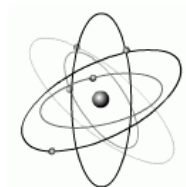




Akademia Górniczo – Hutnicza im. Stanisława Staszica
w Krakowie
Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej



Wojciech Chmura

**Badania składu izotopowego azotanów
w wodach podziemnych i powierzchniowych –
aspekty metodyczne i zastosowania**

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Kazimierza Różańskiego
w Zespole Fizyki Środowiska,
Katedry Zastosowań Fizyki Jądrowej,
Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej,
Akademii Górniczo – Hutniczej

Kraków 2008

Za nieocenioną pomoc udzieloną mi przy powstawaniu tej pracy chciałbym serdecznie podziękować:

*Promotorowi – Prof. dr hab. inż. Kazimierzowi Różańskiemu
oraz dr inż. Tadeuszowi Kuconowi,*

wszystkim kolegom i koleżankom z Zespołu Fizyki Środowiska, w tym:

Dr inż. Jarosławowi M. Neckiemu,

Dr. inż. Mirosławowi Zimnochowi,

Dr inż. Zbigniewowi Gorczycy,

Dr inż. Przemysławowi Wachniewowi,

Dr inż. Markowi Dulińskiemu,

Mgr inż. Łukaszowi Chmurze,

Mgr inż. Halinie Mróz,

a także

Dr inż. Annie Żurek, Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska, Akademia Górniczo-Hutnicza,

Dr inż. Marii Chmiel, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Akademia Rolnicza

.....

oraz tym, których nie wymieniłem, a bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.

Dedykuje Mamie...



*„Nie staraj się zrozumieć wszystkiego, bo wszystko stanie się niezrozumiałe.
Nadzieje uczonych są pewniejsze niż bogactwa nieuków”.*
Demokryt z Abdery (ok. 460 – 370 r. p.n.e.)

SPIS TREŚCI

Rozdział 1. Wprowadzenie	7
1.1. Wstęp	7
1.2. Cel pracy doktorskiej	8
Rozdział 2. Azot w przyrodzie	10
2.1. Podstawowe informacje o azocie	10
2.2. Formy występowania azotu w przyrodzie	11
2.3. Obieg azotu w przyrodzie	12
2.4. Zaburzenia cyklu azotowego wskutek działalności człowieka	13
Rozdział 3. Problem zanieczyszczenia wód azotanami	19
3.1. Wzrost zanieczyszczenia wód związkami azotu na przestrzeni ostatnich 150 lat	19
3.2. Wpływ wysokiej zawartości azotanów w wodzie na organizmy żywe	23
3.3. Regulacje prawne w Polsce i na świecie dotyczące dopuszczalnych stężeń azotanów w wodach gruntowych i podziemnych	24
3.3.1. Inicjatywy na rzecz poprawy jakości wód w Europie pod względem zanieczyszczenia azotanami	24
3.3.2. Normy zawartości azotanów w wodach podziemnych i powierzchniowych	27
Rozdział 4. Frakcjonowanie izotopowe w związkach azotu	28
4.1. Podstawy frakcjonowania izotopowego	28
4.2. Mechanizmy biofizykochemiczne wpływające na skład izotopowy związków azotu	31
Rozdział 5. Pomiar składu izotopowego azotanów	43
5.1. Metoda wyznaczania składu izotopowego azotanów z chemiczną konwersją do N_2 i CO_2	44
5.1.1. Pobór prób w terenie i przechowywanie prób z azotanami	44
5.1.2. Osadzanie azotanów na żywicach anionowymiennych	46
5.1.3. Preparatyka i chemiczna konwersja azotanów do N_2 i CO_2	49
5.1.4. Pomiar składu izotopowego N_2 i CO_2 na spektrometrze mas	56
5.1.4.1. Pomiar składu izotopowego azotu	56
5.1.4.2. Pomiar składu izotopowego tlenu	59
5.2. Denitryfikacyjna metoda wyznaczania składu izotopowego azotanów	61
5.2.1. Określenie i przygotowanie minimalnej wielkości próby wody	62
5.2.2. Hodowla kultur bakteryjnych i inkubacja próbki	63
5.2.3. Ekstrakcja podtlenku azotu N_2O z roztworu	64
5.2.4. Pomiar składu izotopowego N_2O na spektrometrze mas	67
5.3. Porównanie zastosowanych metod oznaczania składu izotopowego azotanów	73
Rozdział 6. Zastosowanie opracowanych procedur wyznaczania składu izotopowego azotanów do badania próbek środowiskowych	74
6.1. Zmienność stężenia i składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w opadach	74
6.1.1. Charakterystyka miejsc poboru prób	74
6.1.2. Prezentacja i dyskusja wyników pomiarów	75
6.2. Zmienność składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodach powierzchniowych	85
6.2.1. Charakterystyka miejsc poboru prób	85
6.2.2. Prezentacja i dyskusja wyników pomiarów	87
6.3. Występowanie azotanów w zbiornikach wód podziemnych	94
6.3.1. Główny Zbiornik Wód Podziemnych GZWP333 „Opole – Zawadzkie”	94

6.3.2. Główny Zbiornik Wód Podziemnych GZWP451 „Piaski Bogucickie”	101
Rozdział 7. Podsumowanie	106
Bibliografia	108

Rozdział 1. Wprowadzenie

1.1. Wstęp

Szeroko pojęte nauki o środowisku obejmują wiele dyscyplin naukowych, opisujących oddziaływania pomiędzy biologicznymi składnikami środowiska a jego elementami fizykochemicznymi, ze szczególnym uwzględnieniem zanieczyszczenia i degradacji środowiska wskutek niekorzystnej działalności człowieka o charakterze zarówno krótko– jak i długofalowym. Interdyscyplinarność badań środowiskowych wymusza współpracę i wzajemne uzupełnianie się różnych dziedzin nauki. Przykładowo, zadaniem fizyki w kontekście badań środowiskowych jest przede wszystkim opisywanie cyrkulacji materii i energii w środowisku, podczas gdy chemia pomaga w zrozumieniu transformacji chemicznych występujących zarówno w poszczególnych elementach środowiska, jak i w środowisku jako całości.

Woda należy do podstawowych składników środowiska umożliwiających życie i prawidłowe funkcjonowanie organizmów żywych, w tym człowieka. Całość wody w organizmie człowieka wymieniana jest średnio co 20 dni. Dzielne przeciętne spożycie wody przez człowieka szacuje się na około 2,5 litra. 2/3 powierzchni Ziemi pokrywają akweny wodne mórz i oceanów. Tylko około 1% rezerw wodnych stanowi ciekła woda słodka w rzekach i jeziorach, którą można wykorzystać do celów konsumpcyjnych. Reszta to słone morza i oceany, para wodna w atmosferze i lodowce.

Prace związane z oceną potencjalnego zagrożenia źródeł wody pitnej obejmują m.in. wpływ różnych substancji chemicznych wykorzystywanych w rolnictwie na jakość wód powierzchniowych i podziemnych. Takimi związkami są np. azotany, fosforany, siarczany itp. W przypadku tych pierwszych, w wielu miejscach na Ziemi zaobserwowano wzrost ich stężenia w wodach powierzchniowych i podziemnych ponad dopuszczalne normy. Zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) stężenie azotu azotanowego $N(NO_3^-)$ w wodzie pitnej nie powinno przekraczać 10 mg/L. Tymczasem w wodach zarówno powierzchniowych, jak i podziemnych poziom ten bywa często przekraczany, przede wszystkim wskutek wprowadzania przez rolnictwo do środowiska nadmiernej ilości nawozów sztucznych oraz zanieczyszczenia wód odpadami komunalnymi. Przekłada się to bezpośrednio na zagrożenie zdrowia i życia, szczególnie w przypadku małych dzieci, u których wskutek spożywania wody o dużej zawartości azotanów może wystąpić tzw. methemoglobinemia, zwana potocznie „chorobą błękitnych dzieci”. Ponadto, w wielu produktach spożywczych (np. jarzynach) jako pozostałości po nawozach sztucznych występują nitrozoaminy, związki o charakterze rakotwórczym.

W wyniku przedostawania się do rzek i zbiorników powierzchniowych ścieków i wód o podwyższonym stężeniu azotanów i fosforanów zachodzi w nich proces eutrofizacji polegający na wzmożonym rozwoju roślinności wodnej (głównie glonów) i planktonu, co doprowadza do zakłócenia równowagi tlenowej zbiornika. W skrajnych przypadkach przy dnie wytwarza się warstwa beztlenowa i zachodzą reakcje chemiczne z wydzielaniem gazów, np. CH_4 , H_2S , co prowadzi do wymierania fauny wodnej. Obecne w opadach atmosferycznych kwasy siarkowe i azotowe powodują zakwaszanie wielu cieków i zbiorników, doprowadzając do poważnych szkód w lokalnych ekosystemach.

Źródła azotanów zanieczyszczających wody podziemne i powierzchniowe dzielimy na dwie grupy: (i) źródła punktowe (np. zbiorniki na odpady komunalne, szamba, nieszczelne osadniki w oczyszczalniach ścieków, niewłaściwie przechowywane odpady pozwierżące (obornik), oraz (ii) źródła rozproszone

(np. nawozy sztuczne i naturalne rozprowadzane na znacznym obszarze). Obecnie tego typu źródła zanieczyszczeń funkcjonują przede wszystkim na obszarach wiejskich. Badania tam prowadzone dokumentują zarówno samo przekraczanie określonych norm stężeń azotanów w wodach podziemnych, jak i procesy zmieniające ich zawartość.

Efektywne zarządzanie kontrolą jakości wód i opracowywanie rozwiązań dla zbiorników i cieków wodnych już zanieczyszczonych azotanami wymaga przede wszystkim posiadania narzędzi do identyfikacji źródeł zanieczyszczeń i badania procesów determinujących poziom zawartości azotanów. Dodatkowe informacje na temat lokalnych warunków hydrologicznych pomagają ocenić potencjalne zagrożenie dla zbiorników wody pitnej. Podstawowym problemem w tego typu badaniach jest znalezienie korelacji pomiędzy ilością azotanów wprowadzanych do środowiska z poszczególnych źródeł, a ich koncentracją w wodach podziemnych i powierzchniowych. Ewentualne trudności wynikają z: (i) występowania na danym terenie kilku źródeł azotanów o różnym charakterze, (ii) niepunktowego charakteru źródeł i oddziaływania pomiędzy nimi, oraz (iii) zachodzenia procesów biogeochemicznych wpływających na stężenie azotanów w wodzie.

Badania składu izotopowego azotanów stanowią cenne uzupełnienie tradycyjnych analiz chemicznych. W wielu przypadkach, ze względu na odmienną azotową i tlenową sygnaturę izotopową ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$) poszczególnych źródeł azotanów możliwa jest ich identyfikacja. Ponadto, różne przemiany w biogeochemicznym cyklu azotu (np. denitryfikacja) zmieniają skład izotopowy azotanów w sposób, który można później zidentyfikować na podstawie analiz izotopowych.

1.2. Cel pracy doktorskiej

Podstawowym celem przedstawionej pracy doktorskiej było opracowanie metodyki określania składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie i przetestowanie jej w oparciu o pobrane próby wód pochodzących z różnego typu środowisk.

Metody określania składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie można podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich polega na ekstrakcji azotanów z wody i takiej ich preparatyce chemicznej, aby otrzymać substancje, które można zmierzyć, wykorzystując spektrometr mas. W prezentowanej pracy doktorskiej do ekstrakcji azotanów użyto żywic anionowymiennych, a otrzymany po zobojętnieniu tlenkiem srebra Ag_2O azotan srebra AgNO_3 przeprowadzano do postaci azotu cząsteczkowego N_2 (do wyznaczenia $\delta^{15}\text{N}$) i dwutlenku węgla CO_2 (do wyznaczenia $\delta^{18}\text{O}$). Druga zastosowana metoda wykorzystuje bakterie denitryfikacyjne, redukujące jony azotanowe NO_3^- do podtlenku azotu N_2O . W pracy zastosowano bakterie *Pseudomonas aureofaciens*, ponieważ w procesie metabolicznym denitryfikacja związków azotu zatrzymuje się u nich na etapie podtlenku azotu N_2O . Gaz ten można jednocześnie analizować pod kątem składu izotopowego azotu i tlenu, co znacznie upraszcza całą procedurę.

W ramach pracy przygotowano i wszechstronnie przetestowano stanowisko do chemicznej preparatyki prób wód zawierających azotany. Zbudowana została również linia do ekstrakcji i oczyszczania N_2O . Proces namnażania bakterii i denitryfikacji azotanów prowadzony był w specjalnie przystosowanym do tego typu czynności laboratorium Katedry Mikrobiologii, Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Akademii Rolniczej w Krakowie.

W celu sprawdzenia poprawności metod analizy składu izotopowego azotanów opracowanych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej pobrano szereg prób wód reprezentujących trzy odmienne typy środowiskowe: wody opadowe, powierzchniowe i wody podziemne. Dla sprawdzenia wpływu czynników antropogenicznych na skład izotopowy azotanów w wodzie opadowej zbierano przez okres dwóch lat, od marca 2004 roku do lutego 2005 roku i od lipca 2005 roku do czerwca 2006 roku, próby opadów na dachu budynku Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie i w Obserwatorium Meteorologicznym Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej na Kasprowym Wierchu. Aby zbadać wpływ środowiska miejskiego na zawartość i skład azotanów w wodach powierzchniowych, w okresie od lipca 2005 roku do czerwca 2006 roku badano próby wody pobierane z Wisły ze Stopnia Wodnego „Kościuszek” (przed Krakowem) i z Mostu Wandy (poza centrum Krakowa) oraz ze zlokalizowanego w pobliżu Krakowa zbiornika wód powierzchniowych Zalew Kryspinów I. Możliwość zastosowania wyznaczonego składu izotopowego azotanów do identyfikacji źródeł zanieczyszczeń i badania procesu denitryfikacji w wodach podziemnych przetestowano w oparciu o próby wody pobrane z dwóch zbiorników wód podziemnych: z obejmującego część Krakowa i pobliskie okolice Głównego Zbiornika Wód Podziemnych 451 „Piaski Bogucickie” oraz z położonego na południowy wschód od Opola Głównego Zbiornika Wód Podziemnych 333 „Opole – Zawadzkie”. We wszystkich pobieranych próbach wody zmierzono stężenie azotanów.

Rozdział 1 rozprawy doktorskiej wprowadza w problematykę zanieczyszczenia wód azotanami i wyznaczania ich składu izotopowego oraz przedstawia założenia pracy. Rozdział 2 opisuje cyrkulację azotu i jego związków w przyrodzie oraz zaburzenia tego cyklu wywołane działalnością człowieka. W rozdziale 3 przedyskutowano problem wpływu zanieczyszczeń azotanami na organizmy żywe i przedstawiono regulacje prawne normujące dopuszczalne poziomy stężeń tychże związków. Rozdział 4 zawiera krótkie omówienie zagadnień dotyczących zmian składu izotopowego azotanów i procesów nań wpływających. W rozdziale 5 przedstawiono przegląd dotychczas stosowanych metod określania składu izotopowego azotanów oraz szczegółowo opisano metody pomiarowe opracowane i wdrożone w ramach niniejszej pracy. Rozdział 6 zawiera wyniki pomiarów składu izotopowego azotanów w różnego typu próbach środowiskowych. Ostatni rozdział 7 stanowi podsumowanie przeprowadzonych prac.

Rozdział 2. Azot w przyrodzie

Azot należy do pierwiastków o podstawowym znaczeniu dla większości procesów biologicznych. Wchodzi m.in. w skład aminokwasów (cegiełek tworzących białka), czy zasad (wraz z cukrem–pentozą i resztą fosforanową tworzących cząsteczki kwasów nukleinowych). Różne procesy, takie jak np. wiązanie czy denitryfikacja, prowadzą do transformacji jednego typu związków azotu w drugie. Również człowiek poprzez produkcję związków azotu (np. amoniaku, kwasu azotowego) i stosowanie ich w gospodarce i rolnictwie (np. jako nawozów sztucznych) ingeruje coraz bardziej w naturalny cykl obiegu azotu w środowisku.

2.1. Podstawowe informacje o azocie

Nazwa pierwiastka pochodzi z języka greckiego od słów *nitron* (po łacinie *nitrium*) i *genes*. Słowem *nitron* nazywano minerały – zawierające azotan potasu bądź sodu – z których można było otrzymać azot. Słowem *genes* oznacza natomiast *tworzący*. W języku greckim *azotikos* oznacza *nie podtrzymujący życia*. Azot został wyizolowany z powietrza w 1772 roku jednocześnie przez Carla Scheelego, Josepha Priestleya i Henry’ego Cavendisha. Jako odkrywcę tego pierwiastka przyjmuje się jednak szkockiego fizyka Daniela Rutheforda, który w 1772 roku pierwszy opublikował rezultaty swoich badań. Pragnąc podkreślić wyjątkową obojętność na spalanie i negatywny wpływ na podtrzymywanie życia, Antoine Lavoisier wprowadził termin *azote*, który upowszechnił się później w wielu językach, w tym w polskim.

Azot to siódmy pierwiastek pod względem częstości występowania we Wszechświecie. Całkowita abundancja azotu na Ziemi wynosi 0,03%. W przyrodzie pierwiastek ten występuje zarówno w stanie wolnym, w postaci cząsteczki N_2 , w której atomy azotu połączone są wiązaniem potrójnym, jak i w stanie związanym w licznych związkach chemicznych. Azot cząsteczkowy jest głównym składnikiem powietrza. W suchym powietrzu jego stężenie wynosi 78,08% (objętościowo). Całkowita masa azotu w atmosferze ziemskiej wynosi w przybliżeniu $4 \cdot 10^{15}$ ton (education.jlab.org). Dla porównania, objętościowy udział azotu w atmosferze sąsiednich planet w Układzie Słonecznym wynosi: 3% (Wenus) i 2,7% (Mars) (www.boc.com). Obecność azotu stwierdzono również w atmosferze Tytana, największego księżyca Saturna.

Azot należy do piątej grupy układu okresowego – azotowców. Jest niemetalem. W fazie stałej występuje w kilku postaciach. Oznacza się je literami z alfabetu greckiego: α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ . Azot cechuje dość duża bierność chemiczna, wynikająca z wysokiej energii wiązania w cząsteczce (945,33 kJ/mol). W podwyższonej temperaturze reaguje z metalami aktywnymi, tworząc azotki. W wysokiej temperaturze łączy się z wodorem i tlenem, tworząc amoniak i cały szereg tlenków azotu. Z niemetalami typu siarka, fosfor czy jod azot reaguje w obszarze wyładowania łuku elektrycznego. Atom azotu posiada siedem elektronów: dwa elektrony na pierwszej powłoce (oba na podpowłoce 1s) oraz pięć elektronów na drugiej powłoce (dwa na podpowłoce 2s i trzy na podpowłoce 2p). Dlatego też w większości związków bywa trójwartościowy. Znanych jest 15 izotopów azotu o liczbach masowych od 10 do 24, z czego tylko dwa są trwałe: ^{14}N (99,634%) i ^{15}N (0,366%) (education.jlab.org). Abundancja izotopu ^{15}N w powietrzu jest stała (Junk i Svec, 1958) ze stosunkiem izotopowym $^{15}N/^{14}N=1/272$. Z tego względu skład izotopowy azotu wyraża się najczęściej względem azotu atmosferycznego N_2 .

2.2. Formy występowania azotu w przyrodzie

Azot wytwarzany jest w trakcie reakcji termojądrowych zachodzących we wnętrzu masywnych gwiazd w ramach tzw. cyklu węglowo–azotowo–tlenowego CNO, zwanego też cyklem Bethego–Weizsäckera (von Weizsäcker, 1938; Bethe, 1939). Badając widmo elektromagnetyczne w dalekim ultrafiolecie (90–120 nm), wykryto obecność azotu również w przestrzeni międzygwiazdnej (fuse.pha.jhu.edu).

Oprócz formy cząsteczkowej (N_2) azot jest składnikiem wielu związków nieorganicznych, takich jak np. amoniak, kwas azotowy i jego sole – azotany. Tzw. „woda królewska” (mieszanina kwasu azotowego HNO_3 i solnego HCl) była znana już w średniowieczu alchemikom, używającym jej do rozpuszczania złota. Azot wchodzi również w skład związków organicznych, m.in. niezbędnych dla życia biocząsteczek (kwasów nukleinowych, białek, lipidów). Tabela 2.1 przedstawia przegląd podstawowych grup związków azotu.

Tab. 2.1. Przegląd podstawowych nieorganicznych i organicznych związków azotu.

Grupa	Najważniejsze związki	Występowanie i zastosowania
ZWIĄZKI NIEORGANICZNE		
Kwas azotowy i azotany (azotany (V))	– HNO_3 – $NaNO_3$, KNO_3 , NH_4NO_3 , $Ca(NO_3)_2$, $Pb(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $AgNO_3$, $LiNO_3$	– wytwarzanie innych azotanów ($NaNO_3 \rightarrow KNO_3 \rightarrow HNO_3$), – otrzymywanie azotanów organicznych, np. nitrogliceryny, trinitrotoluenu (HNO_3), – rozpuszczanie metali szlachetnych (mieszanina kwasów HNO_3 i HCl w stosunku objętościowym 1:3, tzw. woda królewska), – rozpoznawanie białek w reakcji ksantoproteinowej (HNO_3), – wykrywanie aldehydów w tzw. próbie Tollensa ($AgNO_3$), – przemysł farmaceutyczny (HNO_3), – produkcja materiałów wybuchowych (HNO_3 , $NaNO_3$, NH_4NO_3 , $AgNO_3$, $Pb(NO_3)_2$, $LiNO_3$), – nawozy sztuczne ($NaNO_3$, KNO_3 , NH_4NO_3 , $Ca(NO_3)_2$), – konserwowanie mięsa ($NaNO_3$, KNO_3), – posrebrzanie lusterek i otrzymywanie substancji światłoczułych ($AgNO_3$), – środek antyseptyczny i sterylizacyjny ($AgNO_3$), – składnik ciekłych paliw rakietowych (HNO_3), – kolorymetryczne wykrywanie narkotyków np. heroiny, morfiny (HNO_3), – produkcja lodów (KNO_3), – wytwarzanie past do zębów (KNO_3), – produkcja barwników ($Pb(NO_3)_2$).
Kwas azotawy i azotyny (azotany (III))	– HNO_2 – KNO_2 , $NaNO_2$, NH_4NO_2	– konserwacja żywności (KNO_2 , $NaNO_2$), – przemysł farmaceutyczny (produkcja azotynu pentylu – leku przy dławicy piersiowej), – produkcja barwników (KNO_2), – w fotografii jako uczulacz (sensybilizator) (KNO_2), – przeciwdziałanie korozji metali i stopów ($NaNO_2$), – w medycynie: obniżanie ciśnienia krwi, udrażnianie układu oddechowego i pokarmowego ($NaNO_2$), – antidotum przy zatruciu cyjankami ($NaNO_2$), – pestycyd i środek przeciwko gryzoniom (NH_4NO_2).
Amoniak i związki amonowe	– NH_3 – sole NH_4^+ , np. NH_4Cl , NH_4F , NH_4Br , NH_4I , NH_4HCO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, NH_4ClO_3	– popularny rozpuszczalnik nieorganiczny metali z I i II grupy układu okresowego (NH_3), – wskaźnik do wykrywania wielu gazów (NH_3), – odkażanie wody (NH_3), konserwacja i spulchnianie żywności (NH_4Cl), – produkcja papierosów (dodatek NH_3 poprawia transfer nikotyny do krwi), – paliwo w silnikach rakietowych (NH_3), – elektrolit w suchych ogniwach Leclanchégo (NH_4Cl), – lek na kaszel, dodatek do paszy dla bydła, składnik szamponu (NH_4Cl), – produkcja nawozów sztucznych, węglanu sodu (sody amoniakalnej) – metodą Solvaya, materiałów wybuchowych, cyjanowodoru (NH_3) i innych soli amonowych, – produkcja tzw. metodą Ostwalda tlenku azotu NO – półproduktu do otrzymywania HNO_3 (NH_3), – czynnik chłodniczy (NH_3), – nawóz sztuczny i środek wspomagający działanie insektycydów, herbicydów i fungicydów ($(NH_4)_2SO_4$), – garbarstwo i przemysł drożdżowy ($(NH_4)_2SO_4$), – przygotowanie tras narciarskich – utrwalanie i opóźnianie topnienia pokrywy śnieżnej (NH_4Cl).

Grupa	Najważniejsze związki	Występowanie i zastosowania
ZWIĄZKI NIEORGANICZNE (c.d.)		
Tlenki azotu	– N_2O , NO i NO_2 (tzw. NO_x -y), N_2O_3 , N_2O_4 , N_2O_5 , NO_3	– przemysł spożywczy – środek spulchniający i konserwujący (N_2O), – „gaz rozwesalający” (N_2O) – uśmierczający ból, stosowany w położnictwie i dentystyce, – środek poprawiający osiągi silników samochodowych (N_2O), – składnik paliwa w silnikach rakietowych (N_2O), – produkcja azotynów (N_2O), – powstrzymywanie agregacji leukocytów i płytek krwi, obniżanie ciśnienia krwi, niszczenie bakterii chorobotwórczych (NO), – neuroprzekaznik w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym (NO), – produkcja materiałów wybuchowych (NO_2 , N_2O_5).
ZWIĄZKI ORGANICZNE		
Aminokwasy	– aminokwasy kwaśne, obojętne i zasadowe – 20 aminokwasów podstawowych (tworzących polipeptydy organizmów żywych)	– materiał budulcowy łańcuchów peptydów i białek, – produkcja neuroprzekazników (glicyna, kwas glutaminowy), – transport lipidów w komórkach (karnityna), – synteza puryn i pirymidyn – ich pochodne wchodzi w skład cząsteczek DNA i RNA (kwas asparaginowy, glicyna), – synteza hemu (glicyna), – składnik leków przeciwko przeziębieniu, grypie i opryszczce (lizyna), – wiązanie NH_3 powstającego przy metabolizmie azotu (glutamina), – wytwarzanie hormonów (tryptofan, tyrozyna).
Białka	– łańcuchy polipeptydowe (>100 aminokwasów) – białka proste i złożone	– materiał budulcowy dla organizmu, – katalizatory reakcji biochemicznych (enzymy), – transport tlenu z płuc do tkanek (hemoglobina), – regulacja stężenia mikroelementów we krwi i wewnątrz komórki, np. Fe (transferyna), – rozpoznawanie antygenów chorobowych (immunoglobuliny), – wytwarzanie i przekaz impulsów nerwowych.
Kwasy nukleinowe	– DNA i RNA	– magazyn kodu genetycznego dla organizmów żywych i większości wirusów, – produkcja białek, – katalizator reakcji biochemicznych (RNA).

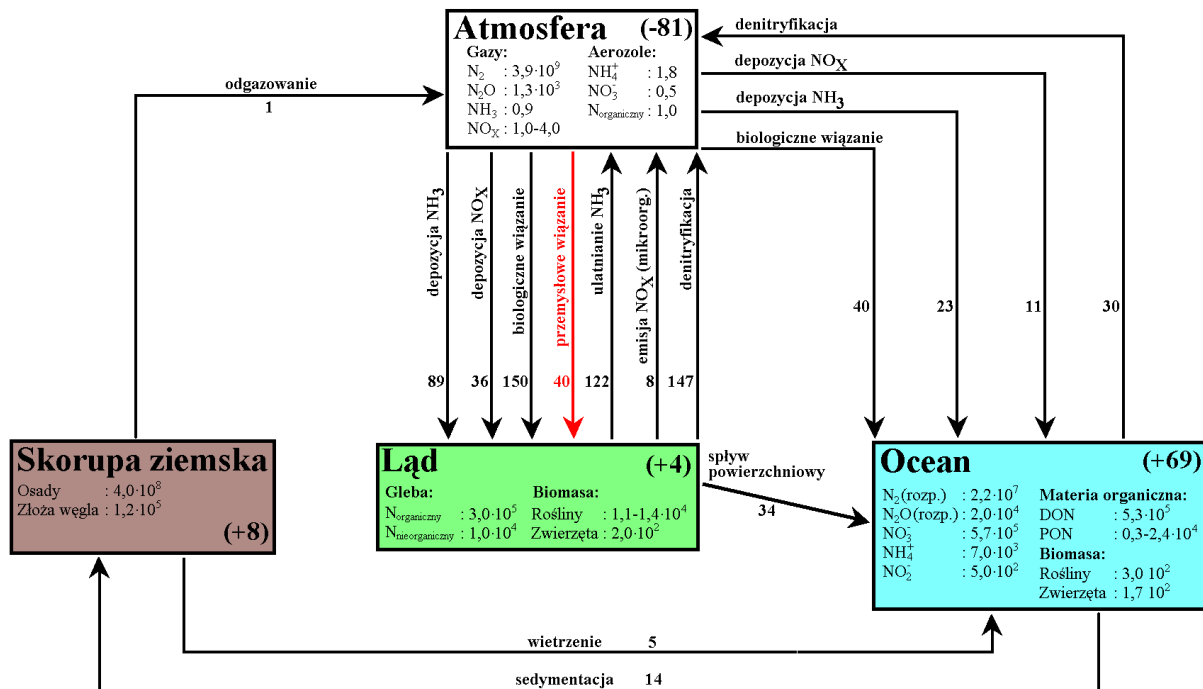
2.3. Obieg azotu w przyrodzie

Mianem cykli biogeochemicznych określa się krążenie pierwiastków i ich związków chemicznych pomiędzy biotycznymi i abiotycznymi częściami globalnego ekosystemu Ziemi. Cztery z nich: węgiel, wodór, azot i tlen stanowią znakomitą (u człowieka 90,3%) część biologicznego budulca formującego, oprócz wody i substancji nieorganicznych, również szereg wysoce zróżnicowanych związków organicznych: białek, lipidów i węglowodanów.

Cykl azotowy opisuje krążenie w przyrodzie azotu i jego związków chemicznych oraz ich chemiczne przemiany wskutek procesów o charakterze zarówno biologicznym, jak i abiotycznym. Wyróżnia się zwyczajowo cztery główne rezerwuary tego pierwiastka: atmosferę, oceany, ląd i skorupę ziemską (Rys. 2.1). Krążenie azotu pomiędzy rezerwuarami w ramach całego cyklu jest procesem złożonym i składa się z szeregu reakcji fizykochemicznych. Wyróżnia się w nim kilka mniejszych sub-cykli:

- cykl amoniakowo–amonowy (NH_3/NH_4^+) (Rys. 2.3),
- cykl tlenkowo–azotanowy (NO_x/NO_3^-) (Rys. 2.4),
- cykl wiązaniowo–denitryfikacyjny (Rys. 2.5).

W atmosferze podstawową formą występowania azotu jest cząsteczkowy N_2 (ponad 99%), reszta to głównie N_2O . Pozostałe związki azotu cechują niskie stężenia i względnie krótkie czasy przebywania w atmosferze (poniżej 1 roku). Niektóre z nich, jak amoniak, wychwytywane są przez kwasowe gazy, aerozole i wodę, przez co zawartość NH_3 w powietrzu maleje z wysokością (Hoell i in., 1980).



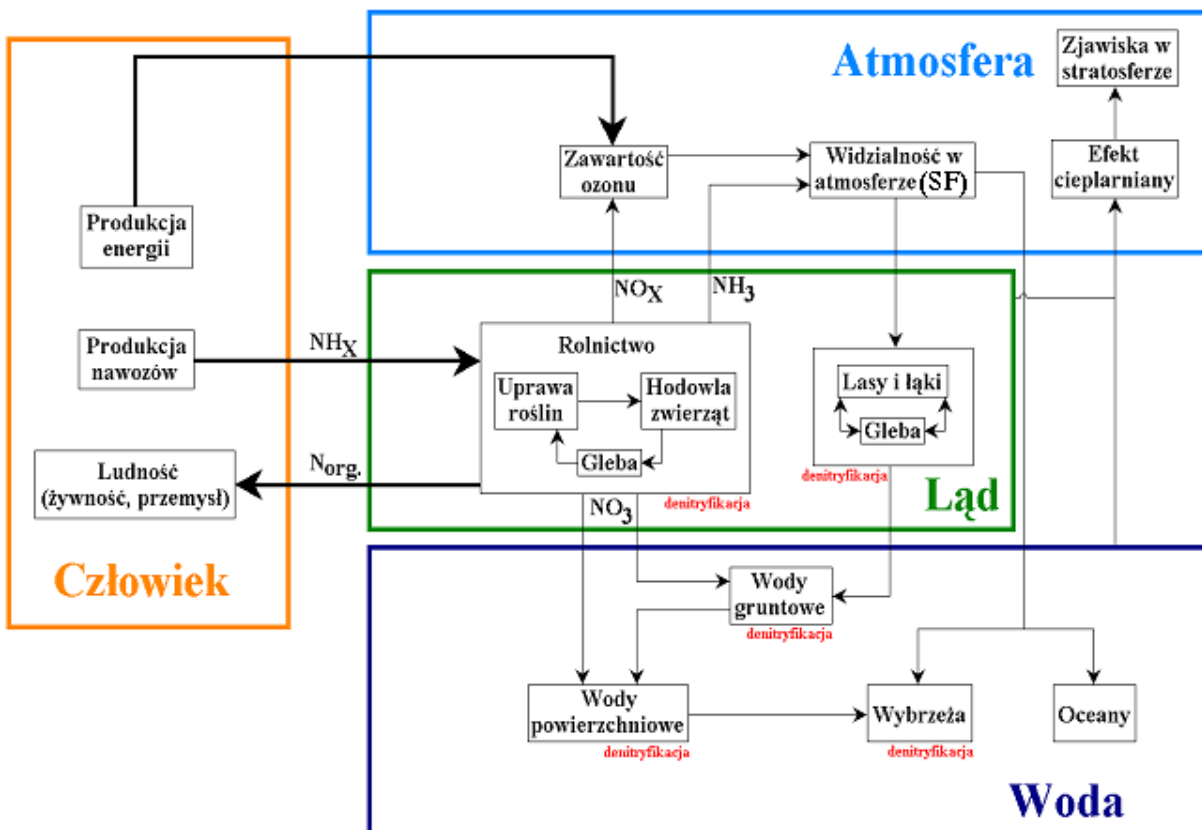
Rys. 2.1. Globalny cykl azotowy (Söderlund i Svensson, 1976; McElroy i in., 1976; Jaffe, 1992). W ramach poszczególnych rezerwuarów podano wielkości zasobów poszczególnych związków i form występowania azotu (w TgN, 1Tg = 10^{12} g). Liczby w nawiasach oznaczają roczne zmiany wielkości danego rezerwuaru (w TgN/rok) wskutek przepływu związków azotu. Wielkości strumieni azotu (w Tg/rok) przedstawiono w postaci strzałek. Strumień azotu wiążanego antropogenicznie zaznaczono na czerwono. Oznaczenia: DON – rozpuszczony azot organiczny, PON – cząsteczkowy azot organiczny.

Również w oceanach dominuje rozpuszczony N_2 (95%), na drugim miejscu sytuują się azotany i rozpuszczona materia organiczna. Rezerwuár morski zawiera jednak tylko niewielki ułamek całkowitego niezwiązanego N_2 (ok. 0,5%). Innych gazów (np. N_2O) również jest mniej w oceanie, przede wszystkim ze względu na ich słabszą rozpuszczalność.

Na lądzie podstawową formą występowania azotu jest martwa materia organiczna w glebie, przeważająca nad formami nieorganicznymi i biomasą roślinno–zwierzęcą. Duży wpływ na zawartość azotu na lądzie mają lokalne warunki klimatyczne: w rejonach cieplejszych jest go więcej w porównaniu z obszarami chłodniejszymi.

2.4. Zaburzenia cyklu azotowego wskutek działalności człowieka

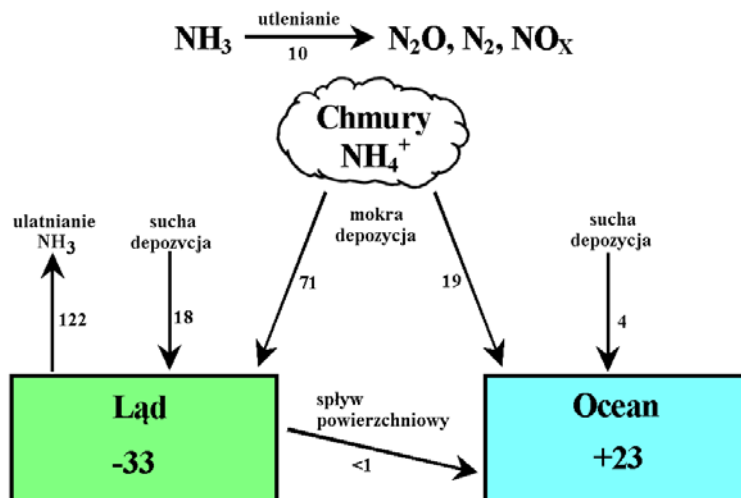
Jak już wspomniano, cykl azotowy składa się z szeregu procesów o charakterze zarówno biologicznym, jak i abiotycznym. Obieg tego pierwiastka jest jednak zaburzony w skali lokalnej i globalnej, w wyniku działalności człowieka (Vitousek i in., 1997). Mianem tzw. *kaskady azotowej* określa się sekwencyjny transport azotu pomiędzy poszczególnymi ekosystemami, inicjowany przez czynnik antropogeniczny (Rys. 2.2).



Rys. 2.2. Wpływ czynnika ludzkiego na krążenie azotu w poszczególnych rezerwuarach (Galloway i in., 2003). Oznaczenie: SF – smog fotochemiczny.

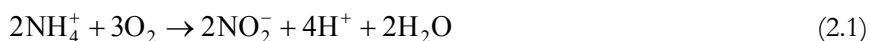
Zasadniczą rolę odegrało tutaj wprowadzenie w latach 1910–1914 nowoczesnej technologii produkcji amoniaku z wykorzystaniem azotu atmosferycznego, tzw. procesu Habera–Boscha ($N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$). Umożliwił on wytwarzanie na szeroką skalę nawozów sztucznych, co jest szczególnie ważne w kontekście wzrostu liczby mieszkańców Ziemi i zapotrzebowania na żywność. O'Neill (1993) podaje, że ilość azotu wykorzystywanego do produkcji nawozów wynosi 80 TgN/rok, przy 140 TgN/rok wiążanego przez mikroorganizmy.

Innym przejawem ingerencji człowieka w naturalny obieg azotu w przyrodzie jest emisja do atmosfery tlenków azotu przy spalaniu paliw kopalnych w silnikach spalinowych i piecach. Wysoka temperatura wytworzona w tego typu urządzeniach pozwala na bezpośrednie łączenie N_2 z O_2 (im wyższa temperatura, tym większa ilość produkowanych NO_x -ów). W globalnym ujęciu ilość emitowanych w ten sposób do atmosfery tlenków azotu nie przekracza kilku procent naturalnej produkcji. Lokalnie, emisja tlenków azotu może jednak doprowadzić do przekroczenia norm stężenia kilkadziesiąt, a nawet kilkaset razy. Skutkuje to powstawaniem w obrębie dużych aglomeracji, w obecności intensywnego nasłonecznienia, tzw. *smogu fotochemicznego*. Jest to mieszanina tlenków azotu – głównie NO_2 , ozonu troposferycznego, lotnych związków organicznych – tzw. VOCs (z ang. *volatile organic compounds*) – aldehydów, ketonów, azotanów itd. W celu zmniejszenia ilości zanieczyszczeń emitowanych przez silniki samochodowe instaluje się katalizatory umożliwiające redukcję tlenków azotu do azotu cząsteczkowego.



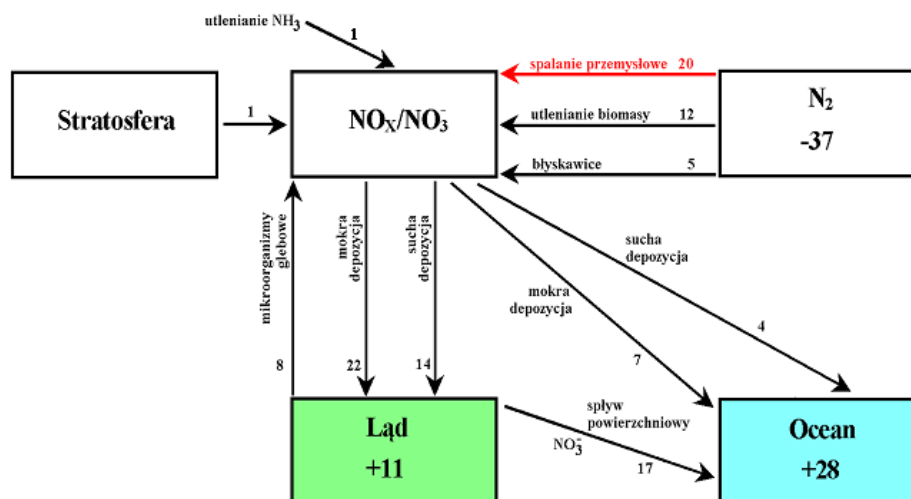
Rys. 2.3. Cykl amoniakowo–amonowy (strumienie i zmiany wielkości rezerwuarów wyrażono w TgN/rok) (Jaffe, 1992).

Antropogeniczna emisja do atmosfery związków azotu ma również szerszy, globalny kontekst. Choć obecny w atmosferze amoniak pochodzi przede wszystkim z amonifikacji i ulatniania z odpadów pozwierzęcych (Frenay i in., 1983), to również, choć w mniejszym stopniu, emitowany jest on podczas stosowania nawozów sztucznych i przy spalaniu paliw. W obecności wody, z cząsteczek NH_3 tworzą się jony amonowe NH_4^+ . Większość amoniaku wraca na powierzchnię ziemi z opadami, jako NH_4^+ , lub w ramach suchej depozycji, jako gazowy NH_3 , a niewielka część utlenia się do tlenków azotu (Rys. 2.3). Amoniak bądź jony amonowe mogą zostać wykorzystane w obrębie biosfery przez wybrane organizmy. W trakcie nityfikacji jony amonowe utleniane są do azotanów (Równ. 2.1 i 2.2), które, w przeciwieństwie do NH_3 lub NH_4^+ , jest w stanie przyswajać większość roślin:



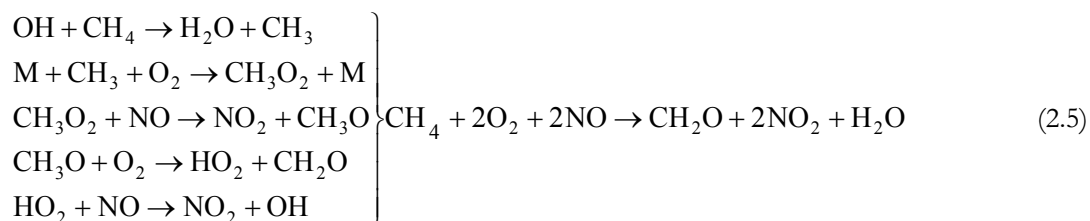
W cyklu tlenkowo–azotanowym depozycja sucha i mokra azotanów oraz tlenków azotu NO i NO_2 równoważy emisję do atmosfery NO_x -ów (Rys. 2.4). Podstawowym źródłem NO_x -ów jest antropogeniczne spalanie zarówno paliw kopalnych (w silnikach samochodowych i elektrowniach), jak i biomasy, mniejsze znaczenie odgrywają tutaj błyskawice, pożary, wybuchy wulkanów i działalność mikroorganizmów (Równ. 2.3 i 2.4).





Rys. 2.4. Cykl tlenkowo-azotanowy (strumienie i zmiany wielkości rezerwuarów wyrażono w TgN/rok). Na czerwono zaznaczono strumień ściśle antropogeniczny (Jaffe, 1992).

Emitowany do atmosfery tlenek azotu NO może być w troposferze utleniany do NO₂. Powyższy proces ma charakter wieloetapowy:



gdzie: M – cząsteczka absorbująca energię (np. N₂).

Wytworzony NO₂ może zostać rozłożony do NO przez promieniowanie słoneczne ($\lambda < 410 \text{ nm}$), z wytworzeniem wolnego tlenu, który z O₂ produkuje ozon:



albo przereagować z rodnikiem OH:



HNO_3 jest usuwany z atmosfery w postaci depozycji suchej lub mokrej jako wolny kwas, bądź po związaniu np. z obecnymi w atmosferze jonami amonowymi jako NH_4NO_3 .

Jeżeli stężenie NO_x -ów w powietrzu osiąga poziom około 30 ppt, to produkcja ozonu zaczyna odgrywać znaczącą rolę (Jaffe, 1992). W warunkach fotochemicznego smogu stężenie O_3 rzędu kilkuset ppb staje się niebezpieczne dla zdrowia. Czas życia NO_x -ów w troposferze szacuje się na 1–30 dni (Söderlund i Svensson, 1976; Garrels, 1982; Crutzen, 1988). Kontrola poziomu stężenia NO_x -ów staje się szczególnie ważna w aspekcie redukcji stężenia ozonu w dolnej atmosferze (Liu i in., 1987; Liu i in., 1988). W dolnych warstwach atmosfery utlenianiu może ulec również amoniak, choć proces ten odgrywa małą rolę jako „studnia” dla NH_3 . W niektórych regionach wpływa jednak na poziom stężenia NO_x -ów (Stedman i Shetter, 1983).

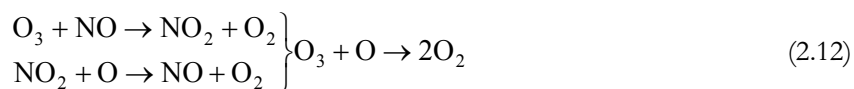
Strumień antropogeniczny tlenku azotu (I) (zwanego również podtlenkiem azotu N_2O) do atmosfery szacuje się na poziomie 3–11 Tg/rok (Weiss, 1981; Hahn i Crutzen, 1982; Stedman i Shetter, 1983). Transport N_2O z troposfery do stratosfery odbywa się na drodze dyfuzji turbulentnej i zależy od gradientu stężenia tego gazu oraz od współczynnika dyfuzji turbulentnej. N_2O w stratosferze przyczynia się do niszczenia obecnego tam ozonu, zabezpieczającego powierzchnię Ziemi przed szkodliwym promieniowaniem nadfioletowym. Obecne w stratosferze promieniowanie słoneczne o długości fali poniżej 250 nm (nadfiolet) dostarcza energii wystarczającej do złamania wiązań chemicznych w cząsteczkach docierającego tu N_2O i wytworzenia N_2 (95% reakcji) lub NO (5% reakcji):



NO może powstać również w wyniku reakcji N_2O ze wzbudzonymi atomami tlenu, wytwarzanymi przez promieniowanie krótkofalowe:



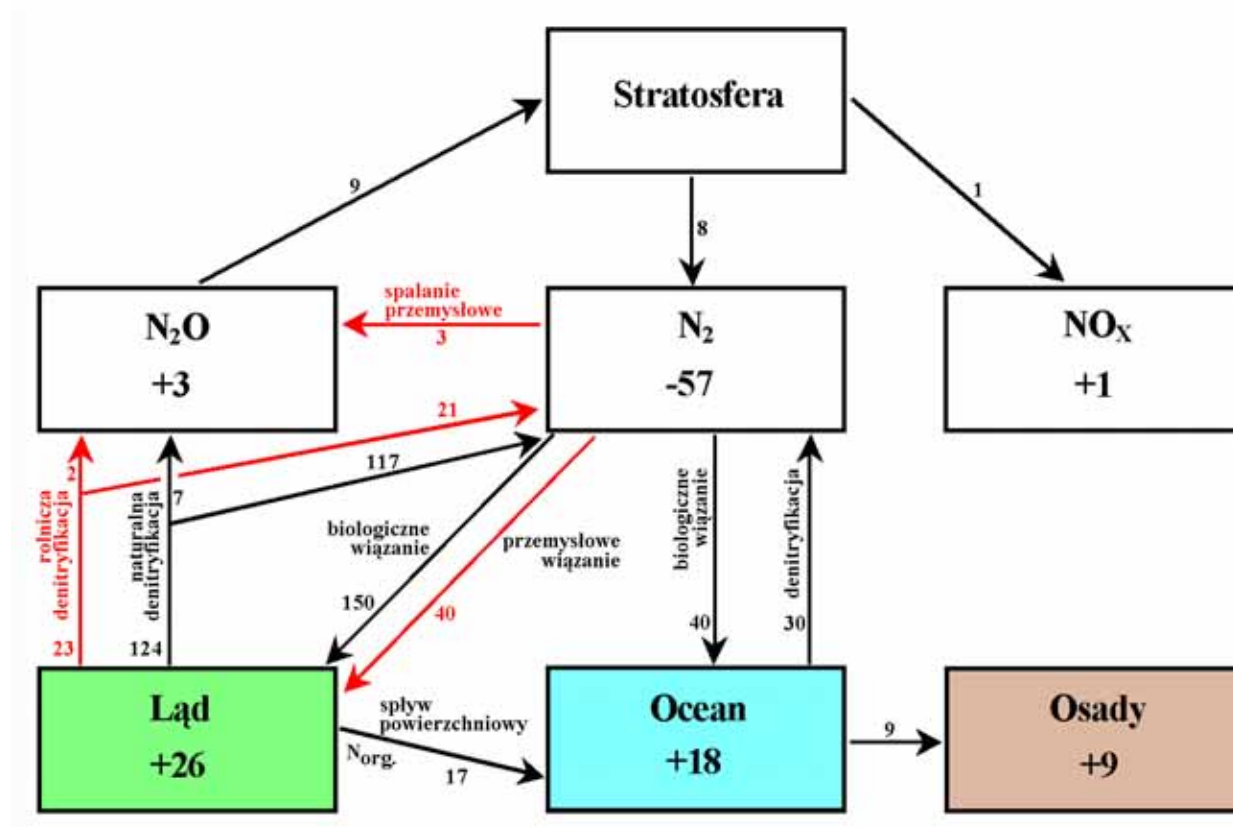
Powstały w stratosferze NO jest ważnym czynnikiem niszczącym ozon. Proces ten przebiega w następujący sposób:



Fotochemiczna produkcja wolnego tlenu, a w konsekwencji O_3 , przeważa nad wytwarzaniem NO , przyczyniającym się do niszczenia ozonu, jednakże pojedyncza cząsteczka tlenku azotu może katalizować rozpad wielu molekul O_3 .

Ingerencja człowieka w naturalny obieg azotu najbardziej uwidacznia się w przypadku cyklu wiązaniowo–denitryfikacyjnego (Rys. 2.5). Emitowane do atmosfery N_2 i N_2O wytwarzane są w trakcie

denitryfikacji azotanów, przy czym N_2O może być również częściowo konsumowany w trakcie denitryfikacji. Mimo iż w sumie jest to najslabiej poznany proces, zakłada się, że zarówno w środowisku lądowym, jak i w oceanach denitryfikacja pełni rolę mechanizmu równoważącego dopływ azotu do rezerwuarów (Burns i Hardy, 1975; Delwiche, 1981; Rolston, 1981; Stedman i Shetter, 1983). Niektóre badania (Weiss, 1981) wskazują jednak na możliwy brak równowagi w cyklu denitryfikacyjnym ze względu na czynniki antropogeniczne.

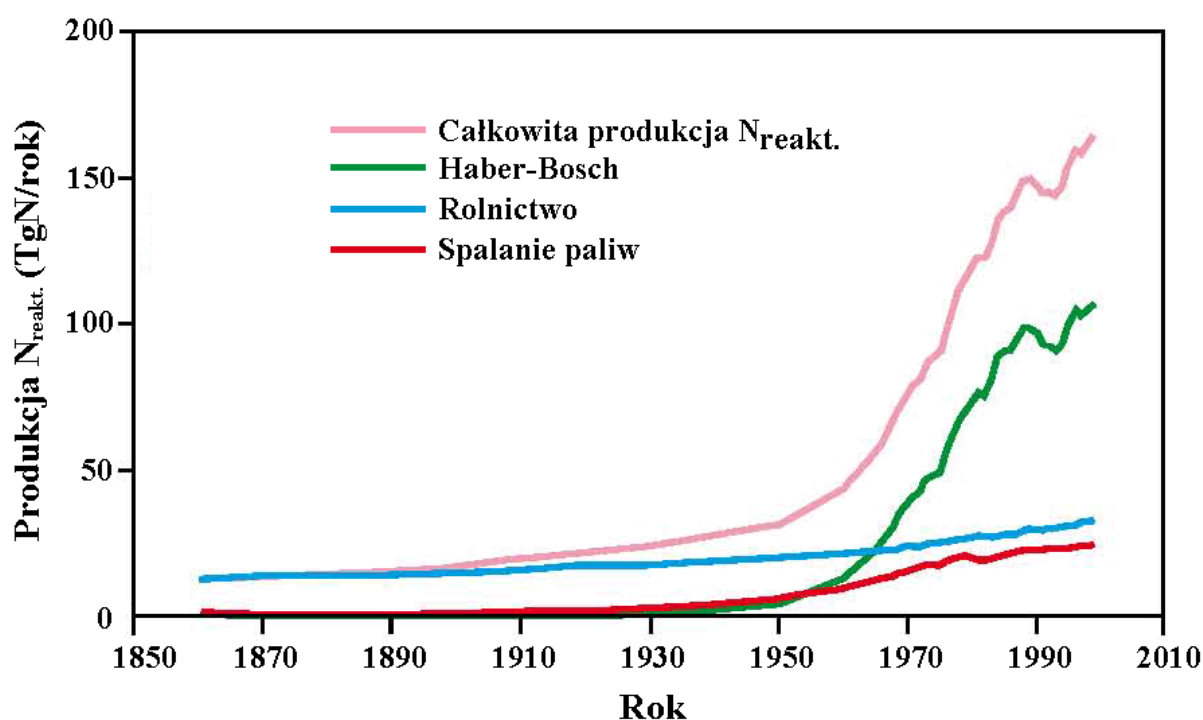


Rys. 2.5. Cykl wiązaniowo–denitryfikacyjny (strumienie i zmiany wielkości rezerwuarów wyrażono w TgN/rok). Na czerwono zaznaczono strumienie antropogeniczne (Jaffe, 1992).

Wzrost ilości azotu wiązanej antropogenicznie z atmosfery należy rozpatrywać w kontekście wpływu tego czynnika na pozostałe elementy cyklu azotowego, np. na ilość emitowanych do tropo– i stratosfery tlenków azotu. Transfer netto azotu z atmosfery do skorupy ziemskiej, lądu i oceanu szacuje się na ok. 81 TgN/rok (Rys. 2.1). Stedman i Shetter (1983) przypuszczają, że większość tego strumienia kierowana jest do oceanów, prowadząc do wzrostu zawartości w wodzie związków azotu, głównie azotanów (o około 0,01%/rok). W konsekwencji rośnie intensywność denitryfikacji i emisja N_2O do atmosfery. Zmiana chemizmu azotowego wód oceanicznych wpływać może również na gatunki roślin i zwierząt bytujących w oceanach.

Rozdział 3. Problem zanieczyszczenia wód azotanami

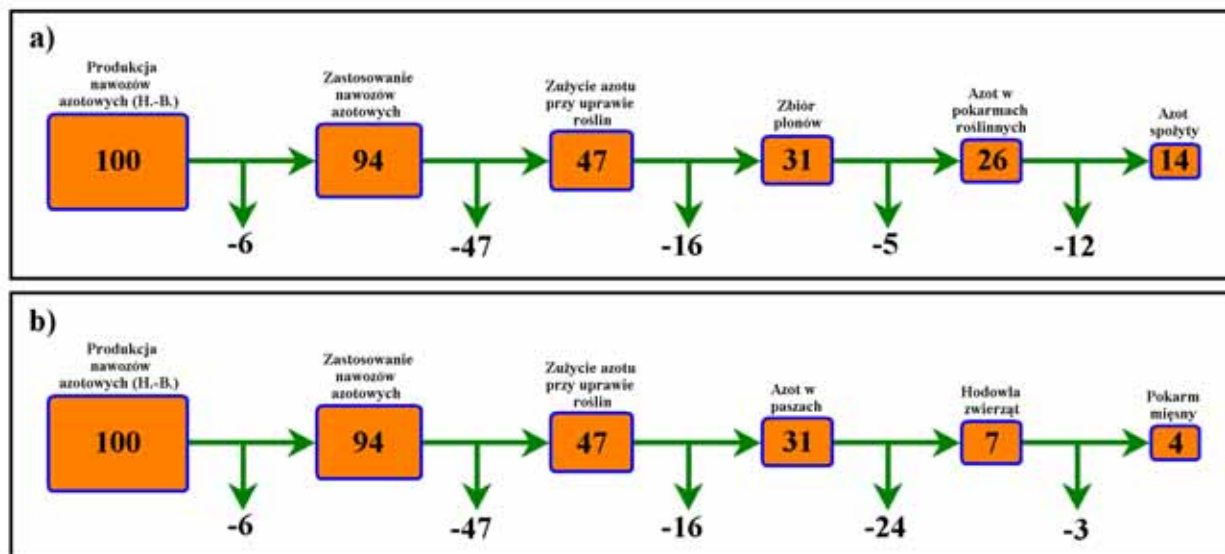
Gwałtowny wzrost liczby ludności w XIX wieku wymusił konieczność polepszenia wydajności rolnictwa. Skutkowało to upowszechnieniem stosowania nawozów. Początkowo uzyskiwano je z wydobywanego guana i mineralnych azotanów. W XX wieku pojawiła się możliwość chemicznej syntezy nawozów – w latach 1905–1910 Fritz Haber opracował technologię syntezy amoniaku, którą później na skalę przemysłową rozwinął Carl Bosch. Od połowy XX wieku rozpoczął się dynamiczny wzrost ilości wprowadzanego do środowiska tzw. azotu reaktywnego (mianem azotu niereaktywnego określa się azot cząsteczkowy N_2). Zaczęto wytwarzać ogromne ilości azotanów (potasu, sodu, amonu). Wprowadzanie nawozów mineralnych do środowiska spowodowało, obok niewątpliwie pozytywnych skutków, również negatywne następstwa – przede wszystkim zanieczyszczenie wód powierzchniowych i podziemnych związkami azotu, głównie azotanami (Rys. 3.1).



Rys. 3.1. Światowa antropogeniczna produkcja azotu reaktywnego związana z produkcją według technologii Habera–Boscha, biologicznym wiązaniem azotu przez uprawiane rośliny i spalaniem paliw kopalnych (Galloway i in., 2003; Galloway, 2005).

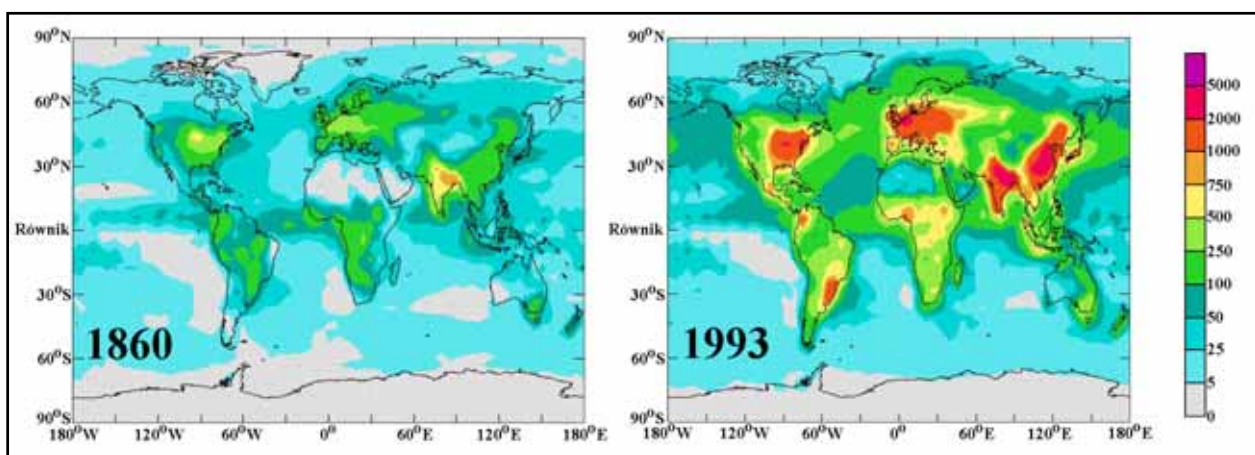
3.1. Wzrost zanieczyszczenia wód związkami azotu na przestrzeni ostatnich 150 lat

Wprowadzanie do środowiska dużych ilości azotu reaktywnego, głównie pod postacią azotanów, prowadzi przede wszystkim do niepełnego wykorzystania azotu w procesie prowadzącym ostatecznie do otrzymania produktów rolniczych (Rys. 3.2). Azot spożyty pod postacią produktów roślinnych stanowi tylko 14% azotu zawartego w nawozach sztucznych zastosowanych do wyprodukowania tych produktów. W przypadku produktów mięsnych udział ten wynosi tylko 4%.



Rys. 3.2. Wykorzystanie azotu obecnego w związkach otrzymywanych w procesie Habera–Boscha (H.–B.): a) produkty roślinne, b) produkty mięsne (Galloway i Cowling, 2002; Galloway 2006).

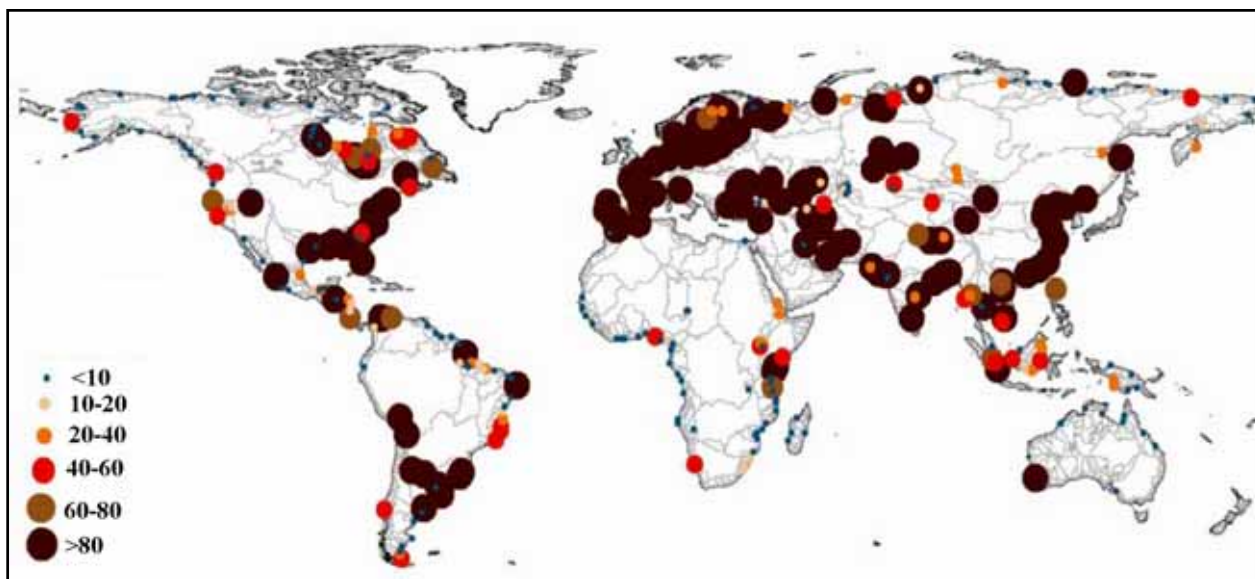
Depozycja całkowitego azotu nieorganicznego (TIN, z ang. *total inorganic nitrogen*) w XX wieku w skali globalnej wykazuje duże zróżnicowanie zarówno przestrzenne, jak i czasowe, w porównaniu z analogicznym rozkładem dla XIX wieku. Każdy kontynent (za wyjątkiem Antarktydy) posiada lokalne maksima depozycji TIN-a (Rys. 3.3).



Rys. 3.3. Przestrzenny globalny rozkład depozycji całkowitego azotu nieorganicznego (w kgN/(km² rok)) w 1860 i 1993 roku (Galloway i in., 2004; Galloway, 2005).

Badania rzek strefy umiarkowanej wpływających do Oceanu Atlantyckiego wykazały, że w porównaniu do sytuacji sprzed intensywnego rozwoju przemysłu nastąpił wzrost ilości całkowitego

rozpuszczonego azotu dostarczanego do rzek o czynnik 2–20 razy (Vitousek i in., 1997). Oznacza to w niektórych przypadkach nawet kilkunastokrotne przekroczenie poziomu związanego z naturalnym strumieniem azotu przenoszonym przez rzeki do przybrzeżnych stref oceanu. Szacuje się, że około 25% azotu reaktywnego uwalnianego do środowiska przenoszone jest przez rzeki na tereny przybrzeżne. Jest to efekt typowy dla zlewni większości dużych rzek (Rys. 3.4), silnie skorelowany ze wzrostem azotu wprowadzanego do zlewni wraz z opadami atmosferycznymi i nawozami. Podobną sytuację zaobserwowano w wielu zbiornikach wód powierzchniowych. Przykładowo, w badanej na przestrzeni 10 lat dużej liczbie norweskich jezior (ok. tysiąca) zanotowano podwojenie zawartości azotanów. Wzrost gęstości zaludnienia na obszarach zlewni spowodował zwiększenie zawartości związków azotu w wodach rzek i zbiorników. Zmniejszyło się natomiast zróżnicowanie tychże związków w wodach powierzchniowych – zdecydowanie zaczęły dominować azotany.



Rys. 3.4. Procentowy wzrost ilości azotu przenoszonego przez rzeki wskutek uwalniania azotu reaktywnego do środowiska przy produkcji żywności (Galloway, 2006).

Zwiększony dopływ azotanów do cieków i zbiorników powierzchniowych przyczynił się do ich zakwaszenia. Dotychczasowe wysiłki, zmierzające do zmniejszenia depozycji zanieczyszczeń, w szczególności w postaci tzw. *kwaśnych deszczy*, koncentrowały się głównie na ograniczeniu emisji związków siarki (głównie SO_2). Znacznie mniej uwagi poświęcano wypuszczanym do atmosfery tlenkom azotu. Nasycone w związki azotu gleby na obszarach zlewni nie są w stanie efektywnie oczyścić infiltrujących wód, zanim te spłyną do rzeki lub jeziora. W trakcie pierwszych wiosennych roztopów często obserwuje się w narażonych na zanieczyszczenie zbiornikach znaczny wzrost stężenia azotanów (tzw. „*kwaśny pik*”), wymywanych z okolicznych obszarów. W jeziorach bogatych w związki fosforu dopływ azotu nieorganicznego oprócz zakwaszenia spowodował eutrofizację, przyczyniając się do zmniejszenia bioróżnorodności gatunkowej w świecie roślin i zwierząt. W wielu jeziorach strefy umiarkowanej w Skandynawii czy Kanadzie nastąpiło

ograniczenie populacji niektórych gatunków ryb, a w skrajnych wypadkach wręcz ich wyginiecie. Inne negatywne skutki to pojawienie się szkodliwego, niejadalnego dla lokalnej fauny fitoplanktonu i toksycznych alg, pogorszenie koloru, zapachu i przejrzystości wody (Rys. 3.5).



Rys. 3.5. Satelitarne zdjęcie Morza Kaspijskiego. Zmniejszenie przejrzystości wody widoczne szczególnie w północnych rejonach nastąpiło w wyniku eutrofizacji (visibleearth.nasa.gov).

W zbiornikach z wyraźną stratyfikacją termiczną, zapobiegającą pionowemu mieszanii wód, eutrofizacja powoduje pojawienie się w strefie dennej obszarów z niedoborem tlenu. W warunkach beztlenowych ze szczątków materii organicznej powstawać mogą wtedy duże ilości siarkowodoru. Zjawiska niedoboru tlenu i związane z tym efekty zanotowano w Morzu Bałtyckim (w Cieśninie Kattegat) czy w Morzu Czarnym.

Wzrost stężenia azotanów zaobserwowano również w wodach podziemnych, szczególnie na terenach, na których intensywnie rozwija się rolnictwo. Zazwyczaj zakłada się, że ilość związków azotu przedostająca się do wód podziemnych jest stosunkowo niewielka. Należy jednak pamiętać, że czas przebywania azotanów w tych wodach może przekraczać nawet kilkadziesiąt lat. Podwyższone stężenie azotanów może zacząć się zmniejszać dopiero w momencie, kiedy czynnik antropogeniczny przestaje znacząco wpływać na lokalny cykl azotowy.

3.2. Wpływ wysokiej zawartości azotanów w wodzie na organizmy żywe

Tlenki azotu reagują z wilgocią atmosferyczną, tworząc opady o kwaśnym odczynie, tzw. *kwaśne deszcze*. Opady te uszkadzają liście i igły, a w skali komórkowej naruszają wewnętrzną strukturę rośliny – rozpuszczają błonę komórkową, zaburzając transport substancji odżywczych i wody.

Zwiększenie zawartości substancji pokarmowych w wodach powierzchniowych, w tym azotanów (tzw. *eutrofizacja*), prowadzi do przyspieszenia rozwoju populacji fotosyntetyzujących glonów. Jest to zjawisko tzw. *zakwitania glonów*. Szczególnie podatne na to zjawisko są śródlądowe zbiorniki jeziorne, w których azotanów i innych składników pokarmowych jest z reguły więcej niż w ciekach wodnych takich jak strumienie czy rzeki. Na obecność glonów w wodach powierzchniowych wpływa dostępność składników pokarmowych i światła słonecznego. Wzrost produkowanej biomasy obniża ilość energii słonecznej dostarczanej w głąb wody. Po obumarciu glonów martwa materia organiczna ulega mineralizacji, w obecności mikroorganizmów i z wykorzystaniem rozpuszczonego w wodzie tlenu. Zawartość azotanów i fosforanów w jeziorach, jeżeli jest odpowiednio niska, może skutecznie ograniczać rozwój glonów i lokalnego łańcucha pokarmowego. Na każdy atom fosforu przyswajany przez glony przypada ok. 12–20 atomów azotu wchodzących w skład różnego rodzaju biocząsteczek wykorzystywanych przez organizmy (O'Neill, 1993). Jeżeli stosunek zawartości azotu do fosforu w wodzie wzrośnie do poziomu 30:1, to fosfor zostanie całkowicie zużyty, zanim wyczerpie się rezerwuaz azotu. Jeżeli stosunek zawartości azotu do fosforu spadnie do wartości 6:1, możliwe jest usuwanie nadmiarowego azotu z wody i spadek przyrostu biomasy.

Występujące w nadmiarze w środowisku azotany i azotyny stanowią duże zagrożenie również dla człowieka. Łatwo rozpuszczalne sole azotu występujące w wodach podziemnych i powierzchniowych kumulują się w owocach i warzywach uprawianych na glebach poddawanych nadmiernemu nawożeniu (Brzozowska, 2004). Negatywny wpływ azotanów i azotynów wynika głównie z ich właściwości utleniających – dotyczy to zwłaszcza jonów NO_2^- . Przy braku warunków redukcyjnych organizm stosunkowo szybko wydala jony NO_3^- (Ellenhorn i Barceloux, 1988).

Methemoglobinemia (w skrócie met-H), zwana inaczej sinicą, jest chorobą objawiającą się spadkiem zdolności hemoglobiny do transportowania tlenu w obrębie organizmu – od poboru w płucach do uwalniania do poszczególnych tkanek (Price, 1998). Obecne w normalnych molekułach hemoglobiny (w centrum cząsteczki hemu) atomy żelaza (II), tzn. Fe^{2+} , potrafią wiązać w sposób odwracalny tlen, co prowadzi do powstawania tzw. oksyhemoglobiny, o jasnoczerwonym zabarwieniu. Niebezpieczeństwo związane z obecnością w organizmie nadmiaru azotanów wynika z faktu, iż jony NO_2^- powstałe w wyniku enzymatycznej redukcji jonów NO_3^- , utleniają jony żelaza Fe^{2+} do jonów żelaza Fe^{3+} . Cząsteczki zawierające jony Fe^{3+} hemoglobiny, czyli tzw. methemoglobiny, nie są w stanie wiązać w sposób odwracalny tlenu (emedicine.com).

O methemoglobinemii mówi się, jeżeli zawartość methemoglobiny we krwi przekroczy 1,5% ogólnego stężenia hemoglobiny. Methemoglobinemia może mieć charakter wrodzony lub nabyty (Ash–Bernal i Wise, 2004). W pierwszym przypadku choroba ujawnia się u dziecka stosunkowo szybko po porodzie i nie wpływa na skrócenie czasu życia, czy obniżenie sprawności psychofizycznej. Methemoglobinemia nabyta pojawia się po zatruciu niektórymi związkami chemicznymi (m.in. azotanami, azotynami) lub po zażyciu pewnych leków (np. nitrogliceryny, fenacetyny, sulfonamidów). Charakterystyczne objawy to duszności, senność, zawroty głowy, bóle brzucha, spadki ciśnienia tętniczego, przyspieszenia akcji serca i ciemne

przebarwienia na skórze. Choroba ta jest szczególnie groźna u noworodków poniżej 6 miesiąca życia, ponieważ tzw. hemoglobina płodowa, stanowiąca u nich zaraz po urodzeniu 60–80% ogólnej hemoglobiny, wykazuje dużo większą podatność na utlenianie. Wraz ze wzrostem dziecka maleje zawartość hemoglobiny płodowej i w konsekwencji podatność na methemoglobinemię. W organizmie dorosłego obecna we krwi reduktaza może skutecznie przekształcać methemoglobinę w hemoglobinę, u niemowlęcia aktywność tego enzymu jest dużo mniejsza. Innym niekorzystnym czynnikiem jest fakt, iż w przewodzie pokarmowym dziecka panują warunki dużo bardziej korzystne dla rozwoju bakterii redukujących NO_3^- do NO_2^- , w porównaniu z organizmami osobników dorosłych. W konsekwencji, w organizmach noworodków względna ilość azotynów blokujących prawidłowe działanie hemoglobiny może być dużo większa. W przypadku methemoglobinemii profilaktyka polega na unikaniu wody zawierającej nadmiar azotanów, a leczenie na podawaniu odpowiednich specyfików, np. błękitu metylenowego. Wody o podwyższonej zawartości azotanów nie należy podawać do picia również zwierzętom domowym, ponieważ w ich układach pokarmowych też egzystują bakterie redukujące azotany i wywołujące methemoglobinemię.

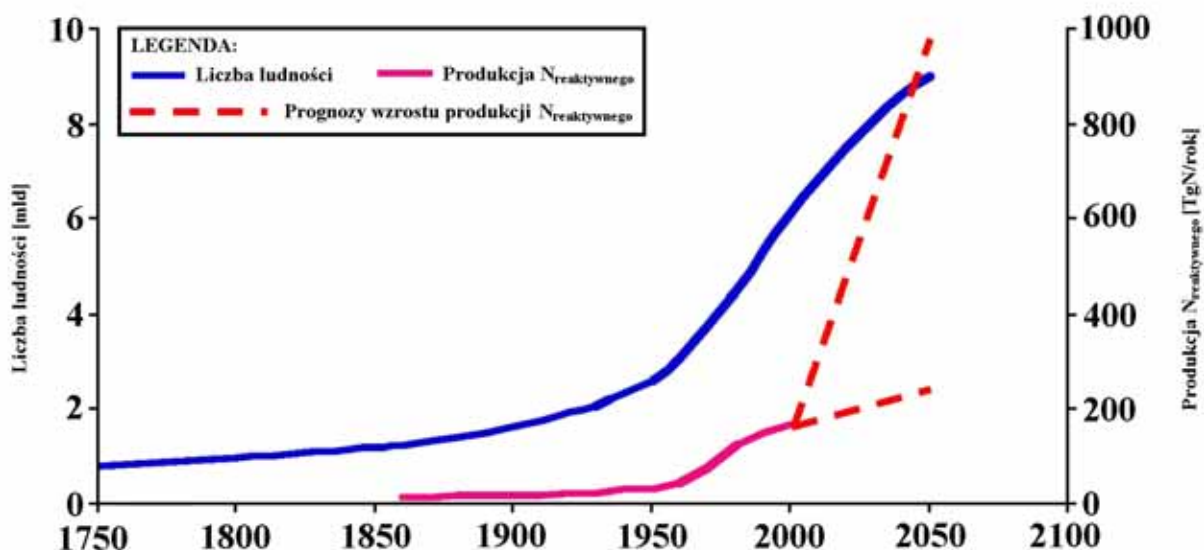
Azotany są w stanie przenikać przez barierę krew–łożysko, powodując powstawanie wad wrodzonych w trakcie rozwoju płodu – mają działanie teratogenne. Zakłócają prawidłowe wykorzystywanie retinolu (witaminy A) i β -karotenu (prekursora witaminy A) oraz wpływają niekorzystnie na metabolizm tłuszczów i białek. U spożywających żywność i napoje zawierające nadmiar azotanów obserwowano zakłócenia w pracy tarczycy, zaburzenia rytmu pracy serca i upośledzenie funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Utlenianie witaminy B6 negatywnie oddziałuje na syntezę hemu – centrum aktywnego hemoglobiny (Majchrzak, 1985; Brzozowska, 2004). Wreszcie, w środowisku kwaśnym pod wpływem działalności drobnoustrojów azotany wchodzić mogą w reakcję z aminami, tworząc nitrozoaminy – niezwykle groźne trucizny środowiskowe wykazujące działanie fitotoksyczne, mutagenne i teratogenne.

3.3. Regulacje prawne w Polsce i na świecie dotyczące dopuszczalnych stężeń azotanów w wodach gruntowych i podziemnych

Naukowcy szacują, że do 2050 roku ilość produkowanego w skali rocznej azotu reaktywnego może osiągnąć poziom 200–1000 Tg (w zależności od prognoz) (Rys. 3.6). W niniejszym rozdziale przedstawiono najważniejsze w kontekście europejskim inicjatywy zmierzające do poprawy jakości wód, szczególnie wód pitnych, pod względem zawartości w nich azotanów.

3.3.1. Inicjatywy na rzecz poprawy jakości wód w Europie pod względem zanieczyszczenia azotanami

W ciągu ostatnich dziesięcioleci w Europie podpisano kilka protokołów odnoszących się do problemu gwałtownej ekspansji związków azotu reaktywnego w środowisku (w tym zanieczyszczenia wód azotanami).



Rys. 3.6. Szacowany (według różnych prognoz) wzrost produkcji azotu reaktywnego do 2050 roku. Dla porównania przedstawiono przewidywany wzrost liczby ludności (Galloway i Cowling, 2002; Galloway, 2006).

Konwencja o Ochronie Środowiska Morskiego Obszaru Morza Bałtyckiego

Protokół przyjęto w 1974 roku, a wprowadzono w życie w 1980 roku, pod auspicjami Konwencji Helsińskiej. Konieczność międzynarodowych działań na rzecz ochrony Bałtyku wynikała z postępującej eutrofizacji znacznych obszarów morza wskutek wprowadzania do niego znacznych ilości związków azotu i fosforu. Każdy kraj nadbałtycki zobowiązał się do przekazywania danych dotyczących zanieczyszczeń morza w obrębie jego strefy ekonomicznej. Zadaniem specjalnych grup jest ograniczanie zanieczyszczeń przedostających się do Bałtyku ze źródeł punktowych (oczyszczalnie ścieków, fabryk itp.) i rozproszonych (rolnictwo). Na bieżąco prowadzi się listę tzw. *punktów żarpalnych* (z ang. *hot spots*) – najbardziej zanieczyszczających morze źródeł punktowych, jednocześnie informując kraje, na terenie których takie punkty się znajdują, jakie działania powinny być podjęte.

Ramowa Dyrektywa Wodna

Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady Europy zwana również Ramową Dyrektywą Wodną (RDW) weszła w życie w dniu 22 grudnia 2000 roku. Stwierdza ona, że woda nie jest „*przedmiotem komercji, ale jest dobrem ogólnym, które winno być bronić, chronione i traktowane jako dziedzictwo*”. Zawiera ona wykaz ogólnych działań, jakie należy podjąć w celu ochrony wszystkich rodzajów wód podziemnych i powierzchniowych, tak aby do 2015 roku we wszystkich państwach Unii (w tym również w Polsce) osiągnąć „dobry” stan wody. Zasady racjonalnego wykorzystania i ochrony zasobów wodnych określono jako tzw. *strategię zrównoważonego rozwoju*. Dotyczyć one powinny wszystkich dziedzin gospodarki, transportu, energetyki, rolnictwa itd. Szkody należy likwidować u źródła, a kosztu powinien ponosić sprawca, zgodnie z zasadą „zanieczyszczający płaci”. RDW wyznaczyła strefy zarządzania zasobami wodnymi na podstawie granic

poszczególnych zlewni („*dla wody nie istnieją granice polityczne*”), nakazując podjęcie współpracy międzypaństwowej na terenach przygranicznych (RDW, 2000).

Dyrektywa Azotanowa

Wraz z akcesją do Wspólnoty Europejskiej Polska formalnie wdrożyła Dyrektywę Rady Europy 91/676/EWG z dnia 12 grudnia 1991 roku dotyczącą „ochrony wód przed zanieczyszczeniami powodowanymi przez azotany pochodzenia rolniczego”. Dokument ten uznał rolnictwo za główne źródło zanieczyszczeń wód podziemnych i powierzchniowych azotanami w Europie i nakazał podjęcie kroków mających na celu ograniczenie i ochronę wód przed dalszym zanieczyszczeniem azotanami (DA, 1991). Dyrektywa Azotanowa wymagała sporządzenia listy obszarów szczególnie narażonych na bezpośrednie lub pośrednie zanieczyszczenie wód azotanami lub innymi związkami azotu, mogącymi przekształcić się w azotany, pochodzącymi z działalności rolniczej. Na terenie Polski wyznaczono 21 takich obszarów (Rys. 3.7) i dla każdego z nich odpowiednie Regionalne Zarządy Gospodarki Wodnej zostały zobowiązane do opracowania i wprowadzenia w życie odpowiednich działań naprawczych.



Rys. 3.7. Mapa Polski z zaznaczonymi obszarami szczególnie narażonymi na zanieczyszczenie azotanami, dla których odpływ azotu ze źródeł rolniczych należy ograniczyć. Oznaczenie: RZGW – Regionalny Zarząd Gospodarki Wodnej (krakow.rzgw.gov.pl).

3.3.2. Normy zawartości azotanów w wodach podziemnych i powierzchniowych

Podwyższone stężenie azotanów w wodzie przeznaczonej do spożycia może niekorzystnie wpływać na zdrowie, szczególnie niemowląt. Ustanawiane limity dopuszczalnych zawartości azotanów w wodzie opierają się przede wszystkim na kryteriach zdrowotnych (Tab. 3.1).

W Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 roku „w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia” w zależności od sposobu uzdatniania wyróżniono 3 kategorie wody przeznaczone do spożycia, oznaczone jako: A1 – najprostsze uzdatnianie fizyczne, A2 – typowe uzdatnianie fizyczne i chemiczne oraz A3 – wysokosprawne uzdatnianie fizyczne i chemiczne (Rozporządzenie Ministra Środowiska, Pozycja 1728, 2002).

Tab. 3.1. Wprowadzone przez różne organizacje normy na zawartość azotanów w wodach wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia.

Organizacja/Urząd/Państwo	NO ₃ ⁻ [mg/L]	N(NO ₃ ⁻) [mg/L]
Światowa Organizacja Zdrowia (WHO–ONZ)	44	10
Agencja Ochrony Środowiska (USEPA–USA)	44	10
Dyrektywa Azotanowa (Unia Europejska)	50	11
Rozporządzenie Ministra Środowiska (Polska)	50	11

Dla wód tych określono zalecane i dopuszczalne wartości graniczne wskaźników jakości wody, w tym również azotanów (Tab. 3.2).

Tab. 3.2. Wartości graniczne zawartości azotanów w poszczególnych kategoriach wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia.

Wskaźnik jakości wody	Jednostka miary	Kategoria A1		Kategoria A2		Kategoria A3	
		zalecane	dopuszczalne	zalecane	dopuszczalne	zalecane	dopuszczalne
Azotany	mgNO ₃ ⁻ /L	25	50	–	50	–	50

Rozdział 4. Frakcjonowanie izotopowe w związkach azotu

Z chemicznego punktu widzenia izotopy pierwiastków (trwale bądź radioaktywne) są nierozróżnialne. Jednakże w pewnych sytuacjach uwidaczniają się różnice w ich własnościach fizycznych i chemicznych – jest to tzw. efekt izotopowy. Zjawisko to obserwuje się zwłaszcza w przypadku lekkich pierwiastków, dla których względne różnice mas ich izotopów są największe. Do takich pierwiastków zaliczają się elementy składowe jonu azotanowego NO_3^- , czyli azot i tlen. W przypadku analizy składu izotopowego azotanów praktyczne znaczenie mają tylko cztery izotopy: dwa izotopy azotu (^{14}N i ^{15}N) i dwa izotopy tlenu (^{16}O i ^{18}O).

Skład izotopowy określa się zazwyczaj poprzez stosunek izotopowy izotopu cięższego do lżejszego, korzystając z tzw. notacji „delta”, w której odnosi się go do składu pierwiastka w związku przyjętym jako standard (Równ. 4.1) i wyraża w promilach:

$$\delta X_{\text{PRÓBKA}} = \frac{R_{\text{PRÓBKA}} - R_{\text{STANDARD}}}{R_{\text{STANDARD}}} \cdot 1000 \quad [\text{‰}] \quad (4.1)$$

gdzie: $R_{\text{PRÓBKA}}$, R_{STANDARD} – stosunek zawartości izotopu cięższego do lżejszego ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) w próbce i w standardzie.

Skład izotopowy azotu w azotanach podaje się z reguły w odniesieniu do azotu atmosferycznego. Jest to uzasadnione, ponieważ jego skład izotopowy jest stały (Mariotti, 1983). Skład izotopowy tlenu wyrażany jest względem powszechnie stosowanego standardu, jakim jest Vienna Standard Mean Ocean Water (V-SMOW). W przedstawionej pracy skład izotopowy azotanów zawsze wyrażano względem wyżej wymienionych standardów.

4.1. Podstawy frakcjonowania izotopowego

Wśród procesów fizycznych i chemicznych, w których występuje frakcjonowanie izotopowe, wyróżnia się: (i) odwracalne równowagowe reakcje wymiany oraz (ii) jednokierunkowe przemiany nieodwracalne.

Reakcję wymiany izotopowej można symbolicznie zapisać w postaci:



gdzie: I^1 i I^2 – dwa różne izotopy tego samego pierwiastka.

Współczynnik frakcjonowania α opisujący frakcjonowanie izotopowe w procesie wymiany definiowany się jako:

$$\alpha_{\text{AI/BI}} \equiv K_{\text{AI/BI}} = \frac{[\text{AI}^1] \cdot [\text{BI}^2]}{[\text{AI}^2] \cdot [\text{BI}^1]} = \frac{[\text{AI}^1]/[\text{AI}^2]}{[\text{BI}^1]/[\text{BI}^2]} = \frac{R_{\text{AI}}}{R_{\text{BI}}} \quad (4.3)$$

gdzie: $K_{AI/BI}$ – stała równowagi reakcji wymiany opisanej równaniem 4.2,

R_{AI} , R_{BI} – stosunek stężeń molowych związków AI^1 do AI^2 oraz BI^1 do BI^2 .

Wielkość frakcjonowania równowagowego α jest funkcją temperatury. Wartości równowagowych współczynników frakcjonowania i ich zależności od temperatury wyznacza się z reguły w laboratorium. Można je też obliczyć teoretycznie (Bigeleisen i Wolfsberg, 1958; Hunkeler, 2002).

Wzbogacenie izotopowe ε definiuje się jako:

$$\varepsilon = \alpha - 1 \quad (4.4)$$

Związek pomiędzy składem izotopowym substratu (s) i produktu (p) oraz wzbogaceniem izotopowym ε jest następujący:

$$\varepsilon_{s/p} = \alpha_{s/p} - 1 = \frac{R_s}{R_p} - 1 = \frac{R_s / R_{std}}{R_p / R_{std}} - 1 = \frac{1 + \delta_s}{1 + \delta_p} - 1 = \frac{\delta_s - \delta_p}{1 + \delta_p} \approx \Delta = \delta_s - \delta_p \quad (4.5)$$

Frakcjonowanie kinetyczne, związane z jednokierunkowymi przemianami nieodwracalnymi, odgrywa zazwyczaj większą rolę niż frakcjonowanie równowagowe, szczególnie w środowiskach, w których występują duże wahania temperatury. Współczynniki frakcjonowania kinetycznego zależą od wielu czynników, m.in.: (i) stężenia substratów i produktów, (ii) szybkości reakcji, (iii) warunków środowiskowych (np. temperatury, zawartości tlenu), czy (iv) obecności mikroorganizmów (np. bakterii).

Molekuly zawierające lżejsze izotopy z reguły reagują łatwiej, przez co produkty stają się izotopowo lżejsze niż substraty. W przypadku odwracalnych reakcji równowagowych mogą jednak powstawać produkty cięższe bądź lżejsze od wyjściowych. Współczynnik frakcjonowania i wzbogacenie izotopowe definiuje się analogicznie jak w przypadku frakcjonowania równowagowego (Równ. 4.3 i 4.4), tzn. $\alpha_{p/s} = R_p/R_s$ oraz $\varepsilon_{p/s} = \alpha_{p/s} - 1$. Stosuje się również przybliżenie 4.5. tzn. $\varepsilon_{p/s} \approx \delta_p - \delta_s$.

Istotną rolę w ewolucji składu izotopowego substratów i produktów w trakcie procesów zarówno równowagowych jak i kinetycznych odgrywa mechanizm Rayleigha, po raz pierwszy zastosowany pod koniec XIX wieku przez lorda Rayleigha do opisu procesu destylacji frakcjonowanej (Rayleigh, 1896). Równanie Rayleigha stosuje się do opisu procesu frakcjonowania izotopowego, jeżeli: (i) substancja usuwana jest w sposób ciągły z układu, zawierającego cząsteczki z dwoma lub więcej izotopami danego pierwiastka (np. azotany z ^{15}N i ^{14}N oraz ^{18}O i ^{16}O), (ii) porcje usuwanej substancji są niewielkie w porównaniu z masą całego układu, (iii) układ jest homogeniczny w każdym momencie trwania procesu, oraz (iv) współczynnik frakcjonowania α nie zmienia się w trakcie procesu. Jeżeli spełnione są powyższe warunki, to ewolucja składu izotopowego substratu w układzie opisywana jest przez równanie:

$$\frac{R}{R_0} = \left(\frac{X_L}{X_{L0}} \right)^{\alpha-1} \quad (4.6)$$

gdzie: R, R_0 – aktualny i początkowy stosunek izotopowy (np. $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) w substracie,

X_L, X_{L0} – aktualne i początkowe stężenie lżejszego izotopu w rezerwuarze.

Ponieważ stężenie $X_L \gg X_H$ (X_H – stężenie cięższego izotopu), więc X_L jest w przybliżeniu równe stężeniu związku, w skład którego wchodzi izotop. Oznaczając $f = X_L/X_{L0}$ jako frakcję pozostałego w układzie związku, otrzymuje się:

$$R = R_0 \cdot f^{\alpha-1} \quad (4.7)$$

Uwzględniając zależność $R = R_{\text{std}} \cdot (\delta + 1)$ oraz logarytmując stronami równanie 4.7, otrzymuje się:

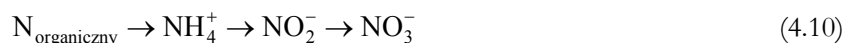
$$\ln(\delta + 1) = \ln(\delta_0 + 1) + (\alpha - 1) \cdot \ln(f) \quad (4.8)$$

Ponieważ δ jest małą liczbą, rozwijając w szereg Maclaurina funkcje $\ln(1+\delta)$ i biorąc tylko pierwszy wyraz, otrzymujemy uproszczoną postać równania Rayleigha, powszechnie stosowaną w układach, w których wzbogacenie izotopowe ε pozostaje stałe:

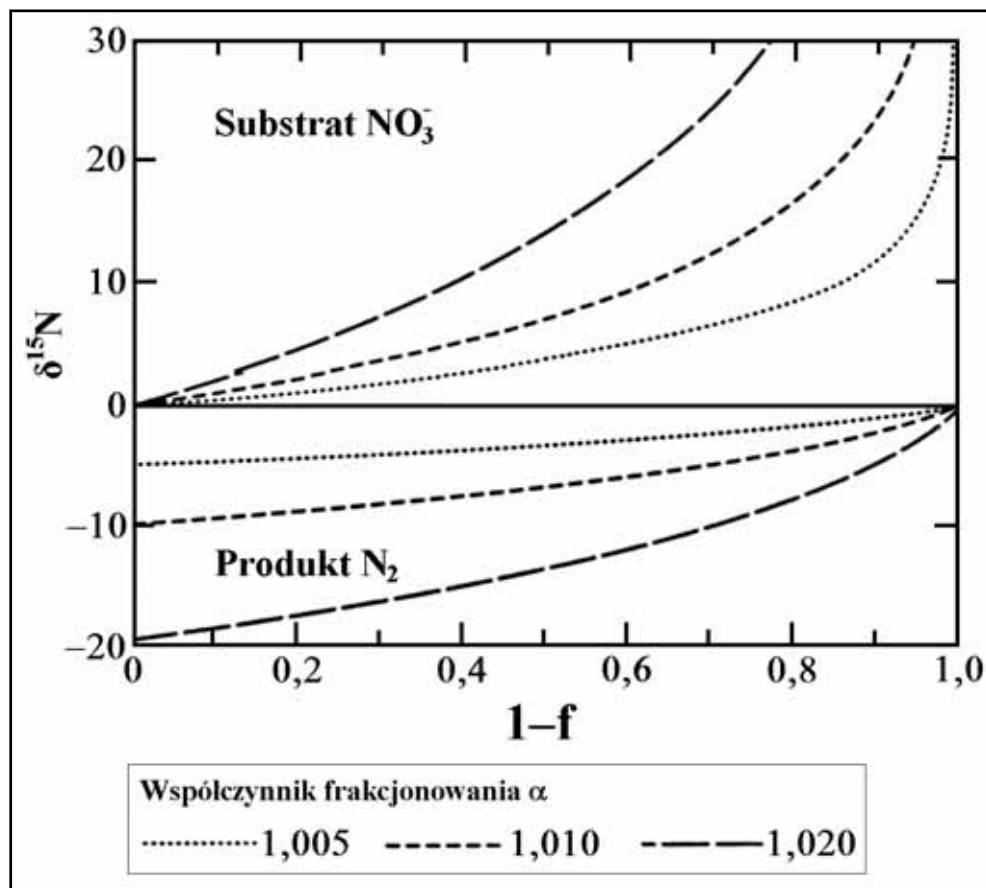
$$\delta \approx \delta_0 + \varepsilon \cdot \ln(f) \quad (4.9)$$

Procesy biologiczne są z reguły reakcjami jednokierunkowymi, z którymi wiąże się efekt frakcjonowania kinetycznego. Wynika to z niższej wartości energii koniecznej do ewentualnego łamania wiązań chemicznych w molekułach podczas reakcji chemicznych. Większość produktów wytwarzanych przez organizmy jest izotopowo lżejsza od substratów. W procesie nityfikacji, w czasie którego bakterie przetwarzają jony amonowe (NH_4^+) w azotany (NO_3^-), wytwarzane azotany są lżejsze izotopowo (zubożone w ^{15}N) w stosunku do pozostałych w układzie jonów amonowych. Wraz z zużywaniem przez organizmy substratu, wartość $\delta^{15}\text{N}$ produktów i substratów zmienia się więc w przewidywalny sposób. Analogiczna sytuacja występuje w przypadku denityfikacyjnej konwersji NO_3^- do N_2 . Z wykresu (Rys. 4.1) widać, że powstający jako produkt N_2 zawsze będzie izotopowo lżejszy, niż pozostałe w układzie azotany (o większej wartości $\delta^{15}\text{N}$). Wraz z przebiegiem reakcji zarówno substrat, jak i produkt stają się izotopowo cięższe (rośnie $\delta^{15}\text{N}$). Po zakończeniu reakcji skład izotopowy powstałego produktu odpowiada początkowemu składowi substratu ($\delta^{15}\text{N} = 0\text{‰}$). W końcowej fazie procesu $\delta^{15}\text{N}$ substratu może osiągać wysokie wartości.

Wiele procesów biologicznych składa się z kilku etapów. W przypadku nityfikacji występuje następujący ciąg przemian:



Każdy z tych etapów wnosi określony wkład do sumarycznego frakcjonowania izotopowego. Całkowite frakcjonowanie zależy od wielu warunków środowiskowych, m.in. liczby i rodzaju etapów pośrednich, wielkości rezerwuarów poszczególnych składników uczestniczących w reakcjach, pH gleby oraz, w przypadku

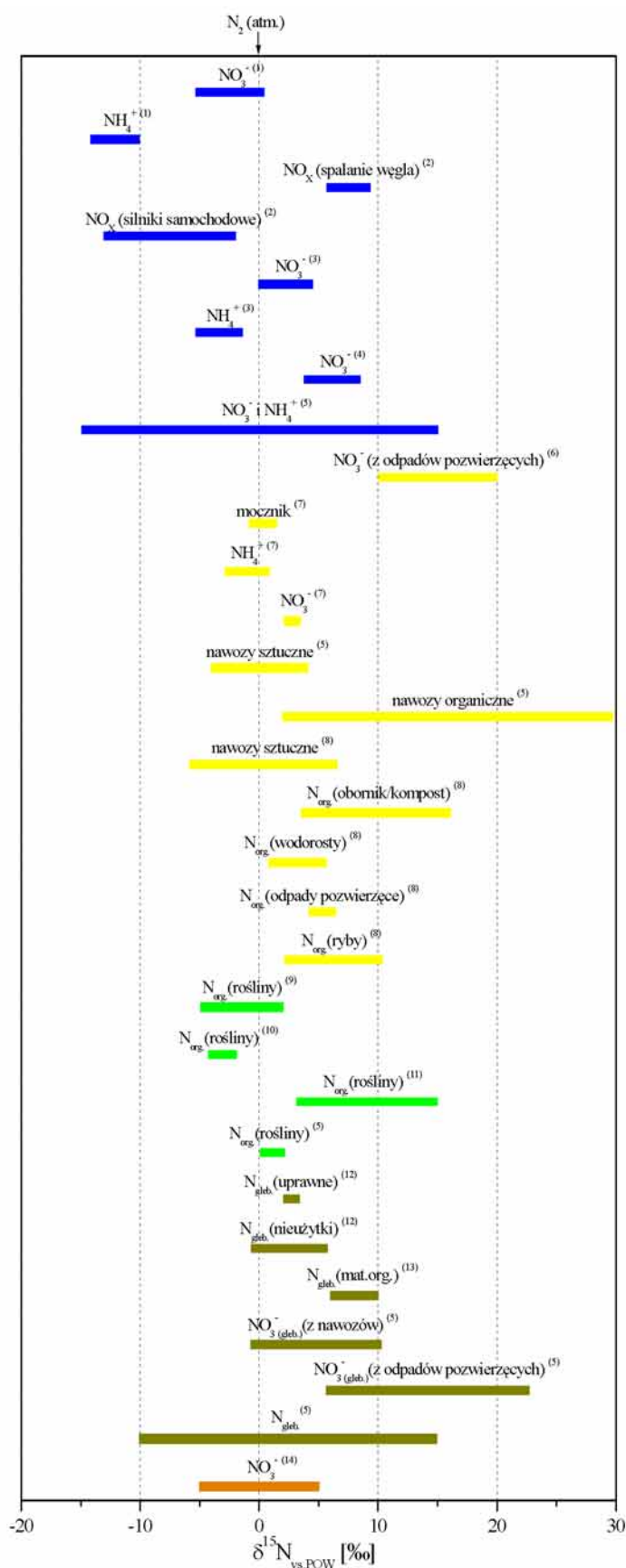


Rys. 4.1. Ewolucja składu izotopowego ($\delta^{15}\text{N}$) substratu (NO_3^-) i produktu (N_2) w trakcie procesu denitryfikacji, obliczona na podstawie równania Rayleigha dla trzech wartości współczynnika frakcjonowania α : 1,005, 1,010 i 1,020. Im wyższa wartość współczynnika α , tym wyższa wartość $\delta^{15}\text{N}$ dla azotanów i niższa dla azotu. Oznaczenie: f – stosunek aktualnej do początkowej zawartości substratu w rezerwuarze (Kendall, 1998).

przemian metabolicznych, od obecności mikroorganizmów. Ogólna reguła mówi, że wielkość frakcjonowania izotopowego determinowana jest przede wszystkim przez etap najwolniejszy. Składy izotopowe substratu i produktu podczas wieloetapowego procesu, w trakcie którego frakcjonowanie kontrolowane jest przez jeden proces, można modelować przy użyciu równania Rayleigha.

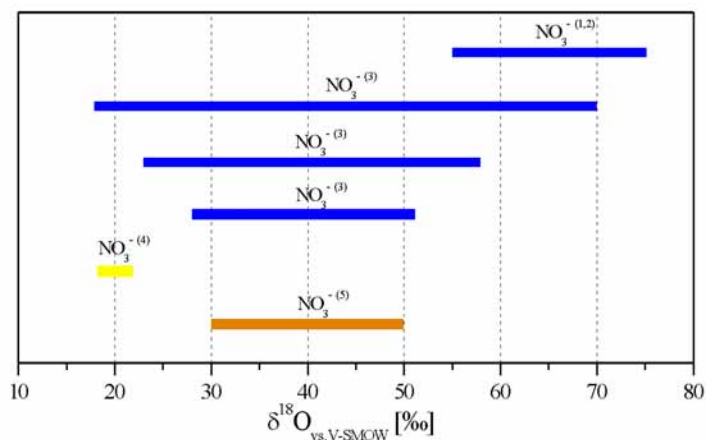
4.2. Mechanizmy biofizykochemiczne wpływające na skład izotopowy związków azotu

Większość azotu obecnego w materii ziemskiej charakteryzuje się wartością $\delta^{15}\text{N}$ z przedziału -20‰ do $+30\text{‰}$. Böhlke i in. (1993) podają zakres mierzonych wartości $\delta^{15}\text{N}$ od -49‰ do $+102\text{‰}$. Powyższe zróżnicowanie izotopowe tłumaczy się złożonym charakterem procesów krążenia azotu. W przypadku azotanów rozpuszczonych w wodzie zakres zmienności $\delta^{15}\text{N}$ jest zazwyczaj dużo mniejszy. Na obszarach leśnych podstawowe źródło azotu stanowi atmosfera o $\delta^{15}\text{N} = 0\text{‰}$, z której pierwiastek ten wiązany jest przez niektóre gatunki roślin i wprowadzany do rezerwuaru glebowego. Nawozy sztuczne produkowane w oparciu o



azot atmosferyczny cechuje $\delta^{15}\text{N}$ zawierająca się w przedziale $0 \pm 3\text{‰}$, z kolei $\delta^{15}\text{N}$ dla nawozów z odpadów pozwierzecznych generalnie zawiera się w przedziale do +10 do +25‰. Wpływ innych źródeł azotu (np. związanych z wietrzeniem skał) zazwyczaj się pomija. Szeroki zakres zmienności składu izotopowego tlenu w jonach NO_3^- związany jest m.in. ze składem azotanów obecnych w opadach. Rysunki 4.2 i 4.3 przedstawiają przegląd rezultatów badań składu izotopowego odpowiednio azotu i tlenu w wybranych związkach azotu w różnych rezerwuarach.

Rys. 4.2. Przegląd rezultatów badań składu izotopowego azotu w wybranych związkach azotu w różnych rezerwuarach. Dla poszczególnych rezerwuarów przyjęto następujące kolory: atmosfera (niebieski), nawozy (żółty), rośliny (jasnozielony), gleby (ciemnozielony) i pustynie (pomarańczowy). Zaznaczone zakresy odnoszą się do danych z publikacji: (1) Freyer (1978), (2) Heaton (1990), (3) Garten (1992), (4) Garten (1995), (5) Kendall (1998), (6) Kreitler (1975, 1979), (7) Hübner (1986), (8) Bateman i Kelly (2007), (9) Fry (1991), (10) Garten (1992), (11) Garten (1993), (12) Broadbent i in. (1980), (13) Nadelhoffer i Fry (1994), (14) Böhlke i in. (1997).



Rys. 4.3. Przegląd rezultatów badań składu izotopowego tlenu w wybranych związkach azotu w różnych rezerwuarach. Dla poszczególnych rezerwuarów przyjęto następujące kolory: atmosfera (niebieski), nawozy (żółty) i pustynie (pomarańczowy). Zaznaczone zakresy odnoszą się do danych z publikacji: ⁽¹⁾ Voerkelius (1990), ⁽²⁾ Durka i in. (1994), ⁽³⁾ Kendall (1998), ⁽⁴⁾ Amberger i Schmidt (1987), ⁽⁵⁾ Böhlke i in. (1997).

Czynniki wpływające na skład izotopowy pierwiastków w związkach azotu rozpuszczonych w wodzie można podzielić na dwie grupy: (i) reakcje biofizykochemiczne prowadzące do przekształcania jednego związku azotu w inny, a w konsekwencji tworzenia bądź usuwania danego związku z układu, oraz (ii) fluktuacje składu izotopowego źródeł i studni związków azotowych w układzie.

Do procesów wpływających na zawartość i skład izotopowy związków azotu w wodzie należy zaliczyć asymilację, mineralizację, denitryfikację i nityfikację. Również procesy fizyczne, zwłaszcza ulatnianie amoniaku, mogą w znaczącym stopniu kontrolować skład izotopowy NO_3^- (Högberg, 1997; Kendall, 1998). Tabela 4.1 zawiera przegląd procesów mogących wpływać na skład izotopowy związków azotu wraz z wartościami związanymi z nimi wzbogaceniami izotopowymi ϵ w różnych procesach transformacji związków azotu w środowisku.

Tab. 4.1. Wartości wzbogacenia izotopowego azotu związanego z różnymi procesami wpływającymi na skład izotopowy azotanów.

Proces	Wzbogacenie izotopowe ϵ [‰]	Literatura
Asymilacja	-2,2 ÷ +0,5 -1,6 ÷ +1,0	Mariotti i in. (1980) Hübner (1986)
Wiązanie azotu	-3,0 ÷ +1,0	Fogel i Cifuentes (1993)
Mineralizacja	-1,0 ÷ +1,0 -35,0 ÷ 0,0	Kendall (1998) Delwiche i Steyn (1970) Feigin i in. (1974) Létolle (1980)
Ulatnianie	-3,0 ÷ -2,0	Kreitler (1975)
Sorpcja/desorpcja	+1,0 ÷ +8,0	Hübner (1986)
Nitryfikacja	-29,0 ÷ -12,0	Shearer i Kohl (1986)
Denitryfikacja	-29,4 ÷ -24,6 -36,0 ÷ -24,0 -8,0 ÷ -5,0 -40,0 ÷ -5,0	Mariotti i inni (1981) Vogel i in. (1981) Mariotti i in. (1988) Kendall i Aravena (2000)

Asymilacja

Asymilacją azotu określa się ogólnie proces przyswajania przez organizmy związków zawierających azot (najczęściej chodzi o proste związki nieorganiczne). Niekiedy, jako specyficzną odmianę tego procesu, uznaje się wiązanie atmosferycznego N_2 przez niektóre gatunki (bakterie, glony). W wyniku asymilacji przyswajane są azotany, azotyny bądź jony amonowe. W obecności enzymu – reduktazy, występujące na wyższym stopniu utlenienia azotany lub azotyny ulegają redukcji do jonów amonowych. Te z kolei przetwarzane są w materię organiczną. W trakcie asymilacji, powstające produkty zubożone są w cięższy izotop azotu ^{15}N . Analogiczna sytuacja występuje w przypadku tlenu: podczas asymilacji azotanów, pozostałe w układzie, nie przetworzone azotany wzbogacone są w cięższy izotop tlenu ^{18}O .

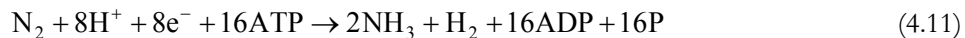
Z asymilacją azotu przez rośliny w glebie wiąże się niewielkie frakcjonowanie izotopowe. W przypadku roślin naczyniowych frakcjonowanie izotopowe przyswajanego azotu ($N_{\text{asymilowany}}$ vs. $N_{\text{organiczny}}$ w glebie) zmienia się w zakresie od $-2,2$ do $+0,5\text{‰}$, przy średniej wartości $-0,25\text{‰}$ (Mariotti i in., 1980). Zakładając więc, że przyswajanie przez rośliny nie wpływa znacząco na skład izotopowy azotu obecnego w glebie w postaci nawozów azotowych i innych form azotu nieorganicznego, można przyjąć, iż wartości $\delta^{15}N$ mierzone dla materii roślinnej będą odzwierciedlać zmiany składu izotopowego azotu glebowego (Karamanos i Rennie, 1980).

Związki azotu asymilowane są też przez niektóre gatunki mikroorganizmów glebowych. Również w tym przypadku frakcjonowanie izotopowe jest stosunkowo niewielkie. Zmierzone wartości mieszczą się w zakresie od $-1,6$ do $+1\text{‰}$, przy średniej wartości $-0,52\text{‰}$ (Hübner, 1986). Specyficznym przypadkiem asymilacji związków azotu jest przyswajanie ich w środowisku wodnym przez glony. Na wielkość frakcjonowania izotopowego podczas tego procesu wpływają dostępność związków azotu i odpowiednich enzymów oraz warunki dyfuzji związków azotu do wnętrza komórek glonów. Fogel i Cifuentes (1993) opracowali model asymilacji przez glony jonów amonowych przy uwzględnieniu wspomnianych powyżej trzech czynników. Uzyskane wartości frakcjonowania izotopowego wyniosły odpowiednio -4‰ , -14‰ i -27‰ , w zależności od tego, który czynnik miał decydujący wpływ na frakcjonowanie. Największa wartość frakcjonowania (-27‰) związana była z procesem dyfuzji jonów NH_4^+ do wnętrza komórek glonów. W glebach, w których stężenie jonów amonowych i pH jest stosunkowo niskie, transport tych związków do komórek roślinnych odbywa się na tyle szybko, iż nie powoduje to dużych zmian składu izotopowego azotu (frakcjonowanie poniżej -4‰). Czynnikiem ograniczającym jest tutaj tylko dostępność związków azotu.

Jako proces przeciwny do asymilacji wprowadza się niekiedy pojęcie dysymilacji. Mianem tym określa się przemiany metaboliczne związków azotu, w których pełnią one rolę źródeł energii jako akceptory elektronowe (np. przy utlenianiu związków organicznych przez denitryfikatory), bądź jako donory elektronowe (np. w reakcjach redoks z udziałem bakterii nitryfikujących).

Wiązanie azotu

Mianem wiązania azotu określa się różnego typu procesy przemiany cząsteczkowego azotu z atmosfery (N_2) w inne związki azotu (np. Równ. 4.11). Reakcje takie prowadzone są przez sinice i niektóre gatunki bakterii (zwanych diazotrofami), zarówno wolno żyjących (np. *Azotobacter*, *Clostridium*), jak i obecnych m.in. w naroślach na korzeniach roślin strączkowych i olchowych (np. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*). Bakterie te wykorzystują do wiązania N_2 enzym – nitrogenazę.



gdzie: ADP, ATP – adenozynodwufosforan i adenozynotrójfosforan (ADP posiada w cząsteczce dwa, a ATP trzy grupy fosforanowe).

W szerszym znaczeniu wiązanie azotu oznacza również konwersję N_2 do NO_x -ów podczas wyładowań atmosferycznych oraz w przemyśle, energetyce czy rolnictwie (np. przy produkcji nawozów sztucznych). Azot atmosferyczny wykorzystuje się do wytwarzania takich związków jak np. amoniak, azotany.

Materia organiczna wytwarzana w wyniku biologicznego wiązania azotu atmosferycznego ma wartość $\delta^{15}\text{N}$ nieco poniżej 0‰. Frakcjonowanie izotopowe dla tego procesu mieści się w zakresie od –3 do +1‰ (Fogel i Cifuentes, 1993). W przypadku innych procesów, w wyniku których wytwarzana jest materia organiczna, frakcjonowanie izotopowe jest z reguły wyższe. Bliską zeru wartość $\delta^{15}\text{N}$ dla próbek materii organicznej podaje się często jako dowód na wiązanie atmosferycznego N_2 .

Mineralizacja

Mineralizacja to reakcja rozkładu złożonych cząsteczek związków organicznych zawierających azot do amoniaku NH_3 lub jonów amonowych NH_4^+ . Proces ten bywa niekiedy określany mianem amonifikacji. Zachodzi on np. po biologicznej śmierci zwierzęcia lub rośliny, a rozkładane związki organiczne mogą być wykorzystywane przez inne organizmy. Przykładem tego typu procesu jest amonifikacja (hydroliza) mocznika $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$:



Z procesem mineralizacji w powyższym ujęciu związane jest niewielkie frakcjonowanie izotopowe. Wartość $\delta^{15}\text{N}$ azotu amonowego w glebie różni się zwykle tylko o kilka promili od wartości $\delta^{15}\text{N}$ dla glebowej materii organicznej. Niektórzy naukowcy rozszerzają pojęcie mineralizacji na wieloetapowy proces produkcji azotanów z materii organicznej. W takim przypadku frakcjonowanie jest odpowiednio większe i może wahać się w granicach od –35 do 0‰ (Delwiche i Steyn, 1970; Feigin i inni, 1974; Létolle, 1980), przy czym wielkość frakcjonowania zależy od etapu najwolniejszego determinującego prędkość całego procesu. Traktując więc mineralizację jako wieloetapową konwersję materii organicznej do azotanów, o zakresie frakcjonowania izotopowego decyduje nie konwersja azotu glebowego do azotu amonowego, ale nityfikacja tego ostatniego do azotanów.

Ulatnianie (wolatylizacja)

Mianem ulatniania (wolatylizacji) określa się proces emisji amoniaku do atmosfery z powierzchniowych warstw gleby. Sumarycznie, emitowany amoniak cechuje niższa wartość $\delta^{15}\text{N}$ niż pozostałe w glebie jony amonowe. Frakcjonowanie izotopowe w trakcie ulatniania może wynikać z: (i) frakcjonowania równowagowego pomiędzy amoniakiem rozpuszczonym w wodzie i obecnym w fazie gazowej, (ii) frakcjonowania

równowagowego pomiędzy amoniakiem i jonami amonowymi rozpuszczonymi w wodzie, oraz (iii) frakcjonowania kinetycznego w trakcie dyfuzji zubożonego w ^{15}N amoniaku do atmosfery.

Na obszarach rolniczych intensywność ulatniania amoniaku zależy od stopnia nawożenia pola obornikiem i mocznikiem (mineralizowanych do NH_3). Wskutek emisji amoniaku wartość $\delta^{15}\text{N}$ dla glebowej materii organicznej w oborniku (zazwyczaj niewielka) może przekroczyć nawet +20‰ (Kendall, 1998). W nawozach pozwierzających występuje szereg związków azotowych, w postaci stałej i jako roztwór. Dominującą formą jest jednak mocznik, który ulega hydrolizie (Równ. 4.12). Powstający amoniak może zostać w procesie nityfikacji utleniony do azotanów (Heaton, 1986). Amoniak jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie i dysocjuje w niej według równania:



Powoduje to czasowy wzrost pH środowiska. Alkaliczacja środowiska sprzyja ulatnianiu się amoniaku, który jest zubożony w ^{15}N względem azotu amonowego rozpuszczonego w wodzie. Wraz z ulatnianiem amoniaku pH środowiska maleje. Pozostały w roztworze, wzbogacony w ^{15}N azot amonowy ulega nityfikacji do azotanów.

Stopień wzbogacenia w ^{15}N jonów amonowych zależy od wielu czynników wpływających na prędkość ulatniania amoniaku, np. temperatury powietrza i wody, wilgotności, siły wiatru, pH gleby. W Teksasie badano gleby nawożone wcześniej nawozami sztucznymi (Kreidler, 1975). Stwierdzono, iż wskutek ulatniania amoniaku nastąpił wzrost $\delta^{15}\text{N}$ dla NH_4^+ rozpuszczonego w położonych poniżej wodach gruntowych o 2–3‰. Szczególnie duże zmiany w składzie izotopowym azotu spowodowane wolatylizacją amoniaku zaobserwowano w przypadku gleb zasadowych o wysokim pH.

Sorpcja/desorpcja

W trakcie procesów typu sorpcja/desorpcja może dojść w glebie do wymiany izotopowej na centrach wymiany. Frakcjonowanie związane z tym efektem jest niewielkie. W przypadku centrów anionowymiennych preferowana jest wymiana lżejszych izotopów azotu i tlenu w jonie NO_3^- (Delwiche i Steyn, 1970), a dla centrów kationowymiennych – wymiana cięższego izotopu ^{15}N w zaadsorbowanej frakcji NH_4^+ . Ten drugi proces zachodzący w profilu glebowym powoduje, że jony amonowe, asymilowane przez korzenie roślin bądź utleniane w trakcie nityfikacji, mają niższą wartość $\delta^{15}\text{N}$. Frakcjonowanie związane z wymianą jonową w glebie mieści się zazwyczaj w przedziale od 1 do 8‰ (Hübner, 1986). Na wielkość tego frakcjonowania, zmieniającego się wraz z głębokością gleby, wpływ ma kilka czynników, m.in. budowa gleby i skład chemiczny wód gruntowych.

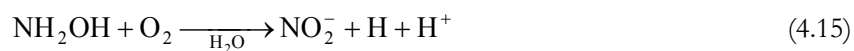
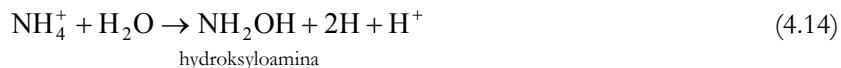
Wymiana izotopowa

Cząsteczka azotu N_2 jest bardzo stabilna. Energia wiązania pomiędzy atomami azotu wynosi 945,33 kJ/mol. Ewentualna wymiana atomów azotu pomiędzy rozpuszczonym azotem N_2 a związkami azotowymi w wodzie nie odgrywa więc praktycznie żadnej roli. W przypadku atomów tlenu frakcjonowanie izotopowe może się

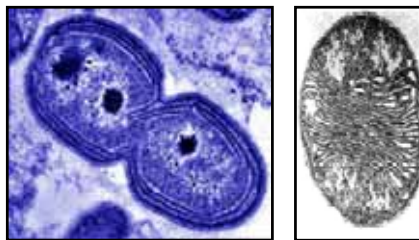
wiązać z wymianą atomów tlenu zawartych w azotanach i w wodzie. Przypuszcza się, że jony azotanowe NO_3^- zachowują się wtedy podobnie do jonów siarczanowych SO_4^{2-} . Szybkość wymiany tlenu z cząsteczką wody jest z reguły mała, choć rośnie ze wzrostem temperatury i obniżaniem pH. W skali pojedynczych lat proces ten nie odgrywa więc w środowisku wodnym znaczącej roli.

Nitryfikacja

Nitryfikacja, czyli wieloetapowy proces utleniania jonów amonowych, odgrywa ważną rolę we wzroście większości roślin, ponieważ nie potrafią one pobierać ze środowiska bezpośrednio amoniaku lub jonów amonowych. Przyswajalne przez rośliny mogą być azotany. Sprzyja temu ich bardzo dobra rozpuszczalność w wodzie, aczkolwiek ułatwia ona również ich wymywanie z otaczającej roślinę gleby. Uczestniczące w nitryfikacji organizmy samożywne (autotrofy) wytwarzają w jej trakcie energię metaboliczną. Wskutek uwalniania jonów H^+ proces prowadzi do wzrostu kwasowości. Oprócz azotanów wytwarzane mogą być inne, przejściowe związki azotu, takie jak np. azotyny (NO_2^-), tlenki azotu (N_2O , NO). Podczas nitryfikacji każdy etap utleniania prowadzony jest osobno przez różne gatunki autotrofów. Utlenianie jonów amonowych przez bakterie *Nitrosomonas* ma następujący przebieg:



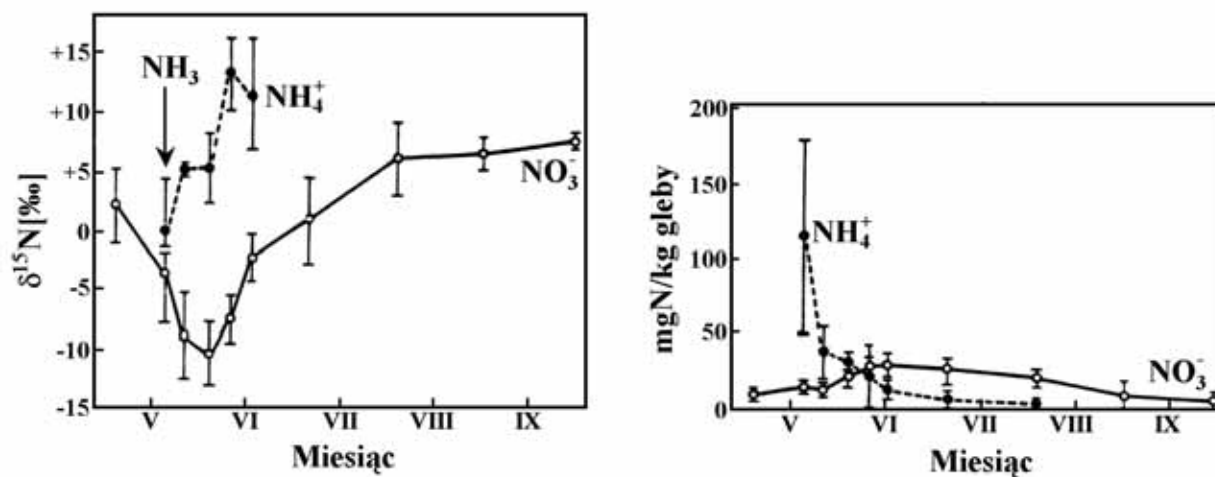
W następnym etapie azotyny utleniane są przez bakterie *Nitrobacter*:



Rys. 4.4. Fotografie bakterii *Nitrosomonas* (po lewej) i *Nitrobacter* (po prawej) (uni-bayreuth.de).

O wielkości całkowitego frakcjonowania izotopowego związanego z nitryfikacją w największym stopniu decyduje etap najwolniejszy. Utlenianie przez *Nitrobacter* azotynów do azotanów zachodzi stosunkowo szybko, tak że na frakcjonowanie wpływ ma głównie wolne utlenianie jonów amonowych przez *Nitrosomonas*. Zmierzone wielkości wzbogacenia izotopowego azotu dla nitryfikacji mieszczą się w przedziale od -29 do

–12‰ (Shearer i Kohl, 1986). Wielkością determinującą zakres frakcjonowania jest również wielkość rezerwuaru związków azotu – jeżeli w układzie panuje niedobór tych związków, to i frakcjonowanie jest niewielkie. W takim przypadku skład izotopowy glebowego azotu azotanowego różni się co najwyżej o kilka promili od składu całkowitego azotu organicznego. Obecność w glebie dużych ilości jonów amonowych, dostarczonych np. w formie nawozów amonowych, przyczynia się do wzrostu intensywności nitryfikacji. Na szybkość procesu i wielkość frakcjonowania izotopowego decydujący wpływ ma wtedy właśnie utlenianie NH_4^+ . Na rysunku 4.5 przedstawiono ewolucję składu izotopowego jonów amonowych i azotanów w próbkach pobranych po zastosowaniu jako nawozu bezwodnego amoniaku.



Rys. 4.5. Ewolucja składu izotopowego ($\delta^{15}\text{N}$) NH_4^+ i NO_3^- w czasie nitryfikacji zachodzącej po zastosowaniu jako nawozu bezwodnego amoniaku (Feigin i in., 1974). Wytwarzane na początku azotany są znacznie zubożone izotopowo w ^{15}N względem wyjściowych jonów amonowych; w tym okresie duża prędkość utleniania NH_4^+ determinuje wielkość frakcjonowania izotopowego związanego z procesem nitryfikacji. Wraz z wyczerpywaniem się zapasów NH_4^+ , prędkość nitryfikacji zaczyna maleć. Najwolniejszy etap procesu, czyli utlenianie NH_4^+ , w coraz mniejszym stopniu wpływa na całkowity współczynnik frakcjonowania, który zmniejsza się tak, że wartość $\delta^{15}\text{N}$ azotanów zaczyna zbliżać się do wartości sprzed zastosowania amoniaku (Kendall i Aravena, 2000).

Wykorzystywany w procesie nitryfikacji do tworzenia azotanów tlen pochodzi z dwóch źródeł: na jeden jon NO_3^- przypada jeden atom tlenu z cząsteczki O_2 i dwa z cząsteczek H_2O (Andersson i Hooper, 1983; Kumar i inni, 1983; Hollocher, 1984). Z tego też względu, jeżeli pominie się frakcjonowanie, skład izotopowy tlenu azotanowego, można określić na podstawie znanych wartości $\delta^{18}\text{O}$ dla wody ($\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$) i tlenu cząsteczkowego ($\delta^{18}\text{O}_{\text{O}_2}$):

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3} = \frac{2}{3} \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} + \frac{1}{3} \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{O}_2} \quad (4.17)$$

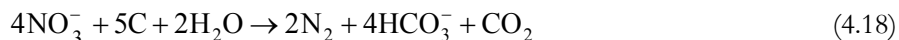
Tlen atmosferyczny ma wartość $\delta^{18}\text{O}$ około +23,5‰ (vs. V-SMOW) (Kroopnick i Craig, 1972). Jeżeli założymy, że skład tlenu glebowego nie różni się znacząco od składu tlenu atmosferycznego, to dla wód o $\delta^{18}\text{O}$ mieszczącym się w przedziale od –25‰ do +4‰ $\delta^{18}\text{O}$ azotanów będzie się zawierał w przedziale od –8,8‰

do +10,5‰. Powyższy model w zastosowaniach terenowych musi spełnić kilka założeń: (i) tlen glebowy, wykorzystywany przez bakterie w procesie nityfikacji, ma identyczny skład izotopowy co tlen atmosferyczny, (ii) skład izotopowy tlenu w wodzie używanej przez bakterie jest taki sam jak skład izotopowy tlenu w wodzie glebowej, (iii) liczba atomów tlenu z O_2 i H_2O , wykorzystywanych w warunkach polowych przez mikroorganizmy do tworzenia jonów NO_3^- , jest taka sama jak w przypadku kultur hodowanych w laboratoriach, oraz (iv) podczas pobierania atomów tlenu z O_2 i H_2O nie występuje żadne frakcjonowanie izotopowe.

Założenia te najczęściej nie są spełnione. Z transferem tlenu z obu źródeł do azotanów związane jest frakcjonowanie izotopowe. Jednym z powodów wysokich wartości $\delta^{18}O$ azotanów jest podwyższona wartość $\delta^{18}O$ dla wody glebowej w stosunku do wód opadowych, wynikająca z częściowego odparowania (Amberger i Schmidt, 1987). Aravena i in. (1993) wskazali na możliwość zmiany stosunku liczby atomów tlenu pobieranych podczas nityfikacji z O_2 i H_2O . Wzbogacenia azotanów w ^{18}O nie można tłumaczyć wymianą izotopową tlenu między azotanami i wodą, ponieważ wtedy $\delta^{18}O$ azotanów byłaby niższa, a nie wyższa. Ze względu na stabilność chemiczną dwuatomowej cząsteczki tlenu mało prawdopodobna jest również wymiana z O_2 . W porach glebowych mogą lokalnie wystąpić warunki beztlenowe umożliwiające zachodzenie denityfikacji i w konsekwencji obniżenie $\delta^{18}O$. Van Everdingen i Krouse (1985) stwierdzili, że duży zakres przyjmowanych wartości $\delta^{18}O$ azotanów może wiązać się z obecnością nie jednej, ale kilku ścieżek, jakimi przebiega nityfikacja.

Denityfikacja

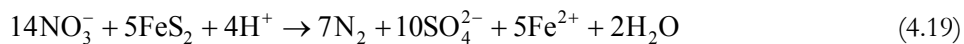
Denityfikacja to wieloetapowy proces redukcji azotanów do związków na niższym stopniu utlenienia. W trakcie etapów pośrednich powstają tlenki azotu (np. NO , N_2O). Ostatecznie wytwarzany jest azot cząsteczkowy N_2 . W zachodzących podczas całego procesu reakcjach redoks akceptorami elektronowymi mogą być różne cząsteczki, atomy, bądź jony (np. SO_4^{2-} , O_2). Czynnikiem ograniczającym denityfikację, prowadzoną przez niektóre gatunki bakterii, jest obecność w otoczeniu znacznych ilości tlenu. Sprzyjające warunki anaerobowe (tzw. kieszenie beztlenowe) mogą jednakże wystąpić lokalnie w natlenionych osadach czy ciekach i zbiornikach wodnych (Koba i in., 1997). W glebie i w zbiornikach wodnych głównym czynnikiem warunkującym zachodzenie denityfikacji azotanów jest obecność bakterii *Pseudomonas denitrificans*. Procesowi temu towarzyszy utlenianie materii organicznej i emisja powstałego dwutlenku węgla:



Produktem końcowym denityfikacji azotanów niekoniecznie musi być azot cząsteczkowy N_2 . W pewnych przypadkach u niektórych gatunków bakterii finalnie wytwarzany jest N_2O . Takie przypadki spotykane są w glebach bagiennych lub w systemach wodnych w pobliżu granicy woda–osad denny (Duff i Triska, 1990).

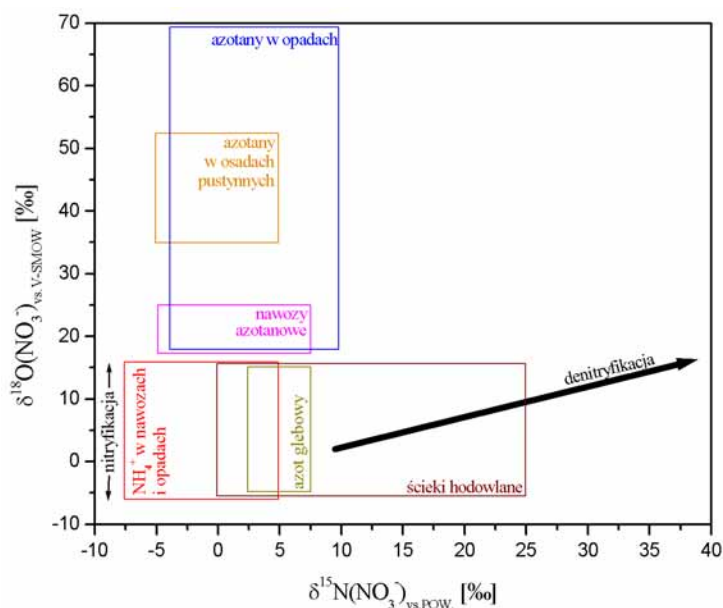
W innym typie denityfikacji reduktorem może być siarka. Dzieje się tak np. w przypadku bakterii *Thiobacillus denitrificans*. Denityfikacja zachodzi w trakcie procesu chemoautotroficznego oddychania, w czasie którego utleniana jest siarka (Równ. 4.19). Proces ten odgrywa ważną rolę w wodach gruntowych

(Böttcher i in., 1990; Postma i in., 1991; Aravena i Robertson, 1998), jak również w systemach oczyszczania ścieków kanalizacyjnych (Batchelor i Lawrence, 1978).



Ciekawostką jest fakt, że *Thiobacillus denitrificans* mogą egzystować zarówno jako hetero– jak i jako autotrofy – są tzw. mikroorganizmami fakultatywnymi. Jeżeli stężenie tlenu w bezpośrednim otoczeniu spadnie poniżej 0,5 mg/L, bakterie zaczynają redukować azotany (Hübner, 1986). Podobne zjawisko występuje u innych gatunków fakultatywnych bakterii denitryfikujących, choć poziom tolerancji tlenowej może być różny.

Denitryfikacja wpływa w charakterystyczny sposób na skład izotopowy azotanów w wodzie (Rys. 4.6). Z obniżaniem się stężenia azotanów eksponencjalnie rośnie wartość $\delta^{15}\text{N}$ (por. Rys. 4.1). Przykładowo, jeżeli zastosowane jako nawozy sztuczne azotany mają $\delta^{15}\text{N}$ rzędu 0‰, to denitryfikacja może spowodować podwyższenie tej wartości dla obecnych w wodach gruntowych azotanów nawet do poziomu +30‰. Ponieważ jest to wartość z zakresu charakterystycznego dla nawozów naturalnych, utrudnia to w znaczący sposób identyfikację źródła zanieczyszczenia azotanami.



Rys. 4.6. Typowe przedziały wartości $\delta^{18}\text{O}$ i $\delta^{15}\text{N}$ mierzonych dla azotanów i jonów amonowych pochodzących z różnych źródeł. Duża strzałka oznacza obserwowany trend zmian $\delta^{18}\text{O}$ i $\delta^{15}\text{N}$ wskutek denitryfikacji azotanów (Kendall, 1998).

Aby odróżnić, czy ma się do czynienia z denitryfikacją czy z mieszaniem wód z dwóch źródeł o różnym stężeniu i składzie izotopowym azotanów, należy przedstawić uzyskane dane w odpowiednim układzie współrzędnych. Jeżeli w układzie $\delta^{15}\text{N} = f(\ln[\text{NO}_3])$ otrzymuje się zależność prostoliniową, to można to przypisać procesowi denitryfikacji, opisywanemu przez model Rayleigha. W tym przypadku, z dopasowanej do

wykresu prostej regresji można wyznaczyć wzbogacenie izotopowe ε . Jeżeli natomiast otrzyma się prostą w układzie $\delta^{15}\text{N} = f(1/[\text{NO}_3])$, to wynika ona z dwuskładnikowego mieszania wód różniących się składem izotopowym azotanów. Można wtedy wykorzystać zależność $\delta^{15}\text{N} = f(1/[\text{NO}_3])$ do określenia składu izotopowego źródła azotanów.

Wytwarzany w trakcie denitryfikacji N_2 ma niższą wartość $\delta^{15}\text{N}$ niż wyjściowe azotany. Zmierzone dla denitryfikacji ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$) wartości wzbogacenia izotopowego mieszczą się w zakresie od -40 do -5‰ (Kendall i Aravena, 2000). W warunkach laboratoryjnych, w kontrolowanej temperaturze (od 20 do 30°C) otrzymano wartości ε w zakresie od $-29,4$ do $-24,6\text{‰}$ (Mariotti i in., 1981). Dodatkowym efektem związanym z denitryfikacją jest wzrost ilości azotu rozpuszczonego w wodach gruntowych. Badając jego skład, uzyskuje się informacje o pochodzeniu azotanów i dowody na denitryfikacyjną działalność bakterii w tych wodach (Vogel i inni, 1981; Böhlke i Denver, 1995).

Mariotti i in. (1988) na podstawie pomiarów składu izotopowego azotu stwierdzili, że wzbogacenie izotopowe ε w procesie denitryfikacji zmieniało się w dużo węższym, niż u innych badaczy, przedziale wartości od -8 do -5‰ . Przyczyny tego mogą być dwojakie. Na wielkość wzbogacenia izotopowego wpływa szybkość reakcji denitryfikacji. Niska wartość ε sugeruje szybszą denitryfikację. Dla próbek azotanów z wód gruntowych w Kotlinie Kalahari w Afryce Południowej zmierzono związany z denitryfikacją współczynnik wzbogacenia rzędu $-30 \pm 6\text{‰}$ (Vogel i in., 1981), co wskazuje na małą prędkość procesu. Oszacowano, że czas, jaki musiał upłynąć, aby ustalił się obecny skład izotopowy azotanów w wodach gruntowych Kotliny Kalahari, wyniósł około 14 tysięcy lat.

Wytłumaczeniem małych wartości wzbogacenia ε , związanego z denitryfikacją, może być też pochłanianie przez skały części azotanów w obrębie zbiornika wód, co skutkuje efektywnie zmniejszeniem wartości ε (Mariotti i in., 1988). W przypadku niektórych minerałów (np. kredy) puste pory stanowią mogą nawet 40% całkowitej objętości skały. Takie miejsca stanowią w większości martwe strefy, w których woda jest zatrzymywana. Obecne w ściankach porów bakterie przyspieszają denitryfikację w tych strefach. W ten sposób powstają obszary o obniżonej zawartości azotanów w stosunku do miejsc wypełnionych przez przepływającą szybko wodę gruntową. Różnica stężeń azotanów powoduje, że pory zachowują się jak studnie, do których dyfundują azotany, przy czym efekt izotopowy związany z procesem dyfuzji jest na tyle mały, że ewentualne wzbogacenie izotopowe z nim związane można pominąć.

Stosunek wielkości wzbogacenia izotopowego tlenu $\varepsilon_{\text{O}}(\text{NO}_3^-)$ do wzbogacenia izotopowego azotu $\varepsilon_{\text{N}}(\text{NO}_3^-)$ zazwyczaj pozostaje stały dla danego procesu denitryfikacji, co można zapisać:

$$\varepsilon_{\text{N}}(\text{NO}_3^-) = k \cdot \varepsilon_{\text{O}}(\text{NO}_3^-) \quad (4.20)$$

gdzie k oznacza stałą proporcjonalności.

Wyznaczone w oparciu o wyniki doświadczalne dużych eksperymentów polowych wartości współczynnika k zawierają się w przedziale od 1,3 do 2,1 (Fukada i in., 2003).

Korzystając z zależności 4.9, z dobrym przybliżeniem można zapisać następujące relacje:

$$\delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{(0)} + \varepsilon_{\text{N}}(\text{NO}_3^-) \cdot \ln(f) \quad (4.21)$$

$$\delta^{18}\text{O} = \delta^{18}\text{O}_{(0)} + \varepsilon_{\text{O}}(\text{NO}_3^-) \cdot \ln(f) \quad (4.22)$$

gdzie subskrypt (0) oznacza pierwotny skład izotopowy azotu bądź tlenu.

Wyznaczając zmiany $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{18}\text{O}$ zachodzące w trakcie denitryfikacji w okresie, kiedy ilość substratów (azotanów) zmniejszyła się od f_1 do f_2 , otrzymuje się:

$$\delta^{15}\text{N}_{(2)} - \delta^{15}\text{N}_{(1)} = \Delta(\delta^{15}\text{N}) = \varepsilon_{\text{N}}(\text{NO}_3^-) \cdot \ln \frac{f_2}{f_1} \quad (4.23)$$

$$\delta^{18}\text{O}_{(2)} - \delta^{18}\text{O}_{(1)} = \Delta(\delta^{18}\text{O}) = \varepsilon_{\text{O}}(\text{NO}_3^-) \cdot \ln \frac{f_2}{f_1} \quad (4.24)$$

Dzieląc obustronnie równania 4.23 i 4.24 i korzystając z równania 4.20, otrzymuje się:

$$\Delta(\delta^{18}\text{O}) = \frac{1}{k} \cdot \Delta(\delta^{15}\text{N}) \quad (4.25)$$

Dla procesu denitryfikacji spotykane wartości współczynnika k są z reguły bliskie liczbie 2 (Böttcher i in., 1990; Voerkelius i Schmidt, 1990; Aravena i Robertson, 1998). Oznacza to, że sporządzając wykres zależności $\delta^{18}\text{O} = f(\delta^{15}\text{N})$ dla próbek reprezentujących proces denitryfikacji, dopasowana prosta będzie miała współczynnik kierunkowy około 1/2 (Rys. 4.6).

Rozdział 5. Pomiar składu izotopowego azotanów

Pomiar składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie sprowadza się do ich separacji z wody i konwersji NO_3^- do związków gazowych, możliwych do zmierzenia spektrometrem mas. Licznie opracowane procedury początkowo umożliwiały jedynie wyznaczenie składu azotu w azotanach poprzez określenie $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$. W tabeli 5.1 przedstawiono chronologiczny przegląd metod analizy $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$.

Tab. 5.1. Przegląd metod analizy składu izotopowego azotu w jonach azotanowych rozpuszczonych w wodzie.

Autor/Publikacja	Opis procedury
Hoering (1957)	– separacja azotanów na kolumnach jonowymiennych, – redukcja NO_3^- do NH_3 z użyciem Zn i Fe, – utlenianie NH_3 do N_2 z użyciem NaBrO, – oczyszczanie N_2 poprzez przepuszczanie nad gorącym CuO (oddzielenie CO) i przez pułapkę kriogeniczną (oddzielenie CO_2),
Cline i Kaplan (1975) Liu i Kaplan (1989) Liu i in. (1996)	– separacja azotanów poprzez dodanie NaOH i destylację próżniową w ewaporatorze, – redukcja NO_3^- do NH_3 z użyciem stopu Dewarda (Al+Cu+Zn), – utlenianie NH_3 do N_2 z użyciem NaBrO, – oczyszczanie N_2 poprzez przepuszczenie nad Cu (700°C) i CuO (600°C),
Ueda i in. (1991)	– redukcja NO_3^- do NH_3 z użyciem stopu Dewarda, – utlenianie NH_3 do N_2 z użyciem KBrO,
Sigman i in. (1997) Goerges i Dittert (1998)	– redukcja NO_3^- do NH_3 z użyciem stopu Dewarda i pułapek kwasowych (tzw. paczek dyfuzyjnych), – utlenianie NH_3 do N_2 i oczyszczenie w systemie on-line,
Russell i in. (1998)	– redukcja NO_3^- do NH_4^+ z użyciem stopu Dewarda i ekstrakcja NH_4^+ , – utlenianie NH_4^+ do N_2 w obecności CuO i Cu (850°C), – kriogeniczne oczyszczenie N_2 ,
Johnston i in. (1999)	– separacja azotanów z wykorzystaniem 1–fenylazo–2–naftolu ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$), – utlenianie do N_2 i oczyszczenie w systemie on-line (CF-IRMS),
Stickrod i Marshall (2000)	– ekstrakcja azotanów na żywicach jonowymiennych i konwersja do AgNO_3 , – utlenianie do N_2 i oczyszczenie w systemie on-line,
Ogawa i in. (2001)	– ekstrakcja azotanów na polimerowej żywicy absorpcyjnej, – utlenianie do N_2 i oczyszczenie w systemie on-line,
Sakata (2001)	– redukcja jonów NO_3^- do NH_3 przy pomocy stopu Dewarda, – destylacja i strącanie jonów amonowych w formie tetrafenyloboranu amonu $((\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{BNH}_4)$, – utlenianie do N_2 i oczyszczenie w systemie on-line,
Tanaka i Saino (2002)	– separacja azotanów poprzez dodanie NaOH i destylację próżniową w ewaporatorze, – redukcja NO_3^- do NH_3 z użyciem Al, – utlenianie NH_3 do N_2 z użyciem KBrO, – oczyszczanie N_2 poprzez przepuszczenie przez Cu (500°C).

Pod koniec XX wieku opracowano metody umożliwiające jednoczesny pomiar składu izotopowego azotu i tlenu azotanowego. Tabela 5.2 zawiera przegląd podstawowych technik wyznaczania $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$.

W ramach niniejszej pracy w Zespole Fizyki Środowiska WFiIS, AGH wdrożono do praktyki laboratoryjnej następujące procedury analityczne zmierzające do określenia składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie: (i) poprzez chemiczną konwersję jonów NO_3^- do N_2 i CO_2 oraz (ii) poprzez konwersję jonów NO_3^- do N_2O z udziałem bakterii denitryfikacyjnych. Zostały one szczegółowo opisane w kolejnych podrozdziałach.

Tab. 5.2. Przegląd metod analizy składu izotopowego tlenu i azotu w jonach azotanowych.

Autor/Publikacja	Opis procedury
Amberger i Schmidt (1987)	– konwersja azotanów w próbce do KNO_3 , – spalanie KNO_3 do CO_2 w obecności HgCN ,
Révész i in. (1997)	– spalanie KNO_3 w obecności grafitu i katalizatorów (Pd+Au), – kriogeniczne rozdzielanie N_2 od CO_2 , – „dopalenie” N_2 w obecności CaO , Cu i Cu_2O przed pomiarem $\delta^{15}\text{N}$,
Brauer i Strauch (2000)	– spalanie azotanów do CO_2 w obecności hydrochloroku guanidyny, – oczyszczanie próbki z NH_3 na pułapce z H_2SO_4 ,
Silva i in. (2000) Fukada i in. (2003)	– ekstrakcja azotanów na żywicach anionowymiennych i konwersja do AgNO_3 , – spalanie AgNO_3 w obecności grafitu ($\text{AgNO}_3 \rightarrow \text{CO}_2$), – spalanie AgNO_3 w obecności CaO , Cu i CuO ($\text{AgNO}_3 \rightarrow \text{N}_2$), – oczyszczanie kriogeniczne N_2 oraz CO_2 ,
Sigman i in. (2001) Casciotti i in. (2002) Granger i in. (2006)	– redukcja przez bakterie denitryfikujące (<i>Pseudomonas aureofaciens</i> , <i>Pseudomonas chlororaphis</i>) azotanów do N_2O , – oczyszczanie kriogeniczne N_2O ,
McIlvin i Altabet (2005)	– redukcja azotanów do azotynów w obecności Cd , – redukcja azotynów do N_2O w obecności azydru sodu (NaN_3), – oczyszczanie kriogeniczne N_2O .

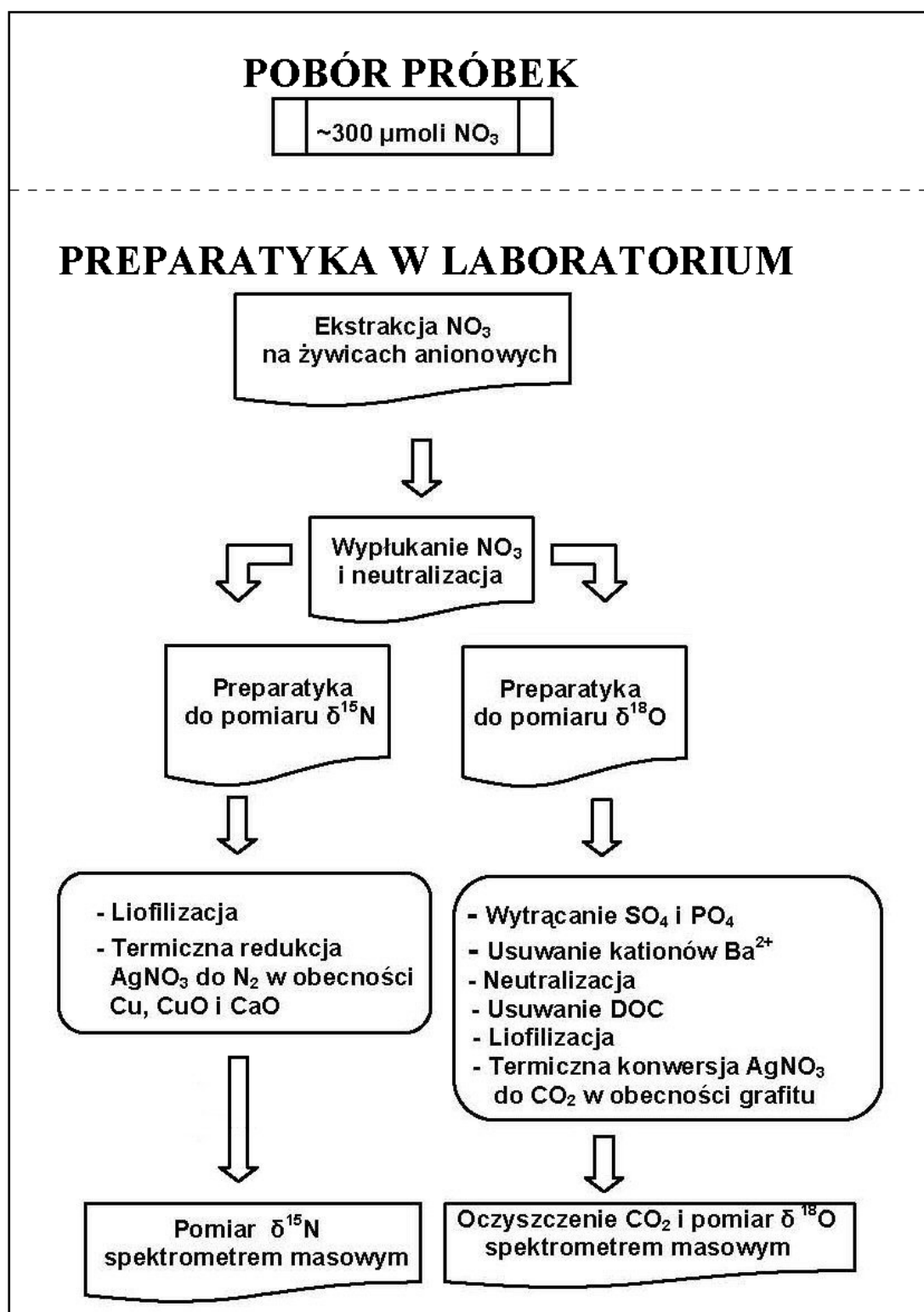
5.1. Metoda wyznaczania składu izotopowego azotanów z chemiczną konwersją do N_2 i CO_2

Zastosowana w niniejszej pracy metoda wyznaczania składu izotopowego azotanów poprzez ich chemiczną konwersję do postaci gazów mierzalnych na spektrometrze mas opiera się o procedurę z ekstrakcją jonów NO_3^- na żywicach anionowymiennych (Silva i in., 2000). Rysunek 5.1 przedstawia schemat wdrożonej w ramach niniejszej pracy metody określania $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$. Początkowe etapy procedury wyznaczania składu izotopowego są wspólne dla obu pierwiastków (azotu i tlenu).

5.1.1. Pobór w terenie i przechowywanie prób z azotanami

Przed poborem prób wody do analiz izotopowych mierzono stężenie azotanów w wodzie, aby określić minimalną objętość próbki, jaką należy pobrać, aby zawierała ona określoną, minimalną ilość azotanów, wymaganą do dalszej obróbki analitycznej. Do określania stężenia NO_3^- stosowano przenośny kolorymetr HACH DR/890. Zasada pomiaru stężenia NO_3^- w wodzie tym przyrządem opiera się na redukcji jonów NO_3^- do jonów NO_2^- odczynnikiem zawierającym kadm. Następnie, jony NO_2^- reagują z kwasem sulfanilowym, formując przejściową sól diazoniową, która łącząc się z kwasem gentyzynowym, tworzy kompleksy o bursztynowym zabarwieniu (DR/890 Colorimeter Procedures Manual, 2005).

Wymaganą do analiz izotopowych ilość azotanów warunkuje szereg czynników związanych z całą procedurą, m.in. wydajność ekstrakcji azotanów na żywicach anionowymiennych oraz wymagana do analiz izotopowych minimalna ilość gazu (w tym N_2 i CO_2). W niniejszej pracy przyjęto 300 μmoli (18,6 mg) jako minimalną ilość azotanów (NO_3^-), jaka powinna znaleźć się w pobranej próbce wody. W procedurze opisanej przez Silvę i in. (2000) pobierano ilość wody zawierającą 100–200 μmoli NO_3^- . Tabela 5.3 przedstawia minimalne objętości wody, jakie należałoby pobrać, aby przy danym stężeniu NO_3^- zawierały one 18,6 mg azotanów.



Rys. 5.1. Schemat zastosowanej w niniejszej pracy procedury wyznaczania składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie w oparciu o ich chemiczną konwersję do N_2 i CO_2 .

Tab. 5.3. Minimalne objętości wody, jakie należy pobrać, aby przy określonym stężeniu znajdowało się w niej 18,6 mg azotanów (NO_3^-).

Stężenie azotanów NO_3^- [mg/L]	Objętość próbki wody [L]
1	18,6
5	3,8
10	1,9
50	0,4
100	0,2

Próby wody pobierano do 10-litrowych polietylenowych kanistrów, względnie do 1-litrowych butelek. Aby zapobiec zmianom stężenia i składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie, jakie mogłyby nastąpić podczas dłuższego przechowywania, próby niezwłocznie dostarczano do laboratorium, gdzie były one odfiltrowywane i przepuszczane przez kolumny z żywicami. Jeżeli nie jest to możliwe, procedurę ekstrakcji NO_3^- na żywicach powinno prowadzić się w terenie. Próby na kolumnach można przechowywać w chłodnym zaciemnionym miejscu nawet przez dwa lata, bez ryzyka znaczącego frakcjonowania azotu bądź tlenu (Kendall, 1998). W przypadku wód opadowych, dla których czas gromadzenia próby reprezentatywnej dla założonego przedziału czasu (np. miesiąca) przekraczał z oczywistych względów „bezpieczny” 2–3 dniowy margines, wodę z deszczomierza zlewano do pojemników w odstępach 1–2 dniowych. Pojemniki przechowywano w lodówce. Po zgromadzeniu wody opadowej za cały badany okres (miesiąc) wszystkie próbki mieszano, uzyskując uśrednioną próbę wody do dalszych analiz izotopowych.

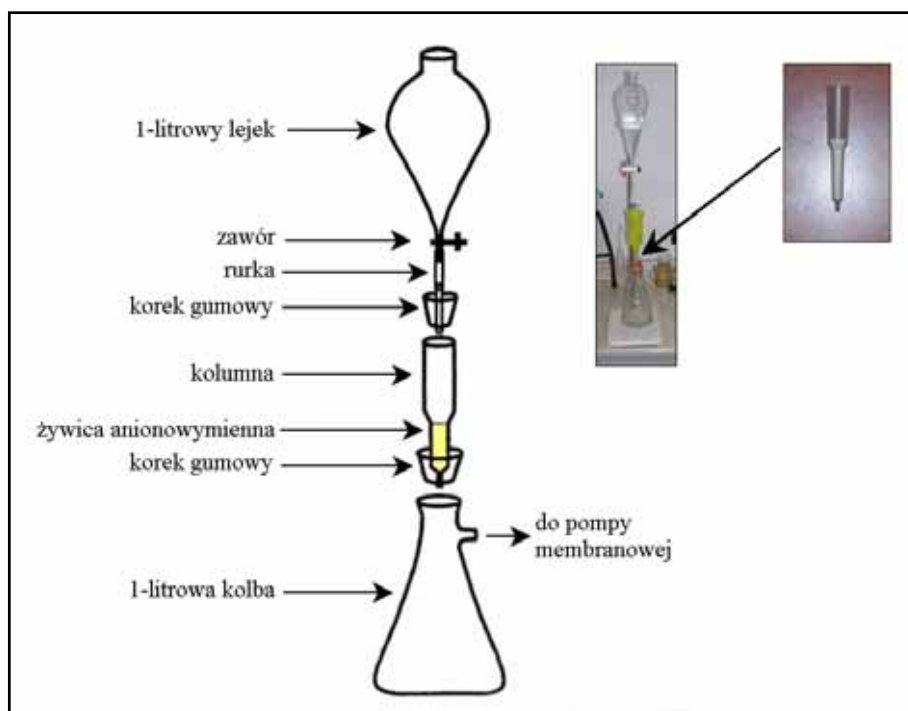
5.1.2. Osadzanie azotanów na żywicach anionowymiennych

Do ekstrakcji azotanów z wody wykorzystywano żywicę anionowymienną AG1-X8 (Bio-Rad Laboratories). Jest to żywica chlorkowa, którą cechuje stosunkowo wysoka wydajność usuwania jonów NO_3^- . Pojemność jonowymienna żywicy wynosi 1,2 meq/mL. Ponieważ objętość zajmowana przez pakiet żywicy w kolumnie wynosi 2 mL, na pojedynczej kolumnie można wychwycić maksymalnie 2,4 mmola jonów NO_3^- . Jest to 8-krotnie więcej niż przyjęta wielkość próby azotanów do analizy. Przed ekstrakcją azotanów przez kolumnę przepuszczano 2 mL 3M roztworu kwasu solnego HCl, aby wszystkie centra wymiany w żywicy były zajęte przez jony chlorkowe Cl^- . Następnie przez kolumnę przepuszczano 15 mL wody dejonizowanej w 3-mililitrowych porcjach, aby wypłukać nadmiar jonów chlorkowych. Po każdej porcji kolumnę przedmuchiwano, co pozwalało dokładnie usunąć wodę z jonami chlorkowymi. Jeżeli kolumna miała być przechowywana przez dłuższy okres czasu, to pozostawiano w niej 1 mL wody dejonizowanej. Dzięki obecności wody ziarna żywicy pozostają w stanie uwodnionym. Zamkniętą szczelnie z obu stron kolumnę przechowywano w obniżonej temperaturze.

Próbę wody przed wprowadzeniem na kolumnę przepuszczano przez filtr z włókien szklanych (Whatman) o średnicy 50 mm i wielkości porów 1,6 μm . Miało to na celu usunięcie drobnych zanieczyszczeń i

jednocześnie stanowiło wstępną filtrację przed użyciem membrany poliwęglanowej (Whatman) o średnicy 47 mm i wielkości porów 0,4 μm (usuwającej drobniejsze zawiesiny).

Z odfiltrowanej próby odmierzano taką ilość wody, aby zawierała ona 0,3 mmola azotanów. Przefiltrowaną wodę nalewano do 1-litrowego szklanego zbiornika podłączonego do kolumny z żywicą anionowymienną. Cały układ montowano na specjalnym statywie (Rys. 5.2). Pozostałą część próby wody pozostawiano do zakończenia analizy. Pozwala to na ewentualne powtórzenie całej procedury w przypadku zniszczenia próbki pierwotnej. Jeżeli ekstrakcję azotanów przeprowadza się w terenie, to po jej zakończeniu kolumny są szczelnie zamykane i w niskiej temperaturze przewożone do laboratorium. Przed dalszą preparatyką kolumny z azotanami przechowywano w niskiej temperaturze, w lodówce.



Rys. 5.2. Zestaw do ekstrakcji azotanów na żywicach anionowymiennych. Po prawej stronie pokazano pojedynczą kolumnę z żywicą anionowymienną.

Prędkość przepływu wody przez kolumnę regulowano przy pomocy zaworu umieszczonego na końcu 1-litrowego zbiornika. Szybszy przepływ wody wymuszano przez podłączenie pompy membranowej do zbierającej wodę kolby. Wydajność ekstrakcji kontrolowano, mierząc kolorymetrycznie stężenie azotanów w wodzie wypływającej z kolumny.

Wpływ prędkości przepływu próbki przez żywicę na wydajność ekstrakcji azotanów

Aby sprawdzić, czy prędkość przepływu wody przez kolumny z żywicą wpływa na wydajność ekstrakcji azotanów, przez kolumny przepuszczano roztwory o takim samym stężeniu azotanów (KNO_3 rozpuszczony w wodzie destylowanej), zmieniając prędkość przepływu. Ze względu na ograniczone możliwości regulacji

prędkości przepływu (zawór + pompa membranowa) wybrano cztery pośrednie prędkości w zakresie 250–1750 mL/h. Prędkość przepływu wyznaczano, mierząc w wykalibrowanym 1-litrowym naczyniu objętość wody przepływającej przez kolumnę w danym przedziale czasu. Wydajność ekstrakcji azotanów $w(\text{NO}_3^-)$ obliczano na podstawie równania:

$$w(\text{NO}_3^-) = \frac{m_p(\text{NO}_3^-) - m_k(\text{NO}_3^-)}{m_p(\text{NO}_3^-)} \cdot 100 \quad [\%] \quad (5.1)$$

gdzie: $m_p(\text{NO}_3^-)$, $m_k(\text{NO}_3^-)$ – masy azotanów (mg NO_3^-) rozpuszczonych w danej objętości wody przed i po ekstrakcji na żywicy anionowymiennej. Stężenia azotanów mierzono kolorymetrem (Hach).

Dla każdej prędkości przepływu wykonano po 2 pomiary, na podstawie których wyznaczono wartości średnie i niepewności prędkości przepływu i odpowiadającej jej wydajności ekstrakcji azotanów. Wyniki zawiera tabela 5.4.

Tab. 5.4. Wydajność ekstrakcji azotanów $w(\text{NO}_3^-)$ na żywicy anionowymiennej przy różnych prędkościach przepływu wody przez kolumnę. Wydajność wyznaczono na podstawie zależności 5.1.

Prędkość przepływu [mL/h]	$w(\text{NO}_3^-)$ [%]
248 ± 15	$98,9 \pm 0,9$
767 ± 11	$99,5 \pm 1,0$
1189 ± 29	$98,9 \pm 1,0$
1683 ± 38	$98,4 \pm 1,5$

Z wyników zamieszczonych w tabeli 5.1 wynika, że w badanym przedziale prędkości, prędkość przepływu wody przez kolumnę z żywicą (250–1750 mL/h) nie ma znaczącego wpływu na wydajność ekstrakcji azotanów, która jest bliska 100%. Do dalszych analiz przyjęto wartość prędkości przepływu wody przez kolumny na poziomie około 1000 mL/godzinę.

Wpływ stężenia azotanów w próbce na wydajność ekstrakcji

W celu sprawdzenia, czy stężenie azotanów rozpuszczonych w wodzie ma wpływ na wydajność ich ekstrakcji na żywicy anionowymiennej, przez kolumny przepuszczono równe objętości wody (około jednego litra), zawierające różne ilości azotanów (zastosowano KNO_3). Ponieważ stężenia NO_3^- zazwyczaj spotykane w środowisku zmieniają się w dość szerokim zakresie od dziesiątych części mgNO_3^-/L do stu kilkudziesięciu mgNO_3^-/L , wybrano kilka pośrednich wartości stężeń, dla których wyznaczono wydajność ekstrakcji azotanów na żywicach. Wydajność ekstrakcji $w(\text{NO}_3^-)$ obliczono według równania 5.1. Dla każdego stężenia przeprowadzono po dwa pomiary, na podstawie których obliczono średnie i odchylenia standardowe wydajności ekstrakcji. Wyniki pomiarów i obliczeń przedstawiono w tabeli 5.5. Uzyskana mniejsza wydajność ekstrakcji dla niższych stężeń wynika najprawdopodobniej z ograniczonej dokładności kolorymetru, którym

mierzone stężenie azotanów (najmniejsza działka to 0,1 mgNO₃⁻/L). Na podstawie wyników pomiarów można stwierdzić, że stężenie azotanów w wodzie nie wpływa znacząco na wydajność ich ekstrakcji na żywicach anionowymiennych.

Tab. 5.5. Wydajność ekstrakcji azotanów $w(\text{NO}_3^-)$ na żywicy anionowymiennej przy różnych stężeniach azotanów w wodzie. Wydajność wyznaczono z zależności 5.1. Dla każdego stężenia wykonano po dwa pomiary.

Stężenie NO ₃ ⁻ [mg/L]	w(NO ₃ ⁻) [%]
1	85,0 ± 5,0
30	98,3 ± 0,9
60	98,9 ± 1,1
90	98,0 ± 1,9
120	97,9 ± 1,7

Powtarzalność ekstrakcji azotanów na żywicach anionowymiennych

Dla oszacowania powtarzalności ekstrakcji azotanów na żywicach anionowymiennych, sporządzono próbkę o ustalonym stężeniu azotanów i przeprowadzono ekstrakcję przygotowanego roztworu na siedmiu kolumnach. Dla każdego zestawu ekstrakcyjnego obliczono według wzoru 5.1 wydajność ekstrakcji $w(\text{NO}_3^-)$, a następnie wyznaczono wartość średnią i odchylenie standardowe. Wyniki pomiarów zawiera tabela 5.6. Z tabeli 5.6. widać, że wydajność procedury ekstrakcji jest powtarzalna na poziomie 2,5%.

Tab. 5.6. Powtarzalność ekstrakcji na żywicach anionowymiennych azotanów z roztworu o jednym, ustalonym stężeniu (19 mgNO₃⁻/L). Do obliczenia odchylenia standardowego pojedynczego pomiaru wykorzystano rozkład Studenta (ze względu na małą liczbę pomiarów, tzn. n=7). Analogicznie postępowano przy innych tego typu obliczeniach.

Lp.	w(NO ₃ ⁻) [%]
1	98,3
2	96,3
3	99,6
4	99,6
5	99,4
6	99,4
7	98,5
Wartość średnia	98,7 ± 2,4

5.1.3. Preparatyka i chemiczna konwersja azotanów do N₂ i CO₂

Kolejnym etapem procedury jest wymywanie jonów NO₃⁻ z żywic anionowymiennych. Aby ułatwić i przyspieszyć pracę, kolumny montowano na specjalnym statywie, umożliwiającym jednoczesną ekstrakcję z 4 kolumn (Rys. 5.3).



Rys. 5.3. Statyw ekstrakcyjny z czterema kolumnami. Azotany wymywane są przez 3–molowy roztwór kwasu solnego.

Aniony azotanowe wymywano z kolumny, przepuszczając przez nią 15 mL 3 M roztworu kwasu HCl. Ilość ta jest wystarczająca do uzyskania wydajności ekstrakcji powyżej 90% (Silva i in., 2000). Kwas solny wprowadzano w 3–mililitrowych porcjach, tak aby wypływ cieczy z kolumny następował swobodnie, bez dodatkowego wymuszenia. Po każdej porcji kwasu kolumnę przedmuchiwało, aby usunąć z niej pozostały eluent. Całość roztworu (około 15 mL) zbierano do 50–mililitrowej szklanej zlewki. Ponieważ HNO_3 jest substancją lotną, należało go przed dalszymi etapami procedury zneutralizować. W tym celu użyto tlenku srebra (I), który reaguje z chlorkami i azotanami obecnymi w roztworze:



Zaletą stosowania Ag_2O jest fakt, że wytrącający się w roztworze chlorek srebra można bardzo łatwo odfiltrować przed etapem wytrącenia bezwodnego azotanu srebra AgNO_3 . Ponieważ neutralizacja roztworu jest procesem egzoenergetycznym, zlewkę umieszczano w zimnej wodzie. Do każdej zlewki dodawano po około 6 g Ag_2O – była to ilość nadmiarowa. Aby równomiernie rozprowadzać w roztworze wydzielające się ciepło reakcji i zapobiec powstawaniu piany, tlenek srebra dodawano w ilości po 1 g, po czym dokładnie mieszano ciecz szklanym prętem. W momencie zubożnienia zanikało mętne zabarwienie roztworu. Odczyn roztworu kontrolowano papierkiem wskaźnikowym.

Do oddzielenia z roztworu AgCl stosowano membrany poliwęglanowe (Whatman) o średnicy 47 mm i wielkości porów $0,2 \mu\text{m}$. Przefiltrowaną ciecz przelewano do 100–mililitrowych zlewek i uzupełniano wodą do objętości 60 mL. Następnie roztwór dzielono na 2 części: 20 mL przeznaczano do dalszej analizy w celu określenia $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$, a pozostałe 40 mL przeznaczano do wyznaczenia $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ i jako rezerwę w przypadku konieczności powtórzenia analizy. Butelki z częścią próbki na $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ szczelnie zakręcano i przechowywano w lodówce. W celu zmniejszenia niebezpieczeństwa fotodegradacji rozpuszczonego w wodzie

AgNO_3 , butelki owijano nieprzeźroczystą folią aluminiową. Warunku minimalizacji kontaktu próbki ze światłem powinno się przestrzegać w trakcie trwania całej procedury analitycznej.

Konwersja AgNO_3 do N_2

Część próbki (około 20 mL), przeznaczoną do wyznaczenia $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$, przelewano do 60-mililitrowego szklanego krystalizatora. Naczynie owijano folią aluminiową, aby zminimalizować kontakt ze światłem, a następnie umieszczano je w lodówce w celu zamrożenia. Krystalizator z zamrożoną próbką umieszczano w liofilizatorze. W niniejszej pracy wykorzystano liofilizator CHRIST LOC-2M (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) (Rys. 5.4). Aby zminimalizować straty azotanów podczas liofilizacji, naczynie przykrywano szczelnie folią z parafilmu, w której wykonywano kilkanaście otworów. Proces liofilizacji trwał kilka godzin i w jego trakcie korpus liofilizatora okrywano nieprzeźroczystym, światłoszczelnym materiałem. W efekcie liofilizacji otrzymywano na dnie krystalizatora drobny, zawierający AgNO_3 proszek. Krystalizator po zakończeniu procesu liofilizacji owijano szczelnie folią aluminiową.

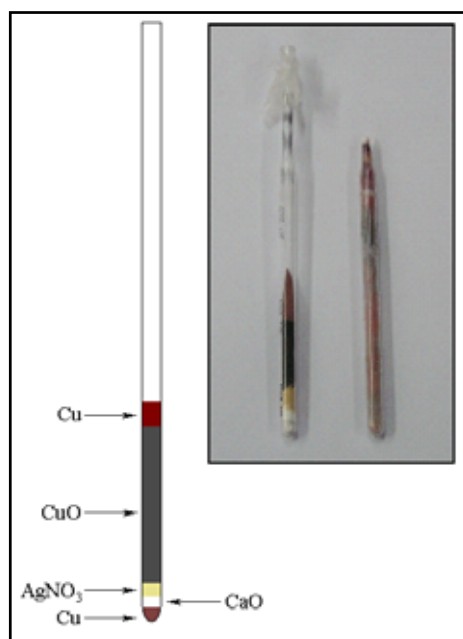


Rys. 5.4. Liofilizator CHRIST LOC-2M z umieszczonym w środku naczyniem zawierającym zamrożony roztwór z azotanami.

Przed dalszymi czynnościami należy przygotować reagenty konieczne do transformacji chemicznej $\text{N}(\text{NO}_3^-) \rightarrow \text{N}(\text{N}_2)$. Są to: miedź (Cu), tlenek wapnia (CaO) i tlenek miedzi (II) CuO (Kendal i Grim, 1990). W preparatyce wykorzystano czystą metaliczną miedź (Riedel-de Haën – czystość >99,8%) w postaci drobnych (o średnicy 0,2–0,6 mm) czerwono-brązowych granulek. Ponieważ miedź tworzy kompleksy, w których stosunkowo łatwo może zmieniać stopień utlenienia, wykorzystuje się ją jako katalizator w reakcjach redukcyjno-utleniających. Granulki miedzi stosowano bez dodatkowego wstępnego oczyszczania czy wygrzewania. Dodatkową zaletą użycia miedzi był fakt, że umieszczona u góry w rurce reakcyjnej, zapobiegała przedostawaniu się podczas odpompowywania drobin reagentów do układu próżniowego. Stosowany tlenek wapnia w postaci dużych (1,0–1,5 cm) bryłek (Merck, czystość >97%) rozdrabniano w moździerz na mialki proszek. W temperaturze pokojowej CaO jest drobnokrystalicznym białym proszkiem. Topi się w 2576°C . Ze względu na silną higroskopijność w obecności wody łączy się z nią, tworząc wodorotlenek wapnia. Aby

usunąć wodę z wykorzystywanego w preparatyce CaO, raz na tydzień tlenek wapnia prażono przez godzinę w temperaturze 1000°C. Zastosowany CuO (Sigma–Aldrich) miał postać czarnego, drobnoziarnistego proszku, praktycznie nierozpuszczalnego w wodzie. CuO stosuje się w analizie związków chemicznych ze względu na jego właściwości utleniające. Aby oczyścić tlenek przed dalszą obróbką, ogrzewano go w temperaturze 600°C przez 4 godziny.

Przygotowane wcześniej rurki kwarcowe wygrzewano w piecu (600°C, 5 godzin). Reagenty wsypywano do rurek (nadmiarowo) w następującej kolejności i proporcjach: (i) 2 g miedzi Cu, (ii) 0,5g tlenku wapnia CaO, (iii) próbka (AgNO_3), (iv) 7g tlenku miedzi (II) CuO oraz (v) 3g miedzi Cu.



Rys. 5.5. Rurka kwarcowa przed zatopieniem (po lewej), zawierająca reagenty do analizy składu izotopowego azotu azotanowego ($\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$). Po prawej widoczne zdjęcie rurek: przed i po spalaniu reagentów w piecu.

Po wsypaniu reagentów rurkę odpompowywano w układzie próżniowym i zatapiano. Następnie, intensywnie wytrząsając rurkę przez około minutę, mieszano wszystkie składniki. Rurkę umieszczano w piecu i ogrzewano przez 2 godziny w temperaturze 850°C, pozostawiając ją na noc do ostygnięcia. W niniejszej pracy do spalania próbek stosowano piec laboratoryjny LAC ze sterownikiem HT40A (Atest).

W celu określenia wydajności redukcji azotanów do azotu cząsteczkowego N_2 sporządzono roztwór KNO_3 o stężeniu 0,3 mmol/L i poddano otrzymany roztwór całej procedurze analitycznej. Wykonano 7 prób. Dla każdej próbki zmierzono w linii próżniowej ciśnienie uzyskanego azotu. Następnie obliczono całkowitą wydajność redukcji $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$. Wyniki obliczeń zawiera tabela 5.7.

Potencjalnymi czynnikami wpływającymi na obniżenie całkowitej wydajności konwersji azotanów do N_2 w porównaniu z cząstkową wydajnością samej ekstrakcji na kolumnach z żywicami jest: (i) niecałkowita konwersja azotanów do AgNO_3 , (ii) liofilizacja próbki oraz (iii) spalanie próbki w piecu. Wydaje się, że największy wpływ na pogorszenie wydajności ma właśnie liofilizacja, podczas której nie da się uniknąć strat

Tab. 5.7. Całkowita wydajność w redukcji azotanów do azotu cząsteczkowego.

Lp.	Wydajność redukcji $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$ [%]
1	91,3
2	93,8
3	90,7
4	92,1
5	92,2
6	91,9
7	93,6
Wartość średnia	$92,2 \pm 2,2$

azotanów w trakcie usuwania wody z krystalizatora w układzie próżniowym. Ponieważ w tym procesie nie należy spodziewać się frakcjonowania izotopowego w odniesieniu do azotu, niższa wydajność procesu nie powinna mieć wpływu na skład izotopowy azotu ($\delta^{15}\text{N}$).

Konwersja AgNO_3 do CO_2

W pierwszym etapie procedury konwersji AgNO_3 do CO_2 należało wyekstrahować AgNO_3 z pozostałych 40 mL roztworu. W próbce, oprócz rozpuszczonych azotanów obecne są również inne substancje zawierające tlen. Zastosowana procedura musi więc zapewnić usunięcie tych substancji (np. jonów SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , rozpuszczonego węgla organicznego), które mogłyby wpłynąć na oznaczany skład izotopowy tlenu w azotanach. Jako czynnik strącający niepożądane jony zastosowano 1 M roztwór chlorku baru BaCl_2 . Siarczan baru i fosforan baru bardzo słabo rozpuszczają się w wodzie. Do 50–mililitrowej plastikowej butelki zawierającej część próbki przeznaczoną do analizy $\delta^{18}\text{O}$ wprowadzano 2 mL roztworu BaCl_2 . Jest to ilość kilkukrotnie przekraczająca potrzebną do strącenia obecnych w roztworze jonów SO_4^{2-} (jonów PO_4^{3-} jest zazwyczaj 2–3 rzędy wielkości mniej). Obecność strączanych jonów zaznacza się poprzez pojawienie się mlecznobiałego zabarwienia próbki.

Butelkę zawierającą roztwór azotanów oraz strącających się siarczanów i fosforanów szczelnie zakręcano i energicznie wstrząsano. Po owinięciu butelki światłoszczelnym materiałem (folia aluminiowa) roztwór chowano w lodówce na całą noc. Następnego dnia usuwano z roztworu powstały osad (AgCl , BaSO_4 , $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$), przepuszczając go przez filtr poliwęglanowy (Whatman) o średnicy porów 0,2 μm . Otrzymany przesącz przepuszczano przez kolumny wypełnione żywicą kationowymienną Bio–Rad AG 50W–X8 (Bio–Rad Laboratories). Jest to żywica wodorkowa, na której kationy H^+ wymieniają się miejscami z obecnymi w roztworze nadmiarowymi kationami baru Ba^{2+} i ewentualnie srebra Ag^+ . Objętość zajmowana przez żywicę w kolumnie wynosi 2 mL, co przy jej pojemności 1,2 meq/mL pozwala na wymianę 1,2 mmola kationów Ba^{2+} . Należy pamiętać, że część kationów została odfiltrowana w postaci BaSO_4 i $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$. Po przepuszczeniu roztworu, przez kolumnę przepuszczano 3 mL wody dejonizowanej. Następnie przedmuchiowano ją celem usunięcia całej próbki. Zebrany do 50–mililitrowej szklanej zlewki roztwór zobojętniano, dodając do niego odpowiednią ilość (około 1–2 g) tlenku srebra Ag_2O . Poziom pH kontrolowano papierkiem wskaźnikowym. Powstały osad AgCl i nadmiar Ag_2O usuwano, przepuszczając roztwór przez filtr poliwęglanowy (Whatman) o porach wielkości 0,2 μm .

W celu usunięcia rozpuszczonego węgla organicznego (DOC), który również zawiera tlen mogący wpływać na oznaczany skład izotopowy tlenu azotanowego, zastosowano węgiel aktywowany (Merck). Na 50 mL próbki dodawano 10 mg węgla (Silva i in., 2000). Następnie próbę mieszano mieszadłem magnetycznym przez ok. 20 minut przy prędkości 200 obrotów/minutę. Dobór właściwego czasu mieszania oraz wzajemnej proporcji węgiel/próbka ma tutaj nieważne znaczenie, ponieważ ze względu na swe specyficzne właściwości (porowata struktura wewnętrzna → duża powierzchnia właściwa) węgiel aktywowany mógłby zacząć absorbować również azotany, wpływając na wydajność procesu konwersji $\text{AgNO}_3 \rightarrow \text{CO}_2$ oraz na oznaczany skład izotopowy tlenu w azotanach.

Aby sprawdzić, czy i w jakim stopniu przyjęta ilość wprowadzanego do próbki węgla aktywowanego oraz czas mieszania wpływają na zawartość azotanów w próbce, sporządzono pięć 50-mililitrowych roztworów zawierających 0,3 mmola azotanów (zastosowano wspomniany już wcześniej KNO_3). Do każdego z roztworów dodano po 10 mg węgla aktywowanego. Zlewki umieszczono na mieszadle magnetycznym na okres 20 minut, przy prędkości mieszania ustawionej na 200 obrotów/minutę. Następnie każdą próbkę przepuszczano przez filtr poliwęglanowy (Whatman) o średnicy porów 0,2 μm , celem usunięcia węgla aktywowanego. Po filtracji w próbkach kolorymetrycznie mierzono stężenie azotanów. Wyniki pomiarów zawiera tabela 5.8. Średni stosunek masy azotanów w próbce po zakończeniu mieszania do masy azotanów przed rozpoczęciem mieszania wyniósł $0,98 \pm 0,01$. Wynik ten wskazuje, że proces usuwania rozpuszczonego węgla organicznego z próbki przeprowadzany zgodnie z przyjętą procedurą nie wpływa znacząco na zawartość azotanów w próbce. Należy jednak przestrzegać reguły, aby węgiel aktywowany odfiltrowywać z próbki natychmiast po zakończeniu mieszania na mieszadle magnetycznym.

Tab. 5.8. Wpływ usuwania rozpuszczonego węgla organicznego na zawartość azotanów w próbkach. Porównano masę azotanów w próbce po zakończeniu mieszania (m_i) do masy azotanów przed rozpoczęciem mieszania (m_o).

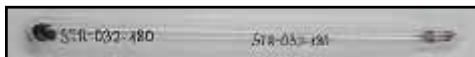
Lp.	m_i/m_o
1	0,97
2	0,98
3	0,98
4	0,99
5	0,98
Wartość średnia	$0,98 \pm 0,02$

Po wytrąceniu z próbek zakłócających jonów SO_4^{2-} i PO_4^{3-} oraz rozpuszczonego węgla organicznego roztwory z azotanami przelewano do 60-mililitrowych szklanych krystalizatorów i zamrażano w lodówce. Jeżeli konieczne jest szybkie zestalenie prób, można to zrobić, zanurzając krystalizatory w ciekłym azocie. Krystalizatory z zamrożonymi próbkami roztworów wstawiono następnie do liofilizatora. Podobnie jak przy procedurze przygotowania prób do pomiaru składu izotopowego azotu, krystalizatory szczelnie przykrywano folią parafilmową, w której wykonywano igłą kilkanaście otworów, aby umożliwić sublimację lodu. Proces liofilizacji trwał około 6–8 godzin, w zależności od objętości próbki i ustawionych warunków pracy urządzenia (temperatura podgrzewania próbek w liofilizatorze zwykle wynosiła 50°C). Należy zaznaczyć, że niewskazane jest zbyt szybkie podgrzewanie naczyń. Może to prowadzić do roztopienia próbek i

odpompowywania azotanów z krystalizatora przez pompę rotacyjną. Liofilizację rozpoczynano przy temperaturze podgrzewania naczynia $t=20^{\circ}\text{C}$ i podwyższano ją co 15 minut o 5°C , aż do wartości 50°C .

Ze względu na stosunkowo dużą powierzchnię, na której w trakcie liofilizacji osadzają się w krystalizatorze azotany, przeprowadzano drugą liofilizację – w naczyniach o mniejszej objętości (szklanych szalkach Petriego o średnicy około 3 cm i ściankach o wysokości około 1 cm). Do krystalizatorów wprowadzano 3 mL wody dejonizowanej. Aby ułatwić rozpuszczanie azotanów, wodę lekko podgrzewano. Zagęszczone roztwory z NO_3^- wlewano do szalek, które wkładano do lodówki w celu zamrożenia. Następnie naczynia szczelnie owijano kawałkami folii parafilmowej, dziurkując je z wierzchu igłą. Po liofilizacji oddzielano proszek (AgNO_3) od szalek. Minimalizacja strat AgNO_3 jest szczególnie ważna w kontekście maksymalizacji całkowitej wydajności procesu preparatyki azotanów. Przy stosunkowo niskiej masie próbki AgNO_3 , każda jego ilość pozostawiona w naczyniu znacznie wpływa na wydajność konwersji $\text{AgNO}_3 \rightarrow \text{CO}_2$.

AgNO_3 uzyskany w procesie liofilizacji przesypywano do kwarcowych rurek reakcyjnych. Następnie dodawano po około 8 mg sproszkowanego, czystego spektrograficznie grafitu (Fluka). Rurki odpompowywano i zatapiano. Próbkę w rurkach spalano w piecu zaprogramowanym do temperatury 850°C przy maksymalnej prędkości nagrzewania, po czym następowało powolne studzenie do temperatury pokojowej przy zamkniętych drzwiach pieca. Po schłodzeniu otrzymany w ten sposób gaz (CO_2) mierzono na spektrometrze mas. Przed pomiarem CO_2 oczyszczano kriogenicznie w układzie próżniowym.



Rys. 5.6. Zatopiona kwarcowa rurka z mieszaniną zliofilizowanej próbki i sproszkowanego grafitu (po lewej stronie).

W celu określenia wydajności konwersji tlenu azotanowego do tlenu w CO_2 sporządzono roztwór KNO_3 , rozpuszczając 0,3 mmola azotanu w 1 litrze wody dejonizowanej i poddając otrzymany roztwór całej procedurze analitycznej aż do otrzymania CO_2 . Wykonano siedem konwersji. Dla każdej próbki zmierzono objętość uzyskanego CO_2 i obliczono całkowitą wydajność konwersji tlenu azotanowego do tlenu dwutlenkowego. Wyniki obliczeń zawiera tabela 5.9.

Tab. 5.9. Całkowita wydajność konwersji $\text{O}(\text{NO}_3^-)$ do $\text{O}(\text{CO}_2)$.

Lp.	Wydajność konwersji [%]
1	90,1
2	89,4
3	90,5
4	89,0
5	89,7
6	89,8
7	91,0
Wartość średnia	$89,9 \pm 1,4$

Wyznaczona wydajność konwersji tlenu azotanowego do tlenu dwutlenkowego jest niższa o ok. 2,5% od wydajności konwersji azotu azotanowego do azotu cząsteczkowego. Przyczyn niższej wydajności należy dopatrywać się w dużo bardziej złożonej procedurze analitycznej dla tlenu azotanowego w porównaniu z azotem azotanowym. Pewne straty azotanów mogą wystąpić podczas usuwania z próbki interferujących izotopowo jonów siarczanowych i fosforanowych, czy też rozpuszczonego węgla organicznego. Straty występują również przy przenoszeniu zliofilizowanych azotanów z krystalizatora do szalki Petriego i z szalki do rurki kwarcowej. Z analizy składu izotopowego standardu wynika jednak (Rozdz. 5.1.4), że wydajność konwersji $O(NO_3^-)$ do $O(CO_2)$ mniejsza od 100% nie wpływa znacząco na skład izotopowy tlenu w azotanach.

5.1.4. Pomiar składu izotopowego N_2 i CO_2 na spektrometrze mas

Uzyskane w przedstawionej powyżej procedurze preparacyjnej gazy (N_2 i CO_2) poddawane były analizie ich składu izotopowego z wykorzystaniem spektrometrii mas.

5.1.4.1. Pomiar składu izotopowego azotu

Do pomiaru składu izotopowego azotu w azotanach ($\delta^{15}N$) wykorzystano spektrometr MAT 251 (Finnigan MAT) (Rys. 5.7), wyposażony w kolektory umożliwiające jednoczesną rejestrację wiązek jonowych, odpowiadających masom cząsteczkowym 28 i 29. Pomiar składu izotopowego w spektrometrze jest względny i odbywa się w odniesieniu do standardu roboczego, którym jest azot (N_2). Przy wyznaczaniu wartości $\delta^{15}N$ mierzone są w spektrometrze mas dwa prądy jonowe I_{28} i I_{29} , odpowiadające masom 28 i 29, czyli odpowiednio molekułom $^{14}N^{14}N$ i $^{14}N^{15}N$. Abundancje izotopów azotu ^{14}N i ^{15}N na Ziemi wynoszą odpowiednio 99,634% i 0,366% (Junk i Svec, 1958). Na podstawie wartości prądów I_{28} i I_{29} wyznaczany jest stosunek izotopowy R:

$$R = \frac{I_{29}}{I_{28}} \quad (5.3)$$



Rys. 5.7. Spektrometr mas MAT 251 stosowany w niniejszej pracy do pomiaru $\delta^{15}N$ i $\delta^{18}O$ w azotanach.

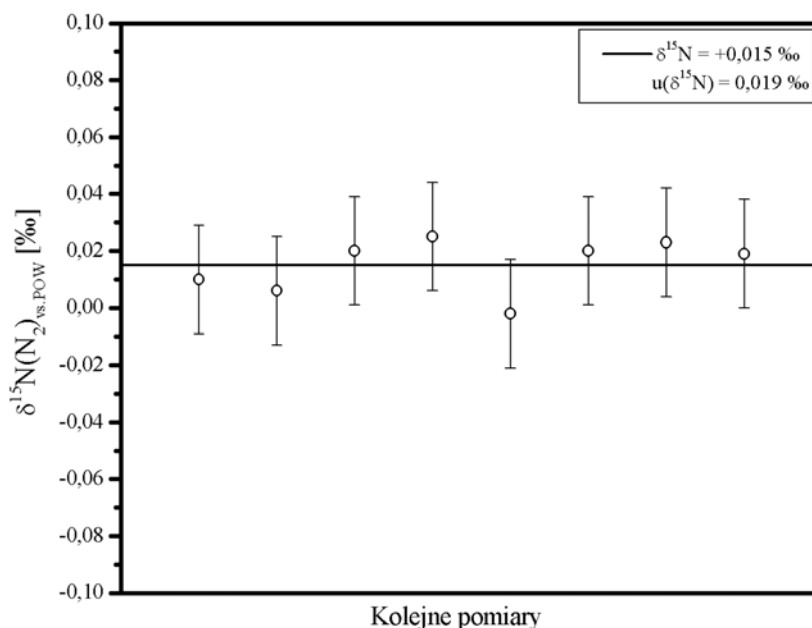
Przygotowanie standardu do pomiaru składu izotopowego azotu cząsteczkowego

Jako standard izotopowy przy pomiarze składu izotopowego azotu cząsteczkowego N_2 stosuje się azot atmosferyczny. Podstawowym krokiem przy preparatyce takiego standardu jest usunięcie z próbki powietrza tlenu.

Do dużego mosiężnego naczynia o objętości około 35 litrów pobrano próbę powietrza. Powietrze było wstępnie osuszane na nadchloranie magnezu $Mg(ClO_4)_2$. Początkowe ciśnienie gazu wewnątrz naczynia wynosiło 973 hPa. Do rurki kwarcowej przeznaczonej na standard wsypano 2 g miedzi (Riedel-de Haën) i 0,5 g tlenku wapnia (II) (Merck). CaO dodaje się, aby zaabsorbować ewentualne resztki wilgoci w próbce. Następnie rurka kwarcowa była podłączana do próżniowej linii preparacyjnej, do której podłączono również zbiornik z powietrzem. Po odpompowaniu układu do rurki kwarcowej wprowadzano powietrze ze zbiornika. Następnie rurkę zatapiano i przez około minutę energicznie wytrząsano, aby uzyskać równomierne rozłożenie składników wewnątrz próbki. Rurkę umieszczano w piecu, ogrzewano w temperaturze $700^\circ C$ przez 2 godziny, aby przereagował cały tlen z powietrza, i pozostawiono do schłodzenia. Gaz pozostały w rurce reakcyjnej zawiera N_2 , Ar oraz inne gazy szlachetne obecne w powietrzu.

Badanie powtarzalności składu izotopowego standardu azotowego

W celu zbadania powtarzalności procedury przygotowywania izotopowego standardu azotowego sporządzono 9 standardów. Jeden z nich wprowadzono do spektrometru po stronie standardu i względem niego zmierzono skład izotopowy pozostałych próbek. Wyniki pomiarów przedstawiono na rysunku 5.8.

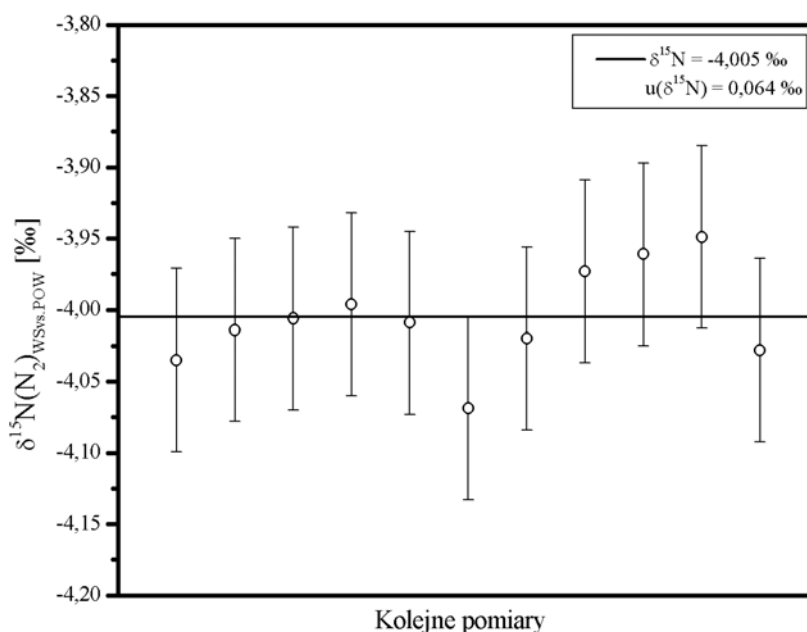


Rys. 5.8. Powtarzalność składu izotopowego przygotowanego standardu azotowego (N_2). Na wykresie zaznaczono wartość średnią (linia prosta) i odchylenie standardowe pojedynczego pomiaru.

Z rysunku 5.8 wynika, że przygotowywane w opisany powyżej sposób próbki azotu atmosferycznego (N_2) mogą służyć jako standardy pierwotne do kalibracji standardu wtórnego (roboczego). W celach kontrolnych, procedurę przygotowania standardu izotopowego powtarzano co pewien czas. Nie stwierdzono znaczących rozbieżności w mierzonym składzie izotopowym standardu.

Kalibracja standardu roboczego do pomiaru składu izotopowego azotu

Jako standard roboczy (WS) wykorzystano czysty (99,999%) azot z butli (Messer), który pobrano do szczelnego 5-litrowego szklanego naczynia pozwalającego na wygodne podłączanie i wprowadzanie gazu do spektrometru mas. Kalibrację standardu roboczego przeprowadzano przed każdą serią pomiarową dużej partii próbek – w sumie było ich 11. Rysunek 5.9 przedstawia wyniki pomiarów kalibracyjnych.



Rys. 5.9. Wyniki kalibracji standardu roboczego do pomiaru składu izotopowego azotu w azotanach. Na wykresie zaznaczono wartość średnią (linia prosta) i odchylenie standardowe pojedynczego pomiaru.

Wpływ procedury redukcji azotanów do N_2 na mierzony skład izotopowy azotu

Aby sprawdzić, czy wdrożona procedura wyznaczania składu izotopowego azotu w azotanach nie wprowadza frakcjonowania izotopowego, sporządzono roztwór azotanów ze standardu azotanowego o znanym składzie izotopowym azotu (IAEA-NO-3), dla którego $\delta^{15}N_{vs. POW} = +4,7 ‰$, z odchyleniem standardowym $SD = 0,2 ‰$ (IAEA, 2002; 2004). Wykonano 7 pomiarów, wyniki przedstawia tabela 5.10. Średnia z otrzymanych wyników nie odbiega w granicach obliczonych niepewności od wartości podanej w katalogu, co świadczy o poprawności stosowanej procedury. Niepewność pojedynczego pomiaru $\delta^{15}N$ uzyskaną w tym eksperymencie można uznać jako miarę powtarzalności pomiaru składu izotopowego azotu w azotanach ($0,22 ‰$ zaokrąglone do $0,3 ‰$).

Tab. 5.10. Pomiar składu izotopowego azotu w standardzie azotanowym IAEA–NO–3 metodą opartą o redukcję azotanu do azotu cząsteczkowego.

Lp.	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]
1	+5,02
2	+4,96
3	+4,81
4	+5,00
5	+4,77
6	+4,78
7	+4,97
Wartość średnia	+4,90 ± 0,22

5.1.4.2. Pomiar składu izotopowego tlenu

Pomiaru składu izotopowego tlenu w azotanach prowadzono z wykorzystaniem spektrometru MAT 251. Przy wyznaczaniu wartości $\delta^{18}\text{O}$ dla gazu, którym jest CO_2 , w spektrometrze mas mierzone są trzy prądy jonowe odpowiadające masom 44, 45 i 46. Z prądami tymi związane są molekuly izotopowe dwutlenku węgla, odpowiednio: $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (masa 44), $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (masa 45) i $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ (masa 46).

Standard roboczy do pomiaru składu izotopowego dwutlenku węgla

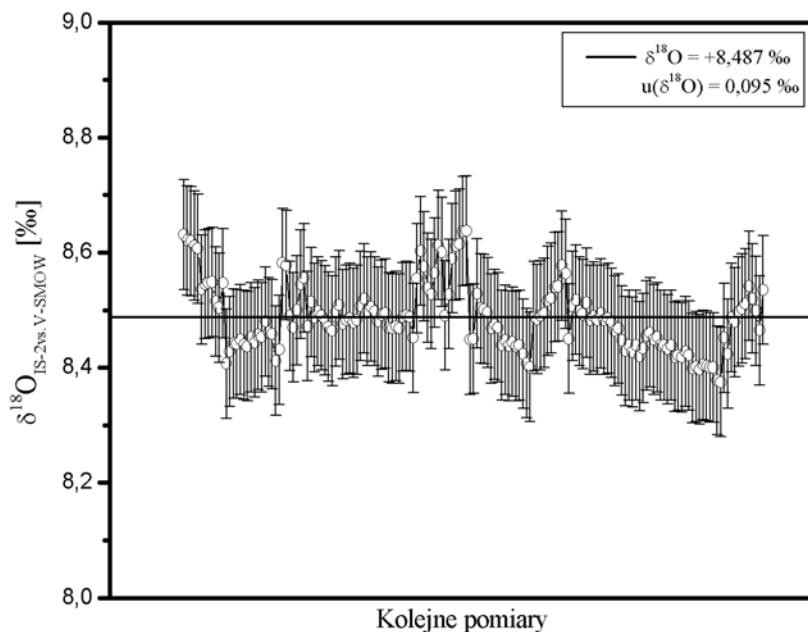
Jako standard roboczy (WS) wykorzystano stosowany z Zespole Fizyki Środowiska do bieżących pomiarów standard izotopowy CO_2 . Został on skalibrowany względem powszechnie stosowanego standardu V–PDB ($\delta^{18}\text{O}_{\text{WSvs.PDB}} = -30,69 \pm 0,10\text{‰}$). Mierzone wartości $\delta^{18}\text{O}$ azotanów podaje się najczęściej względem wzorca V–SMOW, dla którego zakłada się, że $\delta^{18}\text{O} = 0\text{‰}$. Przeliczenie wartości $\delta^{18}\text{O}$ pomiędzy skalami V–PDB i V–SMOW odbywa się za pomocą równania 5.4, uwzględniając fakt, że $\delta^{18}\text{O}_{\text{V-PDB vs.V-SMOW}} = +30,92\text{‰}$ (Coplen, 1995; Coplen, 1996):

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{vs.V-SMOW}} = \delta^{18}\text{O}_{\text{vs.V-PDB}} + \delta^{18}\text{O}_{\text{V-PDBvs.V-SMOW}} + \frac{\delta^{18}\text{O}_{\text{vs.V-PDB}} \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{V-PDBvs.V-SMOW}}}{1000} \quad (5.4)$$

Dla kontroli stabilności pracy spektrometru mas przed każdą serią pomiarową mierzono kilka razy skład izotopowy przechowywanego w laboratorium w butli CO_2 (oznaczanego jako IS–2). Wyniki pomiarów przedstawia rysunek 5.10.

Wpływ procedury konwersji $\text{O}(\text{NO}_3^-)$ do $\text{O}(\text{CO}_2)$ na mierzony skład izotopowy tlenu

Aby sprawdzić, czy wdrożona procedura wyznaczania składu izotopowego tlenu w azotanach nie wprowadza frakcjonowania izotopowego, sporządzono roztwór ze standardu azotanowego o znanym składzie izotopowym tlenu (IAEA–NO–3). Skład izotopowy tego standardu według różnych pomiarów mieści się w



Rys. 5.10. Stabilność pracy spektrometru mas MAT 251, wykorzystywanego do pomiaru składu izotopowego tlenu w azotanach. Dane przedstawione na rysunku obejmują okres od 2005 do 2007 roku

zakresie od +21 do +25‰ (Révész i Böhlke, 2002). Według katalogu IAEA wartość $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ wynosi $+25,6 \pm 0,4$ ‰ (vs.V–SMOW) (IAEA, 2004).

Przeprowadzono 7 pomiarów standardu IAEA–NO–3. Wyniki przedstawia tabela 5.11. Średnia wartość $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ nie odbiega w granicach obliczonych niepewności od wartości podawanych w publikacjach, co świadczy o poprawności stosowanej procedury. Pomiary składu izotopowego standardu IAEA–NO–3 można potraktować również jako określenie powtarzalności pomiaru składu izotopowego tlenu w azotanach.

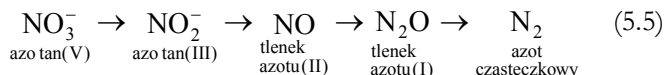
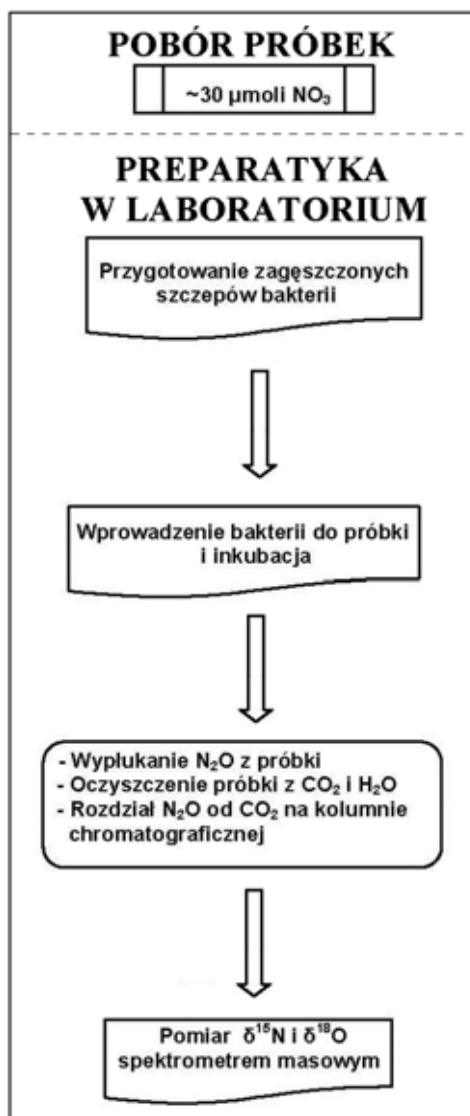
Tab. 5.11. Pomiar składu izotopowego tlenu w standardzie azotanowym IAEA–NO–3 metodą z konwersją do CO_2 .

Lp.	$\delta^{18}\text{O}_{\text{vs.V-SMOW}}$ [‰]
1	+22,9
2	+23,0
3	+22,5
4	+23,5
5	+23,1
6	+23,0
7	+22,8
Wartość średnia	$+23,0 \pm 0,6$

5.2. Denitryfikacyjna metoda wyznaczania składu izotopowego azotanów

Metoda denitryfikacyjna opiera się na analizie izotopowej podtlenku azotu N_2O wytwarzanego z azotanów rozpuszczonych w wodzie przez pewne gatunki bakterii denitryfikacyjnych. Charakterystyczną cechą tego typu bakterii jest brak enzymu umożliwiającego dalszą redukcję N_2O do azotu cząsteczkowego N_2 . Zaletą metody bakteryjnej jest możliwość jednoczesnego określenia składu zarówno azotu ($\delta^{15}N$), jak i tlenu ($\delta^{18}O$) w azotanach.

Opisane wcześniej klasyczne metody analizy izotopowej azotanów wymagają wielkości próby rzędu kilkuset μ moli. W metodzie bakteryjnej wystarcza kilka do kilkunastu μ moli NO_3^- , a w przypadku pomiarów przeprowadzanych w spektrometrach ze stałym przepływem (CF-IRMS) nawet kilkadziesiąt nmoli NO_3^- . Metodę bakteryjną cechuje również mniejsza czaso- i pracochłonność. Przy niskich stężeniach NO_3^- w wodzie (poniżej 1 mg/L) pełna analiza klasyczna wymaga pobrania nawet kilkunastu litrów wody. Pełny proces denitryfikacji azotanów obejmuje następujące etapy:



Aby organizm był w stanie przeprowadzać każdą z wymienionych reakcji, musi posiadać odpowiedni enzym. W przypadku niektórych gatunków bakterii ścieżka denitryfikacyjna jest niepełna. Dzieje się tak z powodu braku białka–enzymu odpowiedzialnego za dany etap (Zumft, 1997). Zastosowana w niniejszej pracy procedura wykorzystuje występujące naturalnie w przyrodzie bakterie nie posiadające tzw. N_2O –reduktazy. Proces redukcji związków azotu przez te bakterie zatrzymuje się na podtlenku azotu (Greenberg i Becker, 1977). Metodę denitryfikacyjną stosowano już wcześniej do pomiarów stężeń azotanów i przy eksperymentach znacznikowych z użyciem ^{15}N (Christensen i Tiedje, 1988; Højberg i in., 1994). Rysunek 5.11 przedstawia schemat opracowanej procedury analizy składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie metodą denitryfikacyjną.

Rys. 5.11. Schemat zastosowanej procedury wyznaczania składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie w oparciu o ich bakteryjną denitryfikację do N_2O .

W niniejszej pracy, w przeciwieństwie do procedury opublikowanej przez Casciotti i in. (2002), denitryfikacji bakteryjnej poddawano duże 30–mikromolowe próbki azotanów, z których podtlenek azotu, po ekstrakcji i oczyszczeniu na specjalnie zbudowanej chromatograficznej linii preparacyjnej, mierzono spektrometrem mas w systemie off–line.

5.2.1. Określenie minimalnej wielkości próby wody wymaganej do analizy

Ze względu na ograniczoną czułość spektrometru mas należało przyjąć minimalną zawartość azotanów w denitryfikowanej próbce. Minimalną wielkość próbki ustalono na poziomie 30 μ mol azotanów, co przy 100–procentowej denitryfikacji pozwala otrzymać 0,33 mL N_2O w przeliczeniu na warunki normalne. Drugim ograniczeniem była maksymalna objętość próby (roztworu) wynosząca 80 mL. Stąd, przy niskich stężeniach azotanów w wodzie zachodziła konieczność wstępnego zateżenia NO_3^- . W tym celu skorzystano z ewaporatora pozwalającego na szybkie zateżanie roztworów poprzez kontrolowane odparowywanie cieczy.

Aby sprawdzić, czy przyjęty sposób zateżania azotanów nie powoduje strat podczas odparowywania, przeprowadzono odpowiednie eksperymenty laboratoryjne. Sporządzono roztwór KNO_3 , który wprowadzono do ewaporatora. Zmierzono początkowe stężenie NO_3^- i roztwór poddano procesowi częściowego odparowania. Co 20 minut kontrolowano ubytek wody w kolbie i pobierano niewielką ilość wody (10 mL) do wykonania pomiaru aktualnego stężenia NO_3^- . Obliczono również stężenia wynikające z ilości odparowanej wody. Tabela 5.12 zawiera wyniki pomiarów. Po upływie 100 minut uzyskuje się niemal pięciokrotne zateżenie roztworu bez znaczących strat w zawartości azotanów w próbce.

Tab. 5.12. Wyniki testu na zateżanie azotanów rozpuszczonych w wodzie przez odparowywanie. Przyjęte oznaczenia: $(NO_3^-)_{zm.}$, $(NO_3^-)_{teor.}$ – zmierzone i teoretyczne stężenia azotanów w wodzie; V_{r-r} – objętość nieodparowanego roztworu w kolbie; V_t/V_0 – stosunek aktualnej objętości próbki do objętości początkowej; C_t/C_0 – stosunek aktualnego stężenia azotanów w próbce do stężenia początkowego.

Czas odparowywania [min]	$(NO_3^-)_{zm.}$ [mg/L]	$(NO_3^-)_{teor.}$ [mg/L]	V_{r-r} [mL]	V_t/V_0	C_t/C_0
0	14,5	14,5	964	1,00	1,00
20	16,9	15,8	886	0,92	1,17
40	20,0	20,5	681	0,71	1,38
60	24,7	26,0	538	0,56	1,70
80	36,9	36,5	383	0,40	2,54
100	71,1	67,9	206	0,21	4,90

Próby terenowe pobierano do plastikowych szczelnych 1–litrowych butelek, bądź, jeśli stężenie azotanów było niskie, do dużych 10–litrowych kanistrów. Wodę przewożono do laboratorium i przechowywano w zaciemnionym i chłodnym pomieszczeniu, aby zminimalizować ewentualny rozwój flory bakteryjnej, mogącej wpłynąć na zawartość azotanów w wodzie. W przypadku metody bakteryjnej nie wchodzi w grę zatrucie próbek wody w celu konserwacji próbki. Aby oczyścić wodę z drobnych zanieczyszczeń, przepuszczano ją przez filtr poliwęglanowy (Whatman) o średnicy porów 0,2 μ m.

5.2.2. Hodowla kultur bakteryjnych i inkubacja próbki

Kultury bakteryjne hodowano z zakupionego szczepu. Szczep bakterii *Pseudomonas aureofaciens* dostarczany jest od producenta (ATCC) w postaci zliofilizowanego białego proszku, zamkniętego w szklanej zatopionej rurce. Ciekłą pożywkę do hodowli bakterii przygotowywano we wcześniej wyjałowionych naczyniach, dodając do bulionu sojowego roztwory: azotanu potasu (w ilości 10 mmoli KNO_3 na litr bulionu) i siarczanu amonu (1 mmol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na litr bulionu), oraz środek zapobiegający spienianiu roztworu, aby nie zwiększać zawartości tlenu w pożywce dla bakterii beztlenowych. Pożywkę rozlewano po 400 mL do półlitrowych zlewek, zakręcano i wyjaławiano. Tak przygotowane pożywki przetrzymywano przed użyciem przez okres nie dłuższy niż jeden miesiąc.

Szczep bakterii dostarczony przez producenta hodowano wstępnie w temperaturze pokojowej (ok. 20°C) na pożywce sojowo–agarowej, również zawierającej KNO_3 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w ilościach takich samych co w ciekłej pożywce. Następnie do szklanej rurki wprowadzano 5 mL ciekłej pożywki i zaszczepiano ją z wyhodowanej wcześniej kolonii startowej. Tak przygotowaną kolonię umieszczano w wirówce i pozostawiano do wzrostu przez całą noc. Następnie, zaszczepiano nią 400–mililitrowe pożywki w półlitrowych zlewkach. Zamknięte szczelnie półlitrowe naczynia z bakteriami (Rys. 5.12) pozostawiono do wzrostu na około 10–14 dni w temperaturze pokojowej, od czasu do czasu mieszając je, aby zapewnić homogeniczność roztworu.



Rys. 5.12. Półlitrowa zlewka z zaszczepionym roztworem bakteryjnym.

Po wyhodowaniu bakterii, w dniu przygotowania próbki kulturę bakteryjną dzielono na 40–mililitrowe porcje. Każdą porcję poddawano odwirowywaniu przez 10 minut z prędkością około 500 rad/s. Z odwirowanego roztworu odlewano tyle cieczy (ok. 36 mL), aby otrzymać 10–krotnie zagęszczony roztwór bakteryjny. Do wysterylizowanej fiołki dodawano 20 ml zagęszczonego roztworu bakteryjnego. Następnie każdą fiołkę szczelnie zamykano aluminiowym kapslem z teflonową uszczelką.

W zagęszczonym roztworze bakteryjnym znajduje się pewna ilość N_2O powstałego w trakcie hodowli szczepu na pożywce azotanowej. Aby go usunąć go i zapewnić bakteriom w próbce korzystne dla nich warunki beztlenowe, każdą zamkniętą fiołkę z roztworem bakteryjnym przepłukiwano helem (o czystości

99,999%) z prędkością około 50 mL/min. przez 0,5 godziny. Gaz wprowadzano do fiolki przez stalową igłę (o średnicy zewnętrznej 1,2 mm i długości 90 mm), wbitą przez teflonową uszczelkę i zanurzoną możliwie głęboko do miejsca tuż przy dnie fiolki (około 1 cm nad dnem). Igła wentylująca (o identycznych parametrach), której koniec znajdował się około 3 cm nad powierzchnią roztworu, wyprowadzała hel bezpośrednio do atmosfery. Obie igły zaopatrzone były w zawory odcinające. Po zakończeniu przepłukiwania roztworu igły ostrożnie wyciągano z fiolki.

Próbkę wody z azotanami wprowadzano do fiolki, używając wysterylizowanej wcześniej w autoklawie strzykawki zaopatrzonej w igłę identyczną jak przy przepłukiwaniu roztworu bakteryjnego. Ponieważ objętość fiolki wynosiła 125 mL, a ciecz z bakteriami zajmowała 20 mL, do każdego naczynia dodawano 80 mL roztworu z azotanami, pozostawiając 25 mL objętości fiolki na fazę nadpowierzchniową. Przed wstrzykiwaniem wody do fiolki wskazane jest przebicie uszczelki dodatkową igłą, aby wewnątrz nie wytworzyło się nadciśnienie, prowadzące do rozszczelnienia fiolki i ucieczki podtlenu azotu.

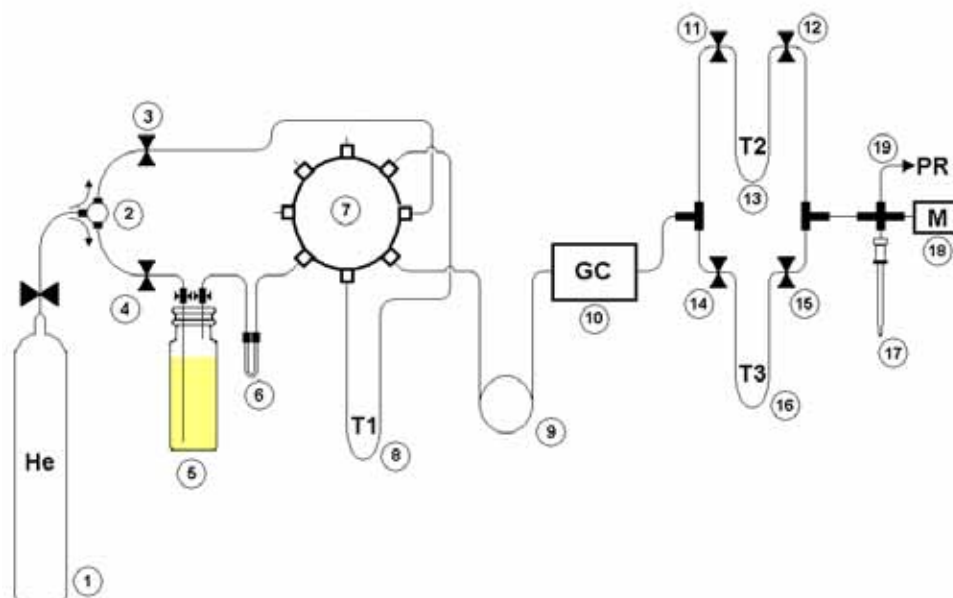
Objętość wstrzykiwanej próby wody z azotanami (ewentualnie rozcieńczonej wodą dejonizowaną nie zawierającą azotanów) wyznacza się tak, aby w próbce znajdowało się 30 $\mu\text{moli NO}_3^-$. Przy założeniu całkowitej konwersji do N_2O daje to 15 μmoli podtlenu azotu. Objętość dodanej próby wody z NO_3^- nie powinna przekraczać pięciokrotnej objętości roztworu bakteryjnego (w niniejszej pracy ten stosunek wynosił 80mL:20mL czyli 4:1). Aby uniemożliwić dopływ światła do próbek w trakcie inkubacji, każdą fiolkę owijano szczelnie folią aluminiową. Do momentu ekstrakcji N_2O fiolki przechowywano odwrócone do góry dnem; zmniejszało to ryzyko ucieczki gazu przez ewentualne nieszczelności w teflonowej uszczelce.

Po zakończeniu inkubacji do każdej próbki dodawano 2mL 10M roztworu wodorotlenku sodu NaOH. Powodowało to podwyższenie pH do wartości rzędu 10–12, co blokowało działalność bakterii. Dodanie NaOH minimalizowało również uwalnianie z próbki rozpuszczonego węgla nieorganicznego (w postaci CO_2), co było istotne w kontekście późniejszego rozdziału N_2O i CO_2 na kolumnie chromatograficznej. Oba tlenki mają identyczne masy cząsteczkowe molekul izotopowych i interferują ze sobą podczas pomiarów na spektrometrze mas. Rozseparowania CO_2 od N_2O metodą chromatograficzną dokonuje się przed analizą składu izotopowego próbek.

Ważnym problemem w denitryfikacyjnej procedurze pomiaru składu izotopowego azotanów jest konieczność ich całkowitej konwersji do N_2O , aby uniknąć frakcjonowania izotopowego. Całkowita konwersja 20 nmoli azotanów przez bakterie *Pseudomonas aureofaciens* w roztworze wodnym następuje już po czasie około 20 minut (Casciotti i in., 2002). Na oznaczany skład izotopowy azotanów nie wpływa również wydłużenie, ponad potrzebny okres, czasu inkubacji. Na podstawie danych literaturowych (Sigman i in., 2001; Casciotti i in., 2002) i własnych doświadczeń w niniejszej pracy jako czas konwersji NO_3^- do N_2O przyjęto 14 dób.

5.2.3. Ekstrakcja podtlenu azotu N_2O z roztworu

Mieszaninę N_2O i CO_2 ekstrahowano z roztworu z kulturami bakteryjnymi, wypłukując ją helem o czystości 99,999%. Schemat zbudowanej linii do ekstrakcji i oczyszczania N_2O przedstawia rysunek 5.13. Zawór sterujący (2) umożliwiał kierowanie helu do próbki, względnie bezpośrednio do zaworu (7). Ośmiodrożny



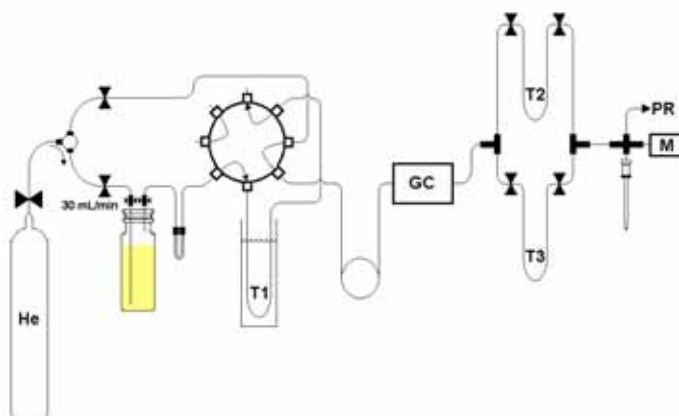
Rys. 5.13. Schemat linii do ekstrakcji i oczyszczania tlenku azotu (I) N_2O z naczyń z kulturami bakterii. Oznaczenia: 1) Butla z heliem (He), 2) Zawór do sterowania kierunkiem przepływu gazu, 3,4) Zawory iglicowe do regulacji natężenia przepływu gazu, 5) Fiolka z roztworem, 6) Szklana rurka z chloranem (VII) magnezu $Mg(ClO_4)_2$, 7) Zawór 8-drożny, 8) Pułapka kriogeniczna (T1), 9) Kolumna chromatograficzna, 10) Chromatograf gazowy (GC), 11,12) Zawory odcinające pułapkę kriogeniczną T2, 13) Pułapka kriogeniczna T2, 14,15) Zawory odcinające pułapkę kriogeniczną T3, 16) Pułapka kriogeniczna T3, 17) Szklana rurka na oczyszczony gaz umieszczona w adapterze (zamiast niej możliwe jest podłączenie w tym miejscu przepływomierza), 18) Próżniomierz (M), 19) Wyjście do pompy rotacyjnej (PR).

zawór firmy Valco może pracować w dwóch ustawieniach, które w dalszym opisie oznaczono jako „tryb ekstrakcji” i „tryb rozdziału”. Wypełnienie kolumny chromatograficznej (9) stanowił Carboxen 1000 (Restek).

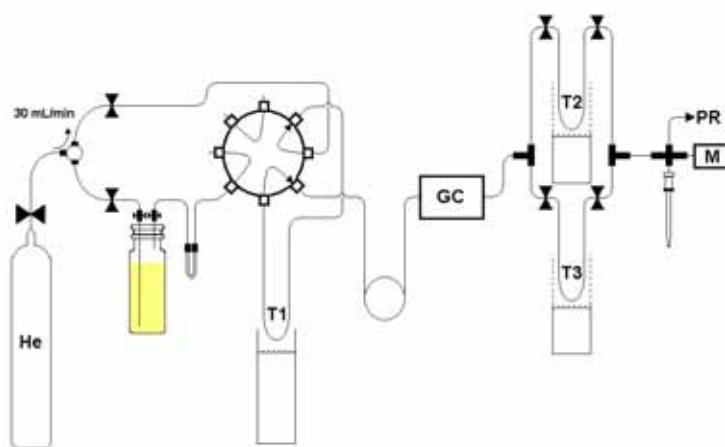
Przed ekstrakcją N_2O linię intensywnie wygrzewano, zwracając szczególną uwagę na miejsca, w których mogła by się ewentualnie gromadzić wilgoć. W trakcie wygrzewania przez linię przepuszczano hel z prędkością około 30 mL/min. Poszczególne elementy linii pozostawiano wypełnione gazem nośnym (helium).

Szczelnie zamkniętą fiolkę z roztworem bakteryjnym przekuwano dwiema igłami o różnych długościach. Dłuższą (o średnicy zewnętrznej 1,2 mm i długości 90 mm) ustawiano tak, aby jej koniec znajdował się około 0,5–1,0 cm ponad dnem butelki. Koniec krótszej igły umieszczono ponad powierzchnią roztworu tak, aby ekstrahowany gaz mógł swobodnie wydostawać się z fiolki. Następnie zawór 8-drożny ustawiany był do pracy w trybie ekstrakcji (Rys. 5.14). Przepływający przez próbkę z natężeniem 30 mL/min hel wypłukiwał rozpuszczone w wodzie gazy. Proces ekstrakcji trwał 0,5 godziny (przy 125-mililitrowej objętości fiolki pozwala to mniej więcej na 7-krotne jej przeplukanie). Wypłukiwany gaz przechodził przez pułapkę chemiczną zawierającą $Mg(ClO_4)_2$, co umożliwiało wylapanie większości wilgoci z próbki. Mieszanina N_2O i CO_2 kondensowała w zanurzonej w ciekłym azocie pułapce kriogenicznej T1, którą stanowiła wygięta U-rurka ze stali nierdzewnej. Pozostałe nieskondensowane gazy, w tym hel (gaz nośny) odprowadzane były do atmosfery.

Po zakończeniu ekstrakcji zawór 8-drożny przełączano do pracy w trybie rozdziału (Rys. 5.15), jednocześnie ustawiając przełącznikiem (2) kierunek przepływu helu tak, aby przechodził on teraz bezpośrednio przez zawór 8-drożny. Do adapteru (17) podłączano przepływomierz, aby przez cały czas



Rys. 5.14. Układ do ekstrakcji N_2O z roztworu bakteriynego, pracujący w trybie ekstrakcji. Wyplukiwany z fiolki gaz jest wstępnie osuszany w pułapce chemicznej zawierającej $Mg(ClO_4)_2$, a następnie kondensuje w pierwszej pułapce kriogenicznej T1 zanurzonej w ciekłym azocie.



Rys. 5.15. Układ do ekstrakcji N_2O z roztworu bakteriynego, pracujący w trybie rozdzielu. Mieszanina gazów wstrzykiwana jest z pułapki kriogenicznej T1 do kolumny chromatograficznej; rozdział N_2O od CO_2 obserwuje się na chromatografie gazowej. Obecność dwóch pułapek kriogenicznych T2 i T3 w oddzielnych torach pozwala na wychwycenie obu tlenków do osobnych szklanych rurek (w niniejszej pracy wylapywano tylko podtlenek azotu). Przed umieszczeniem rurek w adapterze podłącza się do niego przepływomierz w celu kontroli stabilności przepływu gazu przez układ.

kontrolować szybkość przepływu gazu przez linię. W tym momencie gaz przepływał przez układ z prędkością 30 mL/min. Spod pułapki kriogenicznej T1 wyciągano termos z ciekłym azotem. Aby iniekcja mieszaniny gazów do kolumny chromatograficznej miała jak najbardziej impulsowy charakter, U-rurkę T1 ogrzewano intensywnie przez około 1 minutę. Rozdział CO_2 od N_2O obserwowano na ekranie komputera, podłączonego do detektora ciepło-przewodnościowego. W trakcie rozdzielu otwarte były zawory (11) i (12), a zamknięte zawory (14) i (15). W momencie, kiedy w detektorze pojawił się pik N_2O , pod pułapkę kriogeniczną T2 podkładano termos z ciekłym azotem w celu wymrożenia N_2O . Po wychwyceniu N_2O odcinano pułapkę T2,

zamykając zawory (11) i (12). Do adaptera (17) podłączano rurkę szklaną zatopioną na jednym końcu. Pompą rotacyjną odpompowywano najpierw fragment linii do zaworu (12), a potem, po otwarciu zaworu (12), odpompowywano również gazy znad pułapki T2 (nadal zanurzonej w ciekłym azocie). Następnie spod pułapki T2 wyjmowano termos z ciekłym azotem i podkładano pod rurkę szklaną. Po zebraniu do rurki N_2O odpompowywano resztki gazu, po czym rurkę zatapiano i odpowiednio opisywano.

Wydajność procesu denitryfikacji azotanów do podtlenku azotu

O wyznaczeniu wydajności procesu denitryfikacji azotanów do podtlenku azotu można mówić tylko w odniesieniu do atomów azotu, ponieważ atomy tlenu wbudowywane do cząsteczek N_2O pochodzić mogą również z wody. Stopień inkorporacji tlenu nie-azotanowego zależy od gatunku bakterii użytego w eksperymencie (w przedstawionej pracy były to bakterie *Pseudomonas aureofaciens*).

W 125-mililitrowych fiolkach sporządzono po dwie próby roztworów zawierających po 30, 40 i 50 μmol azotanów (KNO_3). Po trwającej 14 dni inkubacji, a potem ekstrakcji i oczyszczeniu próbki otrzymany gaz wprowadzono do linii próżniowej o znanej objętości i mierząc ciśnienie gazu (N_2O), obliczono ilość otrzymanego podtlenku azotu. Stosując odpowiednie przeliczenia, porównano ciśnienie wyprodukowanego przez bakterie gazu z ilością przewidywaną na podstawie znanej pierwotnej ilości azotanów w roztworze inkubacyjnym.

Tab. 5.13. Wydajność denitryfikacji azotanów do podtlenku azotu przez bakterie *Pseudomonas aureofaciens* dla prób zawierających różne ilości azotanów. Oznaczenia: $V_0(N_2O)$ – teoretyczna objętość zajmowana przez N_2O obliczona na podstawie pierwotnej ilości azotanów w roztworze, $V(N_2O)$ – objętość zajmowana przez wyprodukowany przez bakterie N_2O . Wartości objętości znormalizowano do warunków normalnych.

$n(NO_3^-)$ [μmol]	$V_0(N_2O)$ [mL]	$V(N_2O)$ [mL]	$V(N_2O)/V_0(N_2O)$ [%]
30	0,34	0,30	88
40	0,45	0,39	87
50	0,56	0,46	82

Z wyników zamieszczonych w tabeli 5.13 widać, że prowadzona inkubacja nie prowadzi do całkowitej redukcji azotanów do podtlenku azotu. Brak 100-procentowej lub bliskiej jej wydajności redukcji $NO_3^- \rightarrow N_2O$ nie wpływa jednak znacząco na mierzone wartości składu izotopowego azotanów (patrz Rozdz. 5.2.4).

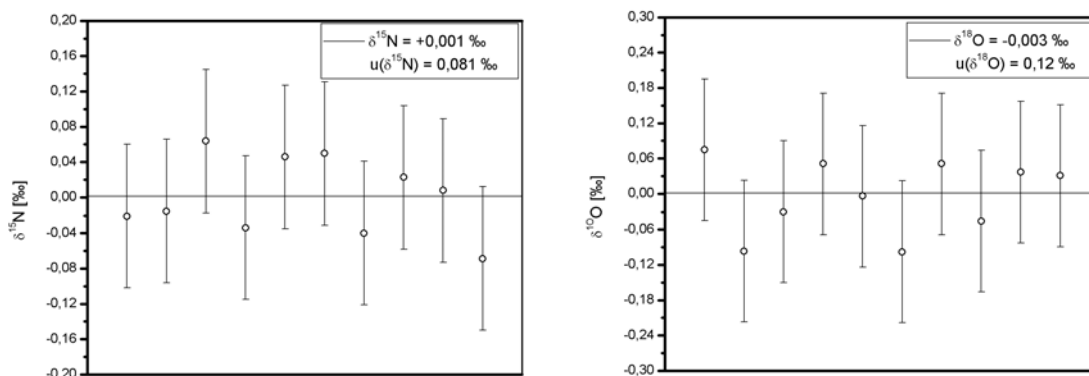
5.2.4. Pomiar składu izotopowego N_2O na spektrometrze mas

Skład izotopowy podtlenku azotu mierzono spektrometrem mas MAT 251. W przypadku wyznaczania składu N_2O , w spektrometrze mas mierzone są trzy prądy jonowe, odpowiadające masom 44, 45 i 46. Z prądami tymi związane są molekuly izotopowe podtlenku azotu, odpowiednio: $^{14}N^{14}N^{16}O$ (masa 44), $^{14}N^{15}N^{16}O$ (masa 45) i $^{14}N^{14}N^{18}O$ (masa 46). Obecność innych molekul izotopowych N_2O zaniedbuje się z uwagi na ich małą

abundancję. Wartości składu izotopowego azotu i tlenu w podtlenku azotu podawano odpowiednio względem azotu atmosferycznego ($\delta^{15}\text{N}_{\text{vs.POW}}$) i standardu V-SMOW ($\delta^{18}\text{O}_{\text{vs.V-SMOW}}$).

Powtarzalność pomiaru składu izotopowego N_2O

W celu zbadania stabilności pracy spektrometru przy pomiarach składu izotopowego N_2O , po obu stronach (próbki i wzorca) wprowadzono ten sam gaz. Do tego celu użyto podtlenku azotu o czystości 99,9% (Linde), dodatkowo oczyszczonego kriogenicznie. Wykonano 10 pomiarów. Wyniki przedstawiono na rysunku 5.16, osobno dla obu izotopów ($\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{18}\text{O}$).



Rys. 5.16. Stabilność pracy spektrometru MAT 251 przy pomiarze składu izotopowego podtlenku azotu: $\delta^{15}\text{N}$ (lewy rysunek) i $\delta^{18}\text{O}$ (prawy rysunek).

Kalibracja wewnętrznego standardu izotopowego N_2O

Jako standard roboczy (WS) do pomiaru składu izotopowego podtlenku azotu zastosowano czysty N_2O (Linde, czystość 99,9%). Standard ten skalibrowano względem azotu atmosferycznego, wykorzystując standard IAEA-NO-3, który poddano opisanej powyżej procedurze denitryfikacyjnej. Przeprowadzono 7 pomiarów składu izotopowego standardu WS.

Tab. 5.14. Kalibracja wewnętrznego standardu izotopowego N_2O .

Lp.	$\delta^{15}\text{N}_{\text{WSvsPOW}}$ [‰]
1	+0,5
2	-0,9
3	+0,1
4	-0,5
5	-0,7
6	-0,8
7	+0,8
Wartość średnia	$-0,2 \pm 1,4$

Wyznaczanie współczynnika poprawkowego „k” uwzględniającego frakcjonowanie izotopowe, wymianę z wodą i efekt „ślepej” próbki przy pomiarach $\delta^{18}\text{O}$ azotanów metodą denitryfikacyjną

Różnice pomiędzy mierzonymi wartościami $\delta^{18}\text{O}$ dla podtlenku azotu, a faktycznym składem izotopowym azotanów rozpuszczonych w wodzie wynikać mogą z kilku powodów: (i) frakcjonowania izotopowego podczas przygotowywania próbki, (ii) wymiany atomów tlenu pomiędzy wodą a związkami azotu, oraz (iii) efektu tzw. ślepej próbki.

Aby wyznaczyć rzeczywistą wartość $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$, konieczne jest ilościowe określenie wpływu wymienionych wyżej efektów na wynik pomiaru $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ metodą denitryfikacyjną. Zmiany składu izotopowego tlenu podczas konwersji azotanów do podtlenku azotu opisuje się dwoma równaniami, określającymi bilans masowy (Równ. 5.6) i izotopowy (Równ. 5.7):

$$m = s + b \quad (5.6)$$

$$\delta^{18}\text{O}_m \cdot m = (\delta^{18}\text{O}_s + \epsilon) \cdot s \cdot (1 - x) + \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot s \cdot x + \delta^{18}\text{O}_b \cdot b \quad (5.7)$$

gdzie: m – końcowa zawartość azotu $\text{N}(\text{N}_2\text{O})$ w próbce,
 s – początkowa zawartość azotu $\text{N}(\text{NO}_3^-)$ w próbce,
 b – zawartość azotu w „ślepej” próbce,
 ϵ – wypadkowy współczynnik frakcjonowania izotopowego, związany z usuwaniem atomów tlenu w trakcie redukcji azotanów do podtlenku azotu,
 x – udział w cząsteczkach N_2O atomów tlenu pochodzących z wymiany z cząsteczkami H_2O w trakcie denitryfikacji,
 $\delta^{18}\text{O}_m$ – zmierzony skład izotopowy tlenu w N_2O (vs.V–SMOW),
 $\delta^{18}\text{O}_s$ – rzeczywisty skład izotopowy tlenu w NO_3^- (vs.V–SMOW),
 $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ – skład izotopowy tlenu w wodzie (vs.V–SMOW),
 $\delta^{18}\text{O}_b$ – skład izotopowy tlenu w NO_3^- w „ślepej” próbce (vs.V–SMOW).

Do problemu ilościowego określenia wpływu frakcjonowania izotopowego, wymiany z wodą i efektu „ślepej” próbki na skład izotopowy tlenu ($\delta^{18}\text{O}$) można podejść w dwojaki sposób, w zależności od tego, czy posiada się dwa czy jeden standard azotanowy o znanym składzie izotopowym tlenu.

SPOSÓB A (2 standardy izotopowe NO_3^-):

Pomiary z dwoma standardami izotopowymi o znanym składzie izotopowym powinno się przeprowadzać dla każdej serii nowych próbek. Wynika to z założenia, że frakcjonowanie izotopowe, wymiana tlenowa i wielkość ślepej próbki pozostają stałe dla wszystkich próbek, przetworzonych z wykorzystaniem danej hodowli bakterii. Nie zmienia się również skład izotopowy wody ($\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$) i ślepej próbki ($\delta^{18}\text{O}_b$).

Równanie bilansu izotopowego można zapisać dla obu mierzonych standardów (1 i 2):

$$\delta^{18}\text{O}_{m_1} \cdot m_1 = (\delta^{18}\text{O}_{s_1} + \epsilon) \cdot s_1 \cdot (1 - x) + \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot s_1 \cdot x + \delta^{18}\text{O}_b \cdot b \quad (5.8)$$

$$\delta^{18}\text{O}_{m_2} \cdot m_2 = (\delta^{18}\text{O}_{s_2} + \epsilon) \cdot s_2 \cdot (1 - x) + \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot s_2 \cdot x + \delta^{18}\text{O}_b \cdot b \quad (5.9)$$

Przekształcając równania 5.8 i 5.9 i odejmując stronami, otrzymuje się:

$$\delta^{18}\text{O}_{s_1} - \delta^{18}\text{O}_{s_2} = \delta^{18}\text{O}_{m_1} \cdot \frac{s_1 + b}{s_1 \cdot (1 - x)} - \delta^{18}\text{O}_{m_2} \cdot \frac{s_2 + b}{s_2 \cdot (1 - x)} \quad (5.10)$$

Jeżeli do każdej fiołki z bakteriami doda się identyczną ilość azotanów, czyli zawsze powstawać będzie taka sama ilość N_2O , to możliwe jest obliczenie całkowitego współczynnika poprawkowego k , dla którego równanie w ogólnej postaci zapisuje się w postaci:

$$k = \frac{s + b}{s \cdot (1 - x)} \quad (5.11)$$

Stosując dwa różne azotanowe standardy izotopowe o znanych (najlepiej różniących się znacznie) wartościach $\delta^{18}\text{O}_s$ i mierząc skład izotopowy $\delta^{18}\text{O}_m$ dwóch wytworzonych z nich próbek N_2O , otrzymuje się prostą formułę na współczynnik poprawkowy k :

$$k = \frac{\delta^{18}\text{O}_{s_1} - \delta^{18}\text{O}_{s_2}}{\delta^{18}\text{O}_{m_1} - \delta^{18}\text{O}_{m_2}} \quad (5.12)$$

gdzie: $\delta^{18}\text{O}_{s_1}, \delta^{18}\text{O}_{s_2}$ – wartości $\delta^{18}\text{O}$ dla zastosowanych azotanowych standardów izotopowych 1 i 2,

$\delta^{18}\text{O}_{m_1}, \delta^{18}\text{O}_{m_2}$ – zmierzone wartości $\delta^{18}\text{O}$ dla próbek N_2O powstałych z azotanowych standardów izotopowych 1 i 2.

Ostatecznie, wartość $\delta^{18}\text{O}$, określająca rzeczywisty skład izotopowy azotanów, „poprawiona” jednocześnie ze względu na frakcjonowanie, wymianę tlenową i efekt ślepej próbki, wyraża się wzorem:

$$\delta^{18}\text{O}_s = \delta^{18}\text{O}_{s,\text{std}} + k \cdot (\delta^{18}\text{O}_m - \delta^{18}\text{O}_{m,\text{std}}) \quad (5.13)$$

gdzie: $\delta^{18}\text{O}_s$ – rzeczywista wartość $\delta^{18}\text{O}$ dla azotanów rozpuszczonych w próbce,

$\delta^{18}\text{O}_{s,\text{std}}$ – rzeczywista wartość $\delta^{18}\text{O}$ dla standardu azotanowego,

$\delta^{18}\text{O}_m$ – zmierzona wartość $\delta^{18}\text{O}$ dla N_2O powstałego z azotanów w próbce,

$\delta^{18}\text{O}_{m,\text{std}}$ – zmierzona wartość $\delta^{18}\text{O}$ dla N_2O powstałego ze standardu azotanowego.

SPOSÓB B (jeden standard izotopowy NO_3^-):

W przypadku braku dwóch niezależnych standardów izotopowych poszczególne efekty wpływające na oznaczany skład izotopowy azotanów muszą być określone osobno. Na ich podstawie oblicza się następnie współczynnik poprawkowy k . Przez cały czas zakłada się, że wielkości m , s , b i ε (z Równ. 5.7) pozostają stałe

dla całego zestawu próbek, a cały „ślepy” N_2O pochodzi z okresu, zanim rozpoczęła się konwersja $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$. Przy takim założeniu $\delta^{18}\text{O}_m$ zależy tylko od składu izotopowego wody ($\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$) i wymiany α .

Aby określić wymianę tlenową α , azotanowy standard izotopowy o znanej wartości $\delta^{18}\text{O}$ rozpuszcza się w co najmniej dwóch próbkach wody o różnych stopniach wzbogacenia w ^{18}O (różnych wartościach $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$). Następnie mierzy się wartości $\delta^{18}\text{O}(\text{N}_2\text{O})$ dla poszczególnych próbek i sporządza wykres zależności $\delta^{18}\text{O}_{\text{N}_2\text{O}} = f(\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}})$. Znając nachylenie prostej dopasowanej do powyższej zależności, wyznacza się wielkość wymiany tlenowej α :

$$\alpha = \frac{m}{s} \cdot \frac{\delta^{18}\text{O}_{\text{N}_2\text{O},1} - \delta^{18}\text{O}_{\text{N}_2\text{O},2}}{\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O},1} - \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O},2}} \quad (5.14)$$

Jeżeli dostępne są więcej niż dwie próbki wody o różnym wzbogaceniu, iloraz różnic wartości δ we wzorze 5.14 zastępuje się wartością nachylenia prostej dopasowanej do wykresu zależności $\delta^{18}\text{O}_{\text{N}_2\text{O}} = f(\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}})$.

Aby określić wielkość ślepej próbki, wykonuje się ekstrakcję N_2O z fiolek z roztworem bakteryjnym, do których nie dodaje się próbki wody zawierającej azotany. W celu zminimalizowania obecności N_2O , związanego ze wstępnym rozwojem kultury bakteryjnej, należy przepłukać roztwór bakteryjny obojętnym gazem (w metodzie opisanej w niniejszej pracy użyto helu, a czas płukania wynosił 0,5 godziny). Wielkość ślepej próbki b związana jest z daną hodowlą wybranego szczepu, dlatego też zakłada się, że dla grupy próbek zaszczipionych z tej samej kolonii bakteryjnej wartość b pozostaje stała i można ją użyć do wyznaczenia poprawki. Natomiast, dla kolejno wytwarzanych nowych kolonii zaleca się przeprowadzanie osobnych pomiarów ślepej próbki.

Znając wszystkie wielkości, tj. początkową i końcową zawartość azotu w próbce (s – azotu azotanowego i m – azotu podtlenkowego), wielkość „ślepej” próbki (b) i wymianę tlenową (α), oblicza się poprawkę k na skład izotopowy tlenu ($\delta^{18}\text{O}$) według równania 5.11.

W niniejszej pracy współczynnik poprawkowy k wyznaczono metodą dwóch standardów. Ponieważ dostępne były trzy standardy izotopowe o znanych wartościach $\delta^{18}\text{O}$ oraz zakupiony KNO_3 , którego skład wyznaczono wcześniej klasycznie (poprzez konwersję $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2$), wyznaczono 6 wartości współczynnika poprawkowego.

Tab. 5.15. Standardy izotopowe wykorzystane do wyznaczenia współczynnika poprawkowego k . Dla trzech pierwszych standardów podano wartości według katalogu IAEA (IAEA, 2004), a dla standardu czwartego (KNO_3) podano wartości wyznaczone metodą z konwersją azotanów do N_2 i CO_2 .

Standard izotopowy	$\delta^{15}\text{N}_{\text{POW}} [\text{‰}]$	$\delta^{18}\text{O}_{\text{V-SMOW}} [\text{‰}]$
IAEA-NO-3	$+4,69 \pm 0,2$	$+25,6 \pm 0,9$
USGS-32	$+180 \pm 1$	$+25,7 \pm 0,4$
USGS-35	$+2,7 \pm 0,2$	$+57,5 \pm 0,6$
KNO_3	$+7,2 \pm 0,3$	$+56,4 \pm 0,6$

Dla poszczególnych par azotanowych standardów izotopowych otrzymano następujące wartości współczynnika poprawkowego k :

Tab. 5.16. Wartości współczynników poprawkowych k wyznaczonych dla poszczególnych par azotanowych standardów izotopowych.

Standardy izotopowe		Współczynnik k
IAEA–NO–3	USGS–32	1,062
IAEA–NO–3	USGS–35	1,022
IAEA–NO–3	KNO ₃	1,111
USGS–32	USGS–35	0,970
USGS–32	KNO ₃	1,048
USGS–35	KNO ₃	0,914
Wartość średnia		1,021 ± 0,142

W przedstawionej pracy zastosowano bakterie *Pseudomonas aureofaciens*, dla których wartości współczynnika wymiany tlenowej z wodą x mieszczą się w przedziale (2,4–8,7%) (Casciotti i in., 2002). Dla tych skrajnych wartości współczynnik poprawkowy obliczony z zależności $k=(s+b)/(s(1-x))$, przy założeniu, że zaniedbuje się „ślepa” próbkę, mieści się w przedziale od 1,025 do 1,095. Wyznaczona w niniejszej pracy wartość współczynnika poprawkowego k odbiega nieznacznie (o 0,004) od przedziału wartości wyznaczonego na podstawie danych literaturowych. Należy jednak pamiętać, że stopień wymiany tlenowej podczas denitryfikacji dla danego gatunku bakterii zależy od wielu czynników zewnętrznych wpływających na sam proces denitryfikacji. W dalszej pracy do wyznaczania składu izotopowego tlenu w azotanach przyjmowano wartość współczynnik $k = 1,021$.

Wpływ zastosowanej procedury analitycznej na mierzony skład izotopowy azotanów

W celu sprawdzenia wpływu zastosowanej procedury denitryfikacyjnej na mierzony skład izotopowy sporządzono po dwie próbki roztworów standardów izotopowych (por. Tab. 5.15). Roztwory te poddano następnie całej procedurze denitryfikacyjnej z udziałem bakterii. Jako wartość referencyjną dla użytego KNO₃ przyjęto skład określony metodą klasyczną, z konwersją do N₂ i CO₂. Wyniki pomiarów przedstawia tabela 5.17.

Tab. 5.17. Skład izotopowy standardów azotanowych wyznaczony metodą denitryfikacyjną. Dla porównania podano katalogowe wartości składu izotopowego, a w przypadku KNO₃ wartości wyznaczone metodą z konwersją do N₂ i CO₂. Obliczono również różnice wartości uzyskanych metodą denitryfikacyjną (δ_d) i katalogowych (δ_k). Podane niepewności dla wartości składów izotopowych uzyskanych metodą denitryfikacyjną (0,7‰ dla $\delta^{15}\text{N}$ i 1,0‰ dla $\delta^{18}\text{O}$) obliczono na podstawie pomiarów przeprowadzonych dla trzech próbek, sporządzonych ze standardu IAEA–NO–3.

Standard	$\delta^{15}\text{N}_{\text{vs. POW}} [\text{‰}]$			$\delta^{18}\text{O}_{\text{vs. V-SMOW}} [\text{‰}]$		
	Wartość katalogowa	Metoda denitryfikacyjna	$\delta_d - \delta_k$	Wartość katalogowa	Metoda denitryfikacyjna	$\delta_d - \delta_k$
IAEA–NO–3	+4,69 ± 0,2	+5,0 ± 0,7	0,31	+25,6 ± 0,9	+24,7 ± 1,0	–0,9
USGS–32	+180 ± 1,0	+182,6 ± 0,7	2,6	+25,7 ± 0,4	+23,1 ± 1,0	–2,6
USGS–35	+2,7 ± 0,2	+2,9 ± 0,7	0,2	+57,5 ± 0,6	+55,9 ± 1,0	–1,6
KNO ₃	+7,2 ± 0,2	+ 8,1 ± 0,7	0,9	+56,4 ± 0,9	+52,4 ± 1,0	–4,0

Z tabeli 5.17 wynika, że wyznaczony metodą denitryfikacyjną skład izotopowy azotanów jest nieznacznie wyższy (w przypadku $\delta^{15}\text{N}$) i niższy (w przypadku $\delta^{18}\text{O}$) niż wartości katalogowe.

5.3. Porównanie zastosowanych metod oznaczania składu izotopowego azotanów

W celu porównania zastosowanych w pracy metod oznaczania składu izotopowego azotanów w oparciu o próby polowe pobrano próby wody z dwóch obiektów: (i) ze studni publicznej położonej przy ulicy Lindego w Krakowie, oraz (ii) z ujęcia GZWP451/8 zlokalizowanego na obszarze Głównego Zbiornika Wód Podziemnych 451 – „Piaski Bogucickie”. Wyniki analiz izotopowych pobranych prób oboma metodami zawiera tabela 5.18.

Tab. 5.18. Porównanie metod oznaczania składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie: klasycznej – opartej na chemicznej konwersji NO_3^- do N_2 i CO_2 oraz denitryfikacyjnej – wykorzystującej bakterie denitryfikujące *Pseudomonas aureofaciens*.

Próbka	$\delta^{15}\text{N}_{\text{vs.POW}} [\text{‰}]$		$\delta^{18}\text{O}_{\text{vs.V-SMOW}} [\text{‰}]$	
	Metoda klasyczna	Metoda denitryfikacyjna	Metoda klasyczna	Metoda denitryfikacyjna
Studnia (ul. Lindego)	$+11,5 \pm 0,3$	$+10,0 \pm 0,7$	$+21,3 \pm 0,6$	$+19,7 \pm 1,0$
GZWP451/8	$+16,9 \pm 0,3$	$+15,7 \pm 0,7$	$+22,5 \pm 0,6$	$+21,7 \pm 1,0$

Z tabeli 5.18 wynika, że obie metody pozwalają na otrzymywanie porównywalnych wyników, aczkolwiek składy izotopowe mierzone metodą denitryfikacyjną okazały się niższe (od 0,8 do 1,6‰) w stosunku do otrzymanych metodą klasyczną. Różnicę tę można przypisać niepełnej konwersji azotanów do podtlenku azotu przez bakterie.

Stworzone zaplecze laboratoryjne oraz opracowane w pracy procedury zostały wykorzystane w pilotażowych pomiarach składu izotopowego azotanów występujących w różnych typach wód. Jako obszar badań wybrano rejon południowej Polski. Pobrane próby reprezentowały następujące typy wód: (i) opady atmosferyczne (Kraków oraz Kasprowy Wierch), (ii) wody powierzchniowe (bezodpływowy zalew poeksploatacyjny Kryspinów I oraz rzeka Wisła w rejonie Krakowa), oraz (iii) zbiorniki wód podziemnych (GZWP 333 i GZWP 451) stanowiące regionalne zaplecze zaopatrzenia w wodę pitną, odpowiednio w rejonie Opola i Krakowa. Przeprowadzone pomiary składu izotopowego azotanów dla zbiorników wód podziemnych stanowiły element prac nad szerszym rozpoznaniem hydrogeologicznym tych ważnych gospodarczo zasobów.

6.1. Zmienność stężenia i składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w opadach

Azot w postaci związków chemicznych, organicznych i nieorganicznych, obecny jest w atmosferze ziemskiej, szczególnie w jej dolnych warstwach, głównie jako azotany, azotyny, amoniak i tlenki azotu będące w formie gazu i aerozolu (por. Rozdz. 2.3). Związki te deponowane są na powierzchni Ziemi w postaci opadu suchego (aerozole) oraz mokrego (deszcz, śnieg). Stężenia azotanów w opadach zbieranych na obszarach kontynentalnych są z reguły wyższe niż w opadach pochodzących z oceanów. Część azotanów z oceanów kontynentalnych może być jednak transportowana nad obszary morskie. Wyraźnie zaznaczającą się sezonowość stężenia azotanów oraz korelację z pochodzeniem napływających mas powietrza stwierdzono np. u wybrzeży chińskich (Zhang i in., 2007). Zmierzona maksymalna wartość strumienia azotanów i azotynów związanego z depozycją moką w rejonie Morza Chińskiego wynosiła w miesiącach letnich ok. 3500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ miesiąc})$.

Istotny wpływ emisji antropogenicznych z odległych źródeł przemysłowych na stężenie NO_3^- i NO_2^- w lokalnym zimowym opadzie śniegu stwierdzono m.in. dla obszaru Karelii i Prowincji Archangielsk (Lozovik i Potapova, 2006). Pomiary lokalnych gazowych emisji związanych z ruchem samochodowym wykazały korelacje między stężeniami CO , NO_x i aerozolu zawieszonego w dolnej troposferze, a natężeniem ruchu samochodowego (Morawska i in., 2002). Stwierdzono też istotną zależność obserwowanych stężeń związków azotu w atmosferze na obszarach zurbanizowanych od stopnia lokalnej antropopresji (Filella i Peñuelas, 2006) oraz korelację ze stężeniem aerozoli (Longley i in., 2005).

6.1.1. Charakterystyka miejsc poboru prób

Do obserwacji zmian sezonowych stężenia i składu izotopowego NO_3^- wybrano dwie lokalizacje (Rys. 6.1.) różniące się znacznie stopniem antropopresji i zanieczyszczenia lokalnej atmosfery: obserwatorium meteorologiczne IMGW na Kasprowym Wierchu w Tatrach (49°14' N, 19°59' E; 1989 m n.p.m.) oraz Kraków (stanowisko na dachu budynku Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH przy ul. Reymonta 19, 50°04' N, 19°55' E; 220 m n.p.m.).



Rys. 6.1. Lokalizacja punktów poboru opadów atmosferycznych na terenie Polski południowej. Strzałki pokazują miejsca próbkowania.

W latach 2004–2006 zbierano na tych stanowiskach próby opadów atmosferycznych. Opady były systematycznie odbierane z deszczomierzy i zlewane do jednego pojemnika, tworząc zintegrowaną próbkę reprezentującą dany miesiąc kalendarzowy. W przypadku opadu śniegu zawartość deszczomierza była każdorazowo roztapiana i zlewana do zbiorczego pojemnika. Przed dalszą preparatyką pojemnik z wodą przechowywano w lodówce w temperaturze ok. 5°C. W zebranych próbach miesięcznych opadów mierzono stężenie azotanów oraz wydzielano jony NO_3^- na żywicy jonowymiennej do pomiaru składu izotopowego. Na Kasprowym Wierchu gromadzenia wody opadowej dokonywał pracownik IMiGW, prowadzący rutynowe obserwacje meteorologiczne. W Krakowie deszczomierz obsługiwano we własnym zakresie. W sumie zostało pobranych i zmierzonych 48 próbek, po 24 próby miesięczne z każdego stanowiska.

W próbach opadów, oprócz azotanów, mogą być obecne są inne związki zawierające azot. Ponieważ zastosowane procedury przygotowania próbek nakierowane były na separację i pomiar składu izotopowego azotanów, w pracy nie zajmowano się innymi związkami azotu występującymi w opadach. Preparatyka chemiczna i pomiary składu izotopowego azotanów w próbach opadów zebranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu zostały wykonane według standardowej procedury, z konwersją NO_3^- do N_2 i CO_2 , opisanej w rozdziale 5.

6.1.2. Prezentacja i dyskusja wyników pomiarów

Stężenie NO_3^-

W okresie prowadzenia obserwacji (od marca 2004 do lutego 2005 oraz od lipca 2005 do czerwca 2006) stężenie azotanów w opadzie atmosferycznym zbieranym w Krakowie wykazywało znaczną zmienność.

Zmierzone stężenia NO_3^- dla tego okresu zawierają się w przedziale od 1,3 do 10,2 mg/L (Tab. 6.1), z zaznaczającymi się maksimami w okresie wiosennym (maj) i jesiennym (październik) oraz minimami w lecie (Rys. 6.2, Tabela 6.2).

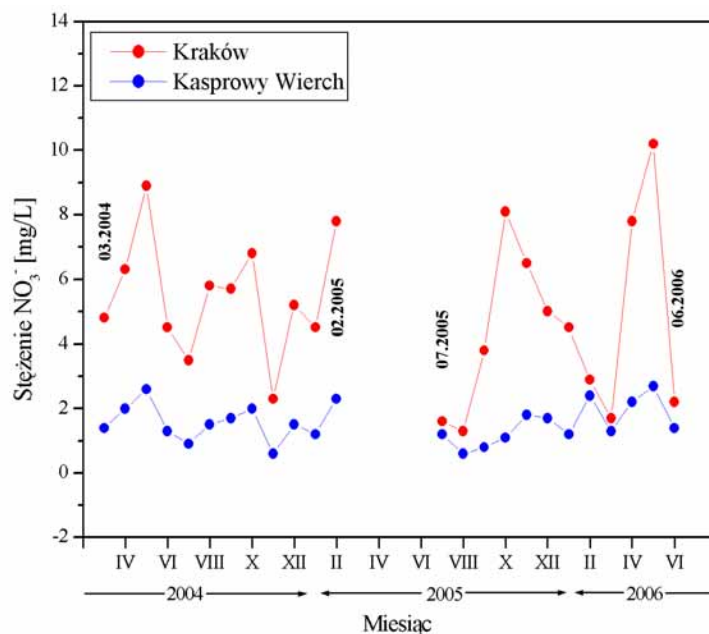
Tab. 6.1. Wielkość opadów, stężenie i skład izotopowy azotanów w opadach zbieranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu w okresach 03.2004–02.2005 i 07.2005–06.2006. Wielkość opadów dotyczy depozycji mokrej, dla jej pomiaru przyjęto niepewność $\pm 1,0\text{mm}$. Jako niepewność względną pomiaru stężenia NO_3^- przyjęto 1,4%. Skład izotopowy azotu ($\delta^{15}\text{N}$) wyrażono względem azotu powietrznego, a tlenu ($\delta^{18}\text{O}$) względem standardu V-SMOW. Jako niepewność pomiaru składu izotopowego azotu i tlenu w azotanach przyjęto odpowiednio $\pm 0,3\text{‰}$ i $\pm 0,6\text{‰}$.

Miesiąc	Kraków				Kasprowy Wierch			
	Opad [mm]	NO_3^- [mg/L]	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$\delta^{18}\text{O}$ [‰]	Opad [mm]	NO_3^- [mg/L]	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$\delta^{18}\text{O}$ [‰]
03.2004	12,3	4,8	+11,6	+21,1	83,7	1,4	+15,1	+34,6
04.2004	34,1	6,3	+10,0	+23,0	67,5	2,0	+6,2	+34,1
05.2004	64,3	8,9	+6,1	+31,9	247,3	2,6	+4,3	+30,3
06.2004	66,4	4,5	+3,2	+31,1	144,3	1,3	+1,2	+34,1
07.2004	68,0	3,5	-2,9	+51,3	377,7	0,9	-4,3	+37,8
08.2004	58,5	5,8	-5,4	+34,1	244,3	1,5	-1,7	+42,3
09.2004	32,8	5,7	+0,3	+30,6	56,3	1,7	-3,4	+41,1
10.2004	42,8	6,8	+2,0	+31,2	79,3	2,0	+3,0	+36,6
11.2004	38,2	2,3	+15,4	+23,5	218,7	0,6	+16,9	+32,4
12.2004	34,9	5,2	+21,7	+24,3	30,9	1,5	+13,4	+30,0
01.2005	32,4	4,5	+16,1	+5,3	177,1	1,2	+19,1	+30,2
02.2005	20,2	7,8	+16,0	+18,5	97,0	2,3	+27,8	+22,4
07.2005	78,4	1,6	-6,3	+49,8	183,2	1,2	-1,9	+28,7
08.2005	58,2	1,3	-3,6	+37,4	290,1	0,6	-0,8	+34,4
09.2005	24,8	3,8	-1,4	+31,7	85,5	0,8	+8,0	+30,7
10.2005	5,8	8,1	+2,1	+29,8	38,0	1,1	+5,8	+25,0
11.2005	30,2	6,5	+1,9	+30,3	74,7	1,8	+9,2	+24,8
12.2005	35,3	5,0	+6,2	+23,9	203,6	1,7	+12,0	+17,1
01.2006	37,8	4,5	+16,4	+22,3	39,4	1,2	+25,7	+19,2
02.2006	26,2	2,9	+23,9	+15,9	76,5	2,4	+30,3	+14,1
03.2006	32,1	1,7	+15,3	+20,2	100,2	1,3	+14,1	+21,4
04.2006	29,5	7,8	+9,4	+25,4	56,1	2,2	+12,9	+25,2
05.2006	41,8	10,2	+7,5	+34,4	188,2	2,7	+5,2	+22,1
06.2006	59,4	2,2	+0,1	+32,9	30,7	1,4	+1,4	+27,8

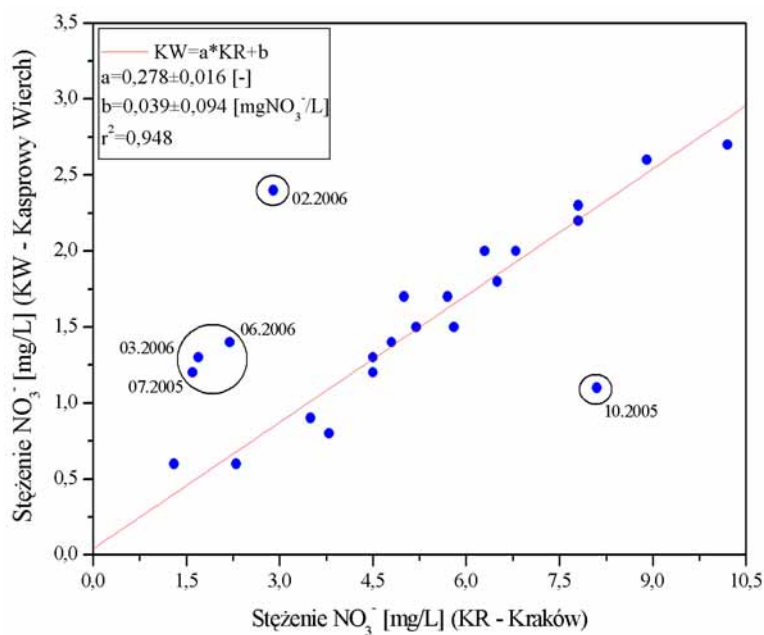
Tab. 6.2. Sezonowa zmienność stężenia i składu izotopowego azotanów w opadach zebranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu. Oprócz wartości dla poszczególnych pór roku wyznaczono również średnie dla całych lat. Średnie stężenie azotanów obliczono jako średnią ważoną ilością opadów, a skład izotopowy – jako średnią ważoną iloczynem wielkości opadów i stężenia azotanów.

	Kraków	Kasprowy Wierch
Stężenie NO_3^- [mg/L] (ważone ilością opadów)		
Wiosna	6,34±3,12	2,23±0,64
Lato	3,30±1,99	1,02±0,40
Jesień	5,24±1,87	1,33±0,65
Zima	4,12±1,99	1,59±0,56
Cały rok	4,75±2,55	1,47±0,69
$\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ [‰] (ważone iloczynem opad*stężenie NO_3^-)		
Wiosna	+6,39±3,03	+4,95±3,12
Lato	-3,46±2,55	-1,91±3,03
Jesień	+7,59±8,69	+10,42±5,08
Zima	+16,58±3,28	+22,59±6,99
Cały rok	+5,84±7,70	+7,55±9,71
$\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ [‰] (ważone iloczynem opad*stężenie NO_3^-)		
Wiosna	+30,59±4,22	+28,06±5,36
Lato	+39,23±9,61	+36,92±5,60
Jesień	+27,67±3,81	+25,33±8,92
Zima	+16,65±7,39	+23,80±6,55
Cały rok	+29,95±9,10	+29,12±7,94

Średnie stężenie NO_3^- dla całego okresu obserwacji wyniosło w Krakowie 4,75 mg/L. Na Kasprowym Wierchu zaobserwowano generalnie niższy poziom stężeń NO_3^- (zakres od 0,6 do 2,7 mg/L), ze słabo zaznaczającą się sezonowością (Rys. 6.2). Średnie stężenie NO_3^- dla całego okresu obserwacji wyniosło 1,47 mg/L.

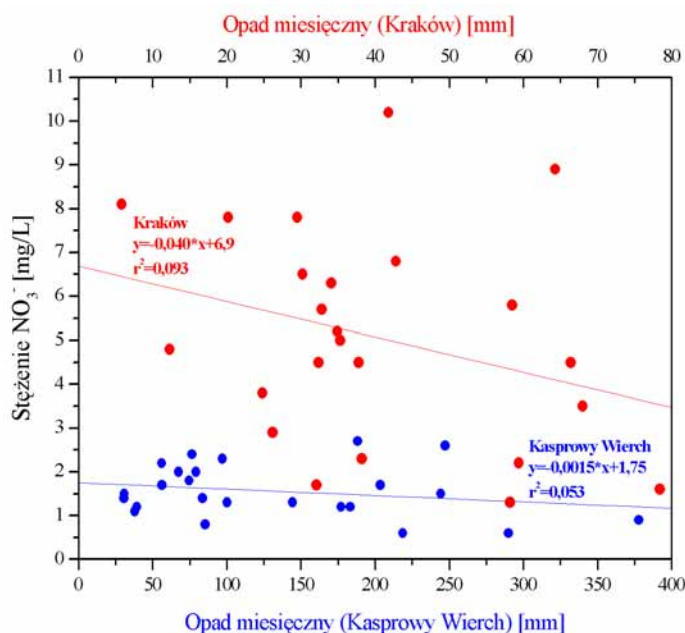


Rys. 6.2. Zmienność stężenia azotanów w opadzie atmosferycznym w Krakowie i na Kasprowym Wierchu.



Rys. 6.3. Korelacja pomiędzy stężeniem azotanów w opadzie atmosferycznym w Krakowie i na Kasprowym Wierchu. Przy obliczaniu współczynników prostej regresji nie uwzględniono punktów znacznie odbiegających od prostej. Dla tych punktów podano miesiące opróbowania.

Zaobserwowano istotną korelację między stężeniami NO_3^- rejestrowanymi na obu stacjach poboru opadów (Rys. 6.3). Dla pięciu miesięcy zaobserwowano istotne odstępstwa od prostej korelacyjnej (lipiec i październik w 2005 oraz luty, marzec i czerwiec w 2006 roku). Przyczyny tych „anomalnych” wartości stężeń są niejasne. Trzy punkty z pięciu odbiegających od prostej regresji reprezentują wartości o najmniejszych różnicach pomiędzy obu stanowiskami (lipiec 2005, marzec 2006 i czerwiec 2006). Nachylenie prostej regresji wskazuje, że w Krakowie stężenie średnio jest ok. 3,6 razy wyższe niż na Kasprowym Wierchu. Silna korelacja między zawartością azotanów w opadach zbieranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu sugeruje obecność procesów kontrolujących stężenie NO_3^- w skali regionalnej nad kontynentem europejskim (patrz dyskusja poniżej). Bliższe wyjaśnienie tych mechanizmów wymagałoby jednak dokładniejszych badań w szerszej skali niż to miało miejsce w ramach niniejszej pracy.



Rys. 6.4. Korelacja pomiędzy wielkością miesięcznych opadów a stężeniem azotanów w próbach opadów w Krakowie i na Kasprowym Wierchu.

Na rysunku 6.4 przedstawiono zależność pomiędzy wielkością miesięcznych opadów a mierzonym w nich stężeniem azotanów. Jak widać z rysunku 6.4, stężenie NO_3^- praktycznie nie zależy od wielkości miesięcznych opadów. Brak korelacji widać szczególnie dla danych reprezentujących Kasprowy Wierch. Sugeruje to, że związki azotu tworzące rozpuszczone azotany znajdują się w nadmiarze w atmosferze. Znacząco niższe i mniej zmienne stężenie azotanów w opadach zbieranych na Kasprowym Wierchu w porównaniu z Krakowem wynikać może z różnicy wysokości obu punktów, a co za tym idzie niższej efektywnej temperatury formowania się opadów oraz z generalnie niższego poziomu związków azotu w atmosferze w rejonie Kasprowego Wierchu.

Znacząco wyższe wartości stężeń azotanów w opadach w Krakowie, ich większa zmienność sezonowa oraz zaznaczająca się słaba ujemna korelacja z wielkością opadu miesięcznego mają najprawdopodobniej swoje źródło w silnym tle związków azotu w lokalnej atmosferze nad Krakowem,

wynikającym głównie z lokalnych emisji antropogenicznych. Nie bez znaczenia jest również bliskość obszarów o intensywnej gospodarce rolnej (nawożenie). Słaba ujemna korelacja z ilością opadów obserwowana dla Krakowa może wynikać ze stopniowego samooczyszczania się dolnej atmosfery w przy bardziej obfitych opadach.

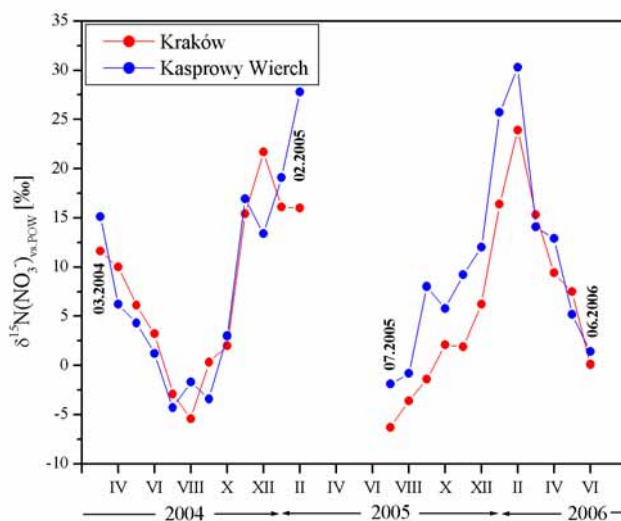
Pomiary stężeń azotanów w wodzie deszczowej wykonywane od ponad 30-tu lat w różnych punktach kuli ziemskiej wykazały dużą zmienność. Na obszarze Europy obserwacje w różnych okresach (1975–1976, 1979–1980) dla Jülich, Ahrensburga, Dueselbach, Hamburga (RFN) i Le Conquest (Bretania, Francja) wykazały średnie stężenia dla poszczególnych pór roku zdecydowanie poniżej 1,0 mg/L, tylko w dwu przypadkach ok. 1,0 mg/L (Freyer, 1991). Dla Pretorii (Republika Południowej Afryki) wartości były niższe, średnia dla wiosny wynosiła 0,65 mg/L, a dla zimy 0,26 mg/L (Freyer, 1991; Heaton i Collet, 1985). Podobne stężenia obserwowane były na Bermudach (Ocean Atlantycki). W 65 próbkach wody (opad deszczu w okresie: styczeń 2000–styczeń 2001) zmierzono wartości w zakresie: 0,09–1,04 mg/L; średnia ważona opadami (SWO) wynosiła 0,31 mg/L dla pory cieplej i 0,40 mg/L dla pory chłodnej (Hastings i Sigman, 2003). Znacznie wyższe stężenia zmierzono w pobliżu Chesapeake Bay (wybrzeże USA w pobliżu Waszyngtonu), gdzie SWO z 60 próbek, z okresu od maja 1993 do grudnia 1994 roku, wynosiła 1,33 mg/L (Russel i inni, 1998).

Wartości stężeń azotanów w opadach obserwowane w ramach niniejszej pracy plasują stanowisko na Kasprowym Wierchu w zakresie stężeń obserwowanych dla Chesapeake Bay, wyraźnie powyżej rejestrowanych dla Europy i Południowej Afryki w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych XX wieku, a także znacznie wyżej niż stężenia zmierzone dla Bermudów (32,27°N, 64,87°W) w 2000 roku (Hastings i Sigman, 2003). Kilkakrotnie wyższe stężenia azotanów rejestrowane w Krakowie w porównaniu z Kasprowym Wierchem, przy zaznaczającej się sezonowości (por. Tab. 6.2.), wskazują niewątpliwie na silne lokalne tło związków azotu związane z emisjami antropogenicznymi.

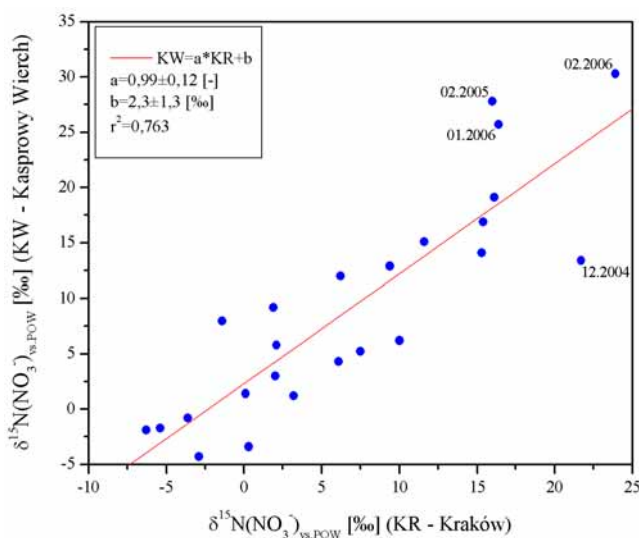
Średnie stężenia azotanów wyliczone dla kolejnych pór roku (Tab. 6.2), które w warunkach klimatycznych Polski determinują średnie temperatury i poziom aktywności wegetacyjnej biosfery, wykazują istotne różnice. W okresie wiosennym (kwiecień–czerwiec) wartości SWO dla Kasprowego Wierchu i Krakowa wyniosły odpowiednio 2,23 mg/L i 6,34 mg/L. Są one ok. 2 razy wyższe niż dla okresu letniego (lipiec–wrzesień, odpowiednio 1,02 mg/L i 3,30 mg/L). Natomiast wartość SWO dla okresu zimowego (styczeń–marzec) w przypadku Kasprowego Wierchu (1,59 mg/L) jest większa niż dla jesieni (październik–grudzień; 1,33 mg/L). Dla Krakowa odpowiednie wartości wynoszą: 4,12 mg/L i 5,24 mg/L. Tego typu sezonową zmienność średniego stężenia azotanów w opadach można interpretować nałożeniem się strumieni NO_3^- generowanych/pochłanianych przez różne „źródła” i „studnie”, których aktywność silnie zależy od pory roku (temperatury, wilgotności, nasłonecznienia). Wiosną dominuje strumień do atmosfery związków azotu pochodzący z gleby od rozkładu związków organicznych nagromadzonych jesienią i zimą, oraz z wysiewanych nawozów sztucznych i naturalnych (obszary upraw rolniczych). Latem intensywność procesów denitryfikacyjnych (denitryfikacja bakteryjna w glebie, reakcje fotochemiczne w atmosferze) jest bardzo duża przy stosunkowo niskim strumieniu antropogenicznym. Jesienią i zimą dominuje przede wszystkim antropogeniczna produkcja azotanów, przy stosunkowo słabej intensywności czynników naturalnych (niskie temperatury, małe nasłonecznienie). Regionalne różnice klimatyczne (niższe temperatury) mogą tłumaczyć wcześniejsze „wygaszenie” naturalnych procesów generacji NO_x w rejonie Kasprowego Wierchu w jesieni, przy stopniowo wzrastającym strumieniu antropogenicznym, głównie związanym z ogrzewaniem w obrębie kotliny Nowotarskiej i w rejonie Zakopanego.

Skład izotopowy azotu ($\delta^{15}\text{N}$) i tlenu ($\delta^{18}\text{O}$) w azotanach rozpuszczonych w opadach

Silna sezonowa zmienność składu izotopowego azotanów w opadach na obu stacjach pomiarowych obserwowana jest zarówno dla azotu, jak i dla tlenu (Tab. 6.1, Tab. 6.2). Wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ zmieniają się dla Krakowa w szerokim zakresie, od -7‰ do $+24\text{‰}$ i podobnie dla Kasprowego Wierchu, od -5‰ do $+31\text{‰}$ (Rys. 6.5). Najniższe wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ są obserwowane dla obu stacji w lecie (lipiec, sierpień), a najwyższe w zimie (styczeń, luty). Podobnie jak w przypadku stężeń NO_3^- występuje istotna korelacja wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ pomiędzy oboma punktami poboru. Przebieg prostej regresji (Rys. 6.6) wskazuje na bardzo zbliżone wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ dla obu punktów pomiarowych, przy nieco wyższych wartościach $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ dla Kasprowego Wierchu rejestrowanych w 2005 i 2006 roku.

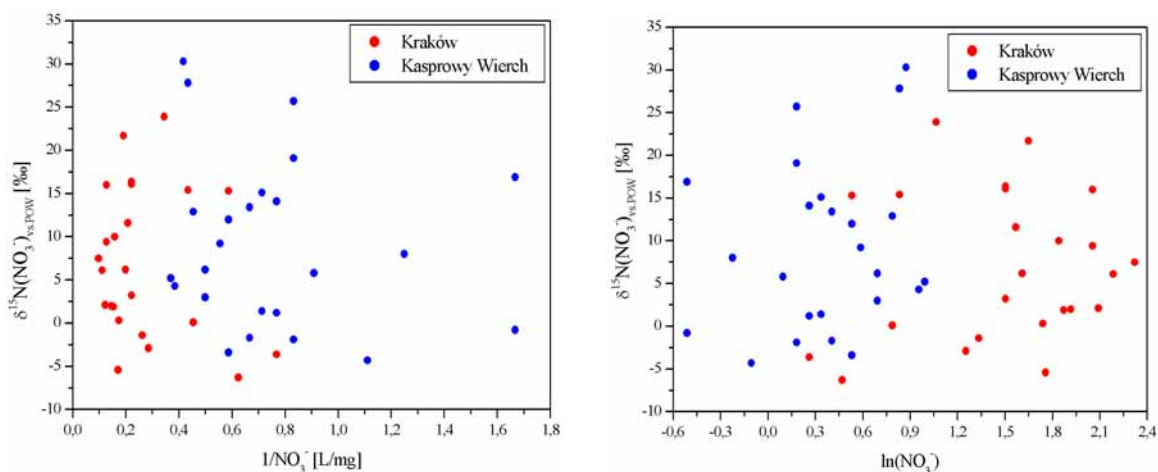


Rys. 6.5. Sezonowe zmiany składu izotopowego azotu $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ w azotanach obecnych w opadzie atmosferycznym.



Rys. 6.6. Korelacja pomiędzy składem izotopowym azotu $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ na Kasprowym Wierchu i w Krakowie. Przy obliczaniu współczynników prostej regresji nie uwzględniono punktów znacznie odbiegających od prostej. Dla tych punktów podano miesiące opróbowania.

Na rysunku 6.7 przedstawiono zależność pomiędzy składem izotopowym azotu azotanowego a odwrotnością stężenia azotanów (lewy rysunek), oraz logarytmem naturalnym stężenia azotanów (prawy rysunek), w opadach atmosferycznych zbieranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu.



Rys. 6.7. Zależność pomiędzy składem izotopowym azotu azotanowego $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$, a stężeniem azotanów w miesięcznych próbach opadów zebranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu. Wykresy sporządzono w dwóch układach współrzędnych: $\delta^{15}\text{N} = f(1/\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{15}\text{N} = f(\ln \text{NO}_3^-)$.

Nieregularny rozkład punktów na wykresie zależności $\delta^{15}\text{N} = f(1/\text{NO}_3^-)$ na rysunku 6.7 wskazuje, że mechanizmem kontrolującym skład izotopowy azotanów nie może być mieszanie azotanów pochodzących z dwóch różnych źródeł. Analogicznie, brak prawidłowości w rozkładzie punktów na wykresie zależności $\delta^{15}\text{N} = f(\ln \text{NO}_3^-)$ sugeruje, że zmienność izotopowa azotu azotanowego obserwowana w opadach na obu stacjach nie może być tłumaczona przez procesy opisywane równaniem Rayleigha (Równ. 4.9).

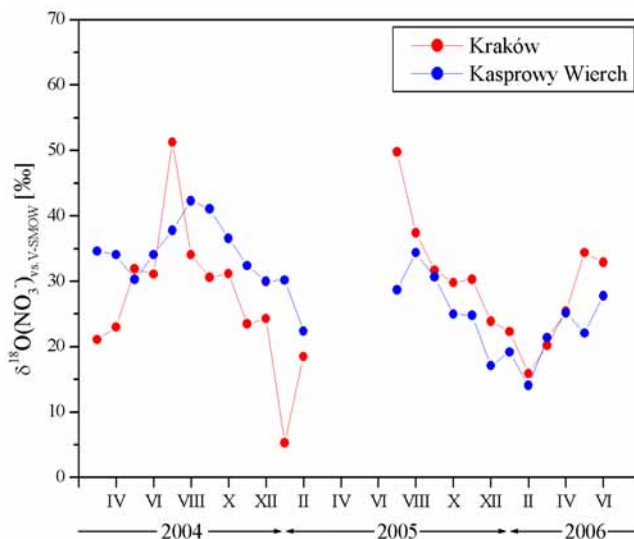
Liczne pomiary składu izotopowego azotu w związkach azotu obecnych w atmosferze ziemskiej wykazały ich bardzo dużą zmienność i silną zależność od warunków lokalnych. W przeciwieństwie do bardzo stabilnego składu izotopowego azotu atmosferycznego, dla azotanów nie można podać jednej, globalnej wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$. Charakterystyczna sezonowa zmienność składu izotopowego azotu w azotanach obecnych w wodzie pochodzącej z opadu atmosferycznego została zaobserwowana po raz pierwszy w Europie Zachodniej. Takí przebieg zmian stwierdzono dla obszaru Niemiec i Bretanii (Francja) (Freyer, 1991), gdzie najbardziej ujemne wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ obserwowano w sezonie letnim (Jülich: $-6,0\text{‰}$ i $-4,9\text{‰}$; Deuselbach: $-4,5\text{‰}$; Le Conquet $-6,5\text{‰}$), podczas gdy wiosną były wyraźnie mniej ujemne (odpowiednio: $-5,0\text{‰}$ i $-2,6\text{‰}$; $-2,2\text{‰}$; $-5,4\text{‰}$), a najwyższe w zimie (odpowiednio: $+0,6\text{‰}$ i $0,0\text{‰}$; $-0,1\text{‰}$; $-1,7\text{‰}$).

Średnie sezonowe składy izotopowe azotanów dla Krakowa i Kasprowego Wierchu, ważone iloczynem wielkości opadów i stężenia NO_3^- , przedstawia Tabela 6.2. Wartości średnie $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ reprezentujące Kasprowy Wierch w okresach klimatycznych: lato, jesień i zima (odpowiednio: $-1,91\text{‰}$, $+10,42\text{‰}$, $+22,59\text{‰}$) wykazują wyraźne systematyczne przesunięcie w stronę wartości bardziej dodatnich w porównaniu z Krakowem (średnie ważne odpowiednio: $-3,46\text{‰}$, $+7,59\text{‰}$, $+16,58\text{‰}$). Przedział zmienności miesięcznych wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ dla Krakowa i Kasprowego Wierchu jest znacznie szerszy niż podawany w

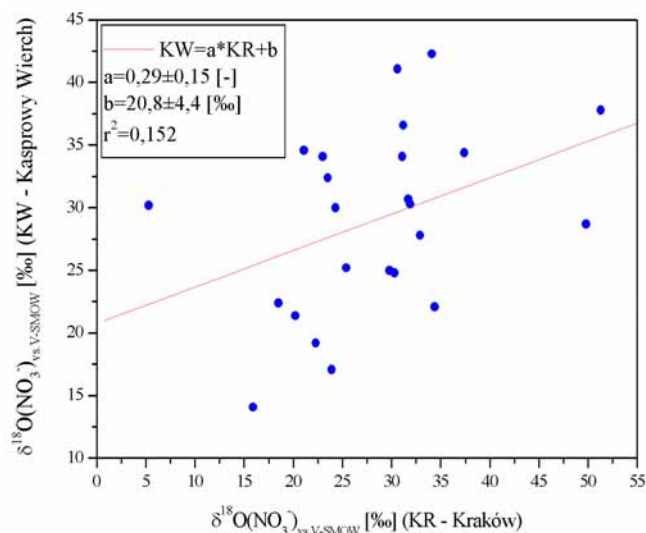
literaturze (Russell i in., 1998). Ujemne wartości średnich ważonych $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ obserwuje się dla obu punktów w okresie lata. Obliczone roczne średnie ważone $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ dla Krakowa (+5,84‰) i Kasprowego Wierchu (+7,55‰) są wyższe niż obserwowane w opadach na Europę Zachodnią w latach 70–tych i 80–tych XX wieku (Russell i in., 1998; Freyer, 1991). Są one równocześnie zbliżone do wartości podawanych dla organicznych związków azotu (Russell i in., 1998).

Bardzo wyraźna sezonowość, jak i wysoki poziom wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ obserwowane dla Krakowa i Kasprowego Wierchu może wynikać z położenia obu stacji w głębi kontynentu i nałożenia się wpływu kontynentalnych źródeł azotanów związanych z rolnictwem w okresie letnim i źródeł antropogenicznych (spalanie paliw kopalnych, transport) w okresie jesienno–zimowym. Obserwowana sezonowość składu izotopowego azotu w azotanach i silne wzbogacenie azotanów w ^{15}N w okresie zimowym może być również powodowana sezonowymi różnicami w intensywności reakcji chemicznych w atmosferze, formujących ostateczną postać azotanów występujących w opadach. Ilościowy opis tych procesów wymagałby jednak specjalistycznych badań, leżących poza zakresem tematycznym niniejszej pracy.

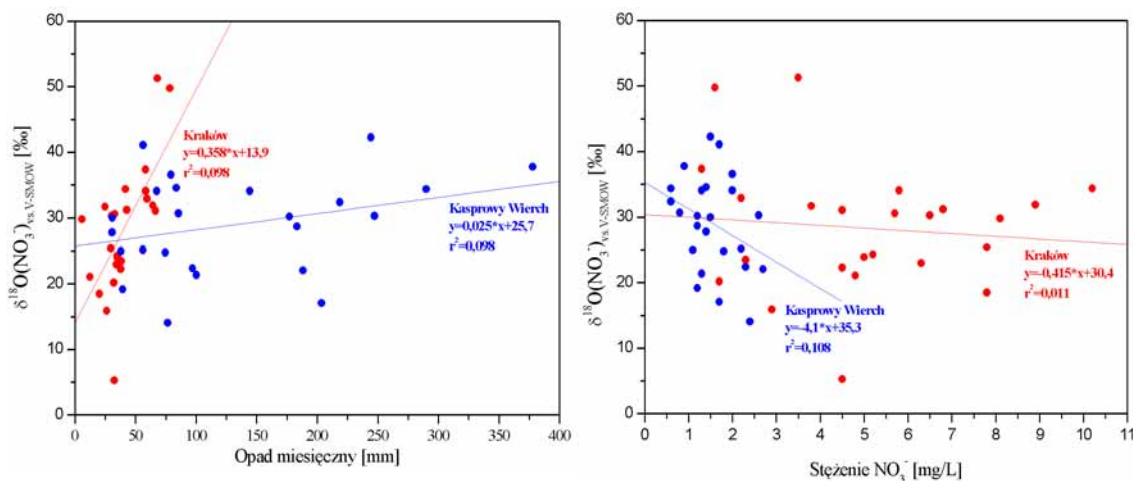
Wyraźne sezonowe fluktuacje zaobserwowano również dla składu izotopowego tlenu ($\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$) w azotanach rozpuszczonych w opadach (Rys.6.8). Zawierają się one w granicach od +5‰ do +51‰ dla Krakowa i od +14‰ do +42‰ dla Kasprowego Wierchu. Maksima $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ występują w miesiącach letnich (lipiec, sierpień), natomiast minima w miesiącach zimowych (styczeń, luty). Nie obserwuje się tak wyraźnej korelacji między wartościami $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ mierzonymi na Kasprowym Wierchu i w Krakowie jak to miało miejsce w przypadku $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ (Rys. 6.9). Nie stwierdzono również związku pomiędzy składem izotopowym tlenu azotanowego $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$, a wielkością miesięcznego opadu czy stężeniem azotanów (Rys. 6.10).



Rys. 6.8. Sezonowe zmiany składu izotopowego tlenu $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ w azotanach obecnych w opadzie atmosferycznym zbieranym w Krakowie i na Kasprowym Wierchu.



Rys. 6.9. Korelacja pomiędzy składem izotopowym tlenu $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ na Kasprowym Wierchu i w Krakowie.

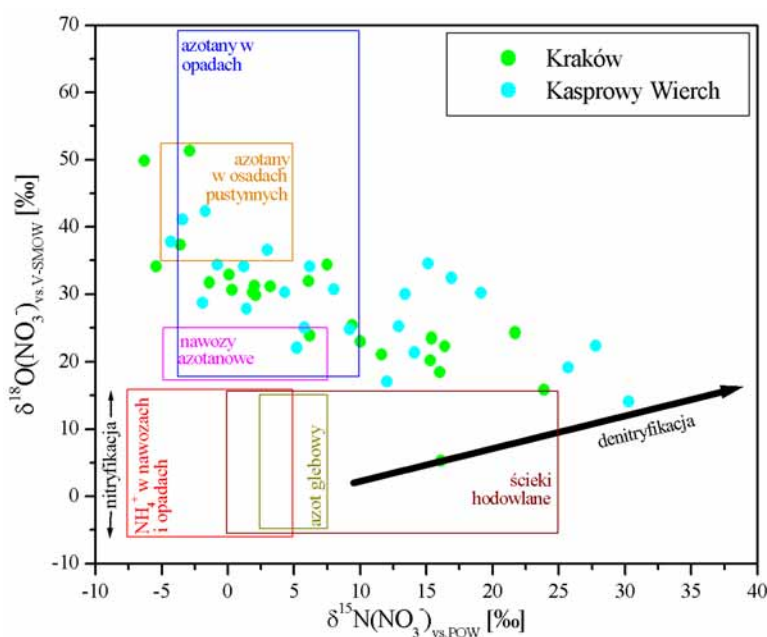


Rys. 6.10. Zależność składu izotopowego tlenu azotanowego $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ od wielkości opadu miesięcznego i stężenia azotanów w opadach zebranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu.

Zmienność składu izotopowego tlenu ($\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$) obecnego w azotanach zawartych w opadzie atmosferycznym zbieranym na Kasprowym Wierchu i Krakowie dobrze mieści się w przedziale wartości mierzonych na innych stanowiskach kontynentalnych (Kendall, 1998). Sezonowość średnich ważonych iloczynem wielkości opadów i stężenia NO_3^- zaznacza się bardzo wyraźnie dla obu punktów poboru (Tab. 6.2). Najwyższe wartości obserwuje się dla okresu letniego (+39,23‰ dla Krakowa i +36,92‰ dla Kasprowego Wierchu), a najniższe dla zimy (odpowiednio: +16,65‰ i +23,80‰). Relatywnie wysokie i bardzo zbliżone do siebie wartości $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ w okresie lata dla obu punktów sugerują, że skład izotopowy tlenu w azotanach kształtowany jest głównie przez reakcje z O_3 atmosferycznym, który posiada bardzo wysokie wartości $\delta^{18}\text{O}$ (Johnston i Thiemens, 1997). Silne nasłonecznienie w lecie, prowadzące do

zwiększonej produkcji ozonu w troposferze w reakcjach fotochemicznych, niewątpliwie ma wpływ na wysokie wartości $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ obserwowane o tej porze roku. Niskie wartości $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ obserwowane zimą wynikają zapewne ze zwiększonego udziału rodnika OH w procesie formowania azotanów w tej porze roku. Skład izotopowy rodników OH jest kontrolowany głównie przez skład izotopowy atmosferycznej pary wodnej. Z uwagi na silny efekt sezonowy w składzie izotopowym pary wodnej, para wodna zimą charakteryzuje się znacznie niższymi wartościami $\delta^{18}\text{O}$ niż w lecie. Może to prowadzić do niskich zimowych wartości $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$. Podobnie jak w przypadku $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$, ilościowe rozważania dotyczące zmienności sezonowej $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ wymagałyby specjalistycznych badań, wykraczających poza zakres tematyczny niniejszej rozprawy.

Rysunek 6.11 przedstawia wartości $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ azotanów w opadach miesięcznych zbieranych na Kasprowym Wierchu i w Krakowie, w funkcji $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$. Z rysunku widać istnienie ujemnej zależności korelacyjnej pomiędzy $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$, przy dość dużym rozrzucie punktów. Podobnego typu korelację zaobserwowano w wodzie opadowej na Bermudach (Hastings i Sigman, 2003), choć ze znacznie różniącym się współczynnikiem nachylenia prostej wyrównującej punkty pomiarowe. Ze względu na to, że $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ jest determinowane przed wszystkim przez skład izotopowy źródeł, natomiast $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ silnie zależy od reakcji chemicznych zachodzących w atmosferze, powiązania pomiędzy tymi wartościami można doszukiwać się np. poprzez temperaturę, która ma wpływ zarówno na źródła NO_x jak i na procesy chemiczne w atmosferze.



Rys. 6.11. Zmienność składu izotopowego tlenu $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ i azotu $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ azotanów w próbach opadów zbieranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu, na tle typowych zakresów zmienności składu izotopowego związków azotu w środowisku. Na wykresie zaznaczono zakres zróżnicowania izotopowego tlenu azotanowego związanego z procesem nityfikacji oraz ewolucję składu izotopowego azotanów wynikającą z procesu denitryfikacji.

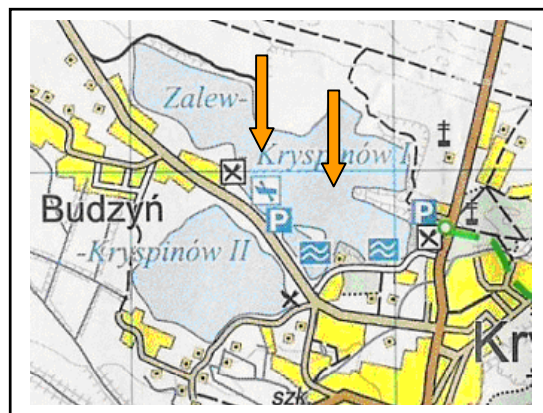
6.2. Zmienność składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodach powierzchniowych

W ramach pracy przeprowadzono pomiary składu izotopowego NO_3^- w dwóch typach wód powierzchniowych: (i) w zalewie Kryspinów I, który jest bezodpływowym jeziorem powstałym w wyniku eksploatacji kruszywa i obecnie wykorzystywanym do celów rekreacyjnych, oraz (ii) w Wiśle w rejonie Krakowa. Badane systemy reprezentują dwa zupełnie odmienne typy wód powierzchniowych o bardzo różnej dynamice.

6.2.1. Charakterystyka miejsc poboru prób

Zalew Kryspinów I: ukształtowanie terenu i warunki hydrogeologiczne

Zalew Kryspinów I i pobliski Zalew Kryspinów II stanowią dwa sąsiadujące ze sobą zbiorniki wodne, zlokalizowane w powiecie krakowskim (gmina Liszki), w północno-zachodniej części województwa małopolskiego, pomiędzy miejscowościami: Liszki, Budzyń, Kryspinów (Rys. 6.12). Zbiorniki wodne są oddalone ok. 20 km od centrum Krakowa i ok. 12 km od zachodnich granic zwartej zabudowy miejskiej.



Rys. 6.12. Lokalizacja zbiornika wodnego Zalew Kryspinów I. Na prawym rysunku strzałkami oznaczono miejsca poboru próbek: ze środka zbiornika i z wysuniętego kilkanaście metrów od brzegu pomostu.

Oba zbiorniki powstały w wyniku eksploatacji złóż kruszywa. Akweny oddziela pas terenu, po którym prowadzi droga lokalna. Łączna powierzchnia wody to ok. 60 ha (Kryspinów I – ok. 40 ha, Kryspinów II –

ok. 20 ha). Maksymalna głębokość obu zbiorników wynosi kilkanaście metrów. Woda w akwenu Kryspinów I posiada pierwszą klasę czystości i w okresie letnim jest wykorzystywana do celów rekreacyjnych jako kąpielisko wyposażone w typową infrastrukturę. Oba zbiorniki nie posiadają powierzchniowych dopływów i odpływów, a hydraulicznie połączone są jedynie czwartorzędowym poziomem wodonośnym (przepuszczalne piaski i gliny).

Rejon Kryspinowa ma charakter równinny o łagodnie zmieniającej się wysokości. Położony jest ok. 210 m n.p.m. W kierunku północnym, w okolicy Borów Morawickich teren wznosi się do wysokości 235 m n.p.m.. Budowa geologiczna w rejonie Kryspinowa jest zróżnicowana, a zidentyfikowane utwory czwartorzędu, trzeciorzędu i górnej jury posiadają profil nieciągły z licznymi lukami stratygraficznymi. Stratygraficznie udokumentowane utwory górnej jury reprezentują osady oksfordu i kimerydu (Krajewski, 2001; Matyszkiewicz, 1997) o miąższości do 200 m. Charakterystyczne wapienie skaliste o stosunkowo dużej twardości i jasnoszarej barwie tkwią pomiędzy innymi odmianami skał węglanowych górnej jury, a wykazując największą odporność na wietrzenie i erozję, ulegają wypreparowaniu, tworząc malownicze skałki (np. dolina Sanki). Osady czwartorzędu, których miąższość sięga od kilku do kilkudziesięciu metrów, leżą na powierzchni erozyjnej o różnej genezie i wieku, ścinającej osady od górnej jury po miocen włącznie. Reprezentowane są przez piaski i żwiry z okresu zlodowacenia południowopolskiego, a także przez piaski rzeczno–peryglacjalne, żwiry i lessy, deponowane podczas zlodowacenia środkowo– i północnopolskiego, oraz przez piaski i muły holoceny (Rutkowski, 1993).

W okolicach Kryspinowa należącego do subregionu hydrogeologicznego Jury Krakowsko–Wieluńskiej zasadnicze znaczenie w profilu hydrogeologicznym mają dwa piętra wodonośne: czwartorzędowe i jurajskie. W piętrze czwartorzędowym na ogół pojawia się jeden poziom wodonośny o swobodnym zwierciadle wody związany z obszarem pradoliny Wisły, gdzie wody występują w utworach żwirowo–piaszczystych. Poziom ten o podstawowym znaczeniu dla zaopatrzenia w wodę zasilany jest bezpośrednio przez opady atmosferyczne, a drenowany przez rzeki i strumienie. Posiada zwierciadło wody znajdujące się na głębokości kilkunastu metrów, a przy braku warstwy izolującej może być silnie odwadniany przez niżej położone warstwy wodonośne (Rutkowski, 1993). Poziom ten stanowi główne źródło wody dla Zalewu Kryspinów I i II.

Próby do analiz zawartości azotanów oraz ich składu izotopowego pobierane były z Zalewu Kryspinów I raz w miesiącu w okresie od lipca 2005 roku do czerwca 2006 roku z pomostu wysuniętego w głąb Zalewu, bądź z pontonu w pobliżu środka tafli wody. Do pobierania używano zatapianego pojemnika plastikowego pozwalającego pobrać próbkę z głębokości ok. 2m. W zimie, gdy powierzchnia była zamrznięta, wykorzystano istniejący przerebėl (próbka z lutego 2006 roku).

Wisła: Stopień Wodny „Kościuszkę” i Most Wandy

Punkty poboru prób wody z Wisły dobrano tak, aby jeden znajdował się przed a drugi za aglomeracją Krakowa. Lokalizację pierwszego punktu wybrano w pobliżu Tyńca, przy Stopniu Wodnym „Kościuszkę”, po którym biegnie autostrada A–4. Drugi punkt zlokalizowano poza centrum Krakowa, w pobliżu dawnej wsi Mogiła, w miejscu gdzie Most Wandy przecina Wisłę na przedłużeniu ulicy Klasztornej (Rys. 6.13).



Rys. 6.13. Lokalizacja miejsc poboru prób z Wisły. Strzałki wskazują Stopień Wodny „Kościuszko” (po lewej stronie) i Most Wandy (po prawej stronie).

Wisła na odcinku pomiędzy pierwszym a drugim punktem pomiarowym jest uregulowana i obwałowana, z kilkoma większymi dopływami po obu stronach (Wilga, Sanka, Rudawa, Białucha) oraz licznymi małymi ciekami powierzchniowymi odwadniającymi okoliczne łąki i dawne tereny zalewowe. Zwarta zabudowa w centrum miasta, podchodząca w pobliżu koryta rzecznego, obejmuje około 1/3 długości całego odcinka. Na pozostałej części dominuje zabudowa luźna, a w pobliżu koryta znajdują się tereny wykorzystywane pod uprawy, pastwiska, a także liczne stawy. Koryto Wisły jest naturalnym ciekiem bezpośrednio drenującym znaczny obszar po obu stronach rzeki. Większość terenów między Stopniem Wodnym „Kościuszko” a Mostem Wandy jest skanalizowana, natomiast rzeka wykorzystywana jest również do celów rekreacyjno–turystycznych i transportowych.

Opróbowanie przeprowadzano, podobnie jak w przypadku Zalewu Kryspinów I, raz w miesiącu ze Stopnia Wodnego „Kościuszko” i z Mostu Wandy, w miejscu głównego nurtu rzeki, w godzinach południowych, pobierając wodę z głębokości ok. 2 m pod powierzchnią przy pomocy odpowiedniego próbnika.

6.2.2. Prezentacja i dyskusja wyników pomiarów

Zestawienie zmierzonych wartości stężenia azotanów oraz ich składu izotopowego dla Zalewu Kryspinów I i Wisły umieszczono w tabeli 6.3. Należy zwrócić uwagę, że pobierane próbki reprezentują wartości chwilowe

mierzonych parametrów. Uzyskane wyniki, z uwagi na brak gwałtownych spływów wody czy wezbrań przynajmniej tydzień przed opróbowaniem oraz dużą bezwładność badanego systemu można uznać za wartości reprezentatywne dla okresów kilkudniowych.

Tab. 6.3. Stężenie oraz skład izotopowy azotanów w próbkach wody pobieranych z Zalewu Kryspinów I oraz z Wisły (Stopień Wodny „Kościuszk” oraz Most Wandy) w okresie od lipca 2005 do czerwca 2006 roku. Skład izotopowy azotu wyrażono względem azotu powietrznego, a tlenu względem standardu V-SMOW.

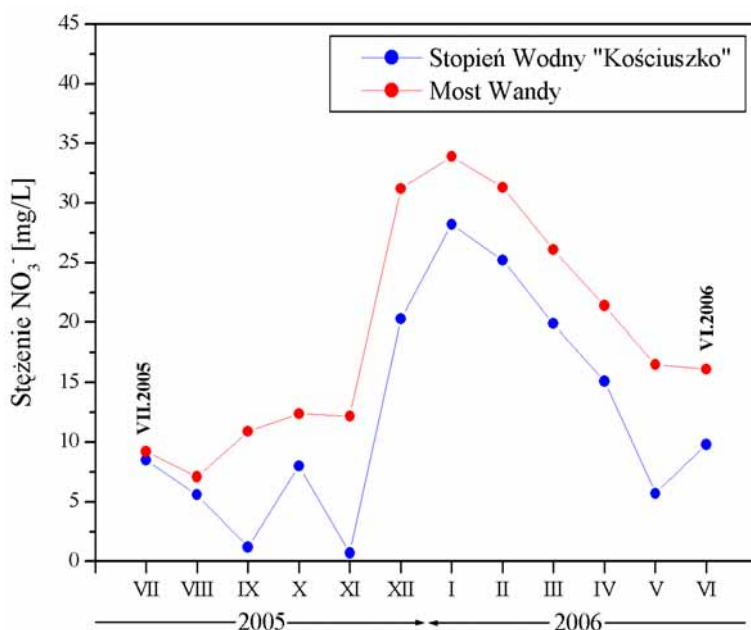
Miesiąc	Zalew Kryspinów I			Stopień Wodny „Kościuszk”			Most Wandy		
	NO ₃ ⁻ [mg/L]	δ ¹⁵ N [‰]	δ ¹⁸ O [‰]	NO ₃ ⁻ [mg/L]	δ ¹⁵ N [‰]	δ ¹⁸ O [‰]	NO ₃ ⁻ [mg/L]	δ ¹⁵ N [‰]	δ ¹⁸ O [‰]
07.2005	1,4±0,1	+3,0±0,3	+15,2±0,6	8,5±0,2	+10,4±0,3	+11,8±0,6	9,2±0,2	+11,2±0,3	+14,2±0,6
08.2005	1,7±0,1	+8,9±0,3	+19,3±0,6	5,6±0,1	+6,0±0,3	+28,1±0,6	7,1±0,1	+8,4±0,3	+27,3±0,6
09.2005	0,9±0,1	+4,1±0,3	+24,1±0,6	1,2±0,1	+17,5±0,3	+24,0±0,6	10,9±0,2	+17,4±0,3	+24,5±0,6
10.2005	<0,1	+11,7±0,3	+24,6±0,6	8,0±0,2	+18,1±0,3	+1,7±0,6	12,4±0,2	+19,4±0,3	+11,5±0,6
11.2005	<0,1	+11,8±0,3	+28,8±0,6	0,7±0,1	+13,1±0,3	-4,7±0,6	12,2±0,2	+9,2±0,3	+5,4±0,6
12.2005	0,7±0,1	+13,5±0,3	+31,7±0,6	20,3±0,3	+8,1±0,3	+1,9±0,6	31,2±0,5	+8,7±0,3	+6,3±0,6
01.2006	0,3±0,1	+14,6±0,3	+1,3±0,6	28,2±0,4	+7,8±0,3	+0,6±0,6	33,9±0,5	+12,4±0,3	+5,9±0,6
02.2006	0,5±0,1	+19,9±0,3	+20,0±0,6	25,2±0,4	+11,4±0,3	+2,1±0,6	31,3±0,5	+14,1±0,3	+3,8±0,6
03.2006	0,2±0,1	+14,1±0,3	+21,8±0,6	19,9±0,3	+15,4±0,3	+1,4±0,6	26,1±0,3	+18,3±0,3	+3,6±0,6
04.2006	0,4±0,1	+11,3±0,3	+18,7±0,6	15,1±0,3	+16,0±0,3	-1,7±0,6	21,4±0,4	+16,7±0,3	+6,4±0,6
05.2006	0,8±0,1	+10,0±0,3	+20,0±0,6	5,7±0,1	+14,1±0,3	+7,6±0,6	16,5±0,3	+10,3±0,3	+12,9±0,6
06.2006	0,8±0,1	+8,0±0,3	+30,5±0,6	9,8±0,2	+9,3±0,3	+22,2±0,6	16,1±0,3	+10,2±0,3	+23,1±0,6

Wisła: Stopień Wodny „Kościuszk” i Most Wandy

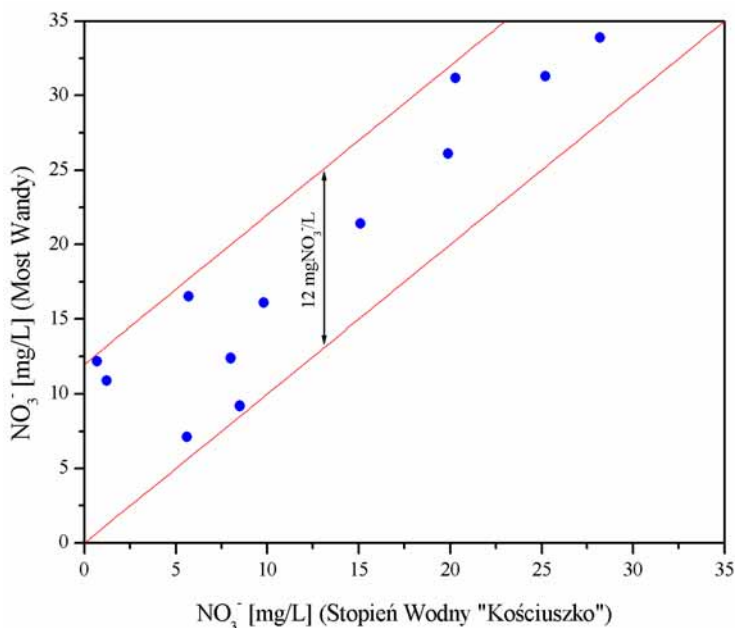
Na rysunku 6.14 przedstawiono sezonowe zmiany stężenia azotanów mierzone w Wiśle na Stopniu Wodnym „Kościuszk” i na Moście Wandy. W obu punktach pomiarowych występuje wyraźne maksimum stężenia NO₃⁻ w miesiącach zimowych (grudzień–luty) z wartościami dochodzącymi do 34 mg/L. W miesiącach letnich stężenie spada do wartości rzędu kilku mg/L. Obserwowane maksimum stężenia NO₃⁻ w miesiącach zimowych w Wiśle można tłumaczyć zmniejszonym przepływem wody (mniejsze rozcieńczanie), a także obniżoną intensywnością samooczyszczania w wyniku bakteryjnych procesów denitryfikacyjnych w korycie rzeki. Wyższe stężenia występujące przy Moście Wandy, w porównaniu ze stężeniami mierzonymi na Stopniu Wodnym „Kościuszk”, należy wiązać z dodatkowym ładunkiem azotanów wnoszonym przez aglomerację krakowską. Zwiększenie stężenia na odcinku aglomeracji nie przekracza 12 mg/L (Rys. 6.15). Wysokie stężenia azotanów obserwowane w dwu punktach Wisły, szczególnie w okresie zimowym, wskazują na duży

stopień zanieczyszczenia Wisły związkami azotu. Zawartość azotanów utrzymuje się jednak poniżej dopuszczalnego poziomu dla wody pitnej (50 mg/L).

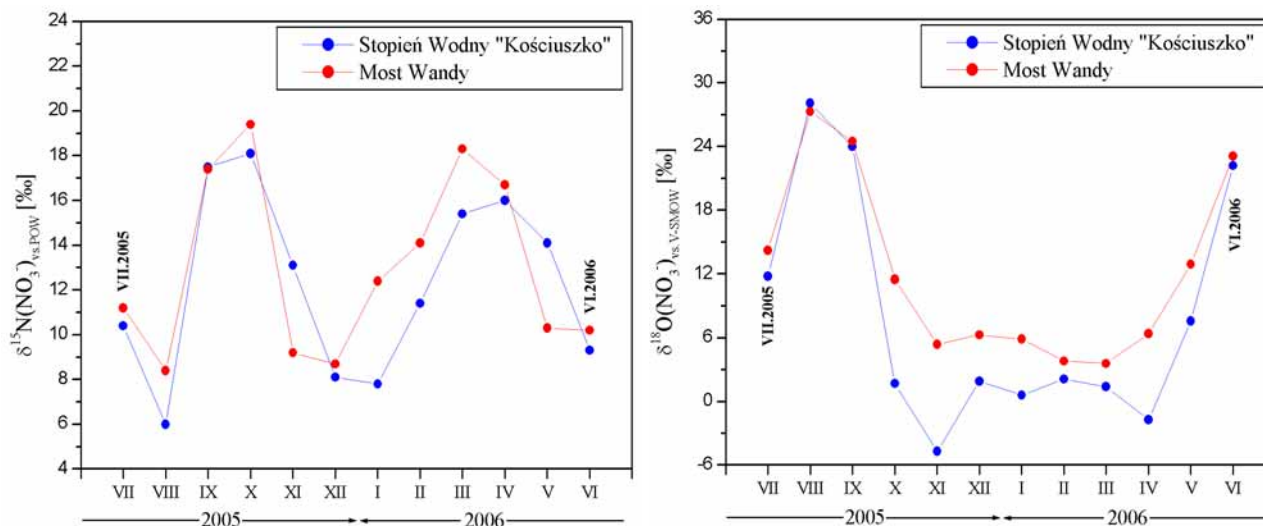
Na rysunku 6.16 przedstawiono zmiany w czasie $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ dla obu punktów opróbowania na Wiśle. Dla $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ widoczne są dwa maksima, jedno w okresie jesiennym (wrzesień, październik) a drugie w okresie wiosennym (marzec, kwiecień). Dla $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ występuje jedno szerokie minimum w okresie jesienno-zimowym oraz maksimum w okresie letnim (czerwiec-wrzesień).



Rys. 6.14. Zmienność stężenia azotanów w okresie od lipca 2005 do czerwca 2006 roku w wodzie z Wisły (Stopień Wodny „Kościuszko” i Most Wandy). Niepewność względna oznaczenia stężenia azotanów wynosi $\pm 1,4\%$.

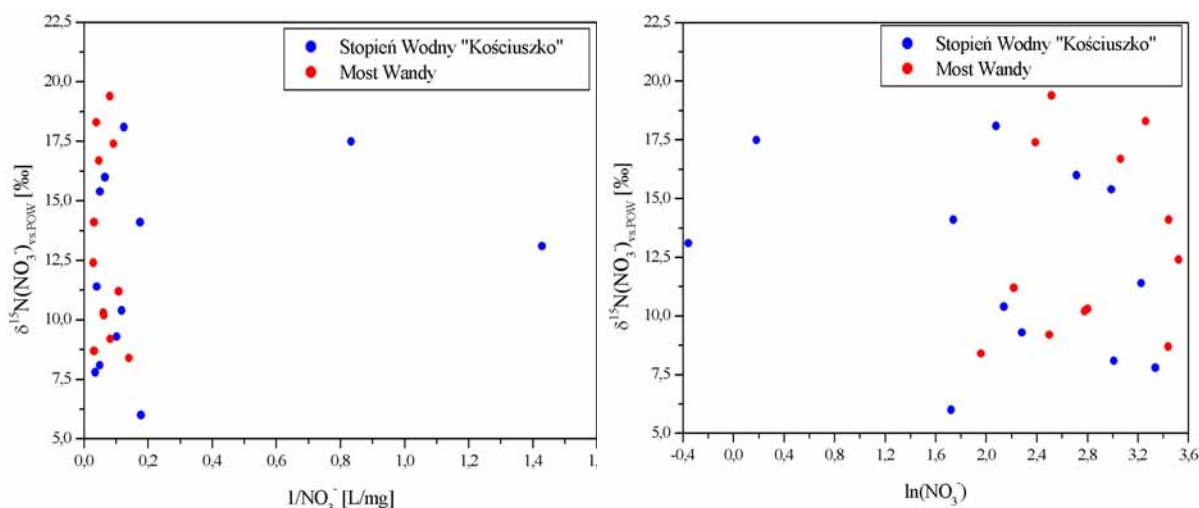


Rys. 6.15. Korelacja pomiędzy stężeniami azotanów w Wiśle przy Stopniu Wodnym „Kościuszko” i Moście Wandy.



Rys. 6.16. Zmienność sezonowa składu izotopowego azotanów (po lewej) i tlenu (po prawej) azotanów w okresie od lipca 2005 do czerwca 2006 roku w próbkach wody z Wisły (Most Wandy i Stopień Wodny „Kościuszko”).

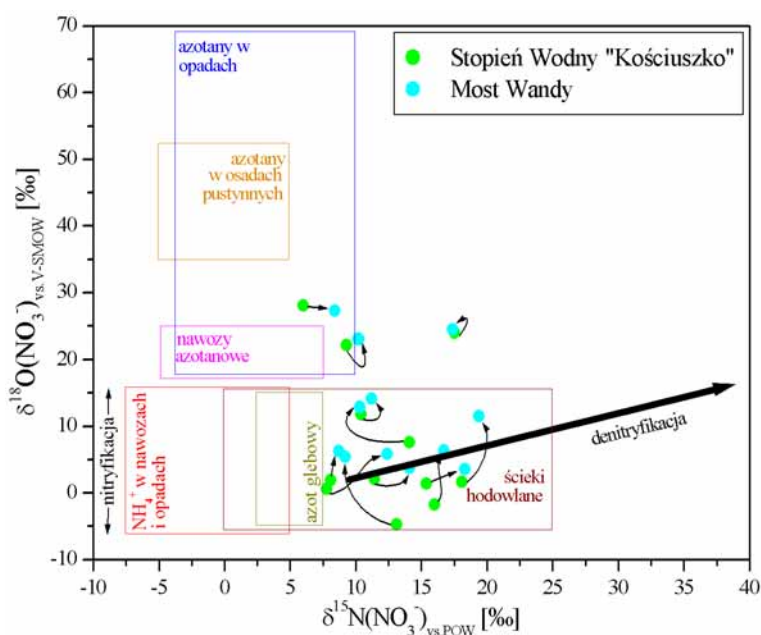
Na rysunku 6.17 przedstawiono zależność pomiędzy składem izotopowym azotu azotanowego a stężeniem azotanów w wodzie wiślanej, przy czym zastosowano następujące układy współrzędnych: $\delta^{15}\text{N} = f(1/\text{NO}_3^-)$ oraz $\delta^{15}\text{N} = f(\ln \text{NO}_3^-)$.



Rys. 6.17. Zależność pomiędzy składem izotopowym azotu azotanowego $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$, a stężeniem azotanów w próbkach wody zebranych w Krakowie z Wisły (Stopień Wodny „Kościuszko” i Most Wandy). Wykresy sporządzono w dwóch układach współrzędnych: $\delta^{15}\text{N} = f(1/\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{15}\text{N} = f(\ln \text{NO}_3^-)$.

Na rysunku 6.18 przedstawiono zależność składu izotopowego tlenu $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ w funkcji składu izotopowego azotu $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ w azotanach rozpuszczonych w wodzie pobranej z Wisły w obu punktach

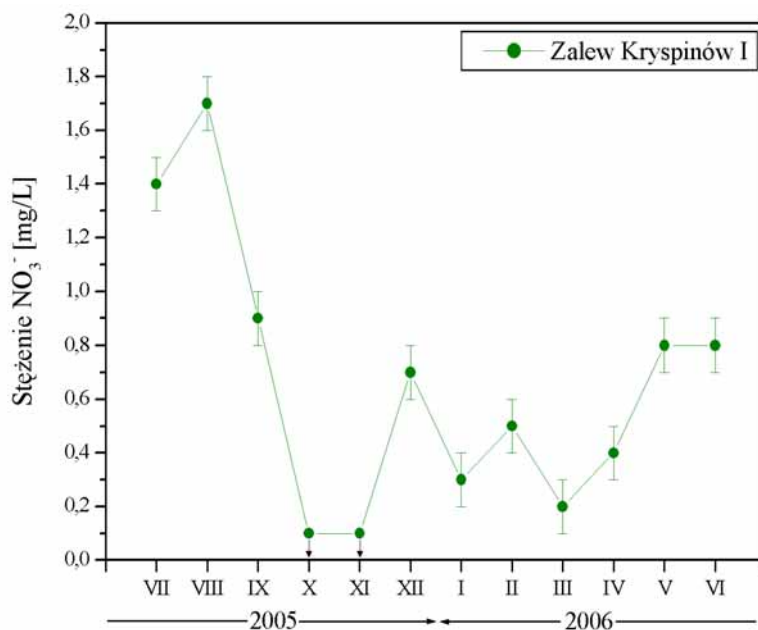
obserwacyjnych. Strzałkami połączono punkty reprezentujące dany miesiąc opróbowania. W próbach wody pobranych z Mostu Wandy obserwowano w większości przypadków wzrost wartości $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ azotanów (9 prób na 12) oraz $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ azotanów (11 prób na 12) w porównaniu z wartościami wyznaczonymi dla Stopnia Wodnego „Kościuszko”. Różnice te wskazują na obecność procesów denitryfikacji bezpośrednio w korycie rzeki albo dopływ azotanów bardziej zdenitryfikowanych z obszaru aglomeracji krakowskiej, bądź obecność obu czynników równocześnie. Punkty pomiarowe o najbardziej dodatnich wartościach $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$, między ok. +20‰ i +30‰, reprezentują miesiące letnie (sierpień i wrzesień 2005, czerwiec 2006). Wysokie wartości $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ wskazują na znaczny udział spływu powierzchniowego w ogólnym przepływie Wisły w okolicy Krakowa w tym okresie (por. Rys. 6.8). Z rysunku 6.16 wynika, iż przepływ podstawowy w Wiśle (z ang. *baseflow*) kontrolowany głównie przez wody podziemne charakteryzuje się stosunkowo niskimi wartościami $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$.



Rys. 6.18. Zależność składu izotopowego tlenu od składu izotopowego azotu w azotanach rozpuszczonych w wodzie pobranej w Krakowie z Wisły: ze Stopnia Wodnego „Kościuszko” i z Mostu Wandy. Zaznaczone zakresy zmienności $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ związane są z azotanami o różnym pochodzeniu. Strzałkami połączono punkty odpowiadające próbom pobranym w tym samym miesiącu.

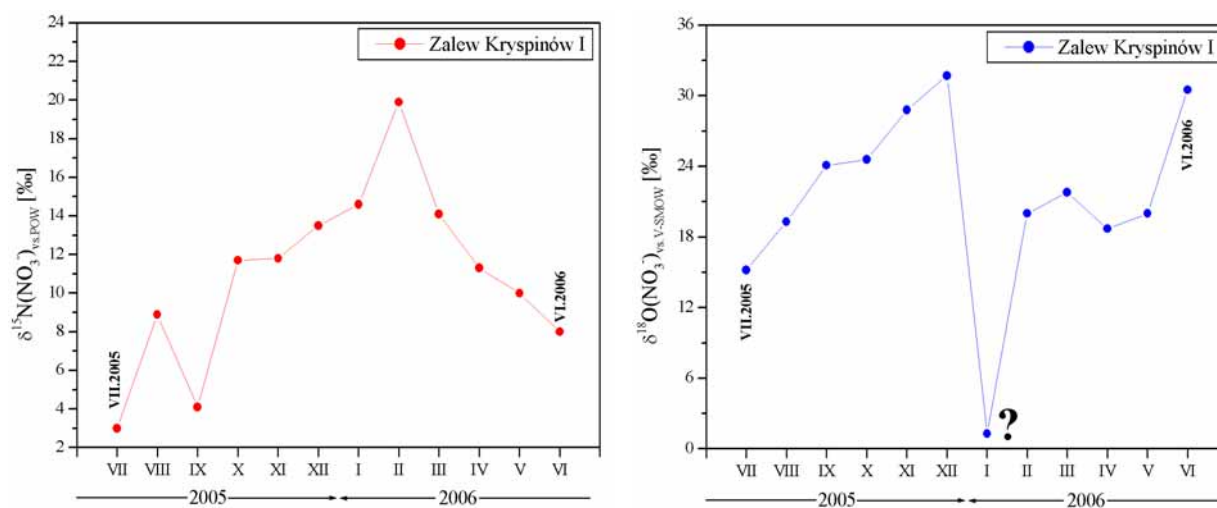
Zalew Kryspinów I

Na rysunku 6.19 przedstawiono sezonowe zmiany stężenia azotanów rozpuszczonych w próbach wody pobranych z Zalewu Kryspinów I od lipca 2005 do czerwca 2006 roku. Zwracają uwagę ekstremalnie niskie wartości mierzonych stężeń, szczególnie w okresie jesienno–zimowym. Maksimum stężenia azotanów zaobserwowano w miesiącach letnich (lipiec–sierpień) – z wartościami dochodzącymi do 1,7 mg/L. Średnia za cały okres obserwacji wynosi 0,7 mgNO₃⁻/L. Dla porównania, średnia dla opadu atmosferycznego w Krakowie za ten sam okres wynosi 3,9 mg/L.



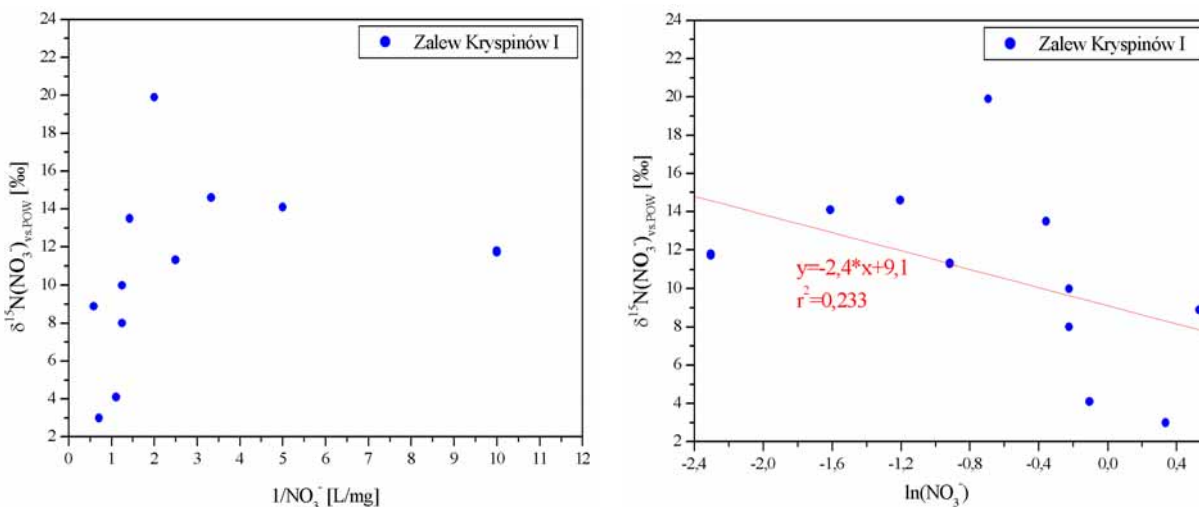
Rys. 6.19. Zmienność stężenia azotanów w okresie od lipca 2005 do czerwca 2006 roku w wodzie pobranej z Zalewu Kryspinów I. W próbkach z października i listopada 2005 roku (oznaczono je strzałkami) stwierdzono stężenie azotanów poniżej granicy oznaczalności ($<0,1 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$).

Zmiany składu izotopowego $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ azotanów w wodach Zalewu Kryspinów I w okresie od lipca 2005 do czerwca 2006 roku przedstawiono na rysunku 6.20.



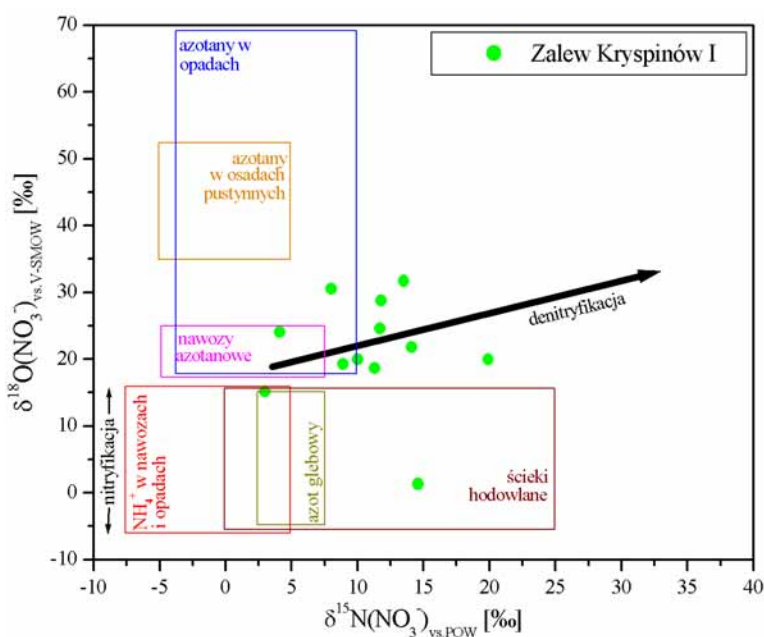
Rys. 6.20. Zmienność składu izotopowego azotu (po lewej) i tlenu (po prawej) azotanów w okresie od lipca 2005 do czerwca 2006 roku w próbkach wody z Zalewu Kryspinów I. Znakiem zapytania „?” oznaczono punkt ze stycznia 2005 roku o współrzędnej $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-) = +1,3\text{‰}$, odbiegający znacząco od pozostałych punktów pomiarowych.

Na rysunku 6.21 przedstawiono zależność pomiędzy składem izotopowym azotu azotanowego a stężeniem azotanów w próbach wody pobranej z Zalewu Kryspinów I, przy czym zastosowano następujące układy współrzędnych: $\delta^{15}\text{N} = f(1/\text{NO}_3^-)$ oraz $\delta^{15}\text{N} = f(\ln \text{NO}_3^-)$.



Rys. 6.21. Zależność pomiędzy składem izotopowym azotu azotanowego $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$, a stężeniem azotanów w próbach wody pobranych z Zalewu Kryspinów I. Wykresy sporządzono w dwóch układach współrzędnych: $\delta^{15}\text{N} = f(1/\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{15}\text{N} = f(\ln \text{NO}_3^-)$. Na wykresie zależności $\delta^{15}\text{N} = f(\ln \text{NO}_3^-)$ zaznaczono dopasowaną prostą regresji.

Na rysunku 6.22 przedstawiono zależność składu izotopowego tlenu $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ od składu izotopowego azotu $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ w azotanach rozpuszczonych w wodzie pobranej z Zalewu Kryspinów I.



Rys. 6.22. Zależność składu izotopowego tlenu od składu izotopowego azotu w azotanach rozpuszczonych w wodzie pobranej z Zalewu Kryspinów I. Zaznaczone zakresy zmienności $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$ i $\delta^{18}\text{O}(\text{NO}_3^-)$ związane są z azotanami o różnym pochodzeniu.

Położenie punktów pomiarowych na wykresie $\delta^{18}\text{O}=\text{f}(\delta^{15}\text{N})$, w połączeniu z niskimi stężeniami azotanów w próbach wód Kryspinowa I (średnio 0,7 mg/L za cały okres obserwacji) w porównaniu ze stężeniami obserwowanymi w opadach w Krakowie, wskazuje na pewną obecność procesów denitryfikacyjnych, bądź to w wodach podziemnych zasilających zbiornik bądź to w samym zbiorniku. Zalew Kryspinów I jest zasilany głównie wodami gruntowymi. Stosunek całkowitego dopływu podziemnego do opadu wynosi dla tego systemu ok.. 5 (Sikora, 2003). Niewielki wzrost stężenia azotanów w okresie letnim może wynikać z większego udziału opadu bezpośrednio na powierzchnię zbiornika w okresie letnim, jak i spływu powierzchniowego. Oba te składniki dopływu charakteryzują się zwiększonymi stężeniami NO_3^- w stosunku do wód podziemnych dopływających do zbiornika.

6.3. Występowanie azotanów w zbiornikach wód podziemnych

Zaopatrzenie ludności w wodę dobrej jakości w szczególności na terenach silnie zurbanizowanych, a także na obszarach intensywnych upraw rolnych i gospodarstw hodowlanych staje się ważnym problemem ze względu na postępujące zanieczyszczenie wód powierzchniowych i podziemnych. Istotnym czynnikiem zanieczyszczającym są azotany.

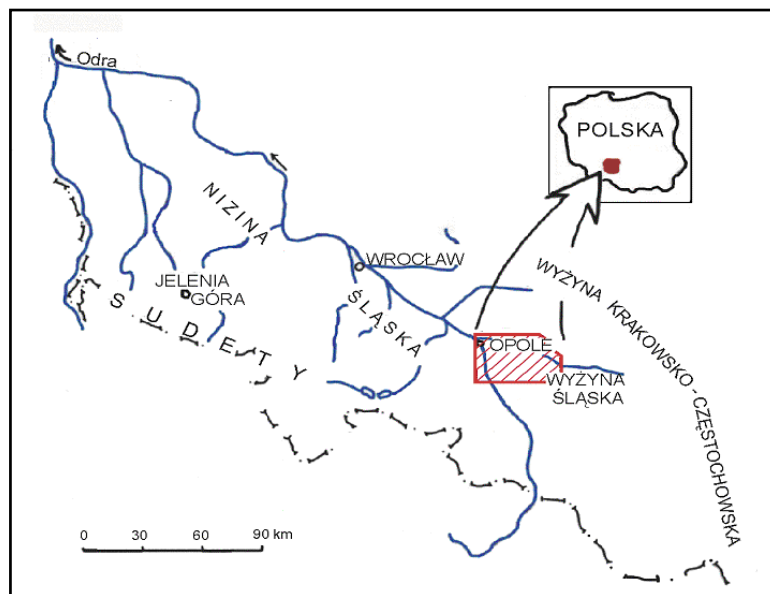
Do rekonesansowych pomiarów wybrane zostały dwa zbiorniki wód podziemnych: (i) Główny Zbiornik Wód Podziemnych 333 „Opole – Zawadzkie”, zlokalizowany na południowy wschód od Opola, oraz (ii) Główny Zbiornik Wód Podziemnych 451 „Piaski Bogucickie”, rozciągający się na wschód od Krakowa. Zbiorniki te są obiektami, na których prowadzone są obecnie szersze badania hydrogeologiczne w aspekcie potencjalnego zagrożenia skażeniami antropogenicznymi.

6.3.1. Główny Zbiornik Wód Podziemnych 333 „Opole–Zawadzkie”

Warunki geologiczne i hydrogeologiczne

Główny Zbiornik Wód Poziemnych 333 „Opole–Zawadzkie” położony jest w południowo–zachodniej części Polski, w województwie opolskim, na obszarach gmin: Opole, Prószków, Tarnów Opolski, Izbicko, Chrzastowice, Strzelce Opolskie, Jemielnica, Zawadzkie i Gogolin. GZWP 333 obejmuje obszar 952,6 km², na pograniczu Niziny Śląskiej i Wyżyny Śląskiej (Rys. 6.23). Stanowi podstawowe źródło zaopatrzenia w wodę pitną na tym terenie.

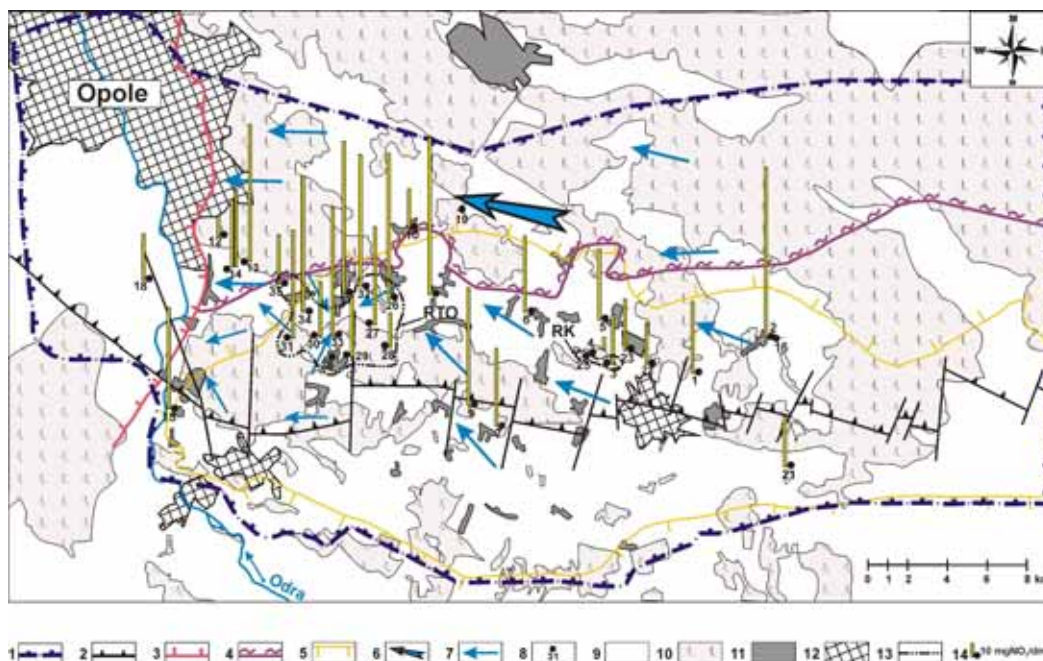
Zbiornik GZWP 333 wypełniają przede wszystkim utwory wapienia muszlowego posiadające charakter szczelinowo–krasowy. Jest to następstwo występowania skał węglanowych, głównie wapieni oraz dolomitów, w których obecność szczelin i spękań, a także pustek typu krasowego ma decydujący wpływ na warunki przepływu wody. Wodonośne piętro triasowe tworzą w tym regionie również głębiej położone poziomy retu i pstrego piaskowca, które łącznie z klastycznymi osadami czerwonego spagowca tworzą wodonośny kompleks permo–triasowy (szczegółowy opis: Staśko, 1992; Kryza i Staśko, 2000).



Rys. 6.23. Lokalizacja Głównego Zbiornika Wód Podziemnych 333 „Opole–Zawadzkie” (Klimaszewski, 1981; Pieczka, 2003).

Warunki hydrogeologiczne na obszarze GZWP 333 determinuje monoklinalna struktura ułożenia warstw. Wschodnie warstw wodonośnych znajdują się na południe od Opola, w rejonie Strzelec Opolskich (Rys. 6.24). Naturalne krążenie i wymiana wody w obrębie GZWP 333 są przestrzennie zróżnicowane, co wynika z budowy geologicznej oraz zmiennej przepuszczalności głównej warstwy wodonośnej. Zbiornik GZWP 333 można podzielić na dwa obszary: południowy i północny. W części południowej zbiornika, odkrytej, będącej łatwo przepuszczalną strefą wschodni wapienia muszlowego, jedynie częściowo przykrytą cienkim nakładem czwartorzędowym i pozbawioną izolującej pokrywy kajprzej, występują dogodne warunki zasilania i przepływu pozwalające na powstawanie znacznych zasobów wód podziemnych. W warunkach naturalnych, w okresie przedindustrialnym, przepływ wód podziemnych był skierowany generalnie na północny zachód, w stronę doliny rzeki Odry. W części północnej zbiornika, pokrytej ilastymi osadami kajpru, warunki przepływu istotnie się pogarszają. Regionalny przepływ wód w tej części GZWP 333 (Rys. 6.24) odbywał się generalnie z południowego wschodu na północny zachód (Żurek, 2002).

Działalność gospodarcza i urbanizacja, szczególnie w ostatnich dekadach, zaburzyły naturalne warunki przepływu wód podziemnych głównie przez rosnącą eksploatację wód studniami zasilającymi lokalne sieci wodociągowe, które są aktualnie rozbudowywane i modernizowane. Poważne zaburzenia wprowadziło również intensywne odwadnianie istniejących odkrywek górniczych dostarczających surowiec dla przemysłu cementowo-wapienniczego. Powstałe leje depresji w rejonie Opola, Strzelec Opolskich, Tarnowa Opolskiego i Górażdży znacznie zmieniają pierwotne kierunki przepływu wód. Silna ingerencja górnicza zmienia sytuację hydrodynamiczną w rejonie Strzelec Opolskich, między innymi przez likwidację starych odkrywek i zalewanie ich wodą (Rozmierka).



Rys. 6.24. Lokalizacja punktów poboru próbek na obszarze GZWP 333 Opole – Zawadzkie na tle warunków hydrogeologicznych i charakteru zagospodarowania terenu. Objasnienia: 1 – granica GZWP 333; 2 – zasięg utworów wapienia muszlowego (Tm); 3 – zasięg utworów kredy (Cr); 4 – zasięg izolujących utworów kajpru (Tk); 5 – zasięg pokrywy utworów czwartorzędowych (Q); 6 – regionalny kierunek przepływu wód podziemnych; 7 – lokalne kierunki przepływu wód podziemnych; 8 – lokalizacja punktów pomiarowych (z numeracją według tabeli 6.4; 9 – tereny rolnicze; 10 – lasy; 11 – tereny zabudowane, bez kanalizacji; 12 – tereny zabudowane z kanalizacją; 13 – granice rejonów: RTO – rejon Tarnowa Opolskiego, RK – rejon Kosic; 14 – stężenie azotanów (wysokość słupka w legendzie odpowiada 10 mgNO₃/L)

Występowanie azotanów w GZWP 333

W GZWP 333 obserwuje się od około 30 lat niekorzystne zmiany jakości wody związane z podwyższoną zawartością azotanów (Kryza i Staśko, 2000; Pieczka, 2003). Problem ten jest szczególnie dotkliwy w części odkrytej zbiornika, przede wszystkim w rejonie Strzelec Opolskich i Tarnowa Opolskiego (Rys. 6.24). Kilka większych ujęć w tym rejonie zostało wyłączonych z eksploatacji, ponieważ dostarczały wodę o stężeniach azotanów znacznie przekraczających dopuszczalną w Polsce wartość dla wód pitnych (50 mgNO₃⁻/L). Dla rosnących potrzeb zaopatrzenia ludności wykonuje się nowe studnie eksploatacyjne zlokalizowane w obszarze zakrytej części GZWP 333 lub pobierające wodę z głębszego poziomu pstręgo piaskowca. Woda podziemna w nowych studniach nie zawiera azotanów, ale z powodu gorszych warunków zasilania i przepływu, studnie te charakteryzują się znacznie niższymi wydatkami niż te w południowej części GZWP 333.

Za główne ogniska zanieczyszczeń związkami azotowymi wód GZWP 333 uznaje się nawożone tereny rolnicze i nie skanalizowane obszary zabudowane. Znacznie niższe zawartości azotanów w części zakrytej GZWP 333 mogą wynikać z wieku wody (woda pochodzi sprzed okresu intensywnych wpływów antropogenicznych) lub być efektem procesu denitryfikacji, któremu w obszarze izolowanym osadami kajpru mogą sprzyjać warunki obniżonego Eh (Żurek, 2002). Zastosowanie technik izotopowych w badaniach na tym

obszarze miało na celu uzyskanie przynajmniej częściowej odpowiedzi na postawione pytania o źródła zanieczyszczeń oraz procesy samooczyszczania się wody w zbiorniku GZWP 333.

Prezentacja i dyskusja wyników pomiarów

W latach 2005 i 2006 przeprowadzono na obszarze GZWP 333 kilka kampanii poboru prób wody z wytypowanych stanowisk. Opróbowano ogółem 33 punkty pomiarowe i z wyjątkiem oznaczonych: St–33 (Rząpie w kopalni odkrywkowej Tarnów Opolski), St–13 (ciek Lutnia) i St–15 (źródło w Malni), wszystkie pozostałe były studniami eksploatacyjnymi lub otworami piezometrycznymi. Wyniki pomiarów stężenia azotanów, ich składu izotopowego, a także zawartości trytu zamieszczono w tabeli 6.4 oraz przedstawiono na rysunkach 6.25, 6.26 i 6.27 (Różański i in., 2007). W tabeli 6.5 porównano wyniki pomiarów zawartości azotanów, ich składu izotopowego oraz stężenia trytu dla dziewięciu studni, które były badane w 2002 roku oraz także w latach 2005 i 2006.

Wody opróbowywane w 2005 i 2006 charakteryzują się szerokim zakresem stężeń NO_3^- : od wartości poniżej 0,5 mgNO_3^-/L do ponad 100 mgNO_3^-/L , czyli znacznie powyżej dopuszczalnej wartości dla wody pitnej. Również szeroki jest zakres zmian składu izotopowego azotanów: $\delta^{15}\text{N}$ zmienia się od +1,1‰ do +32,8‰, a $\delta^{18}\text{O}$ od –4,7‰ do +37,2‰. Stężenie trytu zawiera się w przedziale od 0 TU do 13,1 TU. Można zauważyć, że próby o niskiej zawartości trytu mają również niskie stężenia azotanów (Rys. 6.25). Śladowe stężenia azotanów ($<0,5 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$) wystąpiły w pięciu studniach (St–4, St–16, St–19, St–25, St–36). Skład izotopowy azotanów w tych studniach (Rys. 6.26) sugeruje daleko posunięty proces denitryfikacji. Stężenia azotanów w wodach podziemnych do ok. 5 mgNO_3^-/L uznawane są za naturalne tło hydrogeochemiczne (Witczak i Adamczyk, 1995).

Studnie wykazujące znaczne stężenia trytu ($>10 \text{ TU}$) posiadają z reguły skład izotopowy azotanów plasujący się w zakresach odpowiadających azotanom glebowym lub właściwy dla gleb nawożonych (Rys. 6.26). Studnie te cechuje również podwyższone stężenie azotanów ($>10 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$). Wartości te wskazują na niedawną infiltrację i słaby stopień przetworzenia azotanów. Wcześniejsze badania prowadzone na terenie GZWP 333 (Chmura i in., 2003) również sugerowały możliwość istnienia stosunkowo szybkich składowych przepływu, mimo że opracowania modelowe wskazywały na znaczny średni wiek wody: powyżej 50 lat.

W studniach eksploatacyjnych w rejonie leja depresyjnego spowodowanego działalnością Kopalni „Tarnów Opolski” występuje bardzo silne zróżnicowanie stężenia azotanów. Największe stężenia obserwuje się w centrum leja tj. w Rząpiu (St–33) oraz na północ i północny zachód od niego (Rys. 6.24). Skład izotopowy azotanów dla zdecydowanej większości studni tego rejonu odpowiada skażeniom ściekami i nawozami naturalnymi. Zmierzone wartości stężeń NO_3^- dla południowego i południowo–wschodniego skraju leja (St–28, St–29) są niższe i zawierają się w przedziale 20–35 mgNO_3^-/L . Skład izotopowy dla studni St–29 jest charakterystyczny dla azotu glebowego natomiast dla studni St–28 wskazuje na obecność zaawansowanego procesu denitryfikacji. Rejon północno–wschodni leja depresyjnego (St–11, St–26, St–27, St–32) charakteryzuje się wysokimi zawartościami azotanów (w przedziale 58–90 mgNO_3^-/L) przy czym ich skład izotopowy odpowiada bądź warunkom glebowym (St–11) bądź zaawansowanemu procesowi denitryfikacji (pozostałe studnie). Studnie tej grupy usytuowane są obszarach rolniczych w rejonie nie osłoniętym izolującą pokrywą kajpru.

Tab. 6.4. Stężenie azotanów, ich skład izotopowy oraz zawartości trytu w wodach podziemnych GZWP 333 w latach 2005–2006. Objasnienia – wiek utworów wodonośnych: Tm – wapień muszlowy; Tr – ret; Tp – pstry piaskowiec; P – perm; C – karbon. W nawiasach podano głębokość studzien i otworów. Skład izotopowy azotu wyrażono względem azotu powietrznego, a tlenu względem standardu V–SMOW. Oznaczenie: b.d. – brak danych, n.m. – nie mierzono.

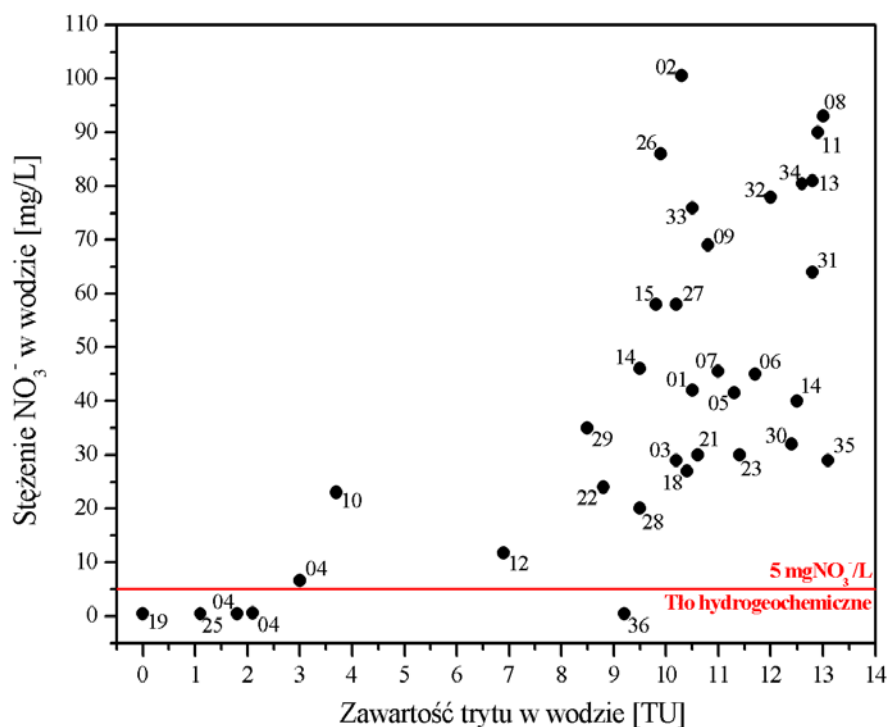
Kod	Położenie	Data próbkowania	Warstwa geologiczna	Głębokość zafiltrowania [m]	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$\delta^{18}\text{O}$ [‰]	NO_3^- [mg/L]	Tryt [TU]
St-01	Szczepanek	02-11-05	Tm	77–87 (90)	+4,5±0,3	+14,3±0,6	42,0±0,6	10,5±0,6
St-02	Jemielnica	02-11-05	Tm	73–103 (108)	+5,4±0,3	+14,3±0,6	100,5±1,5	10,3±0,6
St-03	Kosice 2A	02-11-05	Tm	40–70	+3,9±0,3	+14,1±0,6	29,0±0,5	10,2±0,6
St-04	Kosice 3A	02-11-05	Tm	40–70 (85)	n.m.	+20,0±0,6	<0,5	1,8±0,5
		28-07-06			+23,5±0,3	+37,2±0,6	0,6±0,1	2,1±0,3
		02-11-06			+22,8±0,3	+26,4±0,6	6,7±0,1	3,0±0,4
St-05	Rozmierka	02-11-05	Tm	68–87 (90)	+5,4±0,3	+14,5±0,6	41,5±0,6	11,3±0,7
St-06	Sucha	02-11-05	Tm	42–57 (59)	+7,1±0,3	+17,0±0,6	45,0±0,7	11,7±0,7
St-07	Kalinowice	02-11-05	Tm+Tr	50–68 (70)	+1,1±0,3	+14,2±0,6	45,5±0,7	11,0±0,7
St-08	Izbicko	08-11-05	Tm	33–48 (57)	+4,9±0,3	+15,1±0,6	93,0±1,4	13,0±0,8
St-09	Poznowice	08-11-05	Tm+Tr	22–60 (60,5)	+3,6±0,3	+14,2±0,6	69,0±1,0	10,8±0,7
St-10	Raszowa	08-11-05	Tm	85–105, 115–135 (185)	+6,1±0,3	+15,5±0,6	23,0±0,4	3,7±0,5
St-11	Tarnów Opolski	08-11-05	Tm	48–58 (60)	+1,2±0,3	+14,5±0,6	90,0±1,3	12,9±0,8
St-12	Grotowice 1B	08-11-05	Tp+P	100–180	+6,0±0,3	+16,6±0,6	11,8±0,2	6,9±0,5
St-13	Strumyk Lutnia	08-11-05	b.d.	b.d.	+6,2±0,3	+15,0±0,6	81,0±1,2	12,8±0,8
St-14	Grotowice 6B	08-11-05	Tm	120–156	+5,5±0,3	+15,5±0,6	40,0±0,6	12,5±0,7
		28-07-06			+5,8±0,3	+16,0±0,6	46,0±0,7	9,5±0,5
St-15	Malnia-źródło	08-11-05	b.d.	b.d.	+5,1±0,3	+16,5±0,6	58,0±0,9	9,8±0,7
St-16	Jemielnica (p.p.)	02-11-05	Tp	190–250 (266)	+16,2±0,3	+15,5±0,6	<0,5	n.m.
St-18	Żłinice S3	28-07-06	Tm	82–104, 116–150 (160)	+17,5±0,3	+3,2±0,6	27,0±0,4	10,4±0,6
St-19	Krośnica 46	28-07-06	Tm	95–135, 140–160 (185)	+32,8±0,3	+32,5±0,6	<0,5	0,0±0,3
St-21	Blotnica Strzelecka	02-11-06	Tr	20–37 (40)	+5,8±0,3	+6,7±0,6	30,0±0,5	10,6±0,6
St-22	Farska Kolonia	02-11-06	Tm	28–38 (42)	+25,5±0,3	+11,5±0,6	24,0±0,4	8,8±0,6
St-23	Cementownia (S-2)	02-11-06	Tm	20–24 (26)	+8,9±0,3	+4,4±0,6	30,0±0,5	11,4±0,6
St-25	Kosice 5A	02-11-06	Tp+P+C	250–300	+29,8±0,3	n.m.	<0,5	1,1±0,3
St-26	Rejon Tarnów Op.	11-11-06	Tm	(50)	+25,1±0,3	+12,6±0,6	86,0±1,3	9,9±0,6
St-27	Rejon Tarnów Op.	11-11-06	Tm	(35)	+3,3±0,3	+1,3±0,6	58,0±0,9	10,2±0,6
St-28	Rejon Tarnów Op.	11-11-06	Tm	(40)	+32,7±0,3	+18,6±0,6	20,0±0,3	9,5±0,6
St-29	Rejon Tarnów Op.	11-11-06	Tm	(50)	+4,9±0,3	+6,9±0,6	35,0±0,5	8,5±0,5
St-30	Rejon Tarnów Op.	11-11-06	Tm	(50)	+5,9±0,3	+10,9±0,6	32,0±0,5	12,4±0,6
St-31	Rejon Tarnów Op.	03-11-06	Tm	(50)	+22,8±0,3	+10,4±0,6	64,0±0,9	12,8±0,7
St-32	Rejon Tarnów Op.	11-11-06	Tm	(50)	+19,0±0,3	+20,0±0,6	78,0±1,1	12,0±0,6
St-33	Tarnów Opolski (Rzapie)	15-11-06	Tm	b.d.	+24,9±0,3	+14,1±0,6	76,0±1,1	10,5±0,6
St-34	MW P-1	11-11-06	Tm	(27)	+19,6±0,3	-4,7±0,6	80,5±1,2	12,6±0,6
St-35	Kosorowice	11-11-06	Q+Tm	(18)	+25,5±0,3	+12,2±0,6	29,0±0,5	13,1±0,7
St-36	Kamień Śląski 1	11-11-06	Tm	(70)	+23,9±0,3	+27,1±0,6	<0,5	9,2±0,6

W zachodniej części leja, otwierającej się w kierunku Odry, mierzone parametry badanych studni (St-30, St-31, St-34, St-35) zbliżone są do obserwowanych w centrum leja, przy czym studnia St-34 może być dodatkowo zanieczyszczona w wyniku dopływu świeżej wody silnie skażonej ściekami komunalnymi z pobliskich Kosorowic.

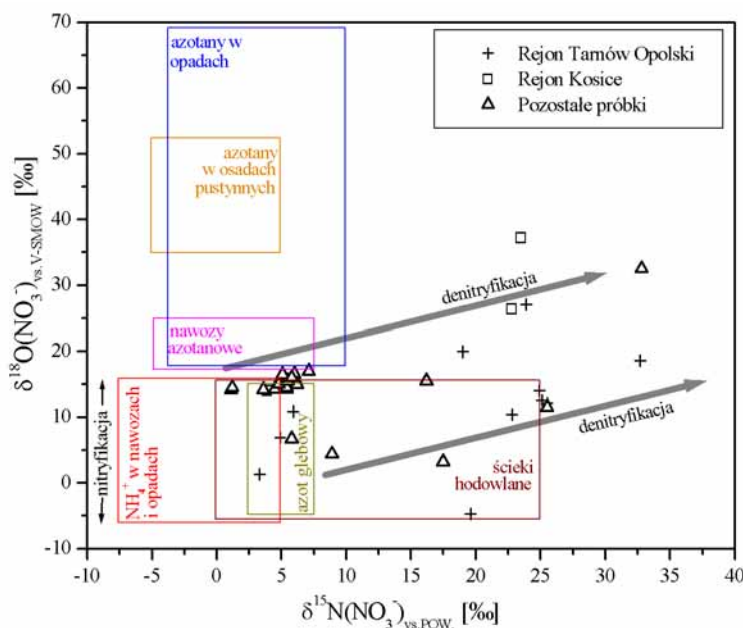
Punkt St-33 (Rzapie), znajdujący się w centralnej części odkrywki Kopalni „Tarnów Opolski”, charakteryzuje się wodą o zbliżonych parametrach do studni w północno-wschodniej części leja depresyjnego. Używanie saletry amonowej jako materiału wybuchowego do kruszenia złoża mogłoby stanowić dodatkowe źródło azotanów. Zmierzony skład izotopowy stosowanej saletry amonowej ($\delta^{15}\text{N}=-0,38\text{‰}$; $\delta^{18}\text{O}=+14,4\text{‰}$) jest odmienny od składu izotopowego azotanów występujących w okolicznych studniach. Wyklucza to hipotezę, że materiały wybuchowe mogą być przyczyną zauważalnego skażenia azotanami.

Tab. 6.5. Zmiany stężenia azotanów, ich składu izotopowego i stężenia trytu w wybranych studniach GZWP 333 w latach 2002–2006. Skład izotopowy azotu wyrażono względem azotu powietrznego, a tlenu względem standardu VSMOW. Oznaczenie: n.m. – nie mierzono.

Kod	Położenie	Data próbkowania	NO ₃ ⁻ [mg/L]	δ ¹⁵ N [‰]	δ ¹⁸ O [‰]	Tryt [TU]
St-01	Szczepanek	22-11-02	93,9±1,4	+0,2±0,3	+13,3±0,6	13,1±0,7
		02-11-05	42,0±0,6	+4,5±0,3	+14,3±0,6	10,5±0,6
St-02	Jemielnica	22-11-02	116,0±1,7	+2,6±0,3	+13,8±0,6	11,7±0,7
		02-11-05	100,5±1,5	+5,4±0,3	+14,3±0,6	10,3±0,6
St-04	Kosice 3A	22-11-02	6,6±0,1	+4,3±0,3	+14,6±0,6	1,1±0,5
		02-11-05	<0,5	n.m.	+20,0±0,6	1,8±0,5
		28-07-06	0,6±0,1	+23,5±0,3	+37,2±0,6	2,1±0,3
		02-11-06	6,7±0,1	+22,8±0,3	+26,4±0,6	3,0±0,4
St-05	Rozmierka	22-11-02	75,7±1,1	+3,7±0,3	+16,6±0,6	13,7±0,8
		02-11-05	41,5±0,6	+5,4±0,3	+14,5±0,6	11,3±0,7
St-06	Sucha	22-11-02	91,6±1,3	+5,0±0,3	+17,2±0,6	13,5±0,7
		02-11-05	45,0±0,7	+7,1±0,3	+17,0±0,6	11,7±0,7
St-07	Kalinowice	22-11-02	127,0±1,8	+2,1±0,3	+16,1±0,6	12,7±0,7
		02-11-05	45,5±0,7	+1,1±0,3	+14,2±0,6	11,0±0,7
St-12	Grotowice 1B	22-11-02	24,4±0,4	+3,3±0,3	+13,4±0,6	9,5±0,6
		08-11-05	11,8±0,2	+6,0±0,3	+16,6±0,6	6,9±0,5
St-14	Grotowice 6B	22-11-02	85,4±1,2	+4,3±0,3	+14,5±0,6	14,7±0,8
		08-11-05	40,0±0,6	+5,5±0,3	+15,5±0,6	12,5±0,7
		28-07-06	46,0±0,7	+5,8±0,3	+16,0±0,6	9,5±0,5
St-25	Kosice 5A	22-11-02	2,2±0,1	+4,4±0,3	n.m.	0,0±0,5
		02-11-06	<0,5	+29,8±0,3	n.m.	1,1±0,3



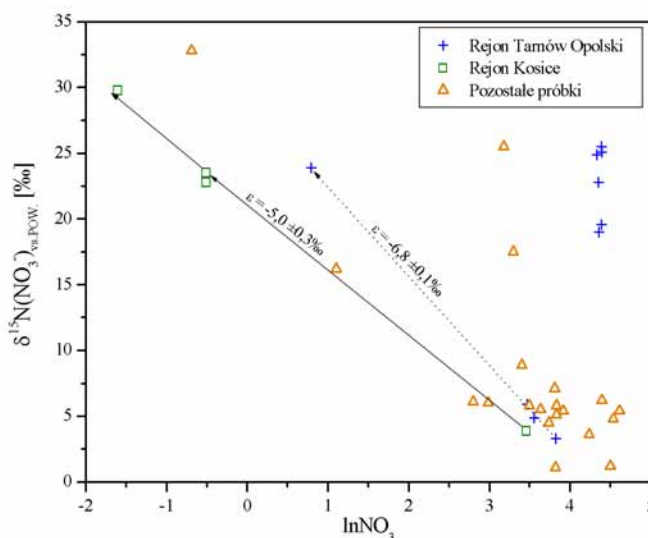
Rys. 6.25. Zależność stężenia rozpuszczonych azotanów od zawartości trytu dla ujęć wody obszaru GZWP 333 w latach 2005–2006. Liczby oznaczają numery studzien zgodnie z tabelą 6.3. Wyróżniono zakres tła hydrogeochemiczne (linia ciągła). Studnia St-10 wykazuje cechy wody mieszanej.



Rys. 6.26. Skład izotopowy azotu i tlenu w azotanach rozpuszczonych w wodach podziemnych GZWP 333. Zaznaczono zakresy składu izotopowego dla różnych typów źródeł i skażeń. Strzałki wskazują kierunek zmian składu izotopowego azotanów w wyniku denitryfikacji.

Studnie eksploatacyjne zlokalizowane w rejonie Kosic, w centralnej części badanego zbiornika (St–03, St–04, St–25), znajdują się w niewielkiej odległości od siebie i sięgają do różnych poziomów wodonośnych. Dostarczają one wodę znacznie różniącą się stężeniami trytu i zawartością rozpuszczonych azotanów (Tab. 6.4). Otwór St–03 zawiera młodą wodę pochodzącą z płytkich warstw wapienia muszlowego (stężenie trytu 10,2 TU). Charakteryzuje się ona pośrednią wartością stężenia azotanów (29 mgNO₃[–]/L) oraz składem izotopowym odpowiadającym nie przetworzonym azotanom wyplukiwanym bezpośrednio z gleby i nawożonych pól uprawnych (Rys. 6.27). W studni St–04, opróbowanej trzykrotnie w okresie 2005–2006, zaobserwowano stopniowy wzrost stężenia azotanów, przy wzrastającym stężeniu trytu (Tab. 6.5). Wskazuje to na rosnący udział młodej składowej w wodzie dopływającej do tej studni. Skład izotopowy azotanów sugeruje daleko posunięty proces denitryfikacji. Badania mikrobiologiczne wykonane przez dr Marię Chmiel (Katedra Mikrobiologii, Wydział Rolniczo–Ekonomiczny, Akademia Rolnicza w Krakowie) wykazały obecność znacznych ilości bakterii denitryfikacyjnych w tym otworze. Inne płytkie studnie zlokalizowane w centralnej części zbiornika (St–01, St–02, St–05, St–21, St–22, St–23) charakteryzują się stężeniem trytu między 8 a 11 TU, znacznymi zawartościami azotanów oraz składem izotopowym charakterystycznym dla azotanów glebowych. Studnia St–16, czerpiąca wodę z głębszych poziomów, zawiera tylko śladowe ilości azotanów o składzie izotopowym wskazującym na obecność procesu denitryfikacji (stężenie trytu nie było mierzone).

Studnia St–19 zlokalizowana w północnej części GZWP 333 czerpie wodę z warstwy wapienia muszlowego położonej głęboko pod izolującą pokrywą kajpru. Śladowe stężenie azotanów, ich skład izotopowy oraz brak trytu jednoznacznie wskazują na wodę starą (wiek > 50 lat), z zawartością azotanów silnie zredukowaną poprzez denitryfikację. Zupełnie odmienny skład izotopowy, charakterystyczny dla azotanów



Rys. 6.27. Skład izotopowy azotu, $\delta^{15}\text{N}(\text{NO}_3^-)$, w zależności od logarytmu naturalnego ze stężenia azotanów dla badanych studni GZWP 333. Dla studni: St-02, St-03, St-25 (linia ciągła, rejon Tarnowa Opolskiego) i St-29, St-30, St-36 (linia kropkowa, rejon Kosice) zidentyfikowano izotopowo proces denitryfikacji i na podstawie modelu Rayleigha wyznaczono wzbogacenie izotopowe ϵ .

glebowych występuje dla studni St-10, która dostarcza wodę również spod pokrywy kajprowej, a więc nie powinna zawierać trytu i azotanów. Zmierzone stężenie trytu wynoszące 3,7 TU, przy stężeniu azotanów 23 mgNO_3^-/L , sugerują wodę mieszaną, ze składową będącą wodą współczesną, skażoną azotanami o znacznym stężeniu, które nie podlegały procesowi denitryfikacji.

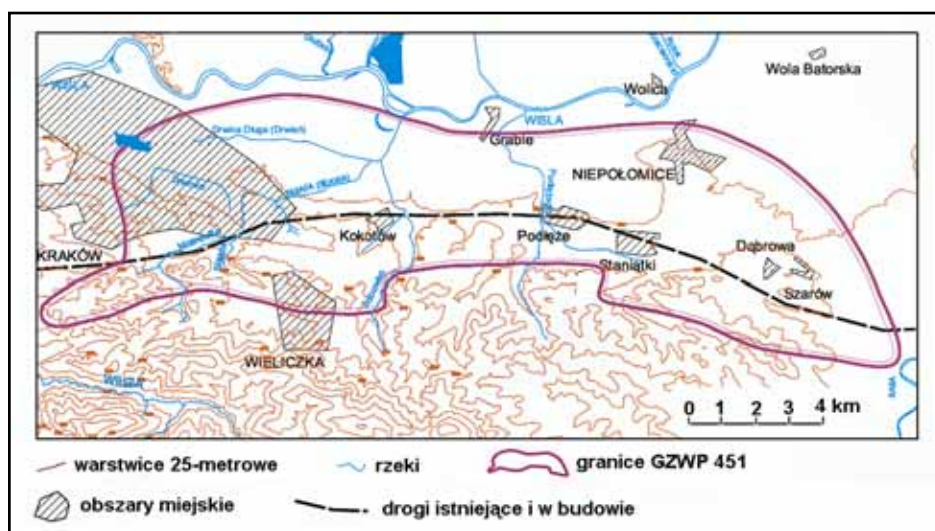
W tabeli 6.5 porównano stężenia trytu, zawartości azotanów i ich skład izotopowy dla 9 studni zlokalizowanych w centralnej części zbiornika, uzyskane w trakcie kampanii pomiarowej w 2002 roku z wartościami zmierzonymi w tych studniach w trakcie kampanii w 2005 i 2006 roku. W próbach pobranych w 2005 i 2006 roku zaobserwowano generalnie niższe stężenia azotanów w porównaniu z sytuacją w 2002 roku. Zmienność w czasie stężenia azotanów, składu izotopowego i zawartości trytu obserwowana dla niektórych studni wskazuje na dużą dynamikę systemu. Wielokrotnie opróbowywana studnia St-04 zmieniła skład izotopowy z odpowiadającego azotanom glebowym na wykazujący znacznie posunięty proces denitryfikacji, przy równoczesnych fluktuacjach stężenia azotanów. Zwiększająca się zawartość trytu sugeruje dopływ młodszej wody, co daje niejednoznaczny obraz zachowania się systemu. Zmiany zawartości trytu w latach 2002–2006 dla wszystkich studni z wyjątkiem St-04 wykazują spadek. Dalsza obserwacja, przynajmniej wybranych studni z obszaru GZWP 333, powinna pozwolić na pełniejszy opis dynamiki przyprływu wód oraz ewolucji w czasie stopnia zanieczyszczenia tego systemu azotanami.

6.3.2. Główny Zbiornik Wód Podziemnych 451 „Piaski Bogucickie”

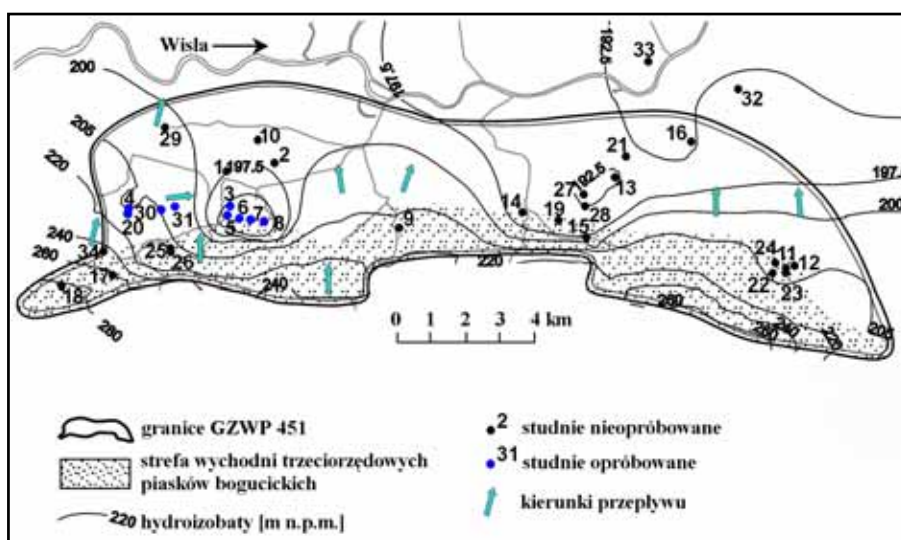
Warunki geologiczne i hydrogeologiczne

Główny Zbiornik Wód Podziemnych GZWP 451 „Piaski Bogucickie” umiejscowiony jest w małopolskim Zapadlisku Przedkarpackim – rozległym obniżeniu tektonicznym o typowych cechach rowu przedgórskiego.

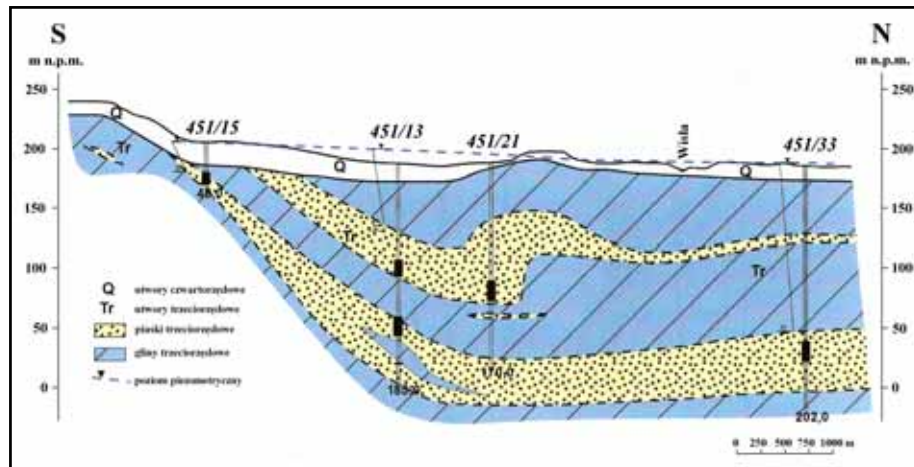
Rozciąga się równoleżnikowo i obejmuje południowo-wschodnie rejony Krakowa i część sąsiadujących z miastem gmin: Klaj, Niepołomice i Wieliczka (Rys. 6.28). Piaski bogucickie zalegające na wschód od Krakowa i tworzące GZWP 451 są naturalnym zbiornikiem wody pitnej o dobrej jakości. Obszar wodonośny to 176 km², co plasuje GZWP 451 w grupie zbiorników średniej wielkości w skali Polski. GZWP 451 tworzą piaski i piaskowce, które stopniowo opadają w kierunku północnym, począwszy od swoich wychodni na granicy Zapadliska Przedkarpackiego aż do środka trzeciorzędowego basenu (Rys. 6.29). Dwie podstawowe warstwy piasków bogucickich są rozdzielone i przykryte utworami gliniastymi. Warstwy piasków jako podłoże również posiadają glinę (Rys. 6.30).



Rys. 6.28. Orientacyjny zasięg GZWP 451 „Piaski Bogucickie” na tle uproszczonej mapy topograficznej.



Rys. 6.29. GZWP 451 „Piaski Bogucickie” z zaznaczonymi punktami poboru prób wody do pomiaru składu izotopowego azotanów.



Rys. 6.30. Przekrój hydrogeologiczny GZWP 451 „Piaski Bogucickie” w kierunku północ–południe pomiędzy miejscowościami Staniątka i Podłęże wzdłuż studni o numerach: 15, 13, 21, 33.

Piaski bogucickie tworzą formację o grubości 175–310 m rozciągającą się wzdłuż kierunku ENE–WSW, należącą do górnego badenu i leżącą na nieprzepuszczalnych warstwach glin chodenickich. Przykrywające je warstwy glin i ilów stopniowo zwiększają swoją grubość w kierunku północnym. Należą do osadów akumulowanych w obszarze delty, w pobliżu linii brzegowej o północno–wschodnim kierunku progresji, rozbudowywanych w wyniku splywu grawitacyjnego. Ku północy zbiornik zagłębia się, aż po ograniczające go osady fliszowe.

Warunki hydrologiczne należy rozpatrywać dla trzech specyficznych obszarów: (i) obszaru zasilania związanego z wychodniami piasków bogucickich na południu, (ii) zamkniętej (izolowanej) części centralnej generalnie o wodach typu artezyjskiego, oraz (iii) północnego obszaru wypływu zlokalizowanego w dolinie Wisły. Zbiornik od dołu jest ograniczony utworami chodenickimi (gliny).

Kierunek przepływu wód podziemnych jest schematycznie zaznaczony na rysunku 6.29. W okresie przedindustrialnym w izolowanej części centralnej występowała prawie wyłącznie woda typu artezyjskiego. Intensywna eksploatacja dla celów komunalnych i przemysłowych istotnie obniżyła zwierciadło wody na niektórych obszarach, doprowadzając do odwrócenia kierunku wypływu. Dostępne zasoby wody pitnej to ok. 40000 m³/dzień, przy typowym wydatku studni wahającym się w granicach: 4–200 m³/h (Kleczkowski, 1990). Wiek wody (średni czas przebywania) zmienia się od kilkunastu lat w obszarze zasilania do ok. 10 tysięcy lat w północnej części zbiornika.

Ponieważ zbiornik „Piaski Bogucickie” jest eksploatowany jako źródło wody pitnej, wymaga on monitoringu jakości wody i identyfikacji potencjalnych ognisk zanieczyszczeń. Woda uzyskiwana z odwiertów na obszarze GZWP 451 z reguły odpowiada normom, niekiedy tylko wymaga prostego uzdatniania. Wraz z infiltrującymi wodami do zbiorników podziemnych mogą przedostawać się skażenia (w tym m.in. azotany) z powierzchniowych źródeł antropogenicznych. Szacunkowy czas przenikania zanieczyszczeń z warstw powierzchniowych do zbiornika przyjęło się uznawać za parametr charakteryzujący stopień narażenia wód podziemnych (Kleczkowski i in., 1990). Wody GZWP 451 ocenia się jako słabo zagrożone (klasa C), tzn. czas migracji zanieczyszczeń szacuje się na poziomie 25–100 lat.

Opróbowywane studnie

Na obszarze GZWP 451 „Piaski Bogucickie” wykonano pomiary stężenia i składu izotopowego azotanów w wybranych studniach, zlokalizowanych w zachodniej części zbiornika, na stosunkowo małym obszarze pomiędzy Prokocimiem a Wieliczką. Położenie studni wraz z numeracją jest zaznaczone na rysunku 6.29. Próby wody zostały pobrane jesienią 2006 roku w trakcie normalnej eksploatacji studni. Próby wody pobierano do pojemników plastikowych i w ciągu kilku godzin przewożono do laboratorium, gdzie niezwłocznie mierzono stężenie azotanów kolorymetrem DR/890 (Hach) i wydzielano azotany na kolumnach z żywicą jonowymienną celem dalszej preparatyki. Dodatkowo dla wszystkich prób dokonano pomiaru zawartości trytu.

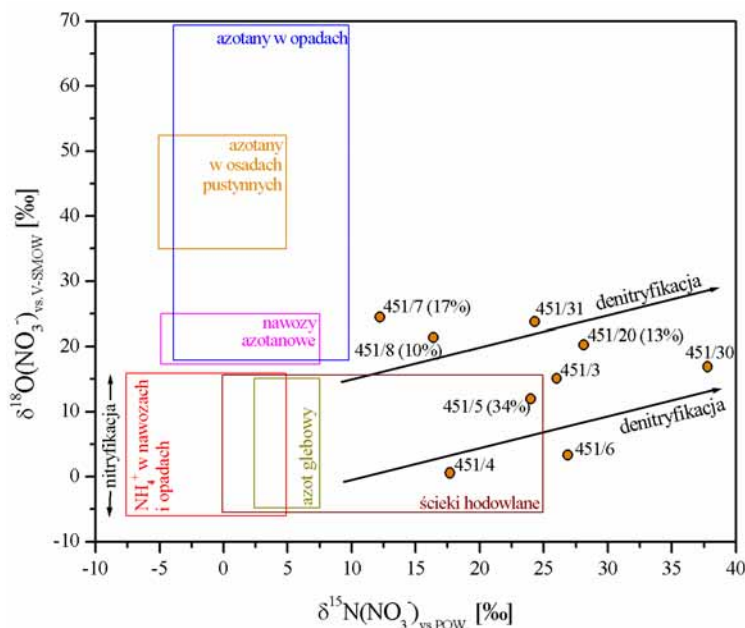
Wyniki pomiarów i dyskusja

Zmierzone stężenia NO_3^- w ośmiu próbach (Tab. 6.6) nie przekraczały wartości $2,4 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$, z wyjątkiem studni 451/8, dla której zmierzone stężenie wyniosło $4 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$. Wszystkie próbki wykazały stężenia azotanów poniżej tła hydrogeochemicznego ($5 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$). Trzy z nich (jedna w Prokocimiu i dwie w Wieliczce) wykazały stężenia azotanów znacznie poniżej tła hydrogeochemicznego ($<1 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$). Pozostałe trzy studnie w Prokocimiu posiadały stężenia w granicach $1,0\text{--}1,4 \text{ mgNO}_3^-/\text{L}$. W zasilających Wieliczkę studniach zakres ten był znacznie szerszy i wynosił $1,9\text{--}4,0 \text{ mg/L}$. Wymienione studnie czerpią wodę z różnych głębokości zawierających się w przedziale od 27 m do 65 m.

Tab. 6.6. Stężenie i skład izotopowy azotanów rozpuszczonych w wodzie, zawartość trytu oraz stosunek stężeń azotu denitryfikacyjnego do równowagowego ($\text{N}_{2(\text{den.})}/\text{N}_{2(\text{równ.})}$) (Zuber i in., 2005) zmierzone w próbach z badanych studni GZWP 451 „Piaski Bogucickie”. Skład izotopowy azotu wyrażono względem azotu powietrznego, a tlenu względem standardu V-SMOW. Oznaczenie: n.m. – nie mierzono.

Próbka	Opis	NO_3^- [mg/L]	$\delta^{15}\text{N}$ [‰]	$\delta^{18}\text{O}$ [‰]	Tryt [TU]	$\text{N}_{2(\text{den.})}/\text{N}_{2(\text{równ.})}$
GZWP 451/3	Fabryka Drożdży	$0,6 \pm 0,1$	$+26,0 \pm 0,3$	$+15,1 \pm 0,6$	$0,0 \pm 0,5$	n.m.
GZWP 451/4	Szpital Dziecięcy w Prokocimiu	$1,0 \pm 0,1$	$+17,7 \pm 0,3$	$+0,6 \pm 0,6$	$19,9 \pm 0,9$	n.m.
GZWP 451/5	ZGK „Wieliczka”	$2,4 \pm 0,1$	$+24,0 \pm 0,3$	$+12,0 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,3$	0,34
GZWP 451/6	ZGK „Wieliczka”	$0,5 \pm 0,1$	$+26,9 \pm 0,3$	$+3,3 \pm 0,6$	$12,7 \pm 0,7$	n.m.
GZWP 451/7	ZGK „Wieliczka”	$1,9 \pm 0,1$	$+12,2 \pm 0,3$	$+24,5 \pm 0,6$	$12,1 \pm 0,6$	0,17
GZWP 451/8	ZGK „Wieliczka”	$4,0 \pm 0,1$	$+16,4 \pm 0,3$	$+21,4 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,5$	0,10
GZWP 451/20	Szpital Dziecięcy w Prokocimiu	$0,5 \pm 0,1$	$+28,1 \pm 0,3$	$+20,3 \pm 0,6$	n.m.	0,13
GZWP 451/30	studnia publiczna, ul. Heleny	$1,3 \pm 0,1$	$+37,8 \pm 0,3$	$+16,9 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,3$	n.m.
GZWP 451/31	studnia publiczna, ul. Jerzmanowskiego	$1,4 \pm 0,1$	$+24,3 \pm 0,3$	$+23,8 \pm 0,6$	$11,4 \pm 0,6$	n.m.

Zmierzone wartości składu izotopowego azotanów (Rys. 6.31) można podzielić na dwie grupy. Studnie o numerach: 4, 5, 3, i 6 leżą w obszarze właściwym dla bezpośredniego skażenia organicznego ściekami hodowlanymi (4 i 5) oraz w bezpośrednim sąsiedztwie tego obszaru (3 i 6). Pozostałe studnie (numery: 7, 8, 20, 30, 31) leżą w zakresie składów izotopowych właściwych dla azotanów glebowych, znacznie przetworzonych poprzez procesy typu denitryfikacji. W liczbie tych ostatnich są dwie studnie (7 i 8) zasilające wodę Wieliczkę i trzy (20, 30, 31) z okolic Prokocimia.



Rys. 6.31. Skład izotopowy azotu i tlenu w azotanach rozpuszczonych w wodach podziemnych GZWP 451 „Piaski Bogucickie”. Zaznaczono zakresy składu izotopowego dla różnych typów źródeł i skażeń. Strzałki wskazują zmiany składu izotopowego w wyniku denitryfikacji. Przy wybranych punktach w nawiasach podano (w %) wartości stosunku $\text{N}_{2(\text{den.})}/\text{N}_{2(\text{równ.})}$.

W przypadku wód podziemnych zachodzenie procesu denitryfikacji jest związane z produkcją gazowego N_2 , który pozostaje rozpuszczony w wodzie. Jeśli nie następuje naturalne odgazowanie wody, nadmiar N_2 może służyć jako wskaźnik procesu denitryfikacji. W ramach wcześniejszych badań GZWP 451 zostały wykonane pomiary nadmiarowego N_2 dla niektórych studni. Szczegółowy opis techniki pomiaru i sposobu wyliczenia nadmiarowego N_2 przedstawili Zuber i in. (2005). Wartości stosunku $\text{N}_{2(\text{den.})}/\text{N}_{2(\text{równ.})}$ podane zostały w tabeli 6.6. Wyznaczone wartości $\text{N}_{2(\text{den.})}/\text{N}_{2(\text{równ.})}$ zawierają się w zakresie od 10 do 34% w stosunku do poziomu równowagi. Obecność podwyższonej ilości N_2 potwierdza obserwowane przesunięcia w składzie izotopowym azotanów, będąc równocześnie niezależnym znacznikiem wskazującym zachodzenie procesu denitryfikacji w obrębie złoża w warunkach układu zamkniętego.

Zmierzona zawartość trytu (Tab. 6.6) dla studni nr 3 wyniosła 0 TU, natomiast dla pozostałych wahała się w granicach 1,7–19,9 TU. Wyniki pomiarów stężenia trytu jak również innych znaczników środowiskowych interpretowane były w ramach modeli rezerwuarowych oraz posłużyły do kalibracji i walidacji trójwymiarowego modelu przepływu i transportu opracowanego dla tego systemu (Zuber i in., 2005).

Podsumowanie

Woda należy do podstawowych składników środowiska umożliwiających życie i prawidłowe funkcjonowanie organizmów żywych. Stąd, obowiązkiem naszej cywilizacji jest ochrona zasobów wód dostępnych na kuli ziemskiej. Jakość tych zasobów jest obecnie zagrożona w wielu rejonach świata. Jednym z czynników zagrożenia są azotany pochodzenia antropogenicznego rozpuszczone w wodach powierzchniowych i podziemnych.

Efektywne zarządzanie kontrolą jakości wód i opracowywanie rozwiązań dla zbiorników i cieków wodnych już zanieczyszczonych azotanami wymaga m.in. narzędzi do identyfikacji źródeł zanieczyszczeń i badania procesów determinujących poziom zawartości azotanów. Badania składu izotopowego azotanów stanowią cenne uzupełnienie tradycyjnych analiz chemicznych. W wielu przypadkach, ze względu na odmienny skład izotopowy azotu i tlenu w azotanach pochodzących z różnych źródeł azotanów możliwa jest ich identyfikacja. Ponadto, transformacje związków azotu w środowisku wodnym (np. proces denitryfikacji) zmieniają skład izotopowy azotanów w sposób, który można później identyfikować na podstawie analiz izotopowych.

Podstawowym celem przedstawionej pracy doktorskiej było opracowanie metodyki określania składu izotopowego tlenu i azotu w azotanach rozpuszczonych w wodzie i wszechstronne jej przetestowanie w oparciu o pobrane próby wód pochodzących z różnego typu środowisk. Wyniki badań przedstawione powyżej uzasadniają stwierdzenie, że cel pracy został w pełni osiągnięty.

W niniejszej pracy doktorskiej wdrożono, rozwinęto i przetestowano dwie metody wyznaczania składu izotopowego azotanów rozpuszczonych w wodzie. Pierwsza z wdrożonych metod opiera się na konwersji jonów azotanowych NO_3^- do azotu cząsteczkowego oraz do dwutlenku węgla. Skład izotopowy tych gazów jest następnie analizowany z wykorzystaniem spektrometrii mas. Druga procedura wykorzystuje bakterie denitryfikacyjne *Pseudomonas aureofaciens* redukujące azotany do podtlenku azotu (N_2O), umożliwiającego jednoczesne wyznaczenie składu izotopowego obu pierwiastków. Dotychczas, metoda bakteryjna wykorzystywana była wyłącznie do analiz małych prób wód, z pomiarem składu izotopowego N_2O prowadzonym przy pomocy spektrometrii mas z ciągłym przepływem gazu (CF-IRMS). W ramach niniejszej pracy zaadoptowano metodę bakteryjną dla większych próbek wód, umożliwiających analizę składu izotopowego N_2O *off-line*, z wykorzystaniem klasycznej spektrometrii IRMS dostępnej w zdecydowanej większości laboratoriów izotopowych na świecie.

Opracowane w pracy procedury analityczne zostały wykorzystane w pilotażowych pomiarach składu izotopowego azotanów występujących w różnych typach wód reprezentujących odpowiednio: (i) opady atmosferyczne (Kraków oraz Kasprowy Wierch), (ii) wody powierzchniowe (bezodpływowy zalew poeksploatacyjny Kryspinów I oraz rzeka Wisła w rejonie Krakowa), oraz (iii) zbiorniki wód podziemnych (GZWP 333 i GZWP 451) stanowiące regionalne zaplecze zaopatrzenia w wodę pitną, odpowiednio w rejonie Opola i Krakowa. Przeprowadzone pomiary składu izotopowego azotanów dla wymienionych powyżej zbiorników wód podziemnych stanowiły element prac nad szerszym rozpoznaniem hydrogeologicznym tych ważnych gospodarczo zasobów.

Przeprowadzone analizy prób wód opadowych i powierzchniowych uwiaryściły znaczną zmienność sezonową stężeń azotanów i ich składu izotopowego, przy czym skala tej zmienności zależy od typu wód i

Podsumowanie

lokalizacji miejsca poboru. W szczególności, zarejestrowano silną zmienność sezonową $\delta^{15}\text{N}$ azotanów rozpuszczonych w opadach zbieranych w Krakowie i na Kasprowym Wierchu, znacznie przekraczającą zakres zmienności dotychczas podawany w literaturze. Dotychczas nie były raportowane w literaturze dane o składzie izotopowym opadów zbieranych w głębi kontynentów. Ponadto, pokazano wpływ aglomeracji krakowskiej na stężenie i skład izotopowy ładunku azotanów niesionych przez Wisłę w przekroju sezonowym. W analizowanych próbach wód podziemnych stwierdzono występowanie w niektórych ujęciach azotanów pochodzących ze źródeł antropogenicznych, jak również występowanie procesu denitryfikacji. Obecność procesów denitryfikacyjnych stwierdzono również dla badanego zbiornika wód powierzchniowych.

Przeprowadzone badania terenowe pokazały, że rozwinięte w ramach niniejszej pracy procedury analityczne pozwalają na w miarę szybkie i precyzyjne określanie składu izotopowego azotu i tlenu azotanów rozpuszczonych w wodach o różnym pochodzeniu. Hydrogeologia krajowa uzyskała w ten sposób nowe narzędzie badawcze, szczególnie istotne z punktu widzenia narastającego problemu zanieczyszczenia wód podziemnych azotanami. Narzędzie to może być również wykorzystywane w dalszych pracach badawczych związanych z dynamiką cyklu obiegu azotu w środowisku.

Bibliografia

- Amberger, A. i Schmidt, H.-L. (1987). Natürliche Isotopengehalte von Nitrat als Indikatoren für Dessen Herkunft. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Tom 51, Nr 10, Str. 2699–2705.
- Andersson, K.K. i Hooper, A.B. (1983). O₂ and H₂O Are Each the Source of One O in NO₂⁻ Produced from NH₃ by *Nitrosomonas*: ¹⁵N-NMR Evidence. *FEBS Letters*, Tom 164, Nr 2, Str. 236–240.
- Aravena, R.; Evans, M.L. i Cherry, J.A. (1993). Stable Isotopes of Oxygen and Nitrogen in Source Identification of Nitrate from Septic Systems. *Ground Water*, Tom 31, Nr 2, Str. 180–186.
- Aravena, R. i Robertson, W.D. (1998). Use of Multiple Isotope Tracers to Evaluate Denitrification in Ground Water: Study of Nitrate from a Large-Flux Septic System Plume. *Ground Water*, Tom 36, Nr 6, Str. 975–982.
- Ash-Bernal, R. i Wise, R. (2004). Acquired Methemoglobinemia: A Retrospective Series of 138 Cases at 2 Teaching Hospitals. *Medicine*, Tom 83, Nr 5, Str. 265–273.
- Batchelor, B. i Lawrence, A.W. (1978). A Kinetic Model for Autotrophic Denitrification Using Elemental Sulfur. *Water Research*, Tom 12, Nr 12, Str. 1075–1084.
- Bateman, A.S. i Kelly, S.D. (2007). Fertilizer Nitrogen Isotope Signatures. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, Tom 43, Nr 3, Str. 237–247.
- Bethe, H.A. (1939). Energy Production in Stars. *Physical Review*, Tom 55, Nr 5, Str. 434–456.
- Bigeleisen, J. i Wolfsberg, M. (1958). Theoretical and Experimental Aspects of Isotope Effects in Chemical Kinetics. *Advances in Chemical Physics*, Tom 1, Str. 15–76.
- Böhlke, J.K.; Gwinn, C.J. i Coplen, T.B. (1993). New Reference Materials for Nitrogen–Isotope–Ratio Measurements. *Geostandards Newsletter*, Tom 17, Nr 1, Str. 159–164.
- Böhlke, J.K. i Denver, J.M. (1995). Combined Use of Ground–Water Dating, Chemical and Isotopic Analyses to Resolve the History and Fate of Nitrate Contamination in Two Agricultural Watersheds, Atlantic Coastal Plain, Maryland. *Water Resources Research*, Tom 31, Nr 9, Str. 2319–2339.
- Böhlke, J.K.; Erickson, G.E. i Revesz, K. (1997). Stable Isotope Evidence for an Atmospheric Origin of Desert Nitrate Deposition Northern Chile and Southern California, U.S.A. *Chemical Geology*, Tom 136, Nr 1–2, Str. 135–152.
- Böttcher, J.; Strebel, O.; Voerkelius, S. i Schmidt, H.L. (1990). Using Isotope Fractionation of Nitrate–Nitrogen and Nitrate–Oxygen for Evaluation of Microbial Denitrification in a Sandy Aquifer. *Journal of Hydrology*, Tom 114, Nr 3–4, Str. 413–424.
- Bräuer, K. i Strauch, G. (2000). An Alternative Procedure for the ¹⁸O Measurement of Nitrate Oxygen. *Chemical Geology*, Tom 168, Nr 3–4, Str. 283–290.
- Broadbent, F.E.; Rauschkolb, R.S.; Lewis, K.A. i Chang, G.Y. (1980). Spatial Variability in Nitrogen–15 and Total Nitrogen in Some Virgin and Cultivated Soils. *Soil Science Society of America Journal*, Tom 44, Nr 3, Str. 524–527.
- Brzozowska, A. (2004). Toksykologia Żywności. Przewodnik do Ćwiczeń. Wydawnictwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa.
- Burns R.C. i Hardy, R.W.F. (1975). Nitrogen Fixation in Bakteria and Higher Plants. *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Springer Verlag, Heidelberg–Nowy Jork, Tom 21.
- Casciotti, K.L.; Sigman, D.M.; Galanter Hastings, M.; Böhlke, J.K. i Hilkert, A. (2002). Measurement of the Oxygen Isotopic Composition of Nitrate in Seawater and Freshwater Using the Denitrifier Method. *Analytical Chemistry*, Tom 74, Nr 19, Str. 4905–4912.
- Chmura, W.; Duliński, M.; Róžański, K.; Żurek, A.; Kryza, J. i Weise, S. (2003). Wstępne Wyniki Pomiarów Składu Izotopowego Azotanów Rozpuszczonych w Wodach Podziemnych GZWP 333 – Isotopic Composition of Nitrates Dissolved in Groundwaters of the GZWP 333 – Preliminary Results. *Współczesne Problemy Hydrogeologii*, Tom 11, Część 2, Politechnika Gdańska. Wydział Budownictwa Wodnego i Inżynierii Środowiska, Gdańsk, Str. 73–80.
- Christensen, S. i Tiedje, J.M. (1988). Sub-Parts–Per–Billion Nitrate Method: Use of an N₂O–Producing Denitrifier to Convert NO₃⁻ or ¹⁵NO₃⁻ to N₂O. *Applied and Environmental Microbiology*, Tom 54, Nr 6, Str. 1409–1413.
- Cline, J.D. i Kaplan, I.R. (1975). Isotopic Fractionation of Dissolved Nitrate During Denitrification in the Eastern Tropical North Pacific Ocean. *Marine Chemistry*, Tom 3, Nr 4, Str. 271–299.
- Coplen, T.B. (1995). Discontinuance of SMOW and PDB. *Nature*, Tom 375, Nr 6529, Str. 285.
- Coplen, T.B. (1996). New Guidelines for Reporting Stable Hydrogen, Carbon and Oxygen Isotope–Ratio Data. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Tom 60, Nr 17, Str. 3359–3360.
- Crutzen, P.J. (1988). Tropospheric Ozone: An Overview. W: I.S.A. Isaksen (Wyd.), *Tropospheric Ozone–Regional and Global Scale Interactions*, NATO ASI Series C, Tom 227, Str. 3–32.
- DA (1991). Dyrektywa 91/676/EWG Rady z Dnia 12 Grudnia 1991 Roku Dotyczącą Ochrony Wód przed Zanieczyszczeniami Powodowanymi przez Azotany Pochodzenia Rolniczego.
- Delwiche, C.C. i Steyn, P.L. (1970). Nitrogen Isotope Fractionation in Soils and Microbial Reaction. *Environmental Science and Technology*, Tom 4, Nr 11, Str. 929–935.

- Delwiche, C.C. (1981).** The Nitrogen Cycle and Nitrous Oxide. W: C.C. Delwiche (Wyd.), *Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide*, John Wiley, Nowy Jork, Str. 1–15.
- DR/890 Colorimeter Procedures Manual (2005).**
- Duff, J.H. i Triska, F.J. (1990).** Denitrification in Sediments from the Hyporheic Zone Adjacent to a Small Forested Stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1990, Tom 47, Nr 6, Str. 1140–1147.
- Durka, W.; Schulze, E.–D.; Gebauer, G. i Voerkelius, S. (1994).** Effects of Forest Decline on Uptake and Leaching of Deposited Nitrate Determined from ^{15}N and ^{18}O Measurements. *Nature*, Tom 372, Nr 6508, Str. 765–767.
- Ellenhorn, M.J. i Barceloux, D.G. (1988).** Nitrates, Nitrites and Methemoglobinemia. W: *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, Nowy Jork, Elsevier, Str. 844–851.
- Feigin, A.; Shearer, G.; Kohl, D.H. i Commoner, B. (1974).** The Amount and Nitrogen-15 Content of Nitrate in Soil Profiles from Two Central Illinois Fields in a Corn–Soybean Rotation. *Soil Science Society of America Journal*, Tom 38, Nr 3, Str. 465–471.
- Filella, I. i Peñuelas, J. (2006).** Daily, Weekly and Seasonal Relationships among VOCs, NO_x and O_3 in a Semi–Urban Area near Barcelona. *Journal of Atmospheric Chemistry*, Tom 54, Nr 2, Str. 189–201.
- Fogel, M.L. i Cifuentes, L.A. (1993).** Isotope Fractionation During Primary Production. W: M.H. Engel & S.A. Macko (Wyd.), *Organic Geochemistry*, Plenum Press, Nowy Jork, Str. 73–98.
- Freney, J.R.; Simpson, J.R. i Denmead, O.T. (1983).** Volatilization of Ammonia. W: J.R. Freney & J.R. Simpson (Wyd.), *Gaseous Loss of Nitrogen from Plant–Soil Systems*, Str.1–32.
- Freyer, H.D. (1978).** Seasonal Trends of NH_4^+ and NO_3^- Nitrogen Isotope Composition in Rain Collected at Julich, Germany. *Tellus*, Tom 30, Nr 1, Str. 83–92.
- Freyer, H.D. (1991).** Seasonal Variation of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Ratios in Atmospheric Nitrate Species. *Tellus B*, Tom 43, Nr 1, Str. 30–44.
- Fry, B.(1991).** Stable Isotope Diagrams of Freshwater Foodwebs. *Ecology*, Tom 72, Nr 6, Str. 2293–2297.
- Fukada, T.; Hiscock, K.M.; Dennis, P.F. i Grischek, T. (2003).** A Dual Isotope Approach to Identify Denitrification in Groundwater at River–Bank Infiltration Site. *Water Research*, Tom 37, Nr 13, Str. 3070–3078.
- Galloway, J.N. (2005).** The Global Nitrogen Cycle – How Is It Changing? *Global Change NewsLetter*, Nr 64, Str. 4–6.
- Galloway, J.N. (2006).** Nitrogen. An Essential Ingredient for Life and Food. American Meteorological Society's Environmental Science Seminar Series. Human Alteration of the Nitrogen Cycle: Implications for Plant Growth, Food Supply, Climate, Water Quality and Human Health. Russell Senate Office Building, Washington, DC.
- Galloway, J.N. i Cowling, E.B. (2002).** Reactive Nitrogen and the World: 200 Years of Change. *AMBIO*, Tom 31, Nr 2, Str. 64–71.
- Galloway, J.N.; Aber, J.D.; Erisman, J.W.; Seitzinger, S.P.; Howarth, R.W.; Cowling, E.B. i Cosby, B.J. (2003).** The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 2003, Tom 53, Nr 4, Str. 341–356.
- Galloway, J.N.; Dentener, F.J.; Capone, D.G.; Boyer, E.W.; Howarth, R.W.; Seitzinger, S.P.; Asner, G.P.; Cleveland, C.C.; Green, P.A.; Holland, E.A.; Karl, D.M.; Michaels, A.F.; Porter, J.H.; Townsend, A.R. i Vöosmarty, C.J. (2004).** Nitrogen Cycles: Past, Present and Future. *Biogeochemistry*, Tom 70, Nr 2, Str. 153–226.
- Garrels, R.M. (1982).** Introduction: Chemistry of the Troposphere – Some Problems and Their Temporal Frameworks. W: E.D. Goldberg (Wyd.), *Atmospheric Chemistry*, Springer–Verlag, Nowy Jork, Str. 3–16.
- Garten, C.T., Jr. (1992).** Nitrogen Isotope Composition of Ammonium and Nitrate in Bulk Precipitation and Forest Troughfall. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, Tom 47, Nr 1, Str. 33–45.
- Garten, C.T., Jr. (1993).** Variation in Foliar ^{15}N Abundance and the Availability of Soil Nitrogen on Walker Branch Watershed. *Ecology*, Tom 74, Nr 7, Str. 2098–2113.
- Garten, C.T., Jr. (1995).** Stable Nitrogen Isotope Ratios in Wet and Dry Nitrate Deposition Collected with an Artificial Tree. *Tellus B*, Tom 47, Nr 1, Str. 60–64.
- Goerges, T. i Dittert, K. (1998).** Improved Diffusion Technique for $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Analysis of Ammonium and Nitrate from Aqueous Samples by Stable Isotope Spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, Tom 29, Str. 361–368.
- Granger, J.; Sigman, D.M.; Prokopenko, M.G.; Lehmann, M.F. i Tortell, P.D. (2006).** A Method for Nitrite Removal in Nitrate N and O Isotope Analyses. *Limnology & Oceanography: Methods*, Tom 4, Str. 205–212.
- Greenberg, E.P. i Becker, G.E. (1977).** Nitrous Oxide as End Product of Denitrification by Strains of Fluorescent Pseudomonas. *Canadian Journal of Microbiology*, Tom 23, Nr 7, Str. 903–907.
- Hahn, J. i Crutzen, P.J. (1982).** The Role of Fixed Nitrogen in Atmospheric Photochemistry. W: W.D.P. Stewart & T. Rosswall (Wyd.), *The Nitrogen Cycle*, The Royal Society, Londyn, Str. 219–239.
- Hastings, M.G., Sigman, D.M. i Lipschultz, F. (2003).** Isotopic Evidence for Source Changes of Nitrate in Rain at Bermuda. *Journal of Geophysical Research*, Tom 108, Nr D24, Str. 22.1–22.12.
- Heaton, T.H.E. (1986).** Isotopic Studies of Nitrogen Pollution in the Hydrosphere and Atmosphere: A Review. *Chemical Geology: Isotope Geoscience Section*, Tom 59, Str. 87–102.

- Heaton, T.H.E. (1990). $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Ratios of NO_x from Vehicle Engines and Coal-Fired Power Stations. *Tellus B*, Tom 42, Nr 3, Str. 304–307.
- Heaton, T.H.F. i Collett, G.M. (1985). The Analysis of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Ratios in Natural Samples, with Emphasis on Nitrate and Ammonium in Precipitation. CSIR Research Report 624, National Physical Research Laboratory, Council for Scientific and Industrial Research, Pretoria, South Africa.
- Högberg, P. (1997). ^{15}N Natural Abundance in Soil-Plant Systems. *New Phytologist*, Tom 137, Nr 2, Str. 179–203.
- Hoell, J.M.; Harward, C.N. i Williams, B.S. (1980). Remote Infrared Heterodyne Radiometer Measurements of Atmospheric Ammonia Profiles. *Geophysical Research Letters*, Tom 7, Nr 5, Str. 313–316.
- Hoering, T. (1957). The Isotopic Composition of Ammonia and Nitrate Ion in Rain. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Tom 12, Nr 1–2, Str. 97–102.
- Højberg, O.; Johansen, H.S. i Sørensen, J. (1994). Determination of ^{15}N Abundance in Nanogram Pools of NO_3^- and NO_2^- by Denitrification Bioassay and Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, Tom 60, Nr 7, Str. 2467–2472.
- Hollocher, T.C. (1984). Source of the Oxygen Atoms of Nitrate in the Oxidation of Nitrite by *Nitrobacter agilis* and Evidence Against a P–O–N Anhydride Mechanism in Oxidative Phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Tom 233, Nr 2, Str. 721–727.
- Hunkeler, D. (2002). Quantification of Isotope Fractionation in Experiments with Deuterium-Labeled Substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, Tom 68, Nr 10, Str. 5205–5207.
- Hübner, H. (1986). Isotope Effects of Nitrogen in the Soil and Biosphere. W: P. Fritz & J.C. Fontes (Wyd.), *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, Tom 2b, The Terrestrial Environment*, Elsevier, Str. 361–425.
- IAEA (2002). IAEA Analytical Quality Control Services. Reference Materials Catalogue. Michael Campbell (Wyd.), Chemistry Unit, Seibersdorf, IAEA.
- IAEA (2004). IAEA Analytical Quality Control Services. Reference Materials Catalogue 2004–2005. Michael Campbell (Wyd.), Chemistry Unit, Seibersdorf, IAEA.
- Jaffe, D.A. (1992). The Nitrogen Cycle. W: S.S. Butcher, R.J. Charlson, G.H. Orians & G.V. Wolfe (Wyd.), *Global Biogeochemical Cycles*, Academic Press Inc., San Diego, Str. 263–284.
- Johnston, J.C. i Thieme, M.H. (1997). The Isotopic Composition of Tropospheric Ozone in Three Environments. *Journal of Geophysical Research*, Tom 102, Nr D21, Str. 25395–25404.
- Johnston, A.M.; Scrimgeour, C.M.; Henry, M.O.; Handley, L.L. (1999). Isolation of $\text{NO}_3\text{-N}$ as Phenylazo-2-Naphthol (Sudan-1) for Measurement of Delta N-15. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Tom 13, Nr 14, Str. 1531–1534.
- Junk, G. i Svec, H.J. (1958). The Absolute Abundance of the Nitrogen Isotopes in the Atmosphere and Compressed Gas from Various Sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Tom 14, Nr 3, Str. 234–243.
- Karamanos, E.E. i Rennie, D.A. (1980). Variations in Natural N-15 Abundance as an Aid in Tracing Fertilizer Transformations. *Soil Science Society of America Journal*, Tom 44, Nr 1, Str. 57–62.
- Kendall, C. i Grim, E. (1990). Combustion Tube Method for Measurement of Nitrogen Isotope Ratios Using Calcium Oxide for Total Removal of Carbon Dioxide and Water. *Analytical Chemistry*, Tom 62, Nr 5, Str. 526–529.
- Kendall, C. (1998). Chapter 16: Tracing Nitrogen Sources and Cycling in Catchments. W: C. Kendall & J.J. McDonnell (Wyd.), *Isotope Tracers in Catchments Hydrology*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Str. 519–576.
- Kendall, C. i Aravena, R. (2000). Chapter 9: Nitrate Isotopes in Groundwater Systems. W: Peter G. Cook & Andrew L. Herzeg (Wyd.), *Environmental Tracers in Subsurface Hydrology*, Kluwer Academic Publishers, Str. 261–297.
- Kleczkowski, A.S. i in. (1990). The Map of the Critical Protection Areas (CPA) of the Major Groundwater Basins (MGWB) in Poland. University of Mining and Metallurgy (AGH), Cracow.
- Klimaszewski, M. (1981). Geomorfologia. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- Koba, K.; Tokuchi, N.; Wada, E.; Nakajima, T. i Iwatsubo, G. (1997). Intermittent Denitrification: The Application of a ^{15}N Natural Abundance Method to a Forested Ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Tom 61, Nr 23, Str. 5043–5050.
- Krajewski, M. (2001). Upper Jurassic Chalky Limestones in the Zakrzówek Horst, Kraków, Kraków-Wieluń Upland (South Poland). *Annales Societatis Geologorum Poloniae*, Tom 71, Nr 1, Str. 43–51.
- Kreitler, C.W. (1975). Determining the Source of Nitrate in Ground Water by Nitrogen Isotope Studies: Austin, Texas. University of Texas, Austin, Bureau of Economic Geology, Report of Investigations Nr 83.
- Kreitler, C.W. (1979). Nitrogen-Isotope Ratio Studies of Soils and Groundwater Nitrate from Alluvial Fan Aquifers in Texas. *Journal of Hydrology*, Tom 42, Nr 1–2, Str. 147–170.
- Kroopnick, P.M. i Craig, H. (1972). Atmospheric Oxygen: Isotopic Composition and Solubility Fractionation. *Science*, Tom 175, Nr 1017, Str. 54–55.
- Kryza, J. i Staśko, S. (2000). Groundwater Flow Rate and Contaminant Migration in Fissure-Karstic Aquifer of Opole Triassic System. *Environmental Geology*, Tom 39, Nr 3–4, Str. 384–389.

- Kumar, S.; Nicholas, D.J.D. i Williams, E.H. (1983). Definitive ^{15}N NMR Evidence that Water Serves as a Source of 'O' during Nitrite Oxidation by Nitrobacter agilis. *FEBS Letters*, Tom 152, Nr 1, Str. 71–74.
- Létolle, R. (1980). Nitrogen-15 in the Natural Environment. W: P. Fritz & J.Ch. Fontes (Wyd.), *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry*, Tom 1, Elsevier, Nowy Jork, Str. 407–433.
- Liu, K.-K. i Kaplan, I.R. (1989). The Eastern Tropical Pacific as a Source of ^{15}N -Enriched Nitrate in Seawater Off Southern California. *Limnology and Oceanography*, Tom 34, Nr 5, Str. 820–830.
- Liu, K.-K.; Su, M.-J.; Hsueh, C.-R. i Gong, G.C. (1996). The Nitrogen Isotopic Composition of Nitrate in the Kuroshio Water Northeast of Taiwan: Evidence for Nitrogen Fixation as a Source of Isotopically Light Nitrate. *Marine Chemistry*, Tom 54, Nr 3–4, Str. 273–292.
- Liu, S.C.; Trainer, M.; Fehsenfeld, F.C.; Parrish, D.D.; Williams, E.J.; Fahey, D.W.; Hubler, G. i Murphy, P.C. (1987). Ozone Production in the Rural Troposphere and the Implications for Regional and Global Ozone Distributions. *Journal of Geophysical Research*, Tom 92, Nr D4, Str. 4191–4207.
- Liu, X.; Trainer, M. i Liu, S.C. (1988). On the Nonlinearity of the Tropospheric Ozone Production. *Journal of Geophysical Research*, Tom 93, Nr D12, Str. 15879–15888.
- Longley, I.D.; Inglis, D.W.F.; Gallagher, M.W.; Williams, P.I.; Allan, J.D. i Coe, H. (2005). Using NO_x and CO Monitoring Data to Indicate Fine Aerosol Number Concentrations and Emissions Factors in Three UK Conurbations. *Atmospheric Environment*, Tom 39, Nr 28, Str. 5157–5169.
- Lozovik, P.A. i Potapova, I.Y. (2006). Input of Chemical Substances with Atmospheric Precipitation onto the Territory of Karelia. *Water Resources*, Tom 33, Nr 1, Str. 104–111.
- Majchrzak, D. (1985). Wpływ Azotanów i Azotynów na Organizm Ludzi i Zwierząt. *Żywnienie Człowieka i Metabolizm*, Tom 12, Nr 4, Str. 298–304.
- Mariotti, A.; Pierre, D.; Vedy, J.C.; Bruckert, S. i Guillemot, J. (1980). The Abundance of Natural Nitrogen 15 in the Organic Matter of Soils along an Altitudinal Gradient (Chablais, Haute Savoie, France). *Catena*, 1980, Tom 7, Nr 4, Str. 293–300.
- Mariotti, A.; Germon, J.C.; Hubert, P.; Kaiser, P.; Letolle, R.; Tardieux, A. i Tardieux, P. (1981). Experimental Determination of Nitrogen Kinetic Isotope Fractionation: Some Principles; Illustration for the Denitrification and Nitrification Processes. *Plant and Soil*, Tom 62, Nr 3, Str. 413–430.
- Mariotti, A. (1983). Atmospheric Nitrogen is a Reliable Standard for Natural ^{15}N Abundance Measurements. *Nature*, Tom 303, Nr 5919, Str. 685–687.
- Mariotti, A.; Landreau, A. i Simon, B. (1988). ^{15}N Isotope Biogeochemistry and Natural Denitrification Process in Groundwater: Application to the Chalk Aquifer of Northern France. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Tom 52, Nr 7, Str. 1869–1878.
- Matyszkiewicz, J. (1997). Stromatacties Cavities and Stromatactis-like Cavities in the Upper Jurassic Carbonate Buildups at Mlynka and Zabierzów (Oxfordian, Southern Poland). *Annales Societatis Geologorum Poloniae*, Tom 67, Nr 1, Str. 45–55.
- McElroy, M.B.; Elkins, J.W.; Wofsy, S.C. i Yung, Y.L. (1976). Sources and Sinks for Atmospheric N_2O . *Reviews of Geophysics and Space Physics*, Tom 14, Nr 2, Str. 13–150.
- McIlvin, M.R. i Altabet, M.A. (2005). Chemical Conversion of Nitrate and Nitrite to Nitrous Oxide for Nitrogen and Oxygen Isotopic Analysis in Freshwater and Seawater. *Analytical Chemistry*, Tom 77, Nr 17, Str. 5589–5595.
- Morawska, L.; Jayaratne, E.R.; Mengerson, K.; Jamriska, M. i Thomas, S. (2002). Differences in Airborne Particle and Gaseous Concentrations in Urban Air between Weekdays and Weekends. *Atmospheric Environment*, Tom 36, Nr 27, Str. 4375–4383.
- Nadelhoffer, K.J. i Fry, B. (1994). Nitrogen Isotope Studies in Forest Ecosystems. W: K. Lajtha & R.M. Michener (Wyd.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Str. 22–44.
- O'Neill, P. (1993). Rozdział 5: Nitrogen. W: Chapman & Hall (Wyd.), *Environmental Chemistry*, St. Edmundsbury Press, Str. 96–113.
- Pieczka, D. (2003). Zmiany Jakości Wód Podziemnych na Obszarze GZWP 333 „Opole – Zawadzkie”. Praca magisterska, Wydział Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska, AGH, Kraków.
- Postma, D.C.; Boesen, H.; Kristiansen, H. i Larsen, F. (1991). Nitrate Reduction in an Unconfined Sandy Aquifer: Water Chemistry, Reduction Processes and Geochemical Modeling. *Water Resources Research*, Tom 27, Nr 8, Str. 2027–2045.
- Price, D. (1998). Methemoglobinemia. W: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 6th Edition*, Praca Zbiorowa, Str. 1507–1522.
- Rayleigh, J.S.W. (1896). Theoretical Considerations Respecting the Separation of Gases by Diffusion and Similar Process. *Philosophical Magazine*, Tom 42, Str. 409–427.
- RDW (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy (2000). *Official Journal of the European Communities*, 2000–12–22, Tom 327, Str. 1–72.

- Révész, K.; Böhlke, J.K. i Yoshinari, T. (1997). Determination of $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in Nitrate. *Analytical Chemistry*, Tom 69, Nr 21, Str. 4375–4380.
- Révész, K. i Böhlke, J.K. (2002). Comparison of $\delta^{18}\text{O}$ Measurements in Nitrate by Different Combustion Techniques. *Analytical Chemistry*, Tom 74, Nr 20, Str. 5410–5413.
- Rolston, D.E. (1981). Nitrous Oxide and Nitrogen Gas Production in Fertilizer Loss. W: C.C. Delwiche (Wyd.), *Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide*, John Wiley, Nowy Jork, Str. 127–149.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 listopada 2002 r. w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe wykorzystywane do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczone do spożycia (2002). Dziennik Ustaw Numer 204, Pozycja 1728, Str. 12738–12751.
- Róžański, K.; Kuc, T.; Chmura, W.; Klisch, M.; Żurek, A. i Chmiel, M. (2007). Zanieczyszczenie Azotanami Zbiornika Wód Podziemnych GZWP 333 „Opole–Zawadzkie” w Świetle Badań Izotopowych. Materiały konferencji: XIII Sympozjum „Współczesne Problemy Hydrogeologii”, Kraków–Krynica 21–23 czerwca 2007, Str. 313–324.
- Russell, K.M.; Galloway, J.N.; Macko, S.A.; Moody, J.L. i Scudlark, J.R. (1998). Sources of Nitrogen in Wet Deposition to the Chesapeake Bay Region. *Atmospheric Environment*, Tom 32, Nr 14–15, Str. 2453–2465.
- Rutkowski, J. (1993). Objaśnienia do Szczegółowej Mapy Geologicznej Polski. 1:50000 Arkusz Kraków (973). Warszawa, Str. 46.
- Sakata, M. (2001). A Simple and Rapid Method for $\delta^{15}\text{N}$ Determination of Ammonium and Nitrate in Water Samples. *Geochemical Journal*, Tom 35, Nr 4, Str. 271–275.
- Shearer, G. i Kohl, D.H. (1986). N_2 Fixation in Field Settings, Estimation Based on Natural ^{15}N Abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, Tom 13, Nr 6, Str. 699–757.
- Sigman, D.M.; Altabet, M.A.; Michener, R.; McCorkle, D.C.; Fry, B. i Holmes, R.M. (1997). Natural Abundance–Level Measurement of the Nitrogen Isotopic Composition of Oceanic Nitrate: An Adaptation of the Ammonia Diffusion Method. *Marine Chemistry*, Tom 57, Tom 3–4, Str. 227–242.
- Sigman, D.M.; Casciotti, K.L.; Andreani, M.; Barford, C.; Galanter, M. i Böhlke, J.K. (2001). A Bacterial Method for the Nitrogen Isotopic Analysis of Nitrate in Seawater and Freshwater. *Analytical Chemistry*, Tom 73, Nr 17, Str. 4145–4153.
- Sikora, R. (2003). Modelowanie Składu Izotopowego Systemów Jeziornych w Długich Przedziałach Czasu. Praca Magisterska, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, AGH, Kraków.
- Silva, S.R.; Kendall, C.; Wilkison, D.H.; Ziegler, A.C.; Chang, C.C.Y. i Avanzino, R.J. (2000). A New Method for Collection of Nitrate from Fresh Water and the Analysis of Nitrogen and Oxygen Isotope Ratios. *Journal of Hydrology*, Nr 1–2, Tom 228, Str. 22–36.
- Söderlund, R. i Svensson, H. (1976). The Global Nitrogen Cycle. W: H. Svensson & R. Söderlund (Wyd.), *Nitrogen, Phosphorus and Sulfur – Global Cycles*, Ecological Bulletin, Tom 22, Str. 23–73.
- Staśko, S., (1992). Wody Podziemne w Węglanowych Utworach Triasu Opolskiego. *Prace Geologiczno–Mineralogiczne*, Acta Universitatis Wratislaviensis, Wrocław.
- Stedman, D.H. i Shetter, R.E. (1983). The Global Budget of Atmospheric Nitrogen Species. W: S.E. Schwartz (Wyd.), *Trace Atmospheric Constituents*, John Wiley, Nowy Jork, 1983, Str. 411–454.
- Stickrod II, R.D. i Marshall, J.D. (2000). On–Line Nitrate– $\delta^{15}\text{N}$ Extracted from Groundwater Determined by Continuous–Flow Elemental Analyzer/Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Tom 14, Nr 14, Str. 1266–1268.
- Tanaka, T. i Saino, T. (2002). A Modified Method for the Analysis of Nitrogen Isotopic Composition of Oceanic Nitrate at Low Concentration in Shallow Water. *Journal of Oceanography*, Tom 58, Nr 4, Str. 539–546.
- Ueda, S.; Ogura, N. i Wada, E. (1991). Nitrogen Stable Isotope Ratio of Groundwater N_2O . *Geophysical Research Letters*, Tom 18, Nr 8, Str. 1449–1452.
- Weiss, R.F. (1981). The Temporal and Spatial Distribution of Tropospheric Nitrous Oxide. *Journal of Geophysical Research*, Tom 86, Nr C8, Str. 7185–7195.
- Witczak, S. i Adamczyk, A.F. (1995). Katalog Wybranych Fizycznych i Chemicznych Wskaźników Zanieczyszczenia Wód Podziemnych i Metod Ich Oznaczania. Tom II. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Państwowy Inspektorat Ochrony Środowiska, Warszawa.
- Van Everdingen, R.O. i Krouse, H.R. (1985). Isotope Composition of Sulphate Generated by Bacterial and Abiological Oxidation. *Nature*, Tom 315, Nr 6018, Str. 395–396.
- Vitousek, P.M.; Aber, J.; Howarth, R.W.; Likens, G.E.; Matson, P.A.; Schindler, D.W.; Schlesinger, W.H. i Tilman, G.D. (1997). Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Causes and Consequences. *Issues in Ecology*, Nr 1, Str. 1–16.
- Voerkelius, S. (1990). Isotopendiskriminierungen bei der Nitrifikation und Denitrifikation: Grundlagen und Anwendungen der Herkunfts–Zuordnung von Nitrat und Disickstoffmonoxid. Praca Doktorska, Technische Universität München.

- Voerkelius, S. i Schmidt, H.-L. (1990).** Natural Oxygen and Nitrogen Isotope Abundance of Compounds Involved in Denitrification. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft*, Tom 60, Str. 364–366.
- Vogel, J.C.; Talma, A.S. i Heaton, T.H.E. (1981).** Gaseous Nitrogen as Evidence for Denitrification in Groundwater. *Journal of Hydrology*, Tom 50, Str. 191–200.
- Von Weizsäcker, C.F. (1938).** Über Elementumwandlungen in Innern der Sterne. II. *Physikalische Zeitschrift*, Tom 39, Str. 633.
- Zhang, G.; Zhang, J. i Liu S. (2007).** Characterization of Nutrients in the Atmospheric Wet and Dry Deposition Observed at the Two Monitoring Sites over Yellow Sea and East China Sea. *Journal of Atmospheric Chemistry*, Tom 57, Nr 1, Str. 41–57.
- Zuber, A.; Witczak, S.; Róžański, K.; Śliwka, I.; Opoka, M.; Mochalski, P.; Kuc, T.; Karlikowska, J.; Kania, J.; Jackowicz-Korczyński, M. i Duliński, M. (2005).** Groundwater Dating with ^3H and SF_6 in Relation to Mixing Patterns, Transport Modelling and Hydrochemistry, *Hydrological Processes*, Tom 19, Nr 11, Str. 2247–2275.
- Zumft, W.G. (1997).** Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Tom 61, Nr 4, Str. 533–616.
- Żurek, A. (2002).** Azotany w Wodach Podziemnych. *Biuletyn Państwowego Instytutu Geologicznego*, Nr 400, Str. 114–141.

WYKORZYSTANE STRONY WWW:

<http://education.jlab.org/>
<http://fuse.pha.jhu.edu/>
<http://krakow.rzgw.gov.pl/>
<http://visibleearth.nasa.gov>
<http://www.boc.com/>
<http://www.emedicine.com/>
<http://www.uni-bayreuth.de/>



*„Anyone who can solve the problem of water,
will be worthy of two Nobel Prizes –
one for peace and one for science”.*
John F. Kennedy (1917 – 1963)