



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE DELLA TERRA"

CICLO XXXIII

Acqua, alimentazione e latte: relazioni fra i caratteri isotopici e chimici

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Mario Tribaudino

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Paola Iacumin

Co-tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Nives Ogrinc

Dottorando: Dott.ssa Marta Boito

Anni Accademici 2017/2018 – 2019/2020

A chi c'è sempre stato,

A chi mi ha supportato e sopportato,

Grazie.

Indice

Riassunto	6
Abstract	7
1 Introduzione	8
1.1 Bio-geologia: un approccio scientifico che viene da lontano.....	8
1.2 Principi di geochimica isotopica	10
1.2.1 Generalità sugli isotopi.....	10
1.2.2 Notazioni in uso.....	11
1.2.3 Gli standard di riferimento.....	13
1.2.4 Il frazionamento isotopico.....	15
1.3 Inquadramento area di studio	16
1.3.1 Il Consorzio e la storia.....	16
1.3.2 Inquadramento Geografico-Geologico	17
1.4 Obiettivi e struttura della tesi.....	20
1.4.1 Relazione acqua - latte - piante (dieta)	21
2 Stato dell'arte.....	22
2.1 Gli isotopi stabili nella ricerca scientifica	22
2.1.1 Gli isotopi dell'ossigeno e dell'idrogeno	22
2.1.2 Gli isotopi del carbonio	31
2.1.3 Gli isotopi dell'azoto	35
2.1.4 Gli isotopi dello zolfo	36
2.2 Il rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$.....	37
2.3 Il suolo e la distribuzione degli elementi minerali	40
3 Materiali e metodi.....	45
3.1 I siti di studio.....	45
3.2 Il campionamento e lo stoccaggio dei campioni.....	48
3.3 Pretrattamento dei campioni in preparazione alle analisi (Università degli Studi di Parma)	50
3.4 Pretrattamento dei campioni in preparazione alle analisi (Jožef Stefan Institute)	53
3.4.1 Preparazione dei campioni per isolamento di grasso, caseina e lattosio dal latte.....	53
3.4.2 Preparazione dei campioni di dieta per le analisi isotopiche $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$	55
3.4.3 Preparazione dei campioni per MC ICP-MS.....	56
3.4.3.1 Determinazione isotopica dello stronzio ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$)	58
3.4.4 Preparazione dei campioni per EDXRF	63
3.5 Le operazioni di misura sui campioni.....	65
4 Presentazione e discussione dei dati.....	67

4.1	Analisi isotopiche $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$	67
4.2	Analisi isotopiche di $\delta^{13}\text{C}$	76
4.2.1	Andamento di $\delta^{13}\text{C}$ nel tempo	76
4.2.2	Indagine statistica	80
4.2.3	Determinazione quantitativa delle componenti della dieta	86
4.2.4	Fattore di frazionamento nei campioni di latte $\alpha_{\text{caseina-grasso}}$ per $\delta^{13}\text{C}$	90
4.3	Analisi isotopiche di $\delta^{15}\text{N}$	92
4.3.1	Andamento di $\delta^{15}\text{N}$ nel tempo	92
4.3.2	Indagine statistica	96
4.3.3	Determinazione quantitativa delle componenti della dieta	101
4.3.4	Fattore di frazionamento tra i campioni di dieta e caseina del latte $\alpha_{\text{dieta-caseina}}$ per $\delta^{15}\text{N}$	101
4.4	Confronto tra i campioni di dieta e di latte	102
4.5	Analisi isotopiche di $\delta^{34}\text{S}$	104
4.6	Rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	106
4.7	Analisi elementare con EDXRF	108
4.7.1	Analisi di correlazione tra latte e dieta	112
7	Conclusioni	119
Appendice 1	123
	Parametro delta: definizione ufficiale	123
	Parametro delta: definizione tradizionale	123
Appendice 2	124
	I diversi significati del fattore di frazionamento isotopico α	124
Appendice 3	128
	Tracciabilità di prodotto: i marchi di qualità	128
	Disciplinare di produzione – Regolamento di alimentazione	129
Appendice 4	134
	Spettrometria di massa isotopica (IRMS)	134
	Spettrometria di massa a flusso alternato e a flusso continuo di elio	138
	IsoPrime100 IRMS, Elementar vario PYRO cube (OH/CNS pyrolyzer/EA)	138
	Spettrometria di massa con sorgente al plasma (ICP-QQQ)	139
	Linea di preparazione automatica Thermo-Finnigan HDO equilibratore	145
	Analizzatore elementare (EA)	147
	Gli standard utilizzati	148
	Multicollector-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (MC-ICPMS)	149
	Fluorescenza ai raggi X (XRF – X Ray Fluorescence)	151

La retta di regressione: generalità	155
La retta di taratura	159
Appendice 5.....	161
Isotope partitioning between cow milk and drinking water: a further tool for identification of milk provenance	161
Appendice 6.....	177
Precisazioni sui valori medi annuali di $\delta^{13}\text{C}$	177
Dettaglio delle analisi statistiche di $\delta^{13}\text{C}$	177
Precisazioni sui valori medi annuali di $\delta^{15}\text{N}$	179
Dettaglio delle analisi statistiche di $\delta^{15}\text{N}$	180
Matrici di confronto tra gli isotopi $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$	181
Bibliografia.....	183
Sitografia	192

Riassunto

In questo progetto di ricerca i principi e le tecniche della geochimica degli isotopi stabili sono stati applicati ai campioni di acqua ingerita, di fieno e di mangime della dieta delle bovine e di latte prodotto, raccolti per un arco temporale di un anno a partire da febbraio 2018 fino a gennaio 2019 nel comprensorio del Parmigiano Reggiano. In particolare, sono stati misurati i valori isotopici di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ nell'acqua e nel siero (acqua) del latte e di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nella caseina e nel grasso separati dal latte, nel fieno e nel mangime. Queste analisi sono state condotte presso il Laboratorio di Geochimica Isotopica del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale dell'Università degli Studi di Parma. In aggiunta, è stato svolto un lavoro di screening che ha interessato le analisi degli elementi maggiori e in tracce, le analisi isotopiche dello zolfo ($\delta^{34}\text{S}$) e il rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ sui campioni di due mesi (agosto 2018 e gennaio 2019). Queste analisi sono state effettuate presso l'Istituto Jožef Stefan di Lubiana (Slovenia).

In questo studio, le caratteristiche geochimiche delle componenti del latte sono state confrontate con quelle del fieno, del mangime e dell'acqua. È stato possibile determinare i fattori di frazionamento α tra: (i) il latte e l'acqua delle fattorie per l'ossigeno e per l'idrogeno ($^{18/16}\alpha_{\text{latte-acqua}}$ e $^{2/1}\alpha_{\text{latte-acqua}}$) che è funzione della stagione; (ii) la caseina e il grasso per il carbonio ($^{13/12}\alpha_{\text{caseina-grasso}}$); (iii) la caseina e la dieta per il carbonio e l'azoto ($^{13/12}\alpha_{\text{caseina-dieta}}$ e $^{15/14}\alpha_{\text{caseina-dieta}}$). Inoltre, è stata determinata una regressione polinomiale di secondo ordine attraverso la quale è possibile calcolare il valore di $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua avendo a disposizione quello del latte (e viceversa) utile per limitare la zona di provenienza. Attraverso il fattore di frazionamento $\alpha_{\text{caseina-dieta}}$ è stato possibile calcolare, per le stalle che non utilizzano l'*unifeed* (piatto unico), la % di fieno nella dieta (attorno al 50%) che è in linea con quanto previsto dal Disciplinare di Produzione del Parmigiano Reggiano.

Per quanto riguarda la composizione isotopica dello zolfo, i valori della caseina sembrano essere controllati principalmente dal fieno e dall'erba e, secondariamente, dal mangime.

L'analisi del rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dell'acqua, latte totale e dieta ha permesso la costruzione di una relazione lineare a più variabili indipendenti ($R^2=0,88$), dalla quale risulta che il rapporto $^{87/86}\text{Sr}$ del latte è determinato principalmente dal rapporto $^{87/86}\text{Sr}$ del fieno.

Infine, l'applicazione dell'analisi multivariata PCA alla concentrazione degli elementi maggiori e in tracce dei campioni di latte liofilizzato e dieta ha permesso di valutare l'associazione tra i profili di fieno, mangime e latte. Tale associazione è presente però solo in alcune stalle e, quindi, non rappresenta una regola. È stato comunque possibile evidenziare che il contributo di alcuni elementi (quali P, Ca, Br e Rb) nel latte sia determinato principalmente dal fieno dove la concentrazione degli elementi è più elevata che nel mangime.

Abstract

In this research project the principles and techniques of stable isotope geochemistry were applied to different samples of ingested water, hay and fodder from the cows' diet and milk produced, collected over a period of one year starting from February 2018 until January 2019 in the Parmigiano Reggiano area. In particular, the isotope values of $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^2\text{H}$ in water and whey (water) of milk and of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in casein and fat separated from milk, hay and fodder were measured. These analyses were conducted at the Isotopic Geochemistry Laboratory of the Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability of the University of Parma. In addition, screening work was performed involving major and trace element analyses and the isotope analyses of $\delta^{34}\text{S}$ and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotope on the two-month samples (August 2018 and January 2019). These analyses were carried out at the Jožef Stefan Institute in Ljubljana (Slovenia).

In this study, the geochemical characteristics of the milk components were compared with those of hay, fodder and water. It was possible to determine the fractionation factors α between: (i) milk and farm water for oxygen and hydrogen ($^{18/16}\alpha_{\text{milk-water}}$ and $^{2/1}\alpha_{\text{milk-water}}$) which is a function of the season; (ii) for carbon casein and fat ($^{13/12}\alpha_{\text{casein-fat}}$); (iii) for carbon and nitrogen casein and the diet ($^{13/12}\alpha_{\text{casein-diet}}$ and $^{15/14}\alpha_{\text{casein-diet}}$). In addition, a second order polynomial regression was determined through which it is possible to calculate the value of $\delta^{18}\text{O}$ of water having available that of milk (and vice versa) useful for delimiting the area of origin. By the fractionation factor $\alpha_{\text{casein-diet}}$ it was possible to calculate, for the cattle sheds that do not use *unifeed* (single dish), the % of hay in the diet (around 50%) which is consistent with the provisions of the Parmigiano Reggiano Production Regulations.

Regarding the isotopic composition of sulfur, the values of casein seem to be controlled mainly by hay and grass and, secondarily, by fodder.

The analysis of the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotope ratio on water, whole milk and diet samples allowed the construction of a linear relationship with multiple independent variables ($R^2=0,88$), from which it results that the ratio $^{87/86}\text{Sr}$ of the milk is mainly determined by the ratio $^{87/86}\text{Sr}$ of the hay.

Finally, the application of multivariate PCA analysis to the concentration of major trace elements of freeze-dried milk and diet samples allowed us to evaluate the connection between hay, fodder and milk profiles. However, this connection is only present in some cattle sheds and, therefore, does not represent a rule. In any case it was possible to highlight that the contribution of some elements (such as P, Ca, Br and Rb) in milk is mainly determined by hay in which the concentration of elements is higher than in the fodder.

1 Introduzione

1.1 Bio-geologia: un approccio scientifico che viene da lontano

Lo studio delle interazioni tra fattori geologici e biologici di un habitat (bio-geologia) attuale o del passato risulta necessario per poter interpretare fenomeni la cui complessità, altrimenti, potrebbe sfuggire allo studioso. Il significato della bio-geologia e il suo legame con le altre Scienze della Terra è stato affrontato da Yin et al (2008) e riassunto nello schema riportato qui di seguito (Figura 1.1).

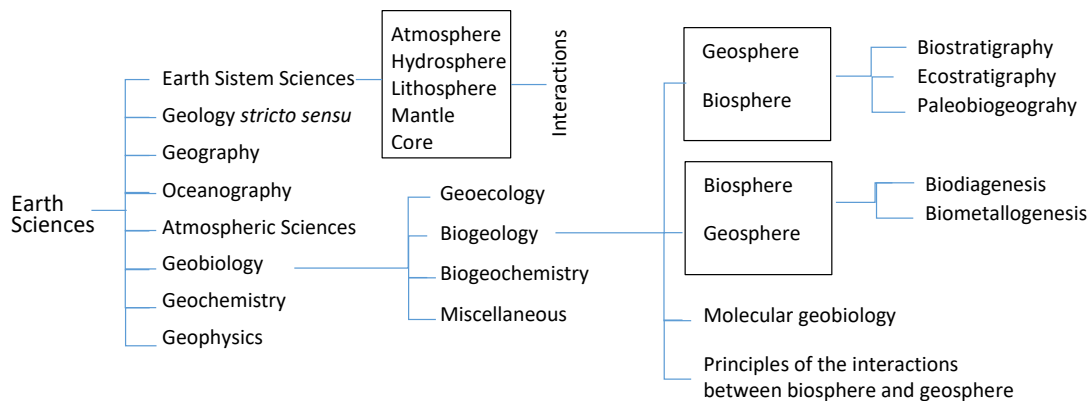


Figura 1.1 – Rappresentazione schematica delle branche di studio di Scienze della Terra

Lo schema mostra tutte le discipline che possono interconnettersi con le Scienze della Terra. Questa è la visione multidisciplinare alla quale le Scienze della Terra può aprirsi.

Progetti di ricerca in bio-geologia sono ben sviluppati negli Stati Uniti, Regno Unito, Cina e Germania (Jiang et al 2001; Zhao 2001; Liu 2006).

La paleontologia, compresa la bio-stratigrafia, costituisce la disciplina bio-geologica per antonomasia: infatti, essa rivolge l'attenzione alla evoluzione delle specie, anche recenti, (es.: genere *Homo*) e degli habitat dal passato più lontano fino al presente.

Il condizionamento sugli esseri viventi da parte delle caratteristiche geologiche di un territorio e, d'altro canto, l'influenza degli esseri viventi sui processi geologici, in particolare di superficie, è ormai innegabile e da decenni oggetto di studio da parte di geologi e biologi che, abbandonato il dominante ed eccessivo riduttivismo disciplinare, hanno cominciato a indagare approfonditamente su queste relazioni. Esempi in questo senso sono abbondantissimi, anche se, probabilmente, poco noti ai più. Qui di seguito ne riportiamo alcuni.

Un eccesso di fosforo nelle acque è altamente tossico per la vita; la concentrazione del fosforo nelle acque è, a sua volta, connessa alla solubilità dei minerali del fosforo, la quale potrebbe essere descritta come caratteristica chimico-fisica correlata alla geologia. Per questo argomento si rimanda ai lavori

di Oelkers & Valsami-Jones (2008) e Manning (2008 e letteratura citata), i quali operano in istituzioni che riguardano la chimica geologica o la mineralogia.

I geologi che si occupano di idrogeologia e quelli -in particolare- che indagano su problemi di inquinamento delle acque non possono fare a meno di studiare le relazioni che esistono tra gli aspetti chimico-fisici inorganici e gli aspetti biologici delle acque (batteri) e delle rocce (materiale organico dei sedimenti, etc.) che costituiscono acquiferi da migliaia o, addirittura, milioni di anni. Infatti, i geologi sanno che soprattutto le reazioni di ossido-riduzione che interessano molti elementi presenti nelle acque, e in esse speciate in vario modo, sono catalizzate da particolari batteri (es.: Stumm & Morgan 1996). La veridicità di queste affermazioni è chiaramente dimostrata dalle modalità di intervento professionale che i geologi svolgono nelle aree inquinate. D'altro canto, l'individuazione delle specie batteriche nelle acque ci consente di identificare il loro potenziale habitat geologico sia di superficie sia di profondità.

Per quanto riguarda l'evoluzione degli olii minerali e degli idrocarburi gassosi è ben noto il ruolo dei batteri nel determinarne le caratteristiche isotopiche (in particolare gli isotopi stabili del carbonio) mediante le quali si può identificare la genesi termogenica o biogenica di alcuni idrocarburi, dove con l'aggettivo termogenico ci si riferisce ad un'evoluzione prettamente inorganica e con l'aggettivo biogenico ad un'evoluzione per la quale il ruolo catalizzatore dei batteri è considerato rilevante (es.: Borgia et al 1988; Grimalt et al 1988; Ricchiuto & Schoell 1988). A questo riguardo si rimanda ai due splendidi volumi editi a suo tempo dalla European Association of Organic Geochemistry col sostegno dell'AGIP, "Organic Geochemistry in Petroleum Exploration" e "Analytical Geochemistry" (1988) che hanno visto come curatori due italiani, L. Mattavelli e L. Novelli.

È ben noto come la prospezione geomineraria e la geochimica ambientale abbiano usufruito e usufruiscano ancora delle piante come traccianti delle caratteristiche chimiche del sottosuolo e pertanto della possibilità o meno dell'esistenza di giacimenti minerali o di inquinamento ambientale (es.: Mascaro et al 2001). Un banale esempio è rappresentato dall'*Alyssum bertolonii*, che è un bioaccumulatore di nichel e cromo e pertanto capace di rivelare suolo e sottosuolo ricco di tali elementi (es.: presenza criptica di rocce ultramafiche) (Robinson et al 1997).

Un altro aspetto di estrema rilevanza riguarda la co-evoluzione di minerali e batteri. Sebbene si tratti di un argomento affrontato dai geologi da decenni, esso è troppo spesso trascurato. Questo argomento, però, ha ripreso vigore nell'ultimo decennio in Dipartimenti di Scienze della Terra all'avanguardia. Ad esempio, il grande evento ossidativo (Great Oxidation Event, GOE) conseguente alla fotosintesi ossigenica dei cianobatteri a partire da 2.45 Ga (Konhauser et al 2011) o forse ancor prima (Planavsky et al 2014) ha aumentato la concentrazione dell'ossigeno nell'atmosfera e diversificato di molto le specie minerali: da circa 1500 a più di 4000 (Hazen & Ferry 2010). Dal canto loro, i minerali

possono costituire un substrato, fonte di nutrienti e/o energia per procarioti (Southam 2012) producendo catalisi nella dissoluzione o rideposizione dei minerali e nell'ossidazione. Inoltre, alcuni batteri catalizzano, ad esempio, la precipitazione di solidi amorfi o cristallini provocando l'immobilizzazione di elementi tossici quali uranio e cromo (Cheng et al 2012).

Le interazioni tra gli esseri viventi e il substrato geologico ha sempre interessato il mondo di formazione geologica e naturalistica. Ad esempio, gli isotopi dell'ossigeno sono frequentemente utilizzati per ricostruzioni paleoclimatiche partendo da dati di base relativi alle ossa di vertebrati attuali o moderni (es.: Longinelli 1984; Luz e Kolodny 1989; Iacumin et al 1996). Un argomento che interessa anche il mondo accademico di estrazione geologica riguarda le interazioni tra substrato inorganico, acqua, animali e prodotti alimentari (es.: mosto dell'uva vs vino; Tescione et al 2015; latte vs acqua: Chesson et al 2010). Infatti, tramite le caratteristiche isotopiche degli esseri viventi si può risalire alle caratteristiche geo-idrologiche dell'area di provenienza. Gli Stati Uniti hanno già prodotto una mappatura del latte in relazione alle acque delle diverse aree (Chesson et al 2010).

1.2 Principi di geochimica isotopica

1.2.1 Generalità sugli isotopi

In natura l'abbondanza e la distribuzione degli elementi sono in relazione alle loro caratteristiche chimico-fisiche, le quali dipendono a loro volta dalle strutture atomiche, quindi dalle configurazioni elettroniche e nucleari.

L'atomo è composto dal nucleo, costituito da protoni (particelle elettricamente positive) e neutroni (particelle elettricamente neutre), che hanno all'incirca la medesima massa, attorno al quale orbitano gli elettroni (particelle elettricamente negative ma di massa trascurabile) in ugual numero dei protoni per preservare la neutralità elettrica.

Per isotopi si intendono atomi di uno stesso elemento che contengono lo stesso numero di protoni ed elettroni ma, diverso numero di neutroni. Il nome "isotopo" deriva dal Greco ἴσος τόπος che significa "stesso posto", il cui significato indica che gli isotopi occupano la stessa posizione nella tavola periodica.

Un generico elemento viene rappresentato nella forma ${}^A E_Z$, dove A indica il numero di massa (numero di protoni+neutroni nel nucleo) e Z indica il numero atomico (numero di protoni) dell'elemento E .

Gli isotopi vengono normalmente distinti in due grandi categorie: stabili (meno di 300 tipi), in cui la configurazione rimane invariata nel tempo, e non stabili o radioattivi (circa 1200 tipi), nei quali, invece, la configurazione nucleare si modifica nel tempo.

I metodi di misura delle due categorie di isotopi sono diversi come pure le informazioni che si possono dedurre dai risultati delle analisi.

Solo 21 elementi chimici (come per esempio il sodio, il fluoro e il berillio) possiedono un solo isotopo stabile, nella maggior parte dei casi essi possiedono più di una forma isotopica.

1.2.2 Notazioni in uso

Nella Tabella 1.1 si riportano gli isotopi più abbondanti e meno abbondanti per i vari elementi elencati:

Elemento	Isotopo stabile	Abbondanza naturale media (%)
Idrogeno	^1H	99,9855
	^2H	0,0145
Ossigeno	^{16}O	99,7587
	^{17}O	0,04
	^{18}O	0,2039
Carbonio	^{12}C	98,892
	^{13}C	1,108
Azoto	^{14}N	99,6337
	^{15}N	0,3663
Zolfo	^{22}S	0,75
	^{32}S	95
	^{34}S	4,21
	^{36}S	0,014

Tabella 1.1 - Abbondanza di alcuni isotopi di idrogeno, ossigeno, carbonio, azoto e zolfo (Biondi et al., 2010)

Si consideri l'elemento chimico E in una specie chimica i appartenente a una fase φ e i due isotopi $^A E$ e $^B E$, di cui $x(^A E)$ e $x(^B E)$ siano le concentrazioni in atomi (abbondanze isotopiche). Definiamo il rapporto isotopico:

$${}^A B R_i^\varphi = [x(^A E) / x(^B E)]_i^\varphi$$

Ad esempio, ${}^A E \equiv {}^{18}\text{O}$, ${}^B E \equiv {}^{16}\text{O}$, $i \equiv \text{H}_2\text{O}$, $\varphi = \text{gas}$:

$${}^{18/16}R_{\text{H}_2\text{O}}^g = [x({}^{18}\text{O}) / x({}^{16}\text{O})]_{\text{H}_2\text{O}}^g$$

Con scrittura non formale ma molto più semplice ed immediata, indichiamo semplicemente

$$x({}^A E) = {}^A E \text{ e } x({}^B E) = {}^B E$$

Pertanto, in riferimento all'esempio precedente,

$${}^{18/16}R_{\text{H}_2\text{O}}^g = ({}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O})_{\text{H}_2\text{O}}^g$$

Questa semplice scrittura omette l'indicazione della fase o della specie chimica quando date per scontate.

Il rapporto di abbondanza (R) tra gli isotopi in un certo elemento in un composto mostra al numeratore l'isotopo pesante (in genere il meno abbondante in natura) e al denominatore quello più leggero (solitamente il più comune).

Le misure di elevata precisione sull'abbondanza degli isotopi stabili vengono effettuate con la tecnica di spettrometria di massa isotopica. Lo spettrometro di massa non consente però di determinare le abbondanze isotopiche assolute con estrema precisione, ma solo quelle relative, che rappresentano la differenza tra il rapporto isotopico R del campione preso in esame e lo stesso rapporto in una sostanza utilizzata come riferimento internazionale.

Un modo per esprimere queste differenze è quello di utilizzare l'unità di misura δ (delta), definita come (IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry):

$$\delta = \frac{R}{R_{ST}} - 1$$

dove:

R= rapporto isotopico per il campione

R_{ST} = rapporto isotopico per lo standard internazionale.

Dato che le variazioni di composizione isotopiche sono molto piccole e che δ assume in genere un valore molto minore di 1, questa unità viene espressa in parti per mille.

Moltiplichiamo e dividiamo $[(R/R_{ST})-1]$ per 10^3 :

$$\delta = \left[\left(\frac{R}{R_{ST}} - 1 \right) * 10^3 \right] 10^3 \equiv \left[\left(\frac{R}{R_{ST}} - 1 \right) * 10^3 \right] \text{‰}$$

dove ‰ indica che il valore numerico tra parentesi quadra deve essere diviso per 10^3 per ottenere il valore di $\delta = (R/R_{ST}) - 1$.

Questa notazione è molto utile perché evidenzia con facilità quanto il campione in esame è arricchito o impoverito in isotopi pesanti rispetto allo standard di riferimento, ottenendo così cifre significative facili da usare.

Un approfondimento riguardante la definizione ufficiale e tradizionale del parametro delta è presente alla sezione “Appendice 1”.

1.2.3 Gli standard di riferimento

Al fine di rendere confrontabili i valori di δ , quest'ultimo valore deve essere riferito allo stesso standard di riferimento RF. Questi materiali di riferimento sono chiamati “standard internazionali primari” (Primary International Standard).

Le principali caratteristiche di uno standard internazionale primario sono:

- purezza;
- omogeneità, affinché le porzioni prelevate contemporaneamente o in momenti diversi non mostrino differenze isotopiche;
- facile reperibilità in natura;
- costo limitato e ampia disponibilità, in modo da garantirne la richiesta del mercato.

Le organizzazioni internazionali che si occupano della catalogazione e distribuzione di questi materiali sono “International Atomic Energy Agency” (IAEA), Vienna (Austria), organo delle Nazioni Unite, e “The National Institute of Standards and Technology” (NIST), Gaithersburg, Maryland (USA).

Gli standard internazionali primari sono:

- V-SMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water*)

Standard universalmente accettato per le analisi isotopiche dei campioni d'acqua. Inizialmente è stato preparato da Craig verso la fine degli anni '60 mescolando campioni diversi di acqua oceanica distillata. I rapporti isotopici $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ corrispondono, per definizione, a quelli medi ponderati dell'acqua oceanica, la cui composizione isotopica si può considerare uniforme (Craig, 1961b).

I valori assoluti di V-SMOW sono:

$$(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{VSMOW}} = 1.5576426 \cdot 10^{-4}$$

$$(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{VSMOW}} = 20.05171 \cdot 10^{-4}$$

Il motivo della scelta di questo standard di riferimento è stato dettato dal fatto che gli oceani ed i mari sono il punto di partenza e di arrivo del ciclo idrologico, ma anche dal fatto che l'acqua oceanica rappresenta circa il 98% dell'acqua esistente sulla crosta terrestre e la sua composizione isotopica media è vicina a quella dell'acqua presente sul globo.

- PDB-1 (*Pee Dee Belemnite*)

Questo standard proviene da un rostro carbonatico di una belemnite facente parte della formazione sedimentaria Pee-Dee del Cretaceo nel Sud Carolina. Può anche essere impiegato per le analisi isotopiche del carbonio e dell'ossigeno con i seguenti valori assoluti:

$$\begin{aligned}({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{VPDB}} &= 111.796 \cdot 10^{-4} \\({}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O})_{\text{VPDB}} &= 2079,0 \cdot 10^{-6}\end{aligned}$$

- N₂ (*Azoto atmosferico*)

Questo standard, il cui valore assoluto è pari a:

$${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} = 36.7647 \cdot 10^{-4}$$

è utilizzato per determinare il rapporto isotopico dell'azoto.

- V-CDT (*Vienna Canyon Diablo meteorite troilite*, Arizona, USA)

Si tratta dello standard di riferimento internazionale per gli isotopi dello zolfo, il cui valore assoluto è:

$${}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S} = 449.94 \cdot 10^{-4}$$

Lo zolfo delle meteoriti è stato considerato uno standard di riferimento adeguato anche perché, a causa della loro provenienza extraterrestre, le meteore rappresentano condizioni isotopiche terrestri primordiali.

Nella Tabella 1.2 si riportano le caratteristiche degli isotopi stabili e gli standard internazionali di riferimento adoperati per l'analisi degli stessi isotopi utilizzati in questo studio.

Elemento	Isotopo stabile	Standard di riferimento internazionale
Idrogeno	^1H	V-SMOW
	^2H	
Ossigeno	^{16}O	V-SMOW
	^{17}O	
	^{18}O	
Carbonio	^{12}C	V-PDB
	^{13}C	
Azoto	^{14}N	AIR (Azoto dell'aria)
	^{15}N	
Zolfo	^{22}S	V-CDT
	^{32}S	
	^{34}S	
	^{36}S	

Tabella 1.2 - Standard di riferimento internazionale di alcuni isotopi stabili (Biondi et al., 2010)

Oltre agli standard primari internazionali e standard internazionali secondari, per le misure isotopiche di routine, vengono utilizzati anche standard di laboratorio.

È infine importante precisare che per ottenere misure accurate riducendo al minimo gli errori di misura è opportuno utilizzare standards con rapporti isotopici non troppo diversi rispetto a quelli dei campioni oggetti di studio.

1.2.4 Il frazionamento isotopico

Nei processi fisico-chimici le differenze di massa tra isotopi dello stesso elemento fanno sì che atomi e molecole si distribuiscano in modo non omogeneo tra fasi e/o specie chimiche coesistenti. In altri termini, in queste specie i rapporti isotopici non sono generalmente gli stessi.

La ripartizione non proporzionata degli isotopi di uno stesso elemento tra due sostanze o tra due fasi della stessa sostanza è definito *frazionamento isotopico*.

I frazionamenti isotopici sono tanto più marcati quanto maggiore è la differenza di massa tra gli isotopi e quindi sono più rilevanti per gli isotopi degli elementi leggeri.

Il frazionamento isotopico viene quantificato mediante il rapporto

$$\alpha_{1-2} = \frac{R_1}{R_2} = \frac{\delta_1+1}{\delta_2+1}$$

dove R_1 ed R_2 indicano i rapporti isotopici esistenti nelle specie di interesse.

Il frazionamento isotopico viene anche espresso mediante il parametro ε , il *fattore di arricchimento*:

$$\varepsilon = (\alpha - 1) = 10^3(\alpha - 1)10^{-3} = 10^3(\alpha - 1) \text{ ‰}$$

dove ‰ = 10^{-3} . Generalmente, si considera il frazionamento in condizioni di equilibrio isotopico.

L'entità del frazionamento è inversamente proporzionale sia alla temperatura di reazione (a mano a mano che questa aumenta le differenze isotopiche tra le due fasi tendono a diminuire), che alla massa dell'isotopo. Inoltre, può dipendere anche dal maggiore o minore scostamento dalle condizioni di equilibrio. In condizioni di equilibrio, la dipendenza del fattore di frazionamento isotopico dalla temperatura assoluta (T) viene generalmente espressa mediante la relazione generale:

$$1000 \ln \alpha = aT^{-2} + bT^{-1} + c$$

dove a, b e c sono delle costanti.

Per un approfondimento inerente ai diversi significati del fattore di frazionamento isotopico α si rimanda alla sezione “Appendice 2”.

1.3 Inquadramento area di studio

In questo sotto-capitolo si inquadra l'area di studio oggetto della tesi, ovvero il comprensorio del Parmigiano Reggiano.

In aggiunta ad una breve introduzione su quella che è la storia del comprensorio, vengono qui discusse le principali caratteristiche geografiche e geologiche della zona.

1.3.1 Il Consorzio e la storia

Siamo nel 1901 quando la Camera di Commercio di Reggio Emilia getta le prime basi per la costituzione di un sindacato tra produttori e commercianti di formaggio, per poter così autenticare l'origine del prodotto destinato all'esportazione.

Successivamente, nel 1909, tra i rappresentanti delle Camere di Commercio di Parma, Reggio, Modena e Mantova si assiste ad un confronto per discutere dell'applicazione di una marcatura del formaggio grana prodotto in queste quattro provincie e per il nome da attribuire al prodotto: Parmigiano o Reggiano?

A causa degli interessi in gioco e delle problematiche insorte a seguito della Guerra Mondiale, la risposta al quesito viene procrastinata. Arriviamo al 1937, quando i confini della zona di produzione vengono finalmente definiti. L'area comprende anche territori della provincia di Bologna posti alla sinistra del fiume Reno. Infine, nel 1938 viene ufficializzato per la prima volta il termine "Parmigiano Reggiano".

Nel 1996, il Parmigiano Reggiano viene riconosciuto come una DOP europea (Regolamento CEE 2081/1992 sulle Denominazioni d'Origine Protetta - le DOP - poi integrato dal Regolamento CEE 510/2006), passaggio fondamentale per la tutela del Parmigiano Reggiano, che è tra i formaggi più contraffatti e imitati del mondo.

1.3.2 Inquadramento Geografico-Geologico

Gli allevamenti di bovine da latte di razza Reggiana, Frisona e Bruna Alpina oggetto di questo studio sono collocati all'interno del comprensorio di produzione del Parmigiano Reggiano. Questo territorio si estende dalla provincia di Bologna alla sinistra del fiume Reno, alla provincia di Mantova alla destra del fiume Po comprendendo le province di Modena, Parma e Reggio Emilia. Il comprensorio racchiude in sé differenti strutture geologiche: dall'Appennino emiliano-romagnolo alla Pianura Padana.

L'Appennino, estendendosi per una lunghezza di oltre 1000 Km dalla zona di raccordo con le Alpi liguri fino all'Arco Calabro Peloritano, è la spina dorsale della penisola italiana.

Diversi settori, aventi una storia geologica relativamente indipendente, separati da lineamenti tettonici trasversali costituiscono la catena appenninica. L'Appennino settentrionale si sviluppa in direzione NW-SE per più di 400 Km delimitato a NW dalle Alpi liguri e a SE dall'Appennino centrale.

L'Appennino è una catena a falde polifasica sviluppatasi dal Miocene (Faccenna et al., 2004) sino all'attuale in seguito alle interazioni tra la zolla europea e la microplacca Padano-Adriatica (o Adria), connessa inizialmente alla zolla africana. Precedentemente al fenomeno della collisione avvenuto tra le due zolle continentali si è verificata la chiusura di un'area oceanica che si trovava tra di esse: il paleoceano ligure o ligure-piemontese (parte della Tetide).

L'Appennino Settentrionale (Figura 1.2) deriva dalla complessa sovrapposizione tettonica di due grandi domini: Dominio Tosco-Umbro-Marchigiano e Dominio Ligure-Emiliano.

Il primo Dominio è costituito da un basamento continentale, facente parte della microplacca Adria, su cui si trovano le coperture sedimentarie (autoctone) Mesozoico-Terziarie. Le Unità toscane

comprendono il crinale emiliano dal Passo di Cirone (PR) fino alla valle del Torrente Sillaro (BO), si estendono poi verso nord con la montagna e collina forlivese, oltre la valle del Torrente Marecchia. Il secondo Dominio è costituito da unità tettoniche ad affinità oceanica che, staccandosi dal loro substrato originario, sono andate a sovrascorrere sul primo Dominio, originando una coltre alloctona (Elter, 1975, 2003). Queste Unità Liguri, con ofioliti, si estendono nel settore occidentale della regione, dalla Liguria e dall'Oltrepò pavese fino all'Appennino bolognese.

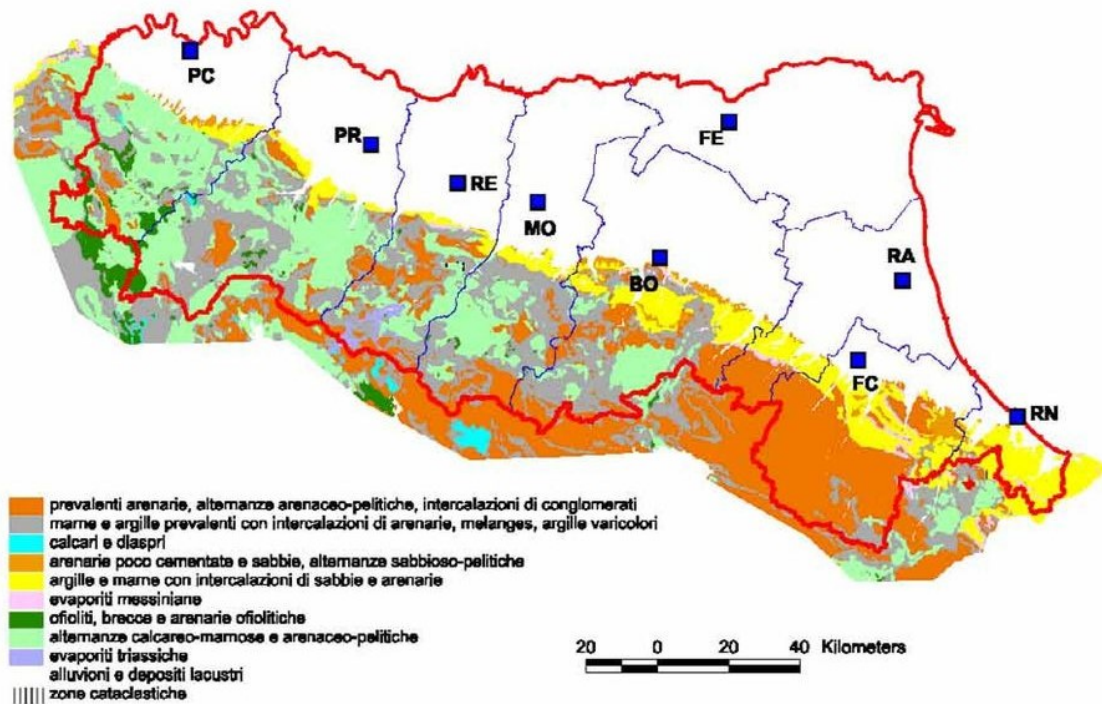


Figura 1.2 - Carta geo-litologica dell'Appennino emiliano-romagnolo. Fonte: https://www.arpae.it/cms3/documenti/radiazioni/martelli_bo07.pdf

Con l'avanzare delle coltri alloctone e attraverso la sedimentazione di successioni torbiditiche appartenenti al primo Dominio si delinea un'avanfossa che migra verso est.

L'avanfossa padano-adriatica, attraverso la graduale deposizione di argille e la successiva deposizione di sabbie continentali e costiere, si riempie tra il Pliocene e il Pleistocene inferiore-medio. In un periodo di tempo compreso tra i 10 e i 5 milioni di anni fa ebbe inizio la progressiva deformazione ed emersione della catena ad iniziare dal lato tirrenico verso l'odierna Pianura Padana. Questi movimenti coinvolsero ampi tratti dell'avanfossa padana.

In questa depressione, in parte ancora occupata dal mare (Adriatico), i detriti fini e grossolani diedero origine a conoidi terminanti nel mare o nelle paludi padane. Questi fenomeni, insieme a quelli sviluppati nell'arco alpino, portarono al riempimento del "Golfo padano".

Nella Catena alpina il glacialismo diede origine a “lingue glaciali” che si estesero fino alla Pianura Padana formando anfiteatri morenici, all’interno dei quali si poterono poi sviluppare conche lacustri. Solo in un periodo successivo, tra 70.000 e 10.000 anni fa, la fase glaciale ebbe inizio sull’Appennino, in quanto la sua altezza non era tale da consentire l’accumulo nivale necessario.

La Pianura Padana è la più grande pianura d’Italia e una delle più estese pianure alluvionali d’Europa, di cui la regione Emilia-Romagna ne costituisce il settore meridionale.

L’età della maggior parte dei sedimenti presenti sulla superficie della pianura emiliano-romagnola è inferiore a 10.000 anni (Olocene). Questi sedimenti sono il risultato dell’interazione deposizionale tra i bacini alluvionali contigui del fiume Po e dei fiumi Appenninici e, nella porzione più orientale, dall’evoluzione della linea di costa del Mare Adriatico. La pianura risulta quindi costituita da una grande varietà di depositi quali: conoidi e piane alluvionali dei fiumi appenninici, piana a meandri del Po, piana costiera, delta, ecc. (Figura 1.3).

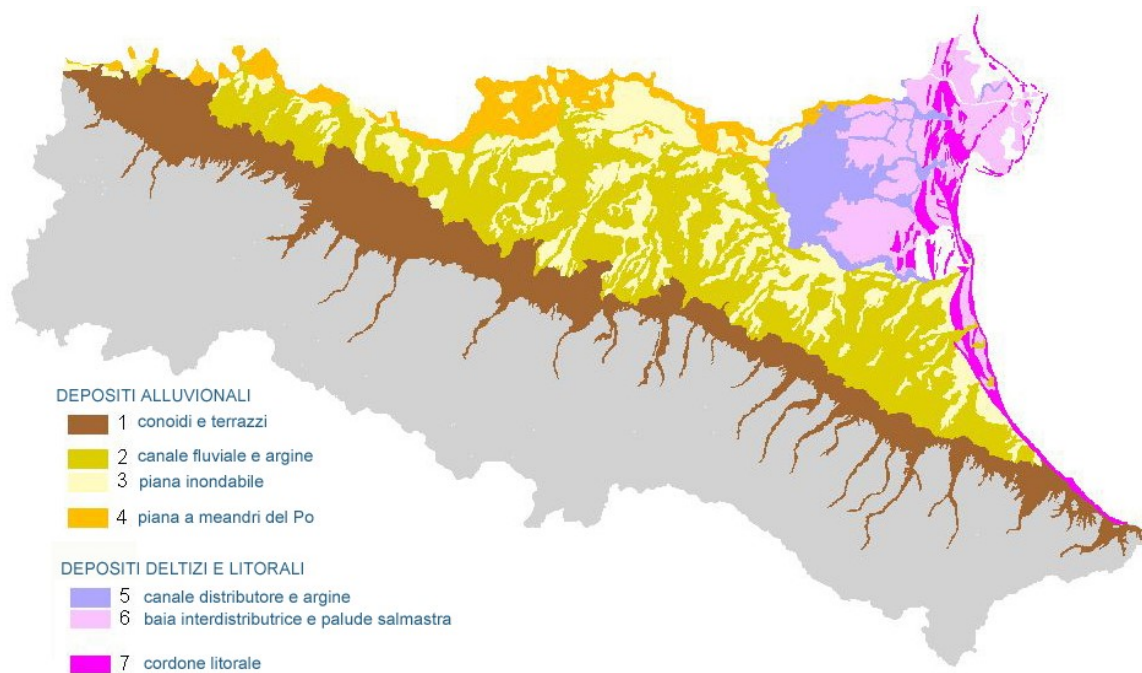


Figura 1.3 - Sintesi dei sistemi deposizionali della Pianura Padana. Estratto della carta geologica in scala 1:250.000. Fonte: https://ambiente.regione.emilia-romagna.it/it/geologia/geologia/geologia-emilia-romagna/jpg/Fig1_geo250pianura4.jpg/image_view_fullscreen

La sua configurazione attuale si deve sia ai fenomeni erosivi delle catene montuose delle Alpi e degli Appennini che ha progressivamente colmato il golfo padano (a partire da 600.000 anni questo golfo si è riempito di sedimenti fluviali, le “alluvioni”), ma anche ad altri due aspetti che hanno avuto un ruolo importante nella formazione della Pianura Padana: il clima e le variazioni del livello del mare.

Ciò ha condizionato per esempio il tipo e la quantità di sedimento trasportato dai fiumi, ma anche la loro stessa distribuzione.

1.4 Obiettivi e struttura della tesi

L'obiettivo principale di questa tesi di dottorato consiste nella valutazione quantitativa della dipendenza delle caratteristiche geochimiche del latte vaccino da quelle del territorio nel quale viene prodotto; in particolare con le caratteristiche geochimiche dell'acqua e dei prodotti di alimentazione delle bovine da latte, quindi del suolo.

Per raggiungere l'obiettivo, si sono prese in considerazione la composizione isotopica dell'ossigeno, dell'idrogeno, del carbonio, dell'azoto, dello zolfo, il rapporto isotopico dello stronzio, alcuni elementi maggiori e in tracce del latte e delle sue macro-componenti, dell'acqua ingerita dagli animali, del fieno e del mangime della dieta delle bovine. I campioni, raccolti mensilmente per un anno, provengono da dieci stalle ubicate nel comprensorio del Parmigiano Reggiano.

Lo studio generale ha permesso di:

- definire le caratteristiche isotopiche dell'acqua della zona di produzione del latte;
- caratterizzare dal punto di vista geochimico il latte e la dieta delle bovine;
- definire le relazioni che intercorrono tra le caratteristiche geochimiche del latte e quelle del suolo (tramite il fieno) e dell'acqua.

Le analisi isotopiche (effettuate tramite IRMS-Isotope Ratio Mass Spectrometry) dei rapporti $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ delle acque sotterranee e dell'acqua del latte, di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sul liofilizzato del latte, su fieno e mangime sono state effettuate presso il Laboratorio di Geochimica Isotopica dell'Università di Parma; le analisi degli elementi maggiori e in tracce, le analisi isotopiche dei rapporti $\delta^{34}\text{S}$ e $^{87/86}\text{Sr}$ sono state effettuate presso l'Istituto Jožef Stefan di Lubiana (Slovenia) durante i periodi di soggiorno da me effettuati presso questa istituzione.

Questa tesi di dottorato è organizzata in sei sotto-capitoli principali (contenuti all'interno del "Capitolo 4") e si apre con uno studio sulla composizione isotopica di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ dell'acqua bevuta dalle bovine da latte e della frazione di acqua presente nel latte prodotto. I risultati appariranno nella seguente pubblicazione: Boito et al., 2021 "*Isotope partitioning between cow milk and drinking water*", riportata nella sezione "Appendice 5".

Successivamente questa tesi si focalizza sull'analisi isotopica degli isotopi di carbonio e azoto e a seguire di zolfo e stronzio; mentre il sesto ed ultimo sotto-capitolo riporta i risultati degli esperimenti condotti attraverso la tecnica a fluorescenza a raggi X sulla determinazione degli elementi maggiori e in traccia.

1.4.1 Relazione acqua - latte - piante (dieta)

Lo scopo di questa ricerca è quello di caratterizzare da un punto di vista geochimico le materie prime che concorrono alla formazione del formaggio DOP Parmigiano Reggiano.

Per quanto concerne le indagini eseguite:

- 1) la conoscenza delle caratteristiche isotopiche delle acque della Pianura Padana e le relazioni che intercorrono tra esse e le precipitazioni, costituisce la condizione necessaria di partenza per la ricerca in corso;
- 2) i caratteri isotopici di ossigeno e idrogeno dell'acqua del latte dipendono fondamentalmente dalla composizione isotopica dell'acqua ingerita. I processi metabolici producono un frazionamento isotopico tra l'acqua ingerita e l'acqua del latte. Questo frazionamento verrà definito tramite l'indagine annuale compiuta su latte proveniente da stalle ubicate in zone diverse. Calcolato il coefficiente di frazionamento isotopico latte-acqua, attraverso la misura isotopica dell'acqua di nuovi campioni di latte provenienti sempre all'interno della stessa area, si potrà risalire alle caratteristiche isotopiche dell'acqua ingerita. In tal modo potranno essere escluse o, nella migliore delle ipotesi, identificate le aree di provenienza del latte. A questo scopo, dovrà essere chiaro il quadro composizionale degli isotopi di ossigeno e, eventualmente idrogeno, delle acque sotterranee della regione in cui si attua lo studio;
- 3) in aggiunta si indagherà sulla ripartizione isotopica del carbonio e dell'azoto nella dieta animale e nelle frazioni grassa e proteica (caseina) del latte e verranno definiti i fattori di frazionamento $\alpha_{caseina-dieta}$ e $\alpha_{caseina-grasso}$ che consentiranno di risalire ai diversi contributi di fieno e mangime all'interno dell'alimentazione;
- 4) infine, verrà condotta l'analisi chimica degli elementi maggiori e in traccia sul latte liofilizzato e sulla dieta e l'analisi del rapporto isotopico dello stronzio e dello zolfo sul latte totale, acqua e dieta su un numero ridotto di campioni. Queste misure rappresentano solo uno screening iniziale per valutare l'adeguatezza di tali parametri nel poter definire un legame tra il latte e l'ambiente.

2 Stato dell'arte

2.1 Gli isotopi stabili nella ricerca scientifica

I primi studi sulla geochimica degli isotopi stabili leggeri risalgono allo sviluppo della fisica moderna (prima metà del XX secolo). Questi studi si occuparono di indagare le variazioni di composizione isotopica legate al frazionamento chimico-fisico di ossigeno, idrogeno, carbonio, azoto e zolfo.

Il tipo di informazioni che è possibile ottenere da questi studi riguarda la datazione, le informazioni di processo, nel caso di dipendenza da parte della composizione isotopica da processi accaduti e il tracciamento geografico, al fine di poter distinguere sorgenti, destini e quindi i trasferimenti degli isotopi traccianti.

A partire dagli anni Novanta, diversi studi condotti sul campo hanno dimostrato come l'analisi dei rapporti isotopici di questi elementi si sia affermata sempre di più, assistendo ad una loro vasta applicazione anche in ambito alimentare a dimostrazione del fatto di come, attraverso lo studio degli isotopi stabili, si possa risalire all'origine dei prodotti (tracciabilità agroalimentare).

Un altro rapporto isotopico impiegato negli studi di tracciabilità ambientale e in campo alimentare è rappresentato dal rapporto $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ che è in grado di fornire informazioni sulle relazioni con le caratteristiche geologiche dell'area oggetto di indagine.

In diversi studi condotti su diverse matrici alimentari (es. succhi di frutta, aceti, vini, latte e formaggi e molti altri) si vede come attraverso l'alimentazione sia possibile individuare variazioni nella composizione isotopica nei prodotti che ne derivano, in quanto i caratteri isotopici di un prodotto, animale o vegetale, essendo strettamente connessi all'area geografica di provenienza e al sistema di produzione/allevamento, costituiscono un importante *marker* geografico/alimentare (Bricout et al., 1985; Martin et al., 1988; Rossmann et al., 1994; Versini et al. 1997; Camin et al., 2008; Chesson et al., 2010). Si parla quindi di *impronta o firma isotopica* dei tessuti per indicare che ogni animale o vegetale è caratterizzato da una specifica composizione isotopica naturale.

2.1.1 Gli isotopi dell'ossigeno e dell'idrogeno

L'ossigeno e l'idrogeno si trovano in natura sotto forma di differenti isotopi: l'ossigeno possiede tre isotopi stabili ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O e dieci radioattivi, mentre l'idrogeno ha due isotopi stabili ^1H e ^2H (indicato anche come D da deuterio) e un radioattivo, ^3H (indicato anche come T da trizio).

Prima di procedere, è necessario specificare che in questo testo si fa riferimento alla nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e quindi all'uso della simbologia $\delta^2\text{H}$ e non δD per indicare l'isotopo stabile dell'idrogeno.

Le abbondanze relative riferite all'ossigeno che si ritrovano in natura sono le seguenti: $^{16}\text{O}= 99,763\%$, $^{17}\text{O}= 0,0375\%$ e $^{18}\text{O}=0,1195\%$ (Morse e Mackenzie, 1990), mentre le abbondanze relative all'idrogeno sono rispettivamente di 99,9844 per ^1H e di 0,0156 per ^2H (Hoefs, 1997).

Solo determinate combinazioni di questi isotopi concorrono alla formazione delle molecole di acqua e sono: H_2^{16}O , $\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$, H_2^{17}O e H_2^{18}O . Ciò è legato a condizioni di stabilità in cui risulta sfavorita la formazione che presenta più di un isotopo pesante.

Nonostante le varie possibili configurazioni della molecola d'acqua, quelle isotopicamente più comuni sono: H_2^{16}O (99,7%), $\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$ (~0,3%), H_2^{17}O (~0,5%) e H_2^{18}O (~2%). Visto che in atmosfera il comportamento della molecola H_2^{17}O è simile a quello della molecola H_2^{18}O (più abbondante e quindi di più facile determinazione), gli studi di paleoclimatologia riguardanti gli isotopi si basano in modo particolare sulle variazioni di concentrazione delle molecole $\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$ e H_2^{18}O .

Secondo lo schema della Figura 2.1, durante il ciclo idrologico ogni cambiamento di fase dell'acqua determina dei frazionamenti isotopici a seguito di fenomeni di evaporazione e condensazione dovuti al fatto che le molecole d'acqua isotopicamente diverse presentano tensioni di vapore diverse (minori per le molecole con isotopi pesanti).

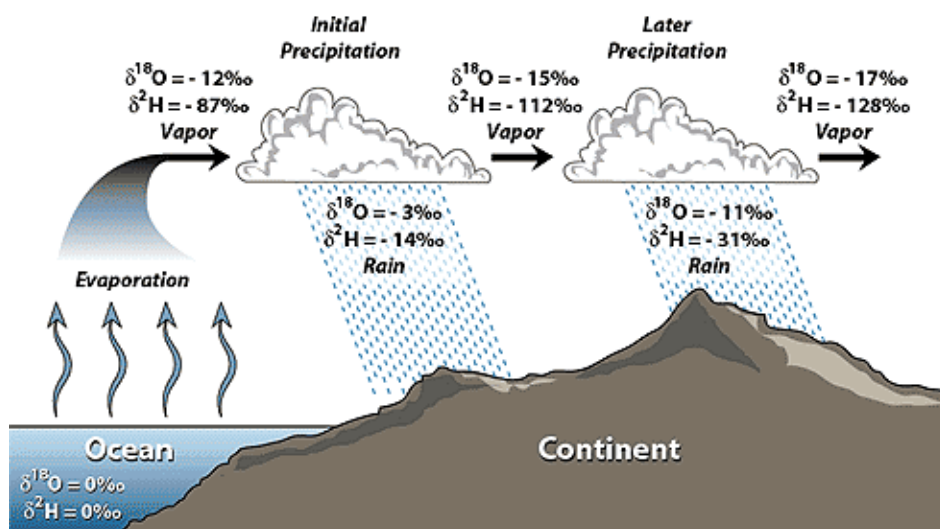


Figura 2.1 - Rappresentazione del frazionamento isotopico di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ nel ciclo idrogeologico. (Hoefs, 1997 e Coplen, 2000)

In generale, il vapore risulterà impoverito in isotopi pesanti rispetto all'acqua da cui si origina ($\delta_v < \delta_L$). Quindi, assumendo che la composizione isotopica dell'ossigeno e dell'idrogeno dell'acqua oceanica (punto di partenza e di fine del ciclo idrologico) sia 0‰, i valori di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ delle acque meteoriche risultano impoverite in isotopi pesanti rispetto all'acqua di mare mostrando valori

isotopici negativi. Al contrario, la condensazione del vapore darà origine ad una precipitazione più arricchita rispetto al vapore di partenza.

Il fattore di frazionamento α , che corrisponde al rapporto $^2\text{H}/^1\text{H}$ o $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ nella fase condensata e nella fase vapore, dipende dalla temperatura e dal cambiamento di fase.

Urey (1948) fu probabilmente il primo a fornire misure di composizione isotopica delle acque oceaniche, ma spettano a Dansgaard (1954) i primi studi riguardanti la relazione intercorrente tra la composizione isotopica delle precipitazioni e la temperatura.

Craig (1961a) studiò a livello globale la composizione isotopica delle acque dolci, quali precipitazioni, acque di lago e di fiume provenienti da tutto il mondo. In questo studio fu messa in evidenza la relazione lineare intercorrente tra $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$, e lui stesso suggerì come la variazione della composizione isotopica nelle precipitazioni potesse essere descritta da un processo di Rayleigh (serie di distillazioni successive in condizioni di equilibrio) (Figura 2.2), con l'assunzione che la condensazione del vapore avvenisse in condizione di equilibrio isotopico con rimozione della fase condensata dopo la sua formazione (Dansgaard, 1964):

$$\delta_p = \alpha_c ((1 + \delta_0)(m_{vc}/m_{v0})^{(\alpha_m - 1)}) - 1$$

dove:

α_c = fattore di frazionamento al momento di formazione della precipitazione

α_m = valore medio del fattore di frazionamento durante la traiettoria della massa d'aria

Con la distillazione Rayleigh il valore della composizione isotopica della precipitazione (δ_p) si può esprimere in funzione della composizione isotopica del vapore acqueo (δ_0) della massa d'aria all'origine e del contenuto in vapore acqueo iniziale (m_{v0}) e finale (m_{vc}) (Merlivat & Jouzel, 1979; Jouzel & Merlivat, 1984).

La quantità di vapore acqueo è direttamente proporzionale alla pressione del vapore saturo (che a sua volta dipende dalla temperatura) ed è inversamente proporzionale alla pressione dell'aria. Ne consegue la dipendenza della composizione isotopica delle precipitazioni da quella iniziale del vapore, dalla pressione dell'aria e dalla temperatura iniziale e finale di condensazione.

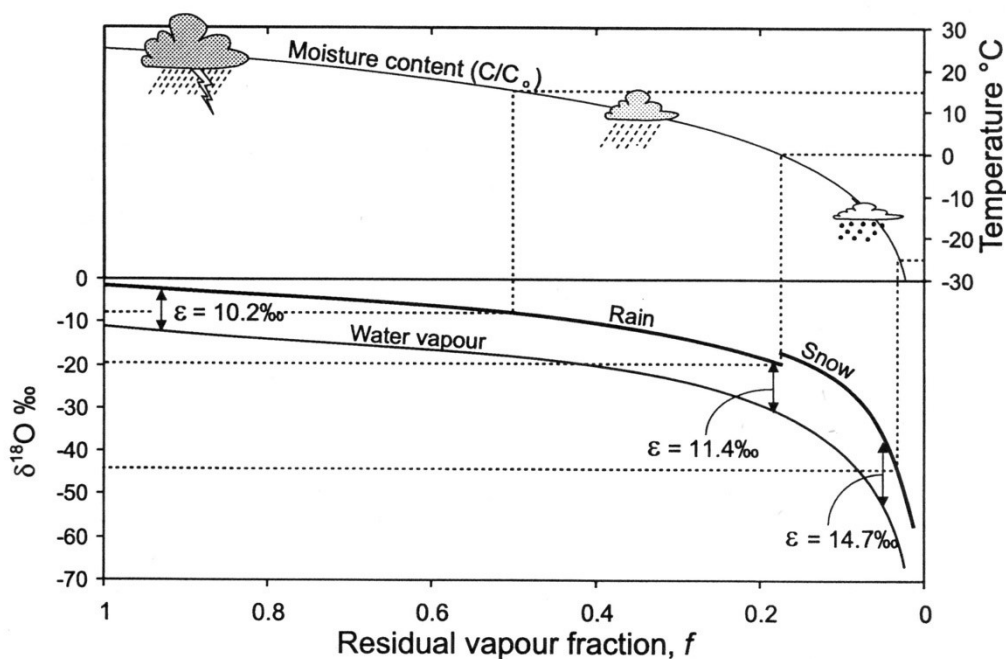


Figura 2.2 - Variazioni nel contenuto in ^{18}O delle precipitazioni in accordo con una distillazione di tipo Rayleigh con composizione iniziale del vapore $\delta^{18}\text{O}_{\text{vap}} = -11\text{‰}$, temperatura = 25°C e temperatura finale di -30°C . Le linee tratteggiate collegano il $\delta^{18}\text{O}$ alla temperatura di condensazione (Clark & Fritz, 1997)

Con il modello di Rayleigh, nelle precipitazioni il gradiente $\delta^{18}\text{O}$ o $\delta^2\text{H}$ /temperatura aumenta in modo continuo al diminuire della temperatura stessa (di circa $1\text{‰}/^\circ\text{C}$ a -10°C fino a $2,3\text{‰}$ a -50°C). Questo modello simula la variazione di composizione isotopica della massa d'aria fino a temperature pari a circa $-10\div-20^\circ\text{C}$.

Invece, per temperature più basse i dati sperimentali non trovano riscontro in tale modello siccome in Antartide, durante la formazione della neve mancando il passaggio intermedio con la fase liquida, la fase condensata trae origine direttamente dalla condensazione del vapore ed è quindi necessario tenere conto di un frazionamento isotopico aggiuntivo.

In generale quindi, attraverso il modello di Rayleigh si è in grado di riprodurre per le medie e alte latitudini la relazione tra la composizione isotopica delle precipitazioni (δ_p) e la temperatura.

La relazione lineare che intercorre tra $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ delle molecole di acqua fu notata per la prima volta da Friedman (1953). Visto però il carattere generale della retta di Craig (1961a), che descrive l'andamento delle precipitazioni globali, spesso ci si riferisce ad essa come la *Global Meteoric Water Line* (GMWL) (Figura 2.3):

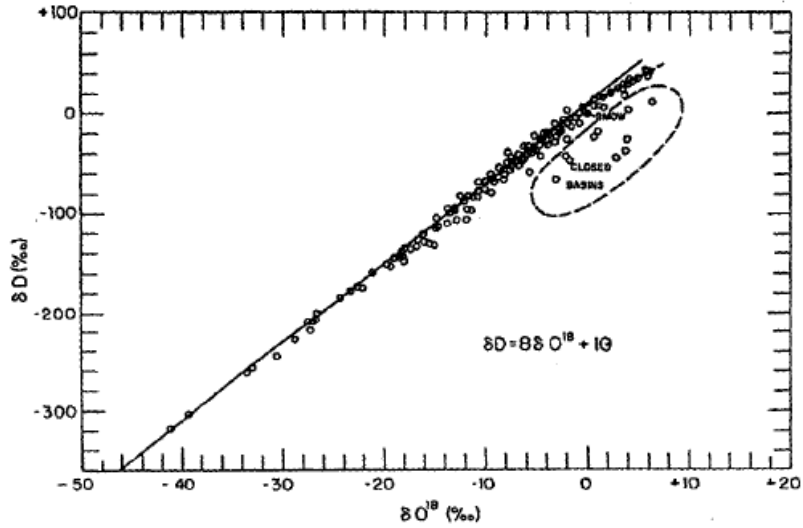


Figura 2.3 - Linea delle acque meteoriche globale (GMWL) (Craig, 1961a)

$$\delta^2\text{H} = 8\delta^{18}\text{O} + 10 \quad (\text{Craig, 1961a})$$

Tale relazione descrive le condizioni “normali” all’equilibrio che esistono fra il $\delta^{18}\text{O}$ e il $\delta^2\text{H}$.

Nel 1993 Rozanski, grazie al programma mondiale di raccolta e analisi isotopica di precipitazioni meteoriche mensili iniziato da IAEA (International Atomic Energy Agency di Vienna) e da WMO (World Meteorological Organization) e ad innumerevoli studi che ne conseguirono, ridefinì la GMWL come:

$$\delta^2\text{H} = (8,20 \pm 0,07) \delta^{18}\text{O} + (11,27 \pm 0,65) \quad (\text{Rozanski et al., 1993})$$

rappresentata nella Figura 2.4:

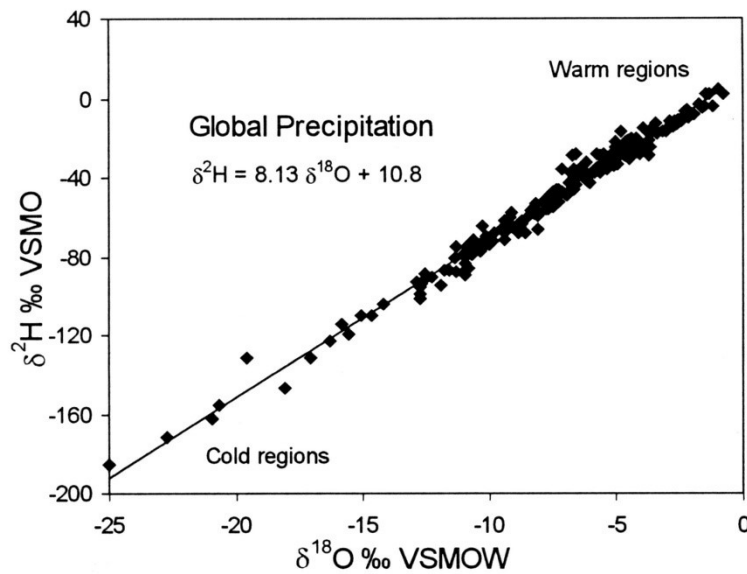


Figura 2.4 - “Global Meteoric Water Line”, compilata da Rozanski et al. (1993), adattata da Clark & Fritz (1997). VSMOW o VSMO = Vienna SMOW

Ciò conferma la validità del modello di regressione determinato da Craig (1961a). Sono presenti però delle eccezioni: le precipitazioni sottoposte a fenomeni di evaporazione e quindi lontane dalle condizioni di equilibrio isotopico mostreranno una deviazione dalla linearità $\delta^2\text{H}-\delta^{18}\text{O}$ della GMWL. La GMWL è una relazione che ha carattere globale; a livello locale ci si riferisce alla *Local Meteoric Water Line* (LMWL) con valori di pendenza e intercetta sito-specifici. Un esempio è rappresentato dalle tre differenti espressioni ottenute per l'Italia settentrionale, centrale e meridionale da Longinelli & Selmo (2003) tenendo conto della composizione isotopica dei campioni di precipitazioni medi mensili:

$$\text{Italia settentrionale: } \delta^2\text{H} = 7,709 \delta^{18}\text{O} + 9,403$$

$$\text{Italia centrale: } \delta^2\text{H} = 7,708 \delta^{18}\text{O} + 5,608$$

$$\text{Italia meridionale: } \delta^2\text{H} = 6,970 \delta^{18}\text{O} + 7,316$$

rappresentate nella Figura 2.5:

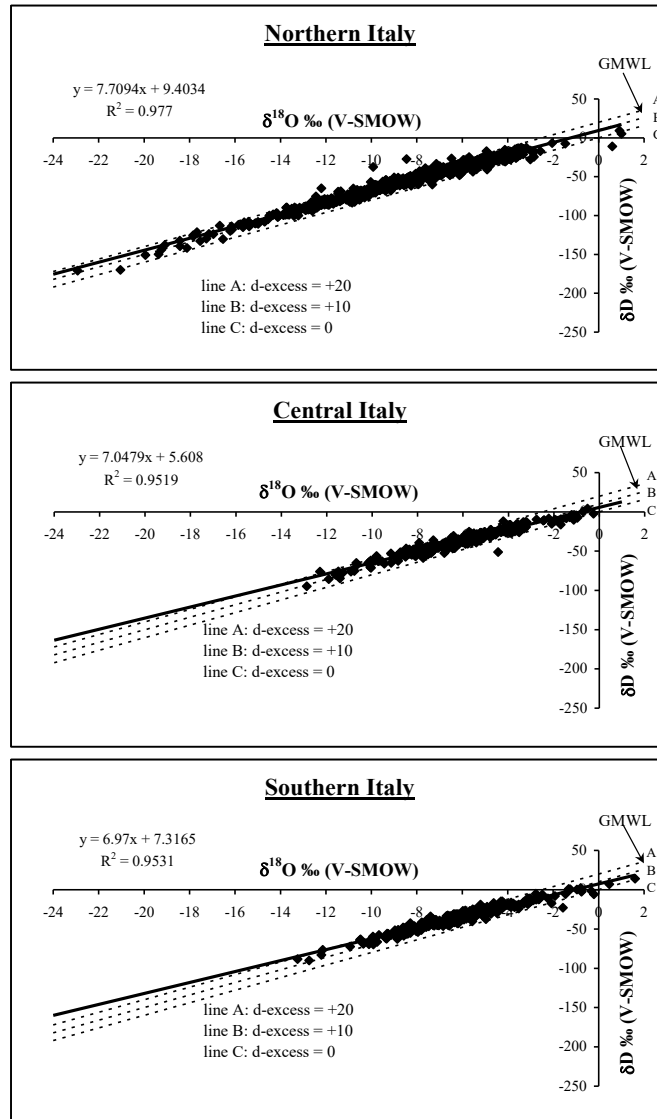


Figura 2.5 - Relazione tra $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ di campioni meteorici mensili dell'Italia settentrionale, centrale e meridionale (Longinelli & Selmo, 2003)

Se si considerano invece tutti i valori si ottiene la seguente espressione simile alla GMWL:

$$\delta^2\text{H} = 7,61 \delta^{18}\text{O} + 9,21 \text{ (Longinelli \& Selmo, 2003)}$$

Nell'analisi climatica e ambientale è di fondamentale importanza la conoscenza dei fattori che influenzano il valore di $\delta^{18}\text{O}$ delle precipitazioni. Sono cinque i principali fattori legati alla temperatura (parametro climatico da cui dipende il frazionamento) che influenzano la composizione isotopica delle precipitazioni e sono: la latitudine, l'altitudine, la continentalità, la stagionalità e l'abbondanza delle precipitazioni (Clark e Fritz, 1997).

Effetto latitudine

La composizione isotopica dell'ossigeno dipende dalla temperatura media di formazione delle precipitazioni, la quale risente della latitudine. La temperatura presenta valori inferiori ad alte latitudini ed aumenta alle basse latitudini; si avranno di conseguenza valori di $\delta^{18}\text{O}$ più bassi a latitudini maggiori e valori di $\delta^{18}\text{O}$ maggiori a latitudini inferiori. Lo stesso discorso riguarda $\delta^2\text{H}$.

Effetto altitudine

È il caso di un rilievo montuoso: quando una massa di vapore acqueo è soggetta ad espansione adiabatica per sollevamento tenderà a raffreddarsi. La diminuzione della temperatura in quota comporta una diminuzione dei valori di $\delta^{18}\text{O}$ nelle precipitazioni che si originano a quote più elevate rispetto a quelle che invece hanno origine in pianura o nelle zone costiere.

L'effetto altitudine dà origine ad un gradiente isotopico verticale associato alle precipitazioni, dove il valore di $\delta^{18}\text{O}$ è compreso tra -0,15 e -0,5‰ ogni 100 metri di quota.

Nel caso dell'Italia, le Alpi e gli Appennini sono caratterizzati da valori di pioggia più negativi (-9‰), mentre lungo le zone costiere ritroviamo valori meno negativi (-6/-5‰) per effetto dell'azione mitigante del mare (Longinelli e Selmo, 2003) (Figura 2.6).

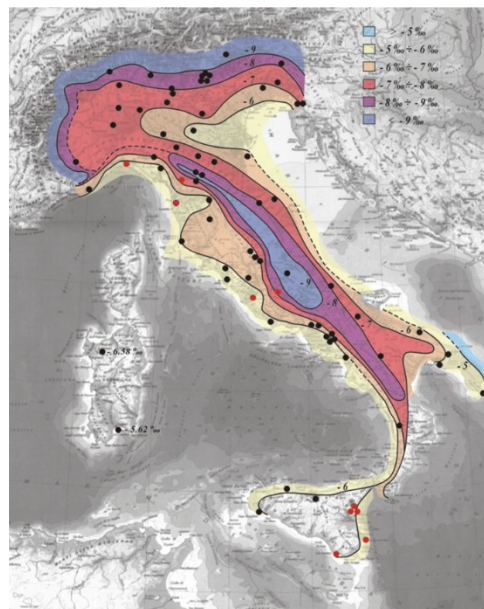


Figura 2.6 - Variazione della composizione isotopica delle piogge in Italia (Longinelli e Selmo, 2003)

Effetto continentalità

Come per l'effetto latitudine, le precipitazioni che avvengono in zone interne al continente saranno impoverite di isotopi pesanti rispetto alle zone costiere per via del fatto che la massa di vapore che si

genera dall'oceano lungo il suo percorso verso il continente subisce impoverimento in isotopi pesanti a causa delle condensazioni parziali.

Effetto stagionalità

Si osserva un andamento quasi sinusoidale legato alle variazioni stagionali della temperatura: le precipitazioni invernali sono impoverite in isotopi pesanti rispetto a quelle estive.

Effetto quantità

Durante un evento di precipitazione la composizione isotopica della pioggia non rimane costante ma via via assume valori sempre più negativi a causa della distillazione frazionata e della diminuzione della temperatura.

I processi qui sopra descritti concorrono alla composizione isotopica delle precipitazioni e sono legati all'equilibrio isotopico liquido-vapore, in quanto la condensazione avviene in caso di umidità relativa pari al 100% (condizione che si verifica all'interno della nuvola).

Per una corretta analisi ambientale, oltre ai fattori precedentemente descritti, è importante valutare anche i comportamenti alimentari e gli effetti metabolici. Ad esempio, nelle piante il contenuto dei diversi isotopi dell'ossigeno dipende dall'abbondanza isotopica dell'acqua assorbita dal terreno che è a sua volta connessa al ciclo planetario dell'acqua. L'acqua a livello fogliare subisce un frazionamento isotopico a causa dell'evapotraspirazione, che porta all'arricchimento dell'isotopo più pesante nelle stesse foglie.

Per quanto concerne l'acqua corporea, le vie di assunzione dell'ossigeno da parte degli organismi sono: tramite l'acqua (bevuta o ingerita con i cibi), tramite il cibo (O strutturale) e tramite la respirazione. La fonte più abbondante di ossigeno è quello metabolizzato sotto forma di acqua ingerita e il suo valore di composizione isotopica rappresenta la variabile principale in quanto l'ossigeno assunto mediante la respirazione ha un valore fisso di +23‰).

Una parte dell'ossigeno assunto viene espulso sotto forma di CO₂, urina e sudore e ciò che ne consegue è che la composizione isotopica dell'ossigeno dell'acqua corporea risulterà essere funzione dei frazionamenti isotopici legati al metabolismo oltre che dei valori iniziali delle varie componenti in entrata nell'organismo (Bryant J. D. and Froelich P. N., 1995).

Autori come Kornexl et al., 1997 e Rossmann et al., 1998 hanno dimostrato come i valori del rapporto isotopico ¹⁸O/¹⁶O nell'acqua del latte riflettano quelli dell'acqua bevuta degli animali e possano quindi

essere considerati validi traccianti dell'area geografica di provenienza del prodotto animale. Inoltre, l'ingestione di erba fresca, con acqua arricchita in isotopi pesanti, e la traspirazione animale determinano un arricchimento in ^{18}O nell'acqua corporea rispetto ai valori di ^{18}O dell'acqua ingerita.

2.1.2 Gli isotopi del carbonio

Il carbonio in natura presenta quattro isotopi radioattivi (^{10}C , ^{14}C , ^{15}C) e due isotopi stabili (^{12}C , ^{13}C), questi ultimi con abbondanza rispettivamente di 98,892% e 1,108%.

Una riserva importante di carbonio è la CO_2 atmosferica, utilizzata dalle piante nei processi fotosintetici che, attualmente, presenta un valore intorno a -7,8‰, (Marino et. McElroy, 1991).

In generale, tutti i processi biochimici determinano un frazionamento isotopico del carbonio. La reazione enzimatica della fotosintesi clorofilliana, mediante la quale la pianta converte l'energia luminosa ricevuta dall'ambiente esterno in energia chimica utile ad ottenere composti ad alto livello di energia, ricade all'interno di questi processi.

A seconda del meccanismo di fissazione del carbonio che avviene durante la fotosintesi clorofilliana, si distinguono tre tipologie di piante terrestri:

- piante a ciclo fotosintetico C3 (ciclo di Calvin - zuccheri a 3 atomi di carbonio);
- piante a ciclo fotosintetico C4 (ciclo di Hatch-Slack - zuccheri a 4 atomi di carbonio);
- piante CAM (Metabolismo Acido delle Crassulacee).

La via principale di assimilazione della CO_2 , descritta da Calvin è la via C3. Le piante che utilizzano questa via sono denominate in questo modo in quanto la fissazione dell'anidride carbonica dà origine a due molecole di acido fosfoglicerico (composto da tre atomi di C) che, grazie all'azione di un enzima (ribulosiodifosfato-carbossilasi), viene trasformato in una molecola di gliceraldeide 3-fosfato, utilizzata per la sintesi di glucosio, e altre molecole organiche.

Le piante C3 effettuano efficacemente la fotosintesi a temperature temperate poiché, tenendo aperti gli stomi di giorno, in caso di una temperatura eccessiva evaporerebbe troppa acqua.

Le C3, tipiche quindi delle zone fredde e temperate, rappresentano circa l'80% delle piante esistenti e tra queste troviamo: gli alberi da frutto, avena, soia, orzo, riso, radici, tuberi, specie erbacee temperate, leguminose foraggere e graminacee foraggere.

Le piante C4 hanno sviluppato una via alternativa al Ciclo di Calvin per la fissazione della CO_2 che avviene mediante l'enzima PEP carbossilasi con produzione di ossalacetato a quattro atomi di carbonio da cui prende il nome del ciclo. Questa via alternativa si basa sulla presenza di due cloroplasti differenti dal punto di vista morfologico e funzionale.

Queste piante, tipiche delle zone tropicali, secche, umide e a volte anche dei terreni salati, compongono il 15% delle piante esistenti e tra queste troviamo: canna da zucchero, sorgo, miglio, mais, specie erbacee tropicali e graminacee foraggere delle aree tropicali.

Le piante CAM sono in grado di utilizzare entrambi i meccanismi di fissazione descritti, possiedono quindi un ciclo metabolico che consente di ottimizzare l'attività fotosintetica in ambienti estremi (es. ambienti desertici). Il meccanismo di fotosintesi CAM avviene anche con gli stomi chiusi. Al contrario, nelle vie metaboliche ordinarie delle piante C3 e C4 la fotosintesi necessita dell'apertura degli stomi affinché possano avvenire gli scambi gassosi (ingresso della CO₂ ed uscita di O₂). A stomi chiusi, infatti, le piante non svolgono la fotosintesi.

La via metabolica alternativa che si verifica è simile a quella delle piante C4 in cui però la fase luminosa e la fase oscura sono separate: l'ingresso della CO₂ e la sua fissazione avvengono durante questi due momenti distinti, con conseguente riduzione di perdita di acqua.

Nella dieta umana queste piante hanno un'importanza marginale, costituiscono solo il 5% delle piante esistenti e rientrano in questa categoria le Crassulacee e le Cactacee, di cui l'unica commestibile è l'ananas.

La fotosintesi C4 e CAM costituisce un meccanismo di adattamento di alcune specie di piante a condizioni di aridità ambientale per cercare di risparmiare acqua nella fase di fissazione del carbonio. Tutte queste tipologie di piante presentano campi di valori isotopici separati e distinguibili (Figura 2.7). Le piante C3, più discriminanti verso il ¹³C atmosferico rispetto alle C4, sono caratterizzate da valori di δ¹³C compresi tra -35‰ e -21‰ (con un valore medio di -26,5‰), mentre le C4 presentano valori isotopici meno negativi e variabili tra -14‰ e -9 ‰ (con un valore medio di -12,5‰) (Smith, 1972). Le CAM invece hanno valori isotopici intermedi tra C3 e C4 (tra -30 e -10‰) (Smith, 1972).

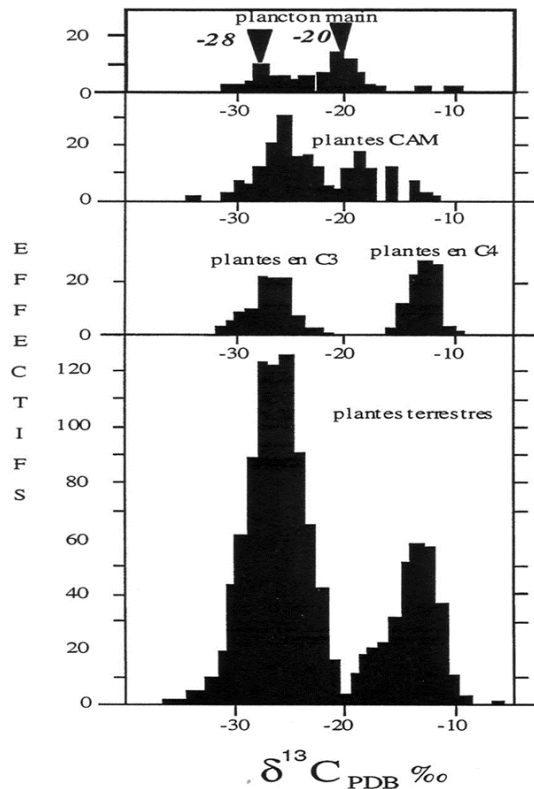


Figura 2.7 – Campi di variabilità di $\delta^{13}C$ nelle piante terrestri (Dienes, 1980)

Per quanto riguarda le piante C3, i valori di $\delta^{13}C$ possono subire variazioni rispetto al valore medio in risposta ai fattori ambientali quali: la disponibilità di acqua (in caso di stress idrico si determina la chiusura degli stomi apportando un arricchimento isotopico, processo opposto si verifica per le piante C4), la temperatura e l'umidità relativa (Figura 2.8). Per questi ultimi due fattori, all'aumentare dell'una e al diminuire dell'altra, si avranno valori di composizione isotopica del carbonio più elevati. Tutte queste variazioni sono dovute al fatto che i parametri climatici influenzano l'apertura stomatica e quindi l'ingresso delle molecole di CO_2 e a loro volta il processo fotosintetico.

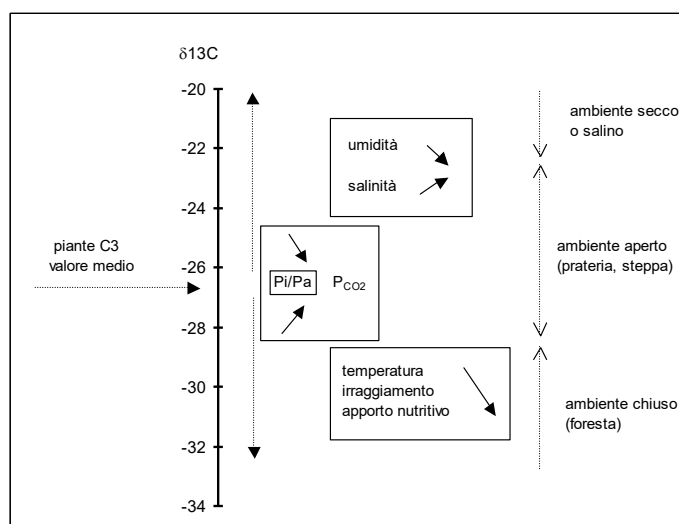


Figura 2.8 – Rappresentazione schematica della relazione tra il $\delta^{13}\text{C}$ delle piante C3 e i fattori climatici (Iacumin modificata da Bocherens, 2001)

I valori di $\delta^{13}\text{C}$ che si riscontrano nei tessuti degli erbivori sono uguali a quelli delle piante non essendoci frazionamento. Un discorso a parte sono i ruminanti, in particolare i bovini, per i quali il processo di metanogenesi causa un arricchimento in carbonio che è stato misurato nel collagene delle ossa. Al contrario, nel passaggio lungo la catena trofica da erbivoro a carnivoro-onnivoro, quest'ultimi sono arricchiti di circa 1-2‰ in ^{13}C . I valori medi variano in base alla specie e taglia dell'animale.

Sono numerosi i lavori scientifici che, trattando il tema della tracciabilità, prendono in considerazione la variazione del $\delta^{13}\text{C}$ nei prodotti di origine animale e la sua dipendenza con la dieta. Il rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ è legato alla tipologia di foraggio assunto dagli erbivori e la sua determinazione consente di discriminare tra piante C3 e C4 (Norman et al., 2009).

Nel caso del latte, Minson e coautori nel 1975 hanno evidenziato come il latte proveniente da mucche alimentate con piante C3 mostri un $\delta^{13}\text{C}$ più negativo rispetto al latte proveniente da mucche alimentate con piante C4, a dimostrazione del fatto che il contenuto in ^{13}C del latte prodotto è funzione del contenuto in ^{13}C della specie botanica foraggera assunta dall'animale.

Il latte si compone sostanzialmente di una frazione grassa ed una proteica (caseina) ed è su quest'ultima che, una volta estratta dal latte o dal formaggio, viene determinato il valore di $\delta^{13}\text{C}$ del latte stesso.

Boutton et al. 1988 e Wilson et al. 1988 hanno dimostrato come una variazione dell'alimentazione animale (da piante C3 a C4 e viceversa) comporti nel latte una variazione del rapporto isotopico che impiega circa quattro giorni a stabilizzarsi.

2.1.3 Gli isotopi dell'azoto

L'azoto rappresenta il 78% dell'atmosfera terrestre ed è l'elemento fondamentale nella costituzione di importanti molecole organiche quali DNA, proteine e alcune vitamine.

L'azoto si trova in natura con due isotopi stabili ^{14}N e ^{15}N le cui abbondanze relative sono rispettivamente 99,634% e 0,366%, e diversi isotopi radioattivi.

Dai valori isotopici dell'azoto è possibile ricavare informazioni inerenti alla dieta degli animali e all'ambiente.

Per quanto riguarda la dieta, l'unica fonte di azoto è rappresentata dalle proteine il cui rapporto isotopico fornisce informazioni circa il livello trofico, con arricchimento del +3/+5‰ in $\delta^{15}\text{N}$ ad ogni passaggio di livello (Steele & Daniel, 1997; De Niro & Epstein, 1980; Bocherens e Drucker, 2003). I carnivori sono caratterizzati da un arricchimento in azoto rispetto agli erbivori di cui si nutrono, i quali risultano più positivi rispetto alle piante che sono alla base della catena alimentare sia terrestre (n. passaggi nella catena trofica 2-3) che marina (n. passaggi nella catena trofica fino a 7).

Quindi, il valore della composizione isotopica dell'azoto ricavato nella frazione organica di un reperto biologico consente di risalire al livello trofico dell'animale. I valori di $\delta^{15}\text{N}$ nelle piante sono molto variabili: sono compresi fra -7 e +18‰ con l'eccezione rappresentata dalle leguminose (es. trifoglio ed erba medica) che, essendo specie azoto fissatrici e quindi in grado di fissare direttamente l'azoto atmosferico, presentano un valore vicino allo 0‰ (Mariotti et al., 1980).

Diversi parametri ambientali sono in grado di influenzare il valore di $\delta^{15}\text{N}$ nelle piante, alcuni esempi sono rappresentati dalla disponibilità di acqua, di composti azotati, dalla quantità di precipitazioni, dalla temperatura e dalle simbiosi (es. micorrize).

I terreni umidi e freddi sono caratterizzati da valori più negativi rispetto ai terreni assolati equatoriali (Amundson et al., 2003). Negli ambienti tropicali, dove si riscontra una maggiore disponibilità di azoto, il valore di $\delta^{15}\text{N}$ sarà più basso rispetto a quello che si riscontra nei suoli temperati.

I fertilizzanti influenzano questi valori a seconda della loro origine naturale o di sintesi. I primi mostrano valori superiori allo zero, mentre i secondi, essendo prodotti dalla fissazione di azoto atmosferico (utilizzato come standard di riferimento), si avvicinano allo zero.

Dai valori isotopici dell'azoto non è possibile discriminare tra piante C3 e C4 siccome, per entrambe le categorie di piante, i valori di composizione isotopica dell'azoto ricadono nello stesso intervallo (Figura 2.9).

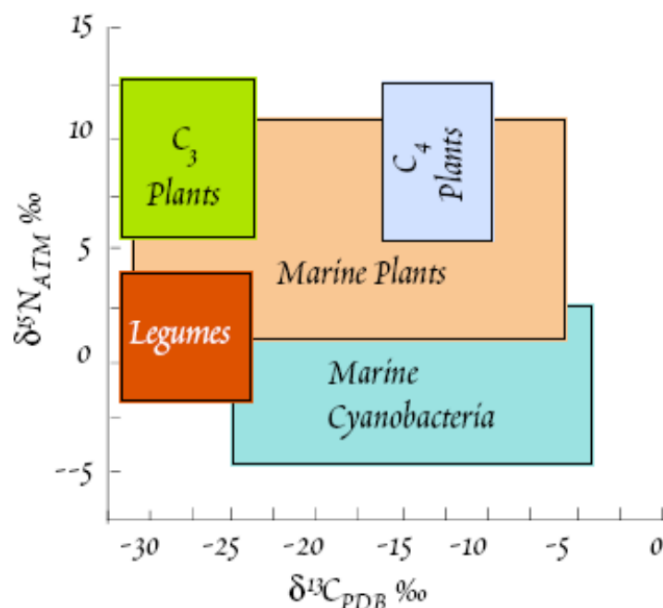


Figura 2.9 – Relazione tra $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ nelle piante più diffuse (White, 2009)

Il valore di $\delta^{15}N$ nei tessuti animali risente anche dall'allattamento: durante l'allattamento l'animale si trova ad un livello trofico superiore rispetto a quello da adulto.

Il rapporto isotopico dell'azoto è anche un utile discriminante dell'area di produzione, in quanto il valore ritrovato nei prodotti animali è legato alla dieta (Kornexl et al., 1997 e Manca et al., 2001).

Camin e Versini (2001) hanno visto come il valore isotopico dell'azoto dei prodotti lattiero-caseari rispecchia, attraverso le piante di cui gli animali si cibano, il valore di $\delta^{15}N$ del suolo e come le variazioni di $\delta^{15}N$ riscontrate nella caseina del latte risentano delle condizioni climatiche, litologiche e delle tecniche di concimazione alle quali i terreni sono sottoposti.

Inoltre, questi stessi autori hanno constatato come un incremento dei processi quali nitrificazione, denitrificazione e mineralizzazione dell'azoto nel suolo durante il periodo estivo concorrano ad abbassare il contenuto di ^{15}N nella caseina del latte.

2.1.4 Gli isotopi dello zolfo

Lo zolfo è un elemento di estrema importanza per le funzioni vitali; un esempio è rappresentato dai ponti di di-solfuro indispensabili sia per le strutture secondarie e terziarie delle proteine e sia come parte funzionale dei siti degli enzimi.

Dello zolfo sono noti quattro isotopi stabili con numero di massa 32 (abbondanza relativa 95,02%), 33 (0,75%), 34 (4,21%) e 36 (0,02%) e diversi isotopi instabili.

La misura del rapporto isotopico $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ fu una delle prime effettuate nel campo della geochimica isotopica ma la riproducibilità di queste misure da parte delle tecniche utilizzate non è mai stata soddisfacente (Cortecci et al., 1975).

L'atmosfera costituisce la fonte principale di solfato per gli ecosistemi, a cui va aggiunto quello proveniente dal dilavamento dei minerali. Nelle località industrializzate, invece, le acque meteoriche solubilizzano e trasportano a terra l'anidride solforosa (SO_2) immessa dalle centrali termoelettriche, dalle caldaie domestiche e da alcune tipologie di attività industriali.

Nelle piante la maggior parte di zolfo è presente sotto forma di due amminoacidi (la cisteina e la metionina) che presentano una concentrazione media di zolfo inferiore all'1%, contro il 2% misurato nella biomassa animale (Krouse et al., 1991) le cui maggiori fonti di solfato sono i vegetali e l'acqua potabile.

I fattori naturali che influenzano i valori di $\delta^{34}\text{S}$ nelle piante terrestri riguardano caratteristiche litologiche della zona di interesse, i fertilizzanti (come il solfato ammonico ed il solfato potassico), le emissioni di SO_2 e la distanza dalla costa (deposizione di aerosol di solfato).

La misura della composizione isotopica dello zolfo effettuata sulle proteine solubili, sia se si tratta di piante che di animali (Tanz et al., 2010), permette di risalire all'origine dei prodotti alimentari. Inoltre, in associazione al carbonio e all'azoto, la distribuzione isotopica dello zolfo è utile per comprendere le caratteristiche della catena trofica e la caratterizzazione biogeochimica dei processi ambientali.

Studi recenti (Camin et al., 2007; Rossmann et al., 2007) hanno evidenziato che lo zolfo non subisce importanti frazionamenti isotopici nel trasferimento dalla pianta ai tessuti animali.

2.2 Il rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$

Lo stronzio è un elemento chimico appartenente al gruppo dei metalli alcalino-terrosi. Presenta quattro isotopi stabili naturali (^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr , ^{88}Sr) caratterizzati da diverse abbondanze isotopiche relative, che sono rispettivamente pari a: 0,56%, 9,86%, 7,0% e 82,58%.

L'abbondanza di ^{87}Sr sulla Terra dipende da quella dell'isotopo ^{87}Rb che subisce decadimento radioattivo β , di cui si parlerà più avanti nel capitolo riguardante la discussione dei dati di questa tesi. L'abbondanza relativa di ^{87}Sr , che viene espressa dal rapporto $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, è variabile e dipende dalla natura e dall'età delle rocce.

Il rapporto isotopico dello stronzio consente una mappatura dell'area geografica studiata. Questo è reso possibile dal fatto che, assumendo che abbiano la stessa composizione litologica, i terreni più antichi tenderanno a valori di $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ superiori rispetto alle terre più giovani.

La sistematica dello stronzio è utilizzata anche in campo idrologico e idrogeologico. Questo rapporto isotopico misurato nelle acque riflette la composizione isotopica della roccia da cui deriva lo stronzio in soluzione e, siccome una volta acquisito non si modifica, è importante anche per indagare su possibili mescolamenti di acque con origine diversa.

A tal proposito, è bene chiarire alcuni concetti riguardanti gli isotopi dello stronzio.

Il decadimento radioattivo può essere considerato una reazione irreversibile con cinetica di primo ordine. In altri termini, la variazione del numero di atomi nel tempo (velocità della reazione) è proporzionale al numero di atomi radioattivi presenti nel materiale (o alla loro concentrazione):

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N \quad \rightarrow \quad -dN = \lambda N dt$$

dove N indica il numero di atomi, presenti al tempo t , della specie atomica N (o la loro concentrazione) che decade in cui dN atomi decadono per trasformarsi in dD atomi della specie “figlio” D e λ è detta *costante di decadimento* con dimensione $[t]^{-1}$. Integrando con condizioni iniziali $N = N_0$ e $t = t_0$, si ottiene

$$\begin{aligned} -\ln \frac{N}{N_0} &= \lambda (t - t_0) \quad \rightarrow \quad \frac{N}{N_0} = e^{-\lambda(t-t_0)} \quad \rightarrow \quad \frac{N_0}{N} = e^{\lambda(t-t_0)} \quad \rightarrow \\ &\rightarrow N_0 = N e^{\lambda(t-t_0)} \quad \rightarrow \quad N_0 - N = N (e^{\lambda(t-t_0)} - 1) \end{aligned}$$

Indichiamo con D^* il numero di atomi del nuclide figlio che si sono formati per decadimento. Se il nuclide figlio D non era presente all’inizio ($t = t_0$) del decadimento, in base alla precedente, scriviamo:

$$D^* = N_0 - N = N (e^{\lambda(t-t_0)} - 1)$$

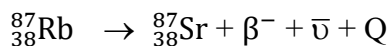
Se, viceversa, al tempo $t = t_0$ nel campione era già presente un certo numero D_0 di atomi di D , otterremo

$$D^* = D - D_0 = N (e^{\lambda(t-t_0)} - 1) \tag{1a}$$

e, pertanto,

$$D = D_0 + N (e^{\lambda(t-t_0)} - 1) \tag{1b}$$

Consideriamo ora sistema Rb-Sr. Sappiamo che in natura si verifica la reazione di decadimento radioattivo:



dove β^- è un elettrone, $\bar{\nu}$ un antineutrino e Q l’energia di decadimento. Pertanto, l’equazione (1a) diviene, rispettivamente,

$${}^{87}\text{Sr}^* = ({}^{87}\text{Sr} - {}^{87}\text{Sr}_0) = {}^{87}\text{Rb} (e^{\lambda(t-t_0)} - 1) \tag{2}$$

Dal momento che lo stronzio ^{86}Sr presente nel materiale in numero di atomi (o concentrazione) $^{86}\text{Sr}_0$ al tempo $t = t_0$ non decade e, pertanto non si modifica, possiamo dividere la (2) per $^{86}\text{Sr}_0$, che indicheremo genericamente con ^{86}Sr :

$$\frac{^{87}\text{Sr}^*}{^{86}\text{Sr}} = \frac{^{87}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}} - \frac{^{87}\text{Sr}_0}{^{86}\text{Sr}} = \frac{^{87}\text{Rb}}{^{86}\text{Sr}} (e^{\lambda(t-t_0)} - 1)$$

$$\frac{^{87}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}} = \frac{^{87}\text{Sr}_0}{^{86}\text{Sr}} + \frac{^{87}\text{Rb}}{^{86}\text{Sr}} (e^{\lambda(t-t_0)} - 1) \quad \lambda = 1.42 \cdot 10^{-11} \cdot \text{a}^{-1} \quad (\text{Steiger e Jäger 1977}) \quad (3)$$

La (3) ci fornisce il valore del rapporto isotopico $\frac{^{87}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}$ al tempo t . Dalla (3) si vede che a parità di intervallo di tempo $(t - t_0)$, la differenza tra i rapporti isotopici sarà via via più grande al diminuire del rapporto isotopico iniziale $\frac{^{87}\text{Sr}_0}{^{86}\text{Sr}}$. Inoltre, dalla (2) si vede che a parità di $^{87}\text{Sr}_0$, valore iniziale, più è elevato il valore di ^{87}Rb al tempo t_0 , più elevato sarà il valore il valore ^{87}Sr (e, quindi, $^{87}\text{Sr}^*$) al tempo t . *Quindi, si può affermare che, più sono elevati i valori di ^{87}Rb e più sono bassi i valori di ^{87}Sr al tempo t_0 , più grande sarà la variazione del rapporto isotopico ^{87}Sr nel campione nell'intervallo di tempo $t - t_0$.*

In questa sede assumiamo che i minerali fondamentali che costituiscono le rocce con cui le acque interagiscono siano silicati e carbonati. Tra i silicati consideriamo i plagioclassi, il feldspato potassico e le miche, e i minerali argillosi quali illite e strati misti illite-montmorillonite. I plagioclassi sono caratterizzati da alto rapporto Sr/Rb mentre le miche e le illiti da bassissimo rapporto. Il feldspato potassico ha valori intermedi. Pertanto, in base a quanto visto circa il decadimento radioattivo, possiamo affermare che la variazione del rapporto isotopico $\frac{^{87}\text{Sr}}{^{86}\text{Sr}}$ nel tempo sarà molto elevato nei fillosilicati, molto ridotto nei carbonati.

Inoltre, precisiamo che Sr è in genere diadiachico di Ca e che la massima parte del calcio e dello stronzio presente nelle acque deriva da dissoluzione della calcite. A mano a mano che passa il tempo, $(t - t_0)$, dalla formazione di calcite e silicati costituenti le rocce (t_0), i silicati tenderanno in misura variabile ad aumentare il rapporto isotopico, mentre il rapporto resterà praticamente costante nella calcite perché di fatto poverissima/priva di rubidio. Se la roccia subisce un processo metamorfico a temperatura sufficientemente elevata da consentire la redistribuzione degli isotopi nelle fasi coesistenti, la calcite aumenterà il proprio rapporto isotopico. Ora, si può affermare che la calcite costituisce il minerale diffuso più solubile (fanno eccezione i solfati di calcio su cui torneremo più avanti): pertanto, le acque che hanno subito interazioni con le formazioni metamorfiche alpine saranno generalmente caratterizzate da un rapporto isotopico più elevato rispetto a quelle provenienti da aree carbonatiche metamorfiche e non metamorfiche, ad esempio le aree carbonatiche sud-alpine.

Inoltre, è possibile misurare la composizione isotopica dello stronzio anche negli alimenti e sfruttare questa misura per determinarne la provenienza. Lo stronzio è direttamente coinvolto nel metabolismo di molti organismi viventi come sostituto del Ca (Pors Nielsen, S. 2004), in quanto i due ioni presentano stessa carica e raggio simile. È inoltre un vicariante del Ca anche nei minerali quali apatite, carbonati, feldspato e solfati (gesso ed anidride) (Capo et al., 1998).

Studi come quello condotto da Hutchin e Vaughan nel 1968 dimostrano come il rapporto Ca/Sr della soluzione nutriente sia mantenuto nella pianta, siccome l'assorbimento dello Sr è direttamente legato a quello del Ca.

Siccome il rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ non mostra variazioni significative lungo la catena alimentare, si presume che l'elemento, dalla frazione labile del suolo, venga trasferito attraverso la pianta al prodotto alimentare senza subire un rilevabile frazionamento isotopico (Price et al, 2002; Kennedy et al., 2000).

Quindi, le differenze che si riscontrano nei valori $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ sono da ricondursi alle proprietà dei terreni (tipologia ed età della roccia) (Horn et al., 1993 e 1998).

Purtroppo, anche i fertilizzanti possono modificare la composizione isotopica della frazione labile di stronzio nel terreno. Infatti, i fertilizzanti, ma in particolare i concimi, contengono sostanze attive che, una volta rilasciate nel suolo, sono immediatamente biodisponibili e la cui composizione isotopica è funzione della materia prima da cui provengono.

Non vengono qui riportati i valori di composizione isotopica dei fertilizzanti, in quanto molto variabili a seconda della tipologia di prodotto.

I vantaggi che si riscontrano nell'analisi isotopica dello stronzio sono quindi l'assenza di frazionamento apprezzabile durante le reazioni bio-chimiche e il basso rischio di contaminazione di Sr dall'atmosfera in quanto presente in concentrazione molto bassa.

2.3 Il suolo e la distribuzione degli elementi minerali

Di seguito viene riportata una breve trattazione circa la distribuzione a livello del suolo e l'assorbimento nelle piante da parte degli elementi chimici analizzati (P, S, Cl, K, Ca, Zn, Br, Rb, Sr) in questa tesi.

Il terreno sul quale crescono la maggior parte delle piante terrestri offre loro una serie di “servizi”, tra cui la fornitura di acqua e nutrienti minerali dalla soluzione del suolo.

Nonostante le varie tipologie di terreno, è possibile tracciare un profilo del suolo comune nel quale si individuano strati orizzontali che giacciono uno sopra l'altro, detti orizzonti. Tre sono gli orizzonti

principali A, B e C, dove all'orizzonte A corrisponde il soprassuolo, fonte di nutrienti minerali per le piante e di materia organica.

La materia organica presente per la maggiore è di origine vegetale. Questa subisce degradazione da parte degli organismi del suolo e forma una sostanza organica composita detta humus. L'humus è fonte di nutrimento per i microrganismi che, attraverso la sua degradazione, liberano nel terreno particelle più semplici che le piante sono così in grado di utilizzare.

La dotazione degli elementi nutritivi di un terreno si compone di *macroelementi*, assorbiti dalle piante in maggiori quantità, e *microelementi* o *oligoelementi*, assorbiti in quantità minore e che svolgono funzione esclusivamente dinamica, in genere come attivatori di enzimi.

Tra i macroelementi ritroviamo: i macroelementi principali tra cui fosforo (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}), potassio (K^+) e i macroelementi secondari tra cui calcio (Ca^{2+}), zolfo (SO_4^{2-}). Essi costituiscono anche i nutrienti più importanti per le piante.

Tra i microelementi ritroviamo: ferro (Fe^{3+}), cloro (Cl^-), manganese (Mn^{2+}), zinco (Zn^{2+}) e, per alcune specie, il silicio.

Ognuno di questi svolge una specifica azione nei processi vitali delle piante, che assimilano, questi e altri nutrienti minerali, dal terreno (in misura maggiore), dove sono presenti disciolti nella soluzione acquosa del suolo che circonda le radici.

In caso di carenza da nutrienti nel suolo, i nutrienti mancanti alle piante possono essere forniti sotto forma di fertilizzante.

Le particelle di argilla, che derivano dalla degradazione chimica del suolo, sono dotate di carica negativa in grado di attrarre cationi minerali importanti per la nutrizione delle piante, come il potassio (K^+), il magnesio (Mg^{2+}) e il calcio (Ca^{2+}). Questi cationi però, per poter essere assunti dalle piante, devono staccarsi dalle particelle di argilla; vengono quindi scambiati con protoni dalle radici (pompati dalla radice o liberati in seguito alla ionizzazione dell'acido carbonico) in un processo detto *scambio ionico*.

L'ordine di assorbimento per scambio ionico degli elementi chimici maggiori nella fase liquida del suolo (soil solution) è $\text{Al}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$.

Uno dei parametri attraverso i quali è possibile quantificare la capacità di scambio ionico di un suolo è la *capacità di scambio cationico* (CSC). La CSC consiste in un importante meccanismo attraverso il quale il suolo è in grado di trattenere e rendere disponibili alle piante e ai microrganismi diversi elementi quali, il calcio, il potassio, ecc. Viene definita come la quantità di cationi scambiabili che il complesso adsorbente del suolo stesso è in grado di trattenere. Si tratta di un indice di potenziale

fertilità chimica del terreno espresso in milliequivalenti/100 g ed il pH, a parità di condizioni, gioca un ruolo chiave.

La CSC presenta bassi valori nei terreni poveri di colloidali e nelle regioni tropicali nelle quali si ritrovano suoli ricchi di minerali argillosi ma privi di sostanza organica. I valori aumentano nel caso di terreni argillosi delle zone temperate; mentre i valori più alti si ritrovano nei terreni ben dotati di sostanza organica.

Nel suolo il comportamento, la mobilità, la disponibilità e la tossicità degli elementi minerali sono determinati da vari fattori, quali: la forma chimica dell'elemento, la sua interazione con altri elementi, il pH del suolo, la CSC, la presenza di microrganismi e piante e le condizioni ambientali.

Gli elementi che presentano una buona mobilità sono: l'azoto, il fosforo, il potassio, il magnesio, il cloro; quelli con una mobilità media: il boro, il ferro, lo zinco, il rame e il molibdeno; e con una mobilità scarsa troviamo: il calcio e il manganese.

Le piante assorbono i nutrienti attraverso le radici, ma anche attraverso i fori sulle foglie (nutrizione fogliare) che costituiscono però una nutrizione eccezionale.

I nutrienti possono entrare in contatto con l'apparato radicale in vario modo e diverse sono le strategie messe in atto dalle piante per aumentare l'assorbimento degli elementi nutritivi (es. aumento della superficie radicale e variazione del pH rizosferico, rilascio di essudati, simbiosi micorriziche).

Tra gli elementi presenti nel terreno possono determinarsi interazioni dovute alle loro concentrazioni. Un'elevata concentrazione di un singolo nutriente può favorire o limitare l'assorbimento di un altro nutriente e, di conseguenza, impedirne l'assorbimento da parte delle piante. Alcuni esempi: un'elevata quantità di potassio favorisce l'assorbimento del ferro e del manganese e d'altro canto impedisce l'assorbimento del magnesio e del boro; un eccesso di fosforo limita la ricezione di ferro, potassio, manganese, calcio e zinco; un quantitativo eccessivo di azoto stimola la ricezione di magnesio e uno scarso assorbimento di potassio, boro e rame; troppo rame restringe l'assorbimento di ferro e manganese.

All'interno della catena alimentare, il trasporto degli elementi avviene attraverso il loro assorbimento dal suolo ad opera delle piante che da queste vengono poi trasmessi ai tessuti degli erbivori e successivamente dei carnivori.

Il latte è un componente essenziale nella dieta e al suo interno si trovano minerali ed elementi in tracce che è possibile utilizzare come marker nella catena pianta-animale-latte. Ad esempio, metalli

che posso determinare inquinamento nell'ambiente esterno (es. nickel) e così nel cibo, passano attraverso il latte ai vari livelli.

Per quanto concerne la dieta, non sono molti gli studi che indagano sulla composizione elementare di fieno e mangime. I dati di letteratura sono pochi e soprattutto non sono presenti riferimenti per tutti gli elementi oggetto di studio di questa tesi.

Tre sono gli studi qui presi in esame, inerenti alla possibile correlazione che intercorre tra la dieta animale e il latte.

Il primo lavoro presentato è quello di Zhou et al., 2017 che si è occupato della misura della concentrazione di 22 elementi (tra cui Zn, Rb e Sr) nel latte grezzo in aggiunta a campioni di acqua e di dieta animale di mucca, capra e bufalo per vedere se le concentrazioni elementari nel latte grezzo presentano correlazioni con quelle riscontrate nell'acqua e nel cibo. I risultati dell'analisi di correlazione hanno rilevato che gli elementi presenti nell'acqua e nel cibo potrebbero contribuire a quelli presenti nel latte. Nello specifico, siccome vi è più probabilità che i foraggi siano raccolti in aree differenti, al contrario della provenienza dell'acqua che è solitamente locale, rispetto all'acqua stessa è risultato un minor numero di elementi nella dieta significativamente correlato con quelli ritrovati nel latte. Le differenze in termini di composizione elementare trovano spiegazione nelle specie animali e nelle diverse località indagate; anche se è stato statisticamente provato che per quanto riguarda il foraggio non sono state riscontrate differenze significative di concentrazione dei vari elementi tra le specie animali e le aree di studio.

Un altro studio di nazionalità cinese è quello presentato da Ren-ju et al., 2015 in cui il contenuto di elementi in tracce quali Pb, Cd, As, Cu, Mg, Ca, Fe and Zn è stato misurato nel latte di mucca e in diverse tipologie di cibo quali mais, insilati, crusca di frumento, cotone ecc., combinati in diverse formule, attraverso l'impiego della spettrofotometria ad assorbimento atomico. Se si considerano gli elementi che si hanno in comune con questo studio, Ren-ju et al. hanno riscontrato che i contenuti di Ca e Zn nel latte sono largamente influenzati dai rispettivi contenuti nella dieta e che la correlazione di Ca tra dieta e campioni di latte è risultata essere significativa, come è inoltre apparsa estremamente significativa anche la correlazione di Zn tra la dieta e il latte.

L'ultimo studio, il più recente, preso in esame riguarda il lavoro di Pšenková et al., del 2020. Uno degli obiettivi di questo studio è stato quello di determinare il contenuto di 11 elementi (elementi essenziali ed elementi potenzialmente tossici) nella dieta (razione mista di insilato di mais, fieno di erba medica, colza, sali, etc.) e nel latte delle bovine da latte raccolti durante la primavera e l'autunno del 2016 in due aree distinte della Repubblica Slovacca (un ambiente indisturbato ed un ambiente altamente contaminato), al fine di determinarne le concentrazioni. Il tutto grazie all'impiego della

spettroscopia ad assorbimento atomico e della spettrometria ad emissione atomica. Per quanto concerne gli elementi essenziali comuni a questa tesi di dottorato, quali Ca e Zn, il lavoro ha messo in evidenza come le concentrazioni significativamente più alte in entrambe le stagioni appartengano alla dieta localizzata nell'area altamente contaminata.

3 Materiali e metodi

3.1 I siti di studio

Come già accennato in precedenza, nell'area definita del comprensorio del Parmigiano Reggiano si trovano gli allevamenti delle bovine alimentate da foraggi (prati di erba medica e trifoglio essiccati) prodotti in questa zona. Questa alimentazione è disciplinata da un regolamento che vieta l'uso di foraggi insilati, alimenti fermentati e farine animali.

Tra le stalle che utilizzano soltanto fieno (erbe di prati naturali essiccate) aziendale (fieno 100% aziendale) ne sono state scelte dieci a caso su cui compiere l'indagine di interesse. Esse sono elencate nella tabella sottostante (Tabella 3.1), nella quale viene riportata, insieme alla ragione sociale e all'ubicazione, l'indicazione dell'altitudine alla quale ogni stalla si trova.

La scelta delle stalle a quote diverse è stata dettata dal fatto di cercare di differenziare dal punto di vista climatico (temperatura, umidità relativa) e ambientale (terreno, tipologia di fieno ed erba) il più possibile la zona di indagine. Ci si aspettava, in questo modo, di trovare differenze isotopiche nell'acqua usata per abbeverare le bovine e nel fieno.

Gestori stalle e località	Altitudine (m sul livello del mare)
Bocchi Nicola (Magnacavallo, MN)	11
Società Agricola Pizzamiglia di Chiaricati S.S. (Guastalla, RE)	25
Fрати Mauro (Busseto, PR)	40
Azienda Ferri (Viarolo, PR)	42
Società Agricola Pontelupo (Collecchio, PR)	112
Società Agricola Benassi (Baiso, RE)	542
Società Agricola Il Rio S.S. (Pavullo nel Frignano, MO)	670
Buffoli Claudio-Allevamento Femmina Morta (Gaggio Montano, BO)	682
La Gesa (Palanzano, Fraz. Trevignano, PR)	691
Grisanti Zeffirino (Castelnovo ne' Monti, RE)	750

Tabella 3.1 – Ragione sociale, ubicazione e altitudine delle dieci stalle studiate

In aggiunta a queste stalle, altre tre (Tabella 3.2) prese come “controllo” (perché stalle in cui si ha la certezza di ciò che gli animali mangiano) sono state inserite nell'elenco nell'arco dell'ultimo anno di campionamento (2019) e sono:

Gestori stalle e località	Altitudine (m sul livello del mare)
Società Agricola Candiabio (Torrile, PR)	32
Società Agricola La fattoria di Alex (Quattro Castella, RE)	160
Società Agricola Le Boccede (Villa Minozzo, RE)	684

Tabella 3.2 - Ragione sociale, ubicazione e altitudine delle tre stalle aggiuntive studiate

Nella Figura 3.1 è riportata la localizzazione geografica di tutti i siti di campionamento:

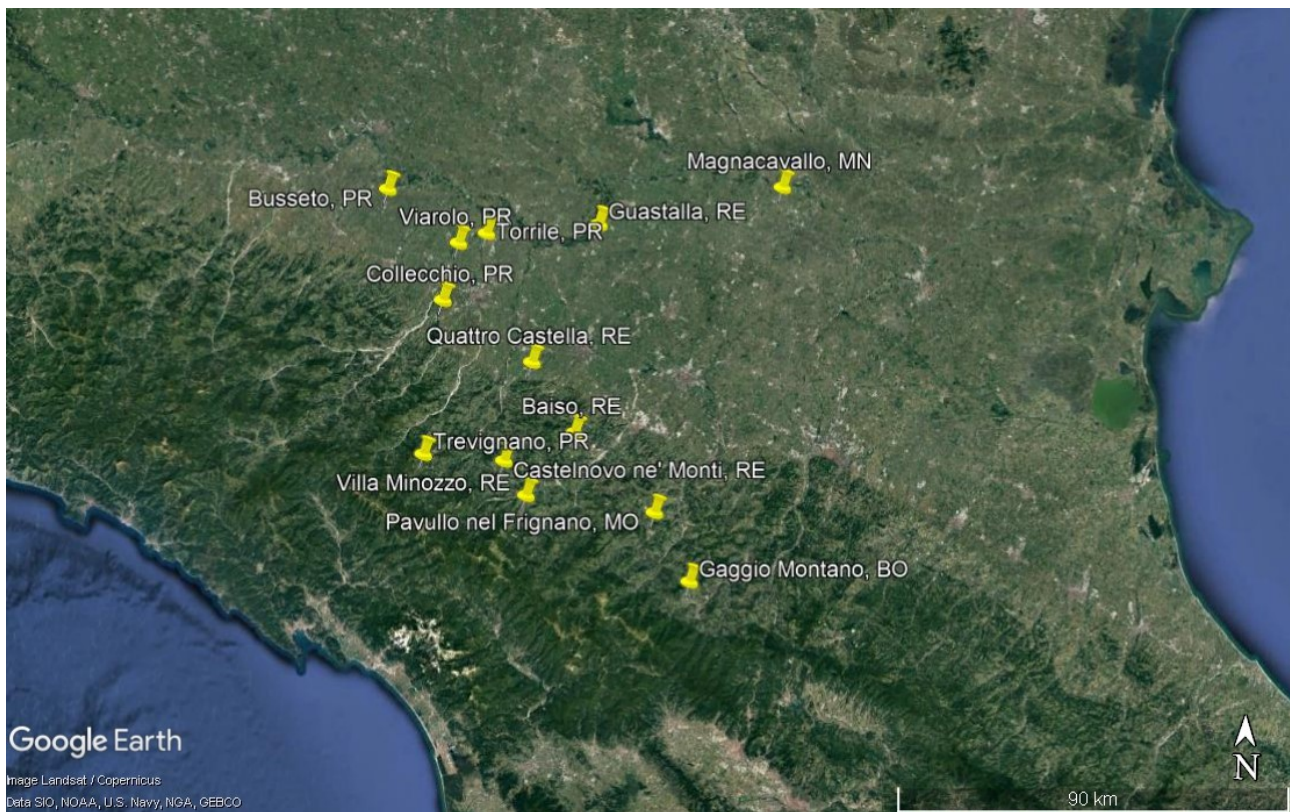


Figura 3.1 - Localizzazione geografica dei siti di campionamento

Nella tabella sottostante sono elencate alcune caratteristiche delle stalle (Tabella 3.3):

Gestori stalle e località	Captazione acqua	N. capi e razza
Bocchi Nicola (Magnacavallo, MN)	Pozzo profondità 175m	60 capi razza Frisona
Società Agricola Pizzamiglia di Chiaricati S.S. (Guastalla, RE)	n. pozzi 2 profondità 120m e 125m	200 capi razza Frisona
Fрати Mauro (Busseto, PR)	Pozzo profondità 25m	120 capi razza Frisona
Azienda Ferri (Viarolo, PR)	Pozzo (informazione sulla profondità non pervenuta)	80 capi (informazione sul tipo di razza non pervenuta)
Società Agricola Pontelupo (Collecchio, PR)	Pozzo profondità 60m	280 capi razza Frisona
Società Agricola Benassi (Baiso, RE)	Acquedotto (acque del Cerreto)	96 capi razza Rossa reggiana
Società Agricola Il Rio S.S. (Pavullo nel Frignano, MO)	Acquedotto comunale	80 capi razza Frisona + 2 capi razza Bruna alpina
Buffoli Claudio-Allevamento Femmina Morta (Gaggio Montano, BO)	Acquedotto (acque da Canevaccia e in caso di siccità dal lago artificiale di Suviana)	85 capi razza Frisona
La Gesa (Palanzano, Fraz. Trevignano, PR)	Acquedotto comunale (Palanzano) di natura sorgiva	60 capi razza Bruna alpina
Grisanti Zeffirino (Castelnovo ne' Monti, RE)	Acquedotto di Gabellina (acque Ventasso)	30 capi razza Bruna alpina
Società Agricola Candiabio (Torrile, PR)	Pozzo profondità 107m	200 capi razza Frisona e Frisona mista (Frisone incrociate con tori svedesi e norvegesi)
Società Agricola La fattoria di Alex (Quattro Castella, RE)	Pozzo profondità 90m	177 capi Frisona
Società Agricola Le Boccede (Villa Minozzo, RE)	Sorgente	150 capi razza Pezzata rossa

Tabella 3.3 – Provenienza delle acque e informazioni sulle bovine da latte appartenenti alle stalle studiate

Le stalle ubicate a Palanzano, Torrile, Villa Minozzo e Quattro Castella sono a regime Biologico, ovvero il foraggio proviene da campi biologici e gli animali all'interno delle stalle sono liberi di muoversi.

Nelle aziende di Castelnovo ne' Monti e Baiso le bovine hanno la possibilità di stare all'aperto (nelle vicinanze delle stalle, non si tratta quindi di un vero e proprio pascolo) durante la bella stagione.

Nella stalla di Baiso a causa della siccità dell'anno precedente alle analisi (2017) i foraggi sono stati acquistati nella provincia di Bologna.

Alcune foto scattate durante i campionamenti (Figura 3.2 - a) Busseto e b) Baiso):



Figura 3.2 - a) e b) - Foto scattate in diversi momenti durante la visita ad alcune stalle (a) Busseto e b) Baiso)

3.2 Il campionamento e lo stoccaggio dei campioni

Per valutare la variabilità, i campionamenti sono avvenuti mensilmente durante le diverse stagioni dell'anno 2018 - inizio 2019. Precisamente la data di inizio risale a febbraio 2018 e la conclusione è avvenuta a gennaio 2019.

Per ogni stalla mensilmente sono stati raccolti:

- un campione di acqua (pozzo/rubinetto);
- un campione di latte;
- campioni di fieno/mangime/*unifeed*.

In accordo con il Regolamento (CE) n.152/2009 della Commissione del 27 gennaio 2009, che fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, sono stati prelevati i campioni rappresentativi di quella che è la dieta giornaliera delle bovine da latte e il

prodotto finito quale è il latte. Si è trattato di un campionamento manuale effettuato con le precauzioni necessarie per evitare qualsiasi alterazione o contaminazione del prodotto.

I campioni elementari quali erbe (erbe di campo), foraggi e *unifeed* o piatto unico (mistura composta dal 40-30% di acqua, fieno, erba medica, prati stabili, mais, orzo, pannello di lino, sorgo, soia, crusca e frumento da sfalcio, il tutto sminuzzato in piccole parti, vitamine e sali minerali) sono stati campionati direttamente nelle aziende facendo attenzione ad attingere da diverse parti della razione che le bovine avevano a disposizione (per un maggior dettaglio sulla composizione della dieta si rimanda alla sezione “Appendice 3”). Questi sono stati prelevati a caso dall'insieme della partita al fine di ottenere una quantità da analizzare omogenea e rappresentativa dei campioni.

Alcune stalle producono i foraggi direttamente sul terreno di proprietà, altre, invece, ne producono *in loco* soltanto una parte e la razione restante viene acquistata esternamente, sempre all'interno del territorio di produzione del Parmigiano Reggiano (almeno il 75%, come stabilito dal Disciplinare).

I campioni di mangime (piante C4, quali mais e pane di soia) e farine di soia, mais ed orzo non sono rigidamente normati dal Disciplinare e sono stati campionati direttamente dal loro sacco contenitore presente nelle aziende.

L'acqua direttamente ingerita dai bovini proviene dall'acquedotto locale oppure da pozzi.

Infine, i campioni di latte sono stati prelevati direttamente dopo la mungitura. Le mungiture che si effettuano sono due: una al mattino presto, quando il latte ha un maggiore contenuto di grasso, ed una verso sera, quando il contenuto di grasso è inferiore (latte sgrassato). I campioni di latte prelevati sono rappresentativi del prodotto di mescolamento delle due mungiture.

I campioni secchi (da 1 kg a 1 hg) sono stati riposti in sacchetti di polietilene, mentre quelli liquidi in contenitori con doppio tappo (da 50 ml per il latte e da 100 ml per l'acqua). I campioni di latte sono stati conservati in congelatore a -20°C, quelli di acqua in frigorifero (+4°C) fino al momento dell'analisi.

La maggior parte della dieta delle bovine consiste in foraggi essiccati, solo alcune aziende forniscono, per pochissimi mesi all'anno, maggese appena raccolto.

3.3 Pretrattamento dei campioni in preparazione alle analisi (Università degli Studi di Parma)

Le metodiche di seguito descritte sono state svolte presso il Laboratorio di Geochimica Isotopica dell'Università degli Studi di Parma, interessano tutte le stalle studiate e riguardano l'intera annualità di campionamento.

Prima di procedere con le analisi, i campioni di dieta - quali fieno, mangime, *unifeed*, focchi (granturco, orzo, favino), mais e orzo - coperti da parafilm traforato sono stati posti in liofilizzatore (-40°C per circa 72 h) in modo da portare al minimo il contenuto di umidità (Figura 3.3).

Trascorso questo tempo, i campioni disomogenei al loro interno sono stati sottoposti a macinazione in giara di agata (Figura 3.4):

- fieno, *unifeed*, mais e orzo per un tempo di 15 minuti circa;
- mangime e focchi per un tempo di 5 minuti circa.



Figura 3.3 – Liofilizzatore (Università degli Studi di Parma)



Figura 3.4 - Giara di agata ad anelli concentrici (Università degli Studi di Parma)

Va precisato che i campioni sottoposti a macinazione subiscono un riscaldamento irrilevante.

Infine, questi campioni vengono riposti in sacchetti in attesa delle analisi.

Per quanto concerne i campioni liquidi, l'acqua non subisce alcun pretrattamento prima di essere sottoposta ad analisi; invece, il latte viene trasferito dal congelatore al frigorifero in cui resta fino al completo scongelamento. Dopo lo scongelamento il latte viene sottoposto a centrifugazione (4000 giri per 4 minuti) in modo tale da separare le tre fasi: grasso in superficie, siero nella parte centrale e proteine come corpo di fondo (Figura 3.5).



Figura 3.5 – Centrifuga (Università degli Studi di Parma)

Le frazioni grassa e proteica vengono ricongelate in attesa di procedere con le analisi e, solo in procinto di esse, vengono poi poste all'interno del liofilizzatore (-40°C per circa 72h) coperte da uno strato di parafilm traforato in modo da fare evaporare il vapore d'acqua. Per quanto riguarda i campioni di siero, dopo il passaggio in centrifuga, necessitano di distillazione per poter eliminare ogni residuo grasso e/o proteico rimasto in soluzione: distillazione a 70°C per 2-3 ore, per separare l'acqua, e sottovuoto per non frazionare isotopicamente il campione (Figura 3.6).



Figura 3.6 - Sistema di distillazione (Università degli Studi di Parma)

Si ricorda infine che i campioni di acqua vengono mantenuti in frigo e i campioni di siero del latte in freezer alla T di -20°C in attesa delle analisi.

I campioni di dieta e latte (frazione grassa e proteica) poco prima di essere analizzati vengono pesati in doppio in capsule di stagno monouso per la determinazione di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Le capsule vengono chiuse e pressate a formare una pallina con l'utilizzo di pinzette per eliminare l'aria residua e poste su una bilancia analitica. La quantità ottimale di campione che deve essere pesata dipende dal valore dell'intensità del picco di un campione di prova così da eguagliarla a quella dello standard interno. Ciò garantisce una migliore precisione nei risultati.

Per i campioni di dieta e latte i range di pesata per gli isotopi di carbonio e azoto sono riportati qui di seguito.

Range di pesata per l'analisi isotopica di C:

- mangime, fieno, grasso e proteine del latte: $0,060 \pm 0,005$ mg

Range di pesata per l'analisi isotopica di N:

- mangime e fieno: $3 \pm 0,500$ mg
- proteine del latte: $1,5 \pm 0,500$ mg

Per poter ottenere una buona accuratezza ogni campione è stato analizzato in doppio. L'analisi di ciascun campione è stata quindi eseguita due volte e il dato riportato nelle elaborazioni presentate e discusse in questa tesi consiste nel valore medio dei due risultati ottenuti.

3.4 Pretrattamento dei campioni in preparazione alle analisi (Jožef Stefan Institute)

Le procedure di seguito descritte sono state svolte durante il mio periodo di attività di ricerca di dottorato presso l'Istituto Jožef Stefan a Lubiana, Slovenia, interessano le dieci stalle studiate e riguardo due mensilità: campioni raccolti ad agosto 2018 e campioni raccolti a gennaio 2019.

La decisione di prendere in considerazione unicamente queste due mensilità è stata dettata dalla disponibilità di tempo: per quanto concerne le analisi isotopiche del carbonio e dell'azoto ciò ha permesso di constatare se ambedue i laboratori fossero in grado di fornire lo stesso risultato; per le analisi isotopiche dello zolfo, del rapporto isotopico dello stronzio e le analisi elementari (analisi considerate di "prospezione") ciò ha permesso di capire se in futuro possa valere o meno la pena effettuare questo tipo di misurazioni.

3.4.1 Preparazione dei campioni per isolamento di grasso, caseina e lattosio dal latte

La metodologia segue la procedura standard descritta da Kornexl et al., 1997, alla quale è stata apportata una modifica per quanto riguarda l'aggiunta del lavaggio con Et₂O: PeEt.

La tecnica della separazione è stata applicata ai campioni di latte liquido (50 ml).

Prima di procedere con la preparazione dei campioni è necessario che questi vengano fatti acclimatare a temperatura ambiente per consentirne lo scongelamento, successivamente sottoposti ad omogeneizzazione (per agitazione), travasati (30-40 ml di campione) in apposite provette e infine riposte in centrifuga (a 3200x10 minuti).

Il risultato del passaggio in centrifuga è che i grassi del latte si stratificano in superficie. Questi vengono separati dal resto del liquido con l'aiuto di una spatola e messi in freezer a -80°C per una notte (per permetterne il completo congelamento).

Nelle provette senza la frazione grassa, si aggiungono circa 10ml di HCl 0,1M che consentiranno la separazione delle diverse frazioni di latte. Si sottopongono poi ad agitazione e ne viene misurato il pH con cartina tornasole fino al raggiungimento del valore di 4,3. Le provette subiscono un'ulteriore centrifugazione (3200x10') che consente la separazione del lattosio (in superficie) dalla caseina (sul fondo). Il supernatante (lattosio) viene poi separato dal resto.

Nelle provette contenenti la caseina si aggiungono circa 20 ml di H₂O milliQ (primo lavaggio con acqua, affine al lattosio) e, attraverso l'agitazione manuale, se ne facilita la dissoluzione. È poi

necessario un ulteriore passaggio in centrifuga (3200x10'). L'acqua rimasta in superficie viene rimossa e alle provette con caseina vengono aggiunti circa 25 ml di H₂O milliQ e sottoposte nuovamente a centrifugazione (3200x10'). È quindi visibile, all'interno delle provette stesse, la separazione acqua in superficie-caseina sul fondo. L'acqua viene rimossa dalle provette e vengono aggiunti circa 10ml di acetone (affine ai grassi, è utilizzato per eliminarne i residui eventualmente presenti). Queste subiscono agitazione (per miscelare acetone e caseina) e successiva centrifugazione (3200x10'), dopo di che l'acetone viene eliminato e al suo posto vengono aggiunti circa 10-15ml di Et₂O:PeEt = 1:2 (etere dietilico: etere di petrolio (1:2), sempre utile per il "lavaggio" dei grassi ma maggiormente affine rispetto all'acetone). Dopo una prima agitazione manuale la caseina viene incisa con una spatola. Si elimina poi l'etere e si ripone la caseina in un contenitore senza tappo per permettere ai residui di etere di evaporare completamente (pochi minuti). Trascorso questo tempo anche la caseina viene messa in freezer a -80°C per una notte.

Passata la notte, sia i grassi che la caseina vengono posti in freezer a -20°C per circa 4 ore e poi nel liofilizzatore a -40°C per circa 72 ore.

Si procede con le pesate in triplo dei campioni (range di pesata di circa 2,2 – 2,7 mg) ed infine si eseguono le analisi isotopiche di carbonio, azoto e zolfo per la frazione di caseina e di carbonio per la frazione grassa del latte (si rimanda alla sezione "Appendice 4 - IsoPrime100 IRMS, Elementar vario PYRO cube (OH/CNS pyrolyzer/EA)", per la descrizione delle condizioni di lavoro utilizzate).

È importante precisare che, nonostante la differenza nella procedura di separazione delle frazioni del latte effettuata presso il Laboratorio di Geochimica Isotopica dell'Università degli Studi di Parma, i valori qui ottenuti di $\delta^{13}\text{C}$ per i campioni di grasso del latte (sempre a partire da un campione di 50 ml) non hanno mostrato differenze se confrontati con quelli ottenuti presso l'Istituto Jožef Stefan. Al contrario, differenze di $\delta^{13}\text{C}$ sono state riscontrate nei campioni di caseina siccome la tecnica applicata nel nostro laboratorio non ha portato ad una completa rimozione degli acidi grassi, i quali hanno determinato quindi una percentuale di carbonio più elevata e un valore isotopico sistematicamente inferiore per la caseina. Pertanto, si è deciso di apportare una correzione media sui valori di questa frazione del latte operando nel seguente modo:

1. si è determinata la differenza tra i valori mensili di $\delta^{13}\text{C}$ della caseina misurati all'Università di Parma e quelli di $\delta^{13}\text{C}$ della caseina misurati all'Istituto Jožef Stefan;
2. si è calcolata la regressione lineare tra i valori della percentuale di carbonio della caseina misurata a Parma e la differenza calcolata al punto 1., $y=0,12(\pm 0,016) \times \%C -4,66(\pm 0,77)$ e $R^2 = 0,78$;
3. si è calcolato il valore della caseina per tutti i campioni misurati a Parma.

3.4.2 Preparazione dei campioni di dieta per le analisi isotopiche $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$

Per quanto concerne i campioni di dieta, analizzati per gli isotopi di carbonio, azoto e zolfo, la procedura alla quale sono stati sottoposti è la stessa applicata ai campioni di dieta analizzati presso il Laboratorio di Geochimica Isotopica dell'Università di Parma (si rimanda al sotto-capitolo "Pretrattamento dei campioni in preparazione alle analisi (Università degli Studi di Parma)").

Questi campioni sono poi stati pesati in triplo (range di pesata 2,2 – 2,7 mg) e sottoposti ad analisi isotopica (per una descrizione approfondita si rimanda alla sezione "Appendice 4 - IsoPrime100 IRMS, Elementar vario PYRO cube (OH/CNS pyrolyzer/EA)").

Per quanto riguarda l'analisi isotopica dello zolfo, è necessario fare alcune precisazioni per i campioni di dieta:

- stalla Collecchio: all'interno della componente mangime sono stati considerati i fiocchi;
- stalla Baiso: all'interno della componente fieno è stata considerata l'erba. Il valore medio si riferisce solo al mese di agosto 2018, in quanto non è stato possibile analizzare il campione di gennaio 2019;
- stalla Palanzano: all'interno della componente fieno è stata considerata l'erba medica, invece per la componente mangime sono stati mediati i contributi costituiti da un mangime più proteico e da uno più ricco di mais;
- stalla Viarolo: all'interno della componente fieno è stata considerata l'erba medica, invece per la componente mangime sono stati mediati i contributi costituiti da un mangime più proteico e da uno più ricco di mais. Insieme al mangime si è tenuto conto dei fiocchi;
- stalla Gaggio Montano: all'interno della componente *unifeed* è stato considerato il fieno;
- stalla Pavullo nel Frignano: per la componente mangime sono stati mediati i contributi costituiti da un mangime più proteico e da uno più ricco di mais;
- stalla Magnacavallo: all'interno della componente erba medica sono stati considerati maggese ed erba.

Anche per quanto riguarda la caseina sono necessarie alcune precisazioni che interesseranno l'elaborazione grafica:

- stalla Palanzano: il valore di $\delta^{34}\text{S}$ si riferisce al solo mese di gennaio 2019, in quanto non è stato possibile analizzare il campione di agosto 2018;
- stalla Gaggio Montano: il valore di $\delta^{34}\text{S}$ si riferisce al solo mese di gennaio 2019, in quanto non è stato possibile analizzare il campione di agosto 2018.

3.4.3 Preparazione dei campioni per MC ICP-MS

In preparazione all'analisi con ICP-MS prima e alla determinazione isotopica dello stronzio attraverso il MC ICP-MS poi, i campioni di dieta e latte seguono una serie di passaggi di pretrattamento che consentono di distruggere completamente la matrice organica, passaggi che invece non sono richiesti per i campioni di acqua.

Per quanto riguarda la dieta e il latte valgono le precisazioni fatte poc'anzi per lo zolfo.

Prima di passare alla descrizione della metodica alla quale ogni tipologia di campione è stato sottoposto, segue una precisazione circa il pretrattamento subito dai campioni di dieta e latte.

Mineralizzazione a caldo in un sistema chiuso a microonde

Per determinare il contenuto in metalli pesanti (nel nostro caso Sr e Rb) nelle matrici solide organiche (es. vegetali, animali) e non (es. sedimento, suolo), i campioni, una volta liofilizzati e macinati vengono sottoposti ad un processo di solubilizzazione totale a caldo in un sistema chiuso a microonde. La procedura prevede la digestione totale del campione con una miscela di acidi forti in opportuni "digestori" sotto pressione. Attraverso la tecnologia a microonde, infatti, si possono superare diversi problemi legati alla solubilizzazione del campione come la possibilità di contaminazioni, la perdita dell'analita/i di interesse, fenomeni di adsorbimento specifici e l'incompleta disgregazione della matrice. L'uso del forno a microonde ad alta pressione permette di diminuire i tempi di trattamento, mantenendo una resa molto buona con o senza l'uso di acido fluoridrico (HF) che permette la completa mineralizzazione.

Dieta

I campioni di dieta, precedentemente liofilizzati, vengono omogeneizzati con l'utilizzo di una spatola e pesati sulla bilancia analitica in doppio (range pesata 0,49 – 0,51g). Oltre ai campioni viene pesato il materiale standard di riferimento 1573a (foglie di pomodoro). Campioni e standard vengono poi riposti in apposite provette di teflon.

Contenuto delle provette di teflon (n.12) per ogni ciclo di mineralizzazione al sistema di digestione a microonde:

- n. 1 provetta con bianco (blank): 5ml HNO₃ 67-69% concentrato + 1ml H₂O₂ 30% suprapur
- n.2 provette con SRM: 0,49-0,51g SRM + 5ml HNO₃ 67-69% concentrato + 1ml H₂O₂ 30% suprapur + 0.1 ml di HF suprapur 40%.
- n. 9 provette con campione: 0,49-0,51g campione + 5ml HNO₃ 67-69% concentrato + 1ml H₂O₂ 30% suprapur + 0.1 ml di HF suprapur 40%.

Questo sistema consente la digestione acida del campione (ad alta temperatura e alta pressione - P 100 Bar, T 240°C per circa 60 minuti) in una camera a reattore singolo (SRC) attraverso il riscaldamento a microonde per ottenerne l'analisi elementare.

Tra le varie parti di cui è costituito, il microonde si compone di un rec di provette di teflon, contenuti all'interno di un contenitore di teflon, nei quali vengono riposti i campioni che subiranno la digestione.

Dopo le varie aggiunte dei reagenti le provette vengono fatte riposare un paio di ore in modo tale da consentire una prima digestione dei campioni.

Successivamente vengono riposti nel microonde e, a digestione terminata, il loro contenuto viene travasato in provette portate a volume finale di 20ml con H₂O milliQ e poi messi in frigo.

Siccome i campioni sono troppo concentrati per poter essere misurati all'ICP-MS, questi vengono diluiti (diluizione 1:10).

Si procede poi con la costruzione della curva di calibrazione di punti 0; 0.5; 1; 5; 10; 50; 100; 500 µg/ml. Gli standards utilizzati sono Multi VI e Antimonio (Sb). Di quest'ultimo è richiesta una preparazione a parte siccome non è presente all'interno del Multi VI. Tutte le provette vengono poi rimesse in frigo in attesa dell'analisi ICP-MS per la determinazione della concentrazione totale degli elementi quali, nel nostro caso, stronzio (88 Sr [He]) e rubidio (85 Rb [He]).

Latte

I campioni di latte vengono prima mineralizzati e poi analizzati all'ICP-MS per la determinazione della concentrazione totale degli elementi quali, nel nostro caso, stronzio (88 Sr [He]) e rubidio (85 Rb [He]), seguendo la stessa procedura descritta poc'anzi.

Gli standard di riferimento certificati (SRM) sono NIST 8435 e NIST 1549a, entrambi latte intero in polvere.

Va precisato inoltre che la digestione al microonde per i campioni di latte e dieta è differente perché la matrice è diversa: per la dieta è stato necessario aggiungere una minima quantità di HF per poter sciogliere i silicati.

Acqua

Il pretrattamento dei campioni di acqua consiste in una filtrazione e attraverso una siringa, alla quale viene applicato un filtro tondo (0.45 micrometri), vengono prelevati 20 ml e filtrati all'interno di apposite provette (Figura 3.7). Per il bianco (blank) si utilizzano 20ml di H₂O milliQ.

Successivamente ad ogni provetta si aggiungono 0.50 μ L di HNO₃ 67-69% concentrato e si ripongono in frigo. I campioni sono poi analizzati all'ICP-MS per la determinazione della concentrazione totale degli elementi quali, sempre nel nostro caso, stronzio (⁸⁸Sr [He]) e rubidio (⁸⁵Rb [He]).

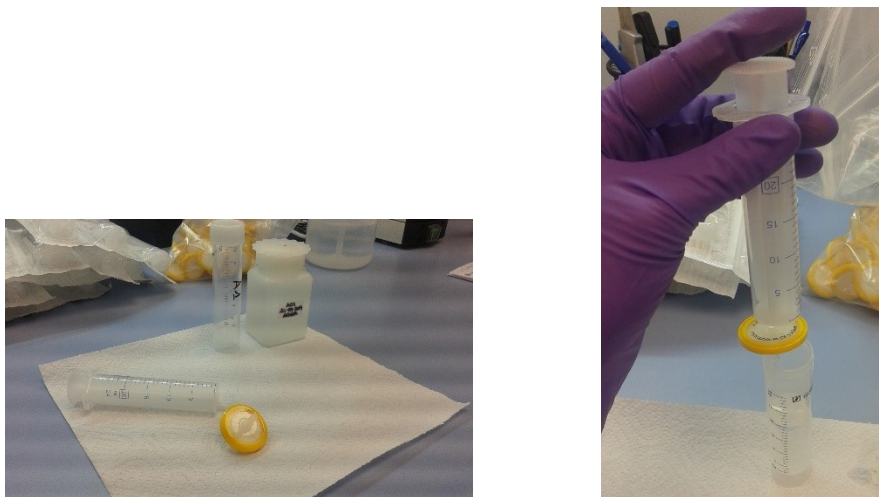


Figura 3.7 – Due immagini di esempio di filtrazione di un campione di acqua

3.4.3.1 Determinazione isotopica dello stronzio (⁸⁷Sr/⁸⁶Sr)

L'analisi isotopica ^{87/86}Sr effettuata sui campioni di dieta, di latte liquido e acqua segue gli stessi passaggi procedurali che sono descritti qui di seguito.

PARTE 1: Preparazione dei campioni per la separazione dello stronzio dalla matrice del campione

- Pretrattamento del campione: digestione acida assistita dal microonde (descritta precedentemente)

Prima dell'analisi a ICP-MS, dove si ottiene il valore iniziale dell'elemento stronzio misurato espresso in ng/ml, come già accennato i campioni digeriti quali dieta e latte vengono diluiti 10x volte, al contrario, invece, per i campioni d'acqua si considerano i campioni originali. Sulla base dei valori misurati di stronzio nei campioni digeriti, si calcola la quantità richiesta di campione da evaporare (volume espresso in ml) che viene pipettata in apposite provette per poi ottenere la concentrazione finale o selezionata di stronzio nelle frazioni di stronzio finali.

In base al volume del campione prelevato per l'evaporazione, si calcola il valore teorico di stronzio (concentrazione teorica), cioè ciò che dovrebbe essere determinato nelle frazioni di stronzio.

- Pre-concentrazione del campione: evaporazione dei campioni su bagno di sabbia e diluizione dei campioni evaporati in 1 ml 8M HNO₃

In questa fase si fa evaporare a secchezza la quantità calcolata di campione digerito, seguito dalla diluizione dei campioni evaporati in 1 ml di 8M HNO₃ prima della fase di estrazione cromatografica.

Le provette contenenti gli ml richiesti per l'evaporazione e privi di tappo, sono riposti in un bagno di sabbia (Figura 3.8) per una notte (range di temperatura raggiunto 90-100°C) per concentrare lo stronzio, isolarlo dalla matrice del campione e distruggere i residui della matrice organica. Insieme ai campioni vengono riposti nel bagno di sabbia anche gli standard, che per quanto riguarda i campioni di acqua si tratta del materiale di riferimento certificato SLRS-5 (acqua fluviale).



Figura 3.8 – Bagno di sabbia

In questo modo la frazione liquida del campione si disperde e ciò che risulta visibile come corpo di fondo è la materia organica completamente distrutta dalla digestione avvenuta nel microonde, ovvero ciò che rimane è lo stronzio concentrato.

Una volta evaporato il contenuto delle provette, queste vengono lasciate acclimatare a temperatura ambiente.

Poi si aggiunge 1 ml di HNO_3 8M (si parla di “sample load”, ovvero campione dissolto in 1ml di HNO_3 8M medium) e le provette vengono riposte nell'ultrasuoni (Figura 3.9) dove, immersi in un bagno maria a temperatura ambiente per circa 20 minuti, attraverso una serie di vibrazioni vengono omogenizzati.



Figura 3.9 – Dispositivo ad ultrasuoni

PARTE 2: estrazione cromatografica dello stronzio usando 0.3 g della resina Eichrom Sr specific resin

Per l'estrazione cromatografica si utilizzano delle apposite colonne cromatografiche (una per ogni campione e standard) e all'interno di ognuna, seguendo le indicazioni riportate in un'apposita tabella, si aggiungono varie sostanze che saranno poi eluite.

Per quanto concerne la preparazione delle colonne alla loro base viene riposto un filtro e poi, pesata sulla bilancia analitica (range di pesata dai 0,3000 g ai 0,3050 g) direttamente all'interno delle colonne stesse, la resina specifica (costituita da particelle solide della dimensione di 100-150 μm). Sopra questo quantitativo di resina viene riposto un secondo filtro. Successivamente attraverso l'ausilio di una bacchetta si compatta il tutto applicando una leggera pressione al filtro superiore. Le colonne così preparate sono riposte in un porta-provette dove al di sotto, per la raccolta delle sostanze che saranno eluite come scarto, viene posizionata una bacinella.

La matrice organica è in affinità con la resina che è anche essa stessa materia organica specifica per lo stronzio, ecco perché va distrutta. Oltre allo stronzio però esistono altri elementi affini alla resina, e questo è il motivo per cui, tra le varie aggiunte che vengono fatte all'interno delle colonne cromatografiche, si usa HNO_3 8M che è la concentrazione ottimale per rimuovere le impurità e le interferenze dai campioni e anche perché ha una grande affinità per lo stronzio. L'uptake dello stronzio da parte della resina aumenta con l'aumentare della concentrazione di acido nitrico.

L' HNO_3 8M invece non è affine al rubidio ed ecco perché eluisce per gravità dalla colonna. Il rubidio viene rimosso in quanto presenta una massa uguale a quella dello stronzio (massa 87) e conseguentemente i picchi visibili allo strumento risulterebbero vicini e non ben distinti perché lo strumento stesso non è in grado di discriminarli ("interferenza isobarica dello stronzio").

Di seguito sono riportati i passaggi seguiti per le varie aggiunte da introdurre in successione all'interno delle colonne (ogni colonna si riferisce ad un campione) per l'estrazione cromatografica ed isolamento dello stronzio dalla matrice dei campioni. Bisogna tenere presente che le aggiunte, che fluiscono poi per gravità lungo le colonne, sono da intendersi 1 ml alla volta:

- 1) 4ml di H_2O milliQ
- 2) 1ml H_2O milliQ + aggiunta di un secondo filtro sopra il filtro superiore. Si inserisce un doppio filtro in quanto è possibile che si creino delle bolle dopo l'aggiunta dei primi ml di H_2O milliQ e inoltre perché è fondamentale che la resina sia ben compatta e non galleggi quando si aggiungono le altre sostanze.
- 3) 1ml HCl 6M
- 4) 10ml H_2O milliQ che consentono all'acido aggiunto precedentemente di velocizzare la sua discesa nella colonna

- 5) 3ml HNO₃ 8M
- 6) 10ml H₂O milliQ
- 7) 2ml HNO₃ 8M
- 8) 1ml sample load (aggiunta preceduta da agitazione manuale delle provette contenenti 1 ml di campione in 8M HNO₃), ovvero i campioni con rubidio e stronzio al loro interno
- 9) 5 ml HNO₃ 8M (medium). Questi ml vengono dapprima pipettati nelle provette che contenevano i campioni, in modo tale da recuperare ogni residuo rimasto, e da qui pipettati poi all'interno delle colonne corrispondenti → eluizione del rubidio e intrappolamento dello stronzio nella resina

Quando anche questi ml saranno eluiti (eluizione/eliminazione di Rb che è necessario eliminare completamente dalla resina per far rimanere lo stronzio), sotto le colonne viene tolta la bacinella contenente tutti i liquidi scartati (Figura 3.10), e messe le precedenti provette che contenevano i campioni (uno per ogni colonna corrispondente), Figura 3.11.

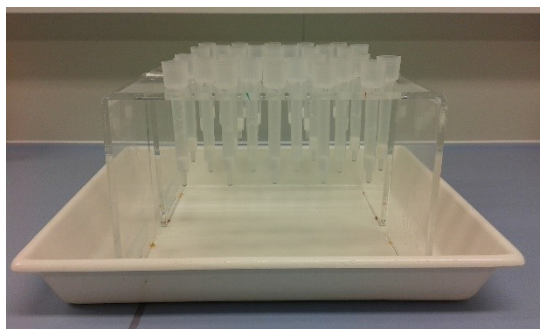


Figura 3.10 – Colonne cromatografiche con bacinella per la raccolta dei liquidi eluiti come scarto

- 10) 10ml H₂O milliQ (medium). L'acqua viene iniettata in colonna per rimuovere l'acido dalla resina e raccogliere le frazioni di stronzio. Ciò che è eluito insieme all'acqua (sempre 1ml alla volta) è lo stronzio che viene poi raccolto nelle provette, fino al volume finale di 10ml (Figura 9.5). → eluizione dello stronzio

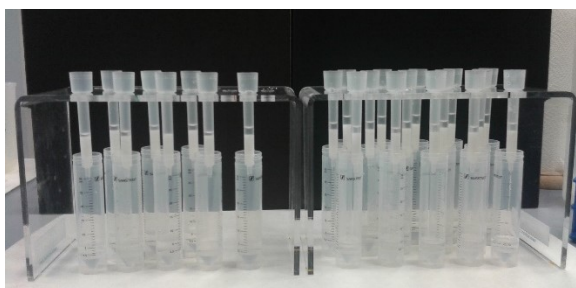


Figura 3.11 – Colonne cromatografiche con provette per la raccolta dei campioni

Gli step 1), 2), 3) e 4) consistono nel pretrattamento della resina: attivazione e lavaggio; gli step 5) e 6) rimozione delle impurità; step 8) è l'introduzione del campione; step 9) eluizione e rimozione del rubidio ed infine, step 10), eluizione e rimozione di Sr che viene raccolto.

La frazione di stronzio viene quindi raccolta nelle provette dal Vf di 10ml che vengono poi analizzate al ICP-MS per la determinazione della sua concentrazione (valore misurato finale). Qui viene misurato anche Rb per essere sicuri che tutto Rb sia stato rimosso. Nessun Rb deve entrare nell'MC ICP-MS.

Si hanno quindi due risultati: concentrazione di stronzio teorica, ossia la quantità di stronzio che ci si aspettava fosse presente nelle frazioni di stronzio dopo il passaggio in colonna, e la concentrazione di stronzio misurata nelle stesse frazioni di stronzio.

Quindi, le concentrazioni prima e dopo le colonne sono le concentrazioni target di Sr che si preparano per le misurazioni dell'isotopo stesso. Da queste concentrazioni sono state calcolate la quantità di campioni digeriti di dieta, latte e acqua che è necessario evaporare per raggiungere la concentrazione target di circa 30-50 ng/ml nel campione dopo la separazione di Sr su colonna.

Utilizzando entrambi i risultati è possibile calcolare il recovery (recupero, espresso in %) per lo stronzio dopo averlo separato dalla matrice del campione:

$$Recovery \% = \left(\frac{\text{valore misurato finale Sr } \left(\frac{ng}{ml}\right)}{\text{valore teorico Sr } \left(\frac{ng}{ml}\right)} \right) * 100$$

qui si confronta la concentrazione iniziale e quella finale di Sr.

Globalmente, i campioni esaminati nel presente lavoro hanno fornito un buon recupero di stronzio, con valori di R% compresi tra 70 e 130%.

Il recovery% si calcola per diversi motivi:

- per vedere se parte dello stronzio è andato perso durante la procedura di isolamento;
- per avere la sicurezza che lo stronzio sia stato completamente rimosso dalla matrice organica del campione (nel caso del latte proteine e grassi) che bisogna distruggere;
- per scoprire le possibili fonti di contaminazione.

Questo perché può succedere che la concentrazione di stronzio che si ottiene sia superiore o inferiore alla concentrazione nei campioni originali. Ecco il motivo per cui si confronta il valore teorico

(calcolato) con il valore misurato per i campioni di dieta e latte, campioni per i quali è stata necessaria una diluizione rispetto ai campioni originali.

Infine, si procede con l'analisi isotopica al MC ICP-MS delle frazioni di stronzio dopo il passaggio in colonna (provette da 10ml) nei campioni di dieta, latte ed acqua.

Le possibili fonti di errore durante la procedura possono avvenire:

- in fase di evaporazione: pipettaggio;
- in fase di estrazione cromatografica: pipettaggio, contaminazione, presenza di materia organica (la materia organica ha affinità con la resina con conseguente impedimento dell'isolamento dello stronzio dalla matrice del campione);
- in fase di preparazione dei reagenti chimici (8M HNO₃, 6M HCl): contaminazione.

3.4.4 Preparazione dei campioni per EDXRF

L'analisi elementare è stata effettuata attraverso la tecnica a fluorescenza di raggi X (EDXRF) su campioni di latte liofilizzato e su campioni di dieta.

Per i campioni di dieta gli elementi determinati sono Si, P, S, Cl, K, Ca, Zn, Fe, Ti, Mn, Br, Rb, Sr.

Per i campioni di latte liofilizzato gli elementi determinati sono: P, S, Cl, K, Ca, Zn, Br, Rb, Sr.

Si è deciso di considerare un unico valore di concentrazione, quale media delle due mensilità analizzate (agosto 2018 + gennaio 2019), sia per la dieta che per il latte per gli elementi comuni alle due categorie studiate (P, S, Cl, K, Ca, Zn, Br, Rb, Sr). I risultati sono espressi sottoforma di concentrazione mg/100g e µg/100g per gli elementi maggiori e in tracce del latte e in g/kg e µg/kg per gli elementi maggiori e in tracce nella dieta. L'errore relativo sulle misure è pari al 10%.

La possibilità di eseguire analisi dirette con XRF su campioni solidi, quali nel nostro caso campioni di dieta e latte liofilizzato, richiede un pretrattamento del campione per renderlo omogeneo e dotato di una superficie piana. Questa procedura si basa sulla frantumazione o macinazione dei materiali in polvere fine seguita da pellettizzazione ad alta pressione.

Prima della macinazione, i campioni vengono solitamente essiccati in forno a 60-100 ° C, o liofilizzati per rimuovere il loro contenuto d'acqua.

A differenza dei campioni di dieta, già precedentemente essiccati, macinati ed omogenizzati e quindi pronti per l'analisi, per i campioni di latte liofilizzato è stato necessario riporli in essiccatore (con una T variabile da +55°C a +64°C) per circa 24h in modo da eliminare l'umidità eventualmente presente al loro interno.

Il pretrattamento, al quale entrambe le tipologie di campioni vengono sottoposti, consiste nei seguenti passaggi:

- omogeneizzazione del campione attraverso l'uso di una spatola rendendolo polvere;
- prelievo di un'aliquota di polvere, attingendo in ogni punto del contenitore in modo tale da ottenere un sotto campione il più rappresentativo possibile della totalità, e deporla in una pressa idraulica (Figura 3.12).

Nella pressa idraulica, a seguito della pressione manuale, la polvere viene compattata in un apposito stampo e trasformata in pellet (Figura 3.13). Il pellet viene successivamente pesato su una bilancia analitica di precisione (per l'analisi EDXRF sono sufficienti circa da 0,5 a 0,1 g di materiale solido in polvere) ed inserito nel porta-campioni dello strumento, un rec a 9 posizioni di misura per l'analisi XRF.



Figura 3.12 – Pressa idraulica



Figura 3.13 – Esempio di pellet di un campione di dieta

È necessario prestare attenzione durante la preparazione del pellet ed assicurare uno spessore uniforme, in quanto qualsiasi disomogeneità del campione solido polverizzato può avere una grande influenza sull'accuratezza della misura.

Per l'eccitazione, sono state utilizzate le sorgenti di eccitazione del radioisotopo del disco di Fe-55 (25 mCi) e Cd-109 (20 mCi) (Eckert e Ziegler, Valencia, U.S.A.). La radiazione di fluorescenza emessa è stata misurata utilizzando uno spettrometro a raggi X a dispersione di energia.

Il tempo di analisi per ogni un campione è di 1 ora e il risultato è espresso sotto forma di concentrazione g/g.

L'incertezza dell'analisi multielemento stimata è del 5%–10%. L'accuratezza dei dati è stata verificata utilizzando il materiale di riferimento del National Institute of Standards and Technology (NIST) 8435 (latte intero in polvere).

Per quanto concerne i campioni di latte, i risultati ottenuti vengono poi moltiplicati per il fattore 0,128 (28% contenuto di acqua), fattore che tiene conto del fatto che il campione analizzato è privo di acqua e quindi gli elementi risultano maggiormente concentrati.

Infine, per quanto riguarda sia campioni di dieta che del latte valgono le precisazioni fatte per lo zolfo e lo stronzio.

3.5 Le operazioni di misura sui campioni

Le tecniche analitiche e gli strumenti utilizzati per l'analisi dei campioni di acqua, di latte (acqua del latte, frazione grassa e proteica) e della componente della dieta delle bovine da latte sono descritte nella sezione "Appendice 4", dove ciascuna tecnica è preceduta da una breve introduzione inerente al suo principio di funzionamento. Ora, invece, vengono qui brevemente illustrate le operazioni di misura sui campioni oggetto dello studio.

Per le analisi isotopiche di ossigeno e idrogeno delle acque e dell'acqua del latte è stato utilizzato lo spettrometro di massa a doppio sistema di ingresso Thermo-Finnigan Delta Plus, collegato alla linea di preparazione automatica Thermo-Finnigan HDO equilibratore (*Automatic device*-HDO-IRMS: $\delta^2\text{H} \pm 1$; $\delta^{18}\text{O} \pm 0.06$).

Le analisi degli isotopi stabili $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dei campioni di dieta e delle frazioni grassa e proteica (caseina) del latte di tutti i mesi dell'anno, con l'eccezione di agosto 2018 e gennaio 2019, sono state eseguite utilizzando l'analizzatore elementare EA/NA-1100 configurato CHN (Thermo Finnigan) – IRMS ($\pm 0,2$ per $\delta^{13}\text{C}$; $\pm 0,1$ per $\delta^{15}\text{N}$).

Queste strumentazioni sono entrambe presenti all'interno del Laboratorio di Geochimica Isotopica dell'Università degli Studi di Parma.

Invece, presso il Laboratorio di analisi dell'Istituto Jožef Stefan di Lubiana si sono svolte le analisi di $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e di $\delta^{34}\text{S}$ di dieta e latte dei due mesi non precedentemente analizzati (agosto 2018 e

gennaio 2019) attraverso l'impiego dello spettrometro IsoPrime100-Vario PYRO Cube (OH/CNS Pyrolyser/Elemental Analyzer). La riproducibilità delle misurazioni è $\pm 0,2\%$ per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e $\pm 0,3\%$ per $\delta^{34}\text{S}$.

Per determinare il rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dei campioni di latte liquido, acqua e dieta lo strumento impiegato è stato il Multicollector-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (MC-ICPMS).

Infine, la determinazione degli elementi maggiori e in tracce effettuata sui campioni di latte liofilizzato e sui campioni di dieta è stata effettuata mediante uno spettrometro a raggi X a dispersione di energia (EDXRF).

Anche queste due ultime strumentazioni sono presenti presso il Laboratorio dell'Istituto Jožef Stefan di Lubiana.

Nella Tabella 3.4 sono riportati gli isotopi applicati in questo studio, le matrici nelle quali questi parametri sono stati misurati e da cosa dipendono:

Isotopi	Provenienza	Dipendenza del parametro da
$\delta^{18}\text{O}$	acqua ingerita	Precipitazioni
$\delta^2\text{H}$	acqua ingerita	Precipitazioni
$\delta^{13}\text{C}$	foraggio e mangime	CO_2 atmosferica
$\delta^{15}\text{N}$	foraggio e mangime	terreno, pratiche agricole, acqua
$\delta^{34}\text{S}$	foraggio e mangime	terreno, pratiche agricole, aerosol
$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	foraggio, mangime, acqua	terreno, pratiche agricole, acqua

Tabella 3.4 – Gli isotopi studiati, l'indicazione della provenienza e la dipendenza dall'ambiente

4 Presentazione e discussione dei dati

Nel sotto-capitolo 4.1 si riportano i risultati e la conseguente discussione degli stessi, corredati da figure e tabelle, che si ritrovano all'interno dell'articolo "*Isotope partitioning between cow milk and drinking water*" inviato alla rivista *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.

4.1 Analisi isotopiche $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$

Il presente lavoro esamina i valori degli isotopi di idrogeno e ossigeno dei campioni di latte e dell'acqua ingerita dalle bovine delle dieci stalle studiate.

I simboli che si ritrovano nelle formule qui presentate seguono la dicitura utilizzata nell'articolo.

Gli isotopi di ossigeno e idrogeno nell'acqua e nel latte

Nella Tabella 4.1 sono riportati i valori isotopici di ossigeno e idrogeno medi annuali appartenenti alle dieci stalle (nella sezione "Appendice 5" alla tabella "Table 1" sono presenti tutti i valori mensili) per i campioni di acqua e di acqua del latte.

Stalle	$\delta^{18}\text{O}(\text{V-SMOW})$ acqua ingerita	$\delta^{18}\text{O}(\text{V-SMOW})$ acqua del latte
Collecchio	$-8,52 \pm 0,06$	$-6,85 \pm 0,70$
Busseto	$-7,90 \pm 0,05$	$-6,43 \pm 0,62$
Castelnovo ne' Monti	$-8,93 \pm 0,11$	$-6,88 \pm 1,35$
Guastalla	$-9,40 \pm 0,05$	$-7,59 \pm 0,81$
Baiso	$-8,92 \pm 0,08$	$-6,68 \pm 1,15$
Palanzano	$-8,95 \pm 0,11$	$-7,13 \pm 0,94$
Gaggio Montano	$-9,52 \pm 0,13$	$-7,59 \pm 0,50$
Pavullo nel Frignano	$-9,56 \pm 0,35$	$-7,73 \pm 0,73$
Magnacavallo	$-11,33 \pm 0,05$	$-8,97 \pm 0,76$
Viarolo (9 mesi)	$-7,54 \pm 0,02$	$-6,65 \pm 0,55$

Tabella 4.1 - Medie annuali di $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua ingerita e dell'acqua del latte delle dieci stalle

Per la stalla di Viarolo, a differenza delle altre stalle, le mensilità considerate sono state nove e non dodici, per il motivo illustrato qui di seguito.

Nella Tabella 4.2 si riportano i valori isotopici di ossigeno e idrogeno mensili dei campioni di acqua ingerita e di acqua del latte della stalla di Viarolo:

campionamento	acqua ingerita		acqua del latte	
	$\delta^2\text{H(V-SMOW)}$	$\delta^{18}\text{O(V-SMOW)}$	$\delta^2\text{H(V-SMOW)}$	$\delta^{18}\text{O(V-SMOW)}$
febbraio'18	-48,27	-7,59	-48,90	-7,48
marzo'18	-47,77	-7,54	-51,15	-7,78
aprile'18	-47,26	-7,54	-41,82	-6,14
maggio'18	-47,02	-7,54	-41,92	-6,19
giugno'18	-47,31	-7,54	-41,86	-6,22
luglio'18	-48,65	-7,52	-43,33	-6,33
agosto'18	-47,43	-7,50	-42,12	-6,28
settembre'18	-46,87	-7,54	-44,17	-6,40
ottobre'18	-48,06	-7,54	-43,33	-6,28
novembre'18	-48,88	-7,57	-47,89	-7,11
dicembre'18	-48,20	-7,51	-44,74	-6,75
gennaio'19	-48,32	-7,57	-44,48	-6,83

Tabella 4.2 – Valori di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ mensili dell'acqua ingerita e dell'acqua del latte della stalla di Viarolo

I valori di $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua del pozzo della stalla di Viarolo, che riflettono i valori della composizione isotopica delle acque del fiume Taro (Iacumin P. et al., 2009), mostrano una certa costanza durante l'intero anno di campionamento, senza nessuna variazione apprezzabile.

Osservando invece i dati mensili dell'acqua latte di Viarolo si può notare come nei mesi di febbraio, marzo e novembre 2018 (mesi esclusi nel calcolo dei valori isotopici medi di $\delta^{18}\text{O}$ riportati in Tabella 4.1) i valori risultino simili a quelli delle acque. Ciò non è possibile in quanto il latte subisce sempre un arricchimento isotopico rispetto all'acqua ingerita, come si può notare nei restanti mesi. Probabilmente il problema è riconducibile ad errori intercorsi durante il campionamento del latte. Al contrario, durante gli altri mesi il comportamento di questa stalla si può ritenere simile a quello delle altre.

Quindi, a causa di questa incongruenza riscontrata in alcuni valori dell'acqua latte, la stalla di Viarolo non è stata considerata per i calcoli che verranno ora presentati, ma solo nella trattazione conclusiva come “verifica”.

Nella Figura 4.1 sono riportate le regressioni $\delta^2\text{H}$ su $\delta^{18}\text{O}$ per i valori isotopici delle acque (W),

$$\delta^2\text{H}_W = 8.36 (\pm 0.17) \delta^{18}\text{O}_W + 16.3 (\pm 1.6) \text{‰}, \quad (1)$$

con $R^2 = 0.96$, $s(yx) = 1.6$,

e per i valori isotopici dell'acqua del latte (siero) (M),

$$\delta^2\text{H}_M = 6.36 (\pm 0.28) \delta^{18}\text{O}_M - 5.3 (\pm 2.1) \text{‰}, \quad (2)$$

con $R^2 = 0.83$, $s(yx) = 3.2$,

dove R^2 è il coefficiente di determinazione e $s(yx)$ l'errore standard sulla regressione. Le rette (1) e (2) differiscono ampiamente sia per la pendenza che per l'intercetta.

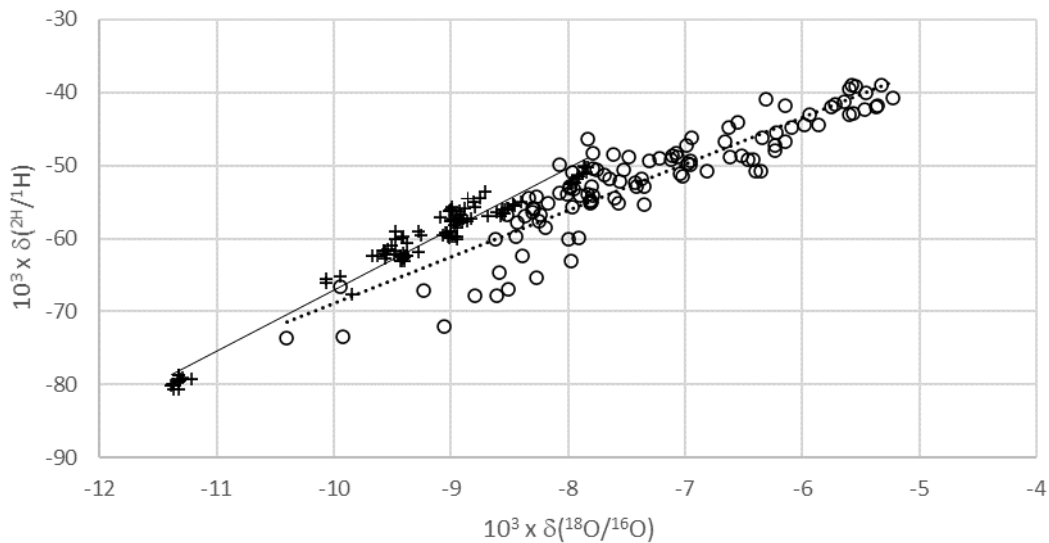


Figura 4.1 - Diagramma di $\delta^2\text{H}$ su $\delta^{18}\text{O}$ per acqua e latte. Croci = acqua; cerchi aperti = acqua del latte (i dati sono riferiti a VSMOW)

È interessante notare che, partendo da un generico punto P sulla retta (1), l'evaporazione dovrebbe portare ad un andamento della retta dell'acqua con pendenza e intercetta inferiore (Gonfiantini R., 1986), ciò che effettivamente avviene nel nostro caso per la retta (2). Quindi, molto probabilmente, oltre ad altri processi metabolici, l'evapotraspirazione animale gioca un ruolo importante nella definizione della tendenza osservata.

Per quanto riguarda l'acqua, assumendo, in prima approssimazione, che la deviazione standard rappresenti bene la dispersione dei dati, osserviamo che, ad eccezione delle stalle di Pavullo, Gaggio e Baiso, la deviazione standard di $\delta^2\text{H}_W$ (0.4-1.3 ‰) ("Table 1") è simile all'incertezza di previsione; a sua volta, ad eccezione della stalla di Pavullo, le deviazioni standard di $\delta^{18}\text{O}_W$ (0.05-0.13‰) sono vicine all'incertezza di previsione. Pertanto, concludiamo che la maggior parte delle acque delle stalle non cambiano i rapporti isotopici durante l'anno. Quando presenti, le variazioni sono dovute al

contributo di diverse fonti di approvvigionamento nel corso dell'anno. Ciò è particolarmente evidente a Pavullo dove $\delta^2\text{H}_W$ and $\delta^{18}\text{O}_W$ sono ben correlati ($R^2 = 0.97$).

La stalla di Magnacavallo (provincia di Mantova), poco distante dal fiume Po, dà una media annua di $\delta^{18}\text{O}_W = -11.33 \pm 0.05 \text{ ‰}$ ("Table 1"); tale costanza nel tempo esclude ogni mescolanza con precipitazioni recenti, che hanno valori più elevati nella pianura padana (Longinelli A. e Selmo E., 2003; Iacumin P. et al., 2009), ed indica un'origine antica. In realtà, Gorgoni et al., 1982 e, più recentemente, Martinelli et al. 2014 hanno identificato le acque sotterranee con valori $\delta^{18}\text{O}_W$ minori di circa -10,5 ‰ (si noti che oggi il $\delta^{18}\text{O}$ del fiume Po è intorno a -9,5 ‰, Gorgoni et al., 1982); queste acque, considerate di origine alpina, hanno subito infiltrazioni risalenti a più di 9000 anni fa. Le acque della stalla di Guastalla hanno mostrato un $\delta^{18}\text{O}_W = -9,40 \pm 0,05 \text{ ‰}$, ad indicare un'origine mista alpino/appenninica.

Per quanto riguarda l'acqua del latte, le deviazioni standard sono sempre ampiamente superiori all'incertezza della previsione. Come discusso di seguito, ciò è dovuto alla variazione dei valori degli isotopi durante l'anno.

Nonostante prevalga costanza nelle caratteristiche isotopiche delle acque, durante l'estate l'acqua del latte si arricchisce in $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$. Ciò potrebbe essere dovuto a diversi fattori quali ad esempio, sempre durante l'estate, l'evapotraspirazione animale (effetto metabolico) e, secondariamente, l'ingestione di erba fresca con acqua arricchita in isotopi pesanti come conseguenza dell'evapotraspirazione delle foglie (Dongmann G. 1974; Farquhar G. D. et al., 1993).

L'arricchimento in isotopi pesanti è particolarmente evidente a Castelnovo e Baiso, dove i dati isotopici per il latte mostrano bimodalità sia per l'idrogeno che per l'ossigeno. In queste località, infatti, durante l'estate gli animali vengono tenuti all'aperto ed ingeriscono anche erba fresca.

Non solo per tutte le stalle complessivamente, ma anche per ciascuna stalla considerata separatamente, la pendenza di ciascuna retta $\delta^2\text{H}_M$ su $\delta^{18}\text{O}_M$ per l'acqua del latte è inferiore a quella dell'acqua. Inoltre, le pendenze ottenute sono correlate positivamente con la temperatura media annuale locale (Figura 4.2), che è compatibile con una risposta dell'animale alla temperatura locale.

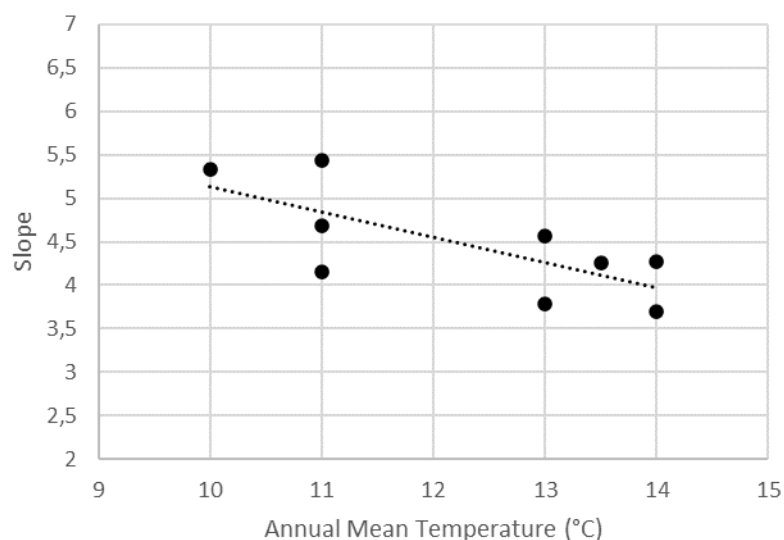


Figura 4.2 – Relazione tra la pendenza $= \frac{\partial \delta^{2H}_M}{\partial \delta^{18O}_M}$ per ogni stalla e la temperatura media annua delle località delle stalle (febbraio 2019-gennaio 2019). Per la regressione riportata è $p_{(slope=0)} = 0.03$, $R^2 = 0.53$

Distribuzione degli isotopi tra l'acqua e l'acqua del latte

I valori $\delta^{18}O_M$ per il latte contro i valori $\delta^{18}O_W$ per l'acqua e i valori δ^2H_M contro i valori δ^2H_W sono significativamente correlati (probabilità $p_{slope=0} \ll 0.00010$ per entrambe le rette di regressione) e i valori del coefficiente di determinazione sono rispettivamente $R^2 = 0,41$ e $R^2 = 0,68$. I valori R^2 indicano che circa il 41% della varianza dei valori $\delta^{18}O_M$ e il 69% della varianza dei valori δ^2H_M sono spiegati da $\delta^{18}O_W$ e δ^2H_W dell'acqua. Nel caso si considerino i valori medi annuali per ogni stalla, il coefficiente di determinazione diventa molto alto ($R^2 = 0,94$) sia per l'ossigeno che per l'idrogeno, suggerendo che i valori medi annuali di $\delta^{18}O_M$ e δ^2H_M per le diverse stalle sono ben spiegate da $\delta^{18}O_W$ e δ^2H_W delle acque appartenenti alle stesse stalle (nella Figura 4.3 come esempio sono riportati i valori isotopici medi per l'ossigeno).

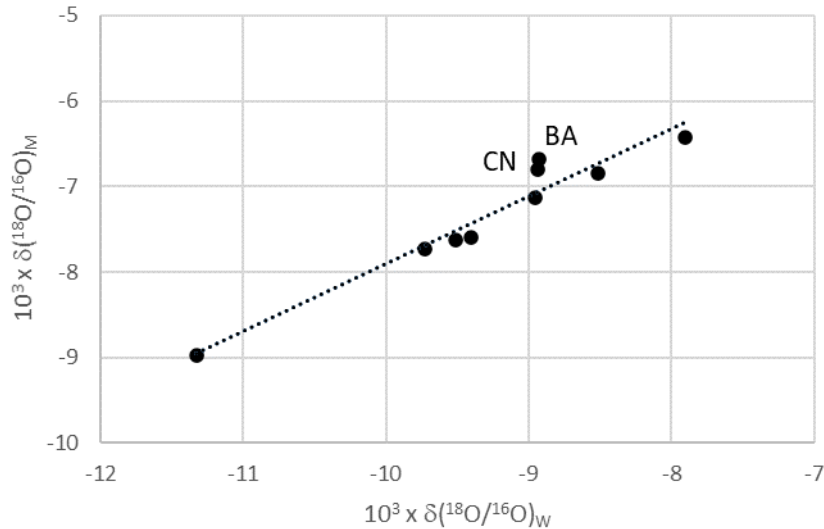


Figura 4.3 – Relazione tra i valori medi $10^3 * \delta^{18}\text{O}$ per l'acqua del latte (M) e per l'acqua (W) (i dati sono riferiti a VSMOW). I due punti sopra la linea di regressione sono per Castelnuovo e Baiso dove, durante l'estate, gli animali vengono tenuti all'aperto

In altre parole, la variazione isotopica dell'acqua tra le diverse località è la causa più importante di variazione dei valori isotopici annuali del latte. Al contrario, i valori mensili sono determinati anche da altri fattori.

L'apparente fattore di frazionamento isotopico tra il latte e l'acqua e la sua dipendenza dal tempo di campionamento

Indichiamo:

$\delta(^aE/^bE)_{W,t}$, valore generico per l'acqua campionata nella stalla generica al tempo generico t ; t è il numero del giorno calcolato a partire dal 1° gennaio di un anno non bisestile;

$\delta(^aE/^bE)_{M,t}$, valore generico per il latte campionato presso la stessa stalla e allo stesso tempo t come per $\delta(^aE/^bE)_{W,t}$;

La distribuzione isotopica tra l'acqua (W) e il latte (M) può essere valutata dal rapporto

$${}^{a/b}\alpha_t = \frac{\delta(^aE/^bE)_{M,t+1}}{\delta(^aE/^bE)_{W,t+1}},$$

questo è il fattore di frazionamento isotopico apparente al tempo t calcolato per ogni coppia di dati $\delta(^aE/^bE)_{W,t}$, $\delta(^aE/^bE)_{M,t}$.

L'importante ruolo del tempo di campionamento su ${}^{a/b}\alpha_t$ è dimostrato e quantificato mediante ANOVA (ANalysis Of VAriance) a due vie. Assumiamo in prima approssimazione che per tutte le stalle il campionamento mensile sia stato eseguito allo stesso tempo \bar{t} , valore medio del tempo del campionamento mensile. ANOVA a due vie, dove le colonne sono riferite alla stalla i e le righe al

tempo \bar{t} di campionamento, indica che la maggior parte della varianza (s^2) dei valori $^{a/b}\alpha_t$ è correlata al tempo \bar{t} di campionamento. Ciò è particolarmente evidente per l'ossigeno: in effetti $s_{\bar{t}(\text{row})}^2 = 0.508 \cdot 10^{-5}$ è ampiamente superiore a $s_{i(\text{column})}^2 = 0.097 \cdot 10^{-5}$; inoltre, $s_{\text{error}}^2 = 0.021 \cdot 10^{-5}$ include l'errore analitico ed altre fluttuazioni minori. Concludendo, i valori isotopici mensili dell'acqua del latte sono influenzati principalmente dal momento del prelievo e, secondariamente, dalla stalla.

La relazione tra i valori $^{a/b}\alpha_t$ rispetto al tempo t di campionamento è ben descritta da una retta di regressione polinomiale di secondo ordine $^{a/b}\hat{\alpha}_t = Ct^2 + Bt + A$. Per l'idrogeno e l'ossigeno (108 coppie di dati $^{a/b}\alpha_t$ e t), otteniamo:

$$^{2/1}\hat{\alpha}_t = -3.08 (\pm 0.36) \cdot 10^{-7} t^2 + 1.14 (\pm 0.14) \cdot 10^{-4} t + 1.0026 (\pm 0.0011) \quad (3)$$

con $n = 108$, $s(\text{yx}) = 3.7 \%$ (errore standard di regressione), $R^2 = 0.41$, e

$$^{18/16}\hat{\alpha}_t = -6.77 (\pm 0.52) \cdot 10^{-8} t^2 + 2.65 (\pm 0.19) \cdot 10^{-5} t + 1.00015 (\pm 0.00015) \quad (4)$$

con $s(\text{yx}) = 0.54 \%$, $R^2 = 0.62$.

Ciò suggerisce che $^{a/b}\alpha_t$ dipende dalle condizioni ambientali stagionali, che, a loro volta, influenzano il metabolismo animale. In particolare, abbiamo considerato la temperatura \bar{T}_i , temperatura media nelle due settimane precedenti il campionamento mensile per ogni località generica in cui si trova la stalla i , e i corrispondenti valori $^{18/16}\hat{\alpha}_{t,i}$. Quindi, per ogni stalla abbiamo definito una retta di regressione $^{18/16}\hat{\alpha}_{t,i} = B_i \bar{T}_i + A_i$. Dai risultati riportati in Tabella 4.3, si nota che $^{18/16}\hat{\alpha}_{t,i}$ e \bar{T}_i sono sempre fortemente correlati ($R^2 \geq 0.67$) e quindi che la temperatura influenza fortemente il fattore di frazionamento e, quindi, il $\delta^{18}\text{O}_M$ del latte.

Localitiy	R^2	$10^5 B_i$
Collecchio	0.89	6.90
Guastalla	0.83	7.72
Gaggio Montano	0.79	5.14
Busseto	0.84	5.73
Baisi	0.82	11.80
Pavullo	0.71	7.03
Castelnovo ne' Monti	0.79	13.3
Palanzano	0.67	8.97
Magnacavallo	0.72	7.40

Tabella 4.3 – Coefficiente di determinazione, R^2 , e pendenza, B_i , per la regressione lineare $^{18/16}\alpha_{t,i} = B_i \bar{T}_i (\text{°C}) + A_i$, dove \bar{T} (°C) è la temperatura media locale per le due settimane precedenti la data di campionamento (i singoli dati di \bar{T} sono riportati in "Table 1")

In particolare, l'arricchimento in isotopi pesanti del latte è correlato al frazionamento isotopico durante l'evaporazione dell'acqua e al percorso di produzione della CO₂. Durante l'estate, la mucca da latte reagisce alle alte temperature "ripristinando" il suo metabolismo; la sintomatologia sarà caratterizzata da un aumento della temperatura corporea da mezzo grado centigrado in su e da un aumento della frequenza respiratoria di oltre 80 battiti al minuto che influenzeranno direttamente la produzione di CO₂. Ciò altera la produzione metabolica di acqua e, poiché l'acqua viene evaporata attraverso i polmoni, aumenta il frazionamento degli isotopi dell'ossigeno. Sia durante il tentativo di acclimatamento che in pieno stress termico, la mucca farà diminuire la produzione di latte; un diverso tasso di produzione potrebbe modificare direttamente il frazionamento dell'ossigeno nella mammella, tra il corpo e l'acqua del latte (Ritz P. et al., 2005; Ritz P. et al., 1996).

Valutazione di $\delta(^aE/^bE)_M$ da $\delta(^aE/^bE)_W$

È molto importante verificare la coerenza tra i valori isotopici del latte e l'acqua ingerita dalla mucca. Affrontiamo qui l'argomento in modo semplice ma sufficiente per ottenere una valutazione dell'incertezza sul valore stimato $^{a/b}\hat{\alpha}_t$ in un dato istante di tempo t (numero di giorni a partire da 1° gennaio) e quindi sul valore di $\hat{\delta}(^aE/^bE)_M$ stimato da $^{a/b}\hat{\alpha}_t$ e $\delta(^aE/^bE)_W$.

Consideriamo le equazioni (3) e (4) sopra riportate. Il coefficiente di determinazione, R^2 , per la regressione (4) è ampiamente superiore a quello per la regressione (3). Quindi, di seguito, i calcoli verranno effettuati considerando solo la polinomiale (4) relativa agli isotopi dell'ossigeno. Questa equazione ci permette di stimare il valore $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ in un dato istante t . Per il calcolo dell'incertezza di previsione, $u(\hat{\alpha})$, su $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ seguiamo la semplice soluzione approssimativa proposta da Jeter S. M. 2003. Otteniamo:

$$^{18/16}\hat{\alpha}_t \pm u(\hat{\alpha}) \cong ^{18/16}\hat{\alpha}_t \pm t_{\alpha(2),v} \sqrt{s(yx)^2 + \frac{s(yx)^2}{n} + (t - t_{av})^2 s_{B|C}^2 + (t^2 - t_{av}^2)^2 s_{C|B}^2}$$

dove $\alpha(2)$ si riferisce al test a due code, $t_{\alpha(2),v} = t$ di student a $v =$ gradi di libertà, $s(yx)$ = errore standard error di regressione, t_{av} = valore medio complessivo dei tempi di campionamento durante gli anni, $s_{B|C}$ = *incertezza condizionale* di B data dal valore di C, e $s_{C|B}$ = *incertezza condizionale* di C data dal valore di B. Sulla base di tutti i dati ($n = 108$), otteniamo: $s_{B|C} = 4.71 \cdot 10^{-7}$, $s_{C|B} = 1.23 \cdot 10^{-9}$, $s(yx) \cong 0.00054$, e $t_{0.32} \cong 1.00$. Pertanto, $u(\hat{\alpha}) \cong 0.54 \text{ ‰}$ (da 0.540 a 0.556 ‰) nell'intervallo dei valori considerati di $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ (da 1.00035 a 1.00376).

Il valore stimato $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ in un tempo definito t può essere utilizzato per calcolare $\hat{\delta}_{M,t}$ da $\delta_{W,t}$ e *viceversa*. Questa valutazione è molto utile per verificare la compatibilità di un campione di latte con l'acqua. Scriviamo:

$$\hat{\delta}_{M,t} + 1 = ^{18/16}\hat{\alpha}_t (\delta_{W,t} + 1) \quad (5)$$

Come si può vedere dal capitolo “Materiali e metodi” dell’articolo, l'incertezza su $\delta_{W,t}$ è molto bassa (circa 0,08 %) rispetto all'incertezza su $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ (circa 0,54-0,56 %). Quindi, l'incertezza $u(\hat{\delta}_M)$ è ben stimata solo dall'incertezza su $^{18/16}\hat{\alpha}_t$, ovvero $u(\hat{\delta}_M) \cong u(\hat{\alpha})$.

L'equazione (4) è stata verificata utilizzando acqua e latte provenienti da altre quattro località dell'area indagata: Torrile, Viarolo, Villa Minozzo e Quattro Castella. I risultati sono riportati nella Tabella 4.4.

Locality	Date of sampling (day/month/year)	t , day number*	$^{18/16}\hat{\alpha}$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{w,m}$ x10 ³	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,m}$ x10 ³	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,c}$ x10 ³	$ \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,m} - \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,c} $ x10 ³
Torrile	20/01/2019	20	1.0006529	-8.78	-8.16	-8.13	0.03
Torrile	25/02/2019	56	1.0014217	-8.86	-7.55	-7.45	0.10
Villa Minozzo	05/02/2019	36	1.0010163	-9.1	-7.81	-8.09	0.28
Quattro Castella	06/02/2019	37	1.0010163	-8.77	-7.92	-7.76	0.16
Viarolo	24/12/2018	358	1.0009603	-7.51	-6.75	-6.56	0.19
Viarolo	16/05/2019	136	1.0025018	-7.54	-6.19	-5.06	1.13

Tabella 4.4 - Valori $\delta^{18}O_M$ del latte calcolati dai valori $\delta^{18}O_M$ dell'acqua in diversi giorni (dati isotopici riferiti a VSMOW)

* t , numero del giorno a partire dal 1° gennaio di ogni anno non bisestile; $^{18/16}\hat{\alpha}$, valore stimato secondo l'equazione (4); m, valore misurato; c, valore calcolato secondo l'equazione (5). Si noti che l'incertezza standard di previsione su $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,c}$ è di circa 0.6 %.

Tranne un caso, la differenza assoluta tra i valori misurati e calcolati per il latte è inferiore all'incertezza di previsione standard; quindi, la concordanza tra i valori misurati e calcolati del latte è soddisfacente. Pertanto, le equazioni di tipo (4) definite per aree diverse e rinnovate di volta in volta, potrebbero essere utilizzate come strumento aggiuntivo per verificare la provenienza del latte.

Il presente studio si è concentrato sul frazionamento degli isotopi di ossigeno e idrogeno tra l'acqua del latte e l'acqua ingerita dalle bovine. I risultati più rilevanti sono stati i seguenti:

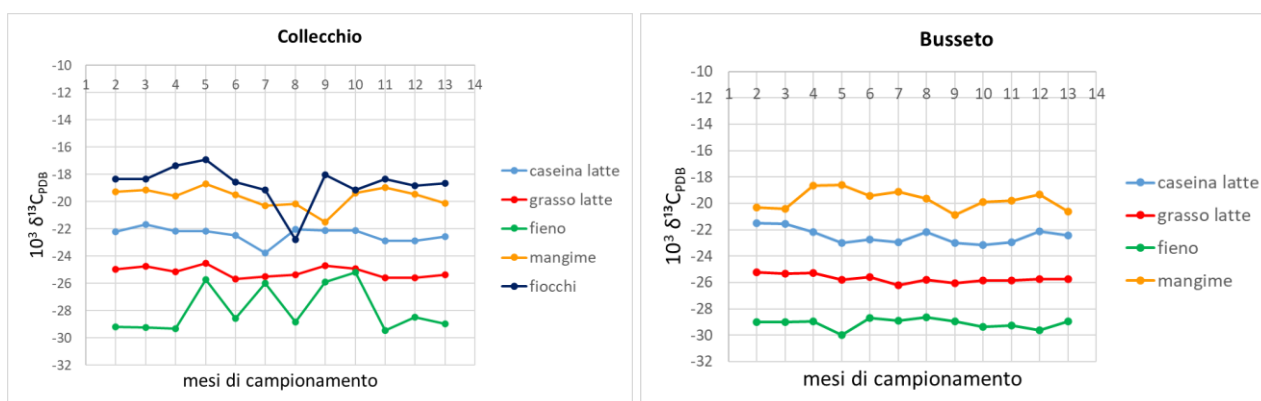
- 1) Per tutte le stalle, la pendenza delle rette di regressione δ^2H_M su $\delta^{18}O_M$ è sempre inferiore rispetto alla pendenza della retta di regressione complessiva descritta dalle acque. Inoltre, la pendenza è inversamente proporzionale alla temperatura media annua delle diverse località. Ciò indica un effetto di risposta fisiologica che è lo stesso che si dovrebbe osservare nel caso in cui l'acqua ingerita fosse influenzata dall'evaporazione.

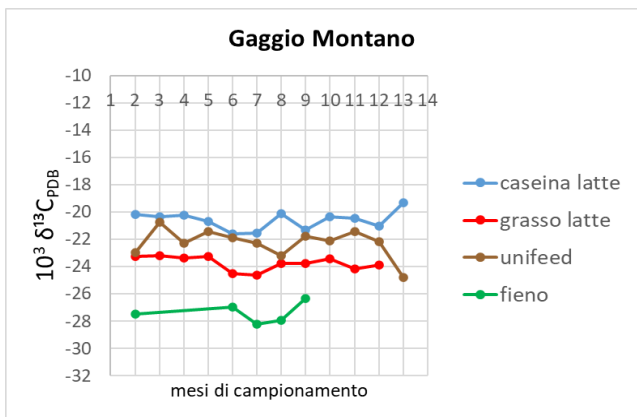
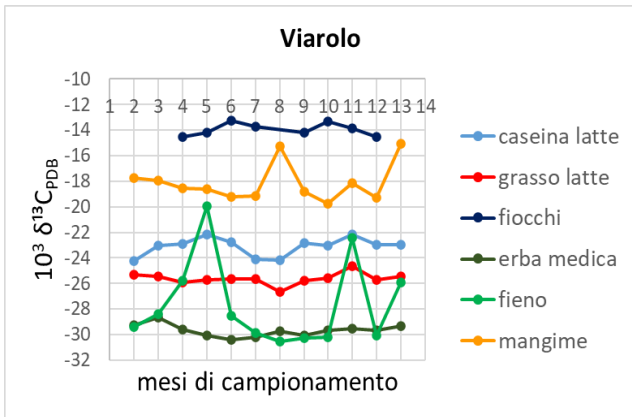
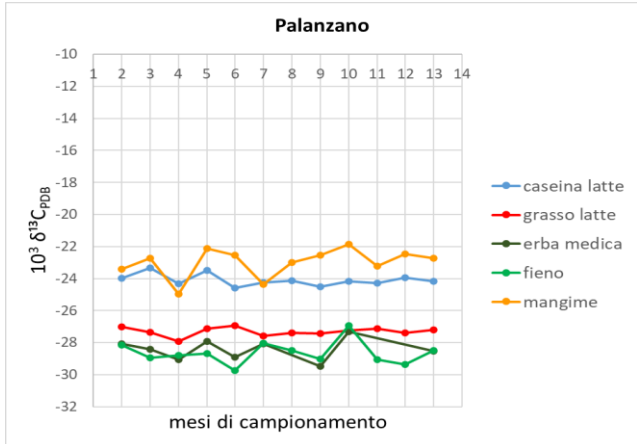
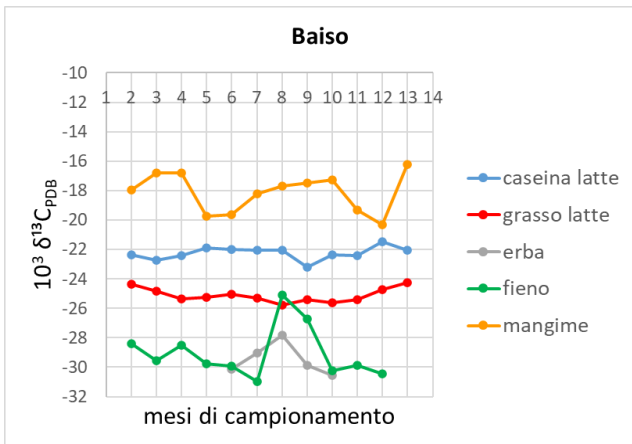
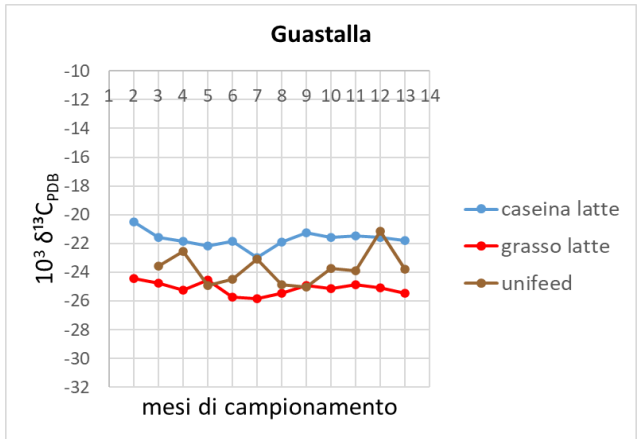
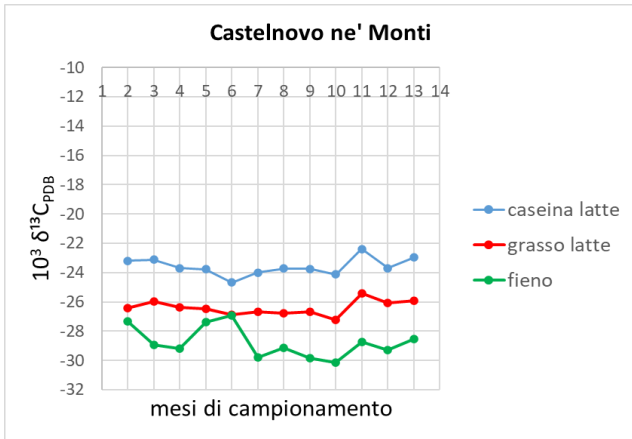
- 2) Solo il 41% della varianza dei valori $\delta^{18}\text{O}_M$ e il 68% della varianza dei valori $\delta^2\text{H}_M$ è spiegato dai corrispondenti valori isotopici dell'acqua. Pertanto, altri fattori come i fattori ambientali e metabolici e le strategie di alimentazione giocano un ruolo molto importante.
- 3) Al contrario, la variazione dei valori isotopici medi annuali del latte tra le diverse stalle è principalmente dovuta alla variazione isotopica delle acque ($R^2 = 0,94$ per la regressione dei valori dell'acqua del latte sui valori dell'acqua sia per l'ossigeno che per l'idrogeno).
- 4) La varianza dei valori del fattore α dipende principalmente dai diversi tempi di raccolta piuttosto che dalle diverse stalle. Ciò supporta l'ipotesi che la variazione di temperatura provoca una risposta fisiologica degli animali. L'evapotraspirazione è probabilmente la risposta più importante.
- 5) Una regressione polinomiale di secondo ordine spiega bene la dipendenza delle caratteristiche isotopiche del latte dalla composizione isotopica dell'acqua: il modello consente quindi la previsione del valore dell'acqua del latte dall'acqua e *viceversa*. L'estensione della nostra indagine su diversi anni in diverse aree potrebbe contribuire in modo significativo agli studi sulla provenienza del latte.

4.2 Analisi isotopiche di $\delta^{13}\text{C}$

4.2.1 Andamento di $\delta^{13}\text{C}$ nel tempo

Per ognuna delle dieci stalle studiate si riporta in Figura 4.4 l'andamento annuale del $\delta^{13}\text{C}$ delle varie tipologie di dieta e delle frazioni del latte (grasso e caseina).





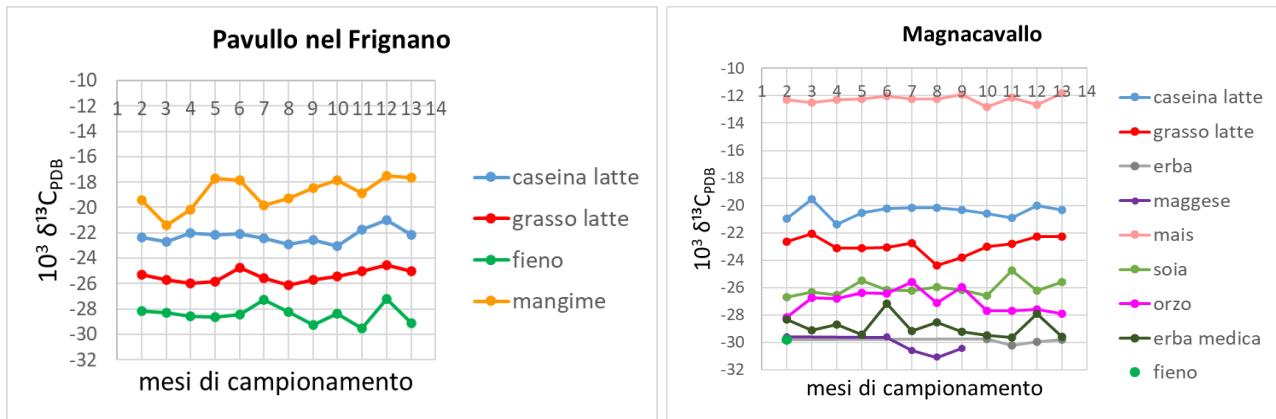


Figura 4.4 – Andamento annuale dei valori di $\delta^{13}C$ di dieta e latte (caseina e grasso) in ognuna delle dieci stalle studiate

Asse x: 2=febbraio 2018; 3=marzo 2018; 4=aprile 2018; 5=maggio 2018; 6=giugno 2018; 7= luglio 2018; 8=agosto 2018; 9= settembre 2018; 10= ottobre 2018; 11= novembre 2018; 12= dicembre 2018; 13= gennaio 2019

Si nota come la componente fieno, per le stalle nelle quali è presente, sia la meno arricchita (in quanto costituita da piante C3), mentre ai fiocchi e al mangime appartengono i valori più arricchiti di $\delta^{13}C$ (visto il loro contenuto anche in piante C4).

Da letteratura è noto il range di variazione di $\delta^{13}C$ delle piante C3 e C4: il primo si trova tra -22‰ e -30‰ e il secondo tra -11‰ e -14‰.

Il fieno è quello che mostra una maggiore variabilità, basti pensare al fatto che contiene diversi sfalci di erbe (prati naturali, prati stabili polifiti, ecc.) e diverse parti vegetali e non (foglie, fusto, ecc.).

Il fieno più altalenante nel corso dell'anno in termini di $\delta^{13}C$ è presente nella stalla di Viarolo che mostra il valore medio più negativo, con due picchi molto pronunciati nei mesi di maggio e novembre 2018: dai valori di $\delta^{13}C$ si può dedurre la presenza di sfalci di mais.

Mangime e fiocchi contengono anche mais in proporzione variabile nei mesi, come si può vedere dal campione di fiocchi della stalla di Collecchio del mese di agosto.

Nelle stalle di Busseto e Pavullo il mangime è più variabile del fieno nel corso dell'anno. Ciò non è di facile interpretazione siccome la casa produttrice di mangime, per tutte le stalle che lo utilizzano, è stata dichiarata essere la stessa.

Per le stalle quali Palanzano (BIO), Viarolo e Pavullo, siccome l'allevatore fornisce quotidianamente due tipi di mangime, uno più proteico e uno più ricco di mais, si è deciso di considerare un valore unico mensile, riportando una media pesata dei valori di $\delta^{13}C$ in base alle rispettive % di C.

Graficamente per la maggior parte delle stalle, ad eccezione di quelle che utilizzano *unifeed* nella dieta, le frazioni del latte ricadono tra le componenti della dieta, con la caseina più arricchita del grasso (arricchimento in carbonio di circa 2‰ per la caseina). Il latte, distribuendosi centralmente rispetto alle componenti della dieta, risente quindi di entrambi i contributi. L'andamento di caseina e

grasso è simile ma meno variabile rispetto alla dieta nel corso dell'anno, ad indicare che i “salti” nella dieta non sono visibili immediatamente o comunque non si riflettono con uguale intensità nel latte. Essendo il contenuto in ^{13}C del latte funzione del contenuto in ^{13}C della dieta, il latte prodotto da bovine alimentate con piante C3 è caratterizzato da un $\delta^{13}\text{C}$ più negativo rispetto al latte prodotto da bovine con alimentazione a base di C4.

Per i campioni di latte, Palanzano è la stalla con i valori di $\delta^{13}\text{C}$ medi annuali meno arricchiti sia del grasso che della caseina. Ciò può risentire del mangime, che presenta, in questa stalla, il valore più negativo.

Per quanto riguarda le stalle di Guastalla e Gaggio Montano la dieta si compone della mistura di *unifeed*. Per Guastalla, a causa della mancata raccolta del campione di *unifeed* del mese di febbraio 2018, non è stato possibile ottenere il valore isotopico corrispondente. Per Gaggio Montano l'allevatore fornisce *unifeed* in mistura con il fieno (lo stesso usato per fare l'*unifeed*).

In entrambi i casi appare visibile come l'*unifeed* si disponga centralmente rispetto agli andamenti di caseina e grasso del latte. L'andamento è altalenante, ma i suoi valori nel corso dell'anno sono più arricchiti di quelli del grasso (per Guastalla le eccezioni riguardano i mesi di maggio e settembre 2019; per Gaggio Montano si ha un picco più negativo nel mese di gennaio 2019) e meno arricchiti di quelli della caseina (per Guastalla l'eccezione è nel mese di dicembre 2019). Queste eccezioni possono ricondursi ad errori commessi durante la procedura di omogeneizzazione del campione: in alcuni casi è risultato impossibile frantumare e quindi omogeneizzare le fibre vegetali.

L'*unifeed*, come già riportato, consiste in una miscela omogenea di tutti i componenti della razione somministrati alle bovine da latte e quindi, trattandosi di un mix di piante C3 e C4, si trova a metà tra i due range di valori riportati in letteratura.

Infine, la stalla di Magnacavallo è l'unica tra quelle studiate che fornisce il mangime sotto forma di farine (farina di soia, orzo e mais) ed è quella con il maggior numero di campioni raccolti.

Dal grafico si vede che si riferiscono al mais i valori $\delta^{13}\text{C}$ più arricchiti e come esso ricade perfettamente all'interno del range di variazione del $\delta^{13}\text{C}$ delle piante C4 (-11‰ ÷ -14‰). Seguono caseina e grasso del latte al di sotto dei quali si trovano soia, orzo e le varie erbe.

Nella sezione “Appendice 6” sono riportate alcune precisazioni sui valori medi annuali di $\delta^{13}\text{C}$ per la dieta (utilizzati nella rappresentazione grafica della Figura 4.4) di alcune stalle.

4.2.2 Indagine statistica

Per questa elaborazione si sono considerati unicamente i valori isotopici di carbonio e azoto di dieta e latte analizzati presso il laboratorio dell'Università di Parma.

Visto l'elevato numero di campioni è utile presentare i dati utilizzando la statistica descrittiva (le tabelle che mostrano la significatività statistica delle misure, ottenute utilizzando il software statistico PAST, sono riportate nella sezione "Appendice 6").

Innanzitutto, dai dati sperimentali ottenuti si sono confrontati prima i valori isotopici di carbonio tra i diversi componenti della dieta delle bovine (fieno, mangime, *unifeed*, ecc.) e poi i valori isotopici di carbonio tra i campioni di caseina e successivamente di grasso del latte durante tutto l'anno di campionamento per vedere se vi fossero differenze significative tra le stalle e/o i mesi di campionamento.

Le elaborazioni che seguono sono presentate secondo l'ordine seguente: dieta in tutte le sue componenti, caseina e grasso dei campioni di latte.

Dieta

Le matrici costruite per ogni tipologia di dieta, dalle quali si sono ottenuti i grafici boxplot seguenti, sono state costruite ponendo sulle colonne le stalle e sulle righe i mesi di campionamento.

Per la stalla di Magnacavallo la soia e l'orzo hanno una media annuale simile (circa $-26 \delta^{13}\text{C}$) ma deviazione standard diversa (rispettivamente 0,57 e 0,84). Il mais invece ha valori meno negativi rispetto alle altre due componenti (circa $-12 \delta^{13}\text{C}$) e una deviazione standard inferiore (0,26).

Tra le categorie soia e orzo vi è differenza significativa (*p same* 0,03478), nonostante un valore medio pressoché uguale.

La differenza tra le due tipologie di dieta è visibile anche dal box plot sottostante (Figura 4.5), che mostra la distribuzione dei dati rispetto alla media e dove questi sono concentrati per la maggiore:

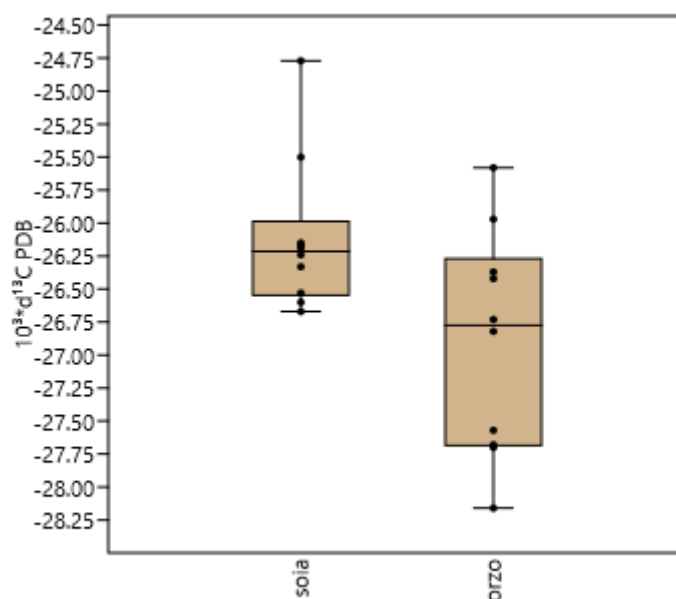


Figura 4.5 - Confronto quantitativo tramite box plot tra il valore isotopico di $\delta^{13}\text{C}$ di orzo e soia per la stalla di Magnacavallo

Le stalle che forniscono fieno nella dieta sono in maggior numero: Collecchio, Busseto, Castelnovone' Monti, Baiso, Palanzano, Viarolo, Pavullo e Magnacavallo.

Per quanto riguarda le stalle di Palanzano e Viarolo si è considerata la media tra i contributi del fieno e della medica; per la stalla di Magnacavallo si è considerata la medica.

L'intervallo dei valori medi annuali va da $-27,71 \delta^{13}\text{C}$ (Collecchio) a $-29,44 \delta^{13}\text{C}$ (Baiso). Non c'è differenza statistica tra le righe (mesi di campionamento) e neppure tra le colonne (stalle): p same 0,1015. In realtà l'unica differenza significativa intercorre tra le stalle di Baiso e Collecchio.

Dal box plot sottostante (Figura 4.6) le stalle che coprono un ampio range di valori sono Collecchio (deviazione standard 1,76) e Viarolo (deviazione standard 1,90). In generale tra le stalle non ci sono differenze significative:

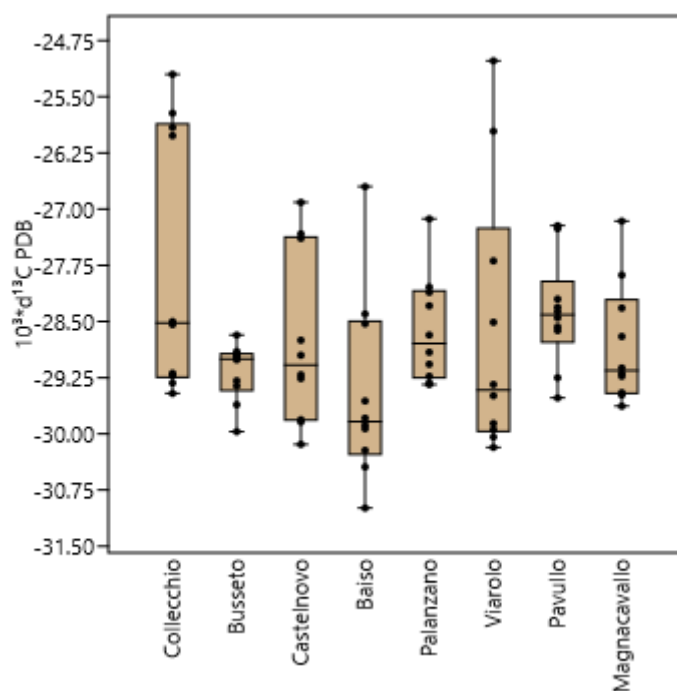


Figura 4.6 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le stalle che forniscono fieno e i valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni di fieno

Nel mese di maggio nelle stalle di Collecchio e Viarolo si ritrovano alcuni valori di $\delta^{13}\text{C}$ del fieno meno positivi (intorno a -25δ) e ciò può indicare la presenza di piante C4 all'interno della razione. Inoltre, per quanto concerne le stalle di Palanzano, Viarolo e Magnacavallo va precisato che dentro la categoria fieno è stata considerata anche l'erba medica per via di valori isotopici simili e anche per la mancanza di campioni in alcuni mesi.

Le stalle che forniscono focchi nella dieta sono Collecchio e Viarolo, vi sono differenze tra loro (p same 0,000014) e quindi i focchi delle due stalle sono differenti.

Il boxplot (Figura 4.7) mostra che Viarolo ha valori più positivi (media annuale $-13.95 \delta^{13}\text{C}$) e Collecchio i valori più negativi (media annuale $-18.31 \delta^{13}\text{C}$):

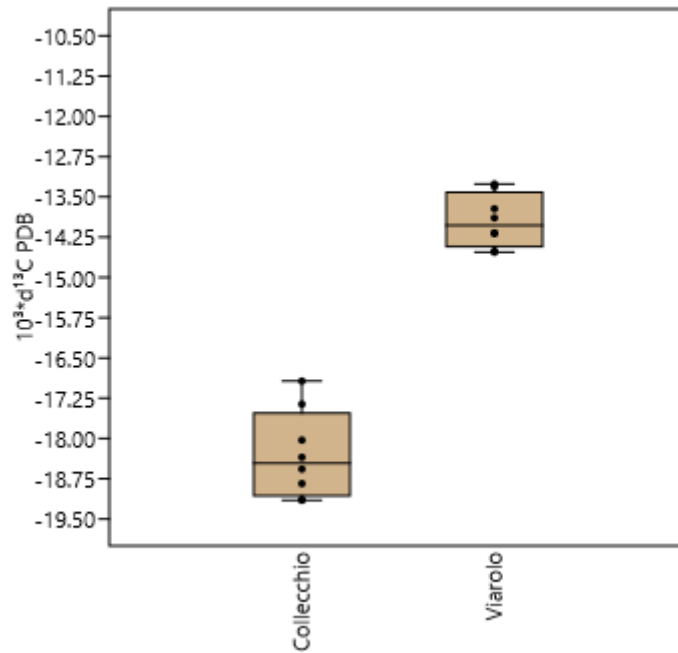


Figura 4.7 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le stalle che forniscono fiocchi e i valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni di fiocchi

Non sono stati considerati i mesi di febbraio e marzo per mancanza di dati.

Le stalle che utilizzano *unifeed* come dieta sono Guastalla e Gaggio Montano: vi sono differenze tra le stalle ($p \text{ same} = 0,00738$) e quindi l'*unifeed* delle due stalle è diverso.

Dal boxplot sottostante (Figura 4.8) si nota che la stalla di Gaggio Montano ha valori più positivi di Guastalla, la quale ha un range di variazione più ampio (deviazione standard maggiore e pari a 1,23):

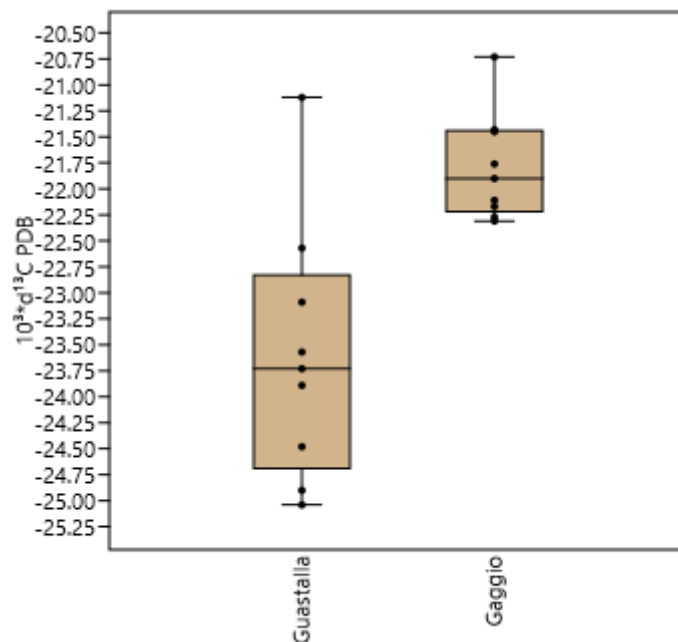


Figura 4.8 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le stalle che forniscono unifeed e i valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni di unifeed

Per mancanza di dati non si è tenuto conto del mese di febbraio e quindi per la stalla di Guastalla non si è incluso il valore del fieno corrispondente a tale mese.

Le stalle che forniscono il mangime nella dieta sono: Collecchio, Busseto, Baiso, Palanzano, Viarolo e Pavullo nel Frignano.

Dal semplice confronto dei dati, le stalle Collecchio e Busseto sembrano uguali come valori di media e deviazione standard (entrambi intorno a $-19,60 \delta^{13}\text{C}$ di media e $0,75$ di dev.st). Stessa cosa si può dire per le stalle Baiso, Viarolo e Pavullo nel Frignano (intorno a $-19,30 \delta^{13}\text{C}$ di media e $1,30$ di dev.st). Vi sono differenze tra le stalle (colonne), $p \text{ same} < 0,10$: $p \text{ same } 7,77 \cdot 10^{-10}$. In particolare, la stalla di Palanzano è diversa dalle altre stalle che però a loro volta non sono statisticamente diverse tra loro e si conferma il fatto che le stalle di Collecchio e Busseto sono tra loro uguali.

Dal boxplot in Figura 4.9 si vede che alla stalla di Palanzano appartengono i valori più negativi di tutti (media annuale $-22,61 \delta^{13}\text{C}$) e si tratta anche della stalla più variabile che si discosta dalle altre:

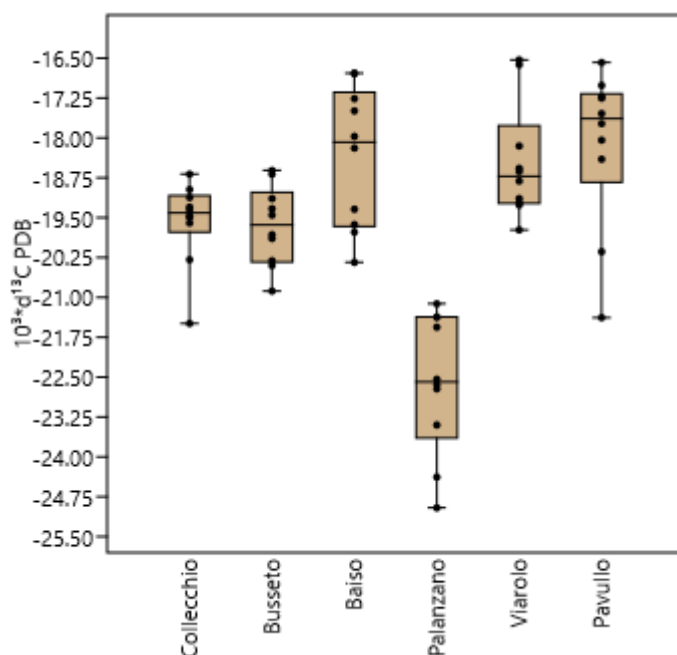


Figura 4.9 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le stalle che forniscono mangime e i valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni di mangime

Caseina nei campioni di latte

La costruzione della matrice è la stessa esposta in precedenza per la dieta: per ogni stalla (colonne) e per ogni mese (righe) si riportano i valori di $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni di caseina.

L'analisi statistica mostra che i campioni di caseina del latte appartenenti alle diverse stalle sono molto diversi tra loro: $4,24 \cdot 10^{-36}$. Le colonne (e quindi le caseine) che differiscono tra di loro sono molte,

tuttavia le coppie di stalle di Collecchio con Busseto e Gaggio Montano con Magnacavallo mostrano una distribuzione dei valori simile. Quindi, nel caso di Magnacavallo, la caseina di questa stalla è diversa da quella di tutte le altre stalle tranne da Gaggio Montano.

La stalla di Castelnovo ne' Monti presenta differenze con tutte, tranne con Palanzano e Viarolo. Ricordiamo che la stalla di Castelnovo ne' Monti è l'unica che fornisce, come dichiarato dallo stesso allevatore, solo fieno come dieta. Essendo quindi (probabilmente) presente solo questo contributo, la differenza riscontrata trova giustificazione.

Alla stalla di Palanzano appartengono i valori di ^{13}C più negativi (media annuale $-24,10 \delta^{13}\text{C}$), Figura 4.10:

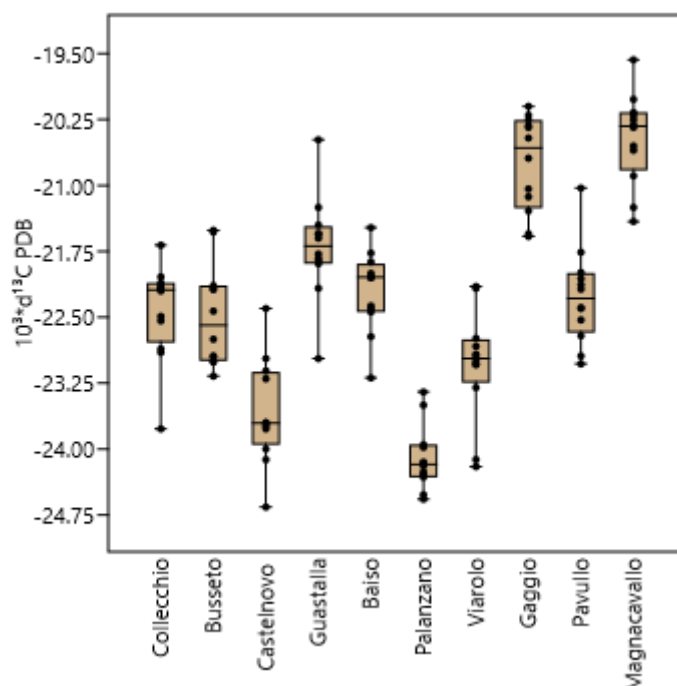


Figura 4.10 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le dieci stalle e i valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni di caseina

Quello che è visibile dalla rappresentazione grafica è che le stalle di Gaggio Montano e Magnacavallo (diverse dalla maggior parte delle stalle ma non tra loro) sono più positive come valori rispetto ad una fascia intermedia in cui si collocano le stalle di Collecchio, Busseto, Baiso e Pavullo nel Frignano. In ogni caso anche queste ultime presentano variazioni tra loro.

Quello che si può affermare per quanto riguarda l'andamento dei valori della caseina è che tra le varie stalle vi sono già differenze nella dieta che si ripercuotono poi nel latte.

Grasso nei campioni di latte

Per quanto concerne i campioni di grasso del latte, dal semplice confronto dei valori medi annuali si vede che alla stalla di Palanzano appartengono i valori ^{13}C più negativi (media annuale $-27,14 \delta^{13}\text{C}$)

e a Magnacavallo quelli meno negativi (media annuale $-22,71 \delta^{13}\text{C}$). Vi è differenza statistica tra le stalle ($p \text{ same } 1,99 \cdot 10^{-44}$). La stalla di Magnacavallo è statisticamente diversa da tutte le altre presentando valori meno negativi; seguono poi, come numerosità di differenze con le altre stalle, Gaggio Montano e Palanzano.

In generale, i campioni di grasso hanno un range di variazione inferiore rispetto alle caseine (Figura 4.11):

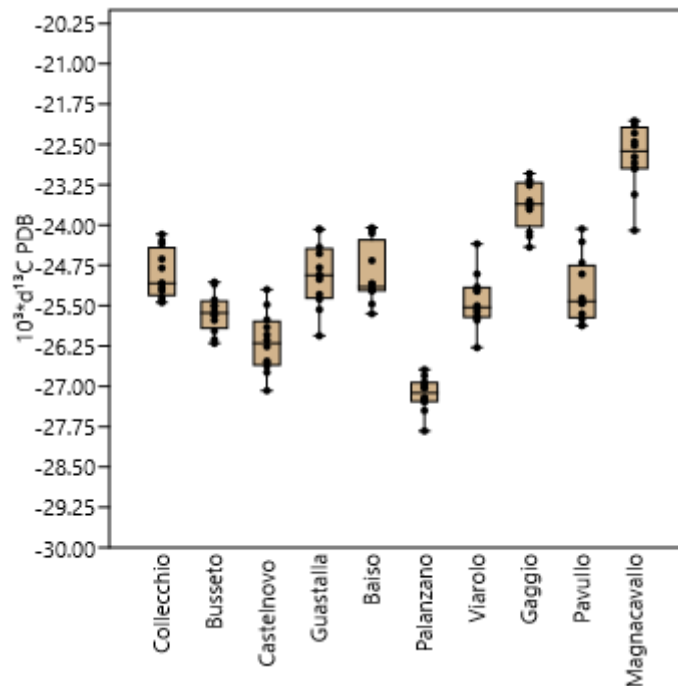


Figura 4.11 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le dieci stalle e i valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni di grasso

Dal boxplot si può notare, graficamente, la differenza tra le stalle. Le stalle che più si discostano sono Palanzano con valori più negativi e Magnacavallo con valori meno negativi.

4.2.3 Determinazione quantitativa delle componenti della dieta

Per le stalle di Guastalla e Gaggio Montano si è calcolato il frazionamento isotopico α che intercorre tra la caseina del latte e la dieta somministrata, solo per queste stalle per le quali il valore medio della dieta era noto essendo *unifed*.

I valori medi annuali di caseina e della dieta utilizzati nei calcoli sono presentati nella sezione “Appendice 6”.

Per la stalla di Viarolo è stato escluso dai calcoli il valore del $\delta^{13}\text{C}$ del fieno corrispondente al mese di maggio 2018.

Dalle misure effettuate sul latte delle stalle di Guastalla e Gaggio Montano, possiamo ricavare il coefficiente di frazionamento relativo al carbonio tra caseina (CAS) e dieta (D):

$$^{13/12}\alpha_{\text{CAS-D}} = \frac{^{13/12}\delta_{\text{CAS}+1}}{^{13/12}\delta_{\text{D}+1}} = 1,00183 \pm 0,000294 \text{ (errore standard della media)}$$

Dai valori (variabili) presenti in letteratura, la caseina risulta arricchita di circa 2-3‰ e i lipidi impoveriti di circa 3-4‰ rispetto alla dieta, ma vediamo che per i dati qui presentati il valore calcolato è più piccolo.

La deviazione standard è piccola ($\pm 0,00141$) e nel calcolo di $\alpha_{\text{caseina-unifeed}}$ il valore medio calcolato è significativo, $p \text{ (same)} < 0,0001$ (significativamente diverso da 1). Inoltre, la deviazione standard riportata tiene conto di 23 misure di α che sono i valori di α mensili delle due stalle.

A questo punto, conoscendo il valore di $\alpha_{\text{caseina-dieta}}$, si è potuto calcolare il valore medio della dieta per le altre stalle per le quali le frazioni fieno e mangime sono separate.

Pertanto, l'equazione seguente ci consente di calcolare il valore $^{13/12}\delta_{\text{D}}$ per i campioni delle altre stalle:

$$^{13/12}\delta_{\text{D}} = 10^3 \left[\left(^{13/12}\delta_{\text{CAS}} + 1 \right) \left(^{13/12}\alpha_{\text{CAS-D}} \right)^{-1} - 1 \right] \text{‰} = 10^3 \text{ } ^{13/12}\delta_{\text{D}} \text{‰} \quad (1)$$

L'incertezza di previsione standard su $^{13/12}\delta_{\text{D}}$ è di circa 0.6 ‰.

I risultati sono riportati nella Tabella 4.5:

stalle	$10^3 \delta^{13}\text{C}_{\text{caseina}}$	$10^3 \delta^{13}\text{C}_{\text{dieta tot}}$	$10^3 \delta^{13}\text{C}_{\text{fieno}}$	$10^3 \delta^{13}\text{C}_{\text{mangime}}$	% fieno	
Collecchio	-22,4	-23,8	-27,9	-19,7	51	
Busseto	-22,5	-23,9	-29,1	-19,7	45	
Castelnovo ne' Monti	-23,6	-25,0	-28,8		87	
Baiso	-22,2	-23,7	-29,2	-18,1	50	
Palanzano	-24,1	-25,5	-28,5	-23,0	46	
Viarolo	-23,1	-24,5	-29,0	-18,1	59	solo mangime
	-23,1	-24,5	-29,0	-14,0	70	solo fiocchi
Pavullo nel Frignano	-22,3	-23,7	-28,4	-18,9	51	
Magnacavallo	-20,4	-21,9	-29,2	-26,5	-175	solo orzo+soia
	-20,4	-21,9	-29,2	-12,3	57	solo mais

Tabella 4.5 – Valori della dieta totale e % delle frazioni di fieno per il carbonio delle stalle per le quali non sono note le proporzioni della dieta

D'altro canto, per la massima parte dei campioni sono noti i valori $^{13/12}\delta_{\text{F}}$ e $^{13/12}\delta_{\text{M}}$, dove F = fieno e M = mangime; pertanto, indicando con X_{F} la frazione in massa (Q) del fieno F

$$X_F = \frac{Q_F}{Q_F + Q_M}$$

e con $X_M = 1 - X_F$ la frazione in massa del mangime M, potremo scrivere il bilancio isotopico

$$^{13/12}\delta_D = X_F ^{13/12}\delta_F + (1 - X_F) ^{13/12}\delta_M$$

da cui

$$X_F = \frac{^{13/12}\delta_D - ^{13/12}\delta_M}{^{13/12}\delta_F - ^{13/12}\delta_M} = 10^2 \frac{^{13/12}\delta_D - ^{13/12}\delta_M}{^{13/12}\delta_F - ^{13/12}\delta_M} \% \quad (2)$$

Quindi, disponendo del valore medio della dieta si sono potute calcolare le frazioni di fieno e mangime usate nelle varie stalle. Le valutazioni di X_F sono riportate in Tabella 4.5.

Evidentemente, i valori dei parametri indicati nelle equazioni sono sottoposti ad incertezza.

Indichiamo per semplicità

$$^{13/12}\alpha_{CAS-D} = \alpha, \quad ^{13/12}\delta_D = \delta_D, \quad ^{13/12}\delta_{CAS} = \delta_{CAS}, \quad ^{13/12}\delta_F = \delta_F, \quad ^{13/12}\delta_M = \delta_M$$

Abbiamo: $s(\alpha) \cong 0.0003$ (errore standard della media), $s(\delta_{CAS})$, $s(\delta_F) \cong 0.5 \text{ ‰}$, $s(\delta_M) \cong 0.5 \text{ ‰}$ (incertezze standard). Pertanto, tenendo conto della relazione (1), scriviamo:

$$s(\delta_D) = \sqrt{\left[\frac{\partial \delta_D}{\partial \delta_{CAS}} s(\delta_{CAS}) \right]^2 + \left[\frac{\partial \delta_D}{\partial \alpha} s(\alpha) \right]^2} = \sqrt{[\alpha^{-1} s(\delta_{CAS})]^2 + [-\alpha^{-2} (\delta_{CAS} + 1) s(\alpha)]^2}$$

In prima approssimazione, si ha $\alpha^{-1} \cong 1$, $\alpha^{-2} \cong 1$, $\delta_{CAS} + 1 \cong 1$; pertanto:

$$s(\delta_D) \cong \sqrt{[s(\delta_{CAS})]^2 + [s(\delta_{CAS})]^2} = \sqrt{0.0005^2 + 0.0003^2} \cong 0.6 \text{ ‰}$$

Consideriamo ora l'equazione (2): l'incertezza sul numeratore

$$y = \delta_D - \delta_M \quad \text{è}$$

$$s(y) \cong \sqrt{[s(\delta_D)]^2 + [s(\delta_M)]^2} = \sqrt{0.0006^2 + 0.0005^2} \cong 0.8 \text{ ‰}$$

L'incertezza al denominatore

$$y = \delta_F - \delta_M \quad \text{è}$$

$$s(w) \cong \sqrt{[s(\delta_F)]^2 + [s(\delta_M)]^2} = \sqrt{0.0005^2 + 0.0005^2} \cong 0.7 \text{ ‰}$$

Molto approssimativamente, l'errore standard su X_F è dato da:

$$s(X_F) \approx \sqrt{\left[\frac{\partial X_F}{\partial y} s(y) \right]^2 + \left[\frac{\partial X_F}{\partial w} s(w) \right]^2} = \sqrt{[w^{-1} s(y)]^2 + [-w^{-2} y s(w)]^2}$$

In grossolana approssimazione si ha, $w^{-1} \cong 1$ e $-w^{-2} y \cong 1$; pertanto,

$$s(X_F) \approx \sqrt{s(y)^2 + s(w)^2} = \sqrt{0.0008^2 + 0.0007^2} \cong 11 \text{ ‰}$$

L'errore stimato sulla frazione di fieno calcolato è pari a $\pm 11\%$.

Si può vedere, sempre dalla Tabella 4.5, che a valori di caseina più negativi non corrispondono % di fieno maggiori nella dieta delle bovine.

La stalla di Viarolo è, probabilmente, quella in cui viene utilizzata la maggiore % di fieno visto i due valori estremi calcolati fra 59 e 70% con solo mangime e solo fiocchi.

La % di fieno calcolata varia fra il 45 e 51% che, tenendo conto dell'errore, corrisponde a quanto previsto dal disciplinare del Parmigiano Reggiano.

Nel caso della stalla di Castelnovo ne' Monti il valore calcolato di 87% invece di 100% è compatibile con l'errore stimato.

Per la stalla di Magnacavallo essendo previsto nella dieta anche orzo+soia, supponiamo che l'allevatore fornisca il 50% di erba medica e il 50% di mangime (mais+orzo+soia), si ottiene un $\delta^{13}\text{C}$ mangime pari a -14,41.

Decidendo di considerare i contributi di soia e orzo insieme, siccome molto simili come valori nel corso dell'anno, e facendo una media dei loro valori annuali ($\delta^{13}\text{C}$ -26,53), si determinano i pesi della componente mais prima e delle componenti orzo+soia poi, che incidono nel 50% del peso del mangime nella dieta, attraverso la solita espressione:

$$X_{\text{mais}} = \frac{-14,41 - (-26,53)}{-12,27 - (-26,53)}$$

$X_{\text{mais}} = 0,85$ del 50% mangime

$$X_{\text{soia}} + X_{\text{orzo}} = 1 - X_{\text{mais}}$$

Di conseguenza, si ottiene 0,15 (15%) come contributo fornito da orzo+soia all'interno del 50% del peso del mangime.

Per quanto riguarda sempre la stalla di Magnacavallo, essendo la dieta composta da tante componenti e quindi dovendo impostare una proporzione, quello che appare chiaro è come il valore di $\delta^{13}\text{C}$ del mangime sia fortemente influenzato dall'elevato quantitativo di mais che l'allevatore fornisce alle bovine.

La % di fieno determinata per Magnacavallo presenta da un lato un valore superiore al 100% e negativo (-175%) nel caso di solo orzo+soia e ciò non è possibile, e dall'altro un 57% nel caso di solo mais nella dieta. Si tratta quindi della stalla che fa maggior uso di mais.

4.2.4 Fattore di frazionamento nei campioni di latte $\alpha_{\text{caseina-grasso}}$ per $\delta^{13}\text{C}$

Per questa trattazione, oltre ai dati isotopici di carbonio e azoto ottenuti presso il laboratorio dell'Università di Parma, sono stati considerati anche i valori riguardanti le due mensilità analizzate presso il laboratorio dell'Istituto Jožef Stefan.

Dai valori di grasso e caseina, per ogni stalla e per ogni mese di campionamento, sono stati calcolati i fattori di frazionamento $\alpha_{\text{caseina-grasso}}$: $\alpha_{\text{caseina-grasso}}$ medio=1,003031 con deviazione standard 0,000329 ed errore standard 0,00010.

La deviazione standard è piccola ed il valore di α è significativo, $p_{\text{same}} < 0,0001$ (significativamente diverso da 1). Inoltre, la deviazione standard riportata tiene conto di dieci misure di α che sono la media annuale delle dieci stalle.

I valori calcolati sono stati riportati in una matrice (Tabella 4.6) dove sulle colonne troviamo le stalle e sulle righe i mesi, per vedere se vi sono differenze legate alla stagionalità e/o alle stalle.

	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Guastalla	Baiso	Palanzano	Viarolo	Gaggio	Pavullo	Magnacavallo
febbraio'18	1,00286	1,00383	1,00330	1,00407	1,00202	1,00313	1,00113	1,00312	1,00302	1,00170
marzo'18	1,00314	1,00388	1,00293	1,00329	1,00214	1,00410	1,00244	1,00294	1,00305	1,00255
aprile'18	1,00306	1,00316	1,00274	1,00352	1,00301	1,00369	1,00305	1,00320	1,00412	1,00178
maggio'18	1,00242	1,00287	1,00275	1,00242	1,00347	1,00372	1,00367	1,00265	1,00378	1,00260
giugno'18	1,00327	1,00292	1,00225	1,00394	1,00315	1,00243	1,00295	1,00301	1,00275	1,00286
luglio'18	1,00177	1,00336	1,00274	1,00293	1,00333	1,00343	1,00155	1,00314	1,00323	1,00263
agosto'18	1,00339	1,00369	1,00316	1,00365	1,00383	1,00333	1,00252	1,00373	1,00327	1,00430
settembre'18	1,00262	1,00312	1,00303	1,00378	1,00229	1,00299	1,00301	1,00256	1,00326	1,00355
ottobre'18	1,00288	1,00274	1,00319	1,00365	1,00334	1,00317	1,00263	1,00317	1,00249	1,00249
novembre'18	1,00277	1,00301	1,00310	1,00351	1,00304	1,00290	1,00256	1,00379	1,00335	1,00198
dicembre'18	1,00280	1,00370	1,00241	1,00360	1,00334	1,00354	1,00281	1,00289	1,00363	1,00229
gennaio'19	1,00291	1,00339	1,00303	1,00375	1,00225	1,00312	1,00255	1,00429	1,00293	1,00200

Tabella 4.6 - Fattori di frazionamento $\alpha_{\text{caseina-grasso}}$ mensili delle dieci stalle

Dall'analisi statistica si vede che c'è differenza tra le colonne, quindi fra stalle ($p_{\text{same}}=1,84*10^{-6}$).

I dati sono rappresentati nel boxplot di Figura 4.12:

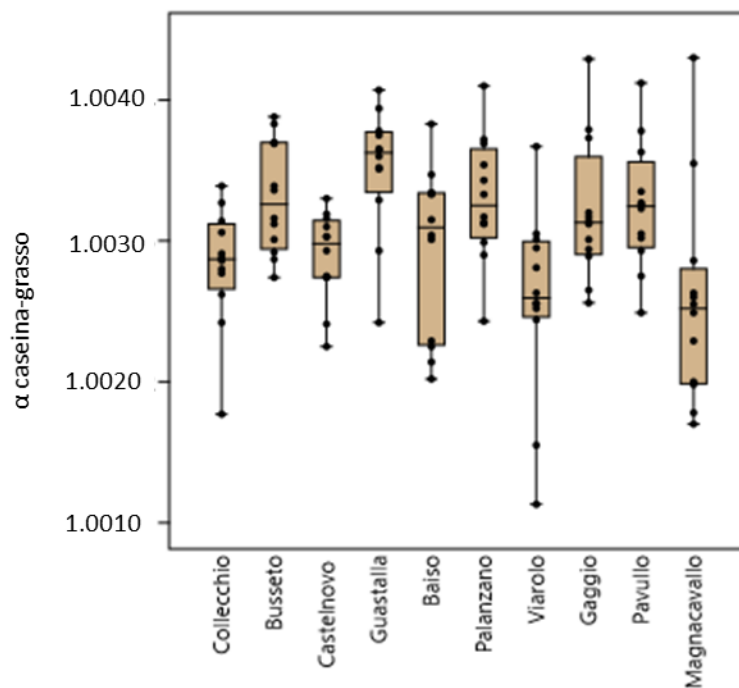


Figura 4.12 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le dieci stalle e il fattore di frazionamento $\alpha_{caseina-grasso}$

Riassumendo, è quindi importante notare come il valore $\alpha_{caseina-grasso}$ medio presenti una deviazione standard piccola e non siano stati riscontrati andamenti stagionali.

Nel boxplot in Figura 4.13 sono rappresentati insieme i valori di $\delta^{13}C$ di caseina (in azzurro) e del grasso (in marrone) dei campioni di latte:

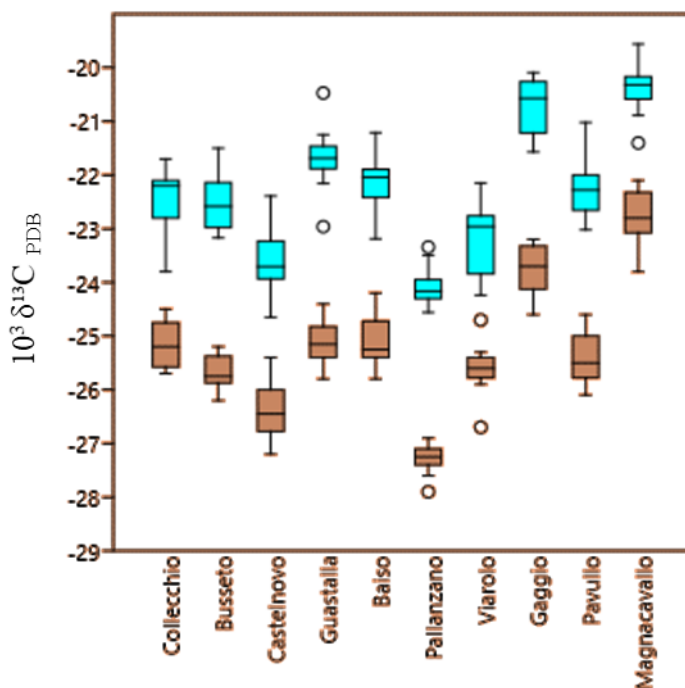


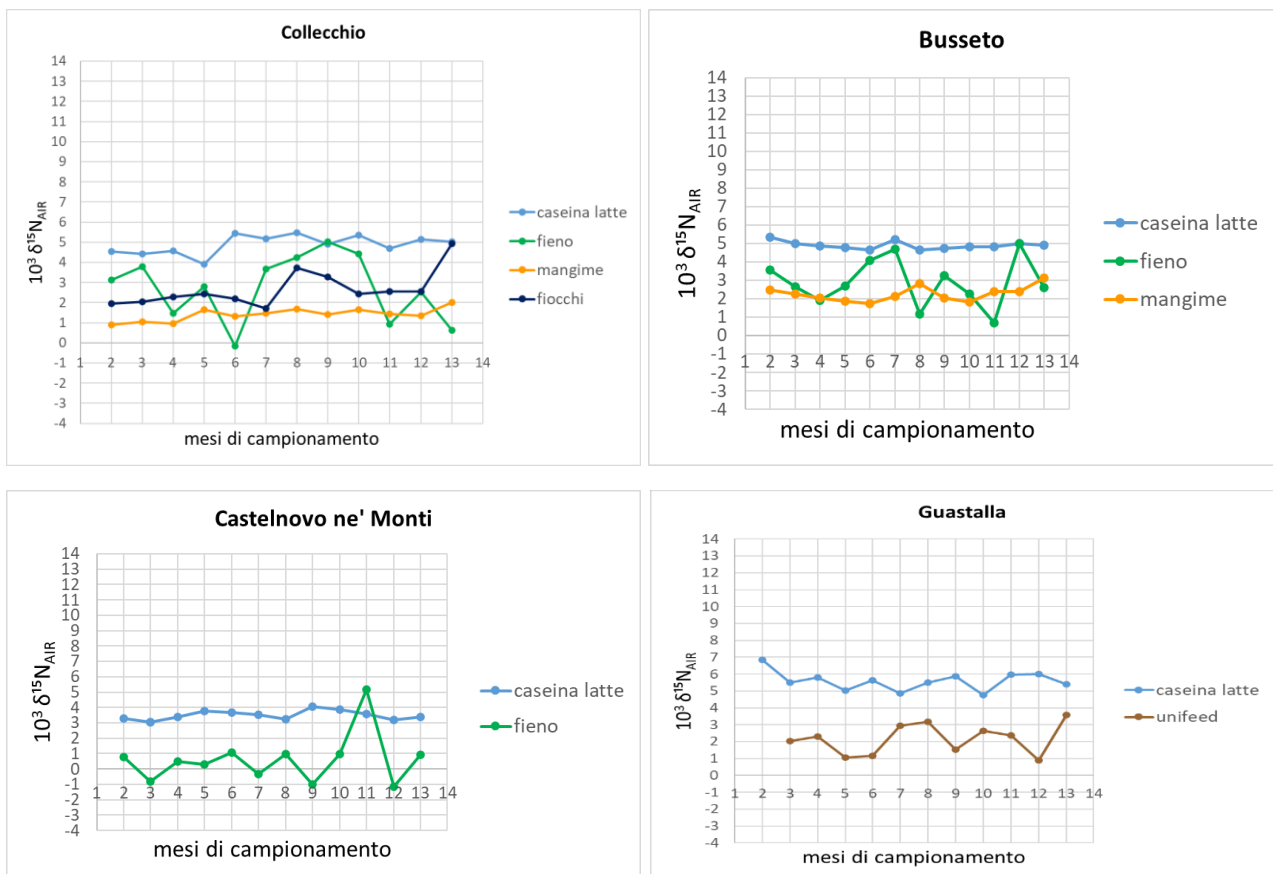
Figura 4.13 - Valori di $\delta^{13}C$ di caseina (in azzurro) e del grasso (in marrone) dei campioni di latte delle dieci stalle

I campioni di caseina, più arricchiti rispetto ai campioni di grasso, si distribuiscono nella parte alta del grafico. I valori di grasso e caseina seguono un comportamento comune: se il valore isotopico della caseina si impoverisce, di conseguenza il valore isotopico del grasso corrispondente mostrerà un valore di $\delta^{13}\text{C}$ più negativo, e viceversa (a titolo di esempio si consideri la stalla di Palanzano).

4.3 Analisi isotopiche di $\delta^{15}\text{N}$

4.3.1 Andamento di $\delta^{15}\text{N}$ nel tempo

Per ognuna delle dieci stalle studiate si riporta in Figura 4.14 l'andamento annuale del $\delta^{15}\text{N}$ delle varie tipologie di dieta e della caseina del latte.



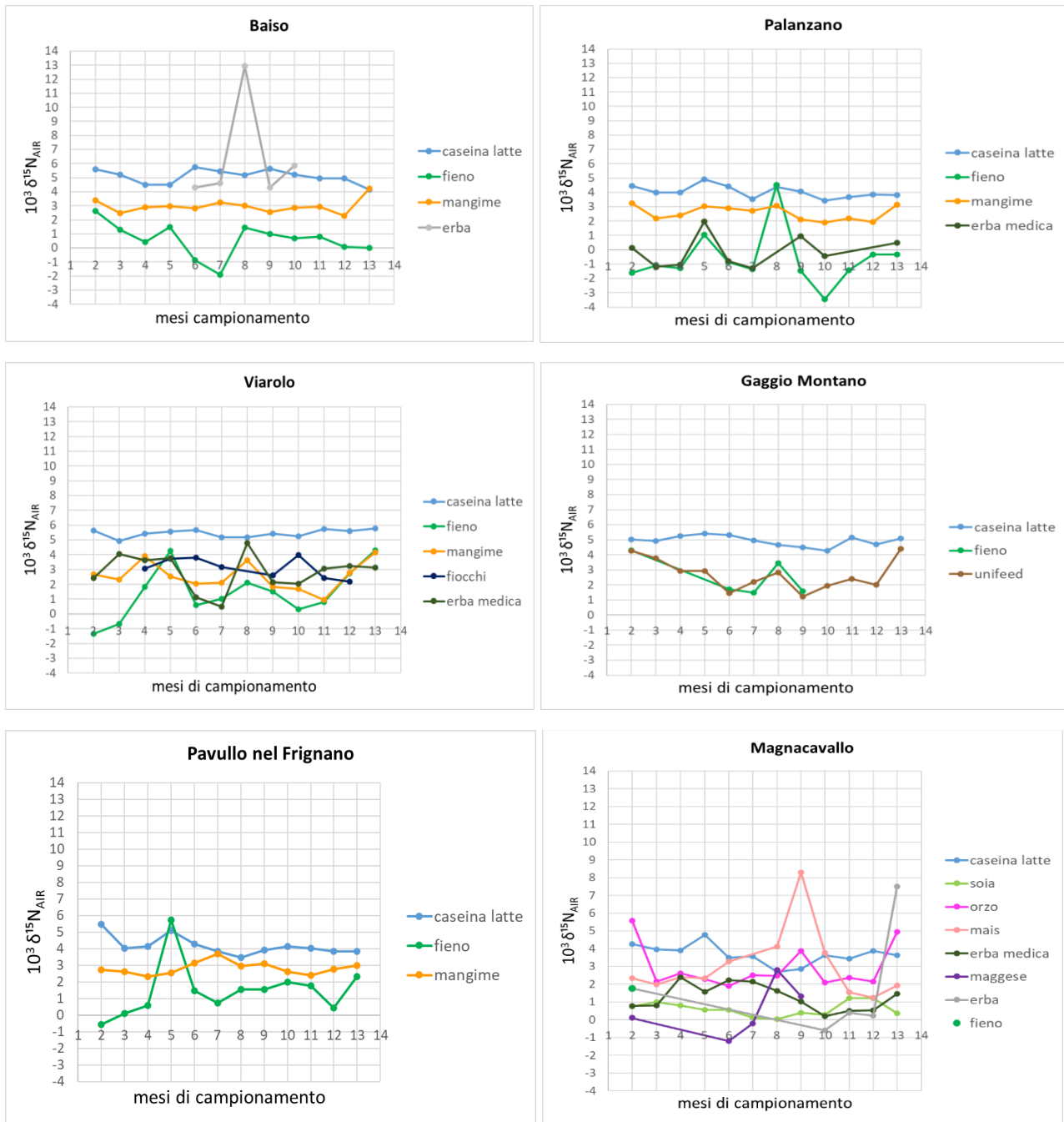


Figura 4.14 – Andamento annuale dei valori di $\delta^{15}N$ di dieta e latte (caseina) in ognuna delle dieci stalle studiate

Asse x: 2=febbraio 2018; 3=marzo 2018; 4=aprile 2018; 5=maggio 2018; 6=giugno 2018; 7= luglio 2018; 8=agosto 2018; 9= settembre 2018; 10= ottobre 2018; 11= novembre 2018; 12= dicembre 2018; 13= gennaio 2019

Come per il carbonio, per le stalle che utilizzano due tipologie di mangime, si è considerata una media pesata (in base alle corrispondenti % di N) dei valori di $\delta^{15}N$.

Nelle stalle di Collecchio e Busseto si nota come la componente mangime nell'arco dei dodici mesi ha valori impoveriti, con alcune eccezioni durante l'anno dove è il fieno a mostrare valori meno arricchiti, e presenta anche un andamento pressoché costante nel tempo. Il mangime è l'alimento più proteico.

Sempre per queste due stalle, la maggior parte dei valori del fieno si ritrovano tra quelli del mangime e della caseina, invece per Viarolo, Baiso e Palanzano la componente fieno mostra valori isotopici meno arricchiti rispetto al mangime.

Per Palanzano e Baiso il mangime è più vicino al valore della caseina e simile ad essa come andamento (questo ultimo aspetto riguarda anche Busseto).

Le due stalle che utilizzano i fiocchi, Collecchio e Viarolo, hanno valori più arricchiti rispetto al mangime (qualche eccezione in alcuni mesi per Viarolo).

Per la stalla di Baiso, il valore di $\delta^{15}\text{N}$ dell'erba corrispondente al mese di agosto 2018 presenta un valore molto positivo (+12,92 $\delta^{15}\text{N}$). Ciò probabilmente è riconducibile ad un errore commesso in fase di pesata del campione.

Nell'insieme, il fieno risulta molto variabile nel corso dell'anno assumendo talvolta valore negativo (il valore medio annuale del fieno più negativo appartiene a Palanzano), per arrivare a raggiungere e superare poi il valore della caseina. Ciò forse dipende dalla diversa quantità di leguminose (es. trifoglio, erba medica) presenti che, essendo specie azoto fissatori di N_2 atmosferico, hanno un valore intorno di $\delta^{15}\text{N}$ a 0‰ (Yoneyama et al., 1995).

In generale la caseina risulta arricchita in $\delta^{15}\text{N}$ sia rispetto al fieno che al mangime (3‰ frazionamento pianta-animale) (Steele & Daniel, 1978; De Niro & Epstein, 1981). Guastalla presenta i valori medi annuali della caseina più arricchiti fra tutte le stalle.

Questi valori possono essere influenzati da diversi parametri ambientali, quali temperatura, disponibilità di acqua e dall'uso dei fertilizzanti naturali o sintetici dei quali però in questo studio non si è tenuto conto.

Come per l'isotopo del carbonio anche per l'azoto si può affermare che l'andamento della dieta sia più incostante di quello della frazione proteica del latte, ciò anche a causa delle diverse parti di cui la dieta stessa si compone.

Per quanto riguarda le stalle di Guastalla e Gaggio Montano che utilizzano *unifeed*, anche qui la caseina risulta arricchita in $\delta^{15}\text{N}$ rispetto alla dieta. In alcuni mesi dell'anno *unifeed* e caseina sembrano seguire un andamento simile, per poi intraprendere variazioni più o meno marcate durante altri mesi. Per quanto riguarda il fieno utilizzato per fare l'*unifeed* della stalla di Gaggio Montano, questo mostra un andamento comune all'*unifeed* stesso.

La stalla di Magnacavallo è una delle stalle che presenta per la caseina valori medi mensili inferiori. Dal grafico si vede come le componenti quali erba, maggese, orzo e soia in alcuni mesi superano (anche di molto nel caso di mais ed erba) il valore di $\delta^{15}\text{N}$ della caseina. Maggese ed erba mostrano alcuni valori negativi nell'andamento annuale. Le componenti della dieta ad eccezione della soia, che appare più costante come valori (valori più o meno intorno allo 0 siccome si tratta di una leguminosa)

e simile come andamento alla caseina, presentano importanti variazioni durante l'anno. L'erba medica, fatta eccezione per i primi e gli ultimi mesi dell'anno dove i valori si avvicinano allo 0, per la maggior parte del tempo mostra valori più arricchiti se confrontati con quelli di letteratura associati alla leguminose. Orzo e mais si caratterizzano per un contenuto di %N inferiore alla soia, la più proteica delle tre farine.

Ciò che si può affermare dopo questa prima analisi dei dati è che la presenza dell'isotopo ^{15}N nel latte quale prodotto animale sia fortemente legata a quella della dieta e che le variazioni in essa osservate riflettano la composizione isotopica del terreno (es. tecniche di fertilizzazione). Non avendo però tenuto in considerazione questo ultimo fatto per questioni pratiche legate al campionamento, siccome non tutti gli allevatori coltivano in loco il foraggio utilizzato per cibare gli animali ma anzi, molto spesso li acquistano all'interno del comprensorio, nulla di più preciso si può aggiungere in merito se non quello già riportato in letteratura. Ovvero che i fertilizzanti organici animali apportano un arricchimento in $\delta^{15}\text{N}$ nei composti azotati del suolo e, a questi, è associato un intervallo di $\delta^{15}\text{N}$ compreso tra +2‰ e +30‰, mentre i fertilizzanti artificiali prodotti dalla fissazione di azoto atmosferico (urea, nitrato d'ammonio, nitrato di potassio) presentano un intervallo di $\delta^{15}\text{N}$ compreso tra -4‰ e +4‰ (D'Urso Maria G., 2010).

Per quanto concerne la stalla di Palanzano, ovvero l'unica stalla BIO tra quelle esaminate, non si differenzia dalle altre stalle.

Nel periodo estivo, nella maggior parte delle stalle quali Busseto, Castelnuovo ne' Monti, Baiso, Viarolo, Gaggio Montano, Pavullo nel Frignano e Magnacavallo si assiste ad un abbassamento del contenuto in ^{15}N nella caseina. Durante l'estate gli allevatori di queste stalle forniscono erba fresca (non solo secca) con un valore di $\delta^{15}\text{N}$ inferiore. Questo comportamento, come noto e già accennato, è dovuto ad un aumento dei processi quali nitrificazione, mineralizzazione, assimilazione e denitrificazione dell'azoto nel suolo che a sua volta determina un abbassamento del valore del rapporto isotopico $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nelle piante (Camin e Versini 2001). Quest'ultimo andamento a decrescere si nota nella stalla di Viarolo (solo per il fieno), Gaggio Montano, Pavullo nel Frignano e Magnacavallo. Purtroppo, nelle altre stalle a causa dei valori mensili molto variabili non è facile distinguere un simile comportamento sia per la caseina che per la dieta.

Per quanto concerne la distinzione tra latte di montagna e latte di pianura, essendo noto che il $\delta^{15}\text{N}$ del formaggio di montagna risulta essere relativamente basso (Versini et al., 2000; Camin et al., 2001) si può affermare che nel nostro caso ciò non risulta. In questa tesi non sono state fatte analisi isotopiche sul formaggio ma, se ci basiamo sul latte, vi sono casi di pianura (stalla di Magnacavallo) con valori di caseina vicini ai valori riscontrati nelle nostre stalle di montagna e viceversa, stalle di

montagna (stalle di Baiso e Gaggio Montano) con valori vicini a quelli corrispondenti alle stalle ubicate in pianura.

Nella sezione “Appendice 6” sono riportate alcune precisazioni sui valori medi annuali di $\delta^{15}\text{N}$ per la dieta (utilizzati nella rappresentazione grafica della Figura 4.14) di alcune stalle.

4.3.2 Indagine statistica

Per questa elaborazione, come per il carbonio, si sono considerati unicamente i valori isotopici dell’azoto di dieta e latte analizzati presso il laboratorio dell’Università di Parma.

Le tabelle che mostrano la significatività statistica delle misure sono riportate nella sezione “Appendice 6”.

Dieta

Per la stalla di Magnacavallo i campioni di mais e orzo hanno una media annuale simile (intorno a $2,50 \delta^{15}\text{N}$), ma deviazione standard diversa. La soia invece mostra valori più bassi durante l’anno rispetto alle altre due componenti (media pari a $0,69 \delta^{15}\text{N}$) e deviazione standard inferiore.

Attraverso l’analisi statistica si vede che non vi è differenza significativa tra le categorie mais e orzo, come dimostra anche il box plot nella figura sottostante (Figura 4.15):

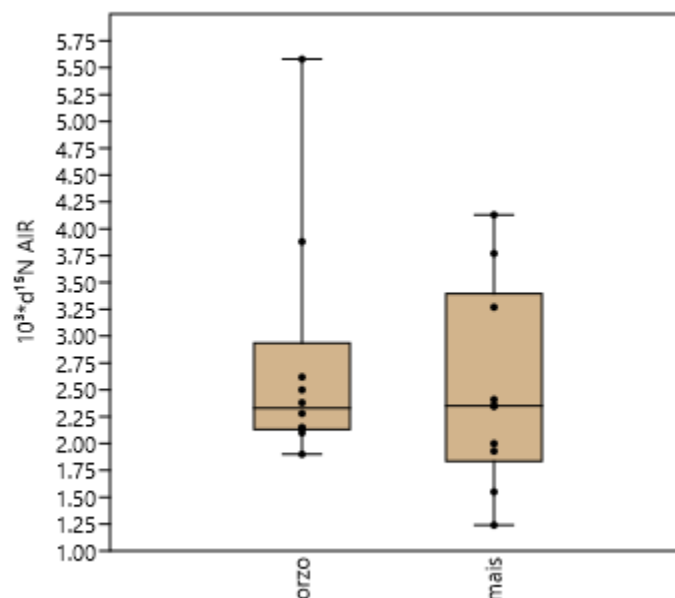


Figura 4.15 - Confronto quantitativo tramite box plot tra il valore isotopico di $\delta^{15}\text{N}$ orzo e mais per la stalla di Magnacavallo

Per la componente fieno, per le stalle di Palanzano e Viarolo si è considerata la media tra i contributi del fieno e dell'erba medica, invece per la stalla di Magnacavallo è presente solo l'erba medica. Con l'analisi statistica si nota che vi sono differenze fra tutte le stalle ($p \text{ same } 4,39 \cdot 10^{-7}$) e in modo particolare si vede che Palanzano è statisticamente diversa dalla maggior parte delle stalle. Il boxplot inoltre (Figura 4.16) mostra che le stalle di Collecchio e Busseto hanno valori più positivi e coprono un range di valori simile, invece la stalla di Palanzano è più negativa:

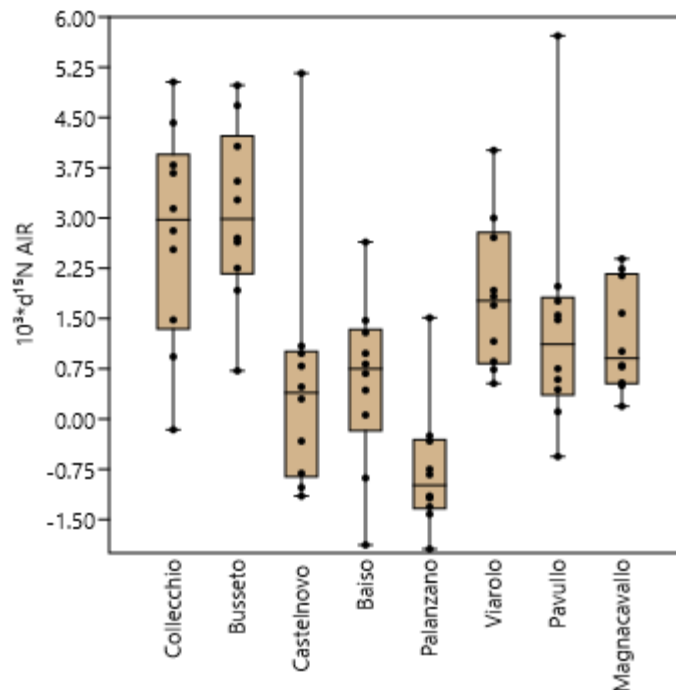


Figura 4.16 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le stalle che forniscono fieno e i valori isotopici di $\delta^{15}N$ dei campioni di fieno

Quindi, i valori isotopici del fieno delle stalle di Castelnovo ne' Monti, Baiso e Palanzano sono diversi da quelli di Collecchio e Busseto. Inoltre, il fieno di Palanzano è diverso anche da quello di Viarolo, Pavullo e Magnacavallo.

Per quanto riguarda le stalle che forniscono focchi con la dieta (Collecchio e Viarolo), Viarolo ha valori più positivi (media annuale $3,13 \delta^{15}N$) e una deviazione standard maggiore di Collecchio. I focchi sono statisticamente differenti tra loro: $p \text{ same } 0,07346$.

Ciò è visibile anche dal boxplot (Figura 4.17), che mostra la distribuzione dei dati delle due stalle:

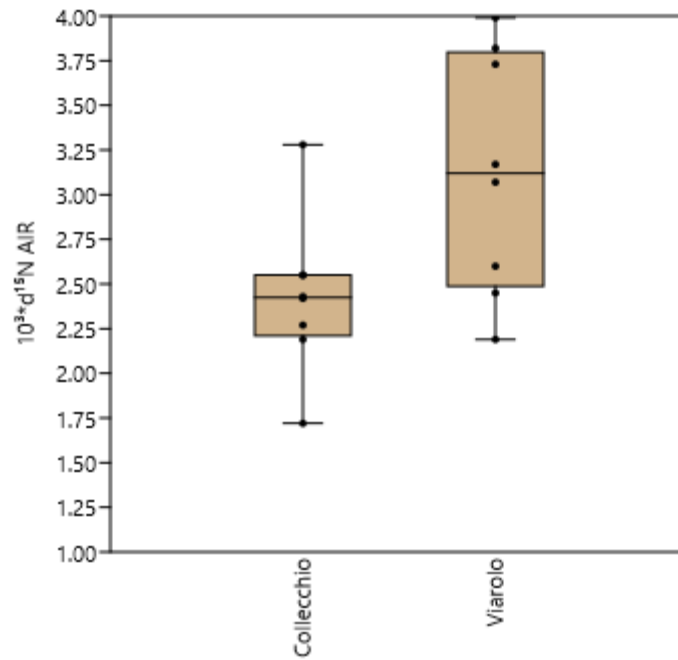


Figura 4.17 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le stalle che forniscono focchi e i valori isotopici di $\delta^{15}N$ dei campioni di focchi

A causa della mancanza di dati, i mesi di febbraio e marzo non sono stati considerati.

Le stalle di Guastalla e Gaggio Montano utilizzano *unifeed* nella dieta. Gaggio Montano mostra valori più positivi (media annua $2,52 \delta^{15}N$) di Guastalla, e deviazione standard simile (intorno a 0,90). Statisticamente, non vi è differenza tra le stalle.

Il fatto che entrambe ricoprono range più o meno simili è visibile anche dal boxplot (Figura 4.18):

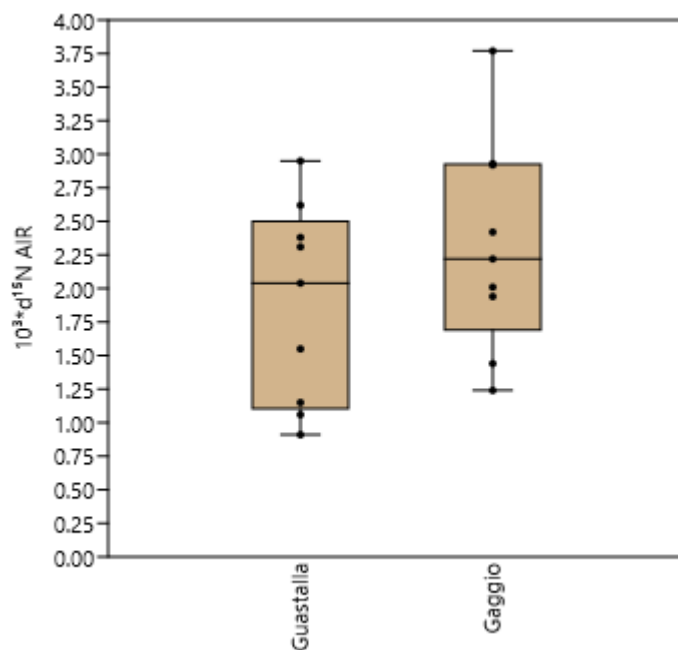


Figura 4.18 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le stalle che forniscono unifeed e i valori isotopici di $\delta^{15}N$ dei campioni di unifeed

Par quanto concerne le stalle che forniscono mangime, dal confronto delle medie annuali la stalla di Collecchio differisce dalle altre presentando valori mensili meno positivi (media annua $1,32 \delta^{15}\text{N}$), mentre le stalle di Baiso e Pavullo nel Frignano hanno la stessa media ($2,84 \delta^{15}\text{N}$). L'analisi statistica mostra che vi sono differenze statistiche tra le stalle: $p \text{ same } 1,33 \cdot 10^{-8}$. È la stalla di Collecchio ad essere diversa da tutte le altre stalle, mentre Busseto differisce da Baiso e Pavullo nel Frignano. Anche dal boxplot sottostante (Figura 4.19) è visibile quanto affermato:

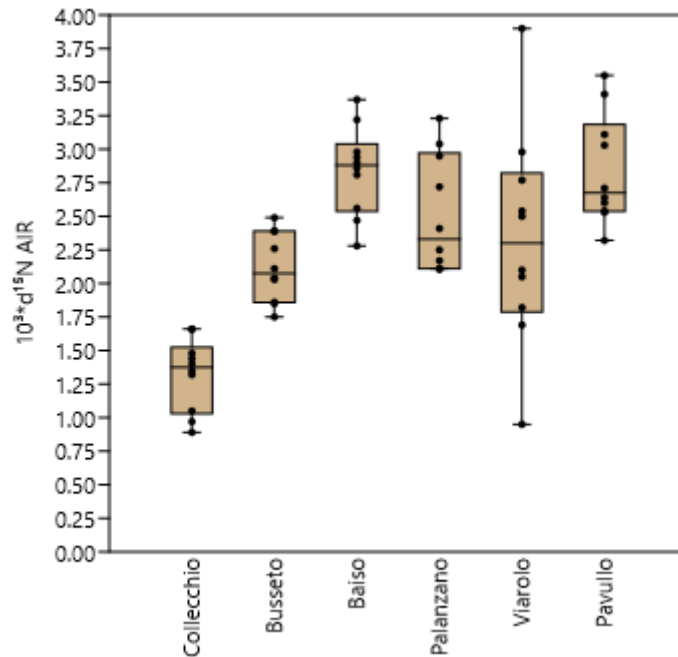


Figura 4.19 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le stalle che forniscono mangime e i valori isotopici di $\delta^{15}\text{N}$ dei campioni di mangime

La stalla di Collecchio si discosta dalle altre stalle presentando valori meno positivi, mentre le restanti stalle ricoprono un range simile di valori in particolar modo le stalle di Baiso e Pavullo nel Frignano.

I valori “anomali” (statisticamente alti e bassi), riscontrati per alcune categorie di dieta (fieno, orzo, fiocchi e *unifeed*) in alcune stalle, potrebbero essere riconducibili al tipo di concimazione utilizzata.

Caseina nei campioni di latte

La costruzione della matrice è sempre la stessa: per ogni stalla (colonne) e per ogni mese (righe) si sono riportati i valori di $\delta^{15}\text{N}$ delle caseine.

L'analisi statistica mostra che i campioni di caseina del latte appartenenti alle diverse stalle sono diversi tra loro: $p \text{ same } 3,69 \cdot 10^{-27}$.

Le stalle che differiscono dalla maggior parte delle altre sono Castelnovo ne' Monti, Guastalla, Pavullo nel Frignano e Magnacavallo. Castelnovo ne' Monti presenta valori isotopici dell'azoto diversi da tutte le altre stalle. Pavullo nel Frignano e Magnacavallo non presentano differenze l'una verso l'altra e nemmeno verso la stalla di Palanzano. Come si nota dal boxplot il loro andamento, insieme alla stalla di Castelnovo ne' Monti, si discosta da quello delle restanti stalle (Figura 4.20).

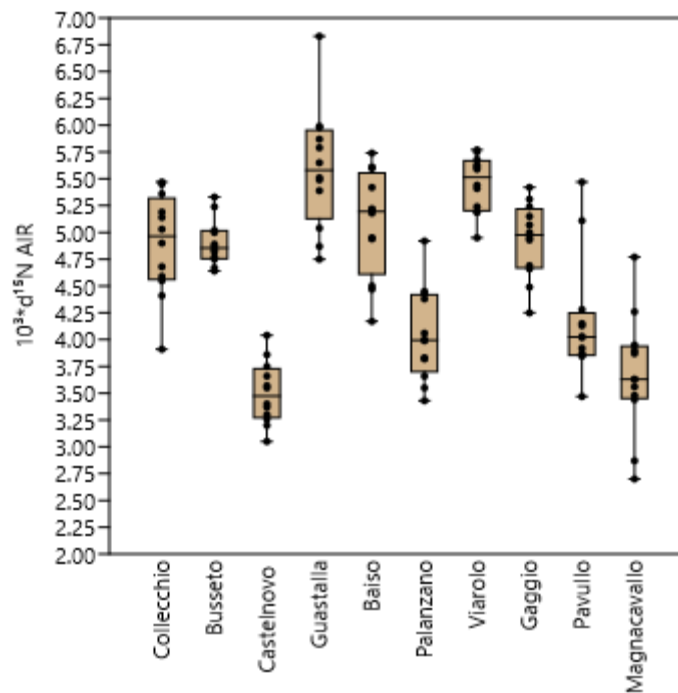


Figura 4.20 - Confronto quantitativo tramite box plot tra le dieci le stalle e i valori isotopici di $\delta^{15}N$ dei campioni di caseina

Ciò che si può affermare, per quanto riguarda l'andamento dei valori della caseina, è che tra le varie stalle esistono già differenze nella dieta che si ripercuotono poi nel latte.

È inoltre possibile raggruppare le stalle in tre gruppi principali con valori medi di caseina statisticamente diversi: i) Collecchio, Busseto, Baiso e Gaggio Montano (valori isotopici intermedi); ii) Guastalla, Baiso, Viarolo (valori più alti); iii) Castelnovo ne' Monti, Palanzano, Pavullo, Magnacavallo (valori più bassi).

Queste differenze possono essere associate ai diversi trattamenti di concimazione dei campi, quindi alle pratiche di coltivazione di fieno ed erbe impiegati nell'alimentazione delle bovine, e alla diversità nella composizione dei terreni stessi.

4.3.3 Determinazione quantitativa delle componenti della dieta

Partendo dalle due stalle (Guastalla e Gaggio Montano) delle quali sono note le proporzioni della dieta, è stato possibile calcolare il coefficiente di frazionamento isotopico α tra la caseina (CAS) del latte e dieta (D):

$${}^{15/14}\alpha_{\text{CAS-D}} = \frac{{}^{15/14}\delta_{\text{CAS}+1}}{{}^{15/14}\delta_{\text{D}+1}} = 1.00285 \pm 0.00034 \text{ (errore standard della media), } p(\alpha=1) < 0.0001$$

Come per il carbonio, notiamo come il valore di α determinato sia inferiore ai valori presenti in letteratura. La variabilità presente in letteratura è dovuta al fatto che si tratta di valori generici riguardanti tutti i mammiferi, mentre in questo studio è stato calcolato α in riferimento alle bovine da latte.

Successivamente è stato quindi possibile il calcolare il valore di ${}^{15/14}\delta_{\text{D}}$ per i campioni delle altre stalle tenendo conto della frazione di fieno e mangime calcolate con il carbonio. I risultati sono riportati nella Tabella 4.7, in cui sono riportate solo le otto stalle la cui dieta si caratterizza di diversi componenti:

	$10^3 {}^{15/14}\delta_{\text{CAS}}$	$10^3 {}^{15/14}\delta_{\text{D}}$
Collecchio	4.89	2.42
Busseto	4.90	2.54
Castelnovo	3.52	0.60
Baiso	5.09	1.83
Palanzano	4.04	0.90
Viarolo	5.45	2.44
Pavullo	4.18	2.07
Magnacavallo	3.67	1.47

Tabella 4.7 - Determinazione quantitativa delle componenti della dieta per $\delta^{15}\text{N}$

L'incertezza di previsione standard su ${}^{15/14}\delta_{\text{D}}$ è di circa 0.6 ‰ (si rimanda al calcolo visto per il carbonio e descritto nel sotto-capitolo 4.2.3).

4.3.4 Fattore di frazionamento tra i campioni di dieta e caseina del latte $\alpha_{\text{dieta-caseina}}$ per $\delta^{15}\text{N}$

Come per il carbonio, oltre ai dati isotopici dell'azoto ottenuti dal laboratorio dell'Università di Parma, si sono considerati anche i valori riguardanti le due mensilità analizzate presso il laboratorio dell'Istituto Jožef Stefan.

Per ogni stalla e per ogni mese di campionamento sono stati calcolati i fattori di frazionamento $\alpha_{dieta-caseina}$ di $\delta^{15}N$ e riportati nella tabella seguente (Tabella 4.8):

mesi	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Guastalla	Baiso	Palanzano	Viarolo	Gaggio	Pavullo	Magnacavallo
febbraio'18	0,99730	0,99770	0,99750	0,99750	0,99750	0,99700	0,99600	0,99930	0,99580	0,99740
marzo'18	0,99780	0,99740	0,99620	0,99650	0,99680	0,99650	0,99740	0,99880	0,99740	0,99740
aprile'18	0,99690	0,99710	0,99710	0,99650	0,99750	0,99650	0,99770	0,99770	0,99750	0,99990
maggio'18	0,99830	0,99750	0,99660	0,99600	0,99800	0,99730	0,99790	0,99750	0,99920	0,99750
giugno'18	0,99570	0,99830	0,99740	0,99550	0,99680	0,99610	0,99630	0,99610	0,99800	1,00080
luglio'18	0,99710	0,99820	0,99610	0,99810	0,99750	0,99710	0,99640	0,99730	0,99870	1,00010
agosto'18	0,99750	0,99730	0,99770	0,99770	1,00180	0,99910	0,99870	0,99820	0,99890	1,00090
settembre'18	0,99820	0,99790	0,99500	0,99570	0,99730	0,99700	0,99660	0,99680	0,99850	0,99970
ottobre'18	0,99740	0,99720	0,99710	0,99790	0,99850	0,99660	0,99670	0,99770	0,99820	0,99710
novembre'18	0,99690	0,99670	1,00160	0,99640	0,99720	0,99780	0,99610	0,99730	0,99810	0,99820
dicembre'18	0,99690	0,99850	0,99570	0,99490	0,99650	0,99760	0,99730	0,99730	0,99780	0,99730
gennaio'19	0,99710	0,99800	0,99750	0,99820	0,99800	0,99770	0,99810	0,99930	0,99890	1,00010

Tabella 4.8 – Fattori di frazionamento $\alpha_{dieta-caseina}$ per $\delta^{15}N$ mensili calcolati con media e deviazione standard delle dieci stalle

Per tutte le stalle, ad eccezione di Magnacavallo, nel calcolo sono stati considerati tutti i contributi di ogni categoria di dieta incluse nell'alimentazione. Per quanto riguarda la stalla di Magnacavallo invece si è deciso di considerare i contributi delle tre farine (soia, orzo e mais) associando ad ognuna di essa il valore di 1/3 come “peso” nella componente del mangime e la medica, senza tenere conto di fieno, maggese ed erba, vista la scarsità di dati in possesso.

4.4 Confronto tra i campioni di dieta e di latte

In base ai dati ottenuti dalle precedenti elaborazioni statistiche svolte per $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ sono state costruite delle matrici di confronto tra le stalle suddivise per tipologia di dieta e frazioni del latte (caseina per $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ e grasso per $\delta^{13}C$). Si rimanda alla sezione “Appendice 6” per un ulteriore approfondimento.

Anche per questa elaborazione si sono considerati unicamente i valori isotopici di carbonio e azoto di dieta e latte analizzati presso il Laboratorio dell'Università di Parma.

Queste matrici di dieta e latte sono state poi messe a confronto per capire se e quali delle stalle studiate mostrano differenze nelle stesse categorie di dieta e/o frazioni del latte per entrambi gli isotopi. Si riportano qui i risultati ottenuti.

In generale, quello che si può affermare per entrambi gli isotopi ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) è che il maggior numero di differenze tra stalle si riscontra nel latte più che nella dieta o nel confronto di dieta e latte.

Facendo un'analisi più dettagliata, e andando a vedere se permangono le stesse differenze riscontrate, e cioè se una stalla differisce solo per carbonio o solo per azoto oppure per entrambi, si è arrivati alle seguenti conclusioni:

1. le stalle tra quelle studiate che presentano differenze comuni nella dieta e nel latte per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sono Palanzano e Collecchio. Queste differenze riguardano i campioni di mangime e caseina;
2. per quanto concerne la dieta, le coppie di stalle che presentano differenze comuni per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sono:
 - ✓ Collecchio e Baiso nel fieno,
 - ✓ Collecchio e Viarolo nei fiocchi;
3. le stalle che hanno mostrato differenze simili nei campioni di caseina per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sono riportate nella tabella sottostante (Tabella 4.9), dove la lettera "X" indica che le stalle messe a confronto differiscono sia per $\delta^{13}\text{C}$ e sia per $\delta^{15}\text{N}$ della caseina:

Stalle	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Guastalla	Baiso	Palanzano	Viarolo	Gaggio	Pavullo	Magnacavallo
Collecchio			X	X		X				X
Busseto			X	X		X				X
Castelnovo				X	X			X	X	
Guastalla						X		X		X
Baiso						X				X
Palanzano							X	X		
Viarolo									X	X
Gaggio									X	
Pavullo										
Magnacavallo										

Tabella 4.9 - Confronto tra le dieci stalle per la caseina per entrambi gli isotopi di carbonio e azoto. Dove, X= le stalle confrontate differiscono per la caseina sia per $\delta^{13}\text{C}$ che per $\delta^{15}\text{N}$

In conclusione, si può dire che ciò che in realtà ci saremo aspettati di vedere erano differenze più marcate tra l'unica stalla BIO e le altre stalle, sia nel contributo iniziale della dieta che in quello finale del latte, ma, come si può vedere della tabella soprastante, Palanzano risulta differente nella caseina da sei stalle (Collecchio, Busseto, Guastalla, Baiso, Viarolo e Gaggio Montano) ma non da tutte. Questo fatto può indicare due cose: che vi sia incidenza del mangime (che, come si evince dal Disciplinare, non è rigidamente normato) o che il carattere Bio di una stalla non sia rilevabile dai rapporti isotopici misurati.

La stalla di Magnacavallo per la caseina non è diversa da Castelnovo nè Monti, Palanzano, Gaggio Montano e Pavullo nel Frignano. Per le ultime tre stalle elencate, questo può trovare spiegazione nel

fatto che l'allevatore della stalla di Magnacavallo fornisce un elevato contributo di piante C4 e quindi a sua volta si può dedurre che anche queste ultime tre stalle risentano di un grande contributo di C4 nella dieta stessa.

Riassumendo, le stalle che non presentano differenze statisticamente significative nei valori isotopici della caseina contemporaneamente per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sono tre: Collecchio, Busseto e Baiso. Tutte le altre si differenziano dalle tre citate e fra di loro o per il valore del carbonio o per quello dell'azoto.

4.5 Analisi isotopiche di $\delta^{34}\text{S}$

Vengono presentati i valori isotopici di zolfo dei campioni di dieta e della frazione proteica del latte (caseina) appartenenti alle due mensilità (agosto 2018 e gennaio 2019) delle dieci stalle studiate. La riproducibilità delle misurazioni di $10^3 \delta^{34}\text{S}$ è pari a $\pm 0,3\%$.

I valori misurati nella caseina variano da -0,8 a 3,9 e non c'è differenza statisticamente significativa tra i campioni di agosto e di gennaio ad eccezione di quelli di Baiso. Nella figura 4.21 le stalle sono ordinate per valori crescenti di $\delta^{34}\text{S}$ per poterli confrontare meglio con i valori misurati nel fieno e nel mangime.

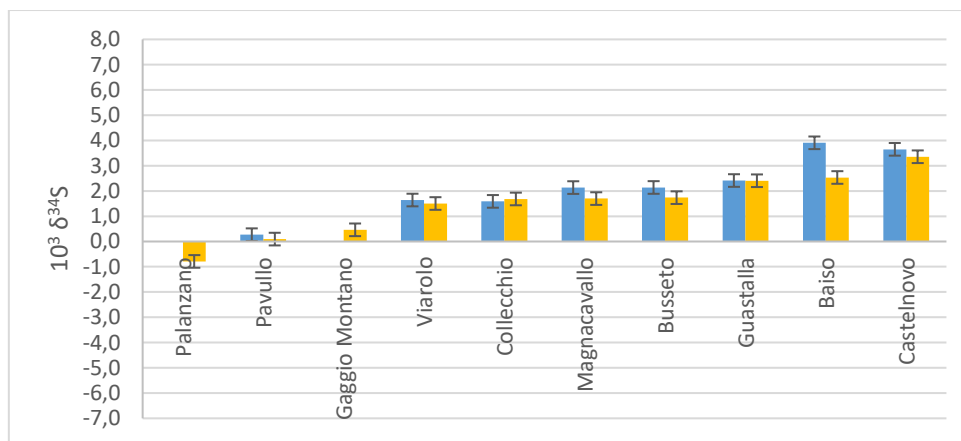


Figura 4.21 – Andamento dei valori di $10^3 \delta^{34}\text{S}$ della caseina. In blu i valori di agosto 2018 e in giallo quelli di gennaio 2019. In cima alle colonne è riportata la barra d'errore

Il latte delle stalle di Palanzano, Pavullo e Gaggio presentano i valori più bassi ($< 0,5 \%$), ciò trova corrispondenza nei bassi valori riscontrati nel fieno (da -4,2 a 2,4) utilizzato dalle tre stalle e anche nei valori dell'*unifeed* per la stalla di Gaggio (Figura 4.22).

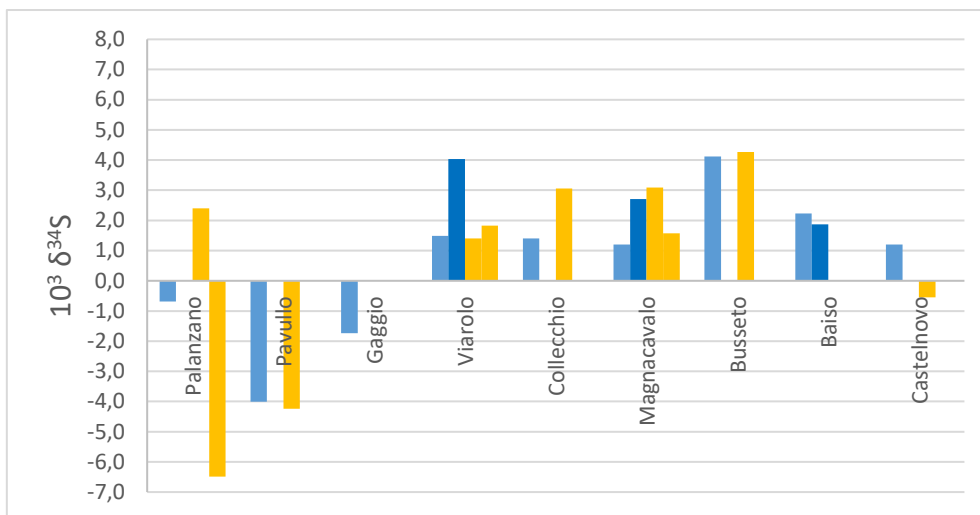


Figura 4.22 - Andamento dei valori di $10^3 \delta^{34}S$ del fieno/erba/medica/maggese. L'ordine delle stalle riprende quello della figura 4.21

Viarolo, Collecchio e Magnacavallo presentano valori di $10^3 \delta^{34}S$ variabili per il fieno (da 1,2 a 4,0). Il valore della caseina cade all'interno dell'intervallo di variazione del fieno/erba per le singole stalle. Per le altre quattro stalle, il valore del fieno/*unifeed* è più basso o più alto di quello della caseina.

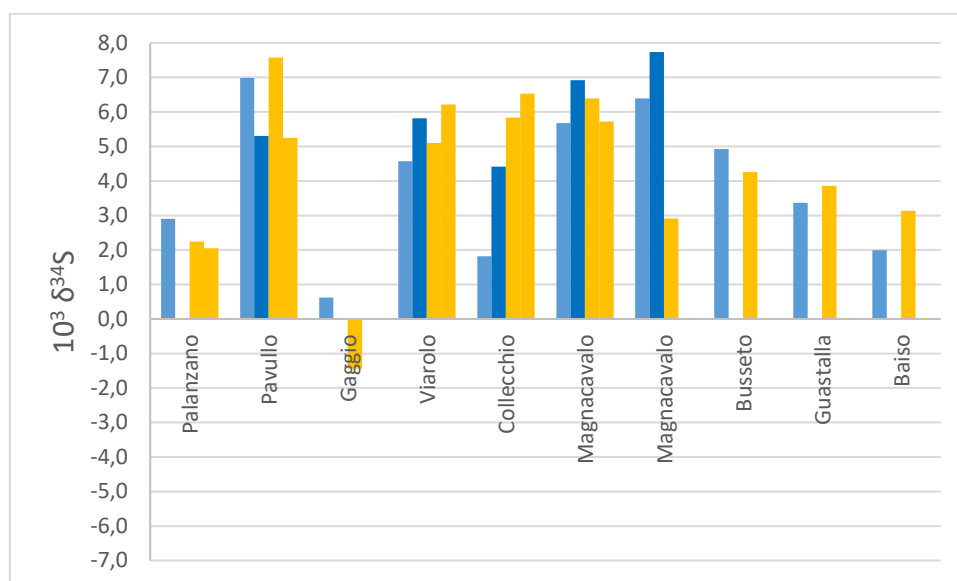


Figura 4.23 - Andamento dei valori di $10^3 \delta^{34}S$ del mangime/fiocchi. L'ordine delle stalle riprende quello della figura 4.21. Per Gaggio e Guastalla i valori si riferiscono all'*unifeed*

Il mangime, in genere, presenta sempre valori decisamente più alti rispetto alla caseina (Figura 4.23). Non sembra possibile da questi dati trovare una regola che valga per tutte le dieci stalle; ciò, probabilmente, dipende dal fatto che il campionamento di soli due mesi non è sufficiente per capire quale componente della dieta sia più importante e se si verifichi un frazionamento isotopico fra dieta

e latte. In generale, si può solo dire che i valori di $10^3 \delta^{34}\text{S}$ della caseina sono più vicini a quelli del fieno piuttosto che a quelli del mangime/fiocchi e che, quindi, sia la componente fieno che controlla il valore della caseina. Ci sono anche delle differenze nei valori di $10^3 \delta^{34}\text{S}$ della caseina nelle diverse stalle; ciò dipende, probabilmente, da un diverso valore di $10^3 \delta^{34}\text{S}$ nel terreno. Quest'ultimo può essere il risultato di pratiche agricole diversificate o di caratteristiche isotopiche originarie del terreno.

4.6 Rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$

Vengono qui presentati i valori medi dei due mesi studiati (agosto 2018 + gennaio 2019) del rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e di concentrazione, espressi in ng/g per i campioni di dieta e di latte e in $\mu\text{g}/\text{L}$ per i campioni di acqua ingerita dalle bovine, delle dieci stalle studiate.

Incertezza sulle misure: ± 0.00004 (2s).

Commenti sugli isotopi dello stronzio

Consideriamo i valori isotopici di Sr nell'acqua bevuta dagli animali (x_1), nel fieno (x_2) e nel mangime (x_3) da essi ingeriti in relazione al valore isotopico del latte (y). La relazione lineare del tipo

$$y = B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_3 x_3 + A$$

ottenuta utilizzando valori medi ottenuti per le diverse stalle, è la seguente:

$$^{87/86}\text{Sr}_{\text{latte}} = 0.192 (\pm 0.073) ^{87/86}\text{Sr}_{\text{acqua}} + 0.759 (\pm 0.365) ^{87/86}\text{Sr}_{\text{fieno}} + 0.191 (\pm 0.090) ^{87/86}\text{Sr}_{\text{mangime}} + 0.100 (\pm 0.259)$$

con

$$R^2 = 0.884, s(yx) = 0.000122,$$

$$p(B_1=0) = 0.077, p(B_2=0) = 0.129, p(B_3=0) = 0.125, p(A=0) = 0.724.$$

1) Il valore $R^2 = 0.88$ indica che l'88% della variabilità del valore $^{87/86}\text{Sr}_{\text{latte}}$ è spiegata da $^{87/86}\text{Sr}_{\text{acqua}}$, $^{87/86}\text{Sr}_{\text{fieno}}$ e $^{87/86}\text{Sr}_{\text{mangime}}$.

2) A livello di significatività $\alpha = 0.05$, i parametri B e A sono tutti significativamente diversi da zero.

3) I valori di B_1 e B_3 sono simili, mentre il valore B_2 è molto più elevato.

Si può affermare, pertanto, che i valori isotopici del latte sono determinati soprattutto dal fieno. Infatti, i valori dello Sr totale nel fieno sono più alti di quelli nel mangime e nell'acqua.

I rapporti isotopici (Marchina et al 2018) delle acque del fiume Po giacciono nell'intervallo approssimato 0.708923-0.70975, valori compresi tra quelli minimi dei complessi metamorfici alpini e massimi delle piattaforme carbonatiche Mesozoiche sud-alpine. Gli affluenti del Po invece

presentano una distribuzione più complessa: Pellice e Sesia con $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} > 0.7097$, Adda, Scrivia, Tanaro, Ticino, Lambro e Panaro con $0.7089 < ^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} < 0.7097$, e Dora Baltea, Trebbia, Taro, Oglio, Mincio e Secchia con $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} < 0.7089$. In particolare, il Secchia è ricco in Sr (1117 $\mu\text{g}/\text{L}$) in quanto le sue acque interagiscono con le rocce evaporitiche Triassiche (il gesso e l'anidrite sono molto solubili e hanno alti contenuti in Sr, dell'ordine di grandezza delle migliaia di ppm).

La massima parte delle acque utilizzate nelle diverse stalle studiate hanno valori isotopici compresi tra 0.7081 e 0.7089; soltanto le stalle di Pavullo e di Magnacavallo hanno valori più elevati, ≈ 0.70968 . In particolare, il valore a Magnacavallo non è lontano da quello attuale del Panaro (0.7095), ma decisamente più elevato rispetto a quello del Po a Revere (≈ 0.7090); d'altro canto, il valore isotopico dell'ossigeno è molto basso (-11,33) ciò che indica una provenienza o, al limite, una dominanza alpina piuttosto che Appenninica (Martinelli et al 2014). A Pavullo, i valori sono pure piuttosto elevati, ciò che non è di facile spiegazione. Considerato che anche il Panaro è caratterizzato da elevati valori pur essendo un fiume appenninico, si può ipotizzare un significativo ruolo di minerali argillosi presenti nelle rocce con cui le acque interagiscono. Infatti, i minerali argillosi nel tempo acquisiscono più rapidamente di altri elevati valori $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in quanto caratterizzati da elevati contenuti in Rb e bassi in Sr.

Gli *unifeed* delle due stalle (Guastalla e Gaggio Montano) presentano differenze sia nel valore isotopico e sia come stronzio totale.

Per i campioni di latte, ad eccezione di tre stalle, complessivamente non vi sono marcate differenze per il valore $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$. Il rapporto $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ nel latte esprime quello del cibo+acqua che l'animale ingerisce; quindi, si può affermare che le bovine di sette delle dieci stalle campionate mangiano e bevano sostanze isotopicamente simili. Le tre stalle che presentano valori più alti sono quelle ubicate a Guastalla, Gaggio Montano e Magnacavallo.

La stalla di Guastalla, collocata in pianura e non molto lontana dal fiume Po, ha a disposizione un pozzo (profondità pozzo 120m) la cui acqua viene utilizzata per abbeverare gli animali. Il valore del latte potrebbe trovare spiegazione con l'eventuale presenza di sedimenti di origine alpina caratterizzati da alti rapporti isotopici.

Per quanto riguarda Magnacavallo, come spiegato in precedenza, si può supporre che questo valore sia in stretta connessione con i sedimenti del fiume stesso (sedimenti alpini che derivano da rocce contenenti silicati con alto rapporto isotopico).

Anche l'alto valore $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ della stalla di Gaggio Montano, località vicino alla quale scorre il fiume Panaro, può essere connesso al fatto che in quella zona si ritrovano probabilmente rocce con rapporti isotopici alti.

Siccome gli isotopi dello stronzio non subiscono fenomeni di frazionamento lungo la catena alimentare, il rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ può essere considerato un buon tracciante per la provenienza.

Le differenze ritrovate nei valori del rapporto isotopico devono essere collegate alle caratteristiche isotopiche dei terreni.

Il contenuto dello stronzio nelle piante è variabile, in quanto le varie parti di cui una pianta si compone possono avere concentrazioni differenti dell'elemento stesso. In quantità assolute di massa, la maggior parte del Ca (Sr) è contenuta nelle foglie, seguono poi le parti legnose.

La quantità di Sr disponibile per una pianta che cresce su un determinato suolo è data dalla sommatoria di numerose sorgenti: stronzio presente nel suolo e trasportato in fase acquosa; i fertilizzanti (contenuto di stronzio nei fertilizzanti fosfatici 10-1000 ppm) (Hosono et al., 2007), considerati come i migliori candidati nella modificazione della composizione del suolo; infine, aerosol e deposizione secca.

Nel caso in cui la composizione isotopica dei foraggi differisse da quella riscontrata nei suoli locali, è ragionevole ritenere che tale differenza sia dovuta all'assorbimento di due sorgenti, naturale e antropica.

Nel presente studio però, come già riportato, non si è tenuto conto del contributo di questi fattori. Ciò che comunque si può affermare è che in base ai valori ottenuti, le mucche oltre che dall'acqua e dal cibo acquisiscono stronzio anche da altre fonti.

4.7 Analisi elementare con EDXRF

L'obiettivo principale del presente lavoro consiste nella misura della concentrazione degli elementi nel latte. Gli stessi elementi sono stati investigati anche nella dieta in modo tale da valutare se e come la concentrazione ritrovata nel latte sia correlata a quella determinata nel cibo e quindi valutare il controllo del trasporto degli elementi lungo la catena suolo - dieta ingerita - latte prodotto, partendo dal suolo stesso nel quale le piante vengono coltivate.

Dieta

Per quanto riguarda la dieta, si sono fatte distinzioni per quanto concerne la componente fieno, la componente mangime (all'interno della quale ritroviamo le farine che la stalla Magnacavallo fornisce) e le uniche due stalle di Guastalla e Gaggio Montano che utilizzano l'*unifeed* come alimento somministrato alle bovine.

➤ *Fieno*

Nei campioni di fieno di tutte le stalle i valori massimo e minimo medi di concentrazione degli elementi studiati nei due mesi sono i seguenti (Tabella 4.10):

Elemento	Valore massimo	Valore minimo
P	3,93 g/kg	1,59 g/kg
S	3,51 g/kg	1,26 g/kg
Cl	7,57 g/kg	2,83 g/kg
K	36,95 g/kg	17,15 g/kg
Ca	13,90 g/kg	5,70 g/kg
Zn	43,50 µg/kg	17,80 µg/kg
Br	17,04 µg/kg	1,96 µg/kg
Rb	16,52 µg/kg	7,93 µg/kg
Sr	156,00 µg/kg	34,55 µg/kg

Tabella 4.10 – Valori massimi e minimi degli elementi (macro-elementi in g/k e microelementi in µg/kg) per i campioni di fieno di tutte le stalle

Per quanto riguarda i macro-elementi l'elemento più abbondante è il K, segue il Ca. Tra gli elementi in traccia è lo Sr il più concentrato, seguito dello Zn.

➤ *Mangime*

Nei campioni di mangime di tutte le stalle i valori massimo e minimo medi di concentrazione degli elementi studiati nei due mesi sono i seguenti (Tabella 4.11):

Elemento	Valore massimo	Valore minimo
P	4,84 g/kg	3,89 g/kg
S	1,97 g/kg	1,11 g/kg
Cl	4,97 g/kg	1,36 g/kg
K	10,30 g/kg	6,62 g/kg
Ca	13,90 g/kg	1,39 g/kg
Zn	152,00 µg/kg	34,98 µg/kg
Br	19,53 µg/kg	4,00 µg/kg
Rb	16,26 µg/kg	4,69 µg/kg
Sr	27,80 µg/kg	7,18 µg/kg

Tabella 4.11 – Valori massimi e minimi degli elementi (macro-elementi in g/k e microelementi in µg/kg) per i campioni di mangime di tutte le stalle

Per quanto riguarda i macro-elementi, come per il fieno, gli elementi più abbondanti sono il K e il Ca. Tra gli elementi in traccia è lo Zn il più concentrato, seguito da Sr.

Per quanto riguarda la stalla Magnacavallo che fornisce il mangime sottoforma di farine (mais, orzo e soia), alla soia appartengono le più alte concentrazioni degli elementi P, S, K, Ca, Zn, Rb e Sr, mentre è l'orzo che ha i valori maggiori di Cl e Br.

➤ *Unifeed*

Per quanto riguarda l'*unifeed*, le stalle Guastalla e Gaggio Montano presentano valori medi simili di concentrazione degli elementi (le deviazioni standard sono piccole, dell'ordine di $\pm 0,99$), ad eccezione degli elementi quali Zn e Sr dove è la prima delle due stalle a presentare valori medi di molto superiori (deviazioni standard: $\pm 27,4$ per Zn e $\pm 8,04$ per Sr).

Nella dieta delle bovine da latte i livelli ottimali di alcuni elementi sono: 4,0 g/kg di sostanza secca DM di P, 5,0 g/kg DM di Ca, 2,0 g/kg DM di Mg e 1,5 g/kg DM di Na (Owen e Larson 1991). In questo studio è possibile confrontare solo Ca e P, in quanto Na non è tra gli elementi analizzati. È stato riscontrato che il fieno e il mangime hanno livelli ottimali in termini di macro-elementi come Ca e P (in media 9,0 g/kg DM di Ca nel fieno e 7,5 g/kg DM di Ca nel mangime; 2,5 g/kg di P nel fieno e 4,4 g/kg di P nel mangime). Ca presenta valori di concentrazioni di poco superiori sia nel fieno che nel mangime rispetto alla letteratura, mentre il contenuto di P nel fieno è molto vicino al risultato ottenuto da Owen e Larson, indici quindi di una buona qualità dei prodotti usati nella dieta.

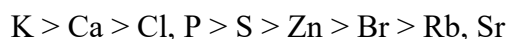
Per quanto riguarda la successione della concentrazione degli elementi maggiori, la successione di abbondanza nei campioni di latte (riportata successivamente) è la stessa anche per il fieno e, in genere, anche per il mangime; mentre per gli elementi in tracce la successione risulta essere:

$Sr > Zn > Rb > Br$ per il fieno,

$Zn > Sr > Rb \geq Br$ per il mangime e *unifeed*.

Latte

La composizione elementare nei campioni di latte segue la seguente scala di concentrazione:



Nessuna differenza statistica è stata rilevata nella composizione elementare tra le differenti stalle.

Nella Tabella 4.12 sono riportati i range di concentrazione in mg/100g per gli elementi maggiori e in µg/100g per gli elementi in tracce, riscontrati nei campioni di latte di tutte le dieci stalle studiate.

Elementi	Campioni
mg/100g	
Ca	100-118
P	77-98
K	122-173
Cl	68-109
S	24-28
µg/100g	
Sr	61-119
Zn	356-458
Br	88-465
Rb	75-180

Tabella 4.12 – Range di concentrazione degli elementi (macroelementi in mg/100g e microelementi in µg/100g) nei campioni di latte delle dieci stalle studiate

I dati presentati sono in accordo con la maggior parte dei dati di letteratura (Potocnik et al. Food Chemistry 2020). I campioni di latte mostrano concentrazioni maggiori per Br e Rb, inferiori per Sr se comparati ai dati presenti in letteratura.

Alla stalla Collecchio appartengono i valori maggiori per gli elementi Cl, K e Ca. La stalla Guastalla ha la maggiore concentrazione di P. La stalla Palanzano presenta concentrazioni più alte per S e Zn; la stalla Busseto ha la più alta concentrazione di Rb e la stalla Magnacavallo degli elementi Br e Sr nel latte.

4.7.1 Analisi di correlazione tra latte e dieta

È noto che la dieta influenza le concentrazioni di elementi nel latte. Sono stati qui applicati diversi approcci chemiometrici per valutare l'associazione tra i profili di fieno/mangime e latte.

Come prima cosa è stata applicata l'*analisi della correlazione canonica (CCA)*, i cui risultati sono presentati nelle Figure 4.24 e 4.25.

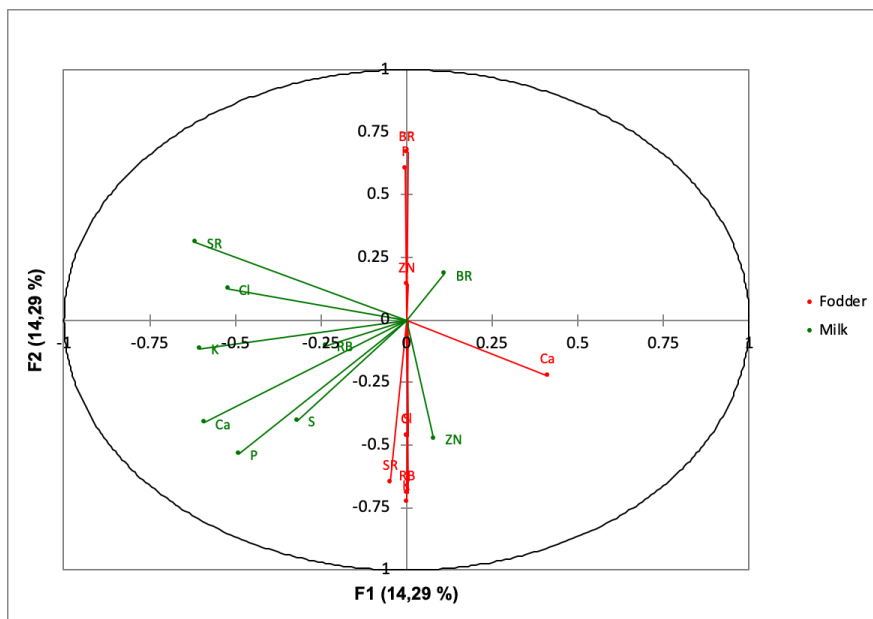


Figura 4.24 - Le variabili canoniche mostrano la correlazione tra i campioni di latte e mangime delle stalle

Nella Figura 4.24 sono riportati in rosso gli elementi per il mangime e in verde gli stessi elementi per il latte. Come si nota dal grafico, non è stata osservata alcuna correlazione nella composizione elementare tra mangime e latte (gli stessi elementi, per entrambe le matrici studiate, non si ritrovano nella stessa parte di grafico) e quindi si può assumere che gli elementi presenti nel latte non provengano dal mangime.

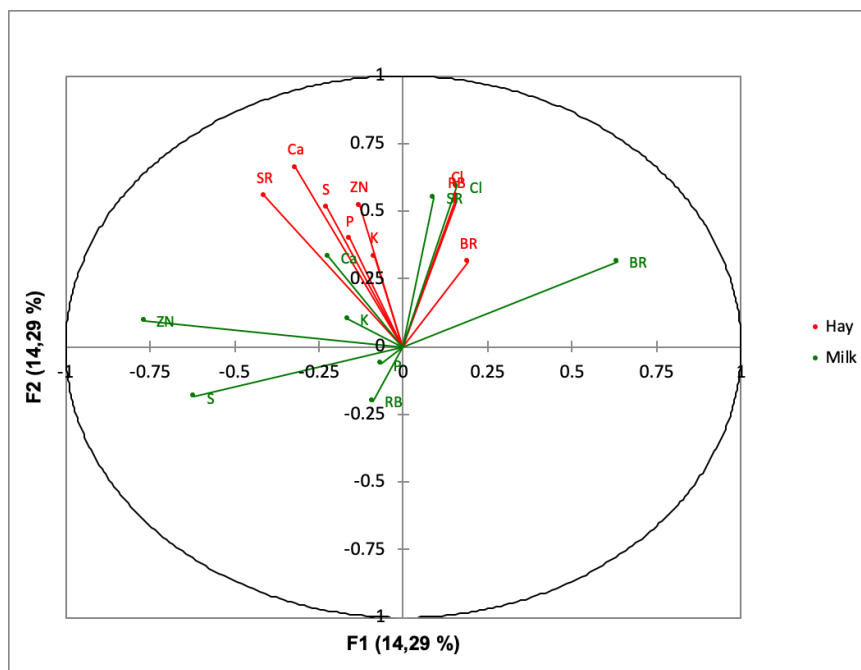


Figura 4.25 - Le variabili canoniche mostrano la correlazione tra i campioni di latte e fieno delle stalle

Nella Figura 4.25 sono riportati in rosso gli elementi per il fieno e in verde gli stessi elementi per la dieta. Gli elementi Ca, Cl, Br, K e Zn mostrano una buona correlazione tra fieno e latte indicando un possibile trasferimento dalla dieta al latte stesso.

Successivamente, sono stati considerati un set di dati della composizione elementare media (P, S, Cl, K, Ca, Zn, Br, Rb, Sr) di dieci campioni di latte (Figura 4.26 - triangoli verdi) e otto campioni di fieno (Figura 4.26 – cerchi rossi), raccolti due volte l’anno (una in agosto 2018 e una in gennaio 2019) nelle dieci località (indicate con le lettere dell’alfabeto A - L). Questi dati sono stati sottoposti all’*analisi multivariata delle componenti principali (PCA)*.

Alla stessa analisi PC sono stati sottoposti i dieci campioni di latte (Figura 4.27 - triangoli verdi) e sei campioni di mangime (Figura 4.27 – cerchi viola), raccolti due volte l’anno (una in agosto 2018 e una in gennaio 2019) nelle dieci località (A - L).

L’analisi PCA è stata applicata per indagare le relazioni tra la composizione elementare di latte e di fieno/mangime e su questa base di correlazione, la possibile indicazione del trasferimento di alcuni elementi dal cibo al latte prodotto.

I dati sono stati normalizzati sottraendo la loro media e poi divisi per la loro deviazione standard. I contributi relativi dei vari elementi alle differenze complessive tra latte e fieno sono stati esaminati in grafici vettoriali.

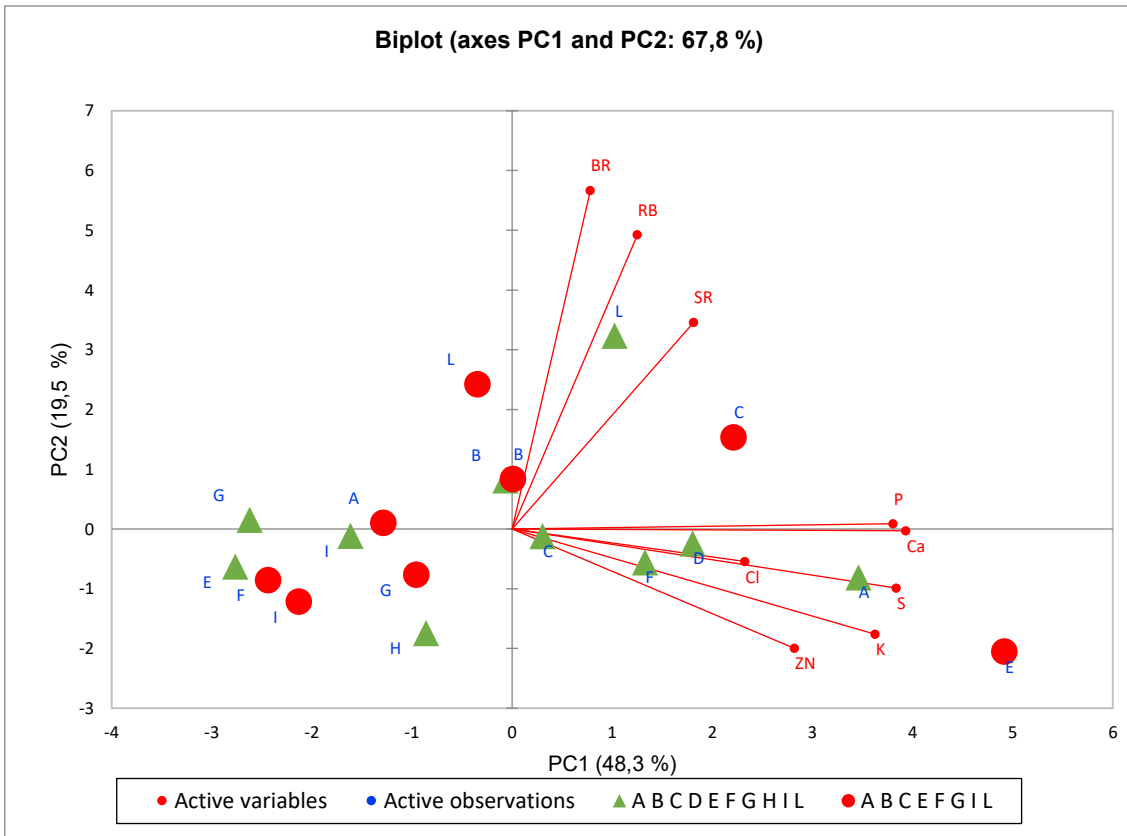


Figura 4.26 - Risultati dell'analisi PC visualizzati come biplot dei punteggi dei fattori (campioni di latte e fieno) e dei carichi (P, S, Cl, K, Ca, Zn, Br, Rb, Sr) nello spazio del primo e del secondo asse PC. Le lettere rappresentano le stalle

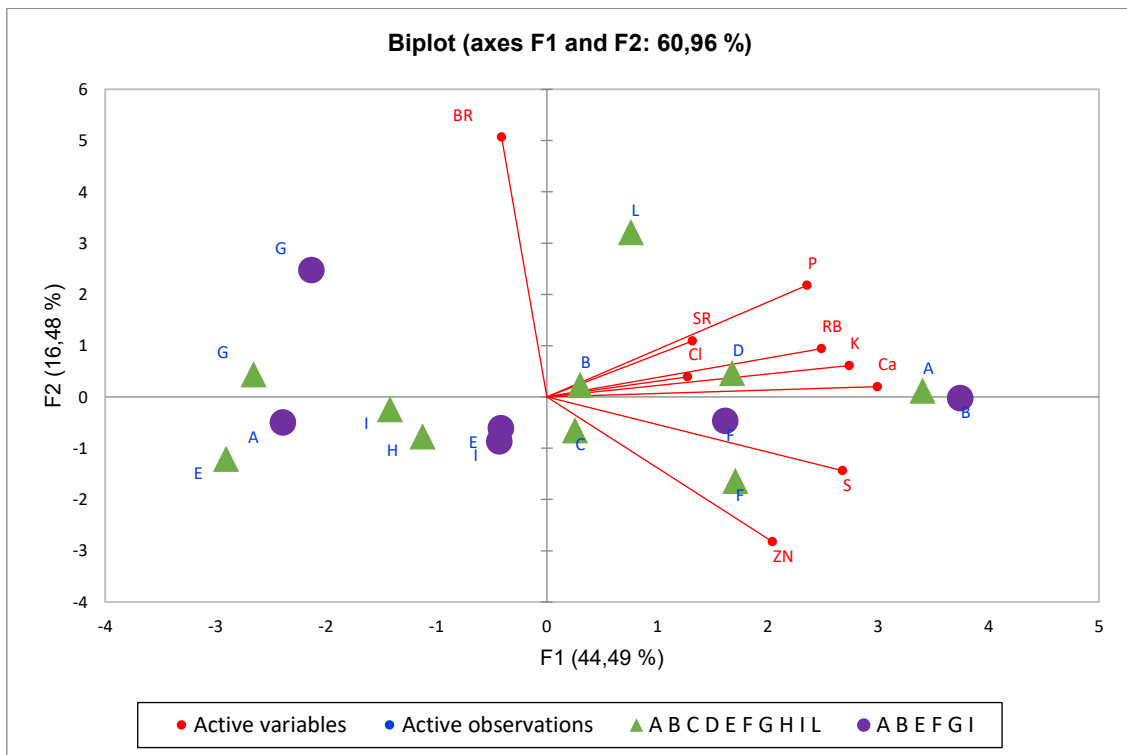


Figura 4.27 - Risultati dell'analisi PC visualizzati come biplot dei punteggi dei fattori (campioni di latte e mangime) e dei carichi (P, S, Cl, K, Ca, Zn, Br, Rb, Sr) nello spazio del primo e del secondo asse PC. Le lettere rappresentano le stalle

I risultati delle Figure 4.26 e 4.27 si trovano nella Tabella 4.13, nella quale sono riportate le correlazioni tra i campioni di latte con campioni di fieno e mangime presenti in alcune stalle e l'indicazione di alcuni elementi che è possibile vengano trasferiti dalla dieta animale (mucca) al latte.

Latte (località)	Tipo di dieta	Intensità della correlazione	Vettori di elementi
B - Busseto	fieno	forte	Br, Rb
C - Castelnovo ne' Monti	fieno	forte	P, Ca
E - Baiso	mangime	debole	Ca, S
F - Palanzano	mangime	forte	S, Zn
G - Viarolo	mangime	forte	Br
I - Pavullo nel Frignano	fieno, mangime	forte	P, Ca
L - Magnacavallo	fieno	forte	Br, Rb

Tabella 4.13 – Risultati delle correlazioni tra latte e dieta nelle diverse stalle.

Esaminiamo ora nel dettaglio la tabella sopra riportata:

- la stalla di Busseto presenta una forte correlazione tra il fieno e il latte per quanto riguarda gli elementi Br e Rb. Si può quindi affermare che il fieno sia la fonte di queste due elementi ritrovati nel latte;
- la stalla di Castelnovo ne' Monti presenta una forte correlazione tra il fieno (unica componente della dieta) e il latte per quanto riguarda gli elementi P e Ca. Come per la stalla precedente, si può quindi affermare che il fieno sia fonte di queste due elementi ritrovati nel latte;
- la stalla di Baiso presenta una debole correlazione tra il mangime e il latte per quanto riguarda gli elementi Ca e S. I valori di questi elementi nel latte sono debolmente influenzati dai loro stessi contenuti rilevati nel mangime, ad indicare quindi che i valori che si ritrovano nel prodotto animale non risentono del mangime;
- la stalla di Palanzano presenta una forte correlazione tra il mangime e il latte per quanto riguarda gli elementi Zn e S. Il valore di questi due elementi nel latte è quindi influenzato dai corrispondenti valori che si ritrovano nel mangime. Ad esempio, nel caso di Zn la più alta concentrazione nella dieta si ha proprio nella componente mangime;
- la stalla di Viarolo presenta una forte correlazione tra il mangime e il latte per quanto riguarda l'elemento Br;

- la stalla di Pavullo nel Frignano presenta una forte correlazione che riguarda sia il fieno e sia il mangime verso il latte per gli elementi P e Ca. P e Ca nel latte sono quindi correlati da P e Ca presenti sia nel fieno che nel mangime;
- la stalla di Magnacavallo presenta una forte correlazione tra il fieno e il latte per quanto riguarda gli elementi Br e Rb.

In generale, in base a quanto ottenuto, si può affermare che gli elementi più importanti che nel fieno vengono poi trasportati nel latte sono P, Ca, Br e Rb; mentre nel caso del mangime abbiamo S, Zn e poi P, Ca e Br come nel fieno.

Nel caso specifico, soprattutto il Ca e poi Br, Rb, P e S sono gli elementi che vengono trasferiti per la maggiore dalle varie frazioni della dieta animale al prodotto finito (latte bovino).

Gli elementi quali Sr e Rb sono connessi alla litologia del luogo. In alcuni casi è visibile la sola impronta digitale di Rb nel trasporto dalla dieta (fieno) al latte.

Sono stati valutati anche i rapporti K/Rb e Ca/Sr come traccianti degli elementi dalla dieta al latte (Griboff et al., 2019). I dati presentati nei boxplot della Figura 4.28 indicano che esiste una corrispondenza tra dieta e latte nel rapporto K/Rb, ma non nel caso del rapporto Ca/Sr. Ciò supporta la nostra precedente ipotesi che il Ca ottenuto dalla dieta potrebbe essere utilizzato in altri processi metabolici delle bovine.

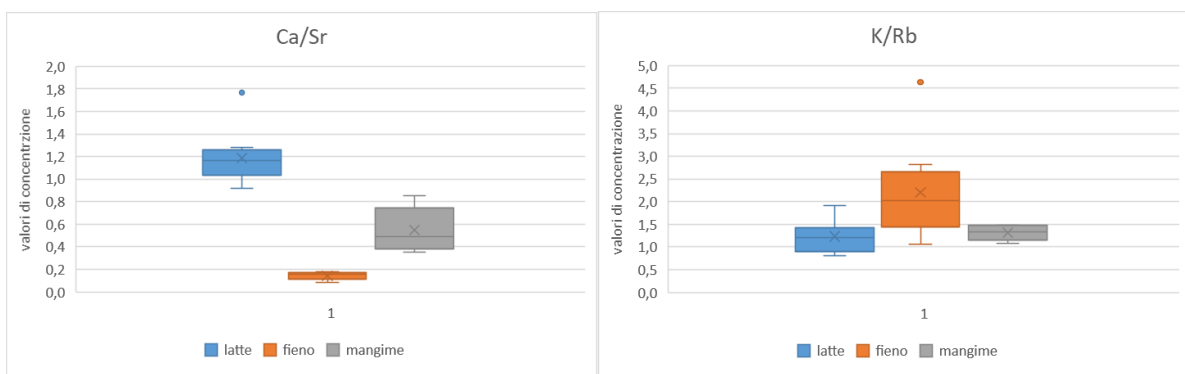


Figura 4.28 – Rapporti K/Rb e Ca/Sr nel latte e nel fieno/mangime determinati per tutte le stalle

Le correlazioni viste (latte vs fieno e latte vs mangime) sono legate ai valori di concentrazione nelle matrici studiate: in linea di massima le alte concentrazioni che si ritrovano nel fieno/mangime sono indice di fonte del valore che si ritroverà nel latte (correlazione forte), vice versa nel caso di concentrazioni basse (correlazione debole).

Confronto con i dati di altri lavori

Se consideriamo il lavoro presentato da Ren-ju et al., 2015 notiamo le stesse relazioni, per gli elementi comuni a questa tesi di dottorato, ovvero la presenza di una correlazione significativa di Ca tra dieta e campioni di latte e di una correlazione estremamente significativa di Zn tra la dieta e il latte.

Inoltre, sempre nello studio di Ren-ju et al., 2015 la determinazione e l'analisi della relazione tra la dieta e il latte hanno mostrato come i contenuti degli elementi benefici nel latte potrebbero essere influenzati dalla dieta: nel caso specifico di Ca e Zn sono influenzati principalmente dal foraggio. Se prendiamo in esame i risultati ottenuti in questa tesi di dottorato per questi stessi elementi, si può affermare che il contenuto di Ca nel latte trova una forte correlazione sia con il fieno che con il mangime; mentre Zn nel latte mostra una forte correlazione con il contenuto dello stesso elemento nel mangime, come dimostra l'alto valore di concentrazione ritrovato in questa categoria di dieta. Quest'ultimo fatto quindi non trova pienamente riscontro con quanto dimostrato da Ren-ju et al., 2015 dove viene indicato un utilizzo maggiore di Ca e Zn nel foraggio rispetto al mangime.

Nello studio di Zhou et al., 2017 viene impiegata come tecnica di misura quella dell'ICP-MS, una metodica differente da quella presentata in questa tesi di dottorato, e quindi non risulta possibile comparare i valori degli elementi. Comunque, in linea generale, confrontando le concentrazioni medie (millig/kg) degli elementi Zn, Rb e Sr del suddetto studio, esse risultano molto diverse da quelle trovate in questa tesi di dottorato.

Dal lavoro di Pšenková et al., del 2020 se si mettono a confronto le quantità medie degli elementi quali Ca e Zn rilevate nella dieta con quelle presentate in questa tesi di dottorato (considerando in maniera distinta le tre componenti: fieno, mangime e *unifeed*) si vede come:

1. la concentrazione media (mg/kg) di Ca di questa tesi di dottorato risulta in alcuni casi molto superiore a quella rilevata nelle due località della Repubblica Slovacca in entrambe le stagioni;
2. la concentrazione media di Zn (mg/kg) di questa tesi di dottorato risulta essere molto inferiore a quelle ritrovate nello stesso studio.

Se però si confrontano i valori medi di concentrazione di Ca dei campioni di dieta della tesi di dottorato con i livelli ottimali (indicatori di animali in salute) descritti da Owen and Larson nel 1991, come già accennato, si nota come questi siano coerenti con quanto riportato da questi due autori e che quindi i campioni di dieta stessa non mostrino carenze di Ca. Al contrario, invece, di quanto si nota per i valori di Ca dei campioni di dieta analizzati da Pšenková et al., 2020: il motivo di questa carenza, come affermano gli stessi autori dello studio slovacco, è probabilmente collegato ad un non perfetto bilanciamento in termini di macro-elementi nel processo di preparazione della razione giornaliera della dieta.

I due differenti approcci statistici utilizzati per descrivere i dati in questa tesi non hanno mostrato gli stessi risultati nel trasporto degli elementi dalla dieta al latte. È stato evidenziato come, nel nostro caso, la PCA sia in grado di fornire risultati migliori in termini di correlazioni ottenute dal confronto tra le diverse tipologie di campioni processati. Si è quindi deciso di descrivere i dati sulla base dei risultati ottenuti attraverso questa analisi statistica.

Si osserva, in generale, come il trasporto di alcuni elementi sia evidente soprattutto dal fieno poiché presenta concentrazioni di elementi più elevate rispetto al mangime. Gli elementi, inoltre, potrebbero derivare anche dall'acqua ingerita ma, purtroppo, non abbiamo dati disponibili per poterlo verificare.

Dai risultati ottenuti da questa tesi e viste le precedenti considerazioni fatte si può quindi affermare che:

- solo per alcune stalle è stata rilevata una correlazione e, quindi, un contributo nel trasporto di certi elementi dalla dieta al latte;
- non tutti gli elementi analizzati sia nel latte che nella dieta risultano essere trasportati da parte di quest'ultima al latte per via di una mancata correlazione diretta tra le due matrici (dieta e latte). Inoltre, come proposto da Zhou et al., 2017, vi sono altri fattori che posso intervenire (esempio la fonte di approvvigionamento di acqua) di cui è consigliato tenere in considerazione;
- il maggior numero di correlazioni significativamente “forti” con il latte si riscontra nei campioni di fieno piuttosto che nel mangime; è quindi dovuto alla frazione della dieta corrispondente al fieno il contributo maggiore nel trasporto di alcuni elementi nel latte;
- valutare le concentrazioni degli elementi maggiori e in tracce nell'alimentazione è importante per capire la loro incidenza e il loro trasporto nel latte.

Lo studio del contenuto di nutrienti e oligoelementi nel latte è importante per definire i livelli ottimali delle bovine e, quindi, apportare eventuali modifiche alla dieta, ma anche per valutare l'eventuale presenza di elementi tossici che dalla dieta stessa, a causa di inquinanti ambientali, potrebbero essere traslocati al latte.

7 Conclusioni

Per raggiungere l'obiettivo preposto, tra le variabili geochimiche sono state prese in considerazione la composizione isotopica dell'ossigeno, dell'idrogeno, del carbonio, dell'azoto e dello zolfo, il rapporto isotopico dello stronzio, alcuni elementi maggiori e in tracce del latte e delle sue macrocomponenti, dell'acqua ingerita dalle bovine da latte, del fieno e del mangime della dieta di questi animali. Sono stati studiati i campioni provenienti da dieci stalle ubicate nel comprensorio del Parmigiano Reggiano.

I principali risultati emersi da questo studio sono i seguenti:

- 1) I valori isotopici di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ delle acque ingerite dalle mucche cadono molto vicino alla LMWL descritta per l'Italia centro-settentrionale e non mostrano, per la maggior parte di loro, variazione dei rapporti isotopici durante l'anno. L'eccezione è rappresentata dai campioni della stalla di Pavullo a causa del differente contributo di diverse fonti di approvvigionamento d'acqua.

Per quanto riguarda i valori del siero del latte, questi presentano una retta di regressione con pendenza inferiore rispetto alle acque ingerite (acque sotterranee), riconducibile al metabolismo animale. A parità di valori ^2H , i valori $\delta^{18}\text{O}$ dei campioni di siero del latte sono risultati essere più arricchiti rispetto a quelli delle acque (con deviazioni standard sempre superiori all'incertezza della previsione): durante l'estate l'acqua del latte si arricchisce in ^{18}O e ^2H e ciò può essere dovuto al metabolismo dell'animale e a processi di evaporazione. Questo effetto è particolarmente evidente nelle località di Castelnovo e Baiso (dove in estate gli animali vengono tenuti all'aperto con possibilità di ingerire anche erba fresca che contiene acqua arricchita di isotopi pesanti). La composizione isotopica dell'ossigeno nell'acqua del latte di ogni singola stalla è, inoltre, ben correlata alla temperatura media annua delle singole località ($R^2=0,53$ - Figura 4.2). Ciò dimostra la dipendenza delle caratteristiche isotopiche del latte dalle condizioni climatiche. I valori medi di $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua ingerita e del siero del latte risultano essere significativamente correlati ($R^2=0,41$ - Figura 4.3) a dimostrazione di come la variazione dei valori isotopici del latte dipende da quella dall'acqua. La distribuzione degli isotopi tra la fase latte e la fase acqua ingerita è descritta dal fattore di frazionamento $\alpha_{\text{H}_2\text{O}}^{M-W}$ che, sia per $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ che per $^2\text{H}/^1\text{H}$, è funzione della data di raccolta dei campioni: questi valori diventano più alti durante l'estate e più bassi durante l'inverno. Il frazionamento cambia durante le stagioni dal momento che il metabolismo dell'animale cambia durante le stagioni stesse. È stato inoltre dimostrato come, attraverso α e il valore dell'acqua campionata, sia possibile risalire alle caratteristiche isotopiche del latte. Questa valutazione è utile per

verificare la compatibilità di un campione di latte con l'acqua ingerita e, quindi, per la tracciabilità geografica (corrispondenza tra luogo, tempo, latte e acqua). Il modello, descritto da un'equazione polinomiale di secondo ordine, ha permesso di stimare l'incertezza del valore $\hat{\alpha}$ in un dato momento t (numero di giorni a partire dal 1° gennaio) e quindi stimare il valore $^{18/16}\hat{\delta}$ dell'acqua del siero dal valore di $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua ingerita e viceversa ($u(\hat{\alpha})_{\alpha} \cong 0.00055 \%$). L'attendibilità è stata verificata attraverso lo studio di quattro stalle aggiuntive.

- 2) Le varie componenti della dieta animale e le frazioni grassa e proteica (caseina) del latte sono state analizzate per gli isotopi di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. Per quanto concerne l'isotopo del carbonio, i risultati ottenuti dai campioni di dieta dimostrano che sono presenti differenze statisticamente significative tra le diverse stalle ma non tra i diversi mesi. Le stalle con il fieno diverso sono Collecchio e Baiso. Per quanto riguarda il mangime, quello usato a Palanzano è isotopicamente diverso da quello usato in tutte le altre stalle. Al contrario, i campioni di caseina e grasso del latte si differenziano tra le varie stalle in funzione, principalmente, delle diverse proporzioni tra fieno e mangime. Il fattore di frazionamento $\alpha_{\text{caseina-grasso}}$ calcolato per tutte le stalle per ogni mese di campionamento non mostra alcun andamento stagionale. Si tratta quindi di un modello ripetibile nel tempo in quanto il metabolismo animale non subisce variazioni anche se si dovessero riscontrare modifiche nell'alimentazione.

Per l'azoto, l'Anova indica che i valori isotopici del fieno delle stalle di Castelnovo, Baiso e Palanzano sono del tutto simili fra loro e diversi da quelli di Collecchio e Busseto. Il fieno di Palanzano è statisticamente diverso anche da quello di Viarolo, Pavullo e Magnacavallo. I mangimi della stalla di Collecchio sono statisticamente diversi da quelli di tutte le altre stalle, mentre la stalla di Busseto è statisticamente differente da Baiso e Pavullo.

Anche per l'azoto i campioni di caseina si differenziano tra le varie stalle.

Dai valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ determinati nella caseina e nell'*unifeed* si è poi calcolato $\alpha_{\text{caseina-dieta}}$ che ha permesso, almeno in alcuni casi, di risalire alle frazioni di fieno e mangime nell'alimentazione. Il contributo del fieno alla dieta totale è risultato essere, in genere, attorno al 50% (± 11) per le stalle di Collecchio, Busseto, Baiso, Palanzano e Pavullo; mentre per Castelnovo è dell'85% (± 11) in accordo con quanto dichiarato dall'azienda (solo fieno, no mangimi). Per le stalle di Collecchio, Busseto e Baiso i valori isotopici sia del carbonio che dell'azoto della caseina non sono statisticamente diversi.

Si può quindi affermare che dai valori isotopici di carbonio e azoto della caseina e del grasso è possibile risalire alla composizione isotopica della dieta e, potenzialmente, alla zona di origine del latte. Fra le stalle considerate nessuna si differenzia da tutte le altre, nemmeno Castelnovo ne' Monti che utilizza solo fieno nell'alimentazione delle bovine. Esiste, quindi,

nel comprensorio del Parmigiano Reggiano una buona uniformità nelle caratteristiche isotopiche di carbonio e azoto del latte. Sarebbe, a questo punto, necessario vedere quali sono i valori al di fuori del comprensorio.

- 3) Per l'analisi di screening che ha riguardato la composizione isotopica dello zolfo per alcuni campioni di dieta e caseina del latte si è constatato che i valori di $10^3 \delta^{34}\text{S}$ della caseina sono più vicini a quelli del fieno rispetto a quelli del mangime/fiocchi e che, quindi, il valore della caseina è controllato dalla componente fieno. Inoltre, sono presenti differenze nei valori di $10^3 \delta^{34}\text{S}$ della caseina nelle diverse stalle e questo è probabilmente legato ad un diverso valore di $10^3 \delta^{34}\text{S}$ nel terreno. Nel nostro caso essendo le stalle ubicate sia nella zona Appenninica che nella pianura ed essendo queste caratterizzate da differenti litologie, è corretto aspettarsi diversi valori isotopici dello zolfo.
- 4) Un'altra indagine di screening è quella condotta sul rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ nei campioni di acqua, latte totale e dieta. Si è osservato che, attraverso la costruzione di una relazione lineare a più variabili indipendenti con R^2 pari a 0,88, chi contribuisce in misura maggiore al valore isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ del latte è il fieno; mentre un contributo minore e paragonabile a quello del mangime proviene dall'acqua. Infatti, le concentrazioni di stronzio totale nel fieno sono decisamente più alte di quelle nel mangime e nell'acqua.

Per i campioni di latte, ad eccezione di tre stalle (Guastalla, Gaggio Montano e Magnacavallo), non vi sono marcate differenze per il valore $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$. Si può quindi affermare che per sette delle dieci stalle campionate i terreni hanno lo stesso rapporto isotopico dello stronzio.

- 5) Nella concentrazione degli elementi maggiori e in tracce del latte non si è rilevata nessuna differenza statistica tra le differenti stalle. Le concentrazioni sono in accordo con i dati presenti in letteratura (Potocnik et al. 2020). Per quanto riguarda la dieta, la scala di concentrazione degli elementi maggiori ritrovata per i campioni di latte ($\text{K} > \text{Ca} > \text{Cl}$, $\text{P} > \text{S} > \text{Zn} > \text{Br} > \text{Rb}$, Sr) è la stessa anche per il fieno e, in genere, anche per il mangime; mentre vi sono differenze per gli elementi in tracce. L'analisi della correlazione canonica (CCA) tra i valori di concentrazione di fieno, mangime e latte indica l'assenza di correlazione tra mangime e latte e quindi nessuna traslocazione degli elementi dal mangime al latte. Al contrario, gli elementi quali Ca, Cl, Br, K e Zn mostrano una buona correlazione tra fieno e latte ad indicare quindi un possibile trasferimento dalla dieta (fieno) al latte stesso. L'analisi multivariata delle componenti principali (PCA) indica che gli elementi più importanti che dal fieno vengono trasportati nel latte sono P, Ca, Br e Rb, mentre nel caso del mangime sono P, Ca e Br, S, Zn. Queste correlazioni non sono presenti per tutte le dieci stalle studiate. Si è evidenziato, inoltre, come il trasporto di alcuni elementi sia evidente soprattutto nel caso del

fieno, poiché presenta le concentrazioni degli elementi più elevate rispetto al mangime, e che sia quindi in grado di fornire un contributo maggiore nel latte.

- 6) Concludendo, lo screening su due mesi di campionamento ha evidenziato che l'analisi degli isotopi dello zolfo e del rapporto isotopico dello stronzio può essere utile per correlare il latte con le componenti della dieta (principalmente il fieno) e quindi con la zona di mungitura. Al contrario, l'analisi degli elementi maggiori e in tracce non sembra dare un contributo utile per risalire alla dieta dell'animale e di conseguenza alla tracciabilità del latte.

Appendice 1

Parametro delta: definizione ufficiale

(secondo i suggerimenti di IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry)

La misura dei valori dei rapporti isotopici “veri” ($R_{v,i}$) è piuttosto complessa. È molto più conveniente misurare con lo stesso strumento il rapporto isotopico apparente (R_i) nel campione e in un materiale di riferimento, RF:

R_i^φ , $R_{v,i}^\varphi$ e R_i^{RF} , $R_{v,i}^{RF}$ sono legati da una costante k :

$$R_i^\varphi = k R_{v,i}^\varphi \quad \text{e} \quad R_i^{RF} = k R_{v,i}^{RF}$$

Si definisce

$$\delta^{(A/B)E}_i^\varphi = \frac{(A/B)E_i^\varphi}{(A/B)E_i^{RF}} - 1 = \frac{A/B R_{v,i}^\varphi}{A/B R_{v,i}^{RF}} - 1 = \frac{k A/B R_i^\varphi}{k A/B R_i^{RF}} - 1 = \frac{A/B R_i^\varphi}{A/B R_i^{RF}} - 1$$

Più semplicemente indicheremo $\delta^{(A/B)E}_i^\varphi = {}^A\delta_i^\varphi = \delta^A E_i^\varphi$

Dal momento che in genere δ assume un valore molto minore dell'unità, spesso si usufruisce di un valore numerico pari a $\delta \cdot 10^3$. Per una certa specie chimica i , scriviamo

$$\delta_{\varphi/RF(IUPAC)} = \left[\left(\frac{R_i^\varphi}{R_i^{RF}} - 1 \right) 10^3 \right] 10^{-3} = X \cdot 10^{-3} = X \text{ ‰}$$

dove ‰ indica che il valore numerico tra parentesi quadra che noi utilizziamo deve essere diviso

per 10^3 al fine di ottenere il valore di $\delta_{\varphi/RF} = \left(\frac{R_i^\varphi}{R_i^{RF}} - 1 \right)$. Si noti che risulta

$$10^3 \delta_{\varphi/RF(IUPAC)} = \left(\frac{R_i^\varphi}{R_i^{RF}} - 1 \right) 10^3 \quad (1)$$

Parametro delta: definizione tradizionale

Il parametro $\delta_{\varphi/RF}$ è definito nel seguente modo

$$\delta_{\varphi/RF} \text{ (tradizionale)} = 10^3 \delta_{\varphi/RF(IUPAC)} = \left[\left(\frac{R_i^\varphi}{R_i^{RF}} - 1 \right) \cdot 10^3 \right] = X$$

In questo caso, il valore tra parentesi quadra, e quindi il valore X , non deve essere seguito da alcuna indicazione. Questa definizione può facilmente indurre in errori di calcolo quando vi siano prodotti tra i valori di delta.

Purtroppo, in alcuni libri e molte pubblicazioni scientifiche si fa confusione. Ad esempio, si definisce $\delta_{\varphi/RF}$ in modo tradizionale e, nel testo, si fa poi seguire il valore X dal simbolo ‰, pertanto riconducendo la definizione di δ al suggerimento IUPAC; in altri termini si avrebbe: $X = X \cdot 10^{-3} = X \text{ ‰}$. La composizione isotopica è un valore relativo e non ha unità di misura; è una grandezza adimensionale.

Appendice 2

I diversi significati del fattore di frazionamento isotopico α

Le specie chimiche presenti nella stessa fase o in fasi diverse possono scambiare gli isotopi A e B

A) Ignorare le condizioni termodinamiche

a) Una fase φ (indicate tra parentesi) e due specie chimiche reali θ_1 e θ_2 :

$${}^{A/B}\alpha_{\theta_2-\theta_1}^{\varphi} = \frac{{}^{A/B}\delta_{\theta_2}^{\varphi} + 1}{{}^{A/B}\delta_{\theta_1}^{\varphi} + 1}$$

esempio: $\varphi = \text{gas}$, $\theta_1 = \text{CO}_2$ specie gassose, $\theta_2 = \text{H}_2\text{O}$ specie gassose.

b) Due fasi φ_1 e φ_2 e solo una vera specie chimica θ :

$${}^{A/B}\alpha_{\theta}^{\varphi_2-\varphi_1} = \frac{{}^{A/B}\delta_{\theta}^{\varphi_2} + 1}{{}^{A/B}\delta_{\theta}^{\varphi_1} + 1}$$

esempio: $\varphi_1 = \text{soluzione acquosa}$, $\varphi_2 = \text{gas}$, $\theta = \text{H}_2\text{O}$ specie liquide in φ_1 e H_2O specie gassose in φ_2 .

c) Due fasi φ_1 e φ_2 (indicate tra parentesi) e due specie chimiche reali θ_1 e θ_2 appartenenti alla fase φ_1 e φ_2 , rispettivamente:

$${}^{A/B}\alpha_{\theta_2-\theta_1}^{\varphi_2-\varphi_1} = \frac{{}^{A/B}\delta_{\theta_2}^{\varphi_2} + 1}{{}^{A/B}\delta_{\theta_1}^{\varphi_1} + 1}$$

esempio: $\varphi_1 = \text{soluzione acquosa}$, $\varphi_2 = \text{gas}$, $\theta_1 = \text{H}_2\text{O}$ specie chimiche liquide reali nella soluzione acquosa φ_1 , $\theta_2 = \text{CO}_2$ specie chimiche gassose reali in fase gassosa φ_2 .

Nota. L'equilibrio potrebbe anche coinvolgere n fasi $\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_n$. Così:

$${}^{A/B}\alpha^{\varphi_2-\varphi_1} = \frac{{}^{A/B}\delta^{\varphi_2} + 1}{{}^{A/B}\delta^{\varphi_1} + 1}, \quad {}^{A/B}\alpha^{\varphi_3-\varphi_2} = \frac{{}^{A/B}\delta^{\varphi_3} + 1}{{}^{A/B}\delta^{\varphi_2} + 1}, \quad \dots, \quad {}^{A/B}\alpha^{\varphi_n-\varphi_{n-1}} = \frac{{}^{A/B}\delta^{\varphi_n} + 1}{{}^{A/B}\delta^{\varphi_{n-1}} + 1},$$

E all'equilibrio:

$${}^{A/B}\alpha^{\varphi_n-\varphi_1} = \frac{{}^{A/B}\delta^{\varphi_n} + 1}{{}^{A/B}\delta^{\varphi_1} + 1} = \frac{{}^{A/B}\delta^{\varphi_2} + 1}{{}^{A/B}\delta^{\varphi_1} + 1} \frac{{}^{A/B}\delta^{\varphi_3} + 1}{{}^{A/B}\delta^{\varphi_2} + 1} \dots \frac{{}^{A/B}\delta^{\varphi_n} + 1}{{}^{A/B}\delta^{\varphi_{n-1}} + 1} = {}^{A/B}\alpha^{\varphi_2-\varphi_1} \quad {}^{A/B}\alpha^{\varphi_3-\varphi_2} \quad \dots \quad {}^{A/B}\alpha^{\varphi_n-\varphi_{n-1}}$$

B) Considerando le diverse condizioni termodinamiche

a) Equilibrio termodinamico

In questo caso la lettera greca ${}^{A/B}\alpha_E$ indica il Fattore di frazionamento isotopico di equilibrio (EQ) (EQFF). Il frazionamento, come descritto nei punti (a), (b) e (c), avviene tra le diverse fasi in contatto tra loro (equilibrio *inter*-fase) o nella stessa fase (equilibrio *intra*-fase). In condizione di equilibrio, la

ripartizione degli isotopi tra le sostanze dipende da condizioni fisico-chimiche (es: temperatura, pressione, attività dei componenti chimici nelle soluzioni, ecc.), non dai singoli valori delta; quindi, se queste condizioni sono preservate, α è costante. Per questo argomento, vedere le semplici considerazioni riportate nel breve articolo di Iacumin et al (2018).

Più in dettaglio, in condizione di equilibrio, il valore di EQFF, qui indicato genericamente come

$${}^{A/B}\alpha_{EQ} = \frac{{}^{A/B}\delta_{y,EQ} + 1}{{}^{A/B}\delta_x + 1} \quad (2a)$$

dove ${}^{A/B}\delta_x$ indica un valore generico, ${}^{A/B}\delta_{y,EQ}$ il valore corrispondente relativo a ${}^{A/B}\delta_x$ attraverso la relazione (2a). Quindi, diverse coppie di valori (${}^{A/B}\delta_{y,EQ} + 1$, ${}^{A/B}\delta_x + 1$) definiscono una retta di regressione lineare che passa per l'origine:

$${}^{A/B}\delta_{y,EQ} + 1 = {}^{A/B}\alpha_{EQ} ({}^{A/B}\delta_x + 1) \quad (2b)$$

(Si noti, tuttavia, che, come discusso di seguito al punto (b), la condizione di $A = 0$ è una *condizione necessaria ma non sufficiente* per assumere l'equilibrio termodinamico).

Esempio di equilibrio *inter*-fase: distribuzione degli isotopi dell'ossigeno nelle specie chimiche molecolari H₂O presenti in una fase liquida e in una fase gassosa in equilibrio.

Esempi di equilibrio *intra*-fase: distribuzione all'equilibrio degli isotopi dell'ossigeno nelle specie chimiche H₂O e CO₂ presenti nella stessa fase gassosa; distribuzione all'equilibrio degli isotopi dell'ossigeno nelle specie chimiche PO₄³⁻ e CO₃²⁻ della bioapatite.

b) Disequilibrio termodinamico

Disequilibrio "senso stretto". Ogni coppia di misure (${}^{A/B}\delta_y + 1$, ${}^{A/B}\delta_x + 1$) fornisce un diverso valore del rapporto $({}^{A/B}\delta_y + 1)/({}^{A/B}\delta_x + 1)$, che, quindi, non presenta una relazione definita con $({}^{A/B}\delta_x + 1)$.

Condizioni di stato stazionario. Definiamo il valore del *Fattore di Frazionamento allo Stato Stazionario* (SS) (SSFF) come

$${}^{A/B}\alpha_{SS} = \frac{{}^{A/B}\delta_{y,SS} + 1}{{}^{A/B}\delta_x + 1}$$

dove ${}^{A/B}\delta_{y,SS}$ non è correlato alle condizioni di equilibrio e ${}^{A/B}\alpha_{SS}$ non è necessariamente indipendente da ${}^{A/B}\delta_x + 1$. Consideriamo alcuni casi:

a) Il valore ${}^{A/B}\alpha_{SS}$ è proporzionale a ${}^{A/B}\alpha_{EQ}$ attraverso una costante di proporzionalità k_a :

$${}^{A/B}\alpha_{SS} = k_a {}^{A/B}\alpha_{EQ} = \frac{{}^{A/B}\delta_{y,SS} + 1}{{}^{A/B}\delta_y + 1} = k_a \frac{{}^{A/B}\delta_{y,E} + 1}{{}^{A/B}\delta_x + 1} \quad (3)$$

b) Il valore ${}^A\alpha_{SS}$ è relazionato a ${}^{A/B}\alpha_E$ attraverso la relazione lineare

$${}^A\alpha_{SS} = \frac{{}^{A/B}\delta_{SS} + 1}{{}^{A/B}\delta_i + 1} = k_a {}^{A/B}\alpha_{EQ} + k_b \quad (4a)$$

dove k_a e k_b sono costanti. Quindi, moltiplicando (4a) per ${}^{A/B}\delta_x + 1$,

$${}^{A/B}\delta_{y,SS} + 1 = (k_a {}^{A/B}\alpha_{EQ} + k_b) ({}^{A/B}\delta_x + 1) \quad (4b)$$

La linea retta in ${}^{A/B}\delta_{y,SS} + 1$ vs $({}^{A/B}\delta_x + 1)$ passa ancora per l'origine, ma la pendenza è diversa.

Sottraendo (2b) da (4b) otteniamo

$$\begin{aligned} \Delta_{SS-EQ} &= {}^{A/B}\delta_{y,SS} - {}^{A/B}\delta_{y,EQ} = (k_a {}^{A/B}\alpha_{EQ} + k_b) ({}^{A/B}\delta_x + 1) - {}^{A/B}\alpha_{EQ} ({}^A\delta_x + 1) = \\ &= (k_a {}^{A/B}\alpha_{EQ} - {}^{A/B}\alpha_{EQ} + k_b) ({}^{A/B}\delta_x + 1) \end{aligned}$$

L'equazione è ancora una linea retta in $({}^{A/B}\delta_x + 1)$ che passa per l'origine.

Esempio. Durante l'evaporazione dell'acqua oceanica a una data umidità relativa h dell'atmosfera aperta sovrastante (*at*), gli isotopi della specie chimica H_2O nella soluzione di acqua marina (*lq*) e nell'atmosfera aperta possono avvicinarsi alle condizioni di stato stazionario, non di equilibrio. In questo caso, nello strato gassoso sopra l'acqua liquida, i valori ${}^{18/16}\delta$ e ${}^{2/1}\delta$ cambiano allontanandosi dalla superficie dell'acqua; in condizioni di stato stazionario, nel tempo i valori rimangono gli stessi alle stesse altezze sopra la superficie dell'acqua. Il partizionamento di ${}^{18}O/{}^{16}O$ e ${}^2H/{}^1H$ tra *lq* e *at* non è espresso dai valori dei fattori di frazionamento all'equilibrio $\alpha_{H_2O,EQ}^{lq-gas}$ (di seguito semplicemente riportato come α_{EQ}^{lq-gas}) tra una soluzione acquosa *lq* e un *gas* in fase gassosa acquosa. Formalmente, per $k_a = 1$, k_b dell'equazione (4a) può rappresentare il "fattore cinetico" per gli isotopi dell'idrogeno e dell'ossigeno durante l'evaporazione allo stato stazionario per l'umidità relativa definita dell'atmosfera aperta (vedi Gonfiantini 1986 e riferimenti ivi contenuti). Per gradi moderati di evaporazione nell'atmosfera in condizioni di disequilibrio, secondo Gonfiantini (1986), per gli isotopi dell'ossigeno e dell'idrogeno i valori di k_b sono approssimativamente i seguenti:

$${}^{18}k_b \cong 0.0142 (1 - h)$$

$${}^2k_b \cong 0.0125 (1 - h).$$

Quindi:

$${}^{18/16}\alpha_{SS}^{lq-at} = {}^{18/16}\alpha_{EQ}^{lq-gas} + 0.0142 (1 - h)$$

$${}^{2/1}\alpha_{SS}^{lq-at} = {}^{2/1}\alpha_{EQ}^{lq-gas} + 0.0125 (1 - h)$$

c) Il valore ${}^A\alpha_{SS}$ è relazionato a ${}^{A/B}\alpha_E$ attraverso la relazione lineare:

$${}^{A/B}\delta_{SS,y} + 1 = m_a ({}^{A/B}\delta_{EQ,y} + 1) + m_b = m_a {}^{A/B}\alpha_{EQ} ({}^{A/B}\delta_x + 1) + m_b \quad (5)$$

dove m_a e m_b sono costanti.

Appendice 3

Tracciabilità di prodotto: i marchi di qualità

Il fenomeno della globalizzazione con la liberalizzazione dei mercati e lo sviluppo del trasporto dei prodotti all'interno del territorio dell'Unione Europea se da un lato ha favorito la diffusione di prodotti tipici, dall'altro ha reso più ostico il controllo del fenomeno dell'introduzione sul mercato di prodotti a basso costo derivanti da imitazioni, sofisticazioni e contraffazioni, ciò che costituisce un rischio potenziale sempre più crescente per la salute dei consumatori e un danno per l'economia dei vari paesi.

Con il preciso scopo di tutelare i prodotti agroalimentari che presentano caratteristiche specifiche e fronteggiare eventuali emergenze alimentari (ricordiamo la BSE - Bovine Spongiform Encephalopathy, o meglio conosciuta come “morbo della mucca pazza”), una delle maggiori priorità dell'Unione Europea è diventata l'esigenza di garantire un elevato livello di sicurezza alimentare, attraverso la definizione di politiche e strumenti, basati sui termini di tracciabilità e rintracciabilità, atti a garantire la sicurezza delle produzioni agroalimentari e che consentono di ricevere informazioni circa l'origine e la storia di un determinato prodotto agroalimentare.

L'Unione Europea ha così introdotto dei marchi di tutela giuridica tramite i quali è possibile fornire maggiori garanzie ai consumatori attraverso un livello di tracciabilità e di sicurezza alimentare più preciso.

Col termine “marchio di qualità” si intende il marchio *DOP* (Denominazione di Origine Protetta), *IGP* (Indicazione geografica protetta) e *STG* (Specialità Tradizionale Garantita) impiegati in campo agroalimentare per identificare prodotti di qualità.

Vengono attribuiti dall'UE a seguito della richiesta del Ministero delle politiche agricole e forestali; una volta acquisito il marchio, i prodotti devono possedere le caratteristiche riportate nei rispettivi disciplinari e avere soprattutto un'origine ben dimostrabile.

I primi regolamenti riguardanti la protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli ed alimentari che normano i prodotti con tali marchi sono i Regolamenti CEE n. 2081/92 e 2082/92 del 14 luglio 1992.

La differenza tra i marchi consiste nel fatto che, mentre il marchio *STG* è volto a tutelare prodotti caratterizzati da composizioni o metodi di produzione tradizionali di una determinata area, ma non prodotti necessariamente in tale zona, non è così per i marchi *DOP* e *IGP*. Entrambe queste ultime certificazioni garantiscono la zona protetta in cui vengono prodotti gli alimenti; esse, tuttavia, differiscono su un punto fondamentale. Per i prodotti *DOP* tutte le fasi comprendenti la produzione, la trasformazione e l'elaborazione devono avvenire in una specifica e delimitata area. Il motivo di

ciò è dettato dal fatto che le caratteristiche dell'ambiente geografico, siano esse fattori umani o naturali, permettono di ottenere un prodotto esclusivo. Quindi vi è una stretta dipendenza tra i prodotti DOP e il territorio di origine.

Invece, per quanto riguarda l'IGP parte del processo produttivo può realizzarsi al di fuori dell'area geografica di origine a patto però che la qualità possa essere attribuita a tale area: quindi, per questa categoria di prodotti, una o più caratteristiche devono dipendere dalla zona di produzione.

Il Paese Europeo che si distingue per un patrimonio agroalimentare unico in termini di ricchezza, varietà e pregio e che presenta il più alto numero di prodotti agroalimentari a denominazione di origine e a indicazione geografica è l'Italia.

Questo aspetto denota come sia ben saldo il legame tra le eccellenze agroalimentari italiane e il territorio originario. Purtroppo, nonostante regolamenti e certificazioni, il fenomeno della contraffazione colpisce sempre più i prodotti alimentari, in particolare il nostro patrimonio agroalimentare.

Per questo l'identificazione dell'origine, la caratterizzazione e l'autenticazione delle materie prime impiegate nella filiera di produzione assumono una notevole importanza e l'autenticità e la tracciabilità geografica costituiscono quindi due tasselli cardine per un alimento di qualità.

Con particolare riguardo per il settore lattiero-caseario l'autenticità del formaggio è un argomento di crescente interesse. La catena produttiva del formaggio consta di molti passaggi e l'ambiente di produzione infonde una sorta di impronta specifica sul prodotto.

Disciplinare di produzione – Regolamento di alimentazione

Si riportano di seguito alcuni articoli estratti del Disciplinare di produzione del Parmigiano Reggiano riguardanti il Regolamento di alimentazione delle bovine.

Art. 2

Principi generali per il razionamento

Il razionamento delle bovine da latte si basa sull'impiego di foraggi del territorio di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano. Nella razione giornaliera, almeno il 50% della sostanza secca dei foraggi deve essere apportata da fieni.

La razione di base, costituita dai foraggi, deve essere convenientemente integrata con mangimi in grado di bilanciare l'apporto dei vari nutrienti della dieta. La sostanza secca dei mangimi nel loro complesso non deve superare quella globalmente apportata dai foraggi (rapporto foraggi/mangimi non inferiore a 1).

Non debbono essere somministrati alle bovine da latte alimenti che possono trasmettere aromi e sapori anomali al latte e alterarne le caratteristiche tecnologiche, alimenti che rappresentano fonti di contaminazione e alimenti in cattivo stato di conservazione.

Art. 3

Origine dei foraggi

Nell'alimentazione delle bovine da latte:

- almeno il 50% della sostanza secca dei foraggi utilizzati deve essere prodotta sui terreni aziendali, purché ubicati all'interno del territorio di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano;
- almeno il 75% della sostanza secca dei foraggi deve essere prodotta all'interno del territorio di produzione del formaggio Parmigiano-Reggiano.

Art. 4

Foraggi ammessi

Possono essere somministrati alle bovine da latte:

- i foraggi freschi ottenuti da prati naturali, da prati stabili polifiti e da prati di erba medica e di erba di trifoglio;
- gli erbai di loietto, di segale, di avena, di orzo, di frumento, di granturchino, di sorgo da ricaccio, di panico, di erba mazzolina (*Dactylis*), di festuca, di fleolo (*Phleum*), di sulla, di lupinella, somministrati singolarmente o associati tra loro;
- gli erbai di pisello, veccia e favino, purché associati con almeno una delle essenze foraggere di cui al punto precedente;
- i fieni ottenuti a mezzo dell'essiccamento in campo o mediante ventilazione forzata (aeroessiccazione con temperature inferiori a 100°C) delle essenze foraggere predette;
- il foraggio trinciato ottenuto dalla pianta intera del mais a maturazione latteo-cerosa o cerosa, somministrato immediatamente dopo la raccolta;
- le paglie di cereali, con esclusione di quella di riso.

Possono, altresì, essere utilizzati per l'alimentazione delle bovine da latte i foraggi delle essenze sopraindicate, ad esclusione del trinciato di mais, trattati termicamente con temperatura pari o superiore a 100°C, nella dose massima di 2 kg/capo/giorno. Tale apporto non può essere cumulato con la quota di foraggi disidratati eventualmente fornita con i mangimi.

Art. 6

Materie prime per mangimi

Nell'alimentazione delle bovine da latte possono essere utilizzate, nelle forme indicate nell'allegato, le seguenti materie prime:

- cereali: mais, sorgo, orzo, avena, frumento, triticale, segale, farro, miglio e panico;
- semi di oleaginose: soia, lino, girasole;
- semi di leguminose: fava, favino e pisello proteico;
- foraggi: farine delle essenze foraggere ammesse;
- polpe secche di bietola;
- concentrato proteico di patate.

Possono inoltre essere utilizzati nei mangimi complementari composti:

- la carruba, in quantità non superiore al 3%;
- il melasso, in quantità non superiore al 3%.

È consentito l'uso di mangimi in blocchi melassati, anche in forma frantumata, nella dose massima giornaliera di 1 Kg. a capo. In ogni caso, l'impiego dei blocchi melassati non è compatibile con l'impiego di mangimi contenenti melasso.

Sono ammesse, inoltre, preparazioni zuccherine e/o a base di glicole propilenico e glicerolo, in forma liquida o disperse nei mangimi, nella dose massima complessiva di 300 grammi capo/giorno. Fatto salvo quanto previsto dall'art. 8, possono essere, inoltre, utilizzati i prodotti e gli alimenti consentiti dalla legislazione vigente per le bovine da latte previa sperimentazione del Consorzio del Formaggio Parmigiano Reggiano che, verificata la compatibilità, ne dà comunicazione agli organismi preposti.

Art. 10

Alimentazione con Piatto Unico

Gli alimenti possono essere somministrati alle bovine da latte mediante la tecnica del "Piatto Unico", che consiste nella preparazione di una miscela omogenea di tutti i componenti della razione prima di distribuirli agli animali.

La preparazione della miscela deve avvenire nell'allevamento che la utilizza.

Inoltre:

- non è consentita la miscelazione di foraggi verdi, nemmeno nel caso in cui si impieghi il trinciato fresco di mais. Se si utilizzano foraggi verdi, questi vanno somministrati a parte;
- le operazioni di preparazione non possono essere eseguite all'interno della stalla;
- se si procede all'umidificazione della massa, la miscelazione deve essere effettuata almeno due volte al giorno e la distribuzione deve seguire immediatamente la preparazione;

- anche se non si procede all'umidificazione della massa, la conservazione della stessa deve essere effettuata al di fuori della stalla e la distribuzione in greppia della miscelata deve essere effettuata almeno una volta al giorno.

Allegato: Materie prime per mangimi ammesse e dosi massime utilizzabili

Materie prime	Dose giornaliera massima Kg./capo/giorno	% massima rispetto al totale di mangimi somministrati giornalmente
Mais in farina	4	40
Mais sottoposto ad altri trattamenti fisici	3	30
Mais in totale	6	50
Orzo in farina	4	40
Orzo sottoposto ad altri trattamenti fisici	3	30
Orzo in totale	6	50
Fruento, triticale, segale, farro, panico e miglio	2,5	25
Crusca, cruschetto, tritello, farinaccio e farinetta di frumento	3	30
Fruento e derivati, segale, farro, panico e miglio in totale	4,5	40
Sorgo	4	40
Avena	2	20
Polpe secche di bietola in fettucce e/o in pellet	2	20
Trinciato di cereali cerosi, ad esclusione del trinciato di mais ceroso, e di foraggi ammessi trattati termicamente allo stato fresco a temperatura superiore a 100°C in totale	2	20
Bucchette di soia	1	10
Farine di estrazione e/o pannello di soia	2,5	25
Soia integrale trattata termicamente	1	10
Farina di estrazione di soia, pannello di soia e soia integrale in totale	3	30
Seme integrale di lino	0,3	3
Farine di estrazione e/o expeller e/o pannelli di lino, di girasole, di germe di mais e di germe di frumento in totale	1,5	15
Fava e/o favino	2,5	20
Pisello proteico	2,5	40
Fava, favino e pisello proteico in totale	4	10
Semola glutinata, glutine di mais e concentrato proteico di patata in totale	1	3
Melasso solo come componente dei mangimi complementari	0,3	3
Carruba	0,3	3

Tabella 1 – Materie prime per mangimi ammesse e dosi massime utilizzabili (“Disciplinare di produzione del formaggio Parmigiano Reggiano”)

Appendice 4

Spettrometria di massa isotopica (IRMS)

La spettrometria di massa isotopica utilizza i metodi della spettrometria di massa per la misura dell'abbondanza relativa degli isotopi in un campione.

La spettrometria di massa è la tecnica analitica largamente impiegata per la determinazione dei rapporti isotopici. Tale tecnica, attraverso l'impiego di un campo magnetico, permette la separazione di miscele di ioni in relazione al loro rapporto massa/carica. Ciò è reso possibile attraverso l'utilizzo di uno spettrometro di massa progettato inizialmente da Nier nel 1940 che ne ha consentito la diffusione in campi quali la biologia e le scienze della terra (Figura 1).

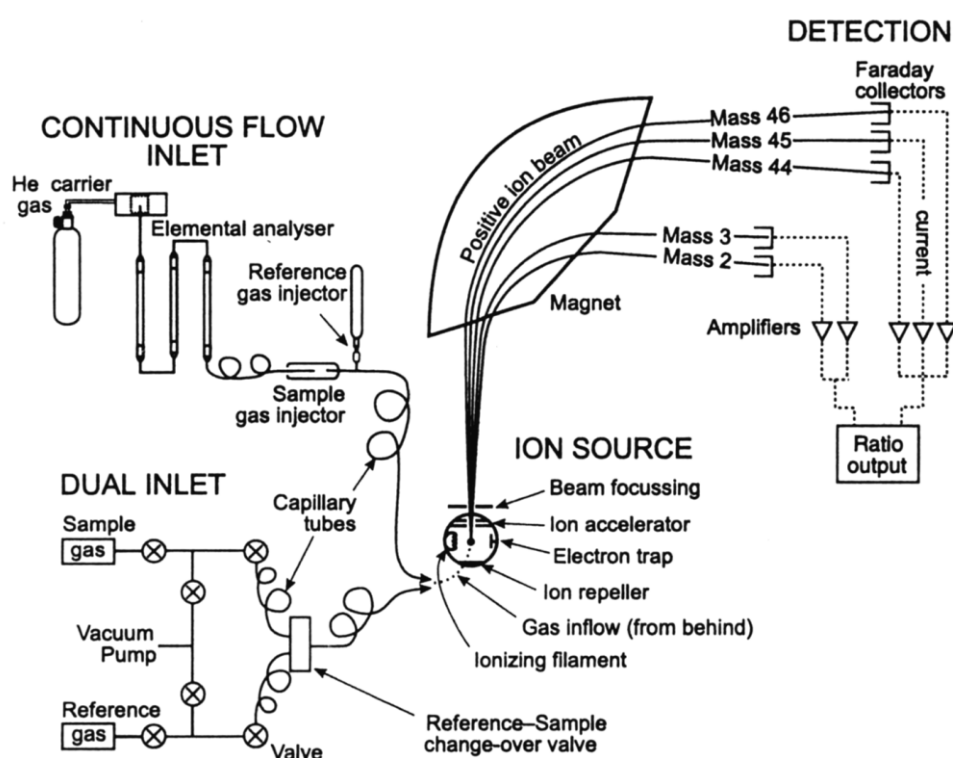


Figura 1 - Schema di funzionamento dello spettrometro di massa per elementi leggeri (IRMS) in continuous flow e dual inlet (Clark & Fritz, 1997)

Per effettuare le misure isotopiche, è necessario che lo strumento si trovi in condizioni di atmosfera rarefatta (cosiddetto “vuoto”). Ciò è reso possibile attraverso un sistema di pompaggio, ottenuto accoppiando una pompa turbomolecolare ad una meccanica rotativa a doppio stadio impiegata per il pre-vuoto. All'interno dello spettrometro si crea un vuoto dell'ordine di 10^{-8} mm Hg cosicché le molecole del gas residuo che si trovano nel tubo analizzatore siano inferiori quantitativamente all'1% rispetto alle molecole di gas campione introdotte per l'analisi nello stesso tubo.

Lo spettrometro di massa si compone di:

- **sistema di ingresso del campione o iniettore:** consente al campione in forma gassosa di giungere alla camera di ionizzazione;
- **camera di ionizzazione o sorgente:** negli spettrometri a doppio sistema di ingresso sono alternativamente introdotti nella sorgente il gas campione da analizzare (CO₂ per la determinazione di ¹⁸O/¹⁶O e ¹³C/¹²C, SO₂ per la determinazione di ³⁴S/³²S, H₂ per ²H/¹H e N₂ per ¹⁵N/¹⁴N) e il gas standard di riferimento. Il gas da analizzare subisce ionizzazione: viene sottoposto ad un bombardamento di elettroni emessi da un filamento di tungsteno incandescente e successivamente subisce accelerazione e focalizzazione per mezzo di campi elettrici in modo da consentirne l'ingresso nel tubo analizzatore.

L'energia cinetica acquisita dagli ioni è pari a:

$$Ve = \frac{1}{2}mv^2$$

dove:

V = potenziale del campo elettrico acceleratore

e = carica dello ione

m = massa dello ione

v = velocità acquisita

- **campo magnetico H:** generato da un magnete permanente o a campo variabile, devia gli ioni con diversi rapporti massa/carica dal loro andamento rettilineo. Il campo magnetico ha un'intensità tra i 5000 e i 7000 Oersted ed è ortogonale alla direzione di moto delle particelle;
- **tubo analizzatore:** si tratta di un tubo metallico (acciaio inox) ad U, con un raggio di curvatura, r, tra 30 e 18 cm, che mette in comunicazione la sorgente e i collettori ed è immerso nel campo magnetico. Il tubo analizzatore viene quindi attraversato dagli ioni accelerati che risentono del campo magnetico che li sottopone ad una forza centripeta Hev opposta a quella centrifuga mv^2/r dovuta all'accelerazione. Quando le due forze sono bilanciate la particella attraverserà con una traiettoria circolare il tubo e giungerà al rivelatore.

L'azione che il campo magnetico esercita sulle particelle è data da:

$$Hev = \frac{mv^2}{r}$$

dove:

Hev = forza magnetica esercitata dal campo su ogni ione

mv^2/r = forza centrifuga

Sostituendo v nella relazione appena descritta si ottiene:

$$r = \frac{1}{H} \sqrt{\frac{2vm}{e}}$$

Risulta evidente che le particelle percorrono traiettorie con differenti raggi di curvatura a seconda del rapporto massa/carica. Siccome nella maggioranza dei casi la carica degli ioni è unitaria, ciò che ne determinerà il percorso, in fasci separati, sarà la massa m ;

- **sistema di collettori:** formati da una serie di fenditure poste in un cilindro di Faraday, costituiscono il punto di arrivo degli ioni: oltrepassato il campo magnetico, il fascio di ioni suddiviso in pennelli con un proprio rapporto massa/carica andrà a collidere sul collettore di competenza. Andando a variare l'intensità del campo magnetico e/o elettrico di accelerazione è possibile modificare la traiettoria degli ioni facendoli così dirigere sul collettore desiderato;
- **amplificatore:** si tratta di un amplificatore elettronico costituito da un insieme di elettrodi a cascata. Quando uno ione giunge sul primo elettrodo vi è l'emissione di elettroni che urtano contro il secondo elettrodo che emette una maggior quantità di elettroni e si procede così. La corrente così amplificata, direttamente proporzionale all'abbondanza dello ione con una specifica massa, giunge al registratore;
- **detector e registratore:** alla fine si ottiene un'amplificazione del segnale che a sua volta viene elaborato dal calcolatore che fornisce come risultato lo spettro di massa.

In geochimica isotopica la risposta che viene fornita dallo spettrometro è sotto forma di rapporto tra due isotopi riportato come differenza da uno standard.

Per il gas prodotto da un certo campione i , il flusso della carica elettrica che trasporta ciascuna specie ionica A_n^+ costituisce una corrente che viene amplificata e registrata. Si abbiano le specie ioniche A_1^+ A_2^+ con correnti trasportate I_1 e I_2 .

Le misure isotopiche non ci forniscono il rapporto corretto

$$R_i = \frac{A_1}{A_2}$$

dove A_1 e A_2 = abbondanza relativa di due molecole isotopiche in un composto,

ma un valore ad esso proporzionale:

$$R_{i,m} = \left(\frac{I_1}{I_2}\right)_i = k \left(\frac{A_1}{A_2}\right)_i = aR_i$$

dove k è una costante di proporzionalità. Se compiamo la stessa misura su di uno standard internazionale primario o , abbiamo:

$$R_{o,m} = \left(\frac{I_1}{I_2}\right)_o = k \left(\frac{A_1}{A_2}\right)_o = aR_o$$

Dalle precedenti, semplificando k, si ottiene facilmente un nuovo parametro indicato con delta, δ :

$$\delta_{i/o} = \frac{R_i - R_o}{R_o} = \frac{R_i}{R_o} - 1 = \frac{R_{i,m} - R_{o,m}}{R_{o,m}} = \frac{\left(\frac{I_1}{I_2}\right)_i - \left(\frac{I_1}{I_2}\right)_o}{\left(\frac{I_1}{I_2}\right)_o} = \left[\left(\frac{R_i}{R_o} - 1\right) 10^3\right] 10^{-3} = \left[\left(\frac{R_i}{R_o} - 1\right) 10^3\right] \text{‰}$$

dove ‰ = 10^{-3} . La definizione precedente è consigliata ufficialmente dalla IUPAC. Dal momento che il valore di $\delta_{i/o}$ è in genere $\ll 1$, si utilizza il valore

$$10^3 \delta_{i/o} = \left(\frac{R_i}{R_o} - 1\right) 10^3 \quad (\text{si noti: } \delta_{i/o} = 10^3 \delta_{i/o} \text{‰!})$$

Per far fronte all'errore strumentale correlato alla misura, si utilizzano spettrometri a doppio sistema di ingresso che consentono l'ingresso alternato nello strumento sia del gas campione che del gas standard (Figura 2).



Figura 2 - Spettrometro di massa a doppio sistema d'ingresso Thermo-Finnigan Delta Plus e Thermo-Finnigan HDO device

Durante la misura, questo tipo di spettrometro effettua più volte il confronto tra i due gas e al termine del ciclo il valore che si ottiene è la media di tutti i confronti effettuati.

Spettrometria di massa a flusso alternato e a flusso continuo di elio

Nello spettrometro a flusso alternato (dual inlet) lo standard ed il campione entrano in maniera alternata nel tubo di misura. Nello spettrometro a flusso continuo il flusso d'elio, che fluisce in modo continuativo nella sorgente ad una velocità pari a circa 80 ml/min, svolge la funzione di “carrier” del gas relativo allo standard e di quello relativo al campione. Il vuoto all'interno dello spettrometro è dell'ordine di 10^{-6} mm Hg.

IsoPrime100 IRMS, Elementar vario PYRO cube (OH/CNS pyrolyzer/EA)

Le analisi isotopiche di carbonio, azoto e zolfo svolte presso l'Istituto Jožef Stefan hanno visto l'impiego dello spettrometro IsoPrime100 connesso all'analizzatore elementare Vario PYRO Cube [IsoPrime100-Vario PYRO Cube (OH/CNS Pyrolyser/Elemental Analyzer) (IsoPrime, Cheadle, Hulme, UK)].

Brevemente, sono stati pesati 2,5 mg di caseina e 2,5 mg di campioni di dieta in una capsula di stagno con l'aggiunta della stessa quantità di WO_3 (triossido di tungsteno), capsula che è stata poi inserita nel campionatore automatico dell'analizzatore elementare.

I risultati per carbonio e azoto sono stati normalizzati rispetto ai seguenti materiali di riferimento internazionali: USGS61 e USGS62 con valori $\delta^{13}C$ di $-35,05 \pm 0,04\%$ e $-14,79 \pm 0,04\%$, rispettivamente per valori di carbonio e valori $\delta^{15}N$ di $-2,87 \pm 0,04\%$ e $+20,17 \pm 0,06\%$, rispettivamente per l'azoto.

Mentre, per quanto riguarda lo zolfo, i risultati sono stati normalizzati rispetto ai materiali di riferimento internazionali: IAEA-S-3 e USGS43 con valori $\delta^{34}S$ di $-32,49 \pm 0,08\%$ e $+10,46 \pm 0,22\%$, rispettivamente.

Per il controllo indipendente sono stati utilizzati: un materiale di riferimento internazionale USGS43 con valori $\delta^{13}C$ di $-21,28 \pm 0,10\%$ e valori $\delta^{15}N$ di $+8,44 \pm 0,10\%$ e in aggiunta un materiale di riferimento di laboratorio per la caseina CRP-IAEA (“casein protein powder”) con valori $\delta^{13}C$ di $-20,3 \pm 0,09\%$, valori $\delta^{15}N$ di $+5,62 \pm 0,19\%$ e valori $\delta^{34}S$ di $+4,18 \pm 0,74\%$.

Per quanto riguarda la frazione grassa del latte, 2,5 mg di campioni di grasso di latte sono stati pesati in una capsula di stagno ed inserita nel campionatore automatico dell'analizzatore elementare per la determinazione dei valori di $\delta^{13}C$. I risultati sono stati normalizzati rispetto ai seguenti materiali di riferimento internazionali: USGS61 e USGS62 con valori $\delta^{13}C$ di $-35,05 \pm 0,04\%$ e $-14,79 \pm 0,04\%$. Per il controllo indipendente sono stati utilizzati: un materiale di riferimento internazionale USGS43 con valori $\delta^{13}C$ di $-21,28 \pm 0,10\%$ e un materiale di riferimento di laboratorio per la caseina CRP-IAEA con valori $\delta^{13}C$ di $-20,3 \pm 0,09\%$.

Le condizioni di lavoro per le misure isotopiche di CNS impostate nell'analizzatore elementare Vario PYRO Cube sono elencate nella tabella seguente (Tabella 2):

Combustion tube: 1080 °C
Reduction tube: 850 °C
He flow: 230 mL/min
O ₂ dosing time: 70 s
Desorption of CO ₂ at 110°C
Desorption of SO ₂ at 240°C

Tabella 2 – Condizioni di lavoro di Elementar vario PYRO cube

Spettrometria di massa con sorgente al plasma (ICP-QQQ)

La strumentazione ICP-QQQ è una tecnica analitica per la determinazione quantitativa di elementi in tracce che sfrutta il principio del rapporto massa su carica.

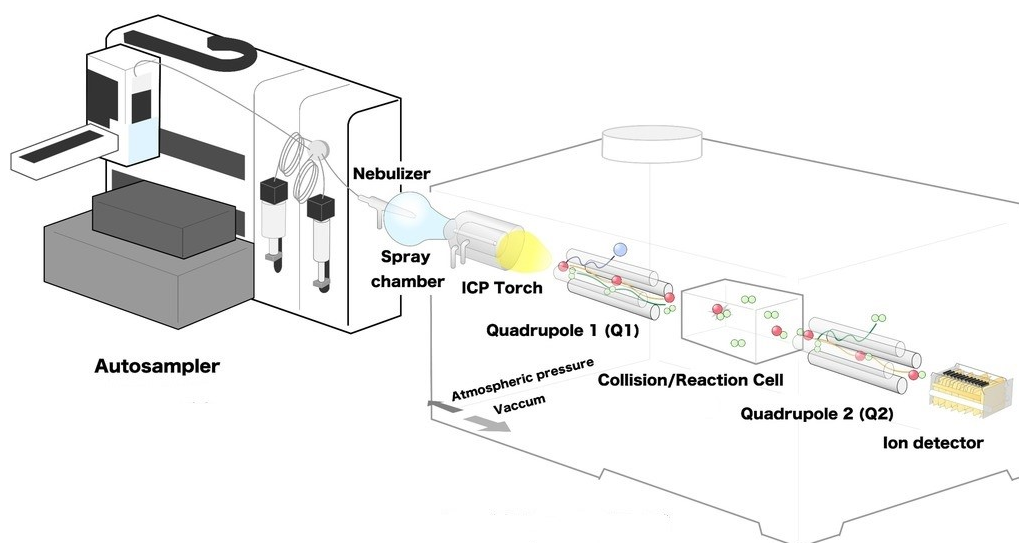


Figura 3 – Diagramma in sezione dello strumento ICP-QQQ

Lo strumento (Figura 3) si compone di:

- **Sistema di introduzione del campione:**

I componenti base del sistema di introduzione sono:

- Auto campionatore
- Pompa peristaltica
- Camera di nebulizzazione

- Iniettore di torcia

Il campione mediante l'ausilio della pompa peristaltica viene mandato al nebulizzatore che viene successivamente trasportato nella torcia dal gas (Ar). Esiste un'ampia gamma di nebulizzatori, a seconda del tipo di matrice con cui si lavora. Nella camera di nebulizzazione avviene una selezione dimensionale del nebulizzato, permettendo solo alla frazione più fine di arrivare al plasma.

- **Torcia al plasma:** sistema composto da tre tubi di quarzo concentrici attorno ai quali è avvolta una bobina di induzione magnetica (bobina di Tesla). La temperatura può raggiungere i 10000 K provocando la desolvatazione, la vaporizzazione, l'atomizzazione, ed infine la ionizzazione del campione.

Nel tubo più esterno l'Ar transita con una velocità di flusso compresa tra 11 e 17 L/min e ha la funzione di raffreddare le pareti della torcia e di alimentare lo stesso plasma; nel tubo intermedio, invece, il flusso di Ar presenta una velocità compresa tra 1.2 e 1.9 L/min e ha il compito di mantenere a giusta distanza il plasma dalla punta dell'iniettore, evitandone una sua fusione. Infine, nel terzo tubo (quello più interno) il passaggio dell'Ar ha la funzione di trasportare il campione dal nebulizzatore al plasma.

Nella bobina di Tesla ha inizio la formazione del plasma di argon costituito da grandi concentrazioni di ioni Ar^+ ed elettroni liberi: la bobina induce un campo magnetico, il quale accelera gli elettroni che, urtando contro gli atomi di argon, originano altri ioni Ar^+ ed elettroni liberi. È possibile cambiare la temperatura della torcia variando la frequenza del generatore di radiofrequenza che alimenta la bobina. In caso di temperatura non sufficientemente elevata si potrebbero avere una diminuzione della sensibilità della misura.

Il maggior numero di elementi si trasforma in ioni monocarica. Alcuni elementi invece, che presentano potenziale di ionizzazione superiore a quello dell'argon, non possono ionizzare. In questo ultimo caso si utilizza l'elio, che ha un potenziale di ionizzazione maggiore.

- **Interfaccia ICP-QQQ**

La zona più critica in un'analisi ICP-QQQ è la zona in cui gli ioni passano dal plasma all'analizzatore di massa. L'interfaccia è costituita da due coni concentrici di rame, che presentano due orifizi in cui il plasma viene convogliato. Tra i due orifizi viene creata una zona di vuoto. Il foro più esterno, detto "*sample cone*", presenta un diametro di circa 1 mm, per ridurre la probabilità di venire occluso da eventuali incrostazioni. Il flusso del campione, dopo essere passato attraverso il *sample cone*, assume una velocità supersonica raggiungendo così in pochi microsecondi il secondo meato, detto "*Skimmer cone*". Lo "*Skimmer cone*", presenta un diametro di circa 0.4 mm. Affinché nell'analizzatore di massa entrino solo gli ioni positivi, vi è un sistema di lenti subito dopo lo "*Skimmer cone*" che assolve a questa funzione. Il sistema di lenti di trasferimento è composto da:

- a. lenti ioniche;
- b. lenti di focalizzazione;
- c. lenti di trasferimento;

Le lenti ioniche, possedendo una d.d.p. negativa, hanno il compito di selezionare gli ioni positivi, dando loro l'energia cinetica necessaria per raggiungere il detector. Le lenti di trasferimento e di focalizzazione, invece, hanno il compito di convogliare verso il centro gli ioni, garantendo un flusso costante che entra nella fenditura dell'analizzatore di massa, favorendo così al massimo la sensibilità dello strumento.

- **Cella di collisione o di reazione (ORS³)**

Nel plasma si possono formare specie poliatomiche da reazioni di combinazione tra gli analiti e le specie del plasma. Queste possono dar luogo ad interferenze, in quanto possono presentare la stessa massa di uno ione su cui si esegue l'analisi. È riportato in letteratura che le specie interferenti presenti più frequentemente sono comprese in un range di 36-65 amu (Scott D. Tanner et al., 2002).

Per evitare il problema legato ai possibili interferenti si utilizza la cella di collisione o di reazione, in grado di rimuovere le interferenze in fase gassosa lasciando inalterato l'analita ionizzato, se utilizzato nella modalità di collisione, o formando un composto ionico nel caso si utilizzi la modalità di reazione (per esempio un addotto con l'ammoniaca se si utilizza come gas NH₃ o un ossido nel caso si utilizzi O₂). La cella di collisione è situata subito dopo il primo analizzatore (Q1) ed è composta da un ottapolo situato all'interno di una cella, che ha il compito di confinare il fascio di ioni e focalizzarlo verso il secondo quadrupolo (Q2). In questa tesi di dottorato la cella ORS³ è stata utilizzata solo in modalità di collisione. In questo caso, la rimozione delle interferenze avviene mediante una semplice collisione-reazione con un gas che è insufflato all'interno della cella (in questo caso He). La pressione parziale del gas all'interno della cella, proporzionale al flusso con cui è instillato (max flow 12mL/min per He), controlla il libero cammino medio degli ioni e la frequenza con cui avvengono le collisioni tra specie interferenti e gas. Per questo motivo è necessario trovare dei valori di pressione parziale adatti per eliminare le specie poliatomiche e per non interferire con gli ioni dell'analita. Vi sono quattro diversi tipi di meccanismi che possono avvenire nella cella di collisione:

1. *collision-induced dissociation (CID)*;
2. *chemical reaction (CR)*;
3. *electron transfer (ET)*;
4. *collisional retardation and differential transmission (KDE)*.

Nel primo caso (CID) la collisione tra gas e specie poliatomica è in grado di rompere il legame tra gli atomi di quest'ultima, rimuovendo così l'interferenza. Questo, però, è un meccanismo poco efficace in quanto per rompere un legame occorre molta energia che una semplice collisione non è in grado di fornire. Nel secondo caso (CR) una molecola di gas e una specie interferente collidono formando due specie che sono date dalla combinazione di un atomo del gas e uno della specie interferente. In questo caso il meccanismo può però creare nuovi ioni che possono essere interferenti con le specie atomiche dell'analita. Nel terzo caso (ET), invece, la collisione tra gas e interferente provoca il trasferimento di un elettrone, rendendo neutra la specie poliatomica. È un meccanismo efficiente che richiede la seguente condizione: l'energia di ionizzazione del gas deve essere minore rispetto alla specie interferente. Nel quarto meccanismo (KDE), infine, la collisione tra le specie poliatomiche e le molecole di gas provoca urti anelastici con conseguente trasferimento di energia dagli interferenti alle molecole di gas. Questo trasferimento di energia può avvenire anche tra gas e analita, ma con una probabilità molto minore; gli ioni atomici, infatti, presentano dimensioni minori rispetto alle specie poliatomiche, avendo una minore frequenza di urti con il gas. Ogni qualvolta avviene uno scontro gas-interferente, quest'ultimo perde energia cinetica. Per passare dalla cella all'analizzatore di massa, le specie devono superare una barriera imposta da un potenziale. Questo è il fattore di discriminazione: solo gli ioni con una certa energia cinetica (KE) riescono a passarlo. Poiché le specie poliatomiche hanno perso energia durante le collisioni, esse rimangono nella cella, collidono con le barre dell'ottupolo divenendo molecole neutre e successivamente trasportate fuori mediante un sistema di pompa a vuoto.

- **Analizzatore:** è un sistema che discrimina gli ioni prodotti in base al loro rapporto massa/carica. Gli analizzatori di massa vengono suddivisi in analizzatori a fascio e analizzatori a trappola. I più diffusi sono gli analizzatori a quadrupolo (analizzatori a fascio). Questi si compongono di quattro barre cilindriche o iperboliche con applicati (a coppie) un potenziale in corrente continua ed uno in corrente alternata a radiofrequenza. Facendo variare il primo rispetto al secondo è possibile cambiare le traiettorie dei rapporti massa/carica e compiere una scansione di massa (solo gli ioni con traiettorie stabili sono in grado di attraversare l'analizzatore ed arrivare al rivelatore). Gli analizzatori a quadrupolo, attraverso un campo magnetico quadrupolare oscillante, sono quindi sistemi capaci di separare gli ioni a seconda della stabilità delle traiettorie dei rapporti massa/carica. In questo caso si hanno due diversi quadrupoli, Q1 e Q2. Il primo filtro di massa quadrupolare (Q1) si trova dopo la lente ionica off-axis, e filtra gli ioni provenienti dal plasma, selezionando le masse che possono entrare nell'ORS³. Il secondo filtro di massa quadrupolo (Q2) si trova dopo l'ORS³ e filtra gli

ioni che emergono dalla cella di collisione / reazione, selezionando solo le masse che vengono passate al rivelatore.

- **Rivelatore:** strumento in grado di generare una corrente elettrica proporzionale all'abbondanza degli ioni incidenti. Questi strumenti necessitano di un sistema di amplificazione in quanto il numero di ioni che in un dato istante attraversa l'analizzatore non è sufficiente per avere un segnale. L'amplificazione avviene grazie alla presenza di dinodi, i quali, una volta colpiti da un fascio di ioni ad alta energia, emettono elettroni a cascata. Ciò provoca una crescente amplificazione del segnale, il quale viene elaborato successivamente dal computer. Gli elettromoltiplicatori sono i detector più diffusi nella spettrometria di massa poiché, oltre ad essere affidabili e robusti, presentano tempi di risposta brevi (nell'ordine di grandezza dei nanosecondi) e un ottimo ampliamento del segnale.

Lo strumento fornisce, per ogni elemento analizzato, un segnale in CPS (Count Per Second). Questo segnale viene poi confrontato con le rette di taratura che si ottengono da soluzioni standards a titolo noto.

Lo strumento utilizzato per le analisi elementari dei campioni è il modello Agilent 8800 ICP-QQQ (Figura 4). Per poter ottenere una buona ripetibilità ogni campione è stato analizzato in doppio.

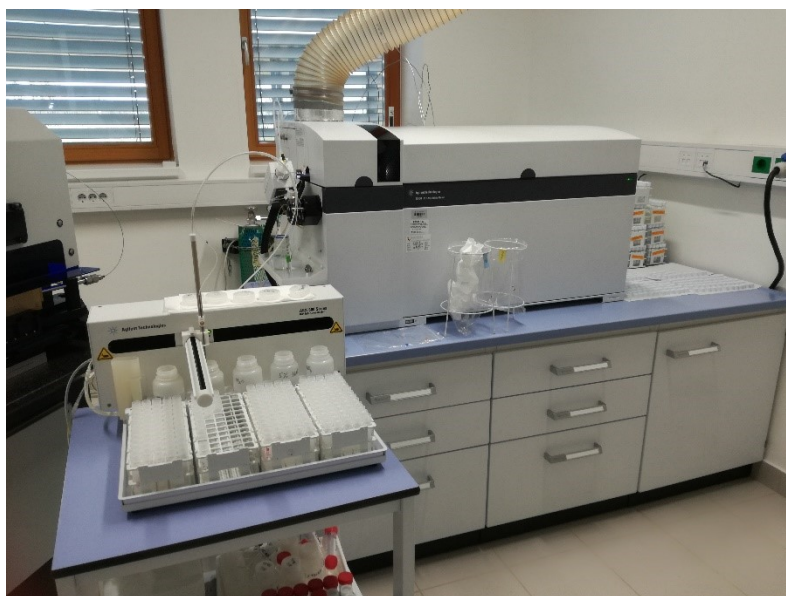


Figura 4 - Strumento ICP-MS presso il laboratorio di analisi dell'Istituto Jožef Stefan

Il risultato è espresso in concentrazione dell'elemento (g/g) e l'errore relativo sulla media dei dati (due ripetizioni per campione) è del 4%.

I parametri per la modalità di misurazione in “Tune mode He” sono riportati nelle due immagini seguenti (Figura 5a e 5b):

Acq Parameters	PeriPump/ISIS	Tune
#1: He	#2: H2	#3: O2
Scan Type		
Scan Type	MS/MS	
Plasma		
<input checked="" type="checkbox"/> All Parameters		
RF Power	1550	1550 500 - 1600 [W]
RF Matching	1.60	1.60 0.20 - 3.00 [V]
Smpl Depth	10.0	10.0 3.0 - 28.0 [mm]
Carrier Gas	1.09	1.09 0.00 - 2.00 [L/min]
Option Gas	0.0	0.0 0.0 - 100.0 [%]
Nebulizer Pump	0.10	0.10 0.00 - 0.50 [rps]
S/C Temp	2	2 -5 - 20 [C]
Gas Switch	<input checked="" type="radio"/> Makeup Gas <input type="radio"/> Dilution Gas	
Makeup Gas	0.00	0.00 0.00 - 2.00 [L/min]
Lenses		
Extract 1	0.0	0.0 -200.0 - 10.0 [V]
Extract 2	-200.0	-200.0 -250.0 - 10.0 [V]
Omega Bias	-105	-105 -150 - 10 [V]
Omega Lens	7.8	7.8 -50.0 - 50.0 [V]
Q1 Entrance	-5.0	-5.0 -50.0 - 20.0 [V]
Q1 Exit	-1.0	-1.0 -50.0 - 20.0 [V]
Cell Focus	-2.0	-2.0 -50.0 - 20.0 [V]
Cell Entrance	-50	-50 -150 - 10 [V]
Cell Exit	-60	-60 -150 - 10 [V]

Figura 5a – Parametri per la misurazione “Tune mode He”

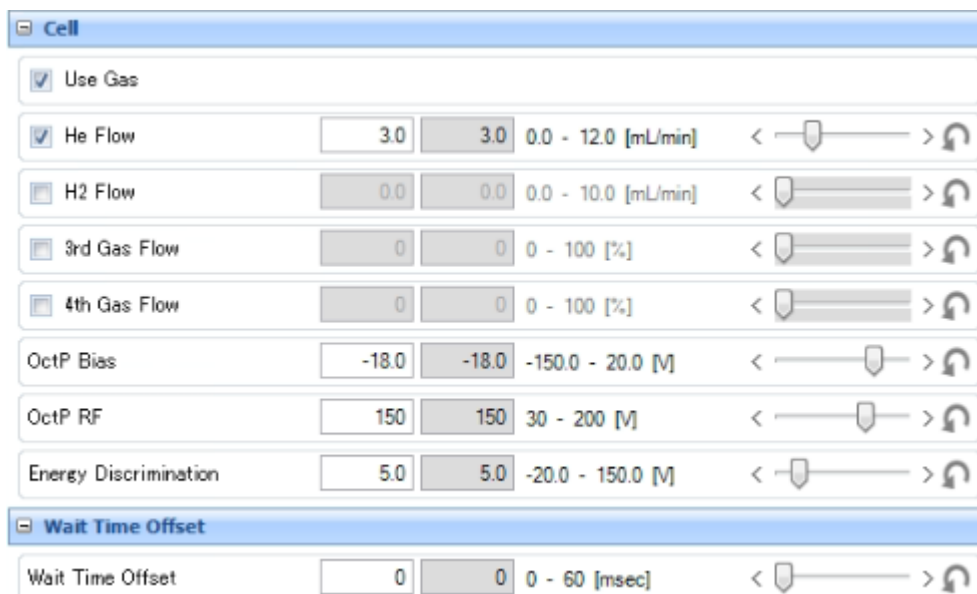


Figura 5b - Parametri per la misurazione "Tune mode He"

Linea di preparazione automatica Thermo-Finnigan HDO equilibrator

Come già accennato, per l'analisi dei campioni di acqua e siero del latte studiati si è utilizzata la linea di preparazione automatica Thermo-Finnigan HDO equilibrator collegata ad uno spettrometro di massa a doppio sistema d'ingresso Thermo-Finnigan Delta Plus (Figura 2).

Prima di illustrare la metodologia utilizzata, va precisato che per quanto riguarda i campioni di siero del latte essi hanno precedentemente subito un processo di distillazione, come già illustrato nel capitolo precedente, prima di essere sottoposti alla stessa procedura di analisi dei campioni di acqua. Nella procedura di analisi della composizione isotopica della molecola d'acqua delle acque ingerite e del siero, si porta il campione in equilibrio isotopico con un gas ultrapuro: CO₂ nel caso dell'ossigeno e H₂ nel caso dell'idrogeno. In questo ultimo caso è previsto anche l'utilizzo di un catalizzatore di platino allo scopo di velocizzare la reazione di scambio isotopico liquido-gas (Epstein & Mayeda, 1953; Horita J. et al., 1989; Avak & Brand, 1995).

La linea automatica si compone di 24 ampolle (Figura 6) all'interno delle quali sono inseriti 5 ml di campione e tre diverse acque a composizione isotopica nota (standard di laboratorio), calibrate contro lo standard internazionale V-SMOW, per permettere la calibrazione dei risultati durante l'elaborazione dei dati.

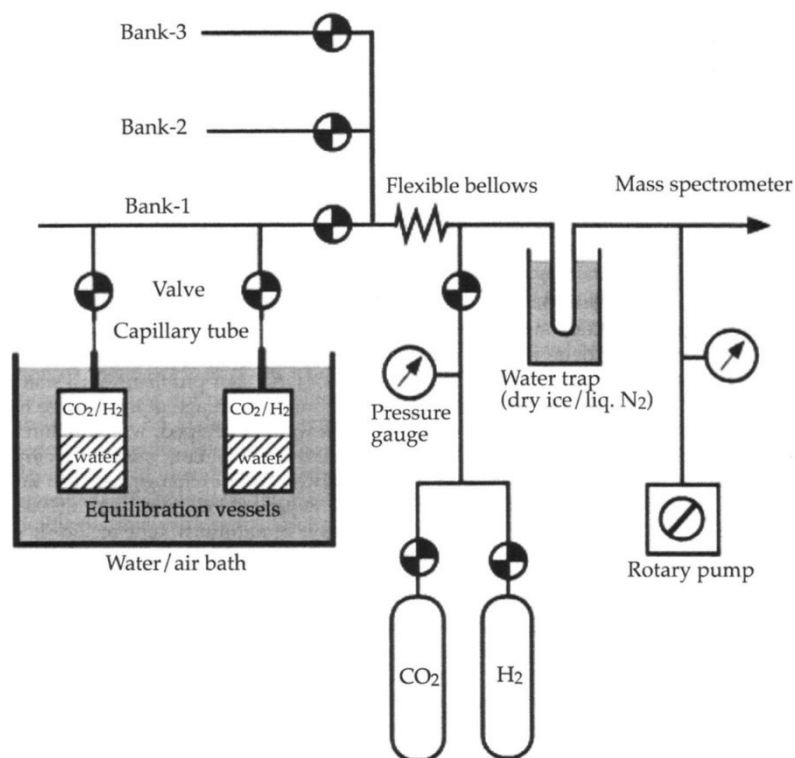
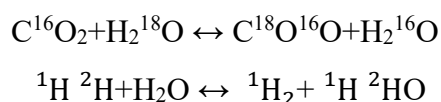


Figura 6 - Thermo Finnigan HDO equilibrator device: schema di funzionamento (Horita & Kendall, 2004)

Le ampolle, collegate alla linea attraverso valvole ad aria compressa, subiscono un degassamento (per un tempo di 120 secondi) che consente l'eliminazione dell'aria al loro interno; ciò viene effettuato con una pompa rotativa a doppio stadio che porta la pressione all'interno del sistema ampolle-acqua/ampolle-siero a 10^{-1} mbar. Successivamente si chiude il collegamento con la rotativa per aprire quello con la bombola di CO₂ o H₂: circa 500-600 mbar di gas purissimo si espandono all'interno delle ampolle. Una volta uniformata la distribuzione del gas al loro interno (pochi minuti), vengono chiuse le ampolle e prende avvio la fase di equilibratura: 540 minuti per l'analisi dell'ossigeno e 120 minuti per quella dell'idrogeno.

La temperatura di equilibratura è inferiore rispetto alla temperatura dell'ambiente circostante onde evitare la condensazione all'interno delle ampolle: queste si trovano parzialmente immerse in un bagno termostatico alla temperatura costante di 18°C.

Le reazioni di scambio isotopico attraverso le quali si raggiunge l'equilibrio sono le seguenti:



In pratica, soltanto il gas subisce una significativa variazione del rapporto isotopico in quanto il numero di molecole di acqua è enormemente superiore a quello contenuto nel gas.

Segue poi una fase di espansione libera in cui il gas, presente nella prima ampolla della sequenza di analisi, passa attraverso una trappola criogenica (contenete alcol etilico alla T di 80-90°C); la trappola blocca eventuali residui di vapore d'acqua che potrebbero compromettere la misura.

Al termine dell'analisi si esegue la calibrazione dei dati, la cui spiegazione è riportata in calce alla presente sezione di appendice (“La retta di regressione: generalità” e “La retta di taratura”).

Analizzatore elementare (EA)

Con l'impiego dell'analizzatore elementare (EA) è possibile determinare qualitativamente e quantitativamente l'abbondanza isotopica di un elemento (carbonio e azoto). Questo strumento si compone di un autocampionatore (50 posizioni consentite per i campioni,) che consente l'ingresso dei campioni nel dispositivo.

Le analisi isotopiche di carbonio e azoto del residuo secco del latte e dei campioni di dieta sono state effettuate utilizzando uno spettrometro di massa a flusso continuo di elio collegato all'analizzatore elementare EA/NA-1100 configurato CHN (Thermo Finnigan) (Figura 7).



Figura 7 – Analizzatore elementare EA/NA-1100 configurato CHN (Thermo Finnigan)

Sono due le reazioni che stanno alla base dell'analizzatore elementare: una prima reazione di combustione (flash combustion o ossidazione catalitica) ed una di riduzione hanno luogo all'interno di due tubi di quarzo (18,5x450 mm) (Figura 8).

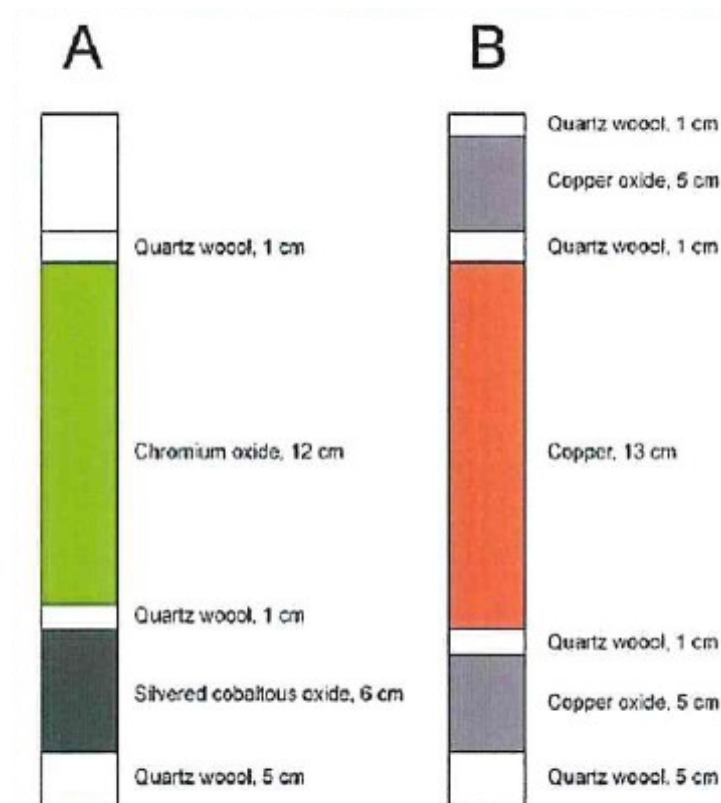


Figura 8 – Schema dei tubi di ossidazione (A) e di riduzione (B) del CHN (Thermo Finnigan, Operating Manual, 1998)

Una porzione del campione in analisi viene pesata in capsula di stagno. Le varie capsule sono inserite nelle cinquanta dell'autocampionatore. Da quest'ultimo, le capsule sono fatte cadere nel primo reattore, in cui sono presenti ossido di cromo e ossido di cobalto argentato: il campione subisce ossidazione alla temperatura di 1025°C.

Il flusso d'elio trasporta una quantità nota di ossigeno nel tubo in cui si svolge una reazione esotermica che porta il campione alla completa ossidazione alla temperatura intorno ai 1800°C (flash combustion); le sostanze organiche e inorganiche si trasformano in una miscela di gas (CO₂, NO_x e H₂O).

I prodotti della combustione entrano poi nel reattore di riduzione (temperatura di lavoro = 650°C) dove l'ossidazione del rame nativo consente la riduzione a N₂ degli ossidi di azoto.

L'eccesso di acqua è bloccato in una trappola di anidride (Mg(ClO₄)₂).

La miscela dei gas arriva allo spettrometro di massa grazie al flusso d'elio; i diversi gas sono separati mediante una colonna cromatografica. L'eluizione prevede la sequenza da N₂ a CO₂.

Gli standard utilizzati

Gli standard utilizzati per l'analisi isotopica dell'azoto sono:

Nitrato di potassio KNO₃: $\delta^{15/14}\text{N} = 4,7 \pm 0,2$ (errore standard della media)

Solfato di ammonio IAEA N°1: $\delta^{15/14}\text{N} = 0,4 \pm 0,2$

Solfato di ammonio IAEA N°2: $\delta^{15/14}\text{N} = 20,3 \pm 0,2$

Gli standard utilizzati per l'analisi isotopica del carbonio sono:

Grafite in polvere USGS-24: $\delta^{13/12}\text{C} = -16,0 \pm 0,1$

Olio ad alta densità NBS 22: $\delta^{13/12}\text{C} = -29,7 \pm 0,2$

Zucchero IAEA-CH-6: $\delta^{13/12}\text{C} = -10,4 \pm 0,2$

Per l'analisi elementare viene utilizzata l'UREA (CH_4NO_2) con percentuali note e fisse di azoto (46,65% in peso) e carbonio (20% in peso).

Gli standard sono misurati su 4-5 diversi prelievi e sono utilizzati per calcolare la retta di regressione che riporta i valori di delta misurati in funzione degli standard internazionali (PDB per C; SMOW per O; $\text{N}_2\text{-AIR}$ per N).

Si rimanda alla taratura svolta per l'idrogeno e l'ossigeno riportata in calce alla presente sezione di appendice ("La retta di regressione: generalità" e "La retta di taratura").

Multicollector-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (MC-ICPMS)

MC-ICPMS è uno spettrometro di massa ibrido che unisce i vantaggi di una ionizzazione effettuata attraverso una sorgente al plasma accoppiata induttivamente e la precisione delle misure degli ioni di uno spettrometro di massa multicollettore a settore magnetico.

Il MC-ICPMS si compone di tre parti principali:

- **sorgente ionica al plasma accoppiata induttivamente:** introducendo il campione nel plasma, quest'ultimo elimina gli elettroni creando ioni caricati positivamente i quali vengono accelerati attraverso un gradiente di potenziale elettrico e focalizzati in un raggio tramite fessure e piastre caricate elettrostaticamente;
- **analizzatore:** qui il fascio ionico viene filtrato, ovvero passa attraverso un filtro di energia e un campo magnetico, per produrre un raggio nel quale gli ioni contengono la stessa energia e possono essere separati in base al loro rapporto massa/carica;
- **serie di collettori:** i fasci vengono diretti nei collettori dove gli ioni sono convertiti in tensione. I rapporti isotopici sono calcolati attraverso il confronto tra le tensioni dei collettori.

L'alta efficienza di ionizzazione (circa il 100%) rende possibile l'analisi della maggior parte degli elementi della tavola periodica, inclusi quelli con un elevato potenziale di ionizzazione. È questo il vantaggio principale dell'MC-ICPMS.

Lo strumento utilizzato per determinare il rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dei campioni di latte liquido, acqua e dieta è il modello Nu plasma II multi-collector ICP-MS (Nu Instruments Ltd., Wrexham, United Kingdom) dotato di un sistema nebulizzatore Aridus II™ Desolvating Nebulizer System (Teledyne Cetac, Omaha, Nebraska, USA) dell'Istituto Jožef Stefan (Figura 9).

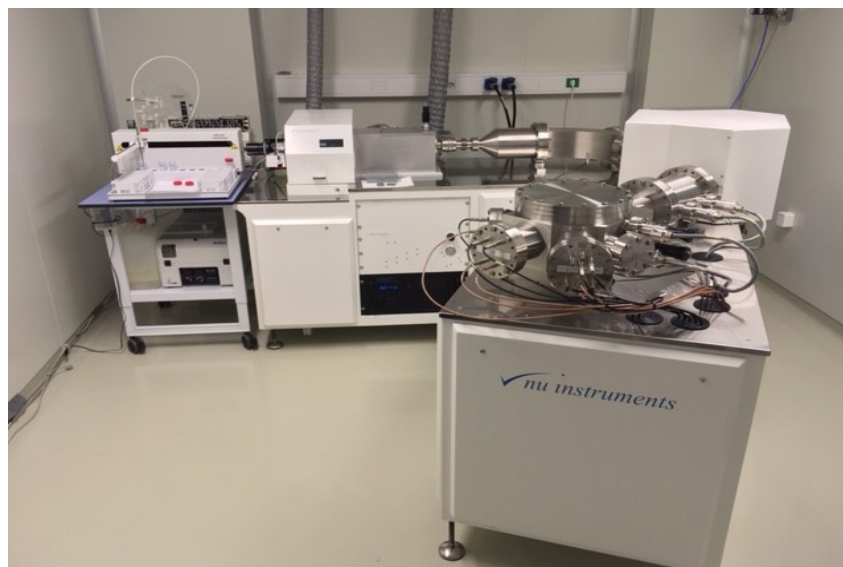


Figura 9 – Immagine dello strumento Nu plasma II multi-collector ICP-MS (Nu Instruments Ltd., Wrexham, United Kingdom) dotato di un sistema nebulizzatore Aridus II™ Desolvating Nebulizer System (Teledyne Cetac, Omaha, Nebraska, USA) presso il laboratorio di analisi dell'Istituto Jožef Stefan

Vengono qui ora presentate le condizioni di lavoro dello strumento MC ICP-MS (Tabella 3):

MC-ICP-MS	
RF power	1300 W
Plasma gas flow	13 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow	0.80 L min ⁻¹
Nebuliser gas pressure	38 psi
Sampler cone	Ni, aperture diameter 0.9 mm
Skimmer cone	Ni, aperture diameter 0.7 mm
Integration time	10 s
Number of cycles	30
Number of blocks	2
Mass assignment to Faraday cup detectors	H7 88
	H5 87
	H3 86
	H1 85
	L1 84
	L3 83

Tabella 3 - Parametri strumentali e operativi per MC ICP-MS

La discriminazione di massa strumentale è stata corretta mediante normalizzazione interna utilizzando il rapporto $^{86/88}\text{Sr} = 0,1194$ e le interferenze Rb e Kr sono state corrette matematicamente utilizzando i rapporti $^{87/85}\text{Rb}$ e $^{86/84}\text{Kr}$ di 0,3857 e 0,30353981 rispettivamente. Le misurazioni sono state eseguite seguendo il metodo di bracketing standard-campione-standard utilizzando NIST SRM 987 SrCO_3 (0.71034 ± 0.00026 , National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) come standard.

Fluorescenza ai raggi X (XRF – X Ray Fluorescence)

La fluorescenza ai raggi X è una procedura analitica non distruttiva che consente di determinare le concentrazioni elementari in molte matrici. Si tratta di un metodo di analisi accurato, affidabile e riproducibile.

Fondamentalmente l'analisi di fluorescenza ai raggi X consente di riconoscere la composizione di un campione attraverso lo studio della radiazione caratteristica emessa dai suoi atomi eccitati dai raggi X. Si basa quindi sul principio secondo il quale l'atomo colpito dai raggi X emette una serie di radiazioni X con lunghezza d'onda caratteristica.

I raggi X sono onde elettromagnetiche con lunghezze d'onda che si estendono da 80 nm (circa 15 eV) a 0,001 nm (circa 1,2 MeV) (Figura 10):

	Wavelengths	Energy (eV)	
	0.00001 nm	100 MeV	γ-rays
	0.0001 nm	10 MeV	
Medical X-rays	0.001 nm	1 MeV	Hard X-rays
	0.01 nm	100 keV	
	0.1 nm	10 keV	Soft X-rays
	1 nm	1 keV	X-rays
	10 nm	100 eV	
	100 nm	10 eV	UV
	1 μm	1 eV	Visible light
	10 μm	0.1 eV	
	100 μm	0.01 eV	IR
	1 mm	1 meV	microwaves
Cellular phones	1 cm	10 meV	
Radio emissions	1 m	100 meV	TV and FM radio waves
	10 m	1 μeV	

Figura 10 - Spettro della radiazione elettromagnetica

Quando un fascio di raggi X attraversa la materia, alcuni fotoni vengono assorbiti, altri diffusi (Figura 11):

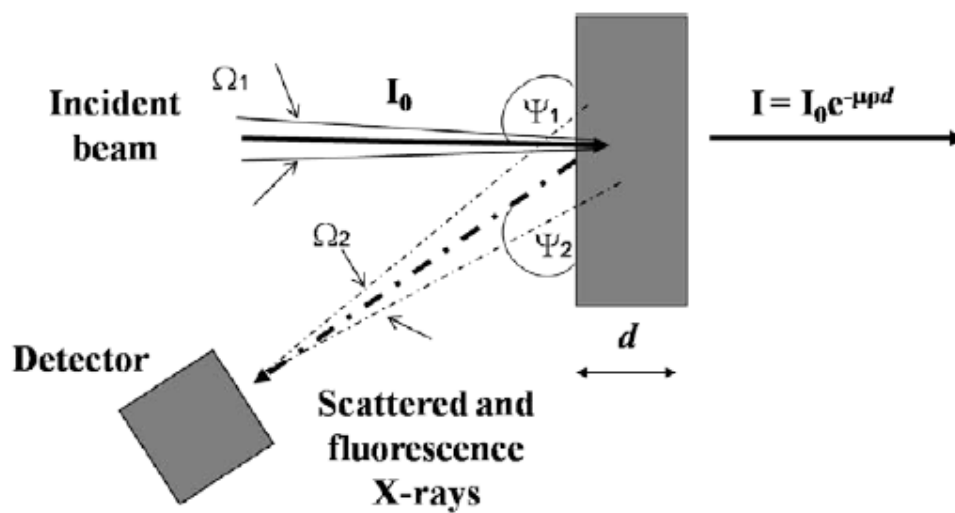


Figura 11 – Interazione dei raggi X con la materia

L'attenuazione del fascio

$$I = I_0 e^{-\mu \rho x}$$

Utilizzando le unità di misura, grammo g e centimetro cm, scriviamo:

μ (cm ² /g)	= coefficiente di assorbimento di massa
ρ (g/cm ³)	= densità
x (cm)	= spessore del materiale attraversato
I_0 (unità arbitrarie)	= intensità iniziale del fascio di raggi X
I (come per I_0)	= intensità finale del fascio di raggi X

Il fascio di intensità I_0 attraversa la materia di spessore x e densità ρ ed è ridotto ad un'intensità I .

La fluorescenza dei raggi X è indotta dall'eccitazione (ionizzazione) degli atomi che si trovano strettamente legati nei livelli atomici interni (Figura 12). Le energie devono superare le energie di legame degli elettroni K e L ed il processo prende il nome di *effetto fotoelettrico*.

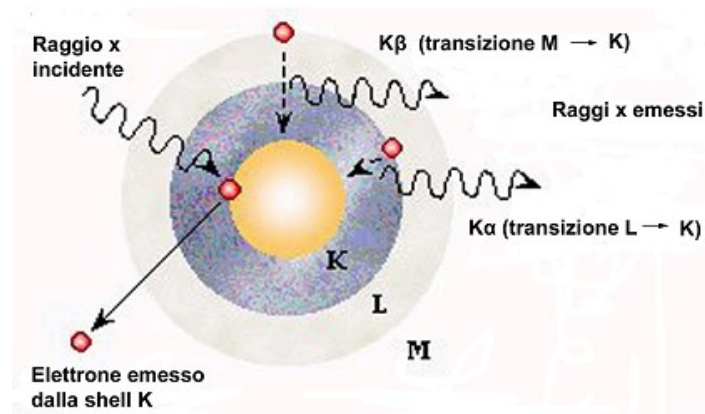


Figura 12 – Interazione di un atomo con raggi X (<http://www.icla.ic.cnr.it/fluorescenza.html>)

La lunghezza d'onda dei raggi X (serie K o serie L) emessi da un atomo sono caratteristiche dell'atomo stesso e la loro intensità è funzione del numero di atomi eccitati, cioè alla loro concentrazione. Le intensità corrispondenti alle varie lunghezze d'onda possono essere misurate (1) con opportuni rivelatori dopo diffrazione dei raggi X ottenuta mediante opportuni reticoli cristallini. (XRF a dispersione di lunghezza d'onda), oppure (2) utilizzando rivelatori allo stato solido (XRF a dispersione di energia). Per l'analisi dei campioni di questa tesi si è utilizzata la dispersione di energia (EDXRF) che descrivo brevemente qui di seguito.

Gli spettrometri EDXRF si compongono di due unità di base: la sorgente di eccitazione e il sistema di rivelazione (Figura 13). In questo caso la risoluzione dello strumento dipende da quella del rivelatore. Solitamente si utilizza un semiconduttore ad alta risoluzione intrinseca [Si (Li)]. I sistemi

EDXRF sono classificati in base al tipo di sorgente di eccitazione, alla geometria di eccitazione e al tipo di rivelatore a dispersione di energia.

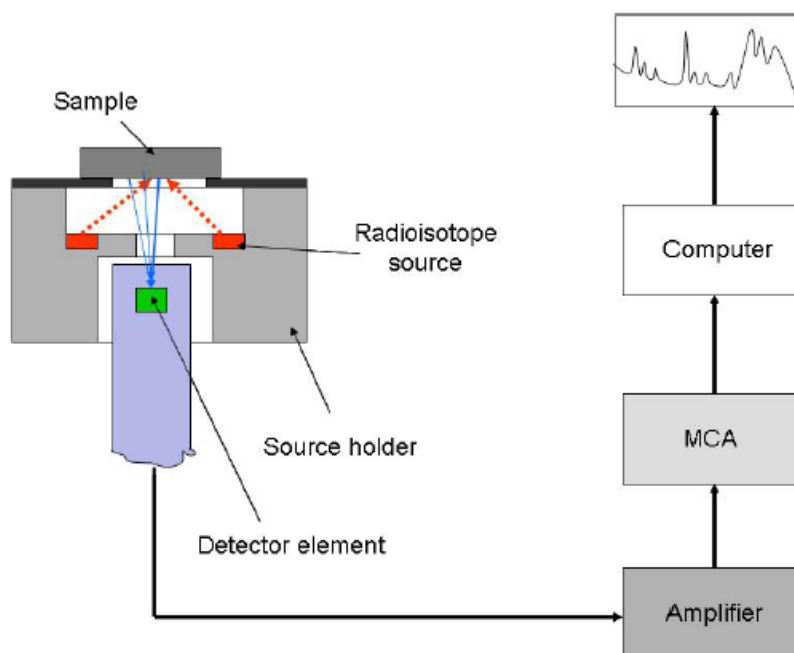


Figura 13 – Schema di un sistema XRF (*Use of X-Ray Fluorescence-Based Analytical Techniques in Phytoremediation, Nečemer et al., 2011*)

- **Fonti di eccitazione:** l'eccitazione degli elementi del campione è fornita tramite sorgenti radioisotopiche monocromatiche o radiazioni policromatiche da un tubo a raggi X. Le fonti più utilizzate includono Fe-55, Co-57, Cd-109 e Am-241. La singola sorgente radioisotopica non è sufficiente ad eccitare l'intera gamma di elementi presenti, così si utilizzano due o tre sorgenti.
- **Rivelatori:** il rivelatore di raggi X trasforma le energie dei fotoni in impulsi di tensione che se conteggiati forniscono una misura del flusso totale di raggi X. Ciò è dovuto al fatto che l'energia assorbita del fotone di raggi X che incide su di esso determina la dimensione della tensione risultante. Il fascio di radiazione policromatica fluorescente, che va ad incidere sul rivelatore, genera uno spettro con altezza dell'impulso proporzionale all'energia stessa. Un analizzatore multicanale acquisisce lo spettro e permette la discriminazione tra le linee di fluorescenza caratteristiche di ogni elemento. Tre sono i rivelatori più comuni: proporzionale al flusso di gas, a scintillazione e a semiconduttore (Si(Li), SiPIN, SiDrift e Hyperpure Ge detectors).

La determinazione degli elementi maggiori e in tracce effettuata sui campioni di latte liofilizzato e sui campioni di dieta è stata effettuata mediante uno spettrometro a raggi X a dispersione di energia (EDXRF) che si compone di un rivelatore Si(Li) (Canberra Industries, Meriden, U.S.A), un amplificatore per spettroscopia (Canberra M2024, Canberra Industries, Meriden, USA), un convertitore analogico-digitale (Canberra M8075, Canberra Industries, Meriden, USA) e un analizzatore multicanale (S-100 Canberra, Canberra Industries, Meriden, USA). Lo spettrometro è inoltre dotato di una camera sottovuoto (Fe-55) che consente la misura di elementi leggeri (da P a Cl) e la risoluzione energetica è 175 eV a 5,9 keV. Questo strumento si trova presso l'Istituto Jožef Stefan di Lubiana (Figura 14).



Figura 14 - Spettrometro a raggi X a dispersione di energia (EDXRF) presso il laboratorio di analisi dell'Istituto Jožef Stefan

La retta di regressione: generalità

Premessa

Per la grandezza X , mediante misure ripetute si sia valutata la riproducibilità delle misure stesse ottenendo la deviazione standard della media campionaria $s_{\bar{x}} = s_x/\sqrt{m'}$, dove m' rappresenta il numero di misure effettuate su X .

Grandezza X non soggetta ad incertezza, cioè $s_{\bar{x}} = 0$

Da n coppie di dati (X, Y) abbiamo

$$\hat{Y} = A + B X$$

o

$$\hat{Y} = \bar{Y} + B (X - \bar{X}) = \bar{Y} + B x \tag{1}$$

con errore standard della regressione $\sigma(yx)$ stimato da $s(xy)$.

Grandezza X soggetta ad incertezza, cioè $s_{\bar{x}} \neq 0$

Consideriamo una qualsiasi coppia di valori (X, Y) che definisce un punto che dista ΔX dalla retta di regressione; avremo che al valore ΔX corrisponderà il valore

$$\Delta Y = B \Delta X$$

Pertanto, utilizzando le varianze, possiamo scrivere

$$\sigma_{\bar{Y}}^2 \text{equivalente} = B^2 \sigma_{\bar{X}}^2$$

Sommando in quadratura la precedente a $\sigma(yx)^2$ (cf. Taylor, 1997, pp. 188-190), otteniamo

$$\sigma(yx)_{\text{tot}} = \sqrt{\sigma(yx)^2 + B^2 \sigma_{\bar{X}}^2} \quad (2)$$

Il valore $\sigma(yx)_{\text{tot}}$ è stimato mediante

$$s(yx)_{\text{tot}} \cong \sqrt{s(yx)^2 + B^2 s_{\bar{X}}^2}$$

Affidabilità di \hat{Y} come stima dell'altezza $\mu = A_0 + B_0 X$

È necessario sottolineare un punto importante che può sfuggire ad un'osservazione superficiale. Le incertezze stimate qui di seguito sono valutazioni dello scostamento che i valori ottenuti mediante la retta campionaria presentano rispetto alla retta di regressione dell'intera popolazione che costituisce il nostro termine di paragone. Pertanto, tutti i parametri riferiti alla retta dell'intera popolazione sono considerati come non affetti da incertezza.

Condizioni previste: distribuzione normale dei residui, omoschedasticità e indipendenza dei residui.

Data una certa popolazione, per ogni campione della popolazione mediante regressione si otterrà una certa retta (retta campionaria). Le diverse rette campionarie siano indicate con a, b, c, ... Dato un certo valore di X, per ognuna di queste rette si avrà un valore calcolato $\hat{Y}_a, \hat{Y}_b, \hat{Y}_c, \dots$, rispettivamente. Ognuno di questi valori rappresenta una media dei possibili valori di Y corrispondenti ad un valore X definito, ossia rappresenta una stima di μ , altezza della retta dell'intera popolazione corrispondente al valore X.

La stima di μ è effettuata soltanto con una retta campionaria. Pertanto, la domanda che ci si pone è la seguente: con quale affidabilità stimiamo μ attraverso il dato sperimentale \hat{Y} ricavato mediante una sola retta campionaria? Per rispondere alla domanda confrontiamo \hat{Y} , con μ : l'incertezza $u(\hat{Y})_\mu$ su $(\hat{Y} - \mu)$ tiene conto contemporaneamente dell'incertezza sulla stima di B_0 mediante il valore B e sulla stima di A_0 mediante in valore di A.

Scriviamo la relazione

$$\hat{Y} - \mu = \bar{Y} + Bx - (a_0 + B_0 x) = (\bar{Y} - a_0) + (B - B_0) x \quad (3)$$

dove \bar{Y} indica la media degli n valori Y utilizzati nella regressione e ricordiamo le due equazioni già viste

$$\mu = a_0 + B_0 x \quad (4)$$

$$Y = a_0 + B_0 x + \varepsilon \quad (5)$$

Sottraendo la (4) dalla (5) si ottiene

$$Y - \mu = \varepsilon$$

Per ognuno dei valori Y_1, Y_2, \dots, Y_n sperimentali del campione e $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_n$ dell'intera popolazione corrispondenti ai valori X_1, X_2, \dots, X_n potremo valutare l'errore $\varepsilon = Y - \mu$:

$$Y_1 - \mu_1 = \varepsilon_1$$

$$Y_2 - \mu_2 = \varepsilon_2$$

$$\dots = \dots$$

$$Y_n - \mu_n = \varepsilon_n$$

Facendo la media si ottiene

$$\frac{Y_1 + Y_2 + \dots + Y_n}{n} - \frac{\mu_1 + \mu_2 + \dots + \mu_n}{n} = \frac{\varepsilon_1 + \varepsilon_2 + \dots + \varepsilon_n}{n}$$

$$\bar{Y} - a_0 = \bar{\varepsilon} \quad (6)$$

dove \bar{Y} = media dei valori sperimentali Y_1, Y_2, \dots, Y_n corrispondenti ai valori X_1, X_2, \dots, X_n , a_0 = media dei valori μ della retta di regressione dell'intera popolazione corrispondenti ai valori X_1, X_2, \dots, X_n , $\bar{\varepsilon}$ = media degli scarti $\varepsilon = Y - \mu$ con varianza $\sigma_{\bar{\varepsilon}}^2 = \sigma(yx)^2/n$;

ovviamente il valore di $\sigma(yx)$ è stimato da $s(yx)$. Sostituendo nella (2), si ottiene

$$\hat{Y} - \mu = (a_0 + \bar{\varepsilon} - a_0) + (B - B_0) x = \bar{\varepsilon} + (B - B_0) x \quad (7)$$

B , stima di B_0 , ha una dispersione data da

$$s_B = s(yx) / \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = s(yx) / \sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2};$$

Come detto più sopra, i valori X sono assunti come non soggetti ad errore, cioè $s_{\bar{X}} = 0$.

Indicando $s^2_{\hat{Y} - \mu}$ con $s(\hat{Y})_{\mu}^2$, si ha pertanto

$$\begin{aligned} s(\hat{Y})_{\mu}^2 &= \left[\frac{\partial \hat{Y}}{\partial \bar{\varepsilon}} s_{\bar{\varepsilon}} \right]^2 + \left[\frac{\partial \hat{Y}}{\partial B} s_B \right]^2 = \\ &= \left[\frac{\partial \hat{Y}}{\partial \bar{\varepsilon}} \frac{s(yx)}{\sqrt{n}} \right]^2 + \left[\frac{\partial \hat{Y}}{\partial B} \frac{s(yx)}{(\sum_{i=1}^n x_i^2)^{0.5}} \right]^2 = \frac{1}{n} s(yx)^2 + s(yx)^2 \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n x_i^2} \end{aligned}$$

$$s(\hat{Y})_{\mu} = s(yx) \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n x^2}}$$

e

$$u(\hat{Y})_{\mu} = t_{\alpha(2), v=n-2} s(yx) \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n x^2}} \quad (8a)$$

Se consideriamo l'eventuale incertezza $s_{\bar{x}}$ inglobata nell'incertezza ottenuta su Y mediante la regressione, otteniamo

$$u(\hat{Y})_{\mu} \cong t_{\alpha(2), v=n-2} s(yx)_{\text{tot}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n x^2}} \quad (8b)$$

Si vede che $u(\hat{Y})_{\mu}$, incertezza sull'altezza media corrispondente al valore X, raggiunge il valore minimo per $x = X - \bar{X} = 0$ in quanto, in tal caso, è $x^2 / \sum_{i=1}^n x^2 = 0$. Si tenga sempre a mente che u è riferito ad un certo valore di significatività α (in genere noi ci riferiremo a $\alpha = 0.32$ o $\alpha = 0.05$).

In sintesi scriveremo

$$-u(\hat{Y})_{\mu} \leq \hat{Y} - \mu \leq u(\hat{Y})_{\mu}$$

Sottraendo \hat{Y} e moltiplicando per -1, si ottiene

$$\hat{Y} - u(\hat{Y})_{\mu} \leq \mu \leq \hat{Y} + u(\hat{Y})_{\mu}$$

Incetenza di predizione per un nuovo valore, Y_j , di Y

Un ulteriore uso della regressione consiste nella predizione di un *singolo nuovo* dato Y_j di Y corrispondente a un valore X_j di X per un *nuovo* individuo della popolazione (ad esempio un nuovo campione di acqua, di osso, etc.). Quale sarà l'incertezza $u(\hat{Y})_Y$ sul corrispondente singolo nuovo dato Y_j di Y calcolato mediante la retta di regressione?

Condizioni: distribuzione normale dei residui, omoschedasticità e indipendenza dei residui.

Il valore calcolato con la retta di regressione è sempre \hat{Y} ; ciò che cambia è l'incertezza che ora non è più riferita al valore medio μ , ma ad un dato Y. Abbiamo:

$$\hat{Y} - Y = \varepsilon + \bar{Y} + Bx - a_o - B_o x = \varepsilon + (\bar{Y} - a_o) + (B - B_o)x = \varepsilon + \bar{\varepsilon} + (B - B_o)x$$

In questo caso non si tratta più di valutare un'incertezza relativa alla differenza $\hat{Y} - \mu$, dove μ non è soggetta a incertezza, ma quella relativa alla differenza $\hat{Y} - Y$, dove ambedue gli addenti sono sottoposti a dispersione di valori. All'incertezza su \hat{Y} dovremo aggiungere anche l'incertezza su un nuovo singolo Y. Indicando $u(\hat{Y} - Y)$ con $u(\hat{Y})_Y$, per un nuovo singolo valore Y_j e tenendo presente il fatto che è $s_{B_o} = 0$, scriveremo:

$$s(\hat{Y})_Y^2 = \left[\frac{\partial(\hat{Y}-Y)}{\partial\varepsilon} s_{\varepsilon} \right]^2 + \left[\frac{\partial(\hat{Y}-Y)}{\partial\bar{Y}} s_{\bar{\varepsilon}} \right]^2 + \left[\frac{\partial(\hat{Y}-Y)}{\partial B} \frac{s(yx)}{\sum_{i=1}^n x^2} \right]^2 =$$

$$= s(yx)^2 + \frac{1}{n} s(yx)^2 + s(yx)^2 \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n x^2}$$

$$s(\hat{Y})_Y = s(yx) \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n x^2}}$$

e

$$u(\hat{Y})_Y = t_{\alpha(2), v=n-2} s(yx) \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n x^2}}$$

Se in $s(yx)$ inglobiamo anche l'incertezza su X , scriveremo

$$u(\hat{Y})_Y \cong t_{\alpha(2), v=n-2} s(yx)_{\text{tot}} \left[1 + \frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum x^2} \right]^{0.5} \quad x = X - \bar{X} \quad (10)$$

Pertanto: $-u(\hat{Y})_Y \leq \hat{Y} - Y \leq +u(\hat{Y})_Y$

da cui $\hat{Y} - u(\hat{Y})_Y \leq Y \leq \hat{Y} + u(\hat{Y})_Y$

La retta di taratura

La retta di taratura è una retta di regressione applicata ai valori δ ottenuti sperimentalmente.

Si riporta un esempio di taratura mediante due standard ST_1 e ST_2 con valori isotopici $\delta_{ST_1/o}$ e $\delta_{ST_2/o}$ accettati dalla comunità internazionale. Per lo standard ST_1 si abbiano k_{ST_1} dati sperimentali $Y_{ST_1,m} = \delta_{ST_1,m/w} + 1$, per lo standard ST_2 , k_{ST_2} dati $Y_{ST_2,m} = \delta_{ST_2,m/w} + 1$, dove m indica valore misurato e w è lo standard di lavoro (ad esempio gas CO_2 in bombola, al quale vengono riferiti i rapporti isotopici misurati sul campione). Assumiamo inizialmente che l'errore sui valori accettati dalla comunità internazionale $\delta_{ST_1/o}$ e $\delta_{ST_2/o}$ sia irrilevante rispetto a quello commesso sui valori misurati $\delta_{ST_1,m/w}$ e $\delta_{ST_2,m/w}$. Consideriamo la regressione OLS (Retta di Regressione Ordinaria) per l'origine delle coordinate $\delta + 1$:

$$\delta_{st,m/w} + 1 = (B \pm s_B) (\delta_{st/o} + 1) + (A \pm s_A)$$

e, per i campioni

$$\hat{\delta}_{i,m/w} + 1 = B (\delta_{i/o} + 1) + A$$

dove s_B e s_A sono gli errori standard sulla pendenza B e sull'intercetta A . Si noti che se la linearità è buona e gli standard utilizzati non sono soggetti a errore sistematico, l'intercetta A non deve essere significativamente diversa da zero. Questa regressione può essere fatta semplicemente utilizzando il Programma EXCEL: Dati \rightarrow Analisi dati \rightarrow Regressione.

Per la stima, $\hat{\delta}_{i/o}$, del valore $\delta_{i/o}$ dei campioni in analisi, useremo la retta precedente rovesciata, ossia:

$$(\hat{\delta}_{i/o} + 1) = \frac{1}{B} (\delta_{i,m/w} + 1) - \frac{A}{B} \quad (2)$$

Le incertezze si calcolano come indicato nel paragrafo precedente. I valori per i diversi isotopi sono riportati in vari punti del testo.

Appendice 5

Isotope partitioning between cow milk and drinking water: a further tool for identification of milk provenance

Marta Boito¹, Paola Iacumin^{1*}, Mattia Rossi¹, Nives Ogrinc³ & Giampiero Venturelli^{1,#}

¹ Department of Chemistry, Life Sciences, and Environmental Sustainability, Parco area delle Scienze 157/A, University of Parma, 43124 Parma (Italy)

² Department of Environmental Sciences, Jožef Stefan Institute, Jamova 39, 1000 Ljubljana (Slovenia)

#, now retired

Correspondence to [*paola.iacumin@unipr.it]

RATIONALE: The isotopic composition, $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ and $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$, of farm water drunk by cows and water component of the milk collected during one year from 9 Italian dairy farms were studied. The aim was to verify the relation between milk composition, farm water and seasonal temperatures.

METHODS: Milk was centrifuged to separate the solids and then distilled under vacuum to separate water. $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ and $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$ analyses of the water molecules were carried out using a water equilibrator online with a mass spectrometer. For oxygen and hydrogen isotope determination, water was equilibrated with pure CO_2 for 7.5 hours and with pure H_2 for 5 hours, respectively. The isotope ratio value is indicated with δ (expressed in the VSMOW/SLAP scale) as defined by IUPAC.

RESULTS: The slope of each line $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{M}}$ on $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ for the milk water is lower than that for the farm waters and the slopes obtained for the single cattle sheds are positively correlated with the local annual average temperature. The values $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ for milk vs values $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{W}}$ for water and values $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{M}}$ vs $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{W}}$ are significantly correlated. The apparent milk/water fractionation factor, $^{18/16}\alpha_t$, values are correlated with the time, t , of sampling and the relation is well described by a 2^d order polynomial regression line, $^{18/16}\hat{\alpha}_t = Ct^2 + Bt + A$. The $^{18/16}\alpha_t$ and the average temperature of the two weeks preceding the monthly sampling are also strongly correlated for all the cattle sheds ($R^2 \geq 0.67$).

CONCLUSIONS: The use of the polynomial line calculated for different areas could be used as an additional tool to verify the origin of milk. Extending the investigation over several years, we think that the results presented in this paper may contribute to the control of the compatibility between

water and milk produced in a narrow geographic area and to the understanding of the animal behaviour.

Key words: cow milk and farm water, oxygen and hydrogen isotopes, isotope partitioning

1. Introduction

A lot of empirical studies have demonstrated the utility of stable isotope measurements on milk for verification of its origin. In fact, like many other natural products, also milk maintains the isotopic features acquired at the time of its production. Actually, the $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ and $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$ values (symbols used according to IUPAC-International Union of Pure and Applied Chemistry)⁶ of milk depends on the main sources of oxygen and hydrogen and on the animal metabolism. For cows, in addition to drinking water, plants can also represent a significant source of water in case the animals are feed on grass and silage (water represents up to 85% of grass, 75% of silage and 15% of hay). Very few studies directly compare the isotopic composition of milk water and drinking water (hereafter indicated as farm water) for both oxygen and hydrogen stable isotopes. For instance, Ehtesham et al.⁷ report an oxygen enrichment of approximately 4 ‰ in milk water compared to farm water and Kornexl et al.⁸ and Rossman⁹ an oxygen enrichment of 2-6 ‰ in milk water compared to ground water and other water sources. Milk water is found also to be more enriched in ^2H than farm water by about 11‰¹⁰. As far as the animal metabolism is concerned, Ritz et al.¹¹ report that the $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ of animal body water is not influenced solely by drinking water, but by the animal's metabolism as well. The study of Midwood et al.¹² shows that, in ruminants, methane production entails a ^2H enrichment in body water as a consequent of depletion in methane. Thus, summing up, we can state that the isotopic composition of milk water mostly depends on (1) farm water, (2) additional water from feed, (3) animal metabolism.

The present work looks in detail at the hydrogen and oxygen isotope values for milk in relation to the farm water during the different period of the years and to local temperature, that in some way influences the metabolism of the animal.

2. Materials and methods

2.1. Selection of cattle sheds.

With the aim of obtaining a random selection of the cattle sheds in the area of production of the "Parmigiano Reggiano" cheese, the area of milk production was subdivided in N pixels; the generic pixel p with position $p(x,y)$ (x,y are the geographic coordinates) may include one cattle shed. From these cattle sheds, we randomly selected a sample of 9 cattle sheds. Cattle sheds are located at Collecchio (Parma), Busseto (Parma), Castelnovo ne' Monti (Reggio Emilia), Guastalla (Reggio

Emilia), Baiso (Reggio Emilia), Palanzano (Parma), Gaggio Montano (Bologna), Pavullo (Modena), and Magnacavallo (Mantova) (Fig.1). In addition, four cattle sheds (Torrile, Villa Minozzo, Quattro Castella, Viarolo) were also sampled to verify the model proposed in this paper.

The farms are located from the plain to the mountains. The number of cattle per farm is higher than 40; in this way, possible influences on the milk isotope values linked to the individual animal (e.g.: different breed, physiological effects due to the different time since the last pregnancy, different age, etc.) have been averaged.

2.2. Samples

Hydrogen and oxygen isotope determinations were carried out monthly from February 2018 to January 2019 on a total of 108 samples of farm water and 108 samples of cow milk (daily average milk). Samples of farm water (100 cm³ in double cap containers) were stored in fridge at 2°C and milk (50 ml in double cap containers) in freezer at -20°C to avoid bacteria proliferation. Milk was centrifuged (4000 revolutions/minute for 4 minutes) to separate the solids and then distilled under vacuum to separate water.

2.3. Stable isotope analysis

$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ and $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$ analyses of the water molecule were carried out at the Isotope Geochemistry Laboratory of the University of Parma (Italy) using a water equilibrator (HDO device, Thermo-Finnigan, at 18°C) online with a Finnigan Delta XP mass spectrometer. For oxygen isotope determination, 5 cm³ of water was equilibrated with pure CO₂ for 7.5 hours, while for hydrogen isotopes, 5 cm³ of water was equilibrated with pure H₂ for 5 hours (platinum wire was used as a catalyser of gas-liquid equilibration). The isotope ratio value is expressed with δ (VSMOW/SLAP scale) that is defined according to IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry):

$$\delta(^aE/^bE)_{\text{sp/VSMOW}} = \frac{R(^aE/^bE)_{\text{sp}}}{R(^aE/^bE)_{\text{VSMOW}}} - 1 = \left[\left(\frac{R(^aE/^bE)_i}{R(^aE/^bE)_{\text{VSMOW}}} - 1 \right) 10^3 \right] \text{‰}$$

where $E = \text{O or H}$, $a = 18 \text{ or } 2$, $b = 16 \text{ or } 1$, $\text{sp} = \text{farm water (W) or milk water (M) sample}$, $R(^aE/^bE)_{\text{sp}}$ = ratio of the isotopic abundances of aE and bE , $\text{‰} = 10^{-3}$, VSMOW = primary international standard of reference. The standard “prediction uncertainties”^{13,14} for measurements of the samples were ± 0.08 for $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{W}}$ and ± 1 for $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{W}}$ in farm water and ± 0.15 for $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ and ± 1.5 for $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{M}}$.

3. Results and discussion

Table 1 shows hydrogen and oxygen isotope data for the nine cattle sheds analysed in the present study.

3.1. Oxygen and hydrogen isotopes in farm water and milk.

Fig. 2 reports the regressions $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$ on $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ for the isotopic values of farm waters (W),
$$\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_W = 8.36 (\pm 0.17) \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_W + 16.3 (\pm 1.6) \text{‰}, \quad (1)$$

with $R^2 = 0.96$, $s(yx) = 1.6$,

and for isotopic values of the milk water (M),

$$\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M = 6.36 (\pm 0.28) \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M - 5.3 (\pm 2.1) \text{‰}, \quad (2)$$

with $R^2 = 0.83$, $s(yx) = 3.2$,

where R^2 is the determination coefficient and $s(yx)$ the standard error on regression. Line (1) and (2) largely differs for both slope and intercept.

It is noteworthy, that, starting from a generic point P on line (1), evaporation should lead to a water trend straight-line with lower slope and intercept¹⁵, what actually occurs in our case for line (2). Thus, very probably, in addition to other metabolic processes, animal evapotranspiration plays an important role in defining the observed trend. Below, we will return on this argument. A similar, but more scattered trend $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M = 5.15 \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M - 7.24 \text{‰}$ ($R^2 = 0.54$) is reported by Ehtesham et al.⁷ for milk from New Zealand dairy farms.

3.2. Farm water (W)

Assuming, as a first approximation, that the standard deviation well represents the dispersion of the data, we observe that, with the exception of the cattle sheds of Pavullo, Gaggio, and Baiso, the standard deviation of $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_W$ (0.4-1.3 ‰) (Table 1) is similar to the prediction uncertainty; in turn, with the exception of the cattle shed of Pavullo, standard deviations of $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_W$ (0.05-0.13‰) is close to the prediction uncertainty. Thus, we conclude that most of farm waters do not change their isotope ratios during the year. When present, the variations are due to the contribution of different supplying sources during the year. This is particularly evident at Pavullo where $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_W$ and $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_W$ are well correlated ($R^2 = 0.97$).

The cattle-shed of Magnacavallo (Mantova province), not far from the Po river, gives an annual average $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_W = -11.33 \pm 0.05 \text{‰}$ (Table 1); this constancy over time excludes any mixing with recent precipitation, that have higher values in the Po plain^{16,17}, and indicates an old origin. Actually, Gorgoni et al¹⁸ and, more recently, Martinelli et al¹⁹ identified ground waters with $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_W$ values minor than about -10.5 ‰ (note that today the $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ of Po river is around -

9.5‰¹⁸); these waters, that are considered of Alpine origin, infiltrated dating back more than 9000 years ago. Farm waters of the cattle shed of Guastalla have $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{W}} = -9.40 \pm 0.05$ ‰, that indicate a mixed Alpine / Apennine origin.

Milk water (M). The standard deviations always are largely higher than the prediction uncertainty. As discussed below, this is due to the variation of the isotope values during the year. Despite the prevalent constancy of the isotopic features of the farm waters, during summer milk water is enriched in ¹⁸O and ²H, that could be due to the factors listed in the Introduction of this work: among them, during summer, animal evapotranspiration (metabolic effect) and, secondarily, ingestion of fresh grass with water enriched in heavy isotopes as a consequence of evapotranspiration in leaves²⁰⁻²². Heavy isotope enrichment is particularly evident at Castelnovo and Baiso, where the isotope data for milk exhibit bimodality both for hydrogen and oxygen. Actually, in these localities, during summer the animals are kept outdoor and also ingest fresh grass.

Not only for all the cattle sheds as a whole, but also for each cattle shed considered separately the slope of each line $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{M}}$ on $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ for the milk water is lower than that for the farm waters. Moreover, the obtained slopes are positively correlated with the average local annual temperature (Fig. 3), that supports an animal response to the local temperature.

3.2. Distribution of isotopes between farm water and milk water

The values $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ for milk vs values $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{W}}$ for water and values $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{M}}$ vs $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{W}}$ are significantly correlated (probability $p_{\text{slope}=0} \ll 0.00010$ for both the regression line) and the value of the determination coefficient are $R^2 = 0.41$ and $R^2 = 0.68$, respectively. The R^2 values indicate that about 41% of the variance of the $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ values and 69% of the variance of the $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{M}}$ values are explained by $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{W}}$ and $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{W}}$ of the farm water. In the case of annual average values for each cattle shed are considered, the determination coefficient becomes very high ($R^2 = 0.94$) for both oxygen and hydrogen, suggesting that the annual average values of $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ and $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{M}}$ for the different cattle sheds are very well explained by $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{W}}$ and $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{W}}$ of farm waters (in Fig. 4 averages isotope values for oxygen are reported as an example). In other words, the isotopic variation of water between the different localities is the most important cause of variation of the annual isotope values of milk. On the contrary, the monthly values are also determined by other factors.

3.3. The apparent isotopic fractionation factor between milk and farm water and its dependence on the sampling time

We indicate:

$\delta(^aE/^bE)_{W,t}$, generic value for water sampled at the generic cattle shed at the generic time t ; t is day number calculated starting from January 1st of a not-leap year;

$\delta(^aE/^bE)_{M,t}$, generic value for the milk sampled at the same cattle shed and at the same time t as for $\delta(^aE/^bE)_{W,t}$;

The isotope distribution between farm water (W) and milk (M) may be evaluated by the ratio

$$^{a/b}\alpha_t = \frac{\delta(^aE/^bE)_{M,t+1}}{\delta(^aE/^bE)_{W,t+1}},$$

that is the apparent isotope fractionation factor at the time t calculated for each couple of data $\delta(^aE/^bE)_{W,t}$, $\delta(^aE/^bE)_{M,t}$.

The important role of the sampling time on $^{a/b}\alpha_t$ is demonstrated and quantified by ANOVA (ANalysis Of VAriance) two-way. Assume as a first approximation that for all the cattle sheds the monthly sampling was performed at the same time \bar{t} , average value of the time of the monthly shed sampling. ANOVA two-way, where the columns are referred to the cattle shed i and the row to the time \bar{t} of sampling, indicates that most of the variance (s^2) of the $^{a/b}\alpha_t$ values is related to the time \bar{t} of sampling. This is particularly evident for oxygen: actually, $s_{\bar{t}(\text{row})}^2 = 0.508 \cdot 10^{-5}$ is largely higher than $s_{i(\text{column})}^2 = 0.097 \cdot 10^{-5}$; in addition, $s_{\text{error}}^2 = 0.021 \cdot 10^{-5}$ includes analytical error and other minor fluctuations. Concluding, the monthly isotopic values of the milk water are influenced mostly by the time of sampling and secondarily, by the cattle shed.

The relation between the $^{a/b}\alpha_t$ values vs the time, t , of sampling is well described by a 2^d order polynomial regression line, $^{a/b}\hat{\alpha}_t = Ct^2 + Bt + A$. For hydrogen and oxygen (108 couples of $^{a/b}\alpha_t$ and t data), we obtain:

$$^{2/1}\hat{\alpha}_t = -3.08 (\pm 0.36) \cdot 10^{-7} t^2 + 1.14 (\pm 0.14) \cdot 10^{-4} t + 1.0026 (\pm 0.0011) \quad (3)$$

with $n = 108$, $s(yx) = 3.7 \text{ ‰}$ (standard error of regression), $R^2 = 0.41$, and

$$^{18/16}\hat{\alpha}_t = -6.77 (\pm 0.52) \cdot 10^{-8} t^2 + 2.65 (\pm 0.19) \cdot 10^{-5} t + 1.00015 (\pm 0.00015) \quad (4)$$

with $s(yx) = 0.54 \text{ ‰}$, $R^2 = 0.62$.

This suggest that $^{a/b}\alpha_t$ depends on the seasonal environmental conditions, that, in turn, influences the animal metabolism. In particular, we considered the temperature \bar{T}_i , average temperature during the two weeks preceding the monthly sampling for each generic locality where the cattle shed i is

located, and the corresponding values $^{18/16}\hat{\alpha}_{t,i}$. Then, for each cattle shed we defined a regression line $^{18/16}\hat{\alpha}_{t,i} = B_i \bar{T}_i + A_i$. From the results reported in Table 2, we note that $^{18/16}\hat{\alpha}_{t,i}$ and \bar{T}_i are always strongly correlated ($R^2 \geq 0.67$) and thus that the temperature strongly influences the fractionation factor and, then, the $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ of milk.

Notably, the heavy isotope enrichment of the milk is related to the isotope fractionation along the water evaporation and pathway of CO_2 production. During summer, the dairy cow reacts to the high temperature by "restoring" its metabolism; the symptomatology will be characterized by an increase in body temperature from half a degree centigrade up and an increased respiratory rate of over 80 beats per minute directly affecting CO_2 production. This alters the metabolic water production and, as water is evaporated through lungs, enhances the oxygen isotope fractionation. Both during the attempt to acclimatize and in full heat stress, cow will drop milk production; a different production rate could directly modify the fractionation of oxygen in the udder between body and milk water^{11, 23}.

4. Evaluation of $\delta(^a\text{E}/^b\text{E})_{\text{M}}$ from $\delta(^a\text{E}/^b\text{E})_{\text{W}}$

It is very important to verify the coherency between the isotopic values of the milk in analysis and the farm water ingested by cow. We approach the argument in a simple way that, however, is sufficient to obtain an evaluation of the uncertainty on the estimated value $^{a/b}\hat{\alpha}_t$ at a given time t (number of days starting from January 1st) and thus on the value of $\hat{\delta}(^a\text{E}/^b\text{E})_{\text{M}}$ estimated from $^{a/b}\hat{\alpha}_t$ and $\delta(^a\text{E}/^b\text{E})_{\text{W}}$.

Consider equation (3) and (4) reported above. The coefficient of determination, R^2 , for regression (4) is largely higher than for regression (3). Thus, hereafter, calculations will be done considering only the polynomial (4) related to oxygen isotopes. This equation allow us to estimate the value $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ at any given time t . For the calculation of prediction uncertainty, $u(\hat{\alpha})$, on $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ we follow the approximate simple solution proposed by Jeter²⁴. We obtain:

$$^{18/16}\hat{\alpha}_t \pm u(\hat{\alpha}) \cong ^{18/16}\hat{\alpha}_t \pm t_{\alpha(2),v} \sqrt{s(\text{yx})^2 + \frac{s(\text{yx})^2}{n} + (t - t_{av})^2 S_{\text{B|C}}^2 + (t^2 - t_{av}^2)^2 S_{\text{C|B}}^2}$$

where $\alpha(2)$ refers to two-tail test, $t_{\alpha(2),v}$ = student's t at v = degree of freedom, $s(\text{yx})$ = standard error of regression, t_{av} = overall average value of the times of sampling during the years, $S_{\text{B|C}}$ = *conditional uncertainty* of B given a value of C, and $S_{\text{C|B}}$ = *conditional uncertainty* of C given a value of B. On the basis of all the data ($n = 108$), we obtain: $S_{\text{B|C}} = 4.71 \cdot 10^{-7}$, $S_{\text{C|B}} = 1.23 \cdot 10^{-9}$, $s(\text{yx}) \cong 0.00054$, and

$t_{0.32} \cong 1.00$. Thus, $u(\hat{\alpha}) \cong 0.54 \text{ ‰}$ (from 0.540 to 0.556 ‰) in the interval of $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ values considered (from 1.00035 to 1.00376).

The estimated $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ value at a defined time t may be used to calculate $\hat{\delta}_{M,t}$ from $\delta_{W,t}$ and *vice versa*. This evaluation is very useful to check the compatibility of a sample of milk with the farm water. We write:

$$\hat{\delta}_{M,t} + 1 = ^{18/16}\hat{\alpha}_t (\delta_{W,t} + 1) \quad (5)$$

As seen in the chapter “Materials and Methods”, the uncertainty on $\delta_{W,t}$ is very low (about 0.08 ‰) in comparison to the uncertainty on $^{18/16}\hat{\alpha}_t$ (about 0.54-0.56 ‰). Thus, the uncertainty $u(\hat{\delta}_M)$ is well estimated only by uncertainty on $^{18/16}\hat{\alpha}_t$, i.e. $u(\hat{\delta}_M) \cong u(\hat{\alpha})$.

Equation (4) has been verified using water and milk coming from other four localities of the investigated area: Torrile, Viarolo, Villa Minozzo, and Quattro Castella. The results are reported in Table 3. Excepting one case, the absolute difference between measured and calculated values for milk is lower than the standard prediction uncertainty; thus the agreement between measured and calculated values of milk is satisfactory. Thus, type (4) equations defined for different areas and renewed from time to time, could be used as an additional tool to verify the milk provenance.

5. Conclusions

The present study is focussed on the oxygen and hydrogen isotope fractionation between milk water and farm water. The following results are the most relevant:

- 1) For all the single cattle sheds, the slope of the regression lines $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M$ on $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M$ is always lower than the slope of the overall regression line defined by the farm waters. Moreover, the slope is inversely related to the average annual temperature of the different localities. This indicates a physiological response effect that is the same we should observe in the case the ingested water was affected by evaporation.
- 2) Only 41% of the variance of the $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M$ values and 68% of the variance of the $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M$ values is explained by the corresponding isotope values of the farm water. Thus, other factors such as environmental and metabolic factors and feeding strategies play a very important role.
- 3) On the contrary, the variation of the average annual isotope values of milk between the different cattle sheds is mostly due to the isotopic variation of the farm waters ($R^2 = 0.94$ for the regression milk water values on farm water values for both oxygen and hydrogen).

- 4) The variance of the α factor values is mostly dependent on the different collecting times rather than on the different cattle sheds. This supports the hypothesis that variation of temperature causes a physiological answer of the animals. Evapotranspiration is probably the most important response.
- 5) A second order polynomial regression explains well the dependence of the milk isotope features on the farm water isotopic composition: thus, the model allows the prediction of the milk water value from the farm water and *vice versa*. The extension of our investigation over several years in different areas could significantly contribute to studies of milk provenance.

Bibliography

1. Renou JP, Deponge C, Gachon P, Bonnefoy J-C, Coulon J-B, Garel J-P, Vérité R, Ritz P. Characterization of animal products according to its geographic origin and feeding diet using Nuclear Magnetic Resonance and Isotope Ratio Mass Spectrometry Part I: cow milk. *Food Chem.* 2004; 85:63-66.
2. Camin F, Perini M, Colombari G, Bontempo L, Versini G. Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope ratios of milk. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008; 22:1690-1696.
3. Camin F, Bontempo L, Perini M, Piasentier E. Stable isotope ratio analysis for assessing the authenticity of food of animal origin. *Compr Rev Food Sci Food Sav.* 2016; 15:868-877.
4. Crittenden R, Andrew A, LeFournour, M, Young, M, Middleton H, Stockmann R. Determining the geographic origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis. *Int. Dairy J.* 2007; 17:421-428.
5. Silva AV, Helie JF, Caxito, Fd, Monardes H, Mustafa A.F, Stevenson, R. Multi -stable isotope analysis as a tool of assessing the geographic provenance of dairy products: a case study using buffalo's milk and cheese samples from the Amazon basin, Brasil. *Int. Dairy J.* 2014; 35:107-110.
6. Coplen TB. Guidelines and recommended terms for expression of stable isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011; 25:2538-2560.
7. Ehtesham E, Hayman A, Van Hale R, Frew R. Influence of feed and water on the stable isotopic composition of dairy milk. *Int. Dairy J.* 2015; 47:37-45.
8. Kornexl BE, Werner T, Rossmann A, Schmidt, HL. Measurements of stable isotope abundances in milk and milk ingredients-a possible tool for origin assignment and quality control. *Food Res. Technol.* 1997; 205:19-24.
9. Rossman A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Rev. Int.* 2001; 17:347-381.

10. Chesson LA, Valenzuela LO, O'Grady SP, Cerling TE, Ehleringer JR Hydrogen and oxygen stable isotope ratios of milk in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:2358-2363.
11. Ritz P, Gachon P, Garel J-P, Bonnefoy J-C, Coulon J-B, Renou J-P. Milk characterization: effect of the bread. *Food Chem.* 2005; 91:521-523.
12. Midwood AJ, Haggarty I, McGaw BA, Robinson JJ. Methane production in ruminants: its effect on the doubly labelled water method. *A. Physiol Soc.* 1989; 257.6, R1488-R1495.
13. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1967.
14. Lavagnini I, Magno F. A statistical overview on univariate calibration, inverse regression, and detection limits: application to gas chromatography/mass spectrometry technique. *Mass Spectrom Rev.* 2006; 26:1-8.
15. Gonfiantini R. Environmental isotopes in lake studies In: Fritz P, ed. *Handbook of Environmental Geochemistry-The terrestrial environment, B, Volume B.* New York, NY: Elsevier Sciences; 1986:113-168.
16. Longinelli A, Selmo E. Isotopic composition of precipitation in Italy: a first overall map. *J Hydrol.* 2003; 270:75-88.
17. Iacumin P, Venturelli G, Selmo E. Isotopic features of rivers and underground waters of the Parma province (Northern Italy) and their relationships with precipitation. *J Geochem Explor.* 2009; 102:56-62.
18. Gorgoni C, Martinelli G, Sighinolfi G.P. Isotopic evidence of paleowaters in the Po sedimentary basin (Northern Italy). *Geochem J.* 1982; 16:51-61.
19. Martinelli G, Chahoud A, Dadomo A, Fava A. Isotopic features of Emilia-Romagna region (North Italy) groundwaters: environmental and climatological implications. *J Hydrol.* 2014; 519:1928-1938.
20. Dongmann G. The contribution of land photosynthesis to the stationary enrichment ^{18}O in the atmosphere. *Radiat Environ Biophys.* 1974; 11:219-225.
21. Flanagan LB, Comstock JP, Ehleringer JR. Comparison of modelled and observed environmental influences on the stable oxygen and hydrogen isotope composition of leaf water in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 1991; 96:588-596.
22. Farquhar GD, Lloyd J. Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In : Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar JD, eds. *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water relations.* San Diego, CA: Academic Press; 1993: 47-70.
23. Ritz P, Cole TJ, Couet C, Ecoward WA. Precision of DLW energy expenditure measurements: contribution of natural abundance variations. *Am J Phys.* 1996; 270(1Pt 1), E164-E169.

24. Jeter SM. Evaluating the uncertainty of polynomial regression models using Excel. *Proceedings of the 2003 American Society for Engineering Education Annual Conference & Exposition, American Society for Engineering Education*, Session 1365. 2003; pp. 8.542.1-8.542.16.

Acknowledgements

We are very grateful to Dr. E. Selmo for the isotope measurements.

Author Contributions

M.B. collected the samples and wrote a first draft. P.I. and G.V. put forward the idea of the paper, analysed the data, set up the model and revised the manuscript. N.O. and M.R. reviewed the manuscript.

Figure captions

Fig. 1. Location of the investigated cattle sheds (filled circle). The open circles refer to cattle sheds used for validation of the model reported in the text.

Fig. 2. Diagram $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$ on $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ for farm and milk water. Cross = farm water; open circle = milk water (data are referred to VSMOW)

Fig. 3. Relation between the slope $= \frac{\partial \delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M}{\partial \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M}$ for each cattle shed and the Annual Mean Temperature of the cattle shed localities (February 2019-January 2019). For the regression reported is $p_{(\text{slope}=0)} = 0.03$, $R^2 = 0.53$). At Castelnovo ne' Monti (CN) and Baiso (BA) during summer the animals are kept outdoor.

Fig. 4. Relation between the average values $10^3 * \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ for water in milk (M) and in the farm water (W) (data referred to VSMOW). The two points above the regression line are for Castelnovo and Baiso where, during summer, the animals are kept outdoor.

Table captions

Table 1. $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$ and $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ for the investigated cattle sheds: W = farm water, M = milk water (isotope data referred to VSMOW)

Table 2. Coefficient of determination, R^2 , and slope, B_i , for the linear regression $^{18/16}\alpha_{t,i} = B_i \bar{T}_i$ ($^{\circ}\text{C}$) + A_i , where \bar{T} ($^{\circ}\text{C}$) is the local average temperature for the two weeks preceding the date of sampling (single data of \bar{T} are reported in Table 1)

Table 3. $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ values for milk calculated from $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{M}}$ values for farm water at different day number (isotope data referred to VSMOW)

Fig. 1. Location of the investigated cattle sheds (filled circle). The open circles refer to cattle sheds used for validation of the model reported in the text.

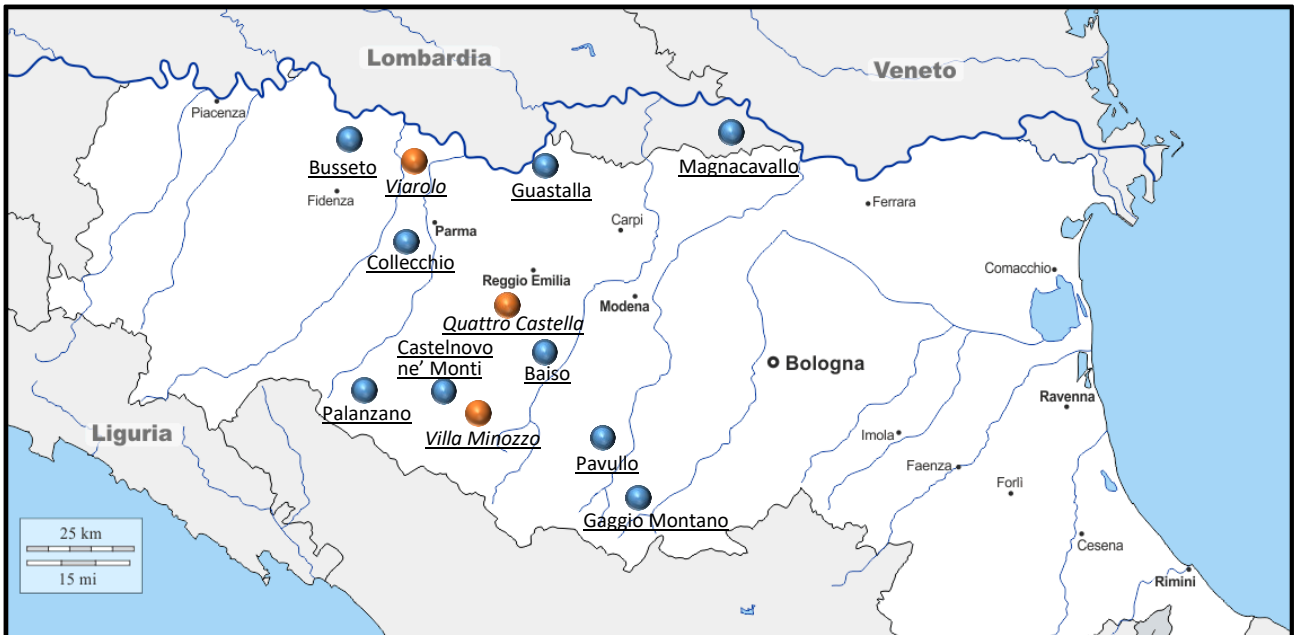


Fig. 2. Diagram $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$ on $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ for farm and milk water. Cross = farm water; open circle = milk water (data are referred to VSMOW)

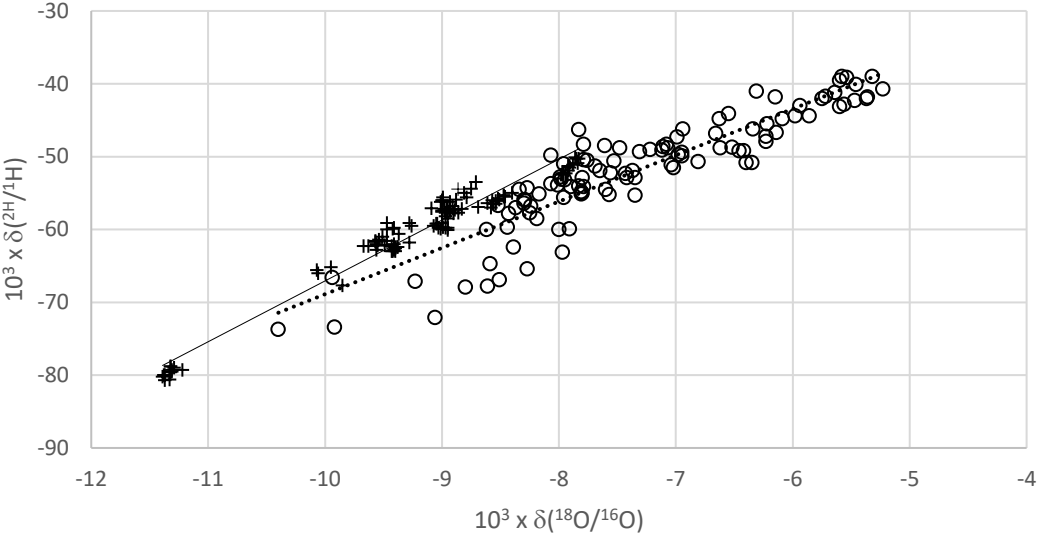


Fig. 3. Relation between the slope $= \frac{\partial \delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M}{\partial \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M}$ for each cattle shed and the Annual Mean Temperature of the cattle shed localities (February 2019-January 2019). For the regression reported is $p_{(\text{slope}=0)} = 0.03$, $R^2 = 0.53$).

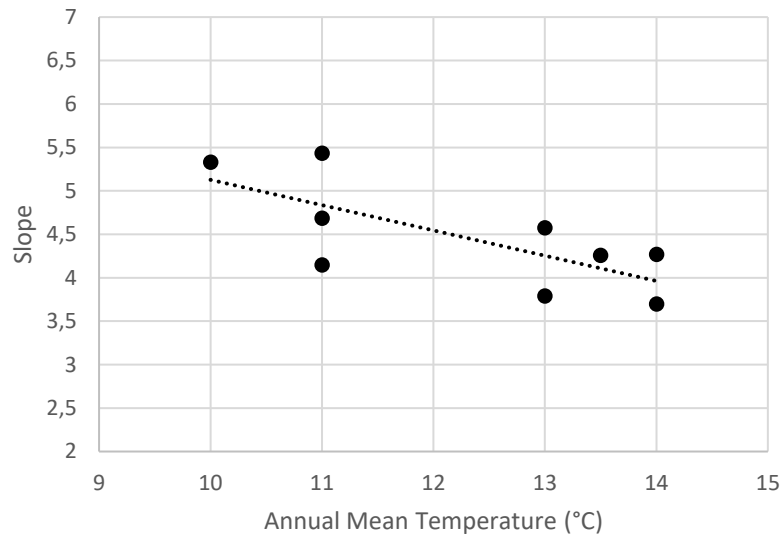


Fig. 4. Relation between the average values $10^3 * \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ for water in milk (M) and in the farm water (W) (data referred to VSMOW). The two points above the regression line are for Castelnovo and Baiso where, during summer, the animals are kept outdoor.

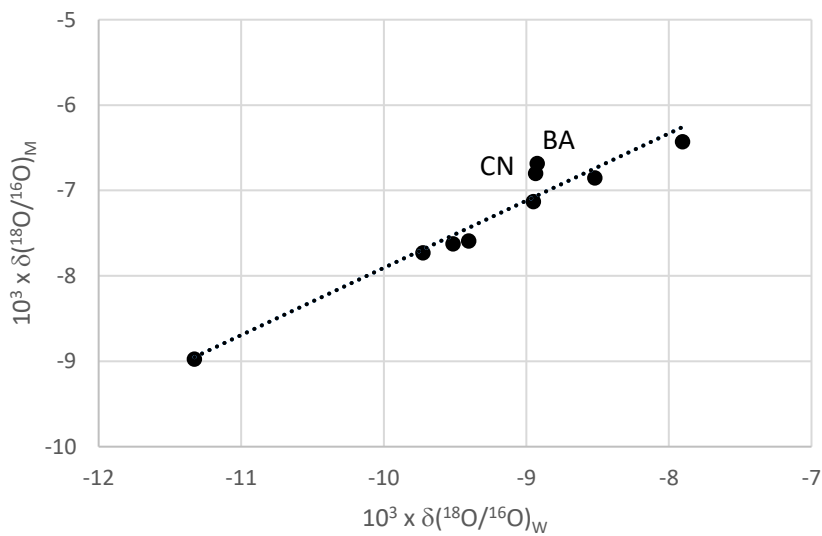


Table 1. $\delta(^2\text{H}/^1\text{H})$ and $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$ for the investigated cattle sheds: W = farm water, M = milk water (isotope data referred to VSMOW):

Date of sampling	t day number	\bar{T} two- weeks	$\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_W$ $\times 10^3$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_W$ $\times 10^3$	$\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M$ $\times 10^3$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M$ $\times 10^3$	Date of sampling	t day number	\bar{T} two- weeks	$\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_W$ $\times 10^3$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_W$ $\times 10^3$	$\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M$ $\times 10^3$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M$ $\times 10^3$	Date of sampling	t day number	\bar{T} two- weeks	$\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_W$ $\times 10^3$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_W$ $\times 10^3$	$\delta(^2\text{H}/^1\text{H})_M$ $\times 10^3$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M$ $\times 10^3$
Collecchio (Parma), 112 m a.s.l.							Guastalla (Reggio Emilia), 25 m a.s.l.							Gaggio Montano (Bologna), 682 m a.s.l.						
01/02/2018	32	4.0	-55.0	-8.40	-49.0	-7.22	05/02/2018	36	4.0	-61.8	-9.28	-56.8	-8.24	13/02/2018	44	1.2	-62.4	-9.38	-51.9	-7.65
01/03/2018	60	1.8	-55.5	-8.46	-48.8	-7.48	05/03/2018	64	0.1	-62.0	-9.41	-56.7	-8.52	13/03/2018	72	0.4	-67.7	-9.85	-55.9	-8.30
01/04/2018	91	7.8	-55.4	-8.47	-48.8	-7.07	05/04/2018	95	8.6	-63.0	-9.40	-54.1	-7.79	13/04/2018	103	9.4	-60.0	-9.47	-54.0	-7.83
01/05/2018	121	18.6	-55.9	-8.51	-44.8	-6.09	05/05/2018	125	16.3	-62.4	-9.38	-49.1	-7.12	13/05/2018	133	13.7	-59.9	-9.42	-49.3	-7.31
14/06/2018	165	21.2	-55.3	-8.47	-47.9	-6.23	10/06/2018	161	21.1	-62.5	-9.40	-49.2	-6.42	22/06/2018	173	18.8	-61.0	-9.51	-51.9	-7.37
14/07/2018	195	24.9	-56.5	-8.54	-44.4	-5.86	10/07/2018	191	23.9	-62.3	-9.43	-49.2	-6.46	22/07/2018	203	21.0	-62.0	-9.56	-49.4	-6.95
14/08/2018	226	26.9	-55.8	-8.52	-50.8	-6.35	10/08/2018	222	26.9	-62.6	-9.40	-50.8	-6.40	22/08/2018	234	21.0	-62.2	-9.55	-51.1	-7.04
14/09/2018	257	22.1	-56.0	-8.57	-46.7	-6.14	10/09/2018	253	20.6	-62.2	-9.49	-59.9	-7.91	22/09/2018	265	18.4	-59.1	-9.47	-49.7	-6.98
24/10/2018	297	15.8	-56.1	-8.54	-50.7	-6.81	25/10/2018	298	14.1	-63.0	-9.42	-55.3	-7.35	23/10/2018	296	12.2	-61.6	-9.47	-55.1	-7.81
24/11/2018	328	8.4	-57.0	-8.58	-52.9	-7.42	25/11/2018	329	8.0	-62.8	-9.41	-55.1	-8.17	23/11/2018	327	6.4	-60.6	-9.37	-53.1	-7.98
24/12/2018	358	1.7	-56.5	-8.56	-54.5	-7.60	24/12/2018	358	0.2	-62.4	-9.40	-59.7	-8.44	23/12/2018	357	1.5	-61.6	-9.57	-55.9	-8.29
24/01/2019	24	2.8	-56.4	-8.61	-53.2	-7.95	23/01/2019	23	0.6	-63.0	-9.43	-57.7	-8.25	23/01/2019	23	2.3	-62.8	-9.56	-60.0	-8.00
Average			-56.0	-8.52	-49.4	-6.85	Average			-62.5	-9.40	-54.5	-7.59	Average			-61.7	-9.52	-53.1	-7.63
St. dev.			0.6	0.06	3.2	0.7	St. dev.			0.4	0.05	4.0	0.81	St. dev.			2.3	0.13	3.2	0.49
Busseto (Parma), 40 m a.s.l.							Baiso (Reggio Emilia), 542 m a.s.l.							Pavullo (Modena), 670 m a.s.l.						
01/02/2018	32	4.0	-50.1	-7.86	-44.1	-6.55	06/02/2018	37	3.1	-55.6	-8.79	-49.8	-8.07	13/02/2018	44	1.2	-59.1	-9.32	-54.3	-8.27
01/03/2018	60	1.6	-50.3	-7.83	-46.2	-6.94	06/03/2018	65	-1.6	-54.5	-8.86	-48.3	-7.79	13/03/2018	72	0.4	-61.7	-9.57	-52.9	-7.80
01/04/2018	91	7.8	-51.1	-7.88	-46.8	-6.66	06/04/2018	96	9.5	-56.0	-9.00	-44.8	-6.63	13/04/2018	103	9.4	-65.6	-10.07	-55.6	-7.96
01/05/2018	121	17.7	-51.9	-7.92	-41.8	-6.15	06/05/2018	126	16.5	-59.8	-9.03	-41.0	-6.31	13/05/2018	133	13.7	-66.0	-10.06	-57.0	-8.37
14/06/2018	165	21.8	-51.5	-7.91	-43.1	-5.60	08/06/2018	159	20.5	-56.8	-8.91	-39.5	-5.60	22/06/2018	173	18.8	-65.2	-9.95	-52.9	-7.35
14/07/2018	195	24.7	-50.3	-7.85	-42.3	-5.47	08/07/2018	189	22.3	-55.0	-8.81	-41.2	-5.64	22/07/2018	203	21.0	-59.8	-9.41	-48.7	-6.52
14/08/2018	226	26.6	-50.9	-7.84	-43.0	-5.94	08/08/2018	220	26.3	-56.0	-8.99	-39.1	-5.54	22/08/2018	234	21.0	-59.1	-9.28	-48.8	-6.62
14/09/2018	257	21.8	-52.3	-7.94	-44.4	-5.98	08/09/2018	251	19.6	-55.6	-8.99	-39.0	-5.58	22/09/2018	265	18.4	-59.5	-9.26	-49.9	-6.95
24/10/2018	297	15.3	-51.3	-7.92	-46.2	-6.34	22/10/2018	295	14.9	-57.3	-8.89	-39.0	-5.32	23/10/2018	296	12.2	-57.5	-8.93	-55.2	-7.57
24/11/2018	328	8.8	-52.4	-7.96	-48.3	-7.08	22/11/2018	326	8.2	-57.8	-8.90	-54.1	-7.90	23/11/2018	327	6.4	-62.3	-9.67	-60.0	-8.62
24/12/2018	358	1.5	-52.5	-7.98	-52.3	-7.43	22/12/2018	356	3.2	-58.2	-8.97	-52.8	-7.99	23/12/2018	357	1.5	-61.4	-9.54	-57.8	-8.43
24/01/2019	24	1.8	-52.3	-7.97	-47.3	-6.99	23/01/2019	23	3.6	-58.5	-8.95	-46.3	-7.83	23/01/2019	23	2.3	-62.3	-9.63	-56.4	-8.30
Average			-51.4	-7.91	-45.5	-6.43	Average			-56.8	-8.92	-44.6	-6.68	Average			-61.6	-9.56	-54.1	-7.73
St. dev.			0.9	0.05	3.0	0.62	St. dev.			1.6	0.08	5.6	1.15	St. dev.			2.9	0.36	3.6	0.73
Castelnuovo ne' Monti (Reggio Emilia), 750 m a.s.l.							Palanzano (Parma), 691 m a.s.l.							Magnacavallo (Mantova), 11 m a.s.l.						
02/02/2018	33	2.6	-53.5	-8.71	-51.0	-7.96	08/02/2018	39	1.4	-56.9	-8.69	-54.5	-8.34	16/02/2018	47	4.8	-78.8	-11.32	-73.7	-10.4
01/03/2018	60	-3.0	-55.9	-8.88	-50.5	-7.76	08/03/2018	67	-2.2	-59.5	-9.07	-52.2	-7.56	16/03/2018	75	7.7	-79.0	-11.29	-67.1	-9.23
02/04/2018	92	4.6	-57.7	-8.97	-48.5	-7.61	08/04/2018	98	8.2	-59.2	-9.05	-51.5	-7.02	16/04/2018	106	12.8	-79.6	-11.32	-64.7	-8.55
02/05/2018	122	15.0	-56.2	-9.01	-50.6	-7.53	08/05/2018	128	14.6	-59.2	-9.04	-48.6	-7.11	16/05/2018	136	17.9	-80.6	-11.33	-62.4	-8.35
08/06/2018	159	17.9	-57.6	-9.00	-42.8	-5.56	14/06/2018	165	18.8	-59.9	-9.01	-45.5	-6.22	10/06/2018	161	22.5	-79.5	-11.31	-63.1	-7.97
08/07/2018	189	19.4	-57.1	-9.09	-41.8	-5.36	14/07/2018	195	20.9	-59.7	-8.99	-47.2	-6.23	10/07/2018	191	24.2	-80.0	-11.37	-65.4	-8.27
08/08/2018	220	22.9	-57.2	-8.96	-42.0	-5.37	14/08/2018	226	23.1	-57.2	-8.83	-42.0	-5.75	10/08/2018	222	27.6	-79.3	-11.31	-66.9	-8.51
22/09/2018	265	18.7	-57.1	-8.95	-40.7	-5.23	14/09/2018	257	17.7	-57.7	-8.86	-41.7	-5.72	10/09/2018	253	21.2	-79.6	-11.33	-67.8	-8.61
22/10/2018	295	12.7	-54.4	-8.75	-40.1	-5.46	24/10/2018	297	12.0	-59.1	-9.00	-58.5	-8.19	25/10/2018	298	15.8	-80.0	-11.38	-72.1	-9.06
22/11/2018	326	6.5	-56.2	-8.93	-51.3	-7.69	24/11/2018	328	6.1	-59.8	-8.97	-50.4	-7.79	25/11/2018	329	9.1	-80.2	-11.39	-67.9	-8.80
22/12/2018	356	1.6	-57.4	-9.00	-53.7	-8.07	24/12/2018	358	1.5	-59.8	-8.95	-55.0	-7.80	25/12/2018	359	1.0	-80.7	-11.37	-73.4	-9.92
Average			-56.5	-8.94	-47.2	-6.80	Average			-59.0	-8.95	-50.2	-7.13	Average			-79.7	-11.33	-67.6	-8.97
St. dev.			1.4	0.11	5.3	1.25	St. dev.			1.1	0.11	5.3	0.94	St. dev.			0.6	0.04	3.7	0.76

Date of sampling: day/month/year; \bar{T} two-weeks = average temperature for the two weeks preceding the date of sampling; St. dev = standard deviation; m a. s. l. = meters above the sea level.

Table 2. Coefficient of determination, R^2 , and slope, B_i , for the linear regression $^{18/16}\alpha_{t,i} = B_i \bar{T}_i$ ($^{\circ}\text{C}$) + A_i , where \bar{T} ($^{\circ}\text{C}$) is the local average temperature for the two weeks preceding the date of sampling (single data of \bar{T} are reported in Table 1).

Localitiy	R^2	$10^5 B_i$
Collecchio	0.89	6.90
Guastalla	0.83	7.72
Gaggio Montano	0.79	5.14
Busseto	0.84	5.73
Baisi	0.82	11.8
Pavullo	0.71	7.03
Castelnovo ne' Monti	0.79	13.3
Palanzano	0.67	8.97
Magnacavallo	0.72	7.40

Table 3. $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M$ values for milk calculated from $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_M$ values for farm water at different day number (isotope data referred to VSMOW)

Locality	Date of sampling (day/month/year)	t , day number	$^{18/16}\hat{\alpha}$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{w,m}$ $\times 10^3$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,m}$ $\times 10^3$	$\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,c}$ $\times 10^3$	$ \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,m} - \delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,c} $ $\times 10^3$
Torrile	20/01/2019	20	1.0006529	-8.78	-8.16	-8.13	0.03
Torrile	25/02/2019	56	1.0014217	-8.86	-7.55	-7.45	0.10
Villa Minozzo	05/02/2019	36	1.0010163	-9.1	-7.81	-8.09	0.28
Quattro Castella	06/02/2019	36	1.0010163	-8.77	-7.92	-7.76	0.16
Viarolo	24/12/2018	358	1.0009603	-7.51	-6.75	-6.56	0.19
Viarolo	16/05/2019	136	1.0025018	-7.54	-6.19	-5.06	1.13

t , day number starting from January 1st of each not-leap year; $^{18/16}\hat{\alpha}$, value estimated according to equation (4); m, measured value; c, value calculated according to equation (5). Note that the prediction standard uncertainty on $\delta(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{M,c}$ is about 0.6 %.

Appendice 6

Precisazioni sui valori medi annuali di $\delta^{13}\text{C}$

Per quanto riguarda la stalla di Baiso, come media annuale di $\delta^{13}\text{C}$ della dieta si è tenuto conto del contributo di fieno ed erba, come contributo unico. Siccome i campioni di erba nell'arco dei 12 mesi erano numericamente inferiori si è deciso di considerarli insieme visti i valori simili. Al contrario, nella rappresentazione grafica, presentata precedentemente nella sezione “Capitolo 4”, i valori sono stati mantenuti separati.

Per quanto riguarda la stalla di Palanzano, come media annuale si è tenuto conto del contributo di fieno ed erba medica insieme, siccome i campioni di medica nell'arco dei 12 mesi erano numericamente inferiori e visti i valori molto simili tra loro; al contrario la rappresentazione grafica è stata fatta separatamente.

Per la stalla di Viarolo il fieno e l'erba medica sono stati considerati separatamente essendo il loro valore medio statisticamente diverso.

Per Magnacavallo, per quanto riguarda il valore medio annuale di $\delta^{13}\text{C}$ della componente di erba medica, si è deciso di includere dentro il calcolo anche i contributi appartenenti alle categorie di erba, maggese e fieno a causa dell'esiguo numero di campioni e del fatto che i valori non erano fra loro statisticamente diversi. Al contrario, nella rappresentazione grafica, presentata nella sezione “Capitolo 4”, queste componenti sono state esplicitate.

Dettaglio delle analisi statistiche di $\delta^{13}\text{C}$

Il programma PAST è un pacchetto software inizialmente progettato per l'analisi dei dati paleontologici. Negli anni questo software è diventato così completo da essere utilizzato non solo dai paleontologi ma anche in molti altri campi quali le scienze della vita, della terra e dall'ingegneria all'economia. L'interfaccia utente di PAST è simile a quella di un foglio di calcolo. I dati sono inseriti in una matrice di celle organizzata in righe e colonne.

Per l'elaborazione dei dati di questa tesi si è utilizzato PAST per la costruzione dei grafici box-plot, per l'applicazione dell'ANOVA ad una e a due vie (senza replica) e il Test di Tukey.

Magnacavallo

	soia	orzo
soia		0,02593
orzo		

Tabella 5 - Test di Tukey per soia e orzo della stalla di Magnacavallo

Stalle che utilizzano il fieno nella razione alimentare

	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Baiso	Palanzano	Viarolo	Pavullo	Magnacavallo
Collecchio		0,119	0,4946	0,0317	0,6788	0,6897	0,9076	0,4251
Busseto			0,9937	0,9995	0,9634	0,9601	0,8035	0,9975
Castelnovo				0,8967	1	1	0,996	1
Baiso					0,7624	0,7524	0,4748	0,9322
Palanzano						1	0,9998	0,9999
Viarolo							0,9999	0,9999
Pavullo								0,9907
Magnacavallo								

Tabella 6 - Test di Tukey per le stalle con il fieno

Stalle che utilizzano i fiocchi nella razione alimentare

	Collecchio	Viarolo
Collecchio		3,51E-09
Viarolo		

Tabella 7 - Test di Tukey per le stalle con i fiocchi

Stalle che utilizzano l'unifeed nella razione alimentare

	Guastalla	Gaggio
Guastalla		0,000905
Gaggio		

Tabella 8 - Test di Tukey per le stalle con l'unifeed

Stalle che utilizzano il mangime nella razione alimentare

	Collecchio	Busseto	Baiso	Palanzano	Viarolo	Pavullo
Collecchio		1	0,1947	4,76E-06	0,2864	0,07621
Busseto			0,1457	8,05E-06	0,2213	0,05384
Baiso				7,91E-10	0,9999	0,9979
Palanzano					1,73E-09	1,59E-10
Viarolo						0,9867
Pavullo						

Tabella 9 - Test di Tukey per le stalle con il mangime

Caseina dei campioni di latte delle dieci stalle

	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Guastalla	Baiso	Palanzano	Viarolo	Gaggio	Pavullo	Magnacavallo
Collecchio		1	2,75E-05	0,04268	0,9902	4,41E-10	0,1566	4,67E-10	0,9993	6,43E-13
Busseto			8,56E-05	0,01916	0,9536	1,70E-09	0,2741	1,20E-10	0,9919	1,71E-13
Castelnovo				3,20E-12	2,66E-07	0,3808	0,2761	0	1,05E-06	0
Guastalla					0,4218	0	8,39E-07	0,00139	0,2511	7,07E-06
Baiso						2,29E-12	0,008563	7,39E-08	1	1,27E-10
Palanzano							0,000184	0	1,05E-11	0
Viarolo								4,44E-15	0,02204	0
Gaggio									1,77E-08	0,956
Pavullo										2,79E-11
Magnacavallo										

Tabella 10 – Test di Tukey per i campioni di caseina delle dieci stalle

Grasso dei campioni di latte delle dieci stalle

	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Guastalla	Baiso	Palanzano	Viarolo	Gaggio	Pavullo	Magnacavallo
Collecchio		0,02482	4,49E-07	1	1	0	0,3162	3,72E-07	0,8743	0
Busseto			0,1751	0,02771	0,02805	1,76E-09	0,9894	2,10E-14	0,6468	0
Castelnovo				5,33E-07	5,43E-07	0,0004499	0,009724	0	0,0003656	0
Guastalla					1	0	0,3373	3,13E-07	0,8893	0
Baiso						0	0,3397	3,07E-07	0,8909	0
Palanzano							8,92E-12	0	1,01E-13	0
Viarolo								1,90E-12	0,9963	0
Gaggio									1,93E-10	0,0008298
Pavullo										0
Magnacavallo										

Tabella 11 – Test di Tukey per i campioni di grasso delle dieci stalle

Fattore di frazionamento $\alpha_{caseina-grasso}$ per $\delta^{13}C$

	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Guastalla	Baiso	Palanzano	Viarolo	Gaggio	Pavullo	Magnacavallo
Collecchio		0,286	1	0,01986	0,9999	0,3146	0,9525	0,6148	0,4993	0,9376
Busseto			0,4857	0,9885	0,6555	1	0,008821	1	1	0,007211
Castelnovo				0,05153	1	0,5212	0,8365	0,8161	0,7182	0,8055
Guastalla					0,09909	0,984	0,0001704	0,8665	0,9285	0,0001331
Baiso						0,6899	0,6925	0,9212	0,8557	0,6528
Palanzano							0,01048	1	1	0,008589
Viarolo								0,04305	0,02631	1
Gaggio									1	0,03623
Pavullo										0,02192
Magnacavallo										

Tabella 12 – Test di Tukey per $\alpha_{caseina-grasso}$ delle dieci stalle

Precisazioni sui valori medi annuali di $\delta^{15}N$

Per la stalla di Guastalla, a causa della mancata raccolta del campione di *unifeed* del mese di febbraio 2018, non è stato possibile ottenere il valore isotopico corrispondente.

Per quanto riguarda il fieno utilizzato per fare l'*unifeed* della stalla di Gaggio Montano, anche se non si hanno a disposizione tutte le mensilità, è stato comunque trattato separatamente nonostante fieno ed *unifeed* presentano valori isotopici simili.

Per quanto riguarda la stalla di Palanzano, visti i valori molto simili tra loro, come media annuale di $\delta^{15}\text{N}$ della dieta si è tenuto conto del contributo di fieno e medica insieme; al contrario la rappresentazione grafica, presentata precedentemente nella sezione “Capitolo 4”, è stata eseguita mantenendo le componenti distinte tra loro.

Per Viarolo si precisa che le componenti della dieta quali fieno ed erba medica sono state considerate separatamente in quanto i loro valori coprivano tutti i mesi studiati.

Per Magnacavallo, per quanto riguarda il valore medio annuale di $\delta^{15}\text{N}$ della componente erba medica, si è deciso di includere nel calcolo anche i contributi appartenenti alle categorie di erba, maggese e fieno a causa dell’esiguo numero di campioni e dei valori simili di $\delta^{15}\text{N}$. Al contrario, nella rappresentazione grafica, presentata nella sezione “Capitolo 4”, queste componenti sono state esplicitate.

Dettaglio delle analisi statistiche di $\delta^{15}\text{N}$

Stalle che utilizzano il fieno nella razione alimentare

	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Baiso	Palanzano	Viarolo	Pavullo	Magnacavallo
Collecchio		0,9996	0,01204	0,01278	5,03E-06	0,8045	0,3301	0,2002
Busseto			0,002305	0,002463	6,17E-07	0,4798	0,1183	0,06144
Castelnovo				1	0,395	0,4121	0,8712	0,9565
Baiso					0,3832	0,4243	0,8794	0,9605
Palanzano						0,001458	0,01682	0,03634
Viarolo							0,9947	0,9685
Pavullo								1
Magnacavallo								

Tabella 14 – Test di Tukey per le stalle con il fieno

Stalle che utilizzano i focchi nella razione alimentare

	Collecchio	Viarolo
Collecchio		0,02745
Viarolo		

Tabella 15 – Test di Tukey per le stalle con i focchi

Stalle che utilizzano il mangime nella razione alimentare

	Collecchio	Busseto	Baiso	Palanzano	Viarolo	Pavullo
Collecchio		0,003673	1,33E-08	5,13E-06	0,0001186	1,21E-08
Busseto			0,01067	0,4019	0,9021	0,009942
Baiso				0,5978	0,1465	1
Palanzano					0,9499	0,5821
Viarolo						0,1392
Pavullo						

Tabella 16 – Test di Tukey per le stalle con il mangime

Caseina dei campioni di latte delle dieci stalle

	Collecchio	Busseto	Castelnovo	Guastalla	Baiso	Palanzano	Viarolo	Gaggio	Pavullo	Magnacavallo
Collecchio		1	2,28E-10	0,005389	0,9855	0,000291	0,06307	1	0,004973	2,64E-08
Busseto			1,56E-10	0,006951	0,9912	0,0002158	0,07685	1	0,003833	1,83E-08
Castelnovo				0	8,63E-13	0,08668	0	7,29E-11	0,009204	0,9942
Guastalla					0,1309	2,05E-12	0,9985	0,0114	1,02E-10	0
Baiso						2,81E-06	0,5575	0,9973	7,69E-05	1,17E-10
Palanzano							1,23E-10	0,0001176	0,999	0,551
Viarolo								0,1119	5,58E-09	1,27E-14
Gaggio									0,002249	8,83E-09
Pavullo										0,1397
Magnacavallo										

Tabella 17 – Test di Tukey per i campioni di caseina delle dieci stalle

Matrici di confronto tra gli isotopi $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

In base ai dati ottenuti dai Test di Tukey sia per $\delta^{13}\text{C}$ che per $\delta^{15}\text{N}$ si sono costruite delle matrici di confronto (presentate qui di seguito) tra le stalle, suddivise per tipologia di dieta e frazioni del latte (caseina per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e grasso per $\delta^{13}\text{C}$), dove nelle rispettive celle si ritrovano i valori presenti nelle celle colorate di rosa del Test di Tukey e corrispondenti a “chi differisce da”.

FIENO	Busseto B		Castelnovo C		Baiso E		Palanzano F		Viarolo G		Pavullo I		Magnacavallo L	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Collecchio A				0,01204	0,0317	0,01278		5,03E-06						
Busseto B				0,002305		0,002463		6,17E-07						
Castelnovo C														
Baiso E														
Palanzano F										0,001458		0,01682		0,03634
Viarolo G														
Pavullo I														

Tabella 18 – Test di Tukey per il fieno per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

FIOCCHI	Viarolo G	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Collecchio A	3,51E-09	0,02745

Tabella 19 – Test di Tukey per i flocchi per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

UNIFEED	Gaggio Montano H	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Guastalla D	0,0009053	

Tabella 20 – Test di Tukey per l'unifeed per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

MANGIME	Busseto B		Baiso E		Palanzano F		Viarolo G		Pavullo I	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Collecchio A		0,003673		1,33E-08	4,76E-06	5,13E-06		0,000119		1,21E-08
Busseto B				0,01067	8,05E-06					0,009942
Baiso E					7,91E-10					
Palanzano F							1,73E-09		1,59E-10	
Viarolo G										

Tabella 21 – Test di Tukey per il mangime per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

PROTEINE	Busseto B		Castelnovo C		Guastalla D		Baiso E		Palanzano F		Viarolo G		Gaggio Montano H		Pavullo I		Magnacavallo L		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	
Collecchio A			2,75E-05	2,28E-10	0,04268	0,005389			4,41E-10	0,000291	0,06307	4,67E-10			0,004973	6,43E-13	2,64E-08		
Busseto B			8,56E-05	1,56E-10	0,01916	0,006951			1,70E-09	0,000216	0,07685	1,20E-10			0,003833	1,71E-13	1,83E-08		
Castelnovo C					3,20E-12	0	2,66E-07	8,63E-13		0,08668	0	7,29E-11	1,05E-06	0,009204			0		
Guastalla D									0	2,05E-12	8,39E-07	0,001386	0,0114		1,02E-10	7,07E-06		0	
Baiso E									2,29E-12	2,81E-06	0,008563			7,39E-08	7,69E-05	1,27E-10	1,17E-10		
Palanzano F										0,000184	1,23E-10	0	0,0001176	1,05E-11			0		
Viarolo G												4,44E-15	0,02204	5,58E-09			0	1,27E-14	
Gaggio Montano H													1,77E-08	0,002249				8,83E-09	
Pavullo I																		2,79E-11	

Tabella 22 – Test di Tukey per la caseina del latte per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

GRASSO	Busseto B		Castelnovo C	Guastalla D	Baiso E	Palanzano F	Viarolo G	Gaggio Montano H	Pavullo I	Magnacavallo L
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
Collecchio A	0,02482		4,49E-07			0		3,72E-07		0
Busseto B				0,02771	0,02805	1,76E-09		2,10E-14		0
Castelnovo C				5,33E-07	5,43E-07	0,0004499	0,009724	0	0,0003656	0
Guastalla D						0		3,13E-07		0
Baiso E						0		3,07E-07		0
Palanzano F							8,92E-12	0	1,01E-13	0
Viarolo G								1,90E-12		0
Gaggio Montano H									1,93E-10	0,0008298
Pavullo I										0

Tabella 23 – Test di Tukey per il grasso del latte per $\delta^{13}\text{C}$

Bibliografia

1. Agilent 8800 ICP-QQQ Application Handbook, 2013.
2. Amundson R., Austin A.T., Schuur E. A. G., Yoo K., Matzek V., Kendall C., Uebersax A., Brenner D., Baisden W. T. Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen, *Global Biogeochemical Cycles*, v.17, p.1031, 2003.
3. Awak H. and Brand W. A. The Finnigan MAT HDO-Equilibrators: A fully automated H₂O/Gas phase equilibration system for Hydrogen and Oxygen Isotope analysis. Finnigan MAT Application News No.11, 1995.
4. Berni Alex, Isotopes for food geographical traceability and environmental applications: strategies for methods development, Ciclo XXVIII – Anno 2013-2015 (tesi di dottorato).
5. Berto D., Calace N., Rampazzo F., Saccomandi F., Isotopi: dalla teoria alla pratica, ISPRA Quaderni – Laboratorio 2/2018 (pdf).
6. Biondi L., Nudda A., Mele M. Metodi analitici per la tracciabilità geografica e di processo dei prodotti lattiero-caseari. In: Sicurezza e tracciabilità nei sistemi di produzione del latte. A cura di Cassandro M., Mele M., Trevisi E., Aracne Editrice s.r.l., Roma, 2010.
7. Bocherens, H. Reconstitutions paléoenvironnementales et paléolithiques par le marquage isotopique nature des vertébrés et des plantes fossiles en milieu continental, Dossier non pubblicato, 2001
8. Bocherens H., Drucker, D. Trophic level isotopic enrichment of carbon and nitrogen in bone collagen: Case studies from recent and ancient terrestrial ecosystems. *International Journal of Osteoarchaeology*, v.13(1-2), p.46-53, 2003.
9. Bolea E. Fernandez, Six years of ICP QQQ, a review, 2nd European ICP QQQ Forum 19-21 Munich, Germany, September 2018.
10. Borgia G. C., Elmi C., Ricchiuto T. Correlation by genetic properties of the shallow gas seepages in the Emilian Apennine (Northern Italy). In: L & Novelli L (Eds), *Advances in Organic Geochemistry*, 1997, Part 1, pp. 319-324, 1988
11. Boutton T. W., Tyrrell H. F., Patterson B. W., Varga G. A., Klein P. D. Carbon kinetics of milk formation in Holstein cows in late lactation. *Journal Animal Science*, 66, 2636-2645, 1988.
12. Bricout J., Koziat J. Detection of the addition of sugar to orange juice by isotopic analysis. *Science Alimentaire*, 5, 197-204, 1985.
13. Bryant J. D., Froelich P. N. A model of oxygen isotope fractionation in body water of large mammals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59(21):4523–4537, 1995.

14. Camin F., Coloru G. C., Depentori D., Franco M. A., Manca G., Versini G. Dieta origine geografica, latte e formaggio: riscontri con l'analisi isotopica. In: *Proced. III International Meeting Anfosc I formaggi d'alpeggio e loro rintracciabilita*, 132-145, Bella (PZ), Italy, 2001.
15. Camin F., Versini G., Gagliano G., Concolato G., Grandi C. Regional origin assignment of italian orange juices by multielement and multicomponent stable isotope ratio analysis. 6th International Symposium on Food Authenticity and Safety. Nantes, France, 2001.
16. Camin F., Bontempo L., Heinrich K., Horaceck M., Kelly S. D., Schlicht C., Thomas F., Monahan F. J., Hoogewerff J., Rossmann A. Multi-element (H, C, N, S) stable isotope characteristics of lamb meat from different European regions. *Analysis Bio-analysis Chemistry*, 389, 309-320, 2007.
17. Camin F., Perini M., Colombari G., Bontempo L., Versini G. Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope ratios of milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 1690-1696, 2008.
18. Camin F., Bontempo L., Perini M., Piasentier E., Stable Isotope Ratio Analysis for Assessing the Authenticity of Food of Animal Origin, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.15, 2016.
19. Capo R. C., Stewart B. W., Chadwick O. A., Strontium isotopes as tracers of ecosystem, 1998.
20. Cheng Y, Holman H-Y, Lin Z. Remediation of chromium and uranium contamination by microbial activity. *Elements* 8: 107-112, 2012.
21. Chesson L. A., Valenzuela L. O., O'Grady S., Cerling T. E., Ehleringer J. Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios of Milk in the United States. *J Agric Food Chem* 58: 2358-2363, 2010.
22. Clark I. D., Fritz P. Environmental Isotopes in Hydrogeology. New York, *Lewis Publishers, Boca Raton*, p.328, 1997.
23. Cortecchi G., Ginesi C., Longinelli A., Composizione isotopica dello zolfo tecniche di preparazione e misura e primi risultati, *Soc. Italiana di Mineralogia e Petrologia – Rendiconti*, Vol XXI (2): pp 339-408, 1975.
24. Coplen, T. B. Laboratory information management system (LIMS) for light stable isotopes. *US Geological Survey*, open-file report 00-345, p.121, 2000.
25. Craig H. Standards of reporting concentrations of Deuterium and Oxygen-18 in natural waters. *Science*, 133, 1833-1834, 1961b.
26. Dansgaard W. Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, 16, 436-468, 1964.
27. De Niro M. J., Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 341-351, 1981.

28. Disciplinare di produzione del formaggio Parmigiano Reggiano (versione pdf).
29. Di Matteo A., La geochimica isotopica applicata ai reperti scheletrici fossili di mammiferi terrestri: considerazioni paloclimatiche e paleoambientali, XXIII Ciclo – anno 2011 (tesi di dottorato).
30. Dongola Reach: Excavations at Site R12. London: Sudan Archaeological Research Society.
31. D'Urso M. G., Tracciabilità del sistema di alimentazione in agnelli da carne: impiego di isotopi, 2007-2010 (tesi di dottorato).
32. Elter P. Introduction à la géologie de l'Apennin Septentrional. *Bullettin Société Géologique de France*, 17, 956-972, 1975.
33. Elter P. Introduzione alla geologia dell'appennino Ligure-Emiliano. In: Zanzucchi, G. (coord), Guide Geologiche Regionali. 10 itinerari Appennino Ligure-Emiliano. *Società Geologica Italiana*. BE-MA editrice, 381pp, 1994.
34. Elter P., Grasso M., Parrotto M., Vezzani L. Structural setting of the Apennine-Maghrebian thrust belt. *Episodes*, 26, 205-211, 2003.
35. Epstein S. and Mayeda T. K. Variations of the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratio in natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 4, 213, 1953.
36. Foster G. O., Larry L. L. Corn Distillers Dried Grains Versus Soybean Meal in Lactation Diets, *J Dairy Sci* 74:972-979, 1991.
37. Friedman I. Deuterium content of natural waters and other substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 4, 89-103, 1953.
38. Gofiantini R. La composizione isotopica delle precipitazioni, *Rendiconto SIMP*, 38 (3): 1175-1187, 1982.
39. Gorgoni, C., Martinelli, G., Sighinolfi, G. P. Isotopic evidence of paleowaters in the Po sedimentary basin (Northern Italy). *Geochemical Journal*. J. 16, 51-61, 1982.
40. Griboff J., Baroni M. V., Horacekb M., Wunderlina D. A., Monferran M. V. Multielemental + Isotopic Fingerprint Enables Linking Soil, Water, Forage and Milk Composition, Assessing the Geographical Origin of Argentinean Milk. *Food Chemistry*, 2019.
41. Grimalt J. O., Torras E., Albaigés J. Bacterial reworking of sedimentary lipids during sample storage. In: Mattavelli L & Novelli L (Eds), *Advances in Organic Geochemistry*, 1997, Part 2, pp. 741-746, 1988.
42. Hazen R. M. & Ferry J. M. Mineral evolution mineralogy in the fourth dimension. *Elements* 6: 9-12, 2010
43. Hoefes, J. Stable isotope geochemistry. *Springer-Verlag*, Berlin, p.201, 1997.

44. Horita J., Kendall C. Stable isotope analysis of water and aqueous solutions by conventional dual-inlet mass spectrometry. In: Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques, Vol.1. pp.1-37. P.A. de Groot Editor. *Elsevier B.V.*, 2004.
45. Horita, J., Ueda A., Mizukami K., Takatori I. Automatic δD and $\delta^{18}O$ analyses of multi-water samples using H₂- and CO₂-water equilibration methods with a common equilibration set-up. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes* 40 (1989): 801-805.
46. Horn P., Schaaf P., Holbach B., Hölzl S., Eschnauer H. $^{87}Sr/^{86}Sr$ from rock and soil into vine and wine. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, vol. 196, no. 5, pp. 407–409, 1993.
47. Horn P., Hölzl S., Todt W., Matthies D. Isotope abundance ratios of Sr in wine provenance determinations, in a tree-root activity study and of Pb in a pollution study on tree-rings. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, vol. 34, pp. 31–42, 1998
48. Hosono T., Nakano T., Igeta A., Tayasu I., Tanaka T., Yachi S. Impact of fertilizer on a small watershed of Lake Biwa: Use of sulfur and strontium isotopes in environmental diagnosis, *Science of the Total Environment*, Volume 384, Issues 1–3, 1, Pages 342-354, 2007.
49. Iacumin P, Bocherens H, Mariotti A, Longinelli A., Oxygen isotope analyses of co-existing carbonate and phosphate in biogenic apatite: a way to monitor diagenetic alteration of bone phosphate? *Earth and Planetary Science Letters*, vol. 142: 1-6, 1996.
50. Iacumin P. Cemetery R12: an isotope approach. In: A Neolithic Cemetery in the Northern Dongola Reach: Excavations at Site R12. London: Sudan Archeological Research Society, 2008.
51. Iacumin P., Venturelli G., Selmo E. Isotopic features of rivers and groundwater of the Parma Province (Northern Italy) and their relationships with precipitation, *Journal of Geochemical Exploration*, Volume 102, Issue 2, Pages 56-62, 2009.
52. Jiang Y., Zhao J. Y., Sun C. Q. Earth life coupled system dynamics of biota and environment control. *Advanced Earth Sciences* 16: 877-884, 2001.
53. Jouzel J., Merlivat L. Deuterium and oxygen-18 in precipitation: modeling of the isotopic effects during snow formation. *Journal of Geophysical Research*, 89, 11749-11757, 1984.
54. Kabata-Pendias A. Trace elements in Soils and Plants. 4th. *CRC Press*, 2011.
55. Kennedy B. P., Blum J. D., Folt C. L., Nislow K. H., Using natural strontium isotopic signatures as fish markers: methodology and application, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 57, no. 11, pp. 2280–2292, 2000.

56. Konhauser K. O., Lalonde S. V., Planavsky N. J., Pecoits E., Lyons T. W., Mjzsis S., Rouxel O. J., Barley M., Rosiere C., Fralick P. W., Kump L. R., Bekker A. Aerobic bacterial pyrite oxydation and acid rock drainage during the Great Oxydation Event. *Nature* 478: 369-373, 2011.
57. Kornexl B. E., Werner T., Rossmann A., Schmidt H. L. Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients—a possible tool for origin assignment and quality control. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 205, 19-24, 1997.
58. Krivachy (Tanz) N., Rossmann A., Shmidt H-L. Potentials and caveats with oxygen and sulfur stable isotope analyses in authenticity and origin checks of food and food commodities. *Food Control* 48:143-150, 2015.
59. Krouse H. R.; Stewart J. W. B., Grinenko V. A. Pedosphere and biosphere. In *Stable Isotopes: Natural and Anthropogenic Sulfur in the Environment*, Scope 43; Krouse, H. R., Grinenko, V. A., Eds.; Wiley: New York, pp 267-306, 1991.
60. L'interpretazione delle analisi del terreno, arpav, ESAV, 1990 (pdf).
61. Liu Y. The National Science Foundation on strategical development in paleontology during 2000-2010 and paleontology research in China. *China Bas Sci* (6): 347-351, 2006.
62. Longinelli A. Oxygen isotopes in mammal bone phosphate: a new tool for papaeohydrological and paleclimatological research? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48: 385-390, 1984.
63. Longinelli, A., Selmo, E. M. Isotopic composition of precipitation in Italy: a first overall map, *Journal of Hydrogeology*, v.270(1-2), p.75-88, 2003.
64. Luz B., Kolodny Y. Oxygen isotope variation in bone phosphate. *Applied Geochemistry* 4: 317-323, 1989.
65. Marchina C., Natali C., Fahnestock M. F., Pennisi M., Bryce J., Bianchini G. Strontium isotopic composition of the Po river dissolved load: insights into rock weathering in Northern Italy. *Applied Geochemistry* 97: 187–196, 2018.
66. Marino B. D., Mc Elroy M. B. Isotopic composition of atmospheric O₂ inferred from carbon in Ca plant cellulose. *Nature* 349, pp. 137-131, 1991.
67. Mariotti A., Germon J. C., Hubert P., Kaiser P., Letolle R., Tardiux A., Tardiux P. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil*, Vol. 62, 413-430, 1981.
68. Martinelli, G., Chahoud, A., Dadomo, A., Fava, A. Isotopic features of Emilia-Romagna region. (North Italy) groundwaters: environmental and climatological implications. *Journal of Hydrology* 519, 1928-1938, 2014.

69. Manca G., Camin F., Coloru G. C., Del Caro A., Depentor D., Franco M. A., Versini G., Characterization of the geographical origin of Pecorino Sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1404-1409, 2001.
70. Manning D. A. C., Phosphate minerals, environmental pollution and sustainable agriculture. *Elements* 4(2): 105-108, 2008.
71. Martin G. J., Guillou C., Martin M. L., Cabanis M. T. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 36, 316-322, 1988.
72. Mascaro L., Benvenuti M., Corsini F., Costagliola P., Lascialfari S., Vaselli O., Tanelli G., Bini C., Gonnelli C., Gabbrielli R., Lattanzi P. Heavy metal pollution of soils and plants at the bottino Pb (Ag)-Zn mine of Bottino, Tuscany (Italy), Cidu R (Ed), *Water-Rock Interaction*, Vol 2, pp.1253-1256, 2001.
73. Merlivat L., Jouzel J. Global climatic interpretation of the deuterium-oxygen 18 relationship for precipitation. *Journal of Geophysical Research*, 84, 5029-5033, 1979.
74. Minson D. J., Ludlow M. M., Troughton J. H. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. *Nature*, 256, 602, 1975.
75. Moreno-Rojas R., Segarra S., Cámara-Martos F., López M. A. A., Multivariate analysis techniques as tools for categorization of Southern Spanish cheeses: nutritional composition and mineral content. *European Food Research and Technology* 231(6):841-851, 2010.
76. Morse, J. W., Mackenzie, T. Geochemistry of Sedimentary Carbonates. *Elsevier*, Amsterdam, 1990.
77. Nečemer M., Kump P., Vogel-Mikuš K. Use of X-Ray fluorescence-based analytical techniques in phytoremediation, Handbook of Phytoremediation, In: Handbook of Phytoremediation, Nova Science Publishers, Inc., *ResearchGate*, 2010.
78. Necemer M., Potocnik D., Ogrinc N., Discrimination between Slovenian cow, goat and sheep milk and cheese according to geographical origin using a combination of elemental content and stable isotope data, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 52, Pages 16-23, 2016.
79. Norman H. C., Wilmot M. G., Thomas M. D., Masters D. G., Revell D. K. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C3 annual pastures and saltbush or C4 perennial grasses. *Livestock Science*, 121, 162-172, 2009.
80. Oelkers E. H., Valsami-Jones E. Phosphate mineral reactivity and global sustainability. *Elements* 4(2): 83-87, 2008.

81. PAST: PAleontological STatistics Version 3.25, Reference Manual, Øyvind Hammer, Natural History Museum - University of Oslo 1999-2019.
82. Pepi S., Terroir e Glera: Indagini geochimiche per la definizione dei marker geografici, Ciclo XXVII - Anno 2012-2014 (tesi di dottorato).
83. Piazza A., Stratigrafia fisica ed analisi di facies dei depositi torbiditici della Formazione delle Arenarie del Monte Cervarola tra la Val Secchia e la Val Scoltenna (Aquitaniiano-Burdigaliano, Appennino Settentrionale), Ciclo XXVIII - Anno 2016 (tesi di dottorato).
84. Planavsky N. J., Asael D., Hofmann A., Reinhard C. T., Lalonde S. V., Knudsen A., Wang X., Ossa F.O., Pecoits E., Smith A. J. B., Beukes N. J., Bekker A., Johnson T. M., Konhauser K. O., Lyons T. M., Rouxel O. J. Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the Great Oxidation Event. *Nature* 7: 283–286, 2014.
85. Pors Nielsen S., The biological role of strontium, *Bone*, vol. 35, no. 3, pp. 583–588, Sep. 2004.
86. Potočnik D., Nečemer M., Perišić I., Jagodic M., Mazej D., Camin F., Eftimove T., Strojnik L., Ogrinc N. Geographical verification of Slovenian milk using stable isotope ratio, multielement and multivariate modelling approaches. *Food Chemistry* 326, 2020.
87. Price T. D., Burton J. H., Bentley R. A., The characterization of biologically available strontium isotope ratios for the study of prehistoric migration, *Archaeometry*, vol. 44, no. 1, pp. 117–135, 2002.
88. Pšenková M., Toman R., Tančin V., Concentrations of toxic metals and essential elements in raw cow milk from areas with potentially undisturbed and highly disturbed environment in Slovakia. *Environmental Science and Pollution Research*, 27:26763–26772, 2020.
89. Ricchiuto T., Schoell M. Origin of natural gases in South Italy: A case history of mixing of gases of deep and shallow origin. In: Mattavelli L & Novelli L (Eds), *Advances in Organic Geochemistry*, 1997, Part 1, pp. 311-318, 1987.
90. Robinson B. H., Chiarucci A., Brooks R. R., Petit D., Kirkman J. H., Gregg P. E. H., De Dominicis V. The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration* 59: 75-86, 1997.
91. Rogers J. R., Bennet P. C. Microbial release and utilization of inorganic nutrients from felspar, basalt, and glass. *Chemical Geology* 203: 91-108, 2004.
92. Rossmann A., Rieth W., Schmidt H. L. Stable isotope ratio determination and its combination with conventional analyses (RSK values) for fruit juice authenticity control. In *Methods To Detect Adulteration of Fruit Juice Beverages*; Nagy S., Wade R. L., Eds.; Agriculture and Food Science: *Auburndale*, FL, Vol. I, pp 28-40, 1994.

93. Rossmann A., Kornexl B. E., Versini G., Pichlmayer F., Lamprecht G. Origin assignment of milk from alpine regions by multielement stable isotope ratio analysis (SIRA). *Journal of Food Science and Nutrition*, Vol. 1, 9-21, 1998.
94. Rozanski, K., Araguás-Araguás L., Gonfiantini R. Isotopic pattern in modern global precipitation. *Climate Change in Continental Isotopic Records*, Swart P. K., Lohmann K. C., McKenzie J. & Savin S. Eds., *AGU Geophysical Monograph Series*, vol. 78, 1-36, 1993.
95. Tanner D. S., Baranov V. I., Bandura D. R., Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review, *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 1361–1452, 2002.
96. Selmo E. M., Variazioni dell'eccesso di deuterio nel corso degli ultimi 800.000 anni nella carota di EPICA Dome C (Antartide Orientale): implicazioni paleoclimatiche, Ciclo XIX-Anno 2006 (tesi di dottorato).
97. Smith B. N. Natural abundance of the stable isotopes of carbon in biological systems, *American Institute of Biological Sciences*, v.22(4), p.226-231, 1972.
98. Ren-ju S., Hui-li T., Jian-guo H., Xue-jun G. Contents of Trace Metal Elements in Cow Milk Impacted by Different Feedstuffs. *Journal of Northeast Agricultural University* (English Edition). Vol. 22 No. 3 54-61, 2015.
99. Southam G. Minerals and substrates for life: the prokaryotic view. *Elements* 8: 101-106, 2012.
100. Spurio A., Il ruolo della geologia e della geochemica nella tracciabilità geografica dei prodotti alimentari DOP mediante l'uso del rapporto isotopico $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, Ciclo XXXI – A.A 2017 – 2018 (tesi di dottorato).
101. Stumm W., Morgan J. Aquatic chemistry. *Oxford University Press*, 1996.
102. Steiger R. H., Jäger E. Subcommittee on geochronology: convention on the use of decay constants in geo- and cosmo-chronology. *Earth and Planetary Science Letters* 36: 359-362, 1977.
103. Stele K.W., Daniel R. M. Fraction of nitrogen isotopes by animals: a further complication to the use of variations in the natural abundance of ^{15}N for tracer studies. *Journal of Agricultural Science*, 90, pp 7-9, 1978.
104. Tanz N., Schmidt H. L. $\delta^{34}\text{S}$ -Value Measurements in Food Origin Assignments and Sulfur Isotope Fractionations in Plants and Animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3139–3146, 2010.
105. Tescionea I., Marchionni S., Mattei M., Tassi F., Romano C., Conticelli S. A comparative $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ study in Red and White wines to validate its use as geochemical tracer for the geographical origin of wine. *Procedia Earth and Planetary Science* 13: 169 – 172, 2015.
106. Thermo Finnigan, Operating Manual, 1998.

107. Tyler G. Ribidium availability and plant uptake in natural soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 15, n. 1075, 1983.
108. Urey H. C. The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society*, London, pp. 562-581, 1947.
109. Versini G., Monetti A., Reniero F. Monitoring authenticity and regional origin of wines by natural stable isotope ratios analysis. In *Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*; Watkins, T. R., Ed.; ACS Symposium Series 661; *American Chemical Society*: Washington, DC; pp 113-130, 1997.
110. Versini G., Camin F., Carlin S., Depentorio D., Gasperi F., Ziller L. Accertamenti innovativi per la caratterizzazione e tutela delle produzioni tipiche di montagna. L'analisi chimica isotopica e dell'aroma. In: *Procede. V Convivio ANFOOSC "Formaggi d'alpeggio: il pascolo, l'animale, la razza, il prodotto"* (pp. 145-158). Cavalese (TN), Italy, 2000.
111. Wilson G. F., MacKenzie D. D. S., Brookes I. M. Importance of body tissues as sources of nutrients for milk synthesis in the cow, using ^{13}C as a marker. *British Journal of Nutrition*, 60, 605-617, 1988.
112. White W. M. Geochemistry (testo pubblico on line), *Wiley-Blackwell*, 2009.
113. Wytenbach A., Furrer V., Tobler L. The concentration ratios plant to soil for the stable elements Cs, Rb and K. *Science of The Total Environment*, vol. 173-174, pp., 361-367, 1995.
114. Yin H. F., Xie S. C., Qing J. Z., Yan, J. X., Luo G. M. Discussion on geobiology, biology and geobiofacies. *Science in China Series D: Earth Sciences* 51: 1516-1524, 2008.
115. Yoneyama T. Nitrogen metabolism and fractionation of nitrogen isotopes in plants. In E. Wada, T. Yoneyama, M. Minagawa, T. Ando, B.D. Fry (Eds.). *Stable isotopes in the biosphere* pp., 92-102, 1995.
116. Zhao S. C. Coupling system of Geo-Biosphere: the key to understand environmental change and life origin. *China Bas Sci*, (9): 52-57, 2001.
117. Zhou X., Qu X., Zhao S., Wang J., Li S., Zheng N., Analysis of 22 Elements in Milk, Feed, and Water of Dairy Cow, Goat, and Buffalo from Different Regions of China, *Biological Trace Element Research*, 176:120–129, 2017.
118. Zuliani T., Kanduč T., Novak R., Vreča P. Characterization of Bottled Waters by Multielemental Analysis, Stable and Radiogenic Isotopes, *Water*, 12(9), 2454, 2020.

Sitografia

<https://ambiente.regione.emilia-romagna.it/it/geologia/geologia/geologia-emilia-romagna/geologia-dellappennino-emiliano-romagnolo>

<https://ambiente.regione.emilia-romagna.it/it/geologia/geologia/geologia-emilia-romagna/la-pianura-padana-1>

https://ambiente.regione.emilia-romagna.it/it/geologia/geologia/geologia-emilia-romagna/jpg/Fig1_geo250pianura4.jpg/image_view_fullscreen

https://ambiente.regione.emilia-romagna.it/it/geologia/geologia/geologia-emilia-romagna/pdf/Articolo_Zanzucchi.pdf

https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/MCICPMS.html

<https://slideplayer.it/slide/15799455/>

https://www.arpae.it/cms3/documenti/radiazioni/martelli_bo07.pdf

<https://www.candiabio.it/candiabio---azienda-agricola-semplice---immagini.html>

<https://www.cifo.it/agricoltura-professionale/limportanza-del-calcio-in-agricoltura/>

<http://www.icla.ic.cnr.it/fluorescenza.html>

<http://www.michele.scardi.name/corsi/regrcorr.pdf>

<https://www.parmigianoreggiano.com/it/>

<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/2090>

<https://mercurilab.units.it/it/content/mineralizzazione-caldo-un-sistema-chiuso-microonde>

Software Google Earth