno troši, te skromno bogaćenje  $^{15}\text{N}$  u nekim područjima novonastalih termoklina, ali ne utječe na vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  u dubokim dijelovima oceana. Nedostatak izotopskih varijacija nitrata dubokog oceana posljedica je toga da u površinskim vodama opskrbu nitrata odozdo gotovo u potpunosti troše fitoplanktoni.

U otvorenoj unutrašnjosti oceana, ispod dubine asimilacije algi, sav amonij generiran iz čestica oksidira u nitrit, a zatim u nitrat prije nego se transportira u određeno područje, dakle, nitrifikacija ima veliku ulogu u dinamici izotopa i čestica otopljenog N. U mješovitom sloju otvorene oceanske površine općenito se pretpostavlja da se amonij generiran remineralizacijom planktonom brzo i u potpunosti asimilira, u tom slučaju izotopski učinak povezan s njegovom potrošnjom ne bi imao važnu ulogu u dinamici izotopa N otvorenog oceana [16].

## Čvrste čestice dušika

Tipičan profil raspršenih čestica ima najmanju vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  u gornjem, površinskom sloju oceana, a povećava se dolje u afotičkoj zoni, to jest u zoni koja je neosvjetljena i nema mogućnost procesa fotosinteze. Niska vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  raspršenih čestica u gornjem sloju oceana ima dva objašnjenja: fiksiranje  $\text{N}_2$  i recikliranje N. Fiksacija  $\text{N}_2$  dodaje 1‰ vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$ . Ispod površine oceana vrijednost  $\delta^{15}\text{N}$  raspršenih čvrstih čestica je oko 6‰ veća nego na površini oceana (slika 5).

Smatra se da raspršene čestice dušika potječu od tonućih čestica, te da je njihov veći  $\delta^{15}\text{N}$  rezultat izotopske diskriminacije tijekom razgradnje i potrošnje od strane bakterija, tj. da su te čestice produkti raspadanja materijala koji dolazi s površine, a bakterije preferiraju remineralizaciju čestica s niskom vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  raspršenih čestica N [16].

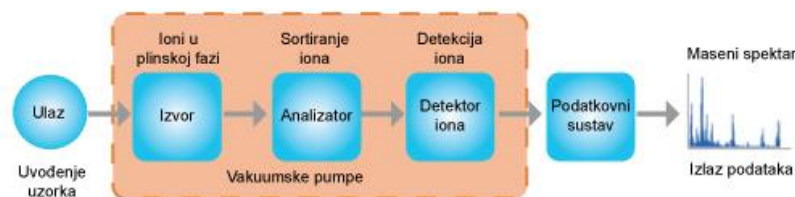


Slika 5. Vrijednosti izotopa dušika u suspendiranim česticama i tonućim česticama, izvor: Nitrogen isotopes in the ocean

## 4. METODE I TEHNIKE MJERENJA

### 4.1. Masena spektrometrija izotopa (IRMS)

Masena spektrometrija razvila se početkom 20.st. i omogućila otkriće stabilnih izotopa kemijskih elemenata. Maseni spektrometar se sastoji od 4 osnovna dijela: sustava za unošenje uzorka, ionskog izvora koji stvara i ubrzava ione u električnom polju, analizatora koji razdvaja putanje iona ovisno o omjerima njihove mase i naboja i detektora u kojem se skupljaju i karakteriziraju razdvojeni ioni (slika 6). [17]



Slika 6. Komponente masenog spektrometra, Preuzeto sa: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/mass-spectrometry.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html), Datum pristupa: 17. svibanj 2021.

Masenom spektrometrijom omjera izotopa (*engl. Isotope Ratio Mass Spectrometry*) možemo izmjeriti omjer izotopa uzorka u odnosu na standard. Postoje dvije osnovne metode IRMS-a: metoda dvostrukog ulaza DI-IRMS (*engl. Dual-inlet Isotope Ratio Mass Spectrometry*) koja je preciznija i sustav kontinuiranog protoka CF-IRMS (*engl. Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry*) koja omogućava unos višekomponentnih uzorka [18].

Analize nitrata rutinski se izvode masenom spektrometrijom. IRMS odvaja ione elemenata ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ) na temelju njihovog različitog omjera masa, tj. naboja. Priprema uzorka sastoji se od pretvaranja krutog ili tekućeg materijala u plin ( $\text{N}_2$ ) i izoliranja određenog plina koji se mora analizirati.[3]

U našem slučaju mjeri se omjer izotopa  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  u odnosu na standard, tj. atmosferski  $\text{N}_2$ . Omjer težeg izotopa  $^{15}\text{N}$  u odnosu na lakši izotop  $^{14}\text{N}$  u zraku iznosi  $0,366765\% \pm 0,00081\%$  [16]. Stabilni izotopski sastav obično se izražava oznakom delta ( $\delta$ ) i jedinicom promil (‰) u odnosu na odgovarajuće međunarodne standarde [14].

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = \left( \frac{R_{\text{uzorak}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000,$$

$$\text{gdje je } R = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$$

U ovom zapisu  $\delta^{15}\text{N}$  atmosferskog  $\text{N}_2$  iznosi 0 ‰.

Pozitivna vrijednost  $\delta$  predstavlja obogaćivanje težim izotopom u ispitivanom uzorku u usporedbi sa standardnim uzorkom pa je uzorak „teži“, a negativna osiromašenje teških izotopa pa kažemo da je uzorak „lakši“ u odnosu na standard [16].

## 4.2. Izotopska frakcionacija

Frakcionacija je rastavljanje izotopa istovrsnog elementa putem kemijskih i fizičkih procesa. Bakterije provode najvažnije procese kod kojih dolazi do frakcionacije, a to su fiksiranje molekularnog dušika (pretvorba otopljenog  $\text{N}_2$  u organske spojeve), nitrifikacija (oksidacija  $\text{NH}_3$  preko  $\text{NO}_2^-$  u  $\text{NO}_3^-$ ) i denitrifikacija (redukcija  $\text{NO}_3^-$  preko  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  i  $\text{N}_2\text{O}$  do molekularnog  $\text{N}_2$ ). Izotopska frakcionacija može biti neravnotežna (kinetička) i ravnotežna [14].

### 4.2.1. Ravnotežna frakcionacija

Ravnotežna frakcionacija se javlja u ravnotežnim reakcijama, dakle reakcije mogu ići u oba smjera, ako je sustav u ravnoteži. Do ravnotežne frakcionacije dolazi zbog razlika u vibracijskoj energiji molekule koja ovisi masi. Brzina napredne reakcije jednaka je brzini povratne reakcije izotopa, što znači da su pri nekoj temperaturi izotopni omjeri jednaki [19]. Teži izotop se koncentrira u spoj ili fazu koji ima najstabilniju vezu. Ravnotežna frakcionacija se obično odnosi na anorganske ionske vrste, tj. nije prisutna u organskim spojevima [20].

### 4.2.2. Kinetička frakcionacija

Kinetička ili neravnotežna izotopska frakcionacija se događa prilikom odvijanja ireverzibilnih reakcija ili kod reakcija gdje je brzina povratne reakcije različita brzini



nastajanja produkata. Kod kinetičke frakcionacije produkti se uvijek obogate lakšim izotopom, a reaktanti težim izotopom. Kinetička frakcionacija se razlikuje od ravnotežne jer kod njih nije moguće da nastanu produkti koji su izotopno teži, to jest izotopno lakši od polaznih reaktanata [19].

Kod dušika, većina frakcionacijskih procesa su kinetički dok su samo difuzija i otapanje  $N_2$  u vodi ravnotežni.

### 4.3. Analitičke metode

#### 4.3.1. Metoda izmjene iona

Metoda ionske izmjene ima tri koraka: transformaciju, pročišćavanje i analizu masenom spektrometrijom. Nitrat se pročišćava i koncentrira propuštanjem uzoraka kroz kolone s ionskim izmjenjivačem, a zatim se istodobno analiziraju vrijednosti  $\delta^{15}N$  i  $\delta^{18}O$  pomoću IRMS-a. Brzina adsorpcije i brzina elucije tijekom transformacije dva su ključna pokazatelja za eksperimentalan rad. Neispravan rad uzrokovat će izotopsku frakcionaciju dušika, što rezultira manjim izmjerenim vrijednostima.

#### 4.3.2. Metoda denitrifikacije

U ovoj metodi određuju se istodobno vrijednosti  $\delta^{15}N$  i  $\delta^{18}O$  iz  $N_2O$ . Ova metoda ima četiri eksperimentalna koraka: selekciju bakterija, uzgoj bakterija, pretvorbu i ekstrakciju  $N_2O$ . Ova metoda ima brojne prednosti, jer je metoda jednostavna i potrebna je mala količina uzorka vode. Metoda denitrifikacije koristi se kao standardna tehnika Geološkog zavoda Sjedinjenih Država za određivanje vrijednosti  $\delta^{15}N$  i  $\delta^{18}O$  nitrata.

#### 4.3.3. Metoda redukcije cd-azida

Metoda redukcije cd-azida, nova je metoda koja može izmjeriti  $\delta^{15}N$  i  $\delta^{18}O$ . U ovoj metodi u uzorak vode dodaje se Cd (kadmij) radi redukcije nitrata u nitrit, a zatim se dodaju i azidi (soli dušikovodične kiseline –  $HN_3$ ) kako bi se nitrit mogao dalje reducirati u  $N_2O$ . Nakon toga,  $N_2O$  visoke čistoće može se dobiti odvajanjem, obogaćivanjem i

pročišćavanjem. Na kraju sastavi  $\delta^{15}\text{N}$  i  $\delta^{18}\text{O}$  mjere se IRMS-om. Prednosti ove metode su to što nije osjetljiva na organske tvari i što je jednostavan i jeftin postupak pripreme. Nedostaci ove metode su opasnosti zbog toksičnosti reagensa [14].

#### 4.4. Uzorkovanje za mjerenja $\delta^{15}\text{N}$

Uzorci se uglavnom filtriraju na terenu kroz filtre od 0,1 mikrona, stavljaju u isprane boce, konzerviraju (sumpornom kiselinom, živinim kloridom ili kloroformom), ohlade, zamotaju u izolacijski materijal za pakiranje i šalju u laboratorij u škrinjama s ledom. Veličina uzorka N kreće se u rasponu od 10-100 $\mu\text{M}$ , no zahtjevi za veličinom uzorka razlikuju se od laboratorija do laboratorija. Uz mjerenje vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$ , neki laboratoriji mogu mjeriti i vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  [3].

##### 4.4.1. Čvrste čestice

Filtracija je najjednostavnija i najčešća metoda za uklanjanje čestica iz vode. Tijekom filtracije treba se voditi računa o smanjivanju razlike tlaka na najmanju moguću mjeru da bi se izbjeglo puknuće stanica. Istraživanja su pokazala da teflonski filtri i filtri od aluminijevog oksida hvataju najveću količinu organskog dušika u obliku čestica. Prije spektrometrijske analize čestice se trebaju pretvoriti u plinoviti oblik.  $\delta^{15}\text{N}$  čestice može se analizirati izravno izgaranjem (pretvorba u  $\text{N}_2$ ) ili oksidacijom persulfata (pretvorba u  $\text{NO}_3^-$ ).

##### 4.4.2. Nitrati i nitriti

Najzastupljeniji oblik dušika u oceanu nalazi se u nitratima  $\text{NO}_3^-$ , a zatim u nitritima  $\text{NO}_2^-$ . Da bi bilo moguće izvršiti izotopsku analizu, nitrati i nitriti moraju se pretvoriti u oblike koji imaju mogućnost ulaska u maseni spektrometar. Metode se razlikuju prema stupnju redukcije, s pretvaranjem  $\text{NO}_3^-$  u  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2$  ili potpunom redukcijom u amonij. Dvije nove tehnike uklanjaju nitrit. Jedna je uklanjanje nitrita reakcijom s natrijevim azidom u

puferu octene kiseline da bi se dobio NO, a druga je reakcija nitrata s askorbinskom kiselinom da bi se dobio NO koji se zatim uklanja mjehurićima.

Neki znanstvenici provode i biološku redukciju  $\text{NO}_3^-$  u  $\text{NO}_2^-$  koristeći kulture denitrificirajućih bakterija za pretvorbe  $\text{NO}_3^-$  u  $\text{NO}_2^-$  do  $\text{N}_2$ , a onda analizirali masenom spektrometrijom. Ova metoda kasnije je promijenjena tako da su znanstvenici koristili mutirani soj denitrificirajućih bakterija koje su proizvodile samo  $\text{N}_2\text{O}$  kako bi se izbjegao problem onečišćenja  $\text{N}_2$  iz zraka.

#### 4.4.3. Amonij

Amonij  $\text{NH}_4^+$  nastaje razgradnjom i remineralizacijom organskih oblika dušika i troši se autotrofnom asimilacijom i ponovnom sintezom u organske molekule, nitrifikacijom u  $\text{NO}_2^-$  i anammox oksidacijom iz  $\text{NO}_2^-$  u  $\text{N}_2$ . Za izotopsku analizu amonijak se mora kvantitativno izlučiti iz otopine i pretvoriti u prikladne plinovite vrste.

Metode u izoliranju amonija za izotopsku analizu provode se destilacijom s vodenom parom. U svim metodama koje uključuju  $\text{NH}_4^+$  potrebna je velika pažnja kako bi se onečišćenje okoliša smanjila na najmanju moguću mjeru [21].

#### 4.4.4. Ionske smole

Uzorci s visokom koncentracijom  $\text{NO}_3^-$  prikupljaju se kao skupni uzorci vode, a uzorci s nižim koncentracijama često zahtjevaju upotrebu ionskih izmjenjivačkih smola. Ovom metodom koncentriraju se  $\text{NO}_3^-$  ili  $\text{NH}_4^+$  na anionskim ili kationskim izmjenjivačkim smolama. Prikupljanje nitrata na anionskim izmjenjivačkim smolama eliminira potrebu za slanjem velikih količina ohlađene vode natrag u laboratorij, eliminira potrebu za opasnim konzervansima, olakšava arhiviranje uzoraka i omogućuje analizu ekstremno nisko-nitratnih voda [3].

#### 4.4.5. Dušikov (I) oksid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) i dinitrogen ( $\text{N}_2$ )

Dušikov (I) oksid se može stvoriti tijekom procesa nitrifikacije i denitrifikacije, a  $N_2$  je krajnji produkt denitrifikacije i anammoksa. Anammox je proces anaerobne amonijeve oksidacije. Tehnika razdvajanja izotopa za analizu  $N_2$  zahtjeva sve tri izotopske varijacije  $N_2$  ( $^{28}N_2$ ,  $^{29}N_2$  i  $^{30}N_2$ ). Za tehniku razdvajanja izotopa možemo koristiti kvadrupolni analizator ili magnetski sektorski analizator u masenoj spektrometriji, s time da kvadrupolni analizator može odrediti istovremeno i omjer  $N_2/Ar$ . Ekstrakcija  $N_2$  iz uzorka vode provodi se razdvajanjem plinova u prikladnim zatvorenim posudama. Kada se plin uravnoteži uzorkuje se u masenom spektrometru.

Neki znanstvenici, umjesto korištenja metode razdvajanja plinova, koriste MIMS metodu (*engl. Membrane Inlet Mass Spectrometry*) kojom se može izravno uzorkovati  $N_2$  za proučavanje fiksacije i denitrifikacije dušika. MIMS metoda također može mjeriti denitrifikaciju praćenjem omjera  $N_2/Ar$  tokom vremena. Sastav argona odražava promjene temperatura i drugih fizikalnih čimbenika, dok promjena koncentracije  $N_2$  odražava ravnotežu između fiksacije dušika i denitrifikacije. Prednost MIMS metode je to što nije potrebno raditi na dugotrajnom procesu ekstrakcije. [21]

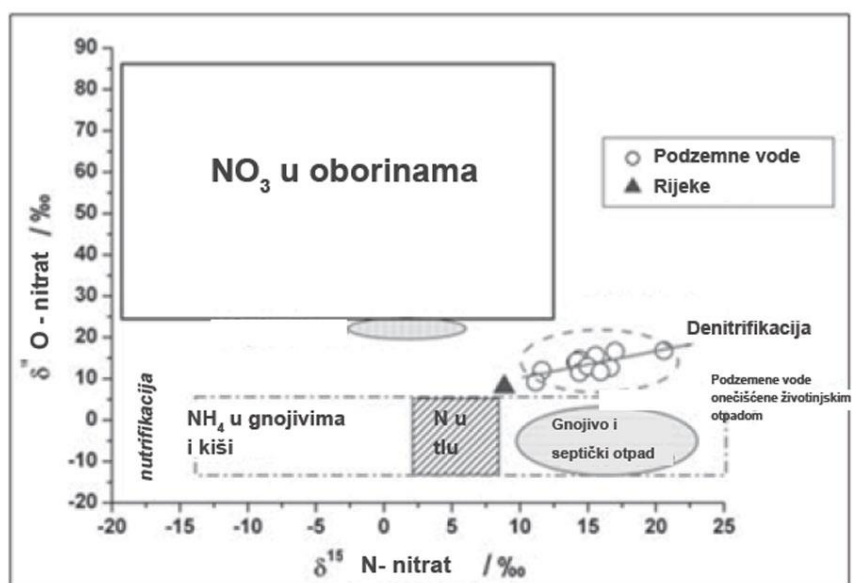
## 5. PRIMJENA STABILNIH IZOTOPA DUŠIKA NA PRIMJERIMA

### 5.1. Podzemne vode

Zagađenje dušikovim spojevima ( $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$ ) u podzemnim vodama važan je ekološki problem u plitkim vodonosnicima u mnogim zemljama i sve više postaje prijetnja zalihama pitke vode. Potencijalni netočasti (disperzni, plošni) izvori onečišćenja podzemnih voda kontaminiranih nitratima uključuju dušik u tlu, gnojivo i životinjski otpad.

Točkasti izvori uključuju propusne septičke sustave, izlivanja ili ispuštanja, odlagališta otpada i područja skladištenja životinjskog otpada. Konzumiranje velike koncentracije nitrata može uzrokovati brojne probleme. Posebno je opasno za dojenčad čija izloženost visokim koncentracijama nitrata može uzrokovati „sindrom plave bebe“ s potencijalno smrtnim ishodom. Postoje i značajni dokazi iz pokusa na životinjama da se stvaraju kancerogeni spojevi u crijevnom traktu nakon konzumacije nitrata. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) preporučila je ograničenje nitrata od  $10\text{mg/L}^{-1}$  (kao N) u vodi za piće. Preliminarni uvjeti za prevenciju su utvrđivanje podrijetla dušika otopljenog u podzemnoj vodi.

Izotopski potpisi, to jest vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  i  $\delta^{18}\text{O}$  iz različitih izvora (tlo, gnojivo, kanalizacija,...) su prilično različiti, što stvara tragove koji se mogu prepoznati u ekosustavu (slika 7).



Slika 7. Izotopski sastav glavnih izvora nitrata, Izvor: Potential use of environmental isotopes in pollutant migration studies

Biološki i kemijski procesi poput denitrifikacije, nitrifikacije i hlapljenja mogu izmijeniti  $\delta^{15}\text{N}$  vrijednosti što rezultira pogrešnom dodjelom izvora. Općenito, biološke aktivnosti preferencijalno koriste  $^{14}\text{N}$ , što rezultira povećanom vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  u preostalom dušiku. Nedavno razvijene izotopske tehnike za analizu izotopskih vrijednosti dušika i kisika u  $\text{NO}_3^-$  omogućuju nam neke zaključke u vezi s identifikacijom izvora nitrata i stupnjem njihove transformacije. Poznavajući sadržaj izotopa kisika i dušika, možemo razlikovati mineralna/anorganska gnojiva od stajskog gnojiva ili nitrata nastalog nitrifikacijom organskog materijala, pa se prema tome može prepoznati dominantan izvor nitrata. Bakterije denitrifikacijom razgrađuju nitrate na plin dušik, te tako stvaraju prepoznatljiv izotopski potpis na dušiku i kisiku u otopljenom nitratu. Omjer izotopa dušika  $^{15}\text{N}$  i kisika  $^{18}\text{O}$  daju nam korisne informacije za utvrđivanje izvora nitrata u podzemnim vodama. Pri utvrđivanju izvora nitrata u podzemnim vodama mogu se donijeti ispravne mjere da bi se spriječilo ili minimaliziralo daljnju kontaminaciju [18].

## 5.2. Površinske vode

Analize sastava  $^{15}\text{N}$  i  $^{18}\text{O}$  u slivu prekrivenom šumom na sjeveroistoku Sjedinjenih Država otkriveno je da je preko 80% nitrata generirano nitrifikacijom dušika u tlu. Kada su se oborine povećale, glavni izvor nitrata u rijekama unutar sliva prekrivenog šumama postali su organski dušik i oborine u tlu. Analize izotopa također pokazuju da atmosferski nitrat odlazi u rijeke nakon nitrifikacije mikroorganizama.

Mjereći vrijednosti izotopa  $^{15}\text{N}$  i  $^{18}\text{O}$  na porudčju jezera Tai u Kini, znanstvenici su proučavali izvore nitrata. Nitrat je uglavnom dolazio iz oborina, otpadnih voda iz domaćinstava, organskog gnojiva ljeti, dok je zimi bio iz nitrifikacije otpadnih voda iz domaćinstava, organskog gnojiva i organskog dušika u tlu. Izvor nitrata u površinskim vodama varira kako u godišnjim dobima tako i u prostornoj raspodjeli. Znanstvenici koji su proučavali izvore nitrata u rijeci Han (Južna Koreja) izvijestili su da su oborine i organska tvar tla glavni izvori nitrata u sjevernom dijelu rijeke Han, a stajski gnoj i kanalizacija glavni izvori nitrata u južnom dijelu rijeke Han.

S izotopima  $^{15}\text{N}$  i  $^{18}\text{O}$  tijekom proučavanja površinskih voda unutar urbanog područja Pekinga utvrđeno je da su glavni izvori nitrata stajski gnoj i kanalizacija. Zaključeno je

da su u složenijim urbanim sustavima površinskih voda glavni izvori nitrata kanalizacija, a asimilacija, nitrifikacija i fiksacija dušika su glavni faktori. U tablici 1. možemo vidjeti podatke o identifikaciji izvora nitrata u površinskim vodama u velikim vodenim sustavima širom svijeta.

Kako sugeriraju podaci, metoda stabilnog izotopa pružila je korisne informacije za analizu izvora nitrata, kao i za uklanjanje nitrata. Izvor nitrata površinskih voda varira ovisno o vremenu i prostoru, a izvori dušika proći će nekoliko biokemijskih reakcija kao što su nitrifikacija i denitrifikacija prije nego što uđu u rijeke. Za detaljnije analize izvora nitrata u velikim slivovima i ostalih karakterističnih onečišćenja potrebni su i drugi pokazatelji poput hidroloških uvjeta, kakvoće vode i vrsta namjene zemljišta [14].

Tablica 2. primjena izotopa dušika i kisika za identifikaciju izvora nitrata u površinskim vodama, Izvor: *Application of Nitrogen and Oxygen Isotopes for Source and Fate Identification of Nitrate Pollution in Surface Water: A Review*

| Ime rijeke / jezera                    | Površina (km <sup>2</sup> ) | Glavni izvori nitrata  |
|--|-----------------------------|--|
| <b>Rijeka Mississippi (SAD)</b>        | 2.9×10 <sup>6</sup>         | Asimilacija dušika   |
| <b>Rijeka Jangce (Kina)</b>            | 1.8×10 <sup>6</sup>         | Nitrifikacija (gnojivo i kanalizacija)   |
| <b>Rijeka Huang He (Kina)</b>          | 7.5×10 <sup>5</sup>         | Otpadne vode i stajsko gnojivo u gornjem toku, otpadne vode i kanalizacija te amonijak i gnojivo koje sadrži ureju u donjem toku |
| <b>Rijeka Sungari (Kina)</b>           | 5.6×10 <sup>5</sup>         | Organski dušik u tlu, dušična gnojiva i kanalizacija   |
| <b>Rijeka Illinois (SAD)</b>           | 7.8×10 <sup>4</sup>         | Fenitificirane podzemne vode i pročišćene opadne vode  |
| <b>Rijeka Oldman (Kanada)</b>          | 3.0×10 <sup>4</sup>         | Nitrifikacija tla u zapadnim pritocima, kanalizacija i/ili stajski gnoj u istočnim pritocima                                     |
| <b>Jezero Winnipeg (Kanada)</b>        | 2.45×10 <sup>4</sup>        | Ispuštanje stajskog gnoja i/ili otpadnih voda i anorganska poljoprivredna gnojiva  |
| <b>Rijeka Guadalgorce (Španjolska)</b> | 3.2×10 <sup>3</sup>         | Gnojiva i organski izvori (stajski gnoj i kanalizacija)  |
| <b>Jezero Tai (Kina)</b>               | 2.3×10 <sup>3</sup>         | Kanalizacija / stajsko gnojivo i organski dušik zimi, oborine i kanalizacija / stajsko gnojivo ljeti                             |

### 5.3. Povremeno poplavljene ravnice

Poplavne ravnice značajan su izvor dušikovog (I) oksida ( $N_2O$ ) koji je snažan staklenički plin i glavni plin koji uništava ozonski omotač.  $N_2O$  se proizvodi u tlu nitrifikacijom u aerobnim uvjetima, gdje se amonijak oksidira i denitrifikacijom koja se događa u anaerobnim uvjetima gdje se nitrat reducira u nitrit,  $NO$ ,  $N_2O$  i u čisti molekularni dušik  $N_2$ . Molekula  $N_2O$  ima asimetričnu strukturu ( $N-N-O$ ), a dva atoma dušika nazivaju se beta i alfa ( $N^\beta-N^\alpha-O$ ). Tijekom procesa nitrifikacije i denitrifikacije uočeno je da se središnja pozicija, tj.  $\alpha$  pozicija obogati izotopom dušika  $^{15}N$ , a  $\beta$  pozicija dušikovim izotopom  $^{14}N$ . Većina analiza  $^{15}N$  povezanih s  $N_2O$  rađena su u mineralnim tlima, a samo nekoliko studija razmatralo je tresetna tla. Istraživanja provedena s izotopima  $^{15}N$  u dreniranim i preplavljenim tlima ispunjenima tresetom otkrili su da je denitrifikacija glavni proces transformacije dušika, te da su emisije  $N_2O$  iz poplavljenih uvjeta mnogo manje nego iz dreniranih uvjeta [22].

### 5.4. Optimizacija korištenja gnojiva

Istraživanja su pokazala da biljke koriste manje od 40% upotrijebljenog gnojiva, dok ostalih 60% odlazi u atmosferu i podzemne vode ili ostaje u zemlji u obliku koji biljka ne može iskoristiti [23]. Dušik je od iznimne važnosti kod rasta biljaka i u procesu fotosinteze. Dušik se često dodaje tlu u obliku gnojiva. Korištenjem gnojiva koje ima izotop dušika  $^{15}N$  znanstvenici mogu pratiti izotope i utvrditi koliko učinkovito biljke iskorištavaju gnojivo. Ta tehnika tako pomaže otkriti optimalnu količinu korištenja gnojiva. Nakon što usjev dosegne zasićenje dušikom, preostali dušik ostaje u tlu i sklon je ispiranju.

U siromašnim državama poput Mjanmara većina vrsta riže koje se tamo tradicionalno uzgajaju su upravo one čija rodnost uvelike ovisi o gnojenju, međutim tamošnji farmeri ne mogu priuštiti gnojivo. Znanstvenici su metodom izotopa  $^{15}N$  između ostaloga otkrili da nove vrste riže ne ovise o čestom gnojenju. Uz pomoć novih sorti, poljoprivrednici će imati pristup usjevima koji imaju veći prinos bez pretjerane upotrebe gnojiva. Početni rezultati pokazali su da je razumna primjena dušika na usjevima riže dovela do uštede gnojiva za oko 30% i smanjila količinu gnojiva izgubljenog u okoliš za 20%[23].



U Bocvani su znanstvenici započeli koristiti metode izotopa  $^{15}\text{N}$  kako bi odredili količine gnojiva potrebne za uzgoj zelenih paprika, špinata i ostalih usjeva [23]. Kako se vrste tla razlikuju u svijetu, ne mogu se koristiti rezultati koji su dobiveni negdje drugdje. Iz početnih rezultata procjenjuje se da bi se moglo koristiti i do polovice gnojiva manje na poljima žitarica. Pretjerano gnojenje ne samo da predstavlja nepotreban dodatni trošak za poljoprivrednike, već i neiskorišteni nitrati mogu zagađivati podzemne vode u blizini poljoprivrednih površina, a to je veoma rizično za zemlju poput Bocvane koja se za korištenje pitke vode oslanja upravo na podzemne rezervoare. U hortikulturnom sektoru gnojivo predstavlja najveći ulazni trošak pa bi smanjenje uporabe gnojiva značajno moglo poboljšati industriju.

U Vijetnamu su rezultati dobiveni tehnikom dušika-15 pokazali da je čak polovina gnojiva primijenjenog na poljima kupusa izgubljena u okolišu, te je došlo do zagađivanja vode i problema sa sigurnošću kvalitete hrane. U suradnji sa Međunarodnom agencijom za atomsku energiju, (*eng. International Atomic Energy Agency – IAEA*), lokalni dužnosnici sada poduzimaju mjere i savjetuju poljoprivrednike o najučinkovitijoj upotrebi gnojiva [23].

## 6. ZAKLJUČAK

Rastom ljudske populacije na Zemlji dolazi do povećanja osnovnih sredstava potrebnih za opstanak ljudske vrste. U mnogim zemljama se pokušava podići svijest o posljedicama povećanja ljudske populacije koja je glavni uzrok onečišćenja okoliša.

Prekomjerno korištenje gnojiva, ljudski i životinjski otpad, te razne industrije negativno utječu na kvalitetu života., a jedan od najraširenijih uzroka su hranjive soli dušika, pogotovo nitrati.

Izotopskim metodama moguće je otkriti u raznim sastavnicama okoliša, što pomaže sprječavanju i uklanjanju dušikovih hranjivih soli ispod vrijednosti štetnih koncentracija za ljude, te učinkovito i ekonomično korištenje gnojiva.

Metode korištenja izotopa relativno su nove u proučavanju okoliša te još uvijek imaju svoja ograničenja. Prikupljanjem podataka iz izotopskih istraživanja diljem zemlje mogla bi se uspostaviti globalna i regionalna baza raspodjele izotopa dušika u svim sastavnicama okoliša, a poglavito u atmosferskoj vlazi (kisele kiše), tlima i vodama. Optimaliziranjem i istraživanjem novih metoda, te povećanje interesa o korištenju izotopnih metoda može se uvelike smanjiti zagađenje okoliša i poboljšati kvaliteta života na Zemlji.

## LITERATURA

- [1] Izotopi, Dostupno na: <https://proleksis.lzmk.hr/28590/>, Datum pristupa: 10. ožujak 2021.
- [2] Milivoj Uroić, Radioaktivni i stabilni izotopi, dostupno na: [http://fulir.irb.hr/2682/1/Milivoj-Uroic-2016-Radioaktivni\\_i\\_stabilni\\_izotopi.pdf](http://fulir.irb.hr/2682/1/Milivoj-Uroic-2016-Radioaktivni_i_stabilni_izotopi.pdf), Datum pristupa: 10. ožujak 2021.
- [3] Nitrogen, Dostupno na: <http://web.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html>, Datum pristupa: 10. svibanj 2021.
- [4] Water Quality and Investigation, Department of Environment and Science (DES), Monitoring and Sampling Manual, Environmental Protection (Water) policy 2009 - Physical and chemical assessment, lipanj, 2018.
- [5] Miriam R. Aczel, What Is the Nitrogen Cycle and Why Is It Key to Life?, Dostupno na: <https://kids.frontiersin.org/articles/10.3389/frym.2019.00041>, Datum pristupa: 15. ožujak 2021.
- [6] The nitrogen cycle, Dostupno na: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/960-the-nitrogen-cycle> Datum pristupa: 22. ožujak 2021.
- [7] Kruženje tvari u prirodi, Dostupno na: [https://mozks-zzh.com/mozks/wp-content/uploads/2020/04/Biologija\\_4\\_Kru%C5%BEenje-tvari-u-prirodi.pdf](https://mozks-zzh.com/mozks/wp-content/uploads/2020/04/Biologija_4_Kru%C5%BEenje-tvari-u-prirodi.pdf), Datum pristupa: 22. ožujak 2021.
- [8] John Arthur Harrison, Ph.D., The Nitrogen Cycle: Of Microbes and Men, Dostupno na: <https://www.visionlearning.com/en/library/Earth-Science/6/The-Nitrogen-Cycle/98>, Datum pristupa: 19. travanj 2021.
- [9] Urednici Enciklopedije Britannice Nitrogen fixation, Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/nitrogen-fixation>, Datum pristupa: 23. ožujak 2021.
- [10] Periodic Table—Nitrogen, Dostupno na: [https://wwwrcamnl.wr.usgs.gov/isoig/period/n\\_iig.html](https://wwwrcamnl.wr.usgs.gov/isoig/period/n_iig.html), Datum pristupa: 23. ožujak 2021.
- [11] Erik A. Hobbie & Andrew P. Ouimette, Controls of nitrogen isotope patterns in soil profiles, Springer Science+Business Media B.V. 2009, Dostupno na:

<https://userweb.weihenstephan.de/lattanzi/Lit/Hobbie%20&%20Ouimette%202008%20Biog.pdf>, Datum pristupa: 2. travanj 2021.

[12] Paul Szpak, Complexities of nitrogen isotope biogeochemistry in plant-soil systems: implications for the study of ancient agricultural and animal management practices, *Front Plant Sci.* 2014; 5: 288., Dostupno na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066317/>, Datum pristupa: 5. svibanj 2021.

[13] Andrija Draguzet, Tlo i mikorizne gljive, Dostupno na:

<https://www.agroklub.com/sumarstvo/tlo-i-mikorizne-gljive/16246/>, Datum pristupa: 5. svibanj 2021.

[14] Yan Zhang, Peng Shi, Jinxi Song, Qu Li, Application of Nitrogen and Oxygen Isotopes for Source and Fate Identification of Nitrate Pollution in Surface Water: A Review, *Applied Sciences*, MDPI, Basel, Švicarska, prosinac 2018.

[15] Elucija, Dostupno na:

[https://hjp.znanje.hr/index.php?show=search\\_by\\_id&id=fFxxXBE%25253D](https://hjp.znanje.hr/index.php?show=search_by_id&id=fFxxXBE%25253D), Datum pristupa: 27. travanj 2021.

[16] D.M. Sigman, K.L. Casciotti, Nitrogen isotopes in the ocean, Princeton University, Princeton, NJ, USA, 2001.

[17] Masena spektrometrija, Dostupno na:

<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=39268>, Datum pristupa: 17. svibanj 2021.

[18] Nada Miljević, Dušan Logobočanin, Potential use of environmental isotopes in pollutant migration studies, Vinca Institute of Nuclear Sciences, Beograd, Srbija, 2007.

[19] Jadranka Barešić, Primjena izotopnih i geokemijskih metoda u praćenju globalnih i lokalnih promjena u ekološkom sustavu Plitvičkih jezera, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, veljača 2009.

[20] Anrea Miniard, Stable Isotopes, Dostupno na:

<https://slideplayer.com/slide/2809014>, Datum pristupa: 27. svibanj 2021.

[21] Evgenia Ryabenko Stable Isotope Methods for the Study of the Nitrogen Cycle, IntechOpen, srpanj 2013, dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/topics-in->

[oceanography/stable-isotope-methods-for-the-study-of-the-nitrogen-cycle](#), Datum pristupa: 27. svibanj 2021.

[22] Mahit Masta, Holar Sepp, Jaan Parn, Kalle Kirsimae, Ulo Mander, Natural Nitrogen Isotope Ratios as a Potential Indicator of N<sub>2</sub>O Production Pathways in a Floodplain Fen, MDPI, Basel, Švicarska, veljača 2021.

[23] Miklos Gaspar, Stable Nitrogen Isotope Helps Scientists Optimize Water, Fertilizer Use, Dostupno na: <https://www.iaea.org/newscenter/news/stable-nitrogen-isotope-helps-scientists-optimize-water-fertilizer-use>, Datum pristupa: 31. svibanj 2021.

## POPIS SLIKA

|   |    |
|---|----|
| Slika 1. Zastupljenost izotopa dušika u prirodi, Preuzeto sa: <a href="http://web.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html">http://web.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html</a> , Datum pristupa: 10. svibanj 2021.....   | 2  |
| Slika 2. $\delta^{15}$ vrijednosti u odnosu na atmosferski N <sub>2</sub> , Preuzeto sa: <a href="http://web.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html">http://web.sahra.arizona.edu/programs/isotopes/nitrogen.html</a> , Datum pristupa: 10. svibanj 2021.....                    | 4  |
| Slika 3. Kruženje dušika u prirodi, Preuzeto sa: <a href="https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/nitrogen-mineralization">https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/nitrogen-mineralization</a> , Datum pristupa: 19. travanj 2021. .... | 6  |
| Slika 4. Vrijednosti $\delta^{15}\text{N}$ tla s dubinom, Izvor: Application of Nitrogen and Oxygen Isotopes for Source and Fate Identification of Nitrate Pollution in Surface Water: A Review .....   | 9  |
| Slika 5. Vrijednosti izotopa dušika u suspendiranim česticama i tonućim česticama, izvor: Nitrogen isotopes in the ocean .....  | 13 |
| Slika 6. Komponente masenog spektrometra, Preuzeto sa: <a href="http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html">http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html</a> , Datum pristupa: 17. svibanj 2021. ....   | 14 |
| Slika 7. Izotopski sastav glavnih izvora nitrata, Izvor: Potential use of environmental isotopes in pollutant migration studies.....  | 20 |

## POPIS TABLICA

|  |    |
|--|----|
| Tablica 1. Reprezentativne procjene izotopskih učinaka za procese N ciklusa, Izvor: Nitrogen isotopes in the ocean .....   | 11 |
| Tablica 2. primjena izotopa dušika i kisika za identifikaciju izvora nitrata u površinskim vodama, Izvor: Application of Nitrogen and Oxygen Isotopes for Source and Fate Identification of Nitrate Pollution in Surface Water: A Review ..... | 22 |