

Commissione internazionale
per la protezione delle acque italo-svizzere



PROGRAMMA 2019-2021

RAPPORTO ANNUALE 2019

**INDAGINI SULLE SOSTANZE PERICOLOSE
NELL'ECOSISTEMA DEL LAGO MAGGIORE**

*a cura di
Aldo Marchetto*

Verbania, 2020



INDICE

1a	RIASSUNTO E CONCLUSIONI <i>(Aldo Marchetto)</i>	2
1b	EXECUTIVE SUMMARY <i>(Aldo Marchetto)</i>	6
2.	CONTAMINANTI NELLO ZOOPLANCTON: VARIAZIONI SPAZIO TEMPORALI E FATTORI DI CONTROLLO DEL TRASFERIMENTO LUNGO LA RETE TROFICA PELAGICA <i>(Roberta Bettinetti, Carlo Dossi, Rossella Perna, Marina Manca, Roberta Piscia, Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon)</i>	8
3.	BIOMONITORAGGIO DELLA CONTAMINAZIONE DEL VERBANO MEDIANTE IL BIVALVE <i>Dreissena polymorpha</i> <i>(Andrea Binelli, Camilla Della Torre, Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon)</i>	20
4	ACCUMULO DI CONTAMINANTI PRIORITARI IN SPECIE ITTICHE DEI PRINCIPALI TRIBUTARI <i>(Andrea Binelli, Camilla Della Torre, Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon, Pietro Volta)</i>	38
5	INDAGINI LUNGO L'ASTA DEL FIUME TOCE: SEDIMENTI, BIOACCUMULO <i>(Laura Marziali, Alfredo Schiavon, Lucia Valsecchi, Niccolò Pirola, Claudio Roscioli, Sara Mattiuzzi, Erica Valenti, Licia Guzzella)</i>	66
6.	INDAGINE SUI SEDIMENTI DEI TRIBUTARI <i>(Licia Guzzella, Sara Mattiuzzi, Claudio Roscioli, Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon, Gianni Tartari)</i>	79
7.	INDAGINI SUL COMPARTO ITTICO <i>(Pietro Volta, Paolo Sala, Licia Guzzella, Sara Mattiuzzi, Stefano Tasselli, Claudio Roscioli)</i>	90
8.	EFFECT-BASED METHODS SU DUE SPECIE ITTICHE CAMPIONATE IN QUATTRO TRIBUTARI <i>(Andrea Binelli, Camilla Della Torre, Pietro Volta)</i>	107
9.	SPERIMENTAZIONE DI EFFECT-BASED TOOLS: CHIRONOMIDI <i>(Andrea Binelli, Roberta Bettinetti, Camilla Della Torre)</i>	118
10.	EFFECT BASED METHODS: TEST DI TOSSICITÀ SUBCRONICO CON HETEROCYPRIS INCONGRUENS SUI SEDIMENTI DEI TRIBUTARI <i>(Laura Marziali, Alfredo Schiavon, Lucia Valsecchi)</i>	123
11	EVOLUZIONE PLURIENNALE DEI PRINCIPALI COMPOSTI NELL'ECOSISTEMA DEL LAGO MAGGIORE <i>(Aldo Marchetto)</i>	128
12.	GLOSSARIO	137

1a. RIASSUNTO E CONCLUSIONI

Aldo Marchetto, CNR-IRSA, Verbania

Questo rapporto inizia un nuovo triennio di indagini sulle sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. In questo primo anno di attività del nuovo triennio, l'aspetto più innovativo è rappresentato dalla sperimentazione dei cosiddetti "effect-based tools" (capitoli 9, 10 e 11).

Infatti, nel programma delle attività del 2019 è stato deciso di integrare in via sperimentale le informazioni provenienti dalle analisi chimiche dei sedimenti e del biota con indagini ecotossicologiche sui loro effetti, basate sul "biomarker approach", che permette di evidenziare gli eventi intermedi tra l'esposizione dell'organismo all'inquinante e l'osservazione del danno biologico, attraverso l'esame di possibili alterazioni biochimiche, fisiologiche o comportamentali degli organismi. Le basi teoriche di questo approccio sono ampiamente delineate nell'introduzione al capitolo 9 del rapporto.

A fianco di questa sperimentazione, è proseguito l'aggiornamento delle serie storiche acquisite nel tempo sulla presenza e la distribuzione di alcuni microinquinanti particolarmente rilevanti nell'ecosistema del Lago Maggiore.

L'aggiornamento delle serie temporali ha riguardato l'analisi qualitativa e quantitativa di sostanze pericolose e di elementi in traccia nei pesci, lo studio del percorso di queste sostanze lungo la rete trofica, attraverso lo zooplancton, e della loro presenza nei molluschi filtratori, tipici organismi litorali, e la valutazione dell'origine dell'inquinamento attraverso le analisi dei sedimenti dei tributari.

Inoltre è proseguita l'analisi del mercurio nelle diverse matrici ambientali e in particolare nella fauna ittica dei tributari, un'analisi introdotta nel 2017.

In generale, le ricerche del 2019 hanno confermato ancora una volta l'importanza del regime idrologico per l'apporto di inquinanti al Lago Maggiore. Infatti, se la prima parte del 2018 non è stata né particolarmente piovosa né particolarmente seccata, vi sono stati eventi notevoli di precipitazione e di piena degli immissari durante l'autunno 2018 e nei mesi di luglio, agosto ed ottobre 2019.

Questi eventi hanno portato ancora una volta all'aumento delle concentrazioni di inquinanti rilevati nel biota nel 2019, molto probabilmente a causa rilascio di inquinanti depositati in passato nei terreni e nei sedimenti fluviali e mobilizzati rispettivamente dalle piogge intense e dagli eventi di piena.

Questo quadro generale è particolarmente evidente nel caso delle analisi dei sedimenti alla foce dei tributari, che hanno lo scopo di comprendere l'origine dei microinquinanti organici e dei metalli in traccia presenti nel Lago Maggiore. La scelta dei tributari e dei composti in ciascun tributario dipende dalle conoscenze sulle pressioni gravanti nel presente e nel passato sul territorio e dalle analisi compiute in passato, che hanno permesso di escludere alcune sostanze presenti in quantità trascurabile in alcuni immissari. Ad esempio, due grandi immissari come il Ticino Immissario e il Maggia, non sono stati inclusi, in quanto in passato avevano mostrato un livello di contaminazione molto ridotto.

Il DDT e i suoi metaboliti (indicati collettivamente come DDx) sono stati misurati quindi solo nel Ticino Emissario e nel Toce, a monte (Domodossola, Prata) e a valle (Bosco Tenso, Premosello,

Ornavasso e Gravellona Toce) del sito industriale dove questo composto veniva prodotto. A Gravellona Toce sono stati rilevati valori piuttosto variabili, particolarmente elevati a luglio e ad ottobre, come ci si attende a seguito di intense precipitazioni, e con un'elevata frazione (> 60%) del composto parentale non metabolizzato (p,p'-DDT), indicatore di un apporto recente di inquinamento.

Invece, a Bosco Tenso e Ornavasso, la concentrazione di DDX era più elevata a febbraio, dopo le intense piogge autunnali, per tornare ai valori precedenti in ottobre. La prevalenza del p,p'-DDT nella forma parentale non metabolizzata, era meno marcata che nel sedimento prelevato a Gravellona Toce in luglio.

Al contrario, per gli altri composti (PCB, PBDE, HBCD, DBPDE, Hg) i valori medi erano simili o inferiori a quelli del 2018. I fiumi Boesio e Bardello rimangono comunque i tributari che contribuiscono principalmente alla contaminazione nel lago, rispettivamente da PBDE e PCB, ma anche da Hg. Inoltre, nel Tresa si conferma la presenza di una sorgente di contaminazione che ha determinato già nel 2015, picchi di concentrazione per IPA e Hg. Si deve segnalare nel caso del Boesio che nel campionamento di aprile 2019, mostra un picco di PBDE di 400 ng/g, che ripercorrendo la storia di questo fiume dal 2018, primo anno di analisi, ad oggi risulta tra i valori più elevati.

Questo quadro generale è stato confermato anche dalle analisi degli invertebrati bentonici, tra cui i ditteri e i gammaridi si sono dimostrati ancora una volta come i principali accumulatori di DDX e Hg, con un pattern spaziale simile: i valori misurati erano sempre marcatamente più alti a valle del sito industriale e i valori massimi di concentrazione per entrambi i gruppi sono stati misurati a Ornavasso per i DDX e a Bosco Tenso per il mercurio. Per i DDX, nei ditteri, i valori di Bosco Tenso erano simili a quelli di Premosello, mentre nei gammaridi l'aumento verso valle era più costante, con valori a Premosello maggiori rispetto a quelli della stazione di Bosco Tenso.

Analogamente, anche nei molluschi filtratori i tenori di DDX e Hg sono tornati a valori elevati, confrontabili con quelli del 2015 e del 2017 quando vi erano stati picchi di contaminazione, pur restando nel range di valori tipici degli ultimi 10 anni, generalmente inferiori al periodo precedente.

Per quanto riguarda la fauna ittica del Lago Maggiore, anche quest'anno gli agoni si sono rilevati maggiormente contaminati da DDX e PCB rispetto alle altre specie studiate. In particolare sono stati rilevati valori di DDX superiori allo standard di qualità per il biota in tre campioni di agoni grandi e uno (quello primaverile) di agoni piccoli, mentre nessun valore dei PCB indicatori ha superato gli standard di qualità. L'andamento delle concentrazioni dei PCB è molto simile a quello dei DDX, confermando che i valori misurati di PCB sono in generale in buon equilibrio rispetto al loro contenuto di lipidi. Anche il valore soglia di 6,5 pg TEQ g⁻¹ p.f. di PCB dioxin like (PCB-dl) su agoni e coregoni del Lago Maggiore, non è stato superato nel 2019 per nessuna specie. Anche quest'anno, le concentrazioni di Hg e PBDE nei tessuti muscolari dei pesci superano largamente gli standard di qualità per il biota.

Infine le concentrazioni di HBCD sono risultate sempre sotto i limiti di quantificazione di 1 ng g⁻¹ p.f., ad eccezione dell'agone grande che in inverno lo supera come già avvenuto nel 2017, senza raggiungere il limite per lo standard di qualità, mentre il DBDPE non è mai stato rilevato nei campioni ittici.

Nel caso dello zooplancton, è da sottolineare ancora una volta la presenza significativa del composto parentale dei DDX a gennaio 2019 e, in misura minore, a novembre 2019, anche se i metaboliti dominanti sono risultati il p,p'-DDE e le due forme di DDD. L'analisi di Hg mostra per le

prime due stagioni valori paragonabili a quelle degli anni precedenti, anche se l'analisi è ancora parziale, in quanto i valori maggiori si registrano generalmente in inverno, un dato ad oggi ancora in fase di elaborazione.

Per quanto riguarda la fauna ittica dei tributari, l'attività del 2018 e del 2019 ha fatto seguito allo studio preliminare del 2017, volto ad individuare gli ambienti e le specie da analizzare con maggiore attenzione nell'anno successivo. Anche in questa campagna di campionamento, le analisi hanno evidenziato per i composti organici uno stato di contaminazione abbastanza omogeneo tra i diversi tributari, con i valori massimi misurati nel Boesio per tutti gli inquinanti, compresi i DDx. I valori misurati cadevano comunque entro i limiti imposti dalla normativa italiana per caratterizzare lo stato di qualità dei corpi idrici, ad eccezione dei PBDE, che presentano un SQA_{biota} più basso rispetto a quanto previsto per gli altri contaminanti. Al contrario, l'analisi del Hg ha mostrato una concentrazione significativamente maggiore per i cavedani del Toce, con un valore in linea con la soglia di qualità. Come già riscontrato per i pesci del lago, anche trote e cavedani dei tributari superano lo SQA_{biota} per il mercurio.

Confrontando i livelli di contaminazione misurati nel 2019 nella fauna ittica degli immissari rispetto a quelli degli anni precedenti, si registra ancora un abbassamento della contaminazione da DDx, più evidente nel F. Toce rispetto agli altri tributari, ad eccezione dei pesci del Boesio.

Come si è detto, nel programma delle attività del 2019 è stato deciso di integrare in via sperimentale le informazioni provenienti dalle analisi chimiche dei sedimenti e del biota con indagini ecotossicologiche sui loro effetti, basate sul "biomarker approach".

Per quanto riguarda la fauna ittica dei tributari, sono stati esaminati due enzimi di detossificazione (EROD e GST) e tre enzimi antiossidanti (SOD, CAT e GPx), mentre non è stato possibile esaminare un biomarker di neurotossicità (AChE) a causa delle limitazioni dovute all'emergenza sanitaria.

Verrà fatto un tentativo di svolgere queste analisi quando gli accessi ai laboratori saranno ripristinati, sempre che i campioni conservati siano ancora utilizzabili.

I risultati hanno mostrato attività enzimatiche simili tra gli esemplari di cavedano prelevati nei quattro immissari (Boesio, Margorabbia, San Giovanni e Toce), rispecchiando i risultati delle analisi chimiche che avevano indicato valori di contaminazione da composti lipofili simili tra i cavedani dei diversi immissari.

Nel caso delle trote fario, invece, gli enzimi antiossidanti hanno mostrato attività significativamente più bassa (SOD) e più alta (GPx) nel torrente più contaminato, il Boesio, suggerendo che la trota fario sia più sensibile agli effetti dei contaminanti rispetto al cavedano.

Le attività enzimatiche sono state misurate anche nei campioni di chironomidi provenienti da 5 tributari (Tresa, Boesio, Margorabbia, Toce, Bardello) e dal Ticino immissario. Anche in questo caso sono stati analizzati enzimi di detossificazione (GST) e antiossidanti (CAT), mentre l'emergenza sanitaria ha impedito di effettuare le analisi di altri enzimi.

Per quanto riguarda l'enzima di detossificazione (GST), sono stati misurati valori più elevati nei chironomidi raccolti nel Tresa e nel Ticino Emissario, indicando rispettivamente come il primo sia un'importante sorgente di inquinanti lipofili, e come dal Verbano esca costantemente una miscela di inquinanti lipofili che andrà a interessare gli ecosistemi posti a valle.

L'enzima antiossidante (CAT) ha mostrato valori elevati nel Toce, indicando la presenza della contaminazione, e valori più bassi di controlli per i tre campioni del Tresa e per i campioni di ottobre del Toce, Bardello e Ticino emissario. Questi valori molto bassi potrebbero indicare un'elevata contaminazione, tale da provocare un'inibizione da substrato dell'enzima.

Da questa sperimentazione appare come le analisi dei biomarker enzimatici nei chironomidi siano uno strumento promettente per il monitoraggio ambientale, ma anche che l'interpretazione dei risultati richiederebbe l'analisi di una batteria più ampia di enzimi, con la necessità di prelevare quantità più elevate di organismi.

Un terzo test sperimentato è stato il saggio di tossicità subcronica dei sedimenti dei tributari sull'ostracode *Heterocypris incongruens*. Con questo test, non è stata rilevata mortalità significativa, mentre è emersa una riduzione della crescita nei campioni autunnali del Bardello e del Ticino emissario, con inibizione rispettivamente del 33% e del 23%, in linea con l'inibizione dell'attività della catalasi riscontrata nei chironomidi.

1b. EXECUTIVE SUMMARY

Aldo Marchetto, CNR-IRSA, Verbania

This report describes the activity in the first year of a new three-year investigation program on dangerous substances in the Lake Maggiore ecosystem. In this first year of activity of the new three-year period, the most innovative aspect is represented by the experimentation of the so-called "effect-based tools", together with the updating of the time series acquired over time on the presence and distribution of some pollutants particularly relevant in the ecosystem of Lake Maggiore.

The updating of the time series concerned the qualitative and quantitative analysis of dangerous substances and trace elements in fish, the study of the path of these substances along the trophic network, through zooplankton, and their presence in filter mollusks, typical coastal organisms, and the evaluation of the origin of the pollution through the analysis of the sediments of the tributaries.

In general, the 2019 research has confirmed once again the importance of the hydrological regime for the supply of pollutants to Lake Maggiore. In fact, if the first part of 2018 was neither particularly rainy nor particularly dry, there were remarkable floods during autumn 2018 and in the months of July, August and October 2019. These events led to the increase in the concentrations of pollutants detected in biota in 2019, most likely due to the release of pollutants deposited in the past in the soils and river sediments and mobilized by intense rains and flood events respectively.

This general picture is particularly evident in the case of sediment analyzes at the mouth of the tributaries, which are intended to understand the origin of organic pollutants and trace metals present in Lake Maggiore. The choice of tributaries and compounds in each tributary depends on the present and past human pressures and on the analyzes made in the past, which allowed to exclude some substances present in negligible quantities in some inlets. For example, two large inlets such as Ticino Immissario and Maggia were not included, as in the past they had shown a very low level of contamination.

DDT and its metabolites (collectively referred to as DDx) were therefore measured only in the Ticino River (lake outlet) and in the Toce River, upstream (Domodossola and Prata) and downstream (Bosco Tenso, Premosello, Ornavasso and Gravellona Toce) of the industrial site. In Gravellona Toce they showed quite variable values, particularly high in July and October, as expected following intense rainfall, and with a high fraction (> 60%) of the non-metabolized parental compound (p, p'-DDT), an indicator of a recent contribution of pollution.

Instead, in Bosco Tenso and Ornavasso, the DDx concentration was higher in February, after the intense autumn rains, to return to previous values in October. The prevalence of p, p'-DDT in the non-metabolized parental form was less marked than in the sediment taken from Gravellona Toce in July.

On the contrary, for the other compounds (PCB, PBDE, HBCD, DBPDE, Hg) the average values were similar or lower than those of 2018. The Boesio and Bardello rivers are once again the tributaries that contribute to a larger extent to the contamination in the lake, respectively by PBDE and PCB, but also from Hg. In addition, the presence of a source of contamination in Tresa is confirmed by peaks of concentration for PAH and Hg, similar to those already occurred in 2015.

This general picture was also confirmed by the analyzes of benthic invertebrates, among which Diptera and gammarids are the main accumulators of DDx and Hg, with a similar spatial pattern: the measured values were always markedly higher downstream of the industrial site and the maximum concentration values for both groups were measured at Ornavasso for the DDx and at Bosco Tenso for the mercury. For DDx, in Diptera, the Bosco Tenso values were similar to those of Premosello,

while in the gammarids the increase downstream valley was more constant, with values in Premosello higher than those of the Bosco Tenso station.

Similarly, in filtering molluscs, the levels of DDX and Hg were comparable to the high values found in 2015 and 2017, while remaining within the range of typical values of the last 10 years, generally lower than the previous period.

As regards the fish fauna of Lake Maggiore, *Alosa agone* was found to be more contaminated by DDX and PCB than the other species studied. In particular, DDX values higher than the quality standard for biota were detected in three samples of large specimen and one (the spring one) of small specimen, while no value of the indicator PCBs exceeded the quality standards. The trend of PCB concentrations is very similar to that of DDX, confirming that the measured values of PCBs are generally in good balance with respect to their lipid content. The concentrations of Hg and PBDE in the muscle tissues of fish far exceed the quality standards for biota. Finally, the concentration of HBCD was generally below the quantification limits of 1 ng g⁻¹ fresh weight.

In the case of zooplankton, it should be emphasized once again the significant presence of the parental compound of DDX in January 2019 and, to a lesser extent, in November 2019, even if the dominant metabolites were p, p'-DDE and the two forms of DDD.

As regards the river fish fauna, the activity of 2018 and 2019 followed the preliminary study of 2017, aimed at identifying the environments and species to be analyzed with greater attention in the following year. Also in this sampling campaign, the analyzes showed for organic compounds a fairly homogeneous state of contamination between the different tributaries, with the maximum values measured in Boesio for all pollutants, including DDX. The measured values, however, fell within the limits imposed by Italian legislation to characterize the quality status of water bodies, with the exception of PBDEs, which have a lower limit. On the contrary, the analysis of the Hg showed a significantly higher concentration for the chubs of the Toce. As already found for lake fish, trout and chub of the tributaries exceed the quality limit for mercury.

As mentioned above, in the 2019 program of activities it was decided to experimentally integrate the information from the chemical analyzes of sediments and biota with ecotoxicological investigations on their effects, based on the "biomarker approach"

As regards the detoxification enzyme (GST), higher values were measured in the chironomids collected in the Tresa and Ticino Emissary, indicating respectively how the former is an important source of lipophilic pollutants, and how a mixture constantly comes from Verbano of lipophilic pollutants that will affect the downstream ecosystems.

The antioxidant enzyme (CAT) showed high values in the Toce, indicating the presence of contamination, and lower values of controls for the three samples of the Tresa and for the October samples of the Toce, Bardello and Ticino emissary. These very low values could indicate a high contamination, such as to cause an inhibition of the enzyme substrate.

From this experiment it appears that the analysis of the enzymatic biomarkers in the chironomids are a promising tool for environmental monitoring, but also that the interpretation of the results would require the analysis of a larger battery of enzymes, with the need to take higher quantities of organisms.

A third experiment tested was the subchronic toxicity test of tributary sediments on the ostracode *Heterocypris incongruens*. With this test, no significant mortality was detected, while there was a reduction in growth in the autumn samples of Bardello and Ticino Rivers, with inhibition of 33% and 23% respectively, in line with the inhibition of catalase activity found in chironomids.

2. CONTAMINANTI NELLO ZOOPLANCTON

Roberta Bettinetti, Carlo Dossi, Rossella Perna, Università dell'Insubria, Como
Marina Manca, Roberta Piscia, CNR-IRSA, Verbania Pallanza
Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon, CNR-IRSA, Brugherio (MB)

Nel corso del 2019 la componente zooplanctonica della zona pelagica del Lago Maggiore è stata analizzata stagionalmente nella stazione di Ghiffa, rappresentativa, anche per la contaminazione da DDT e PCB oltre che per i parametri chimico-fisici e biologici, della zona centro-settentrionale del bacino. Lo zooplancton è stato raccolto suddividendolo e analizzandolo in due frazioni dimensionali, utilizzando un retino a bocca larga (diametro pari a 59 μm) con rete in nylon da 450 μm e da 850 μm di luce entro lo strato 0-50 m (fraz. $\geq 450 \mu\text{m}$ e fraz. $>850 \mu\text{m}$).

A causa della sospensione dell'attività di laboratorio in conseguenza dell'emergenza COVID-19, non è stato possibile determinare il contenuto degli inquinanti nel campione di gennaio del corrente anno. Al fine di avere una visione stagionale completa sono stati inseriti i dati relativi a gennaio 2019 (già presenti nello scorso rapporto).

Ad ogni campionamento una parte del campione è stata filtrata su filtri in microfibra di vetro con pori di 1,2 μm (GF/C, diametro 4,7 cm), congelata a -20 °C e successivamente liofilizzata per la determinazione analitica dei pesticidi clorurati e dei PCB; un terzo circa del volume totale del campione raccolto è stata fissato in alcool per la classificazione tassonomica.

I composti prioritari analizzati sono stati: il p,p'-DDT e i due metaboliti p,p'-DDE e p,p'-DDD e i rispettivi isomeri o,p'- e 14 congeneri di policlorodifenili (PCB). Per tutti i composti il limite di rilevabilità analitica è pari a 0,1 ng g⁻¹ di peso secco.

I campioni, dopo liofilizzazione, sono stati pesati per la determinazione del peso secco e sottoposti ad estrazione mediante estrattore Soxhlet utilizzando una miscela di acetone-*n*-esano (1:1 v/v) in un ditale di microfibra di vetro (19x9x90 mm, Whatman, England). L'estratto concentrato di ciascun campione è stato purificato ed analizzato in GC con ECD utilizzando per la quantificazione uno standard esterno preparato a partire dai singoli composti in isoottano.

La misura della frazione lipidica è stata effettuata mediante determinazione gravimetrica sul campione estratto, essiccato sotto flusso di azoto e portato a peso costante.

Le percentuali lipidiche dello zooplancton delle due frazioni dimensionali nelle diverse stagioni del 2019 sono riportate nella tabella 2.1.

Tab. 2.1. Percentuale lipidica delle tre frazioni dimensionali dello zooplancton campionato a Ghiffa per i quattro campionamenti stagionali e media annuale, espressa sul peso secco.

	2019				Media
	gennaio	maggio	agosto	novembre	
fraz. $\geq 450 \mu\text{m}$	17,0	10,5	9,4	10,8	11,9
fraz. $\geq 850 \mu\text{m}$	8,6	12,9	10,1	10,9	10,6

Nell'arco dell'anno la frazione che ha su base media un contenuto lipidico leggermente maggiore è quella $\geq 450 \mu\text{m}$. Gli organismi della frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ hanno una percentuale lipidica particolarmente elevata a gennaio, a cui segue un andamento abbastanza costante. La frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ presenta invece una minore percentuale lipidica a gennaio, aumentando a maggio per poi assestarsi su valori circa uguali nei mesi successivi.

I risultati relativi alla concentrazione di DDT totali (somma dei p,p'- e degli o,p'-) nelle due frazioni dimensionali dello zooplancton sono riportati nella figure 2.1 e 2.2.

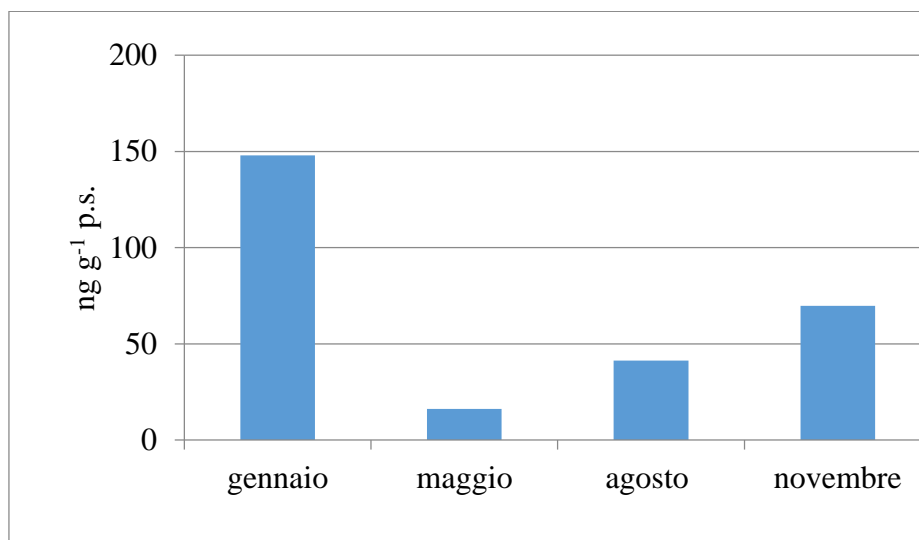


Fig. 2.1. DDT totali nello zooplancton, frazione $\geq 450 \mu\text{m}$. Dati espressi in ng g^{-1} di peso secco.

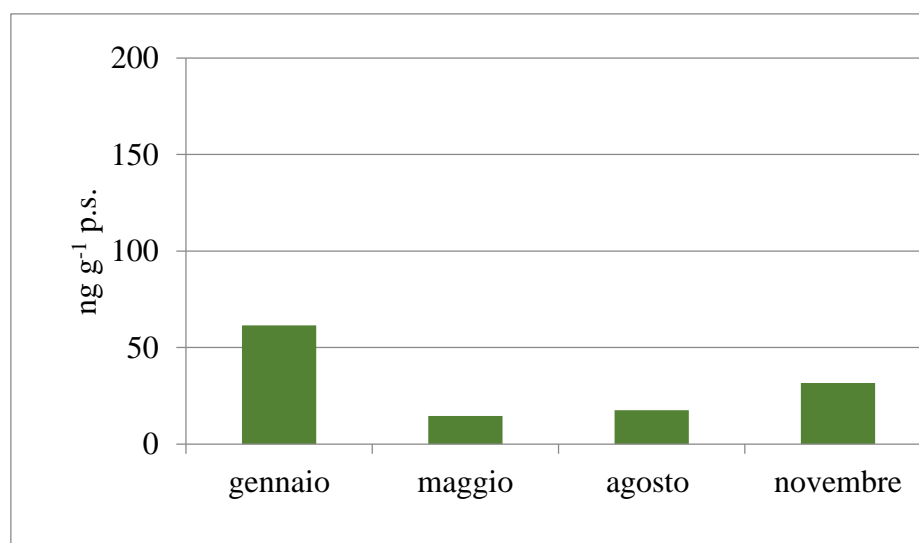


Fig. 2.2. DDT totali nello zooplancton, frazione $\geq 850 \mu\text{m}$. Dati espressi in ng g^{-1} di peso secco.

La concentrazione media di DDT totali nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ è stata di $68,8 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.s.}$, pari a poco più del doppio della frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ ($31,2 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.s.}$). La concentrazione maggiore, misurata a gennaio 2019, è stata rilevata nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$. La frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ ha presentato valori di concentrazione di DDT più alti a gennaio e l'andamento della contaminazione ricalca quello della frazione $\geq 450 \mu\text{m}$.

I risultati della determinazione del o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT e p,p'-DDT riferiti al peso secco dei campioni sono riportati nella figura 2.3 e 2.4, rispettivamente per la frazione dimensionale $\geq 450 \mu\text{m}$ e per quella $\geq 850 \mu\text{m}$.

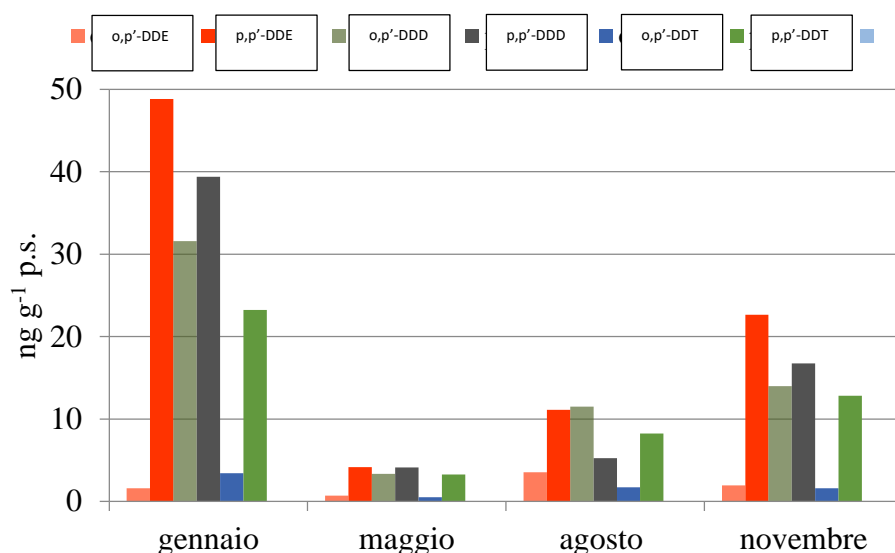


Fig. 2.3. p,p'-DDT, suoi metaboliti e isomeri nello zooplancton (frazione $\geq 450 \mu\text{m}$) nella stazione di Ghiffa nel 2019. I dati sono espressi in ng g^{-1} di peso secco.

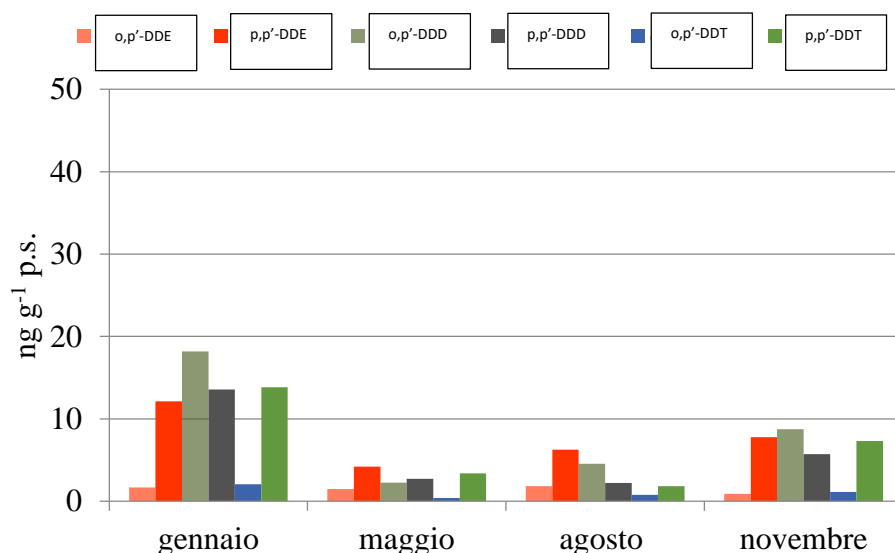


Fig. 2.4. p,p'-DDT, suoi metaboliti e isomeri nello zooplancton (frazione $\geq 850 \mu\text{m}$) nella stazione di Ghiffa nel 2019. I dati sono espressi in ng g^{-1} di peso secco.

Tra i metaboliti e isomeri del p,p'-DDT, il p,p'-DDE risulta essere sempre prevalente nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ mentre nell'altra frazione a gennaio è superato da o,p'-DDD e p,p'-DDD e a novembre dall'o,p'-DDD. La concentrazione maggiore di p,p'-DDE è stata rilevata nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ a gennaio. Continua ad essere rilevante la presenza di p,p'- e op'-DDD; l'o,p'-DDD nella frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ è risultato essere superiore al suo composto parentale (ad eccezione di maggio in cui i livelli sono confrontabili); nell'altra frazione solo ad agosto. Da sottolineare la presenza non trascurabile (superiore a $10 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.s.}$) del composto parentale p,p'-DDT a gennaio in entrambe le frazioni campionate. Nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$, il p,p'-DDT è presente in concentrazione superiore a $10 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.s.}$ anche a novembre.

In termini di valori medi annuali il p,p'-DDE prevale nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$, mentre nella frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ è maggiore, seppur di poco, il p,p'-DDD, seguito dal p,p'-DDE (21,7 p,p'-DDE

ng g⁻¹ p.s. nella frazione ≥450 μm; 8,4 p,p'-DDD ng g⁻¹ p.s. e 7,6 p,p'-DDE ng g⁻¹ p.s. nella frazione ≥ 850 μm).

Considerando solo i composti o,p'- quello prevalente è sempre l'o,p'-DDD e raggiunge la massima concentrazione nello zooplancton ≥450 μm a gennaio.

Tra tutti i composti, anche se il p,p'-DDE rappresenta un contributo importante, va evidenziato come l'o,p'-DDD e il p,p'-DDD siano presenti con concentrazioni considerevoli, superando anche quest'anno il p,p'-DDE, come già evidenziato. La presenza di o,p'-DDD conferma ancora una volta l'origine industriale della contaminazione. La presenza soprattutto nei mesi più freddi del composto parentale, p,p'-DDT porterebbe alla comparsa dell'isomero o,p'-DDT (in misura del 12-20%), che viene a sua volta convertito nel suolo e nei sedimenti nei metaboliti o,p'-DDD e o,p'-DDE.

I PCB totali misurati nel corso del 2019 nelle due frazioni dimensionali sono riportati nelle figure 2.5 e 2.6.

Le concentrazioni di PCB presentano un picco nella frazione ≥450 μm a gennaio, mentre nella frazione ≥850 μm la concentrazione più alta è stata misurata a novembre. Le concentrazioni totali medie sono superiori nella frazione ≥450 μm rispetto alla frazione ≥850 μm (64,1 ng g⁻¹ p.s. e 39,5 ng g⁻¹ p.s.) e l'andamento delle concentrazioni risulta confrontabile, con un aumento nei mesi più freddi (gennaio e novembre).

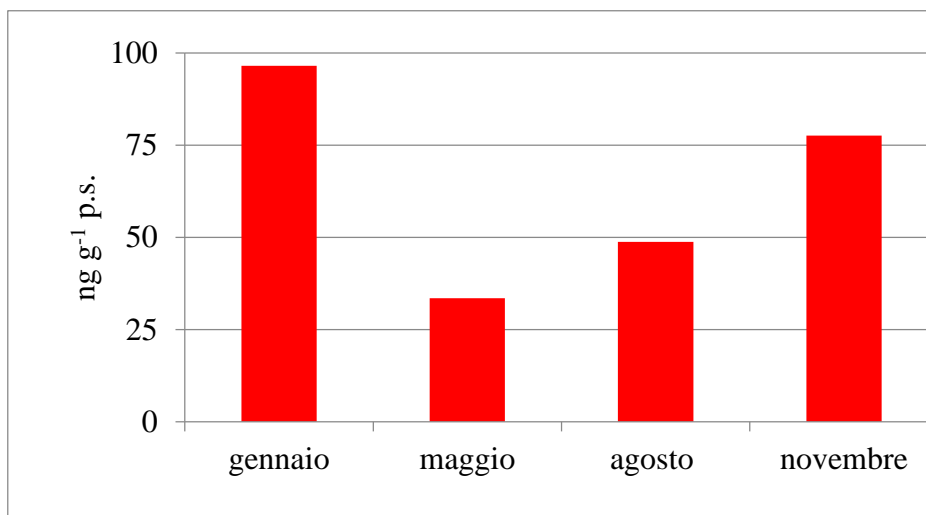


Fig. 2.5. PCB totali nella frazione di zooplancton ≥450 μm nel 2019. Dati espressi in ng g⁻¹ di peso secco.

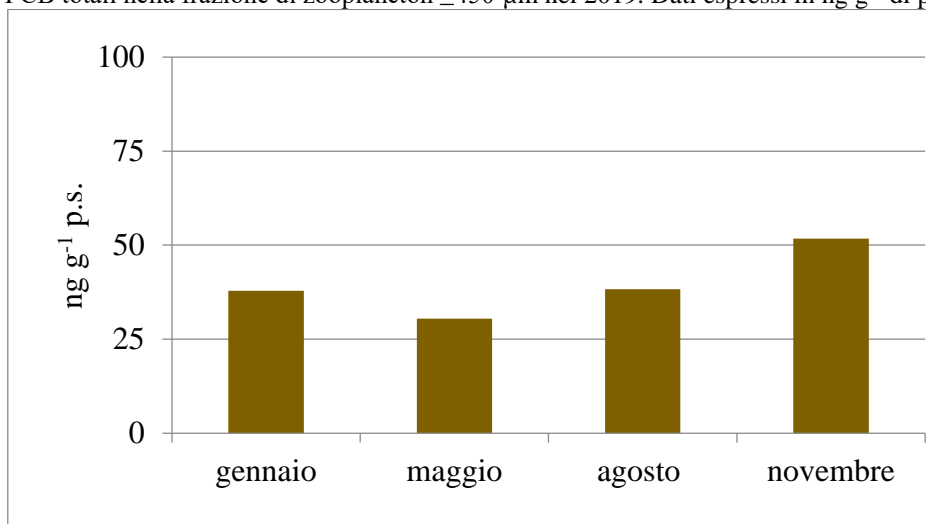


Fig. 2.6. PCB totali nella frazione di zooplancton ≥ 850 μm nel 2019. Dati espressi in ng g⁻¹ di peso secco.

I profili dei congeneri nelle due frazioni dimensionali (Fig. 2.7 e 2.8) evidenziano che il maggior contributo ai PCB totali dell'anno che si verifica a gennaio sia determinato nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ dal PCB153, PCB 138, PCB 101, PCB 44. Nella frazione di dimensioni maggiori il maggior contributo di novembre è dato dal PCB 18 e dal PCB 44; a gennaio deriva dal PCB 18 e dal PCB 153.

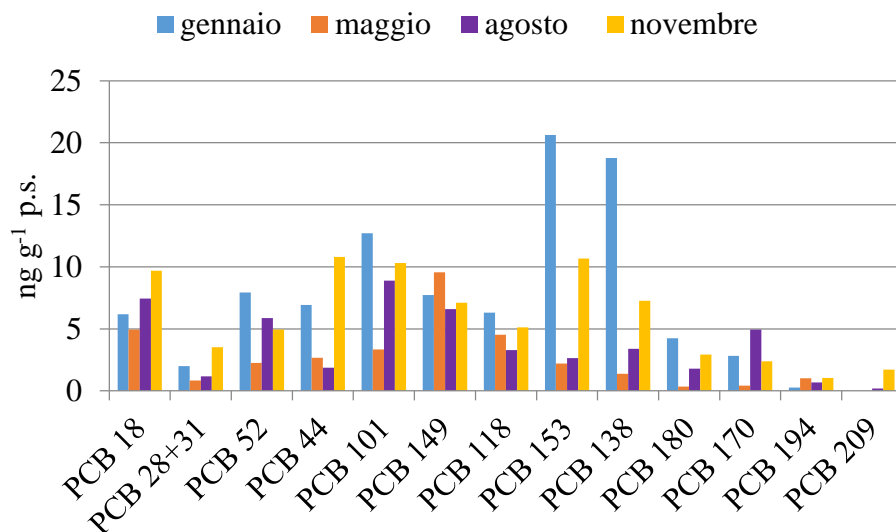


Fig. 2.7. Singoli congeneri di PCB nello zooplancton della frazione dimensionale $\geq 450 \mu\text{m}$ nel 2019 nelle diverse stagioni. Dati espressi in ng g^{-1} di peso secco.

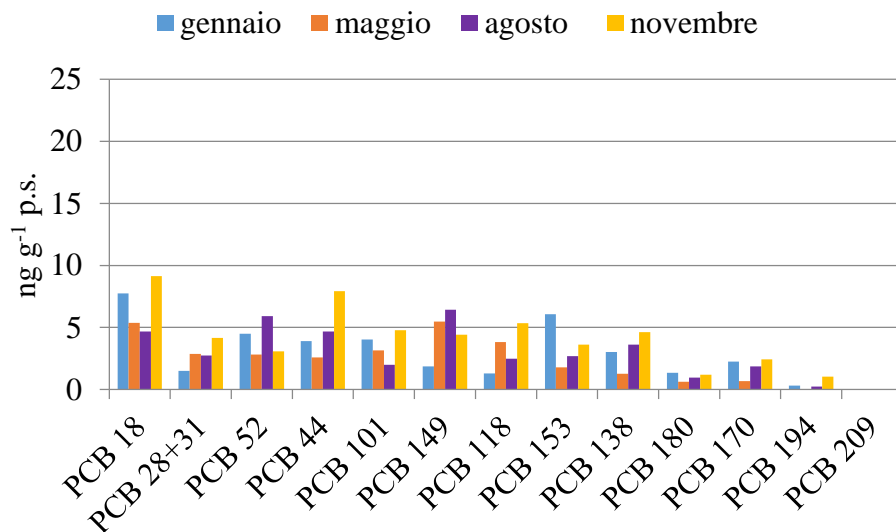


Fig. 2.8. Singoli congeneri di PCB nello zooplancton della frazione dimensionale $\geq 850 \mu\text{m}$ nel 2019 nelle diverse stagioni. Dati espressi in ng g^{-1} di peso secco.

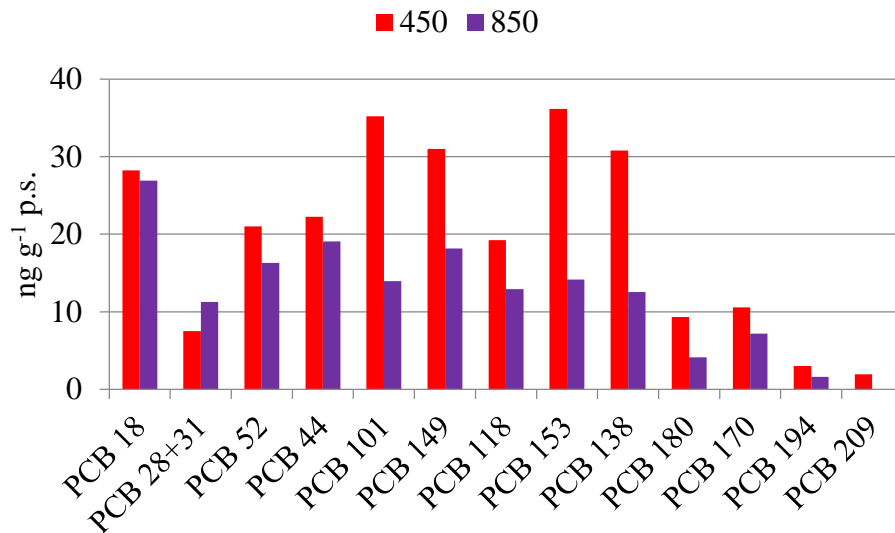


Fig. 2.9. Concentrazioni totali annuali dei diversi congeneri di PCB nelle diverse frazioni di zooplancton nel 2019. Dati espressi in ng g⁻¹ di peso secco.

In relazione alle concentrazioni totali annuali dei diversi congeneri la frazione di zooplancton $\geq 450 \mu\text{m}$ è generalmente la più contaminata (Fig. 2.9), ad eccezione del PCB 28+31. I valori più alti sono stati registrati per il PCB 101 e il PCB 153, seguiti dal PCB 149 e PCB138.

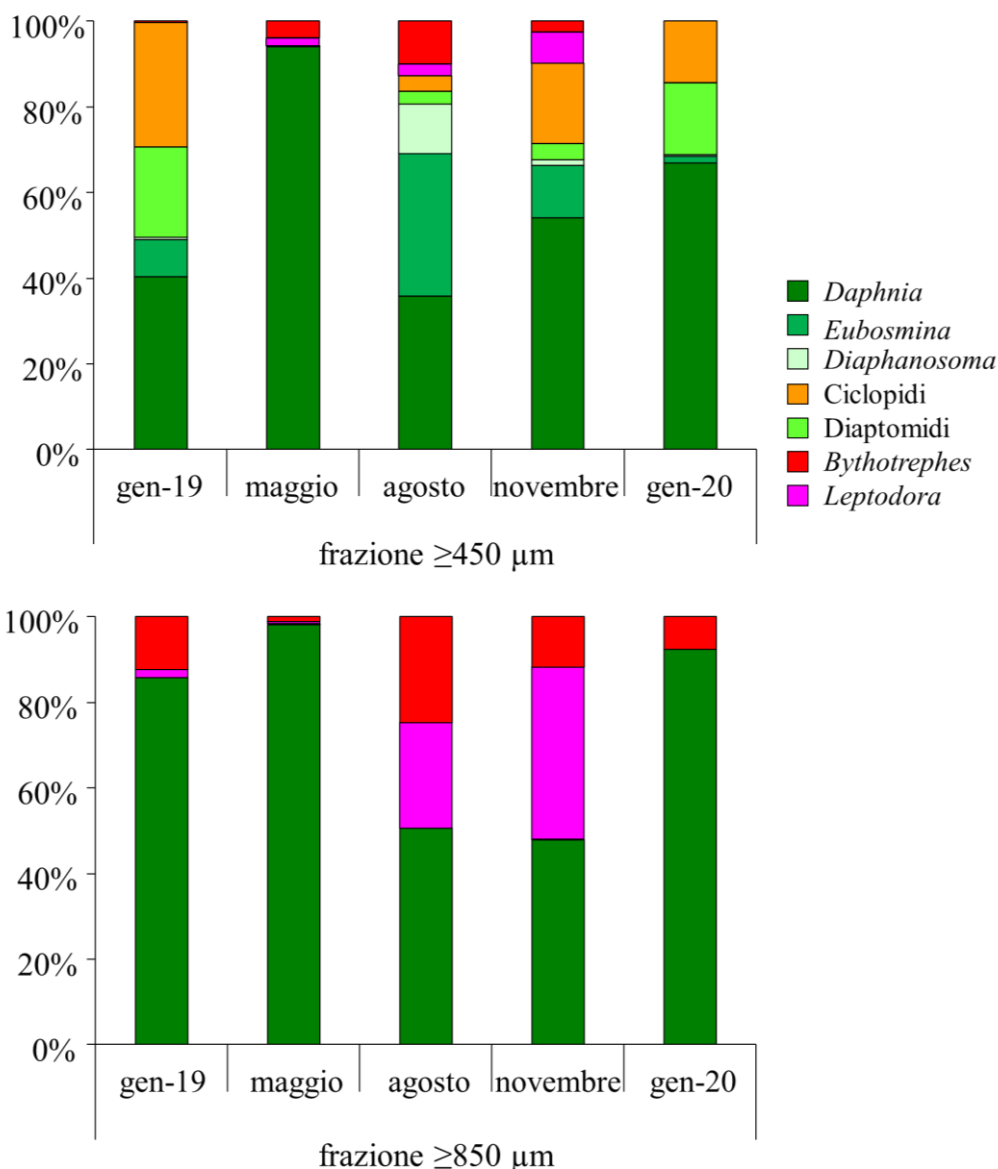


Fig. 2.10. Contributo relativo dei taxa zooplanctonici alla biomassa totale dello zooplancton di rete nelle due frazioni dimensionali analizzate.

Come per gli anni precedenti, la frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ è risultata principalmente composta, in tutti e quattro i campioni, dai consumatori primari (i.e. *Daphnia*, *Diaphanosoma*, *Eubosmina* e diaptomidi), nel complesso costituenti tra il 70% e il 95% della biomassa totale calcolata (Fig. 2.10). In particolare, a maggio, il 95% della biomassa dei consumatori primari è risultata costituita dal filtratore non selettivo *Daphnia*, mentre nei restanti mesi un ruolo non trascurabile lo hanno avuto i diaptomidi (21% e al 17% a gennaio 2019 e 2020, rispettivamente) ed *Eubosmina* (33% ad agosto e 12% a novembre). I ciclopidi sono risultati la componente dominante della biomassa dei consumatori secondari a gennaio 2019 e 2020 e a novembre (pari al 29%, al 14 e al 19%, rispettivamente). Questi organismi sono spesso ricchi di goccioline lipidiche, una loro presenza più massiccia nel campione potrebbe risultare in un alto contenuto lipidico così come è stato osservato nel campione di gennaio 2019. Il campione di agosto si è distinto per una maggior presenza del vorace crostaceo predatore *Bythotrephes longimanus* (10%).

La frazione dimensionale $\geq 850 \mu\text{m}$ è stata caratterizzata da una maggior presenza dei grandi cladoceri predatori *Bythotrephes* e *Leptodora* nella seconda parte dell'anno, con valori complessivamente pari a circa il 50% della biomassa totale. Mentre ad agosto, tale valore è risultato

egualmente suddiviso tra i due organismi, a novembre è risultata dominare *Leptodora*. Il campione di maggio della frazione dimensionale $\geq 850 \mu\text{m}$, essendo composto per il 98% da *Daphnia*, è risultato, in termini di composizione relativa, molto simile a quello dello stesso mese della frazione $\geq 450 \mu\text{m}$, probabilmente perché il campionamento è stato effettuato in concomitanza con la massima crescita numerica di questo cladocero.

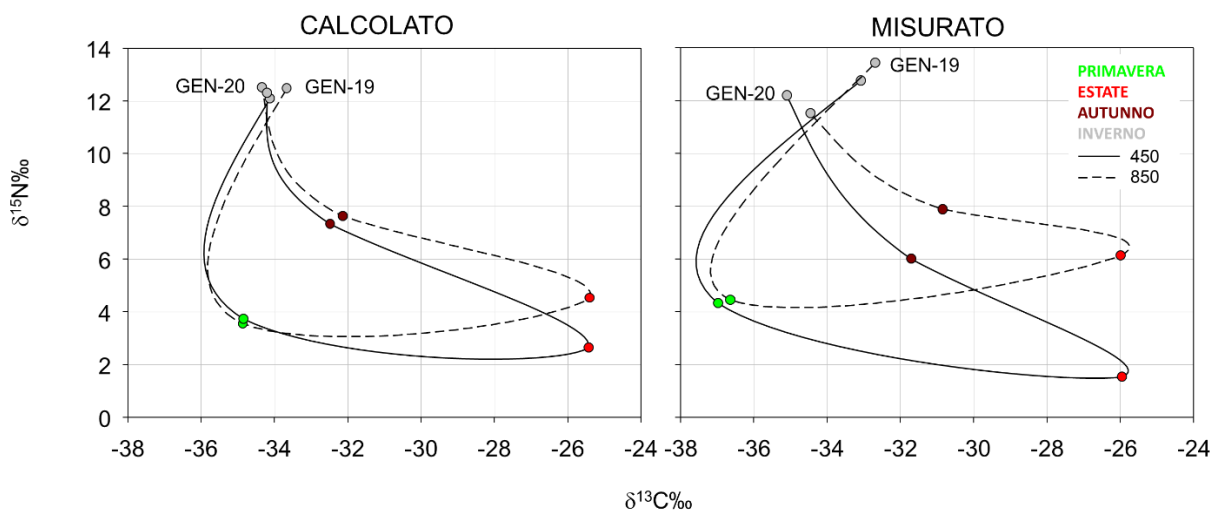


Fig. 2.11. Variazione stagionale del segnale isotopico di carbonio e azoto nelle due frazioni dimensionali analizzate (v. il testo per ulteriori spiegazioni).

A causa dell'emergenza sanitaria i risultati delle analisi isotopiche sono pervenuti dal laboratorio canadese con un ritardo di circa 2 mesi, pertanto, inizialmente abbiamo effettuato una stima della variazione stagionale dei segnali isotopici delle due frazioni analizzate (Fig. 2.11 pannello a sinistra). Il calcolo è stato eseguito con la media stagionale dei segnali isotopici dei singoli taxa nel periodo 2016-2018 (Bettinetti et al. 2019) e applicando la seguente formula:

$$\delta^{15}\text{N}, \delta^{13}\text{C}_{\text{pooled sample}} = (i \times \text{biomassa}\%)_{\text{taxon1}} + \dots + (i \times \text{biomassa}\%)_{\text{taxonN}},$$

dove $i = \delta^{15}\text{N}\text{‰}$ e $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ sono i segnali isotopici dei singoli taxa (Piscia et al. 2019).

Sebbene in termini di valore assoluto il segnale isotopico debba essere necessariamente verificato tramite le analisi di laboratorio, ci sono alcune considerazioni che, sulla base dell'esperienza pregressa possono essere fatte con una certa sicurezza. La spiccata stagionalità del *fingerprint* isotopico, maggiormente arricchito in azoto in inverno, e con $\delta^{13}\text{C}$ meno negativo in estate, è una caratteristica del popolamento zooplanctonico pelagico osservata anche in altri ambienti (e.g. Piscia et al. 2018, 2019; Visconti et al. 2014, 2018). La sovrapposizione del segnale isotopico delle due frazioni in primavera è realistica, in quanto la composizione dei due campioni in termini di biomassa relativa è risultata pressoché identica (Fig. 2.10). Infine, il maggior arricchimento in $\delta^{15}\text{N}$ del campione della frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ rispetto a quella $\geq 450 \mu\text{m}$, deriva da un maggior contributo alla biomassa totale dei consumatori secondari, tipicamente più arricchiti in azoto rispetto ai consumatori primari.

Il pannello di destra della figura 2.11 riporta i valori di $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ derivanti dalle analisi. Sebbene l'andamento generale ricalchi abbastanza bene quello dei valori isotopici stimati, sono ben evidenti delle differenze in termini di valore assoluto. In particolare, per il carbonio è stata osservata una cospicua differenza nei campioni di maggio della frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{reale}} = -36,97$ vs. $\delta^{13}\text{C}_{\text{calcolato}} = -34,84$) e di maggio e novembre della frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{reale}} = -36,64$ vs. $\delta^{13}\text{C}_{\text{calcolato}} = -34,86$ e $\delta^{13}\text{C}_{\text{reale}} = -30,84$ vs. $\delta^{13}\text{C}_{\text{calcolato}} = -32,13$, rispettivamente). Per il segnale

isotopico dell'azoto, invece, le maggiori variazioni tra valori stimati e calcolati sono state rilevate ad agosto e novembre nella frazione $\geq 450 \mu\text{m}$ ($\delta^{15}\text{N}\%_{\text{reale}} = 1,54$ vs. $\delta^{15}\text{N}\%_{\text{calcolato}} = 2,65$ e $\delta^{15}\text{N}\%_{\text{reale}} = 6,02$ vs. $\delta^{15}\text{N}\%_{\text{calcolato}} = 7,33$, rispettivamente) e ad agosto nella frazione $\geq 850 \mu\text{m}$ ($\delta^{15}\text{N}\%_{\text{reale}} = 6,14$ vs. $\delta^{15}\text{N}\%_{\text{calcolato}} = 4,52$). Complessivamente, tali variazioni si sono tradotte in una distinzione più pronunciata, a livello di contenuto isotopico di carbonio e azoto, delle due frazioni analizzate, fatta eccezione per i campioni primaverili, caratterizzati da una composizione relativa pressoché identica nelle due frazioni dimensionali. Le differenze interannuali di contenuto isotopico nei campioni zooplanctonici sono attribuibili non solo ad una diversa composizione tassonomica, ma anche alle variazioni ambientali, sia abiotiche che biotiche, alle quali gli organismi sono sottoposti. Studi precedenti hanno infatti dimostrato la correlazione del contenuto isotopico di carbonio di *Daphnia*, organismo utilizzato come tracciante della linea di base, con la temperatura media dei primi 50 metri della colonna d'acqua (Manca et al. 2009). Anche la presenza di *bloom* algali possono influire sul contenuto isotopico degli organismi zooplanctonici, così come la composizione tassonomica del popolamento fitoplanctonico. Alti tassi fotosintetici possono portare ad una riduzione della concentrazione in acqua della CO_2 di origine atmosferica, favorendo l'utilizzo da parte degli organismi fitoplanctonici di fonti alternative di carbonio (Zohary et al. 1994; Caroni et al. 2012), mentre la presenza di specie di Cianofitee azoto-fissatrici può determinare valori molto bassi di $\delta^{15}\text{N}\%$ in organismi quali *Eubosmina*, che se ne cibano.

Data la complessità delle interazioni tra organismi e ambiente, quelli fin qui descritti sono solo alcuni dei fattori che possono determinare le variazioni interannuali del *fingerprint* isotopico degli organismi zooplanctonici, una migliore comprensione necessiterebbe di studi più approfonditi.

La figura 2.12 traduce, dal punto di vista grafico, la formula sopra riportata, rendendo intuibile che l'apporto dei singoli taxa al segnale isotopico dei campioni analizzati delle due frazioni dipende non solo dal *fingerprint* isotopico dei singoli (centro delle bolle), ma anche dalla loro biomassa relativa (dimensioni delle bolle). Nel grafico sono anche riportate le concentrazioni degli inquinanti analizzati, il cui andamento conferma la loro tendenza ad incrementare con l'aumento del $\delta^{15}\text{N}\%$, suggerendo uno stato stazionario in termini di apporti di inquinanti a lago.

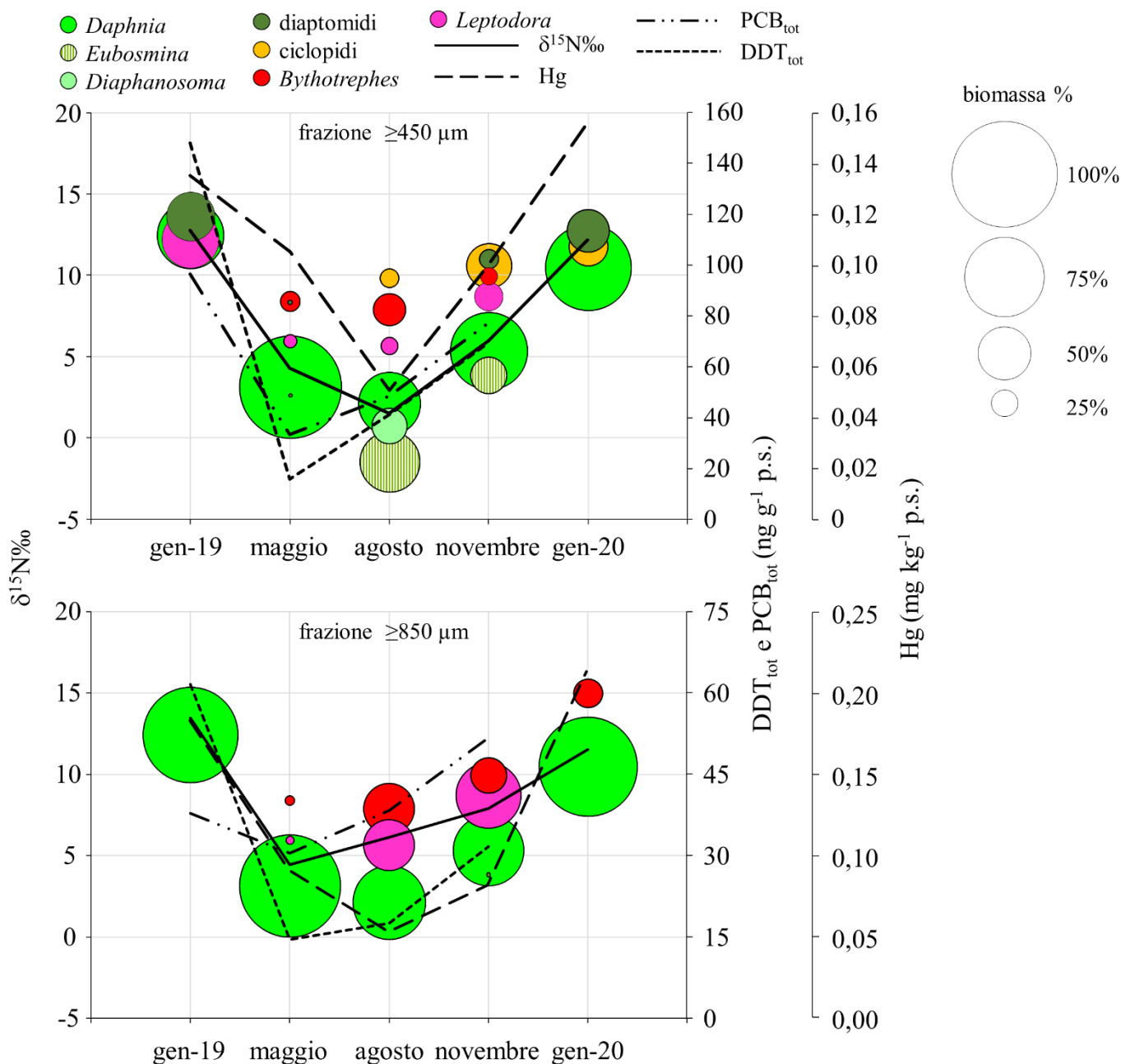


Fig. 2.12. Composizione percentuale della biomassa (bolle) e valori di $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ (centro delle bolle) dei singoli taxa e contenuto di $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$, DDT_{tot} , PCB_{tot} e Hg nei campioni delle due frazioni dimensionali analizzate.

Analisi del mercurio

Gli organismi sono stati campionati nella stazione di Ghiffa a cadenza stagionale, distinguendo due classi dimensionali: $\geq 450 \mu\text{m}$ e $\geq 850 \mu\text{m}$. Successivamente, sono stati liofilizzati, omogenizzati e sottoposti ad analisi del contenuto di mercurio totale mediante analizzatore di mercurio con amalgama d'oro (AMA254, *Automated Mercury Analyzer*, FKV). L'accuratezza è stata verificata tramite analisi del materiale certificato BCR278 *Mussel tissue*, del *Bureau Communautaire de Référence*, ottenendo un recupero del 103%. Ogni campione è stato analizzato in doppio e il coefficiente di variazione percentuale è risultato $\leq 5\%$.

Analogamente a quanto riscontrato nello scorso triennio di attività (CIP AIS, 2019), i valori massimi sono stati riscontrati nella stagione invernale per entrambe le classi dimensionali (Fig. 2.13).

Il valore più elevato è stato riscontrato per la frazione $\geq 850 \mu\text{m}$, con una concentrazione di $0,213 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.s.}$, in linea con quella rilevata nel campione analogo nel 2018. Per le altre stagioni non si rilevano differenze sostanziali tra le due classi dimensionali. Le concentrazioni sono paragonabili a quelle dei precedenti anni di indagine (CIPAIS, 2019).

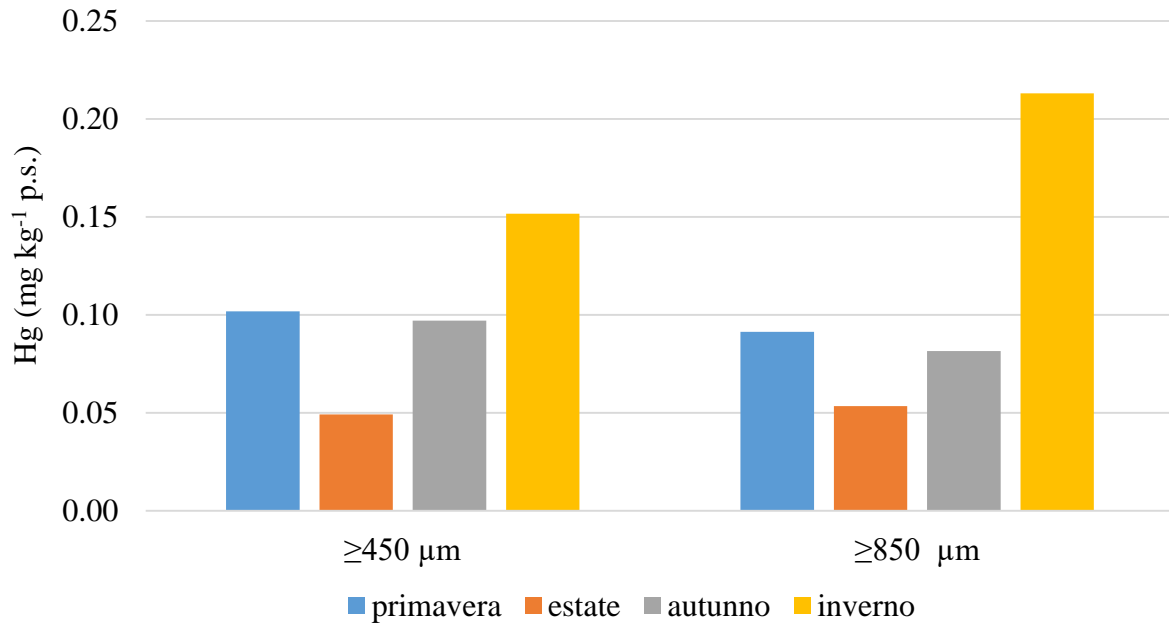


Fig. 2.13 - Concentrazioni di mercurio totale riscontrate nello zooplancton (frazioni dimensionali $\geq 450 \mu\text{m}$ e $\geq 850 \mu\text{m}$) campionato nella stazione di Ghiffa nel 2019 in diverse stagioni.

Bibliografia

- Bettinetti R., Dossi C., Mazzoni M., Piscia R., Manca M., Perna R., Marziali L., Valsecchi L., & Schiavon A. 2019. Contaminanti nello zooplancton: variazioni spazio temporali e fattori di controllo del trasferimento lungo la rete trofica pelagica. In: CNR IRSA. Sede di Verbania. 2019. Indagini sulle sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma triennale 2016-2018. Rapporto finale: 5-12.
- Caroni R., Free G., Visconti A., Manca M. 2012. Phytoplankton functional traits and seston stable isotopes ratio: A functional-based approach in a deep, subalpine lake, Lake Maggiore (N. Italy). *J. Limnol.*, 71, 84–94.
- CIP AIS. 2019. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2018. Rapporto finale 2016-2018.
- Manca M., Visconti A., Fadda A., Caroni R., Cerutti I., & Volta P. 2009. Indagini sullo zooplancton e sulla rete trofica pelagica attraverso analisi d'isotopi stabili di carbonio e azoto. In: C.N.R.-I.S.E. Sede di Verbania. 2009. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma quinquennale 2008-2012. Campagna 2008. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.): 34-52 pp.
- Piscia R., Mazzoni M., Bettinetti, R., Caroni R., Cicala D., & Manca M. M. 2019. Stable Isotope Analysis and Persistent Organic Pollutants in Crustacean Zooplankton: The Role of Size and Seasonality. *Water*, 11(7), 1490.
- Piscia R., Boggio E., Bettinetti R., Mazzoni M., & Manca M. 2018. Carbon and Nitrogen Isotopic Signatures of Zooplankton Taxa in Five Small Subalpine Lakes along a Trophic Gradient. *Water*, 10(1), 94.
- Visconti A., Volta P., Fadda, A., Di Guardo A., & Manca M. 2014. Seasonality, littoral versus pelagic carbon sources, and stepwise ^{15}N -enrichment of pelagic food web in a deep subalpine lake: the role of planktivorous fish. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 71(3), 436-446.
- Visconti A., Caroni, R., Rawcliffe R., Fadda A., Piscia, R., & Manca M. 2018. Defining seasonal functional traits of a freshwater zooplankton community using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ stable isotope analysis. *Water*, 10(2), 108.
- Zohary T., Erez J., Gophen M., Berman-Frank I., Stiller M. 1994. Seasonality of stable carbon isotopes within the pelagic food web of Lake Kinneret. *Limnol. Oceanogr.*, 39, 1030–1104.

3. BIOMONITORAGGIO DELLA CONTAMINAZIONE DEL VERBANO MEDIANTE IL BIVALVE *Dreissena polymorpha*

Andrea Binelli, Camilla Della Torre, Università degli Studi di Milano

Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon. CNR-IRSA Verbania Pallanza

Campionamento e determinazione analitica:

Il prelievo dei bivalvi è avvenuto nel maggio 2019, corrispondente al periodo pre-riproduttivo, come indicato dalla percentuale lipidica misurata (Tab. 3.1). Sono stati selezionati unicamente gli esemplari di *D. polymorpha* di dimensioni superiori a 1 cm, poiché questa lunghezza corrisponde ad animali di almeno un anno d'età che hanno raggiunto l'equilibrio tra i composti accumulati e la colonna d'acqua. Per la stazione di Laveno abbiamo dovuto campionare diversi esemplari di *Unio sp.* in quanto non sono stati trovati esemplari di *D. polymorpha* in numero sufficiente per la fase analitica, a testimonianza della diminuzione di tale popolazione già segnalata gli anni scorsi (CIP AIS, 2017). Come già indicato nel Rapporto CIP AIS 2017 (CIP AIS, 2017) l'impiego di *Unio sp.* anziché del modello biologico scelto non compromette in alcun modo i confronti, in quanto abbiamo dimostrato come questi due bivalvi bioaccumulino esattamente nello stesso modo i contaminanti oggetti di questa campagna di monitoraggio.

Le otto diverse stazioni di campionamento, indicate nella figura 1 con le relative coordinate in gradi decimali, sono state scelte per coprire il più uniformemente possibile il perimetro del lago, con particolare riguardo alla zona prossima al Bacino Borromeo, ritenuta l'area a maggiore rischio ambientale.

Area settentrionale: **Brissago** (lat.= 46,086°; long.= 8,691°)

Area centrale: **Pallanza** (lat.= 45,925°; long.= 8,566°), **Luino** (lat.= 45,998°; long.= 8,733°), **Laveno** (lat.= 45,908°; long.= 8,617°)

Bacino di Pallanza: **Baveno** (lat.= 45,917°; long.= 8,499°), **Suna** (lat.= 45,934°; long.= 8,527°)

Area meridionale: **Brebbia** (lat.= 45,860°; long.= 8,607°), **Ranco** (lat.= 45,790°; long.= 8,566°)

I bivalvi sono stati separati dalle rocce alle quali erano adesi, lavati con acqua di lago, avvolti in fogli di alluminio e trasferiti in laboratorio, all'interno di borse refrigerate, dove sono stati posti in congelatore a -20 °C fino al momento delle analisi.

I composti prioritari analizzati per ciascun campione sono stati: il p,p'-DDT e i cinque rispettivi composti omologhi, 13 policlorobifenili (PCB), 12 *dioxin-like* PCB, 15 idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e 14 PBDE (polibromodifenileteri), per un totale di 60 composti analizzati per ciascun sito di campionamento.

Il campione è stato pesato, liofilizzato ed estratto mediante opportuni solventi per ottenere la frazione lipidica contenente gli analiti in esame. Dopo una digestione acida e un'opportuna purificazione su colonna cromatografica multistrato, si è proceduto all'analisi gas-cromatografica mediante spettrometria di massa (GC-MS/MS). L'analisi dei campioni è stata intervallata dall'analisi di campioni di bianco (uno ogni quattro campioni).

Sia nei campioni sia nei bianchi è stato iniettato, prima dell'estrazione lipidica, uno standard interno deuterato a concentrazione nota, il DDE D8 (p,p'-DDE D8); tutti i campioni hanno mostrato

un recupero superiore all'80%. I limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati stimati in base al rapporto segnale/rumore (3:1 e 10:1), per ogni composto analizzato:

- 0,05 ng g⁻¹ p.s. e 0,35 ng g⁻¹ p.s per il p,p'-DDT e relativi composti omologhi;
- 0,15 ng g⁻¹ p.s. e 0,35 ng g⁻¹ p.s. per i congeneri di PCB e i PBDE;
- 0,1 ng g⁻¹ p.s. e 0,25 ng g⁻¹ p.s. per gli IPA.

Parametri morfo-fisiologici degli esemplari utilizzati per il monitoraggio

Per quanto riguarda la percentuale lipidica (Tab. 3.1), espressa sul peso secco, i valori rilevati per *D. polymorpha* sono compresi tra il 14,6% degli esemplari di Brebbia e il 20,9% di quelli prelevati a Suna, superiori ai valori rilevati nel 2018 (CIP AIS 2018). Per quanto riguarda gli esemplari di *Unio sp.*, la percentuale lipidica è risultata più bassa rispetto a *D. polymorpha*. Anche per questa ragione, tutti i risultati sono stati normalizzati sulla frazione lipidica, così da consentire un confronto sia tra i diversi siti di campionamento, sia con i risultati degli anni precedenti, escludendo la variabile determinata dalla differenza di quantità di lipidi, comparto in cui i contaminanti lipofili si accumulano.

Tab. 3.1 - Parametri morfo-fisiologici degli esemplari di *D. polymorpha* e *Unio sp.* campionati a maggio 2019.

<i>Stazione di campionamento</i>	<i>Lunghezza media degli esemplari (cm ± d.s.)</i>	<i>Peso lipidico medio (g)</i>	<i>Frazione lipidica media (% su peso secco)</i>
BAVENO	1,9 ± 0,2	0,26	17,3
BREBBIA	2,0 ± 0,2	0,22	14,6
BRISSAGO	2,1 ± 0,2	0,28	18,6
LAVENO (Unio)	6,0 ± 0,3	0,11	7,3
LUINO	1,8 ± 0,2	0,29	19,2
RANCO	1,6 ± 0,2	0,26	16,9
SUNA	1,1 ± 0,3	0,25	20,9
PALLANZA	1,5 ± 0,2	0,29	19,2

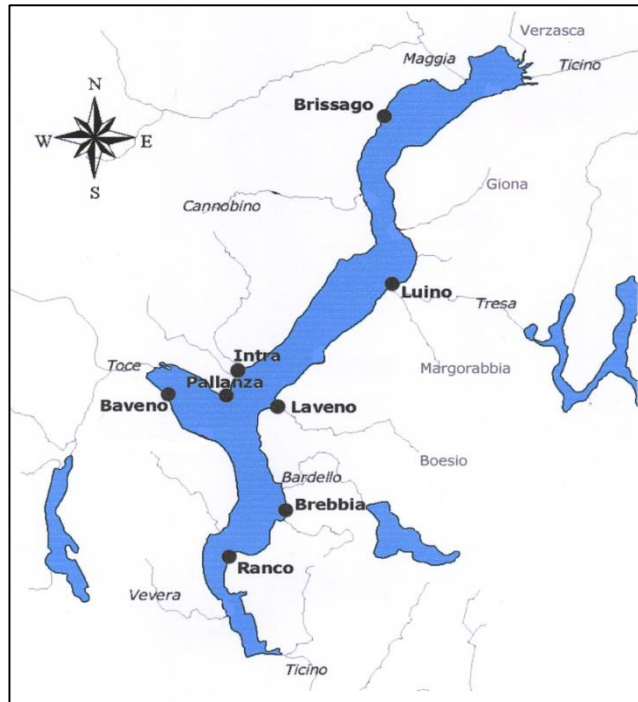


Figura 3.1 Area di studio e siti di campionamento utilizzati per il prelievo di *D. polymorpha* e *Unio sp.*

Contaminazione da DDT

Le concentrazioni medie della somma del p,p'-DDT e dei suoi omologhi (DDx), normalizzate sulla frazione lipidica, sono riportate in figura 3.2. Le concentrazioni maggiori sono state rilevate nel Bacino Borromeo, che presenta una concentrazione media di 876 ng g⁻¹ lipidi, risultando non solo l'area con la maggiore contaminazione anche nel 2019, ma che ha mostrato una nuova risalita dell'inquinamento rispetto al 2018, anno in cui si erano misurati valori medi di DDx nel Bacino Borromeo inferiori di oltre la metà (CIPAIS, 2018).

La media delle stazioni di prelievo poste a centro lago (Luino, Pallanza e Laveno) è stata di 364 ng g⁻¹ lipidi, non molto differente rispetto ai dati 2018, mentre particolarmente interessanti sono stati i risultati ottenuti nelle altre due zone in cui abbiamo idealmente diviso le aree di campionamento del Verbano. Infatti, la zona più settentrionale ha mostrato dei livelli di DDx (438 ng g⁻¹ lipidi) triplicati rispetto al dato 2018, come d'altra parte anche la zona più meridionale (602 ng g⁻¹ lipidi), a testimonianza di un nuovo innalzamento delle concentrazioni di DDx in tutta la cuvetta lacustre.

Nel 2019, quindi, si assiste a un deciso aumento dei DDx, soprattutto nel sito di campionamento di Baveno, in cui sono stati superati i 1000 ng g⁻¹ lipidi, valore più che doppio rispetto ai minimi rilevati a Laveno (408 ng g⁻¹ lipidi) e Brissago (438 ng g⁻¹ lipidi). Il fatto che dal punto di campionamento di Baveno si assista a un lento decremento della contaminazione nelle altre stazioni poste più a sud, con livelli comunque maggiori rispetto ai siti di prelievo posti più a nord di Baveno, sembrerebbe indicare un ingresso dal F. Toce di DDx, le cui concentrazioni tenderebbero poi a calare verso l'emissario.

Il pattern di distribuzione (Fig. 3.2) conferma il cambiamento intervenuto tra il 2018 e il 2019, in quanto non solo la percentuale di p,p'-DDT è risalita in quasi tutte le stazioni, con un minimo registrato a Brissago e Laveno (9%) e un massimo misurato proprio a Baveno (18%) e Suna (19%), ma le percentuali isomeriche maggiori sono state rilevate per il p,p'-DDD (valore medio=31%) e

l'o,p'-DDD (valore medio=20%), chiari indicatori di una trasformazione anaerobica del composto parentale e del suo relativo isomero o,p'-DDT, come conseguenza di un ingresso a lago di materiale sedimentario dovuto a effetti alluvionali avvenuti nel periodo precedente il campionamento. Infatti, come segnalato dal Rapporto triennale CIP AIS sugli aspetti limnologici (CIP AIS, 2018 b) nel Bacino del L. Maggiore si sono verificate abbondanti piogge nel periodo ottobre-novembre 2018, concentrate in un breve periodo di tempo e in grado di far innalzare il livello del lago di 2,2 m in soli 6 giorni.

Infine, il metabolita finale p,p'-DDE presenta notevoli fluttuazioni, in termini percentuali, passando dal 10% rilevato a Baveno fino al 31% di Laveno, valori comunque decisamente inferiori alle percentuali riscontrate nel 2018 (CIP AIS, 2018).

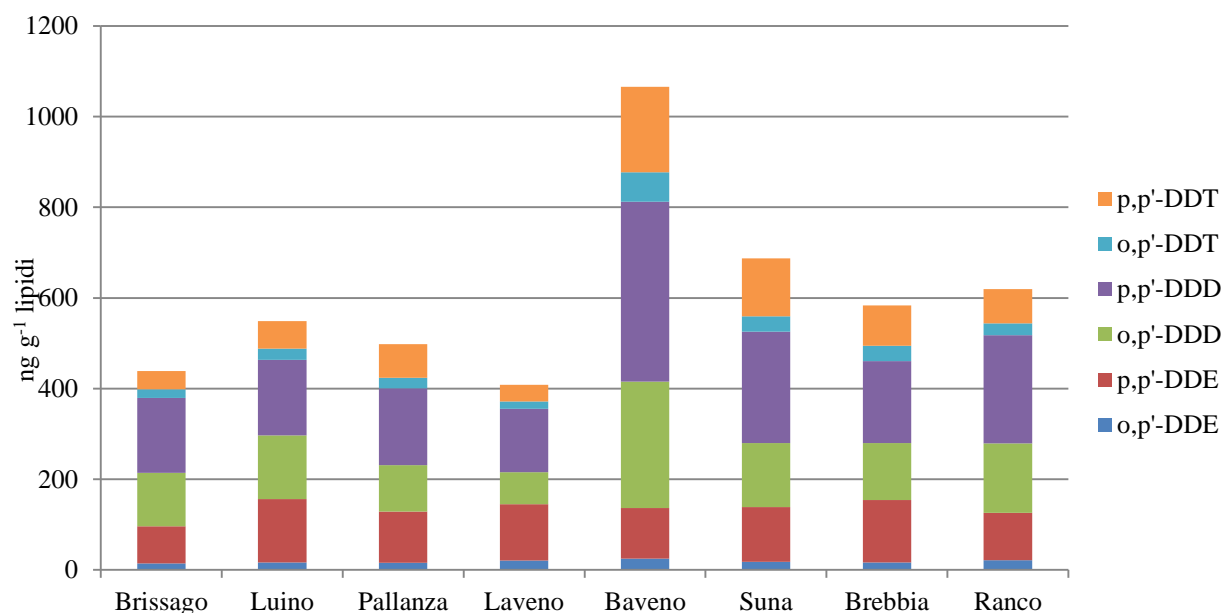


Fig. 3.2 Concentrazione dei DDT totali misurata nelle otto stazioni di campionamento nel 2019, con i rispettivi valori isomerici.

In figura 3.3 sono riportate le medie delle percentuali dei diversi DDx misurate nelle otto stazioni di prelievo nel 2019. Il p,p'-DDT rappresenta mediamente il 13% dell'intero pattern di contaminazione, leggermente superiore al 2018, mentre il p,p'-DDD è il composto principale (35%), a scapito del p,p'-DDE che scende al 21%. Interessante è anche notare come l'o,p'-DDD (23%) sia decisamente superiore agli altri due omologhi o,p'-DDT (5%) e o,p'-DDE (3%), molto simili ai valori percentuali riscontrati nel 2018 (CIP AIS, 2018).

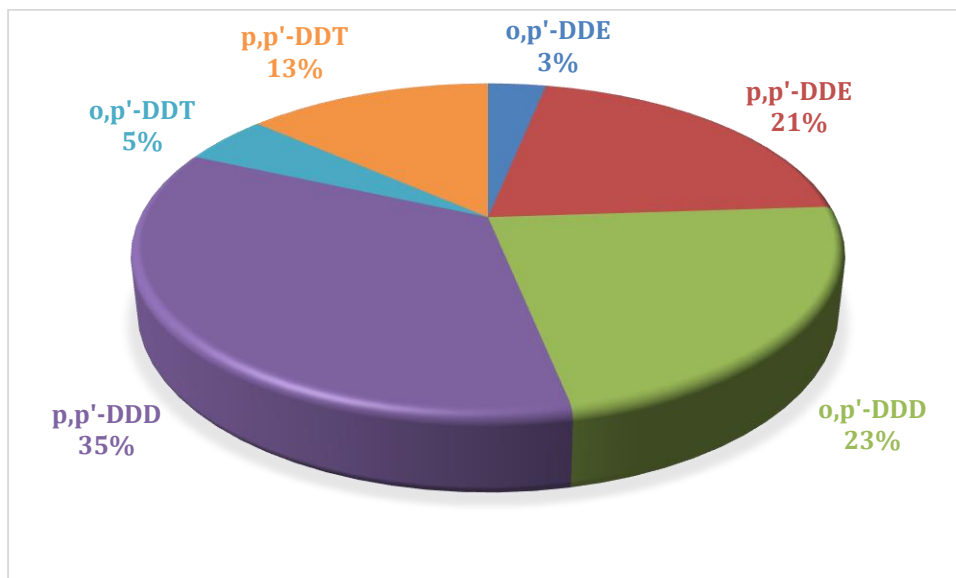


Fig. 3.3 Percentuale media dei DDX misurati nelle otto stazioni di campionamento nel 2019.

Per ogni stazione di campionamento sono stati calcolati i rapporti isomerici p,p'-DDT/p,p'-DDE e p,p'-DDE/p,p'-DDD (Tab. 3.2). Il primo è utilizzato sia per ricavare informazioni sulle trasformazioni del composto parentale, che per valutare se la contaminazione da DDT è pregressa o recente. Infatti, da questo rapporto è possibile ottenere una datazione approssimativa dell'inquinamento: valori del rapporto superiori a 0,33 indicano una contaminazione recente, in caso contrario è considerata pregressa. Il secondo rapporto valuta se la degradazione del p,p'-DDT avviene in condizioni aerobiche o anaerobiche: se il valore del rapporto è <1, la degradazione anaerobica prevale su quella aerobica.

Il calcolo di questi rapporti conferma quanto detto precedentemente riguardo un nuovo ingresso nel Verbano di sedimenti contaminati, in quanto il rapporto isomerico p,p'-DDT/p,p'-DDE è risultato sempre superiore a 0,33, ad eccezione di Laveno (0,30) che è risultato comunque molto vicino a tale valore-soglia. Il fatto che Baveno (1,69) e Suna (1,06) abbiano mostrato i rapporti più alti testimonia una volta di più che il F. Toce è stata la sorgente di questo nuovo arrivo di materiale contaminato a lago. Tali risultati sono molto simili a quelli riscontrati nel 2017 (CIP AIS, 2017), anno in cui avevamo rilevato un picco di contaminazione, indicando come la contaminazione da DDx sia ancora, purtroppo, soggetta alle condizioni meteorologiche che possono determinare nuovi rilasci nel Verbano.

Anche i rapporti isomerici p,p'-DDE/p,p'-DDD mostrano non solo un ribaltamento della situazione 2018, ma indicano che il nuovo ingresso a lago di DDx è sicuramente legato all'apporto di materiale in cui è avvenuta una degradazione anaerobica, in quanto tale rapporto è risultato in tutte le stazioni ben al di sotto del limite-soglia pari a 1. (Tab. 3.2).

Tabella 2 Rapporti isomerici per la valutazione dello stato di contaminazione del Verbano
calcolati per le otto diverse stazioni.

	Brissago	Luino	Pallanza	Laveno	Baveno	Suna	Brescia	Ranco
p,p'-DDT/p,p'-DDE	0,49	0,43	0,65	0,30	1,69	1,06	0,65	0,73
p,p'-DDE/p,p'-DDD	0,50	0,84	0,67	0,89	0,28	0,49	0,76	0,44

In conclusione, la contaminazione da DDX misurata nel 2019 è stata più elevata rispetto al dato 2018 per tutte le stazioni di campionamento, ma confrontabile con i risultati 2015 e 2017, dove si erano verificati dei picchi di contaminazione (Fig. 3.4; CIP AIS, 2015, 2017). Ciò conferma, una volta di più, come la contaminazione da parte di questi composti sia strettamente legata ai fenomeni meteorologici e che l'inquinamento da DDX continua a rappresentare un pericolo per l'ecosistema del Verbano dopo quasi 25 anni dalla scoperta di tale inquinamento.

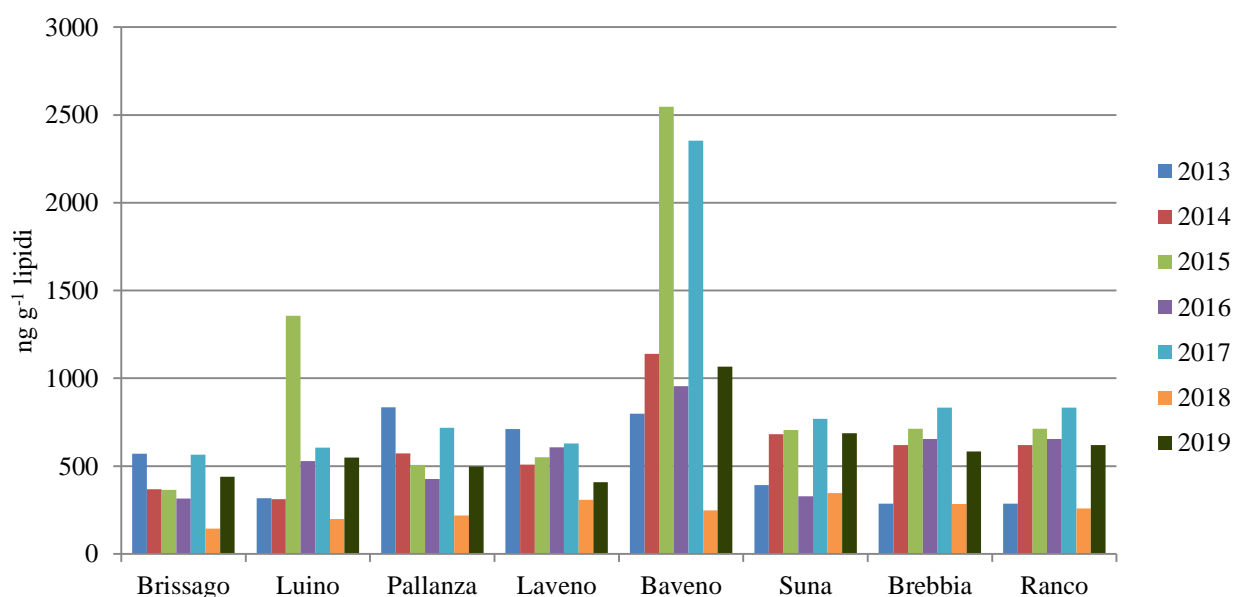


Fig. 3.4 Andamento della contaminazione da DDX misurata nel periodo 2013-2019 nel Verbano.

La lunga serie storica che abbiamo a disposizione per i dati relativi ai DDX misurati negli esemplari di *D. polymorpha* a partire dal 1996 nelle due stazioni "storiche" di Baveno e Pallanza (Fig. 3.5) mostra chiaramente come nel 2019 la contaminazione da DDX sia tornata nuovamente a salire, dopo un 2018 con valori molto bassi dovuti a condizioni meteorologiche costanti, senza eventi estremi in grado di portare a lago matrici ambientali inquinate (CIP AIS, 2018).

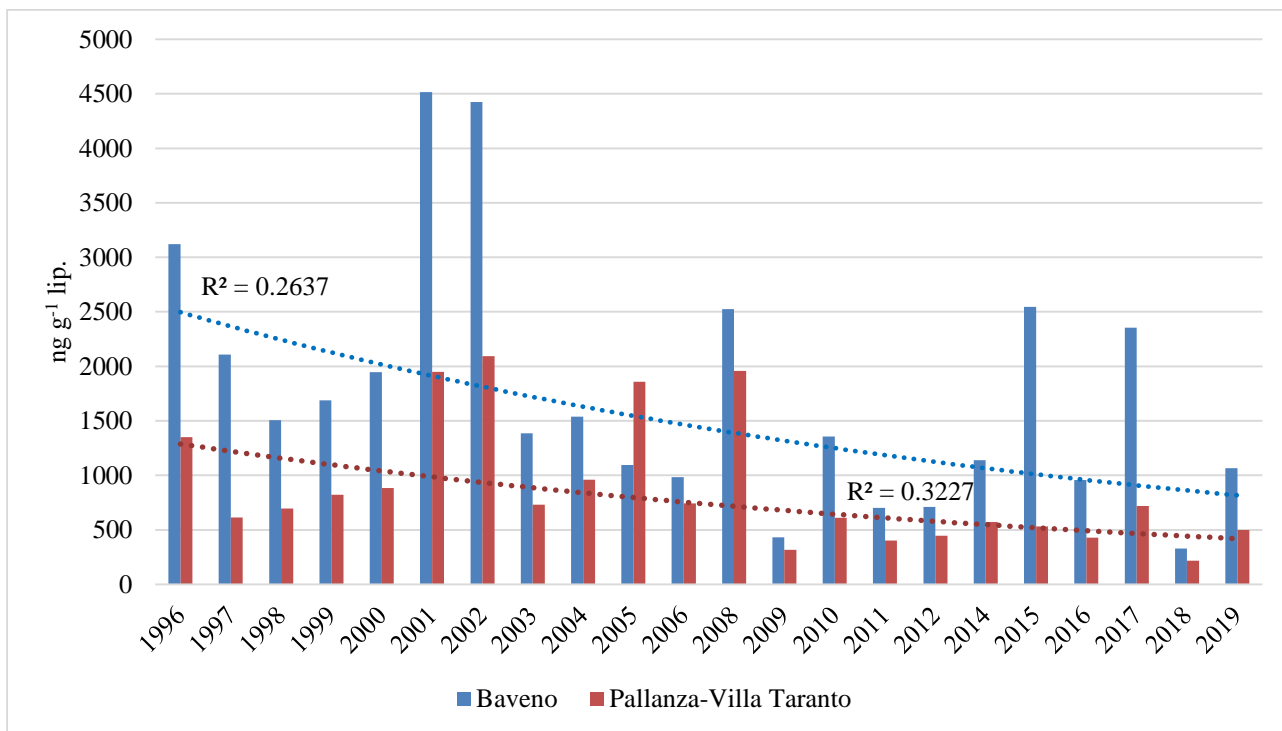


Figura 3.5 Trend pluriennale della concentrazione dei DDX nelle due stazioni di prelievo di Baveno e Pallanza.

Utilizzando i dati normalizzati sul peso fresco, è stato possibile anche confrontare i livelli dei DDX con gli Standard di Qualità Ambientale per il biota (SQA_{biota}) imposti dalla normativa italiana per il monitoraggio degli ecosistemi acquatici (Decreto Legislativo n. 172/2015). La figura 3.6 indica come i livelli misurati nel 2019 siano ben al di sotto del relativo SQA_{biota} per i DDX totali, pari a $100 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$

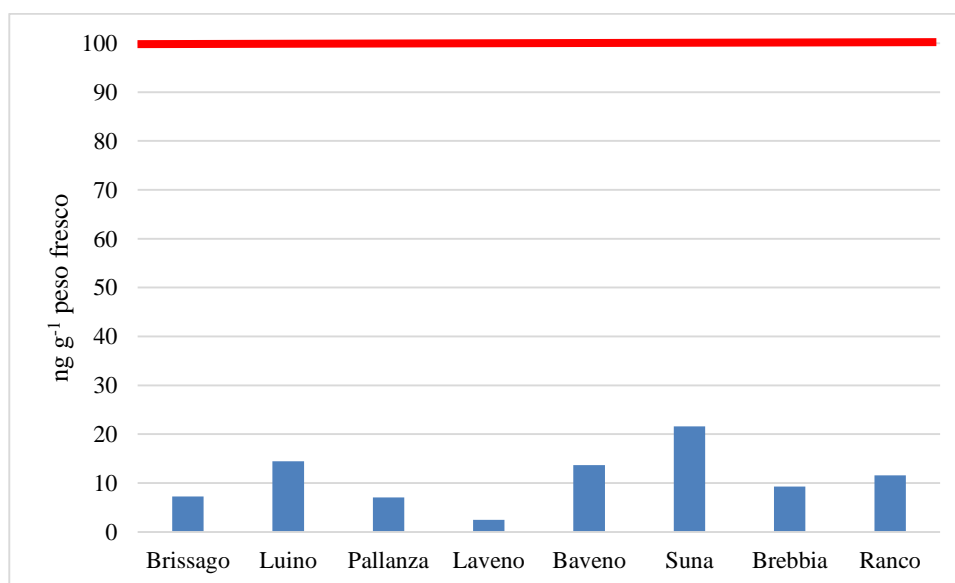


Figura 3.6 Concentrazione totale dei DDX espresso come peso fresco per le otto stazioni. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota}) pari a $100 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$

Contaminazione da PCB

Abbiamo analizzato i 13 congeneri che rappresentano più del 90% delle miscele commerciali utilizzate in Italia (Arochlor 1260 e 1254) prima che ne fossero vietati la produzione e l'utilizzo.

Nel 2019 abbiamo rilevato cambiamenti significativi nella contaminazione da PCB del Verbano (Fig. 3.7), al contrario degli anni precedenti in cui erano stati rilevati livelli sempre costanti, con valori non particolarmente elevati e in linea con le concentrazioni considerate di *background* per i laghi subalpini (CIP AIS, 2014). A fronte, infatti, di una concentrazione pari a 569 ng g^{-1} lipidi rilevata come picco massimo nel 2018 nella stazione di Pallanza, nel 2019 i livelli si sono notevolmente alzati per i siti di Brebbia (2175 ng g^{-1} lipidi) e Baveno ($1334,6 \text{ ng g}^{-1}$ lipidi), la cui causa è sconosciuta, ma probabilmente riconducibile a sorgenti puntiformi di rilascio a lago di tale classe di contaminanti. Tale ipotesi è confortata dal fatto che, nelle altre stazioni, i PCB totali sono risultati assolutamente paragonabili ai livelli 2018, con valori compresi tra 122 ng g^{-1} lipidi (Ranco) e 355 ng g^{-1} lipidi (Brissago).

La situazione è ancora più particolare perché il pattern di contaminazione rilevato a Brebbia e Baveno è profondamente differente rispetto alle altre stazioni di campionamento. Mentre, infatti, in queste ultime abbiamo rilevato come i congeneri principali siano stati l'esaCB-153 (min: 25% a Brissago; max: 29,3% a Luino) e l'esaCB-138 (min: 19,9% a Pallanza; max: 24,4% a Suna), come negli anni precedenti, nelle due stazioni interessate dall'aumento dell'inquinamento da PCB abbiamo rilevato concentrazioni praticamente identiche (12-13% per ciascuno dei congeneri) non solo dei due esacloro-sostituiti CB-153 e CB-138, ma anche dei due epta-cloro CB-170 e CB-180 e addirittura dell'otta-cloroCB-194 (Fig. 3.7), rilevato negli anni passati a concentrazioni trascurabili. Un ulteriore dato in controtendenza è rappresentato dal decaCB-209 che nei due siti più contaminati rappresenta il 10-11% dell'intero pattern, mentre nelle altre stazioni è stato rilevato a livelli molto bassi, non superiori al 4%, oppure addirittura al di sotto dei limiti di rilevabilità.

Tale situazione, mai rilevata prima nel Verbano, suggerisce un approfondimento delle cause di tale inquinamento e un attento monitoraggio del suo andamento negli anni.

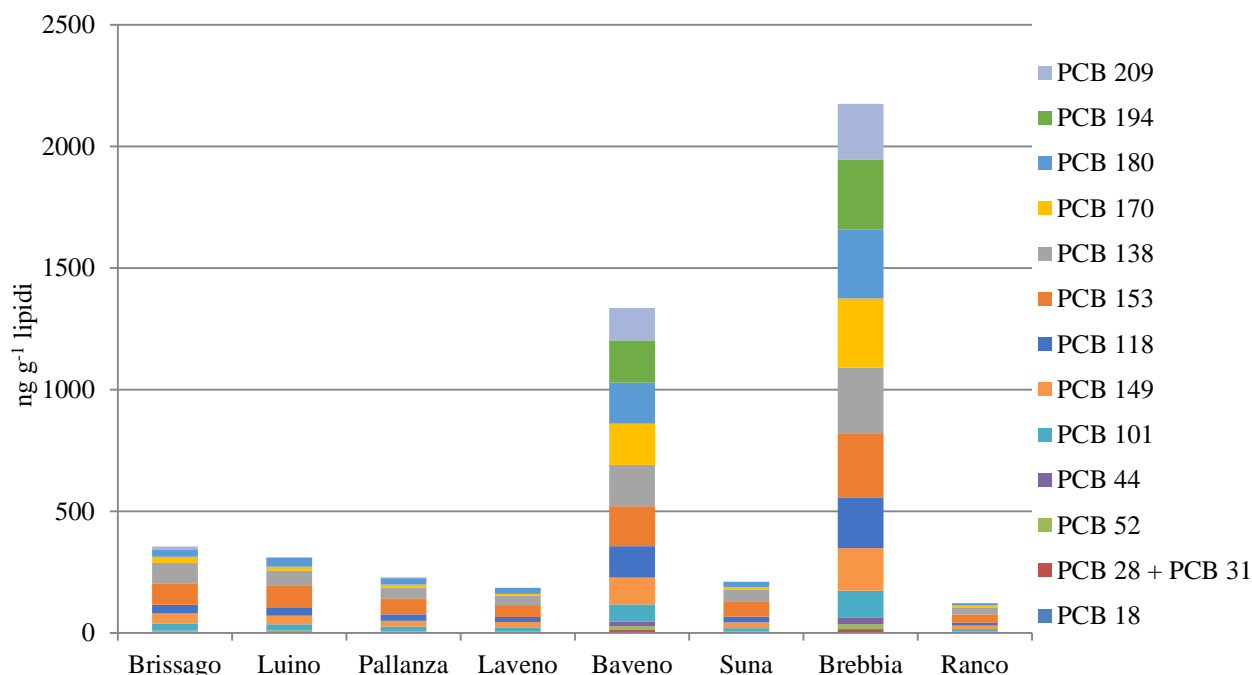


Figura 3.7 Concentrazione dei PCB totali misurata nelle otto stazioni di campionamento nel 2019, con i relativi rapporti tra congeneri.

A causa delle evidenti differenze del pattern di contaminazione mostrato da Brebbia e Baveno rispetto alle altre stazioni, è più opportuno visualizzare le percentuali medie ottenute per le diverse classi di clorurazione dei PCB, anziché quelle relative ai singoli congeneri (Fig. 3.8). La classe maggiormente rappresentata è stata quella degli esacloro-sostituiti (26%), seguita dagli epta-CB (22%) e otta-CB (18%), mentre i penta-CB e addirittura il deca-CB si spartiscono il 15% ciascuno. Infine, i tri-CB e i tetra-CB sono presenti in percentuali trascurabili (2%).

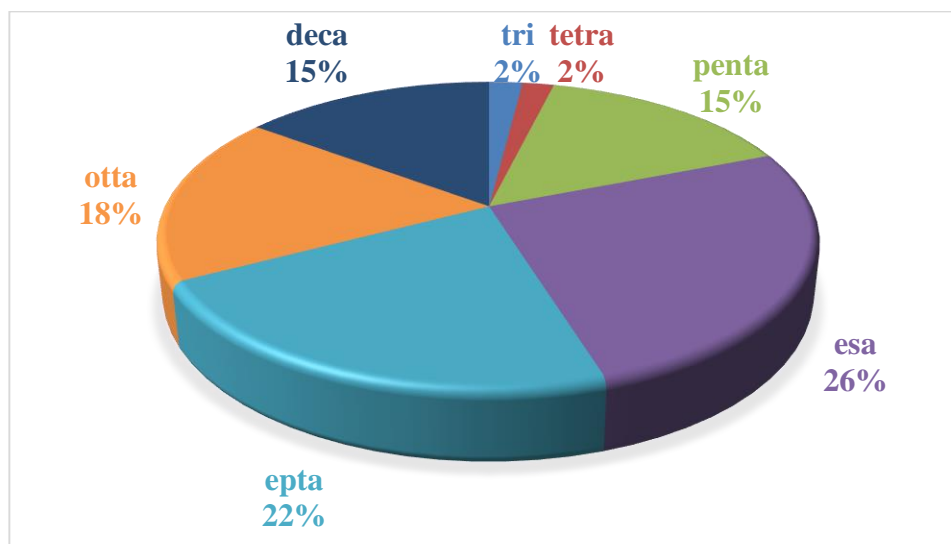


Figura 3.8 Percentuale media delle diverse classi di clorurazione di PCB misurati nelle otto stazioni di campionamento nel maggio 2019.

Per quanto riguarda i *dioxin like-PCB* (dl-PCB), in figura 3.9 sono riportati i valori medi normalizzati sul peso lipidico dei congeneri analizzati per le otto stazioni campionate, con i relativi rapporti tra congeneri. L'andamento della contaminazione conferma la particolare situazione già osservata per i PCB indicatori, in quanto anche i dl-PCB hanno mostrato due picchi a Baveno (159,2 ng g⁻¹ lip.) e Brebbia (231,6 ng g⁻¹ lip.), anche se con valori confrontabili o minori a quelli massimi rilevati nel 2018 (Laveno; 243 ng g⁻¹ lip.).

La concentrazione più bassa è stata misurata a Ranco (30 ng g⁻¹ lip.), mentre gli altri siti hanno mostrato livelli intermedi, compresi tra circa 40 e 75 ng g⁻¹ lip., decisamente minori rispetto ai dati 2018 (CIP AIS, 2018). Come già sottolineato in altri rapporti (CIP AIS, 2008; 2017; 2018) la contaminazione da PCB, compresi i dl-PCB, non è mai stata imputata al Fiume Toce, ma va ricercata in altre fonti di contaminazione.

Entrando nel dettaglio, il dl-PCB più rappresentato è il CB-114, con una percentuale media del 60%, ma sempre con notevoli differenze tra le due stazioni di Brebbia (87%) e Baveno (85%) e le altre (45-55%). Come per il 2018, il secondo dl-PCB maggiormente rappresentato è il CB-123 (media=22%), seguito dal CB-157 che si attesta su una percentuale media del 9%.

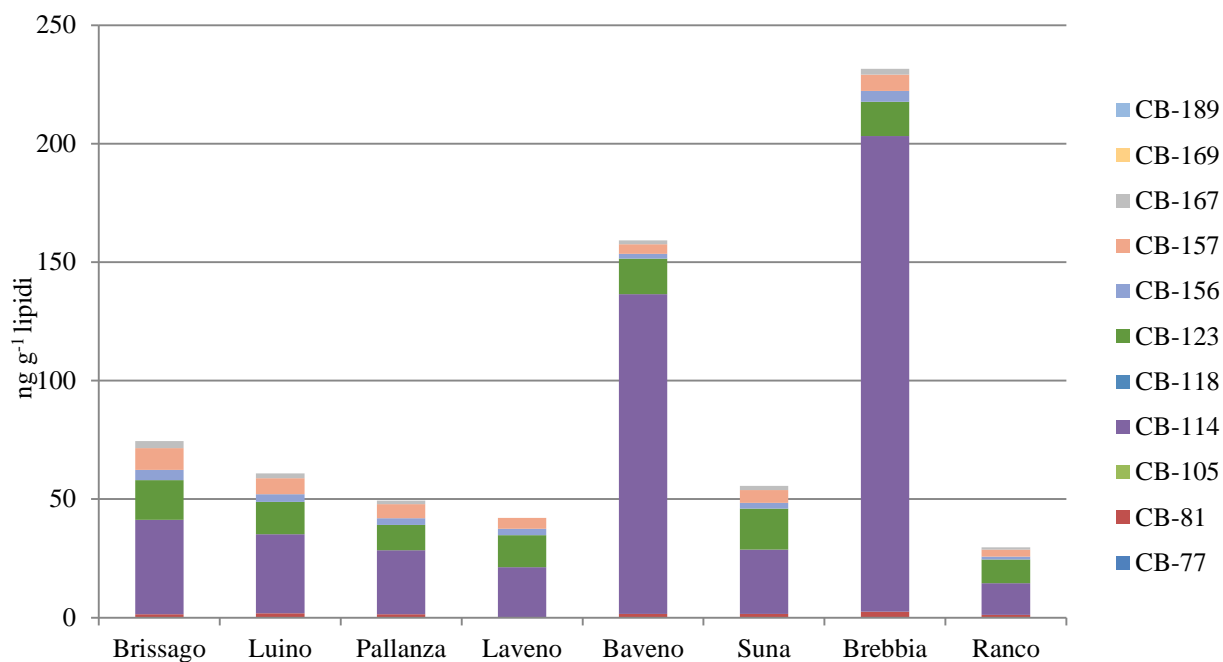


Fig. 3.9 Concentrazione media dei diversi congeneri di *dioxin like*-PCB misurati nelle otto stazioni di campionamento.

Ad esclusione della contaminazione anomala riscontrata a Baveno e Brebbia, i dl-PCB sono decisamente calati nelle altre stazioni di campionamento, come sottolineato anche dall'abbassamento della percentuale dei dl-PCB rispetto ai PCB indicatori (Fig. 3.10) che è passata dal 26% nel 2018 (CIPAIS, 2018) al 13% nel 2019, a conferma della diminuzione della loro percentuale osservata negli ultimi anni (CIPAIS, 2016, 2017).

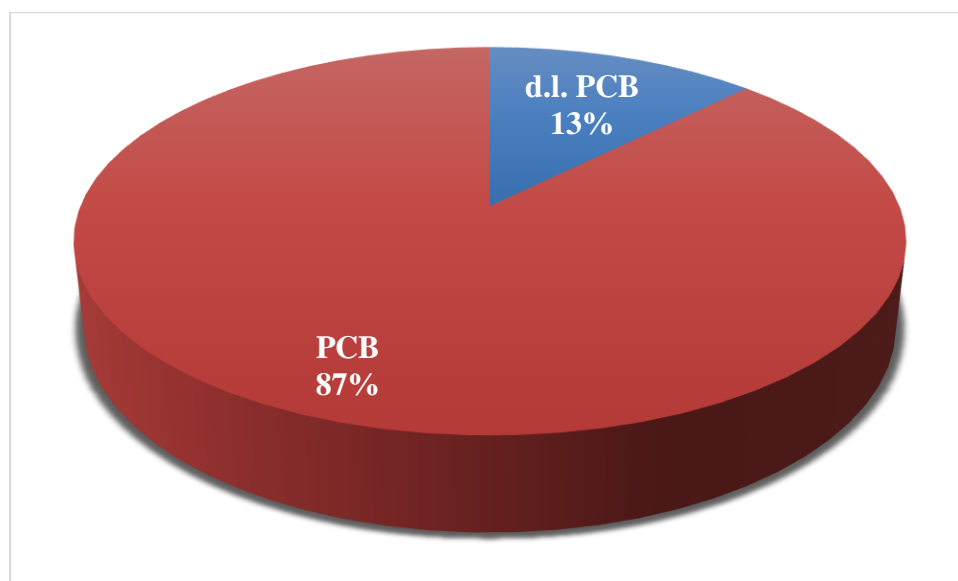


Figura 3.10. Percentuali medie relative ai PCB indicatori e i dl-PCB.

Le figure 3.11 e 3.12 presentano le concentrazioni di PCB e dl-PCB per le otto stazioni campionate confrontate con i rispettivi SQA_{biota} . La normativa italiana (D.L. 172/2015), riprendendo il Regolamento UE 1259/2011, prevede che la somma delle concentrazioni dei PCB-28, 52, 101, 138, 153, 180 ritenuti i cosiddetti PCB indicatori, non superi i $125 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ mentre per i *dioxin like-PCB* lo standard è basato sul TEQ (*Toxicity Equivalent Quotient*) e ha valore di $6,5 \text{ pg TEQ g}^{-1}$. Come mostrano i grafici, entrambe le classi di contaminanti sono ben al di sotto delle rispettive soglie.

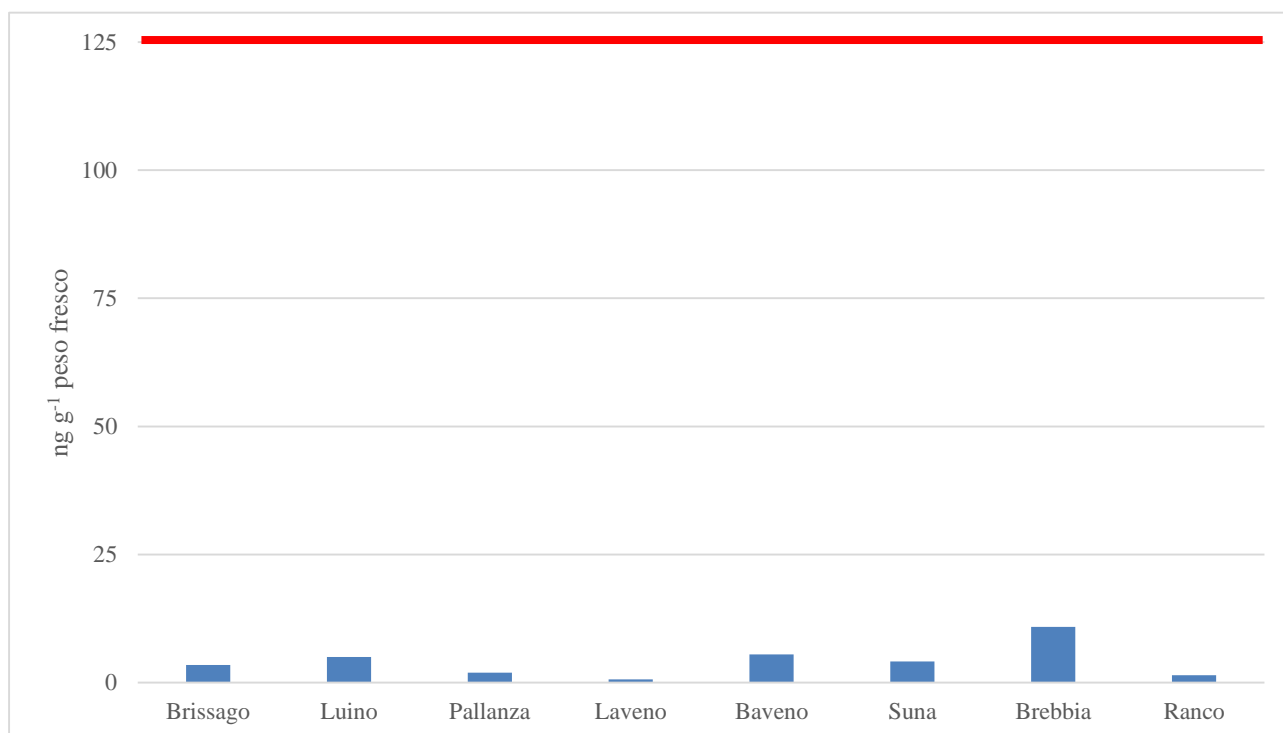


Figura 3.11 Concentrazione totale dei PCB indicatori (CB 28, 52, 101, 138, 153, 180) per le otto stazioni. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota}) pari a $125 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ come somma dei 6 PCB indicatori.

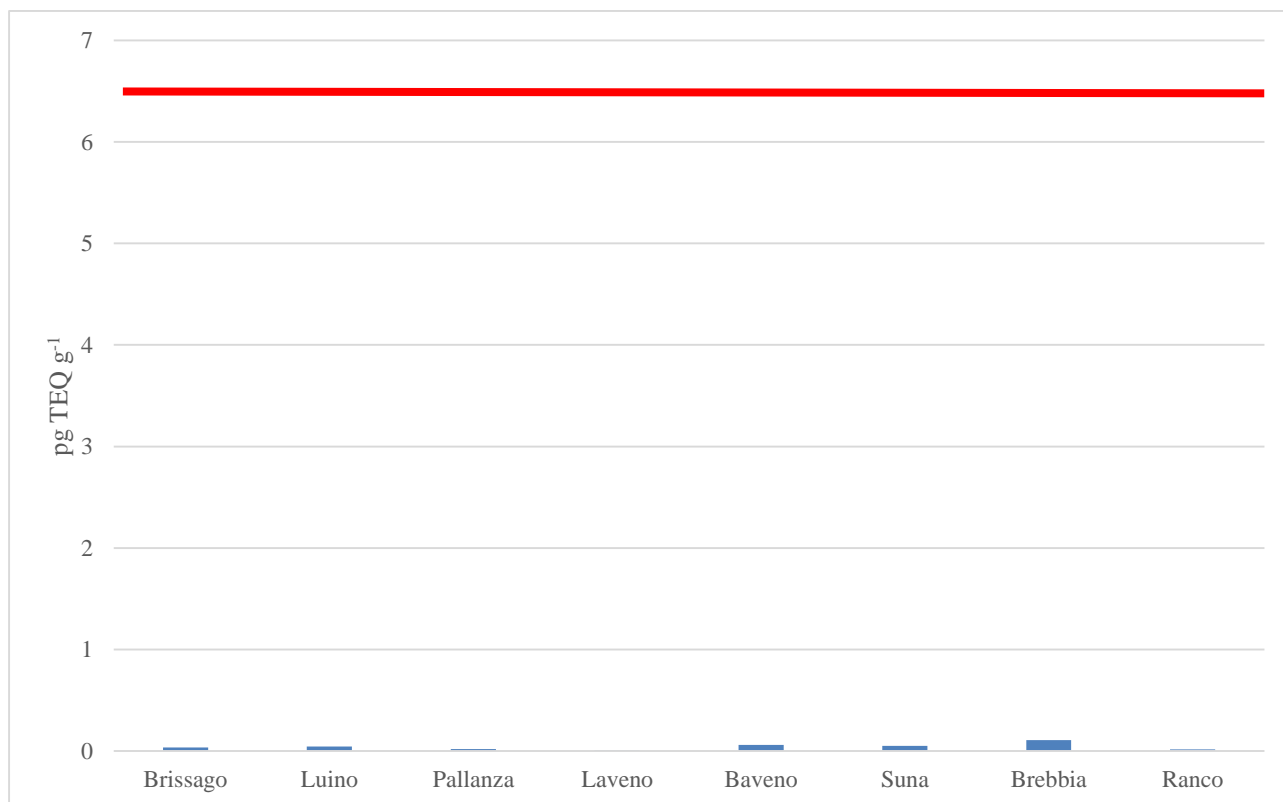


Figura 3. 12 Concentrazione totale dei *dioxin like*-PCB per le otto stazioni. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota}) pari a 6,5 pg TEQ g⁻¹.

Contaminazione da IPA

La contaminazione del Verbano da parte degli IPA è decisamente disomogenea (Fig. 3.13), con un andamento abbastanza differente rispetto al 2018 (CIPAIS, 2018), anche se i rapporti tra le concentrazioni dei diversi siti di campionamento sono stati molto simili. Come nell'anno precedente, infatti, la stazione che ha mostrato la contaminazione maggiore è stata Brebbia (2612 ng g⁻¹ lip.), come d'altra parte anche quella meno inquinata da IPA (Brissago; 200 ng g⁻¹ lip.).

A differenza del 2018, dove la parte più meridionale del Verbano aveva mostrato la maggiore contaminazione media, nel 2019 i livelli medi più elevati sono risultati quelli dell'area centrale (1747 ng g⁻¹ lip.), seguita da quella meridionale (1422 ng g⁻¹ lip.). Queste concentrazioni mostrano, purtroppo, come la contaminazione da IPA sia notevolmente aumentata nel 2019, in quanto il valore più alto del 2018 è stato di circa 270 ng g⁻¹ lip., circa 10 volte inferiore rispetto a quello misurato nella stessa stazione nel 2019.

L'andamento disomogeneo è confermato dal fatto che, mentre i valori riscontrati per Brissago, Baveno e Ranco, attorno ai 200-215 ng g⁻¹ lip., sono perfettamente paragonabili alle concentrazioni 2018 misurate negli stessi siti, l'aumento evidente osservato nelle altre 5 stazioni è invece in controtendenza, indicando la presenza di sorgenti puntiformi di IPA nel 2019. È opportuno sottolineare che i livelli raggiunti in questi siti sono confrontabili con le concentrazioni del 2015 (CIPAIS, 2015) che rappresentano i valori più elevati di IPA riscontrati negli ultimi anni nel Verbano.

Entrando più nel dettaglio, il 2-metilnaftalene è stato il composto mediamente più rilevato (61%), seguito dall'1-metilnaftalene (13%), mentre gli altri IPA sono stati rilevati a concentrazioni molto basse o addirittura sotto il limite di rilevabilità (IPA con 5-6 anelli condensati).

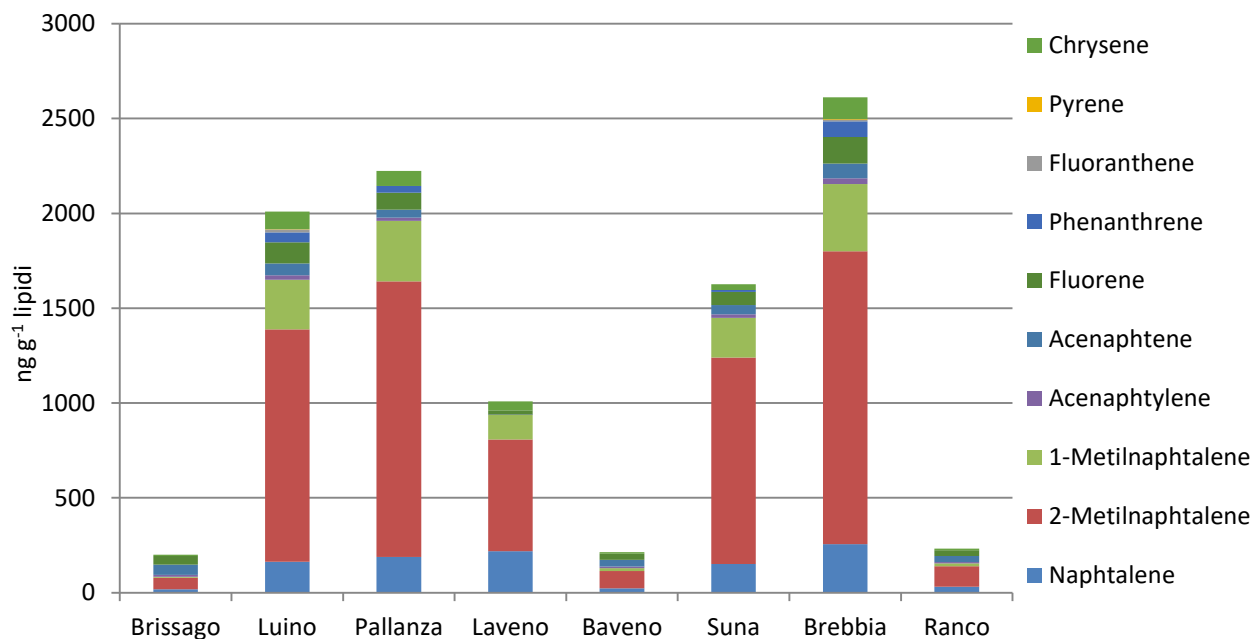


Figura 3.13 Concentrazione degli IPA totali misurata nelle otto stazioni di campionamento nel 2019, con i valori relativi alle diverse classi.

Anche i rapporti tra le diverse classi di condensazione sono decisamente cambiati perché, mentre nel 2018 gli IPA con 4 anelli aromatici condensati rappresentavano circa il 70% del totale, quelli a 2-3 anelli circa il 28% e gli IPA a 5 anelli solamente il 2%, la figura 3.14 mostra come nel 2019 gli IPA più “leggeri” rappresentino quasi completamente il pattern di contaminazione osservato nel Verbano e solo il 4% è costituito dagli IPA a 4 anelli condensati.

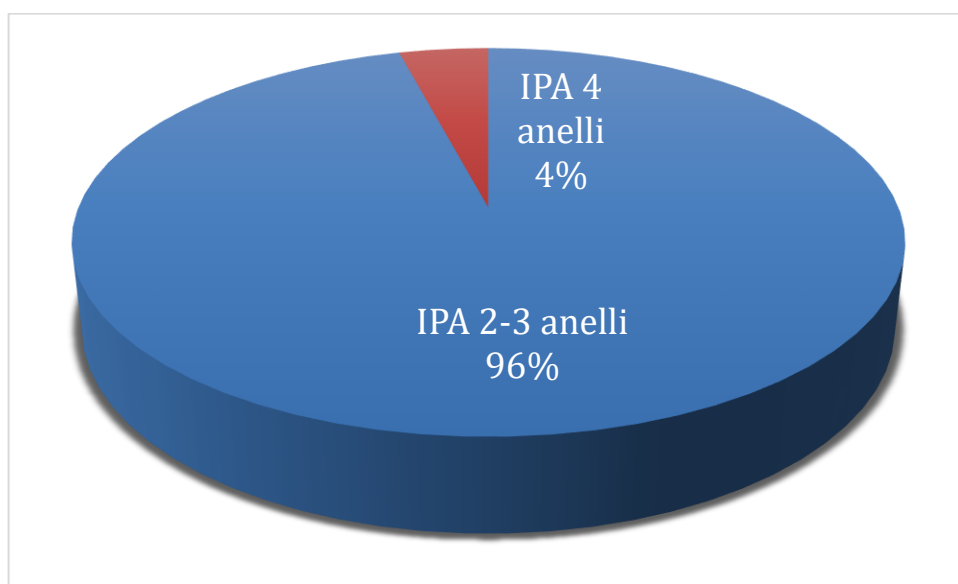


Figura 3.14 Percentuale media dei diversi IPA misurati nelle otto stazioni di campionamento nel 2019.

Per definire l'origine della contaminazione da IPA del Verbano è necessario approfondire i meccanismi di formazione di questi composti. Infatti, è possibile suddividere gli IPA in composti di origine naturale, ossia prodotti da trasformazioni post-deposizione da parte di precursori biogenici, composti di origine pirogenica (formati da combustioni incomplete di materiali organici che danno origine a IPA diversamente condensati) e composti di origine petrogenica, risultanti dallo scarico del petrolio e derivati, che contengono le più alte concentrazioni di IPA alchilati a minor peso molecolare (2 e 3 anelli aromatici). La presenza di composti alchilati a basso peso molecolare indica, dunque, una contaminazione correlata a petrolio e derivati, mentre una prevalenza di IPA ad alto peso molecolare è indicatrice di un'origine pirolitica (Latimer e Zheng, 2003). È bene ricordare che i composti caratterizzati da un elevato numero di anelli aromatici (4-6) sono i più pericolosi per la biocenosi e proprio per questo motivo sono stati classificati dall'US EPA (US *Environmental Protection Agency*) come quelli a maggior rischio cancerogenico (CIP AIS, 2011). Per ogni stazione è stato, quindi, calcolato il rapporto LMW/HMW, tra gli idrocarburi a basso peso molecolare (LMW; *Low Molecular Weight*- naftalene, 2-metilnaftalene, 1-metilnaftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene) e quelli ad alto peso molecolare (HMW; *High Molecular Weight* - benzo(α)antracene, crisene, benzo(β)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(α)pirene, indeno(1,2,3-cd)pirene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(g,h,i)perilene).

Valori inferiori all'unità, riconducibili quindi a un'elevata percentuale di IPA ad alto peso molecolare, stanno a indicare una fonte pirogenica dell'inquinamento, mentre valori >1 segnalano un'origine petrogenica (Colombo et al., 1989).

In tabella 3.3 vengono mostrati i rapporti LMW/HMW per le otto stazioni del Verbano. E' ovvio che con il deciso cambiamento del pattern di contaminazione, a favore degli IPA con soli 2-3 anelli condensati, si sono ottenuti per tutte le stazioni valori decisamente più alti rispetto all'unità, indice di un'origine petrogenica della contaminazione, legata più a sversamenti diretti di idrocarburi, che a combustioni incomplete. Tale dato potrebbe essere un'ulteriore conferma della presenza di sorgenti puntiformi nelle stazioni più contaminate legate, ad esempio, a un aumento del traffico navale, magari temporaneo.

Tabella 3.3 Rapporti LMW/HMW calcolati in ciascuna delle otto stazioni di campionamento.

	Brissago	Luino	Pallanza	Laveno	Baveno	Suna	Brebbia	Ranco
LMW/HMW	30,3	20,9	27,0	20,2	37,2	54,2	21,8	27,5

Il D.L. n. 172/2015, per quanto riguarda la classe degli IPA, determina lo standard di qualità per due soli composti aromatici: il fluorantene e il benzo(α)pirene. La normativa prende in esame unicamente questi due composti poiché classificati dalla IARC (International Agency for Research on Cancer) come sospetto il primo e sicuro cancerogeno il secondo (classe 3 e classe 1, rispettivamente). Il limite imposto per il benzo(α)pirene è pari a 5 ng g⁻¹ p.f., mentre per il fluorantene è fissato a 30 ng g⁻¹ p.f. Il primo IPA non è stato trovato in nessuna delle stazioni di prelievo, mentre il fluorantene è stato rilevato solamente a Luino e Brebbia, anche se a concentrazioni sempre inferiori a 1 ng g⁻¹ p.f.

Contaminazione da PBDE

Per l'analisi di questa classe di composti organici sono stati presi in considerazione 14 congeneri, anche se nel 2019 ne sono stati rilevati solamente 5 nei tessuti molli dei bivalvi campionati nelle 8 stazioni di campionamento (Fig. 3.15). Purtroppo, a causa dell'emergenza sanitaria, quest'anno non è stato possibile avvalersi della collaborazione dell'IRSA-CNR di Brugherio per l'analisi del BDE 209, che necessita di particolari condizioni analitiche per evitare la sua degradazione. Tale composto è quello che viene rilevato a concentrazioni maggiori nel Verbano, rendendo impossibile, quindi, ogni confronto con i dati assoluti pregressi, almeno per il momento. La figura 15 mostra come la contaminazione sia piuttosto omogenea tra le diverse stazioni, ad eccezione di Luino (77 ng g⁻¹ lipidi) e Suna (96 ng g⁻¹ lipidi), che presentano valori più che doppi o quasi tripli rispetto al sito meno contaminato (Laveno; 34,8 ng g⁻¹ lipidi).

Escludendo i livelli del BDE 209 nei dati 2018, possiamo notare come la contaminazione da PBDE sia stata molto simile tra i due anni, in quanto i valori nel 2018 si posizionavano tra 40 ng g⁻¹ lipidi (Brissago) e 92 ng g⁻¹ lipidi (Laveno e Luino).

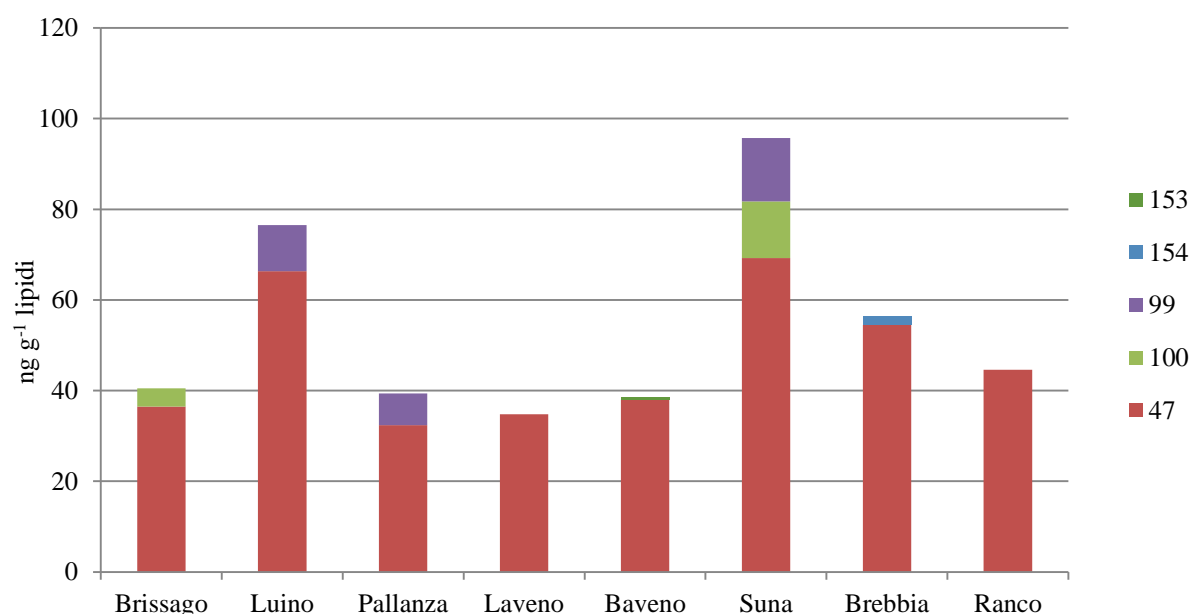


Figura 3.15 Concentrazione dei PBDE totali misurata nelle otto stazioni di campionamento nel mese di maggio 2019.

Il pattern di contaminazione risulta abbastanza omogeneo in tutte le stazioni, anche se alcuni congeneri non sono stati rilevati in tutti i siti (Fig. 3.15). Il più rappresentativo, ad esclusione del BDE 209, è stato il BDE 47, con una percentuale media tra le otto stazioni che ha raggiunto l'89% in tutti i siti di campionamento (Fig. 3.16), seguito dal BDE 99, presente con una percentuale media pari a circa il 7%, e dal BDE 100 (3%). Gli altri BDE hanno percentuali medie trascurabili, come d'altra parte avevamo già osservato negli anni precedenti.

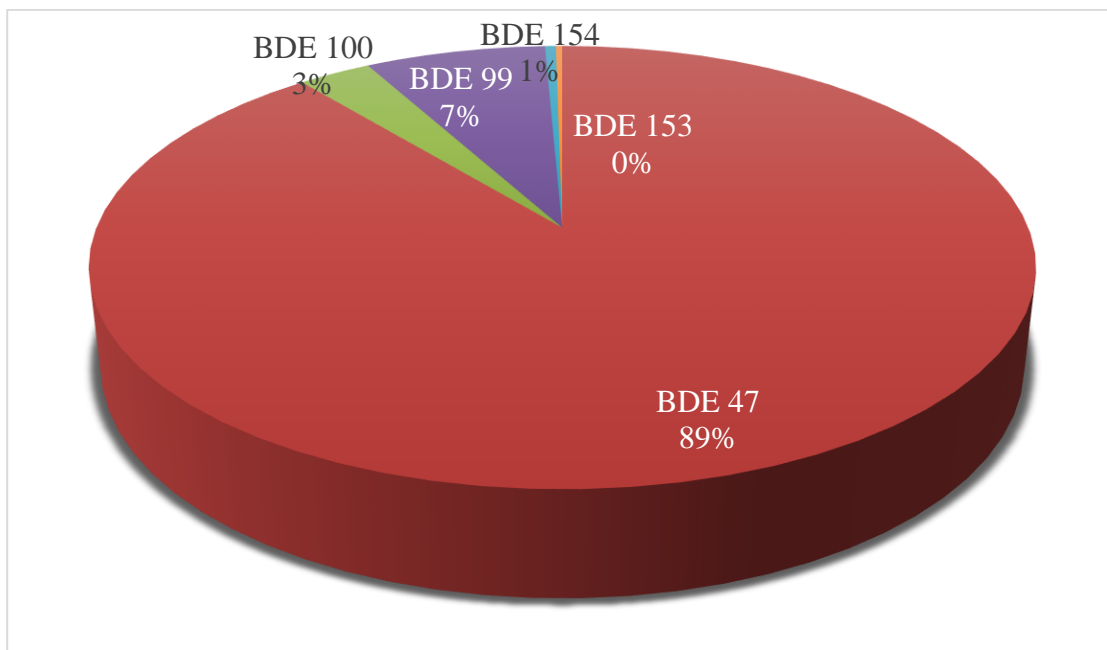


Figura 3.16 Percentuale media dei diversi congeneri di PBDE misurati nelle otto stazioni di campionamento (con l'esclusione del BDE 209).

Per i PBDE, la legge prevede che la somma dei BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154 nel biota non superi il valore di $8,5 \text{ pg g}^{-1} \text{ p.f.}$, che è un ordine di grandezza inferiore rispetto agli SQA definiti per le altre classi di contaminanti. La Figura 3.17 mostra come le concentrazioni rilevate nella campagna del 2019 siano al di sopra di tale valore per tutti i siti campionati.

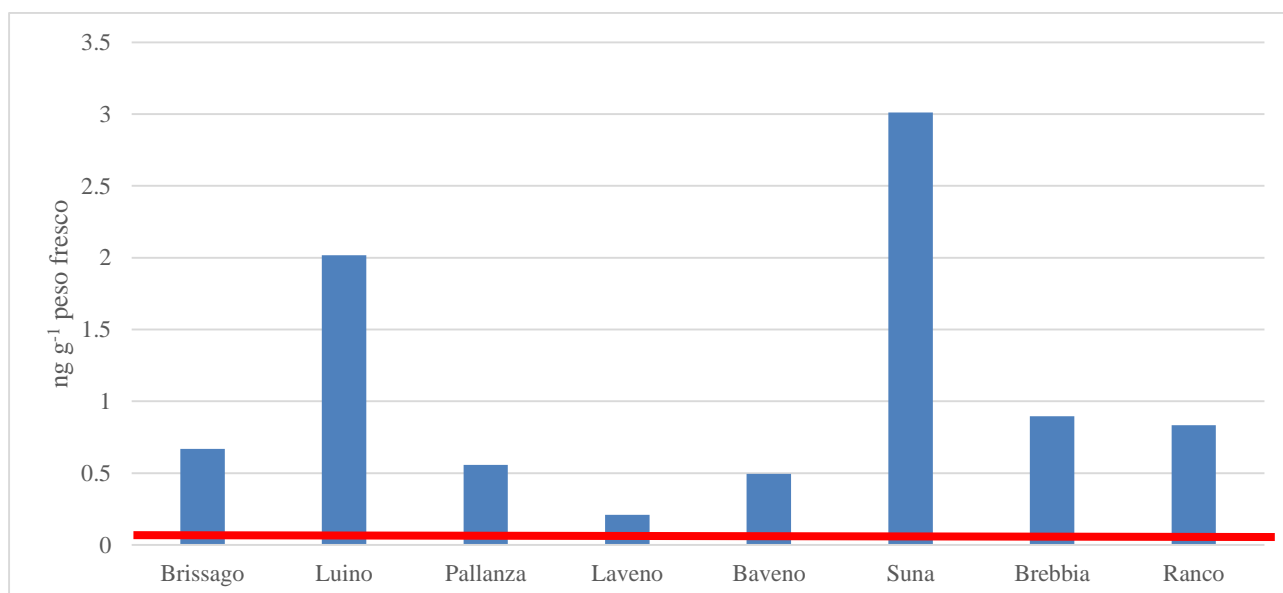


Figura 3.17 Concentrazione totale dei PBDE per le otto stazioni. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota}) pari a $8,5 \text{ pg g}^{-1} \text{ p.f.}$

Analisi del mercurio

Il mercurio totale è stato analizzato in pool di organismi campionati a maggio 2019 del genere *Dreissena* a Pallanza e Baveno e del genere *Unio* a Suna.

Le analisi del mercurio sono state condotte in doppio su aliquote (30-50 mg) di campioni liofilizzati, utilizzando un analizzatore di mercurio con amalgama d'oro (AMA254, *Automated Mercury Analyzer*, FKV). L'accuratezza è stata verificata mediante analisi del materiale certificato BCR278 *Mussel tissue* del *Bureau Communautaire de Référence*, per il quale si è ottenuto un recupero del 93%. Il coefficiente di variazione è risultato $\leq 5\%$. I valori riscontrati sono compresi tra 0,05 e 0,07 mg kg⁻¹ p.s. e sono paragonabili a quelli rilevati nel 2016 e 2017 (CIPAIS, 2017, 2018), mostrando quindi che il bioaccumulo in *Dreissena* e *Unio* risulta generalmente confrontabile (Fig. 3.18). La concentrazione di *Dreissena* campionata a Pallanza (0,05 mg kg⁻¹ p.s.) risulta confrontabile con quelle della serie storica, confermando l'anomalia del picco registrato nel 2018 per *Unio* nella stessa stazione (0,150 mg kg⁻¹ p.s.). Baveno e Suna risultano tendenzialmente più contaminate rispetto a Pallanza, confermando i dati delle campagne CIPAIS precedenti.

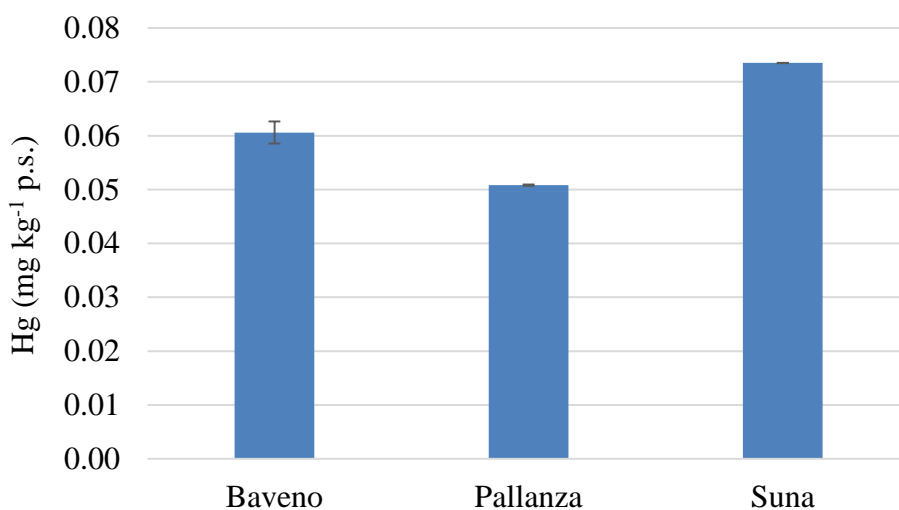


Fig. 3.18. Concentrazioni di mercurio totale riscontrate negli individui di *Dreissena polymorpha* (Baveno e Pallanza) e *Unio* (Suna) campionati nel maggio 2019 in tre stazioni del Bacino di Pallanza.

Bibliografia

- CIP AIS, 2008. Monitoraggio della presenza del DDT e di altri contaminanti nell'ecosistema Lago Maggiore. In: Programma 2008-2012. Pallanza.
- CIP AIS, 2009. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Quinquennio 2008-2012. In: Rapporto Annuale 2009. Pallanza.
- CIP AIS, 2011. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2008-2012. In: Rapporto Annuale 2011. Pallanza.
- CIP AIS, 2012. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2008-2012. In: Rapporto Annuale 2012. Pallanza.
- CIP AIS, 2013. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. In: Rapporto annuale 2013. Pallanza.
- CIP AIS, 2014. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. In: Rapporto annuale 2014. Pallanza.
- CIP AIS, 2017. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. In: Rapporto annuale 2017. Pallanza.
- CIP AIS, 2018. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. In: Rapporto annuale 2018. Pallanza.
- CIP AIS, 2018 b. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma triennale 2016-2018. Campagna 2018 e Rapporto triennale 2016-2018.
- Colombo, J. C., E. Pelletier, C. Brochu, M. Khalil, J. A. Catoggio, 1989. Determination of hydrocarbons sources using n-alkanes and polycyclic aromatics distribution indexes. Case study: Rio de la Plata, Argentina, *Environmental Science & Technology*, 23, 888-894.
- Latimer, J. S., Zheng., J. 2003. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In PAH: An ecotoxicological perspective. P.E.T. Douben (Ed.), London. Wiley, 9-33.

4. ACCUMULO DI CONTAMINANTI PRIORITARI IN SPECIE ITTICHE DEI PRINCIPALI TRIBUTARI

Andrea Binelli, Camilla Della Torre, Università degli Studi di Milano

Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon, CNR-IRSA, Brugherio (MB)

Pietro Volta, CNR-IRSA Verbania Pallanza

Prelievo e trattamento dei campioni

Il prelievo dei pesci è avvenuto nel mese di luglio 2019 nei seguenti tributari: Boesio, Margorabbia, San Giovanni e Toce. L'attività di campionamento ha coinvolto 3 operatori del CNR-IRSA di Pallanza e 3 operatori dell'Università degli Studi di Milano e ha previsto l'utilizzo di un elettrostorditore spallabile (modello ELT60IIGI, *Scubla aquaculture*, 1300 W, 600 v) in modalità "corrente continua". Come anodo è stato utilizzato un anello metallico (diametro 35 cm) montato su un manico in vetroresina della lunghezza di 2 metri, mentre come catodo è stata impiegata una treccia in rame della lunghezza di 2 metri.

Per tutti e quattro i corpi idrici il campionamento è stato effettuato lungo il gradiente valle-monte per una lunghezza complessiva di 200 metri circa per ogni transetto. La scelta del transetto ha tenuto conto della maggiore eterogeneità d'habitat possibile (raschi, pozze, rifugi, ecc.).

Per ogni singolo individuo catturato sono stati misurati i seguenti parametri: lunghezza totale (dall'apice del muso al termine della pinna caudale a lobi riuniti, espressa in cm) e il peso totale (g). È stato effettuato, inoltre, un prelievo di sangue dagli archi branchiali, da cui è stato ottenuto uno striscio ematico su vetrino. Successivamente i pesci sono stati sacrificati, mediante dose letale di anestetico, prelevando successivamente fegato e cervello, mentre il resto della carcassa è stato mantenuto in contenitori refrigerati per il trasporto in laboratorio. Successivamente, presso il laboratorio CNR-IRSA di Pallanza è stato prelevato il tessuto muscolare dorsale e per ogni individuo sono state prelevate alcune scaglie utilizzate per la determinazione dell'età. Le scaglie sono state lavate in NaOH diluita, pulite dal tessuto epidermico e montate su un vetrino. L'età è stata determinata individuando sulla scaglia gli annuli mediante un visore a basso ingrandimento (ingrandimento 33x).

Le specie utilizzate per le analisi sono state scelte sulla base dei pattern di contaminazione rilevati nell'ambito del monitoraggio del 2017 e 2018, che hanno evidenziato cavedano (*Squalius squalus*) e trota fario (*Salmo trutta*) come le due specie più idonee per la prosecuzione delle indagini. Il prelievo è stato finalizzato anche al reperimento di esemplari che presentassero classi di età omogenee nei diversi tributari, in modo da poter confrontare i livelli di contaminazione. Le classi di età sono state scelte in modo da ottenere dati confrontabili con gli anni precedenti, al fine di generare una robusta serie storica.

Per quanto concerne le analisi chimiche, i filetti di ciascun esemplare sono stati liofilizzati e uniti in pool come indicato in tabella 4.1, per un totale di 8 campioni analizzati. I composti prioritari analizzati per ciascun campione sono stati: il p,p'-DDT e i cinque rispettivi composti omologhi, 13 policlorobifenili (PCB) 12 *dioxin-like* PCB e 14 PBDE (polibromodifenileteri).

Il campione liofilizzato è stato estratto attraverso un estrattore soxhlet per ottenere la frazione lipidica contenente i contaminanti in esame. Dopo una digestione acida e un'opportuna purificazione su colonna cromatografica multistrato, si è proceduto all'analisi gas-cromatografica mediante spettrometria di massa (GC-MS/MS). L'analisi dei campioni è stata intervallata dall'aggiunta di campioni di bianco (uno ogni quattro campioni), processati nello stesso modo dei campioni di filetto. Sia nei campioni sia nei bianchi è stato iniettato, prima dell'estrazione lipidica, uno standard interno deuterato a concentrazione nota, il DDE D8 (p,p'-DDE D8); tutti i campioni hanno mostrato un

recupero superiore all'80% di tale standard interno. I limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati stimati in base al rapporto segnale/rumore (3:1 e 10:1, rispettivamente per ogni composto analizzato:

- 0,05 ng g⁻¹ p.s. e 0,35 ng g⁻¹ p.s per il p,p'-DDT e relativi composti omologhi;
- 0,15 ng g⁻¹ p.s. e 0,35 ng g⁻¹ p.s. per i congeneri di PCB e i PBDE;

Per quanto riguarda la percentuale lipidica, espressa sul peso secco, i valori rilevati sono compresi tra il 5,4 % misurato nel cavedano prelevato nel Fiume Margorabbia e il 10,9 % nella trota fario campionata nel fiume San Giovanni (tabella 4.1). Data la variabilità del contenuto lipidico tra i diversi campioni, tutti i risultati sono stati normalizzati sulla frazione lipidica, così da consentire un confronto sia tra le diverse specie, sia tra le stazioni di campionamento.

Tributario	Specie	Esemplari	Età	peso lipidico (g)	frazione lipidica%
Boesio	Cavedano	6	7-10	0,12	8,0
	Trota fario	6	1-3	0,14	9,4
San Giovanni	Cavedano	6	8-10	0,095	6,3
	Trota fario	6	2-4	0,16	10,9
Margorabbia	Cavedano	6	8-11	0,08	5,4
	Trota fario	6	2-3	0,12	7,7
Toce	Cavedano	6	10-11	0,15	10,0
	Trota fario	6	2-3	0,11	7,3

Tab. 4.1 Numero di esemplari e caratteristiche dei pesci campionati.

Contaminazione da DDx

Cavedano

I livelli di DDx misurati negli esemplari di cavedano prelevati nei 4 tributari evidenziano un livello di DDT e omologhi maggiore nel Fiume Toce rispetto agli altri tributari, con valori pari a 910 ng g⁻¹ lipidi (Fig. 4.1). I livelli di DDx misurati nei pesci provenienti dal fiume Boesio sono solo leggermente inferiori rispetto ai livelli riscontrati nel Toce e pari a 788 ng g⁻¹ lipidi. Le concentrazioni misurate nei pesci dei fiumi Margorabbia e San Giovanni, pari a 210 ng g⁻¹ lipidi e 391 ng g⁻¹ lipidi, rispettivamente, risultano di oltre 3 volte inferiori rispetto a quelli del F. Toce.

DDx

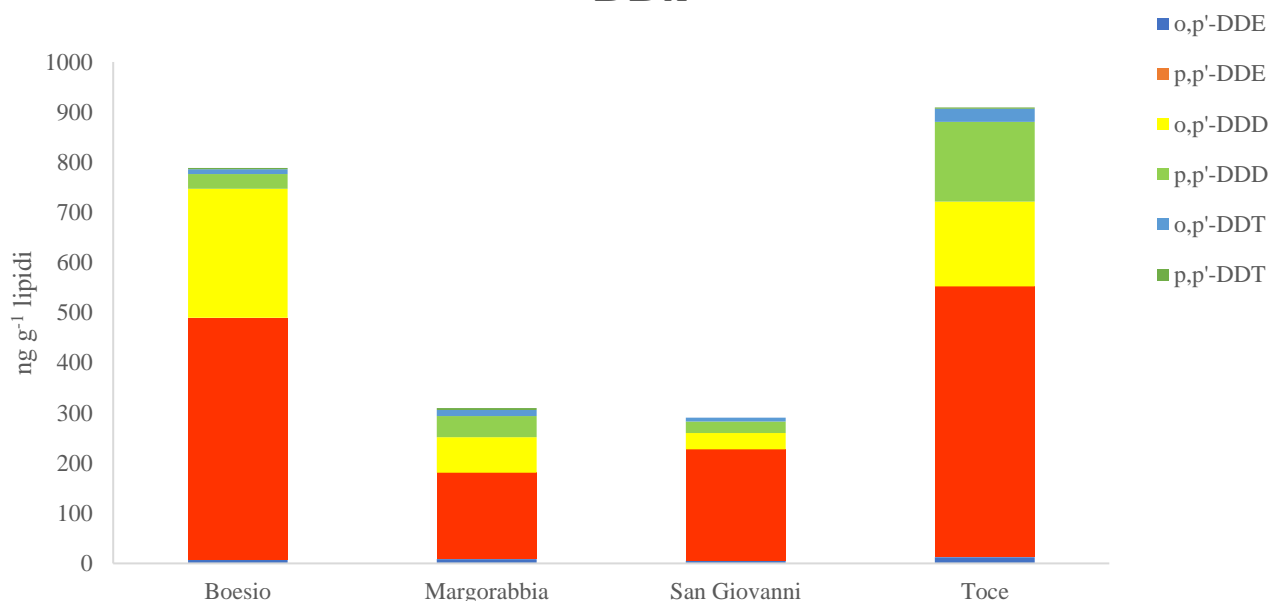


Fig. 4.1 Concentrazione dei DDx totali misurata negli esemplari di cavedano prelevati nei tributari nel mese di luglio 2019, con i rispettivi valori isomerici.

L'impronta della contaminazione, riportata in figura 4.2, si è dimostrata abbastanza omogenea nei diversi tributari. Nei campioni si osserva una prevalenza di p,p' DDE, con un massimo del 76% del totale negli esemplari del San Giovanni e un minimo pari al 56 % negli esemplari del Margorabbia. Si osserva, inoltre, che tutti i campioni presentano una concentrazione non trascurabile di o,p'-DDD con percentuali variabili tra il 11 % rilevata nel San Giovanni e il 33 % misurata negli esemplari prelevati nel Boesio. Anche il pp'-DDD è presente in concentrazioni che variano dal 4% nel Boesio al 18% nel Toce. Ciò suggerisce che in questi tributari si sia verificato un rilascio di contaminanti contenuti nei sedimenti anossici, probabilmente in seguito a fenomeni alluvionali in questi fiumi. I restanti omologhi mostrano percentuali trascurabili.

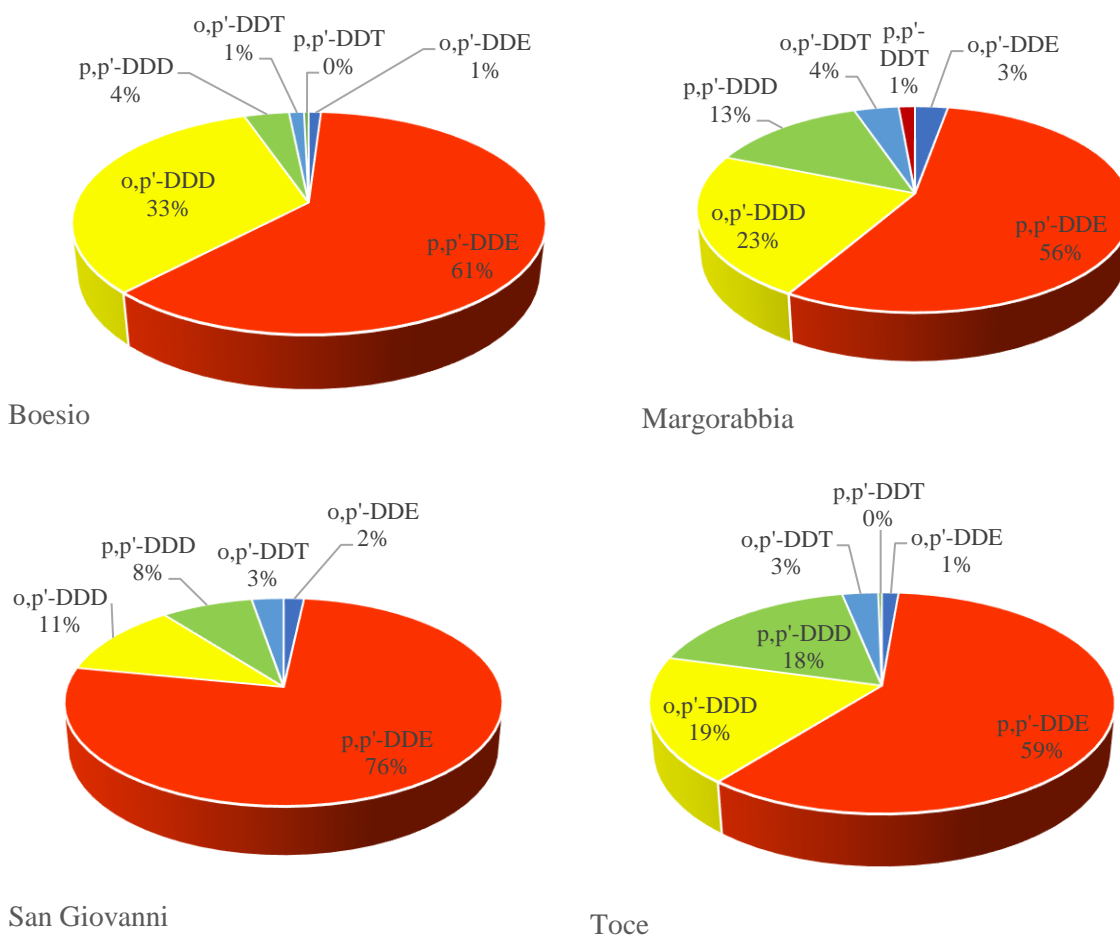


Fig 4.2. Percentuale media dei DDx misurati negli esemplari di cavedano prelevati nei 4 tributari

Il rapporto tra gli isomeri p,p'-DDT/p,p'-DDE osservato per tutti i pool analizzati mostra valori inferiori a 0,33, confermando un'origine pregressa della contaminazione; mentre il rapporto tra p,p'-DDE/p,p'-DDD mostra valori per tutti i pool superiori a 1 indicando una degradazione del p,p'-DDT in ambiente aerobio (Tab. 4.2).

	Boesio	Margorabbia	San Giovanni	Toce
p,p'-DDT/p,p'-DDE	0,006	0,025	0,001	0,005
p,p'-DDE/p,p'-DDD	16,69	4,09	9,79	3,39

Tab. 4.2. Rapporti tra isomeri dei relativi pool analizzati

Trota fario

Contrariamente a quanto osservato per il cavedano, i livelli di DDx misurati negli esemplari di trota fario prelevati nei 4 tributari evidenziano un livello di DDT e omologhi maggiore nel Fiume Boesio rispetto agli altri tributari, con valori pari a 577 ng g⁻¹ lipidi (Fig. 4.2). I livelli di DDx misurati

nei pesci provenienti dal fiume Toce sono leggermente inferiori rispetto ai livelli riscontrati nel Boesio e pari a 405 ng g^{-1} lipidi. Le concentrazioni misurate nei pesci dei fiumi Margorabbia e San Giovanni, pari a 310 ng g^{-1} lipidi e 210 ng g^{-1} lipidi, rispettivamente, risultano circa 2 volte inferiori rispetto a quelli degli altri 2 tributari.

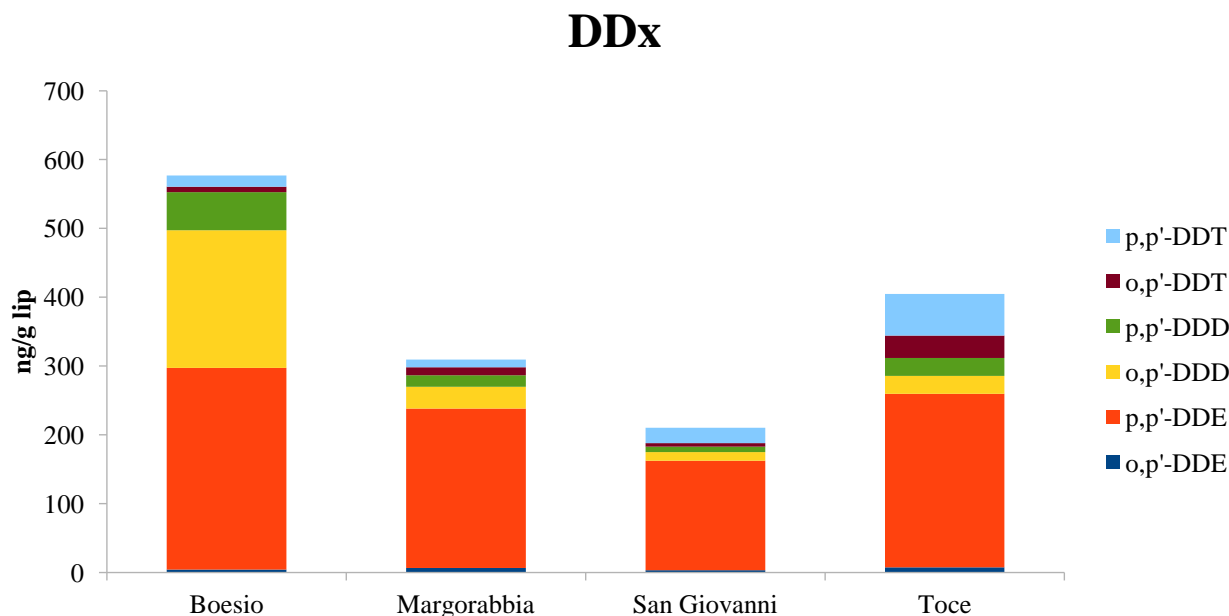


Fig. 4.3 Concentrazione dei DDx totali misurata negli esemplari di trota fario prelevati nei tributari nel mese di luglio 2019, con i rispettivi valori isomerici.

L'impronta della contaminazione, riportata in figura 4.4, si è dimostrata abbastanza omogenea nei diversi tributari. Nei campioni si osserva una prevalenza di p,p'-DDE, con un massimo del 76% del totale negli esemplari del San Giovanni e un minimo pari al 51% negli esemplari campionati nel Boesio. Nel fiume San Giovanni e nel Toce sono stati rilevati livelli di p,p'-DDT pari al 10% e 15% rispettivamente. Come rilevato anche nel cavedano, si osserva inoltre che tutti i campioni presentano una concentrazione non trascurabile di o,p'-DDD con percentuali variabili tra il 6% rilevata nel San Giovanni e il 35% misurata negli esemplari prelevati nel Boesio. Il p,p'-DDD, invece, risulta presente in concentrazioni inferiori al 10% in tutti i tributari. Il risultato sembra confermare, quindi, un rilascio di contaminanti contenuti nei sedimenti anossici, probabilmente in seguito a fenomeni alluvionali avvenuti prima del campionamento di questi fiumi.

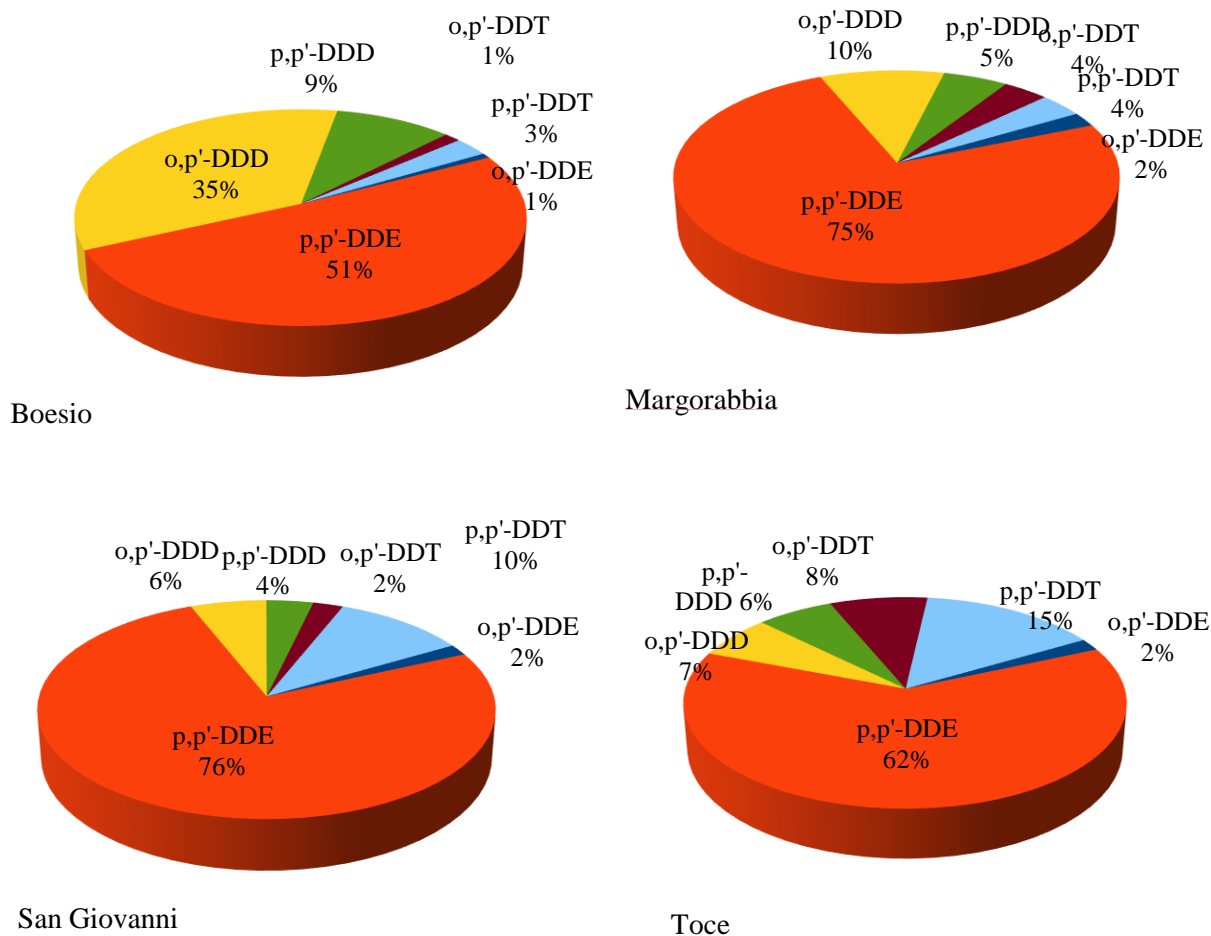


Fig 4.4 Percentuale media dei DDx misurati negli esemplari di trota prelevati nei 4 tributari

Il rapporto tra gli isomeri p,p'-DDT/p,p'-DDE osservato per tutti i pool analizzati mostra valori inferiori a 0,33 confermando un'origine pregressa della contaminazione; mentre il rapporto tra p,p'-DDE/p,p'-DDD mostra valori per tutti i pool superiori a 1 indicando una degradazione del p,p'-DDT in ambiente aerobio (Tab. 4.3).

	Boesio	Margorabbia	San Giovanni	Toce
p,p'-DDT/p,p'-DDE	0,056	0,049	0,140	0,239
p,p'-DDE/p,p'-DDD	5,32	14,02	20,41	9,749

Tab. 4.3. Rapporti tra isomeri dei relativi pool analizzati

Contaminazione da PCB

Cavedano

I risultati relativi agli esemplari di cavedano prelevati nei 4 tributari non evidenziano una contaminazione rilevante a carico del PCB, ad esclusione del fiume Boesio, nel quale le concentrazioni totali di PCB hanno presentato valori pari a 1417 ng g^{-1} lipidi, indicando tale tributario come possibile fonte puntiforme di PCB nel Verbano. Nei cavedani prelevati negli altri tributari sono stati misurati livelli di PCB totali da circa 2 a 4 volte inferiori e pari a 302 ng g^{-1} lipidi nel Margorabbia, 563 ng g^{-1} lipidi nel San Giovanni e 628 ng g^{-1} lipidi nel fiume Toce (Figura 4.5).

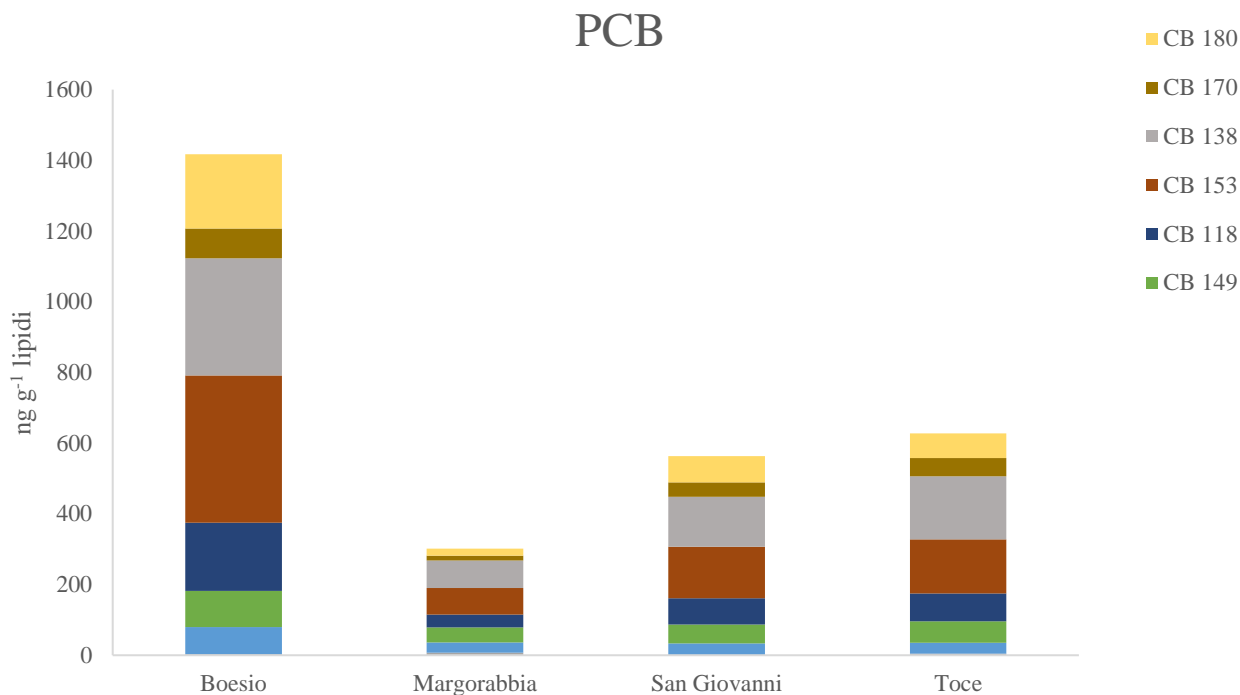


Fig 4.5 Concentrazione dei PCB totali misurata negli esemplari di cavedano prelevati nei 4 tributari, con i relativi rapporti tra congeneri.

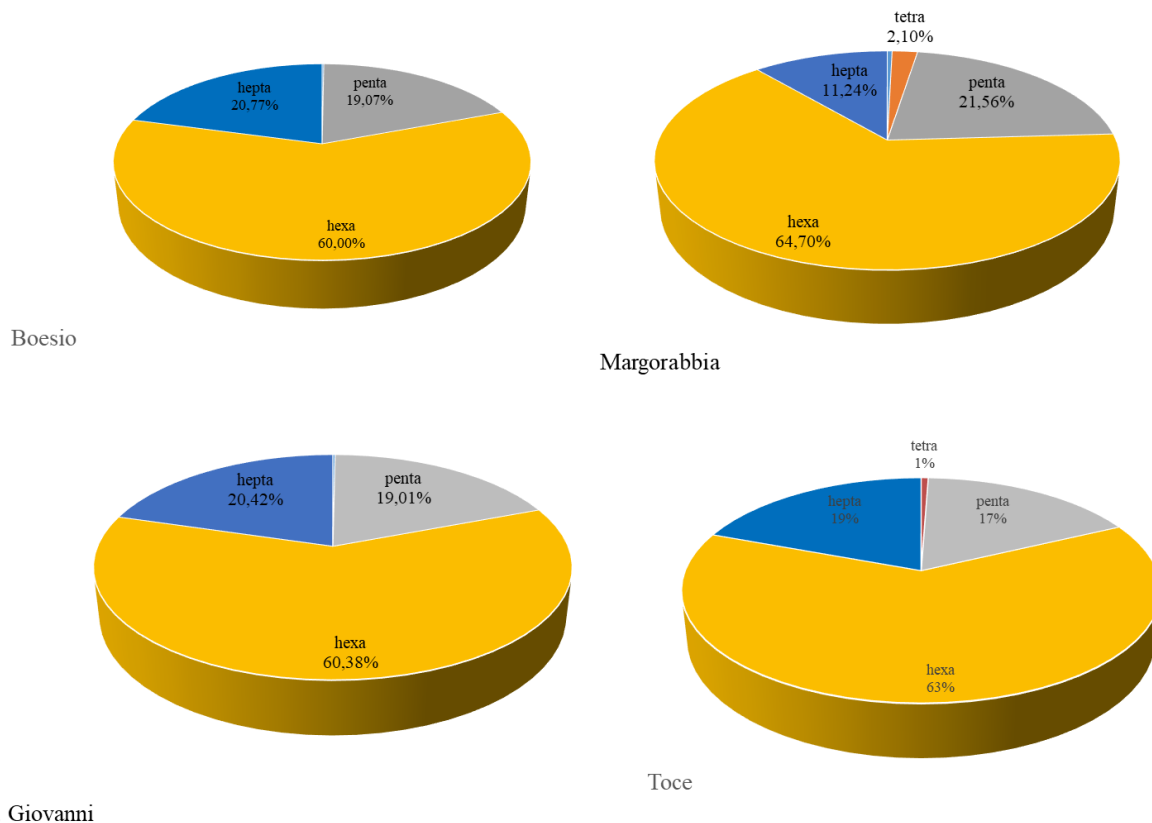


Fig 4.6 Percentuale media dei diversi congeneri di PCB misurati negli esemplari di cavedano prelevati nei quattro tributari.

Il pattern di contaminazione è risultato omogeneo nei diversi tributari e i congeneri più rappresentati sono il CB-153, il CB-138, CB-180, CB-170 e il CB-118 (Fig. 4.6). I composti esaclorurati risultano essere quelli più presenti, con percentuali medie pari al 60% circa in tutti i campioni analizzati. I composti pentaclorurati hanno presentato percentuali oscillanti da un minimo di 17% nel Toce al 22% nel Margorabbia. Anche i composti eptaclorurati hanno presentato una concentrazione non trascurabile, pari al 21 % nel Boesio e nel San Giovanni, pari al 19% nel Toce e all'11% nel Margorabbia. I restanti composti, tri-, tetra-, octa- e decaclorurati hanno presentato livelli trascurabili o non rilevabili, in tutti i campioni analizzati.

Trota fario

Similmente a quanto osservato per il cavedano, i risultati relativi agli esemplari di trota fario prelevati nei 4 tributari non evidenziano una contaminazione rilevante a carico del PCB, ad eccezione del F. Boesio, nel quale le concentrazioni totali di PCB hanno presentato valori pari a 969 ng g⁻¹ lipidi. Nelle trote prelevate negli altri tributari sono stati misurati livelli di PCB totali da circa 2 volte inferiori e pari a 346 ng g⁻¹ lipidi nel Margorabbia, 344 ng g⁻¹ lipidi nel San Giovanni e 544 ng g⁻¹ lipidi nel fiume Toce (Figura 4.7).

PCB

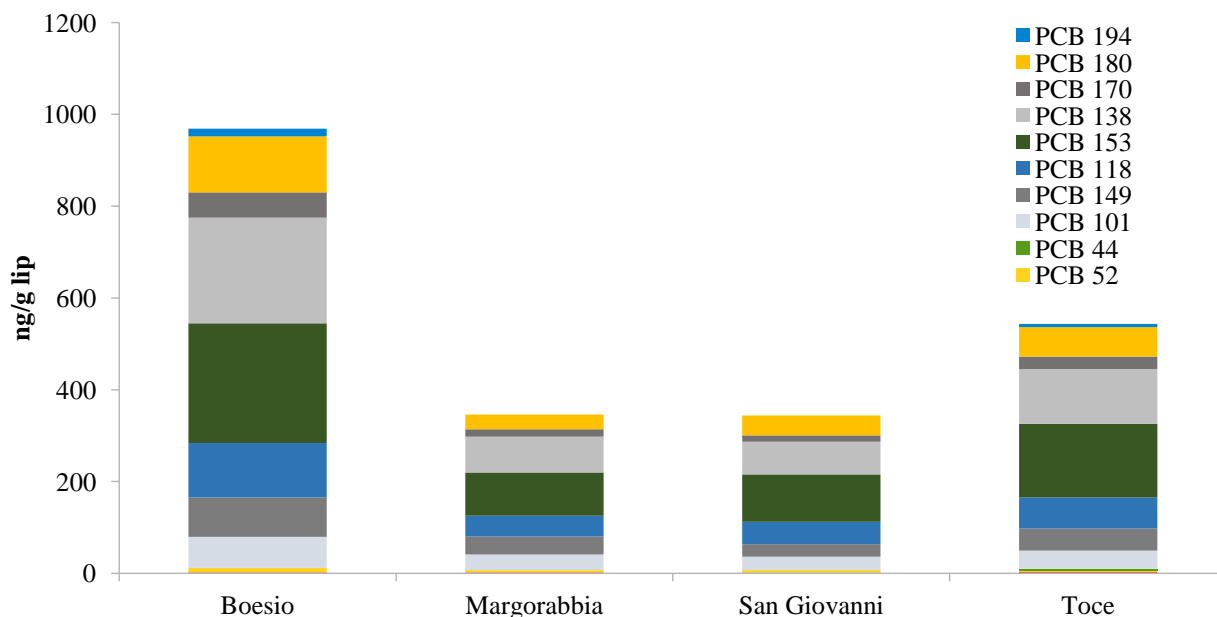


Fig 4.7 Concentrazione dei PCB totali misurata negli esemplari di trota fario prelevati nei 4 tributari, con i relativi rapporti tra congeneri.

Il pattern di contaminazione è risultato omogeneo nei diversi tributari e i congeneri più rappresentati sono il CB-153, il CB-138, CB-180 e il CB-118 (Fig. 4.8). I composti esaclorurati risultano essere quelli più presenti, con percentuali medie pari al 60% circa in tutti i campioni analizzati. I composti pentaclorurati hanno presentato percentuali oscillanti da un minimo di 19% nel Boesio al 23% nel Margorabbia e San Giovanni. Anche i composti eptaclorurati hanno presentato una concentrazione omogenea in percentuale in tutti i tributari non trascurabile, oscillanti dal 14% nel Margorabbia al 14% nel Boesio. I restanti composti, tri-, tetra-, octa- e decaclorurati hanno presentato livelli trascurabili o non rilevabili, in tutti i campioni analizzati.

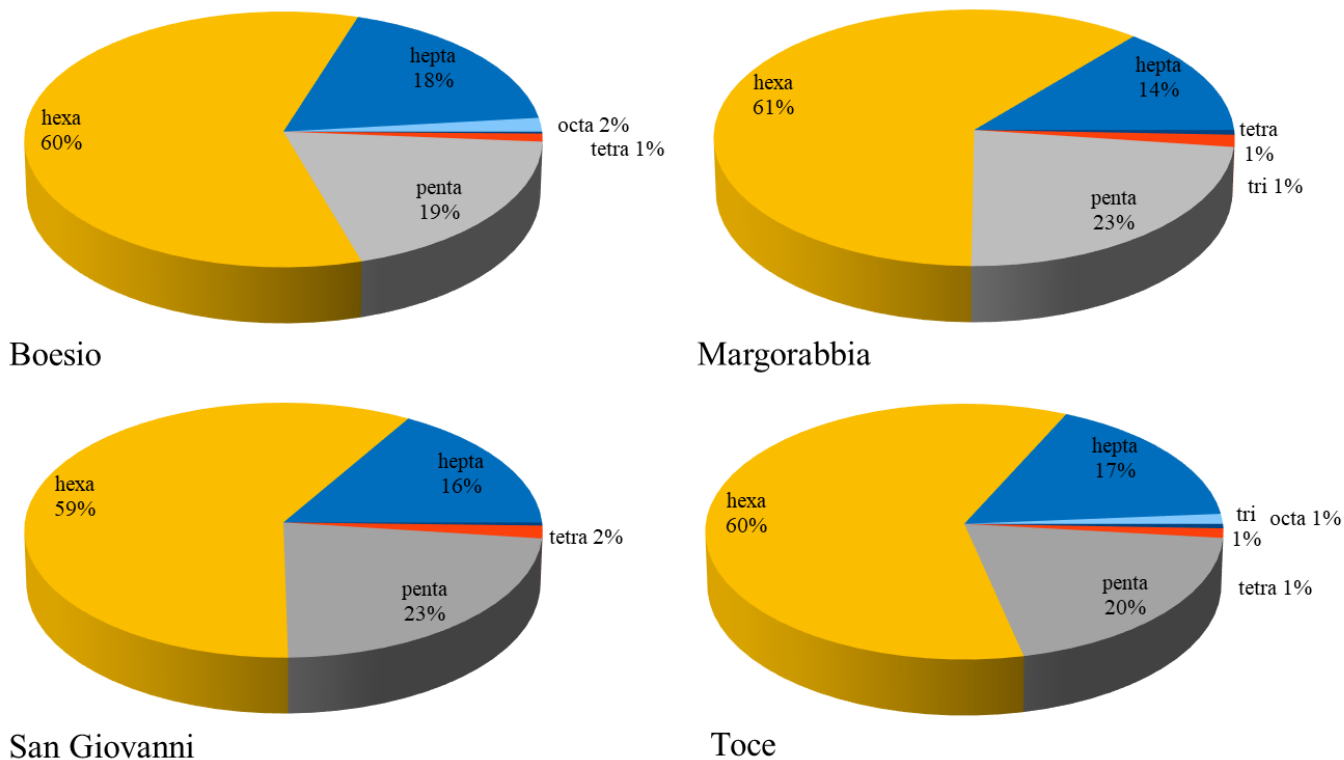


Fig 4.8 Percentuale media dei diversi congeneri di PCB misurati negli esemplari di trota prelevati nei quattro tributari

Contaminazione da PCB dioxin-like

Cavedano

I risultati relativi agli esemplari di cavedano prelevati nei 4 tributari confermano il trend osservato per i PCB indicatori, evidenziando una maggiore criticità per il fiume Boesio rispetto agli altri tributari. Nel Boesio le concentrazioni totali di dl-PCB hanno presentato valori pari a 408 ng g^{-1} lipidi. Nei cavedani prelevati negli altri tributari sono stati misurati livelli di dl-PCB di circa 3 volte inferiori nel San Giovanni (135 ng g^{-1} lipidi) e 2 volte inferiori nel Toce e pari 183 ng g^{-1} lipidi, mentre i valori misurati negli esemplari campionati nel Margorabbia sono risultati nettamente più bassi e pari a 75 ng g^{-1} lipidi (Figura 4.9).

PCB dioxin-like

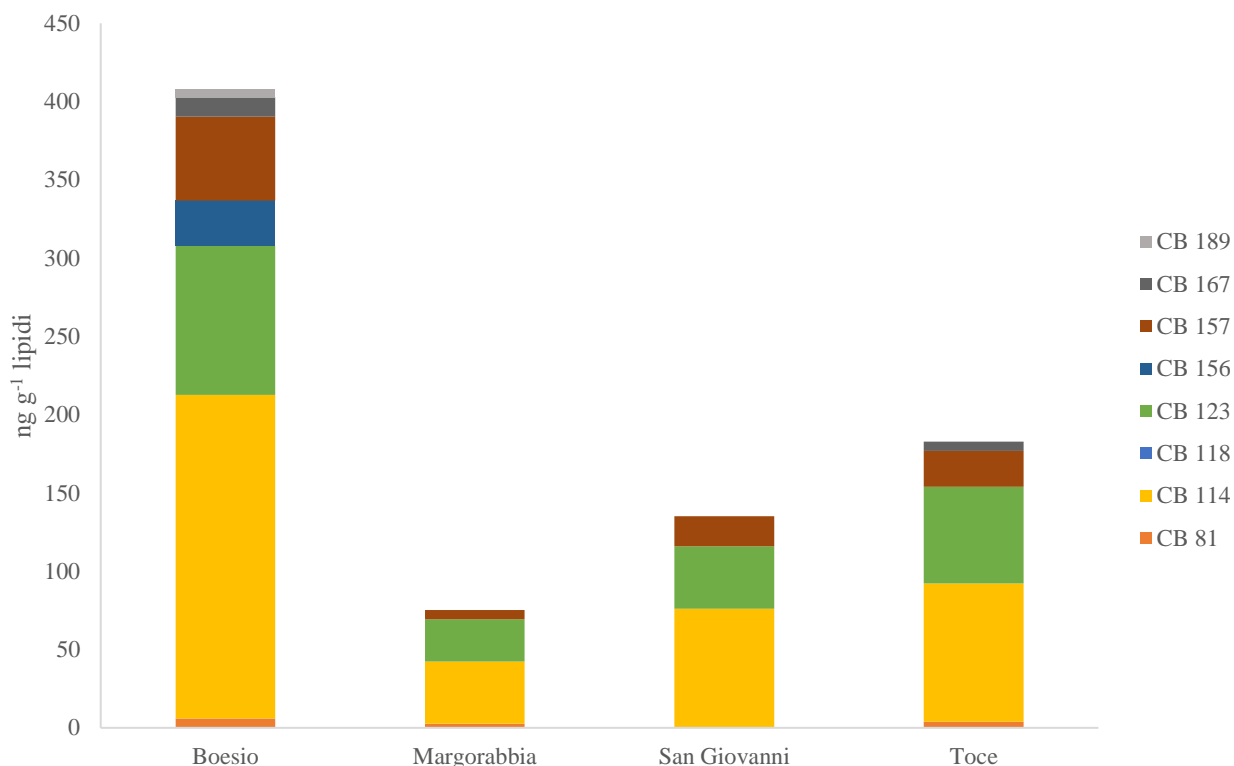


Fig 4.9 Concentrazione dei dl-PCB misurata negli esemplari di cavedano prelevati nei 4 tributari, con i relativi rapporti tra congeneri.

Il pattern di contaminazione è risultato omogeneo nei diversi tributari (Fig. 4.10). Entrando nel dettaglio, il dl-PCB più rappresentato è il CB-114, con una percentuale variabile tra il 48 % nel Toce e il 56 % nel San Giovanni. Il secondo dl-PCB maggiormente rappresentato è il CB-157 che si attesta su percentuali variabili tra il 7% nel Margorabbia e il 14% nel San Giovanni. Esclusivamente nel Boesio sono state rilevate percentuali non trascurabili di CB-156, pari al 7% del totale. I restanti composti hanno presentato livelli trascurabili o non rilevabili, in tutti i campioni analizzati.

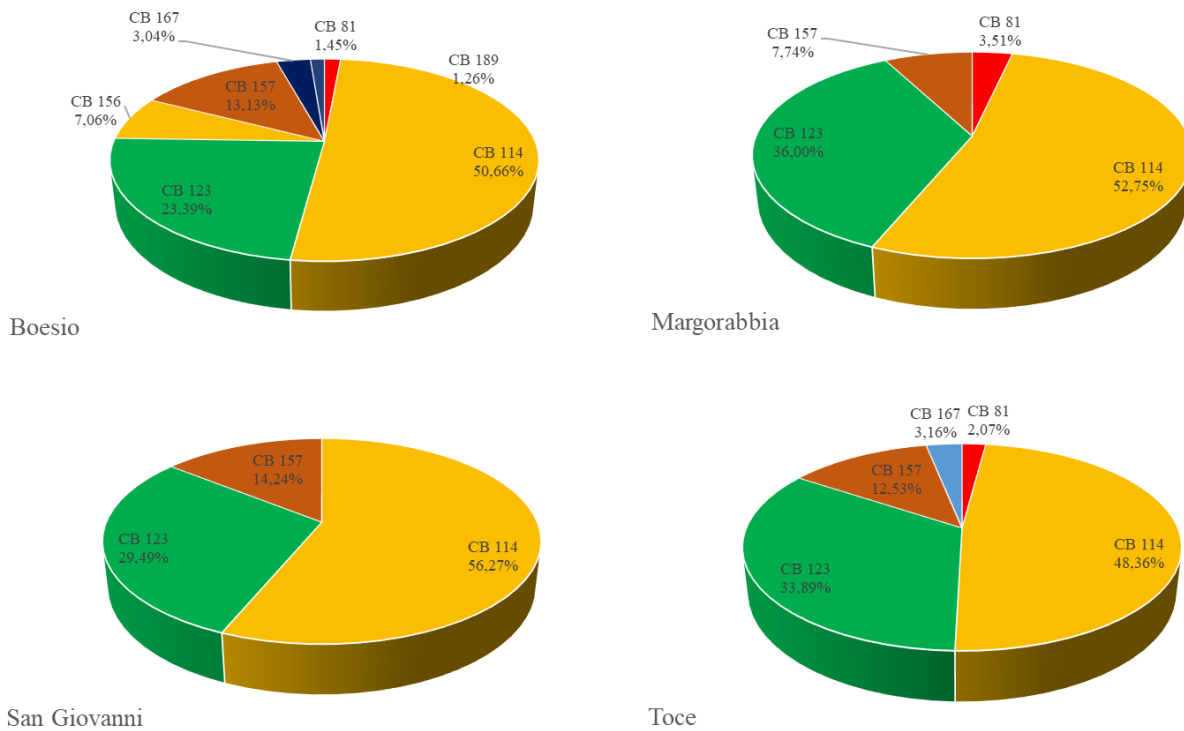


Fig 4.10 Percentuale media dei diversi congeneri di dl-PCB misurati negli esemplari di cavedano prelevati nei quattro tributari

Trota fario

Similmente a quanto osservato per gli esemplari di cavedano, i risultati relativi agli esemplari di trota fario prelevati nei 4 tributari confermano il trend osservato per i PCB non-dl. Nel Boesio le concentrazioni totali di dl-PCB hanno presentato i valori più elevati pari a 262 ng g⁻¹ lipidi. Nei cavedani prelevati negli altri tributari sono stati misurati livelli di dl-PCB totali pari a 144 ng g⁻¹ lipidi nel Toce. I livelli misurati negli esemplari campionati negli altri due tributari sono risultati molto simili e pari a 93 ng g⁻¹ lipidi nel San Giovanni e pari a 95 ng g⁻¹ lipidi nel Margorabbia (Figura 4.11).

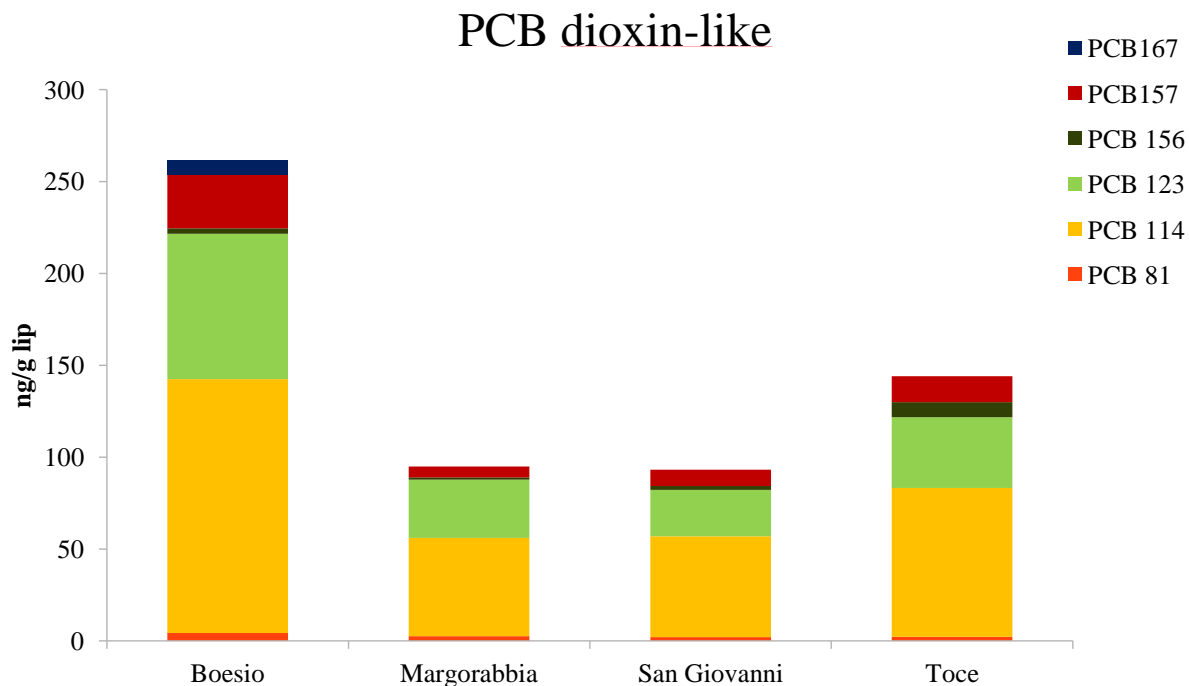


Fig 4.11 Concentrazione dei PCB-dl misurata negli esemplari di trota fario prelevati nei 4 tributari, con i relativi rapporti tra congeneri.

Il pattern di contaminazione è risultato omogeneo nei diversi tributari (Fig. 4.12). Entrando nel dettaglio, il dl-PCB più rappresentato è il CB-114, con una percentuale variabile tra il 53 % nel Boesio e il 59 % nel San Giovanni. Il secondo dl-PCB maggiormente rappresentato è il CB-157 che si attesta su percentuali variabili tra il 6% nel Margorabbia e 11% nel Boesio. Sono state rilevate percentuali trascurabili di CB-156 (1-2%), ad eccezione del Toce, in cui le concentrazioni si sono attestate intorno al 6% del totale. I restanti composti hanno presentato livelli trascurabili o non rilevabili, in tutti i campioni analizzati.

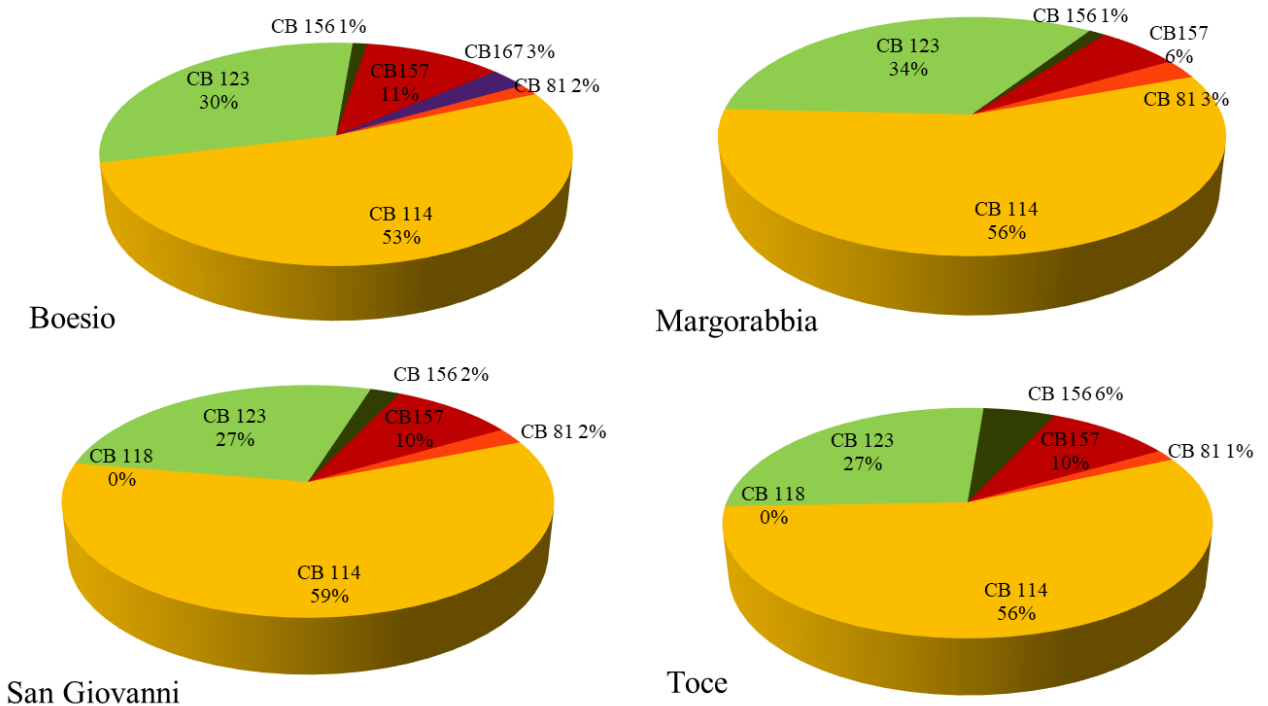


Fig 4.12 Percentuale media dei diversi congeneri di PCB-dl misurati negli esemplari di trota fario prelevati nei quattro tributari

Contaminazione da PBDE

Cavedano

I risultati relativi agli esemplari di cavedano prelevati nei quattro tributari mostrano anche per questa classe di contaminanti come sia il fiume Boesio il più interessato da questo tipo di contaminazione, con concentrazioni pari 190 ng g^{-1} lipidi, mentre il Toce ha presentato valori pari a 120 ng g^{-1} lipidi. I tributari Margorabbia e San Giovanni hanno confermato i livelli più bassi anche per questa classe di contaminanti, di oltre due volte rispetto agli altri due tributari e pari a 75 ng g^{-1} lipidi e 64 ng g^{-1} lipidi, rispettivamente (Fig. 4.13).

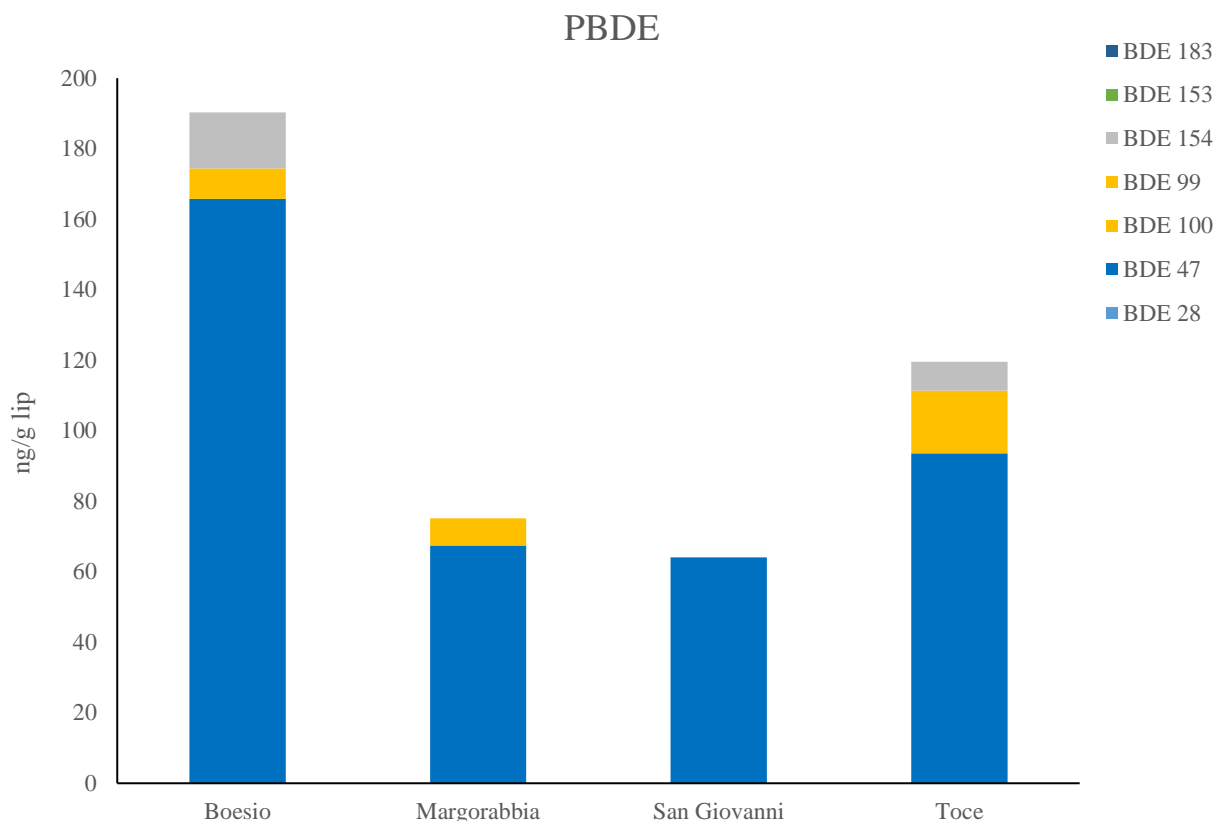


Fig 4.13 Concentrazione dei PBDE totali misurata negli esemplari di cavedano prelevati nei quattro tributari con relativi congeneri

Il pattern di contaminazione risulta abbastanza omogeneo nei diversi tributari (Fig. 4.14). È opportuno sottolineare che non è stato possibile analizzare il BDE 209, in quanto occorrono metodologie analitiche e tecniche di cui non disponiamo. Il congenero più rappresentativo tra quelli misurati è il BDE 47, con una percentuale variabile da circa il 78% nei cavedani del Toce al 100% nei cavedani del San Giovanni. A questo congenero segue il BDE 100, con percentuali che oscillano dal 4% nel Boesio al 15% nel Toce. Il congenero 154 è stato rilevato nel Boesio e nel Toce a percentuali pari a 7% e 8% rispettivamente. I congeneri BDE 28, 99, 153 e 183 sono risultati sotto la soglia di rilevabilità in tutti i tributari.

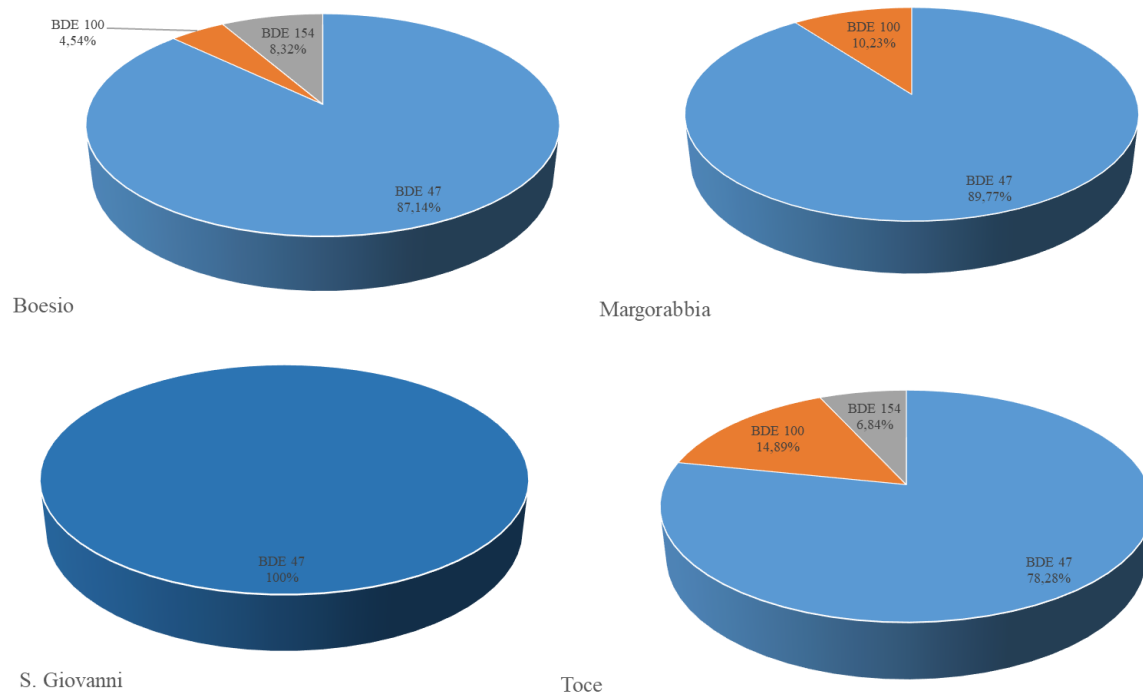


Fig 4.14 Percentuale media dei diversi congeneri di PBDE misurati negli esemplari di cavedano campionati nei 4 tributari

Trota fario

I risultati relativi agli esemplari di trota fario prelevati nei quattro tributari mostrano una contaminazione molto simile per i quattro tributari. Il fiume Boesio è risultato il più contaminato con concentrazioni pari a 147 ng g^{-1} lipidi, il Toce e il San Giovanni hanno presentato livelli leggermente più bassi pari a 118 ng g^{-1} lipidi e 114 ng g^{-1} lipidi rispettivamente. Infine, negli esemplari prelevati nel Margorabbia sono stati misurati livelli di PBDE pari a 75 ng g^{-1} lipidi (Fig. 4.15).

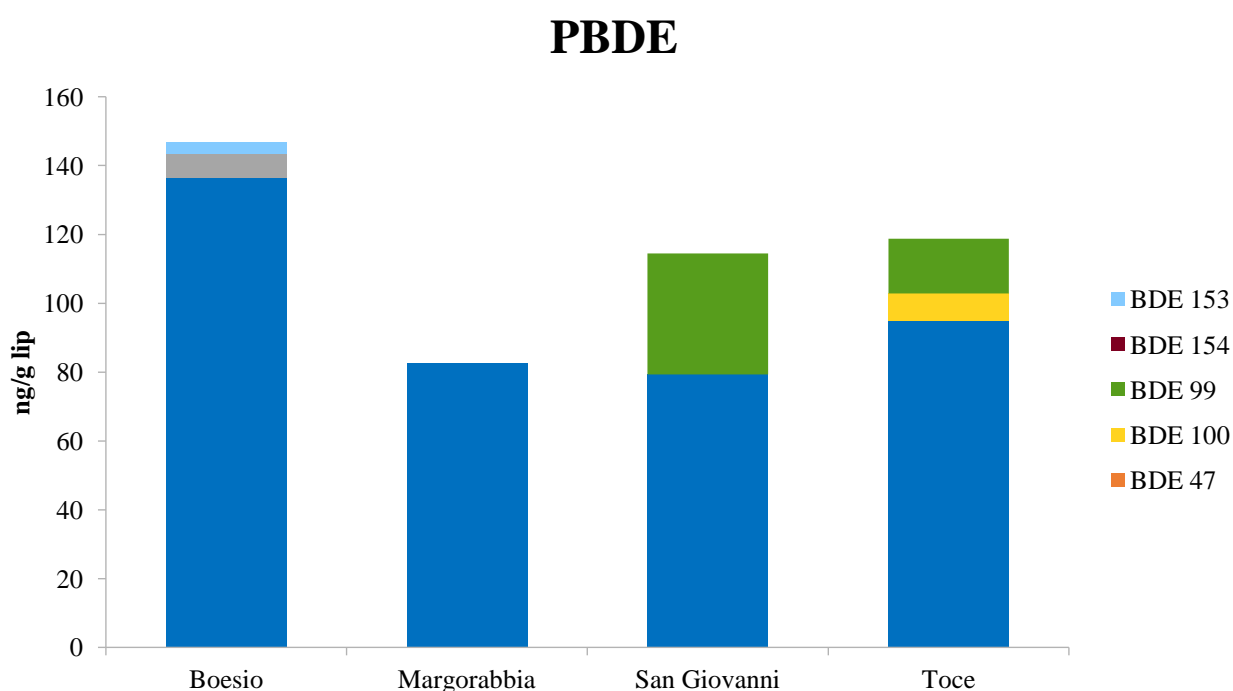


Fig 4.15 Concentrazione dei PBDE totali misurata negli esemplari di trota fario prelevati nei quattro tributari con relativi congeneri

Il pattern di contaminazione presenta alcune differenze nei diversi tributari (Fig. 4.16). Il congenere più rappresentativo tra quelli misurati è il BDE 47, con una percentuale variabile da circa il 69% negli esemplari del San Giovanni al 100% misurato in quelli del Margorabbia. A questo congenere segue il BDE 99, rilevato nei tributari con percentuali che oscillano dal 4% nel Boesio al 15% nel Toce. Il congenere 154 è stato rilevato nel Boesio e nel Toce a percentuali pari a 7% e 8% rispettivamente. I congeneri BDE 28, 99, 153 e 183 sono risultati sotto la soglia di rilevabilità in tutti i tributari. Occorre, però, ricordare che tali dati sono falsati, in quanto non è stato possibile misurare il BDE 209, che rappresenta il congenere oggi giorno maggiormente presente in ambiente.

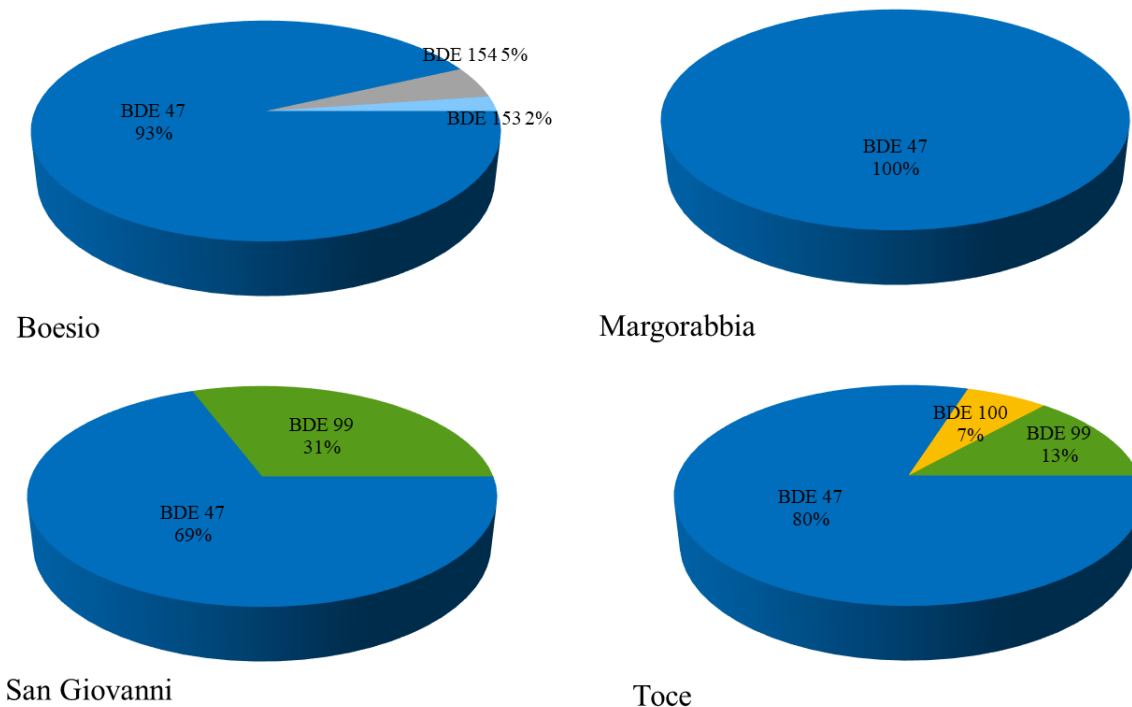


Fig 4.16. Percentuale media dei diversi congeneri di PBDE misurati negli esemplari di trota fario campionati nei 4 tributari

Utilizzando i dati normalizzati sul peso fresco, è stato possibile anche confrontare i livelli dei contaminanti prioritari analizzati con gli Standard di Qualità Ambientale per il biota (SQA_{biota}) imposti dalla normativa italiana per il monitoraggio degli ecosistemi acquatici (Decreto Legislativo n. 172/2015). Tali standard sono definiti come riportato di seguito:

SQA_{biota} per i DDX totali: $100 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$

SQA_{biota} per PCB: riprendendo il Regolamento UE 1259/2011, la normativa prevede che la somma delle concentrazioni dei PCB-28, 52, 101, 138, 153, 180 ritenuti i cosiddetti PCB indicatori, non superi i $125 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$

SQA_{biota} per dioxin like-PCB: lo standard è basato sul TEQ (*Toxicity Equivalent Quotient*) e ha valore di $6,5 \text{ pg TEQ g}^{-1}$.

SQA_{biota} per PBDE: la somma dei BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154 nel biota non deve superare il valore di $8,5 \text{ pg g}^{-1} \text{ p.f.}$

Le figure sottostanti (4.17-4.24) indicano come i livelli misurati in entrambe le specie siano abbondantemente al di sotto del relativo ad eccezione dei PBDE, per cui lo standard risulta abbondantemente superato in entrambe le specie.

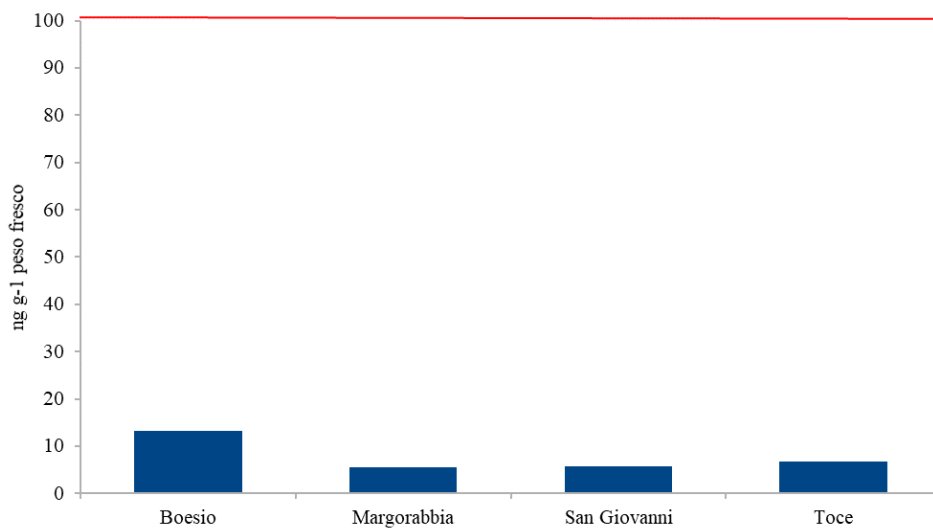


Figura 4.17 Concentrazione totale dei DDX espressa come peso fresco negli esemplari di cavedano campionati nei tributari. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota})

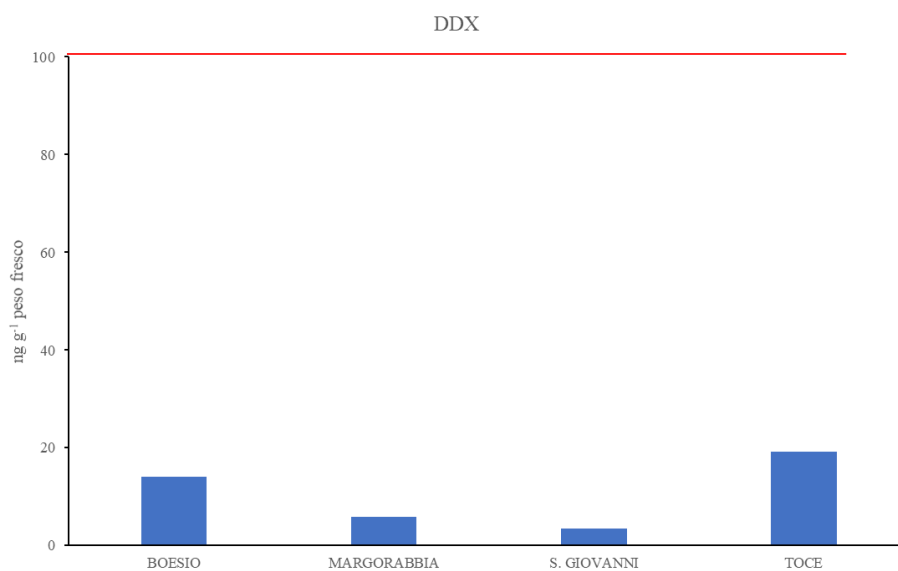


Figura 4.18 Concentrazione totale dei DDX espressa come peso fresco negli esemplari di trota fario campionati nei tributari. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota})

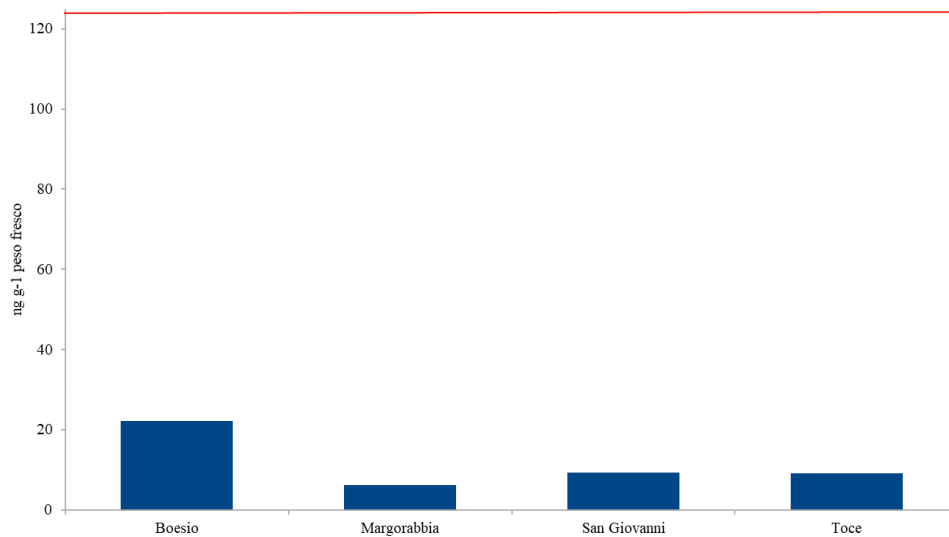


Figura 4.19 Concentrazione totale dei PCB indicatori (CB 28, 52, 101, 138, 153, 180) espressa come peso fresco negli esemplari di cavedano campionati nei tributari. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota})

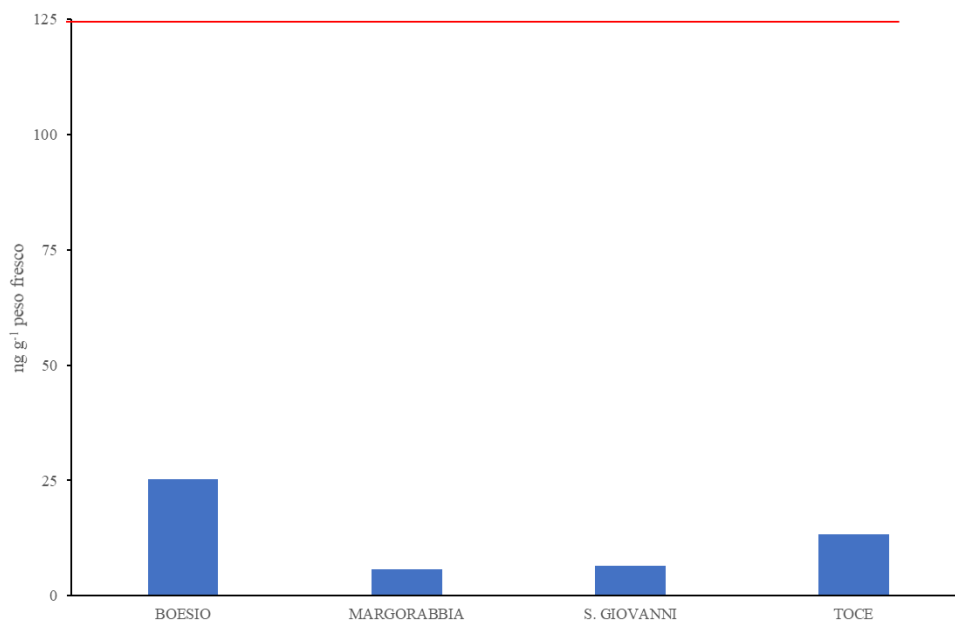


Figura 4.20 Concentrazione totale dei PCB indicatori (CB 28, 52, 101, 138, 153, 180) espressa come peso fresco negli esemplari di trota fario campionati nei tributari. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota})



Figura 4.21 Concentrazione totale dei *dioxin like*-PCB espressa come TEQ peso fresco negli esemplari di cavedano campionati nei tributari. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota})

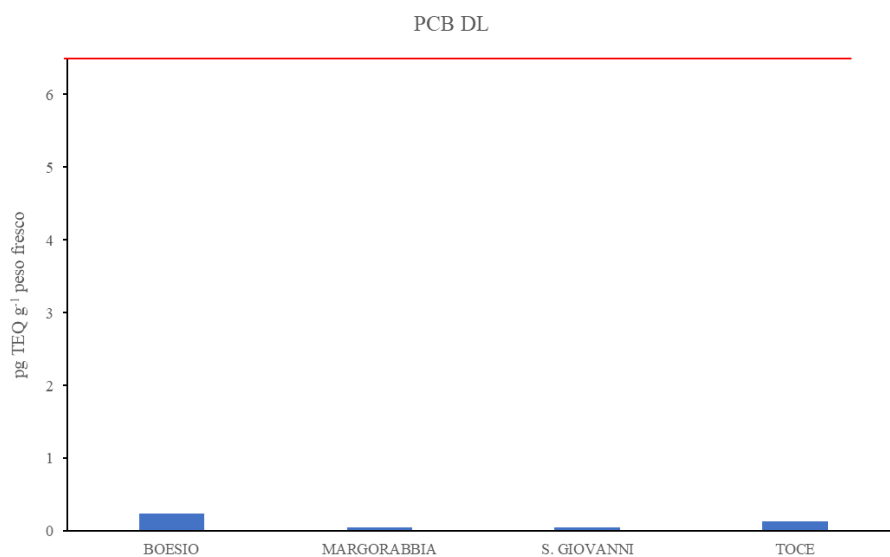


Figura 4.22 Concentrazione totale dei *dioxin like*-PCB espressa come TEQ peso fresco negli esemplari di trota fario campionati nei tributari. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota})

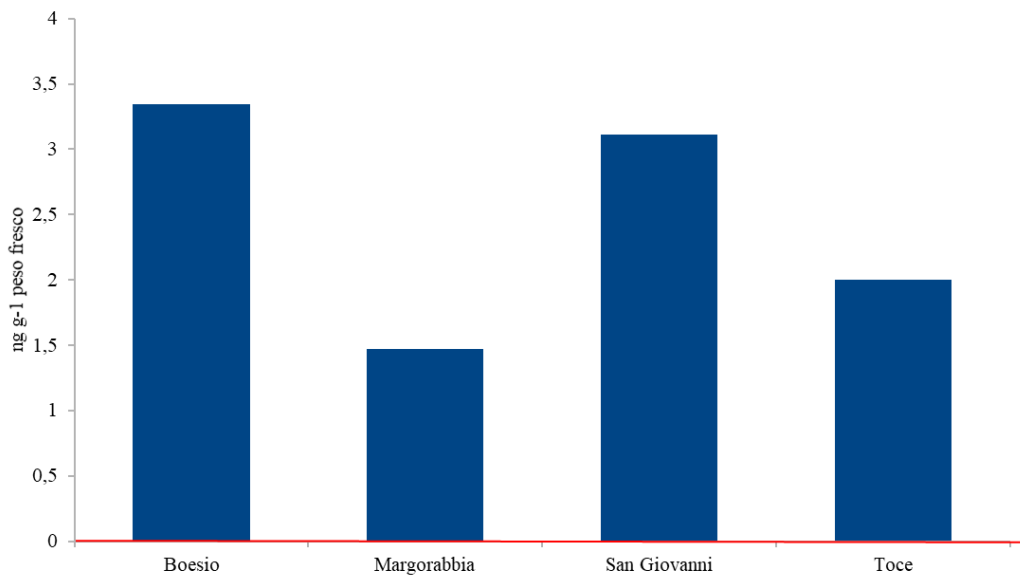


Figura 4.23 Concentrazione totale dei PBDE espressa come peso fresco negli esemplari di cavedano campionati nei tributari. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota})

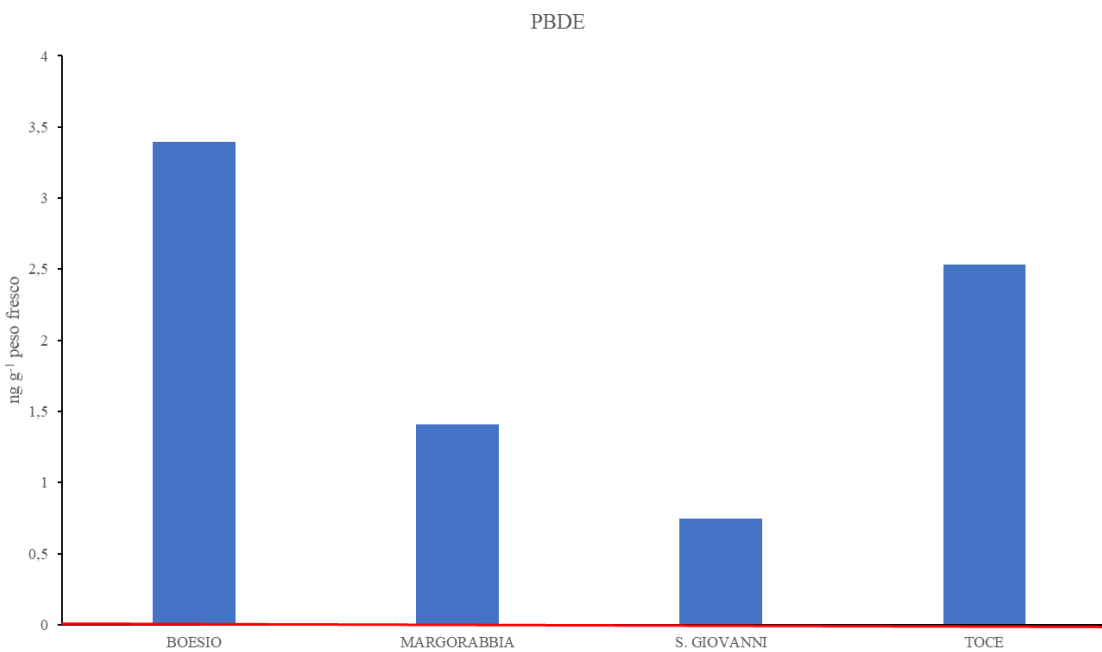


Figura 4.24 Concentrazione totale dei PBDE espressa come peso fresco negli esemplari di trota fario campionati nei tributari. In rosso: standard di qualità ambientale per il biota (SQA_{biota})

Andamento temporale della contaminazione

I livelli di POPs misurati nel 2019 sono stati comparati con quelli rilevati nelle campagne di monitoraggio relative agli anni 2017 e 2018 nei fiumi Boesio e Toce, poiché solo per questi due tributari avevamo a disposizione i dati completi per le due specie considerate. Per quanto concerne il fiume Boesio, il trend temporale dei DDx in entrambe le specie mostra una riduzione marcata della contaminazione nel 2018 rispetto al 2017, mentre i livelli sembrano rialzarsi nel 2019, soprattutto negli esemplari di cavedano (Fig. 4.25). In entrambe le specie, nel 2019 si osserva una percentuale non trascurabile di o,p'-DDD, probabilmente legata all'immissione nel tributario di materiale sedimentario legato ad eventi alluvionali.

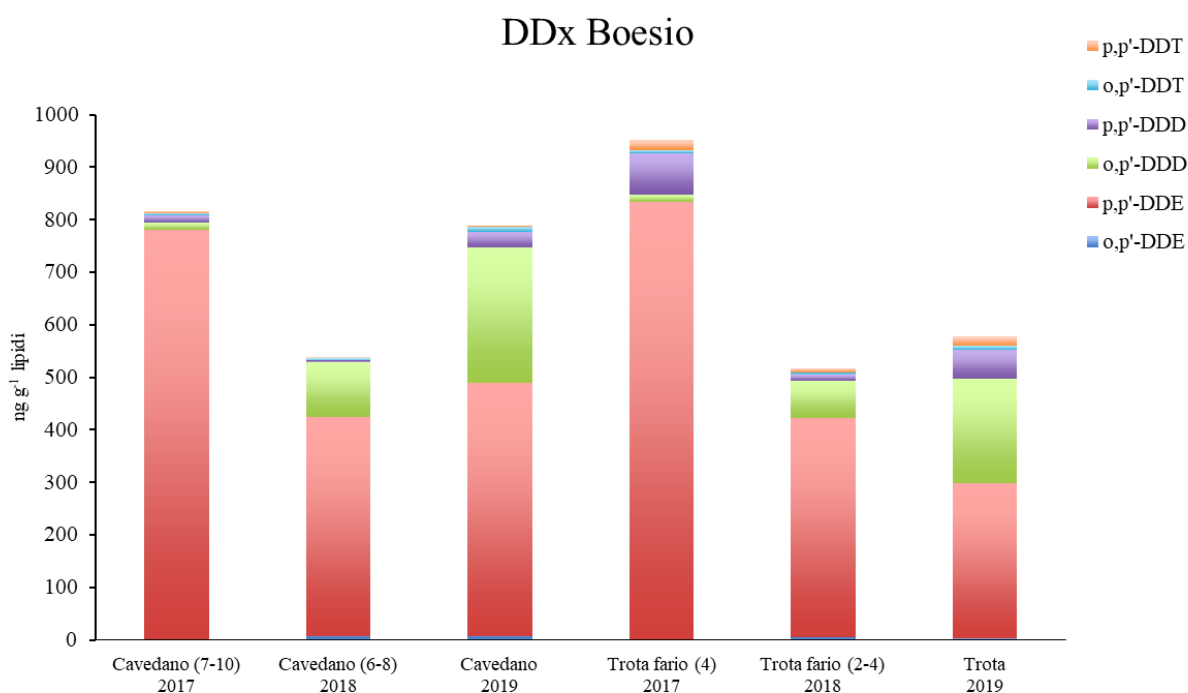


Fig. 4.25 trend temporale dei DDx negli esemplari di cavedano e trota fario campionati nel Boesio.

Per quanto concerne l'andamento temporale dei PCB (Fig. 4.26), si osserva un generale decremento del carico di questi contaminanti nei tre anni, ad eccezione del valore riscontrato nel 2018 per gli esemplari di trota fario, che comunque non si discosta in modo rilevante rispetto all'anno precedente. Il profilo di contaminazione risulta omogeneo tra le due specie e nei tre anni di monitoraggio suggerendo che non ci sia stato un input puntiforme di questi contaminanti nel triennio considerato, ma che negli organismi siano state rilevate tracce di contaminazione diffusa e persistente nel tributario.

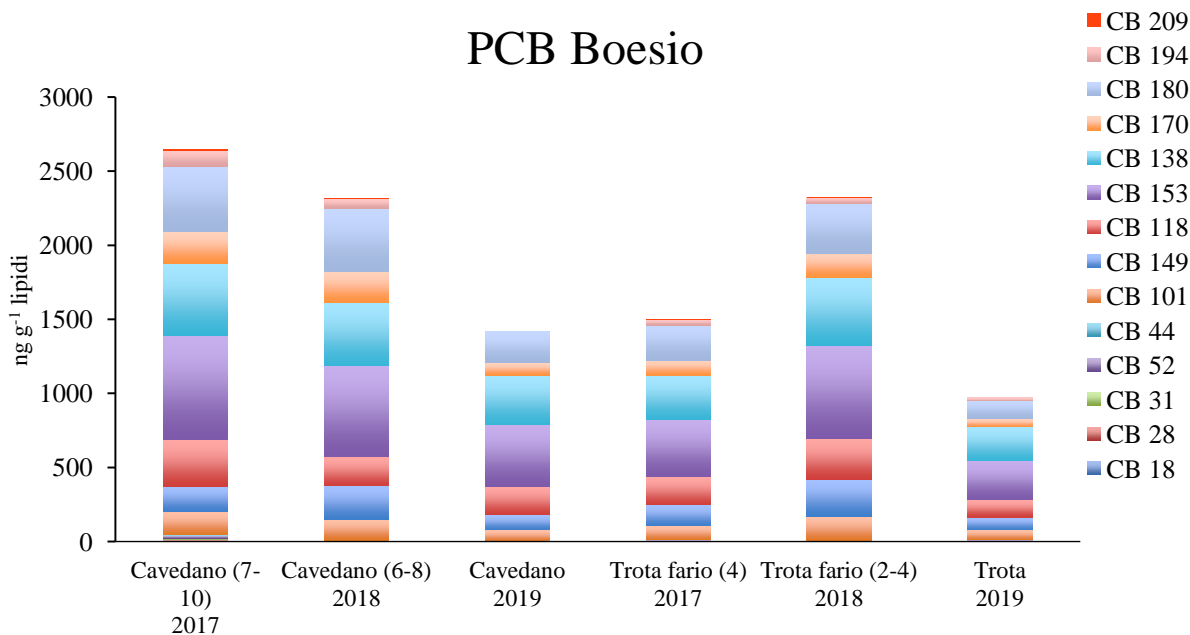


Fig. 4.26 trend temporale dei PCB negli esemplari di cavedano e trota fario campionati nel Boesio.

Infine, per quanto concerne l'andamento temporale dei PBDE nel fiume Boesio si può osservare una decisa riduzione dei livelli di questi contaminanti negli anni 2018-2019 rispetto al 2017 (Fig. 4.27). Tuttavia l'innalzamento dei livelli di PBDE rilevato nel 2019 rispetto al 2018 in entrambe le specie suggerisce che sia avvenuta in quest'ultimo anno una nuova immissione di questi contaminanti nel fiume, probabilmente in seguito agli eventi alluvionali che si sono registrati nell'area prima del campionamento. Ciò sottolinea ulteriormente la validità del monitoraggio nel corso degli anni a venire.

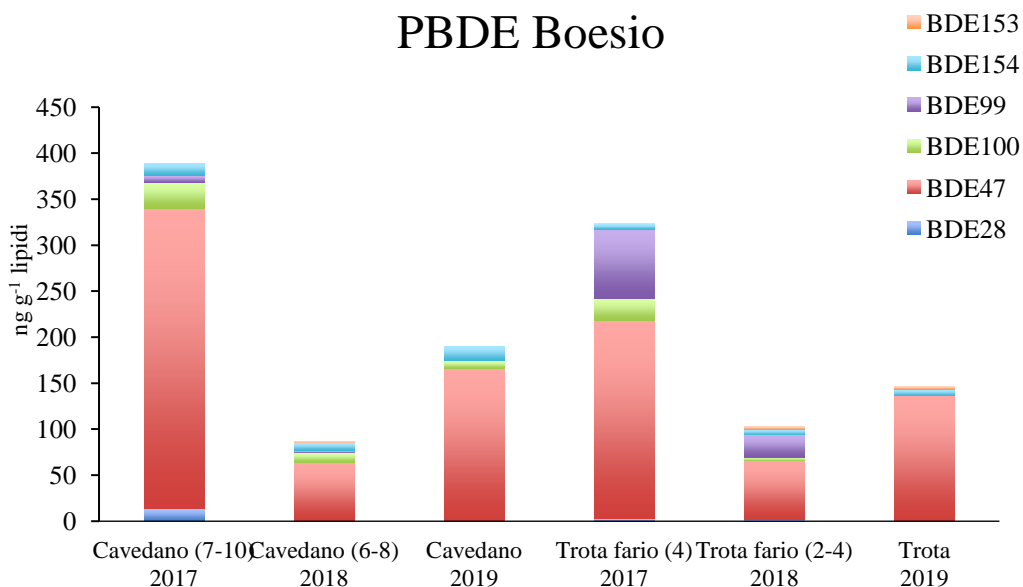


Fig. 4.27 trend temporale dei PBDE negli esemplari di cavedano e trota fario campionati nel Boesio.

L'andamento temporale della contaminazione degli esemplari prelevati nel fiume Toce (Fig. 4.28) mostra in modo evidente come la criticità rilevata a carico dei DDx nell'anno 2017 si sia ridimensionata in modo rilevante negli anni successivi. I livelli di DDx misurati in entrambe le specie sono calati nel 2018-2019 di circa 10 volte rispetto al 2017. Anche il profilo di contaminazione mostra che nei campioni più recenti non è stato più rilevato l'o,p'-DDT, che invece era stato riscontrato in percentuale rilevante rispetto al totale dei DDx in entrambe le specie nel 2017.

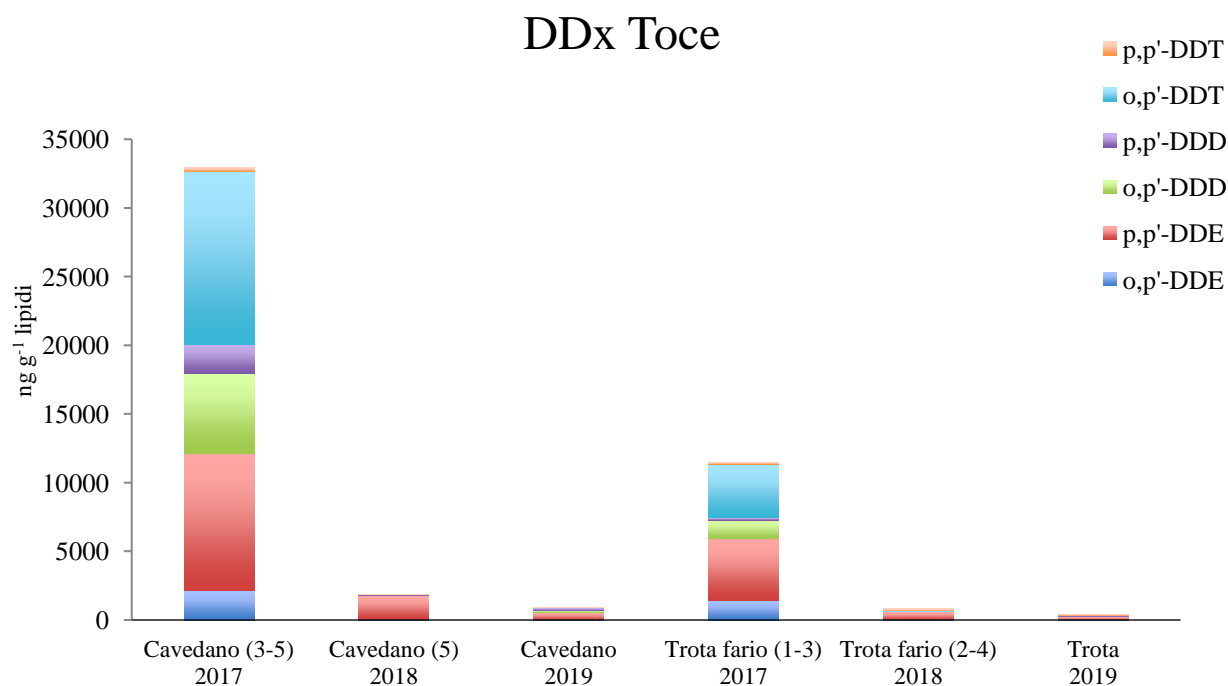


Fig. 4.28 trend temporale dei DDx negli esemplari di cavedano e trota fario campionati nel Toce.

Per quanto riguarda l'accumulo di PCB nel Toce i livelli sono risultati abbastanza omogenei nei tre anni in entrambe le specie, ad eccezione di un picco rilevato negli esemplari di cavedano nel 2018 (Fig. 4.29). Il profilo di contaminazione è risultato piuttosto omogeneo in tutti i campioni considerati. Così come osservato per il Boesio i dati sembrano suggerire che per questa classe di contaminanti ci sia una condizione di contaminazione diffusa e non si sia verificato un input nell'anno 2019.

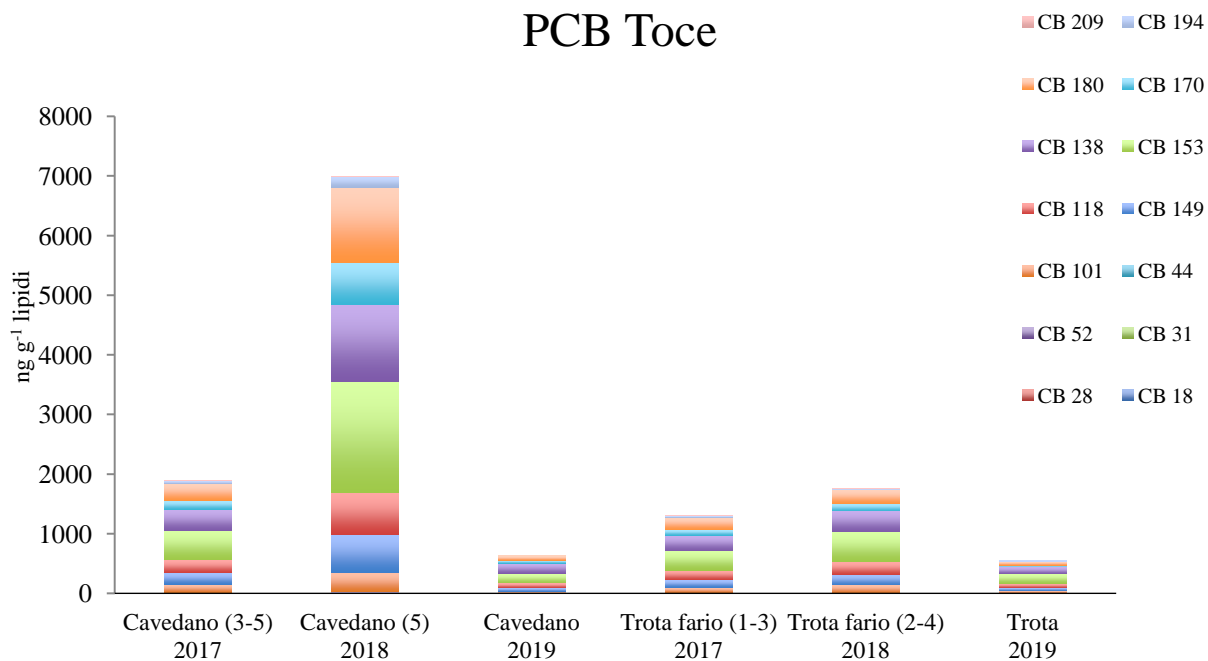


Fig. 4.29 trend temporale dei PCB negli esemplari di cavedano e trota fario campionati nel Toce.

I livelli di PBDE misurati nei tre anni nel fiume Toce mostrano un calo evidente di questa classe di contaminanti in entrambe le specie, particolarmente accentuato nella trota fario (Fig. 4.30). Saranno estremamente importanti i campionamenti negli anni successivi al fine di confermare il trend di diminuzione di questo anno.

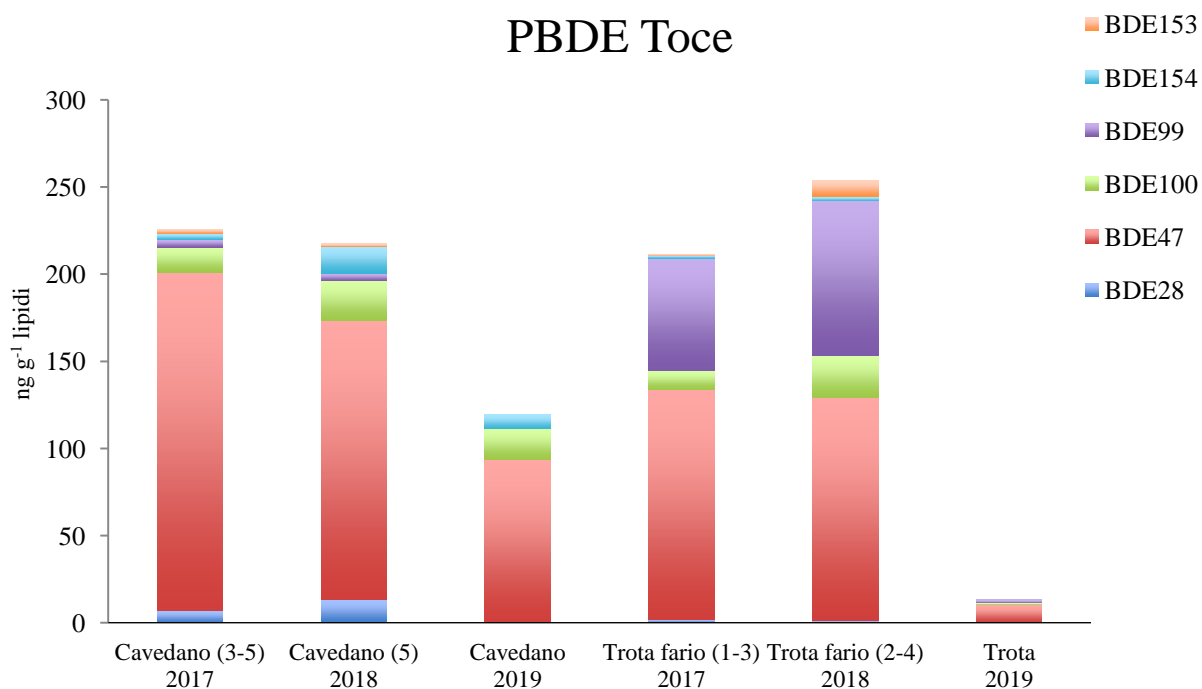


Fig. 4.30 trend temporale dei PBDE negli esemplari di cavedano e trota fario campionati nel Toce.

Considerazioni generali

In generale, i risultati ottenuti in questa campagna di campionamento della fauna ittica residente nei tributari del Verbano hanno evidenziato uno stato di contaminazione abbastanza omogeneo ed entro i limiti imposti dalla normativa italiana per caratterizzare lo stato di qualità dei corpi idrici, ad eccezione dei PBDE, che presentano un SQA_{biota} più basso rispetto a quanto previsto per gli altri contaminanti. I dati suggeriscono che i tributari monitorati, in particolare il fiume Toce e il Boesio possano contribuire significativamente alla contaminazione del bacino lacustre a causa della presenza lungo l'asta fluviale di sorgenti per i contaminanti prioritari analizzati, principalmente di natura industriale. I fiumi Margorabbia e San Giovanni, come atteso, sembrano, invece, caratterizzati da un basso livello di contaminazione.

Confrontando i livelli di contaminazione misurati nell'anno 2019 rispetto a quelli dei due anni precedenti, si registra un abbassamento della contaminazione da DDX, più evidente nel F. Toce rispetto agli altri tributari. Per quanto riguarda i PCB i valori si sono mantenuti abbastanza omogenei nei due anni in tutti i tributari monitorati. Un trend simile a quanto osservato per i DDX è stato osservato anche per i PBDE, i cui livelli sono diminuiti rispetto ai due anni precedenti. Per quanto concerne invece il fiume Boesio si è osservato un trend in aumento sia per i DDX che per i PBDE, che suggerisce un possibile input avvenuto nel corso dell'anno per questo tributario, sottolineando l'importanza di proseguire con il monitoraggio di entrambe le specie negli anni successivi.

Il quadro generale di contaminazione rilevato conferma, infine, la validità della scelta di campionare come specie bioindicatrici il cavedano e la trota fario, poiché entrambe rappresentano in modo adeguato lo stato di contaminazione dei fiumi campionati.

Misura delle concentrazioni di mercurio totale nei pesci dei tributari

Sono state analizzate le concentrazioni di mercurio totale in due specie di pesci, trota fario e cavedano, prelevati in quattro tributari del Lago Maggiore: Boesio, Margorabbia, Toce e San Giovanni. L'analisi è stata condotta con le stesse modalità descritte nel capitolo 7 (mercurio nei pesci del lago). L'accuratezza delle misure è stata verificata mediante analisi del materiale certificato BCR278 *Mussel tissue*, del *Bureau Communautaire de Référence*, per il quale si è ottenuto un recupero medio del 92% rispetto al valore certificato. Il coefficiente di variazione percentuale è risultato inferiore al 5%.

I risultati evidenziano concentrazioni di mercurio significativamente più basse nella trota fario (0,026-0,088 mg Hg kg⁻¹ p.f.) rispetto a quelle nel cavedano (0,148-0,508 mg Hg kg⁻¹ p.f.) (Fig. 4.31). Queste differenze possono essere imputabili all'età degli organismi analizzati, che è di 1-4 anni nella trota e 7-11 nel cavedano. Tuttavia, i risultati riportati in CIP AIS (2018) mostravano che, a parità di età, il cavedano mostra generalmente valori di mercurio molto più elevati rispetto alla trota. Questa maggiore capacità di bioaccumulo può dipendere dalla dieta, dall'ecologia o dall'*home range* degli organismi, tuttavia, i valori bassi nella trota potrebbero anche essere attribuibili a possibili ripopolamenti. Questo potrebbe spiegare la bassa concentrazione riscontrata nelle trote campionate nel Toce rispetto a quelle di altri tributari.

Per quanto riguarda un confronto tra i vari tributari, il Toce si conferma come il più contaminato da mercurio, come evidenziato soprattutto dalla concentrazione nel cavedano (0,509 mg Hg kg⁻¹ p.f.) ma anche i valori riscontrati nel Boesio, in particolare, evidenziano la presenza di sorgenti attive di contaminazione, come discusso nel capitolo 6 (mercurio e metalli nei tributari).

Tutti i campioni analizzati presentano valori superiori allo Standard di Qualità per il biota secondo la normativa europea 2013/39/UE e italiana (D. Lgs. 172/2015), pari a 0,02 mg Hg kg⁻¹ p.f.. Il superamento, tuttavia, è stato osservato anche in numerosi corpi idrici europei non interessati da contaminazione diretta, in quanto il mercurio ha la capacità di diffondersi ad ampio raggio per via atmosferica, entrando poi nelle catene trofiche (Lepom et al., 2012; EEA, 2018). L'analisi di pesci prelevati da tributari del lago esenti da sorgenti attive di contaminazione da mercurio (ad esempio il Margorabbia) potrebbe aiutare a capire quali valori possono essere considerati un *background* determinato da contaminazione diffusa nel bacino e quali invece possano essere imputabili a singole situazioni di compromissione della qualità chimica delle acque. In particolare, i cavedani del Toce superano la soglia di 25 volte, confermando l'elevata biodisponibilità del mercurio in questo tributario.

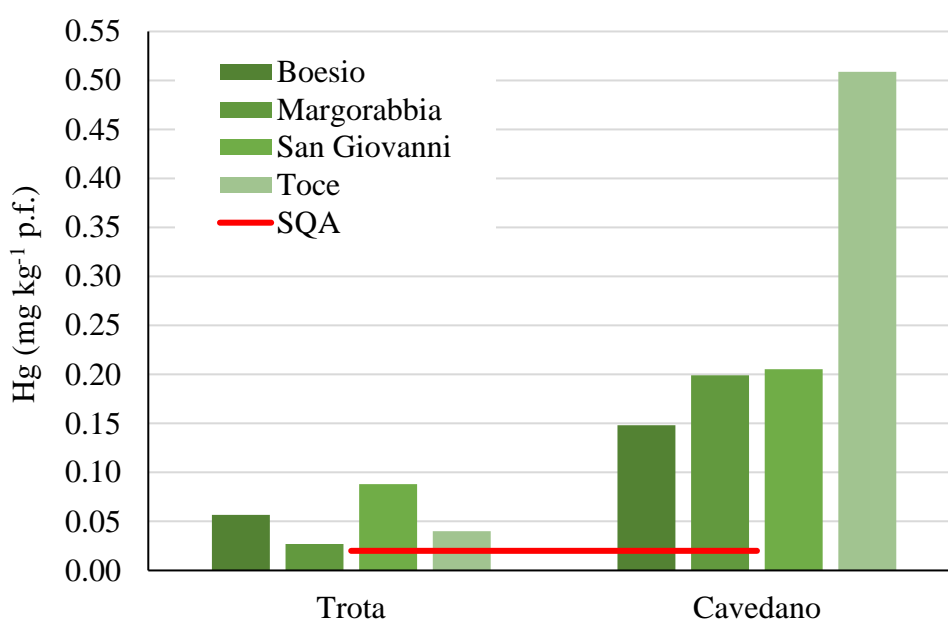


Fig. 4.31. Concentrazioni di mercurio in due specie ittiche dei tributari del Lago Maggiore campionate nel 2019. I risultati sono espressi su peso fresco. La linea rossa rappresenta lo Standard di Qualità Ambientale (SQA) per il biota secondo la normativa europea 2013/39/UE e italiana (D. Lgs. 172/2015), pari a 0,02 mg Hg kg⁻¹ p.f.

Bibliografia

- CIP AIS. 2018. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2017
- EEA, European Environmental Agency, 2018. European waters. Assessment of status and pressures 2018. EEA Report No 7/2018
- Lepom P., Irmer U., Wellnitz J., 2012. Mercury levels and trends (1993–2009) in bream (*Abramis brama* L.) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from German surface waters. Chemosphere 86: 202-211.

5. INDAGINI SUL FIUME TOCE: SEDIMENTI, BIOACCUMULO

Laura Marziali, Alfredo Schiavon, Lucia Valsecchi, Niccolò Pirola, Claudio Roscioli, Sara Mattiuzzi, Erica Valenti, Licia Guzzella, CNR-IRSA, Brugherio (MB)

Campionamenti sedimenti

Il Fiume Toce è stato oggetto di indagine per approfondire il ruolo di questo corso d'acqua come sorgente di contaminazione nel veicolare al Lago Maggiore contaminanti quali il DDT e i suoi metaboliti e il mercurio (Hg).

Sono stati indagati alcuni siti, già individuati nel 2013, lungo il tratto terminale del Fiume Toce compreso tra Domodossola e la foce del Fiume. Le aree selezionate corrispondono a tratti di fiume in cui è massima la sedimentazione e dove si accumula il materiale più fine e ricco di inquinanti.

Sono state scelte cinque stazioni di campionamento circa equidistanti tra loro, le stesse in cui è stato campionato il benthos nativo nell'ambito del programma CIP AIS 2016-2018 (CIP AIS, 2017, 2018, 2019).

In particolare, Domo e Prata si trovano a monte del sito industriale di Pieve Vergonte, sorgente della contaminazione, mentre le altre tre (Bosco Tenso, Premosello, Ornavasso) sono a valle (Fig. 5.1). La stazione di Domo viene considerata come controllo negativo, in quanto le precedenti indagini CIP AIS (CIP AIS, 2015, 2019) hanno evidenziato che è esente dalla contaminazione da mercurio e DDx. Nella tabella seguente (Tab. 5.1) sono riportate le coordinate geografiche e la distanza delle stazioni di campionamento dal sito industriale di Pieve Vergonte.

I campionamenti sono stati effettuati in febbraio e ottobre 2019.

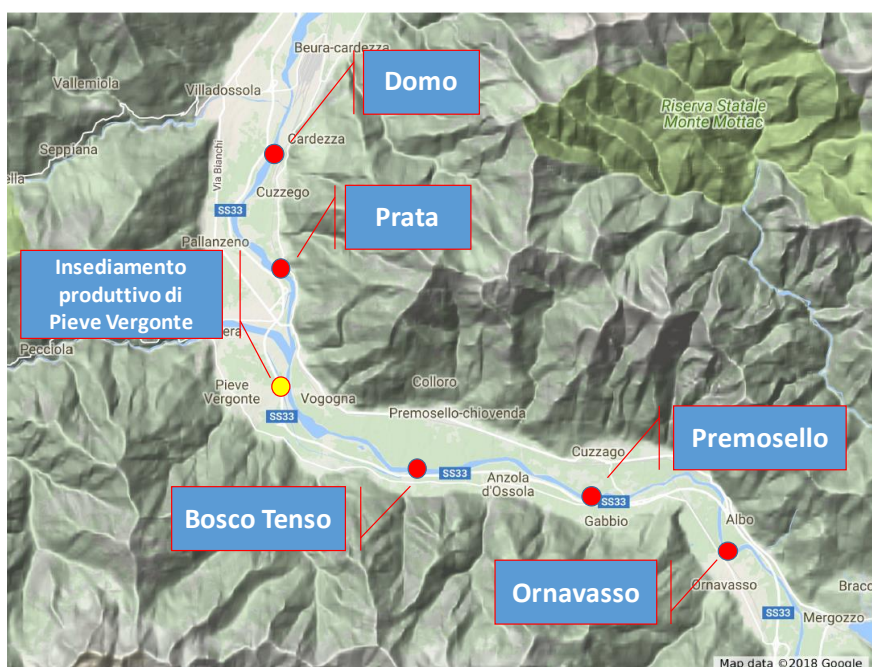


Fig. 5.1. Localizzazione delle stazioni di campionamento e dell'insediamento produttivo di Pieve Vergonte lungo il Fiume Toce.

Tab. 5.1. Stazioni di campionamento: coordinate geografiche e distanza dal sito industriale di Pieve Vergonte (il segno meno indica le stazioni a monte del sito).

Descrizione stazione	Coordinate geografiche sistema cartografico UTM32 Nord, Datum WGS84		Distanza dalla fonte di inquinamento (km)
Domo	5100276,03	444075,93	-8,9
Prata	5098012,01	444370,99	-3,4
Bosco Tenso	5093412,06	447825,34	3,7
Premosello	5092796,91	452230,66	8,7
Ornavasso	5091494,92	454982,83	13,1

Misura delle concentrazioni di DDx nei sedimenti

Il trattamento del sedimento per l'analisi dei DDx è stato lo stesso di quello riportato nel capitolo 6 (Sedimenti dei tributari).

I risultati delle analisi del sedimento fine (< 63 μm) del Fiume Toce per i DDx sono riportate in figura 5.2; sono rappresentate le concentrazioni totali e i contributi dei singoli composti ottenuti per i campioni di Febbraio ed Ottobre 2019 nelle stazioni considerate. Le colonne indicano i valori totali espressi in ng g^{-1} p.s. e con l'indicazione dei composti presenti, la linea in rosso rappresenta le concentrazioni totali normalizzate sul contenuto di carbonio organico del sedimento (ng g^{-1} C.O.).

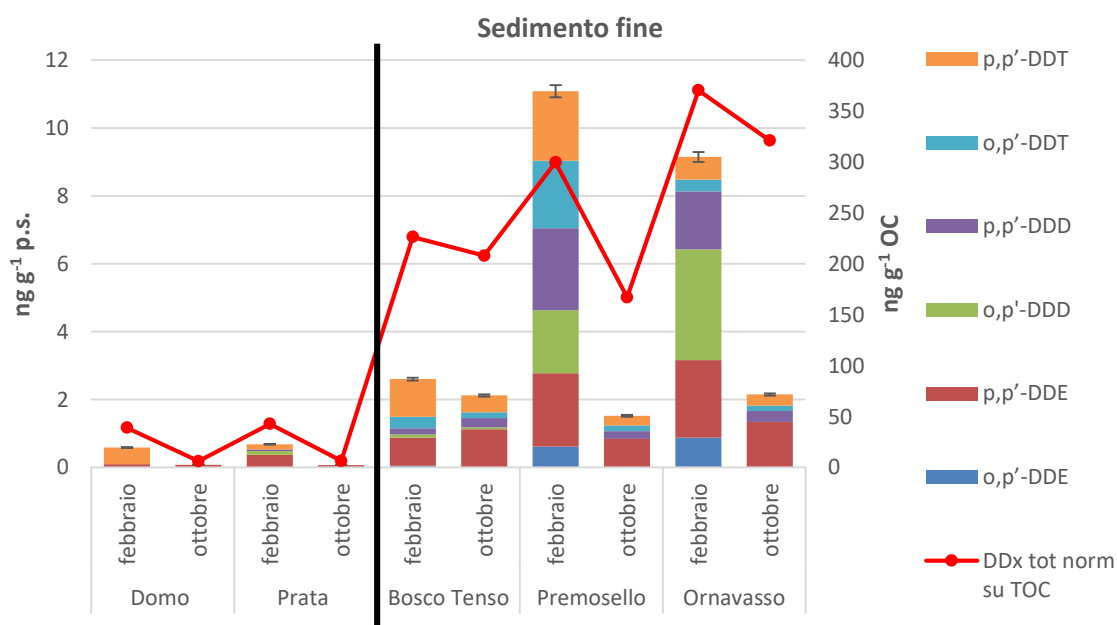


Fig. 5.2 - Concentrazioni di DDx nei sedimenti delle stazioni del Fiume Toce considerate a Febbraio ed Ottobre 2019 (esprese in ng g^{-1} p.s. e in ng g^{-1} OC). La linea nera separa le stazioni a monte da quelle a valle del sito produttivo.

Le stazioni di Domo e Prata, site a monte del polo industriale di Pieve Vergonte, sono state caratterizzate da concentrazioni molto contenute di DDx ($< 0,5 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.s.}$) e rappresentano siti di riferimento poco contaminati rispetto ai siti a valle. Le tre stazioni di valle (Bosco Tenso, Premosello e Ornavasso) sono risultate maggiormente contaminate rispetto alle due stazioni di monte con una media molto variabile in quanto i livelli nei campioni di Febbraio 2019 sono dieci volte maggiori rispetto a quelle di Ottobre per Premosello e di circa 5 volte per Ornavasso. I livelli a Bosco Tenso sono invece più bassi e simili tra i due periodi, evidenziando come la sedimentazione del particolato contaminato avviene principalmente dopo Bosco Tenso, quando la corrente d'acqua diminuisce ed è favorita la sedimentazione.

Il profilo dei DDx nei siti a valle di Premosello e Ornavasso presenta nei campioni in maggiori concentrazioni, come a Febbraio 2019, con una prevalenza di o,p'- + p,p'-DDT e o,p'- + p,p'-DDD con percentuali molto simili comprese pari tra il 36 e il 38% del totale per Premosello, mentre ad Ornavasso è prevalente il o,p'- + p,p'-DDD con il 54% sul totale DDx.

Per quanto riguarda i valori espressi come Q-PEC per DDx e metaboliti per Premosello e Ornavasso a Febbraio 2019, quando le concentrazioni erano massime, questi sono pari a 2,2 e 2,4 unità rispettivamente, evidenziando un reale rischio di tossicità per il macrobenthos e del tutto simili ai dati ottenuti per il Toce foce del 2019, osservati nel capitolo tributari.

Misura delle concentrazioni di mercurio (Hg) nei sedimenti

L'indagine ha riguardato gli stessi campioni utilizzati per l'analisi dei contaminanti organici. I campioni liofilizzati sono stati omogeneizzati manualmente o tramite micromulino a biglie. L'analisi per il mercurio totale è stata effettuata direttamente su aliquote di campioni utilizzando l'analizzatore di mercurio AMA254 (*Automated Mercury Analyzer, FKV*). L'accuratezza è stata verificata mediante analisi del materiale certificato BCR-320R *Channel sediment* dell'*Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, European Commission*, ottenendo un recupero medio del 97%. I campioni sono stati analizzati in triplo, accettando coefficienti di variazione $\leq 5\%$.

Come per i DDx, le concentrazioni di mercurio totale mostrano un andamento generalmente crescente da monte verso valle, a partire dai valori più bassi, registrati a Domo (0,016-0,020 mg Hg $\text{kg}^{-1} \text{ p.s.}$), fino a concentrazioni significativamente più elevate a valle dell'insediamento produttivo, con un massimo a Premosello in febbraio (0,188 mg Hg $\text{kg}^{-1} \text{ p.s.}$), che supera il valore di cb-TEC secondo MacDonald et al. (2000), ossia la soglia al di sotto della quale non sono attesi effetti avversi sugli organismi acquatici (Fig. 5.3). Concentrazioni superiori al valore di fondo sono state riscontrate in tutti i siti a valle dell'insediamento produttivo. I valori misurati nei campioni di febbraio sono risultati generalmente più elevati rispetto a quelli di ottobre, in analogia con quanto rilevato per i DDx.

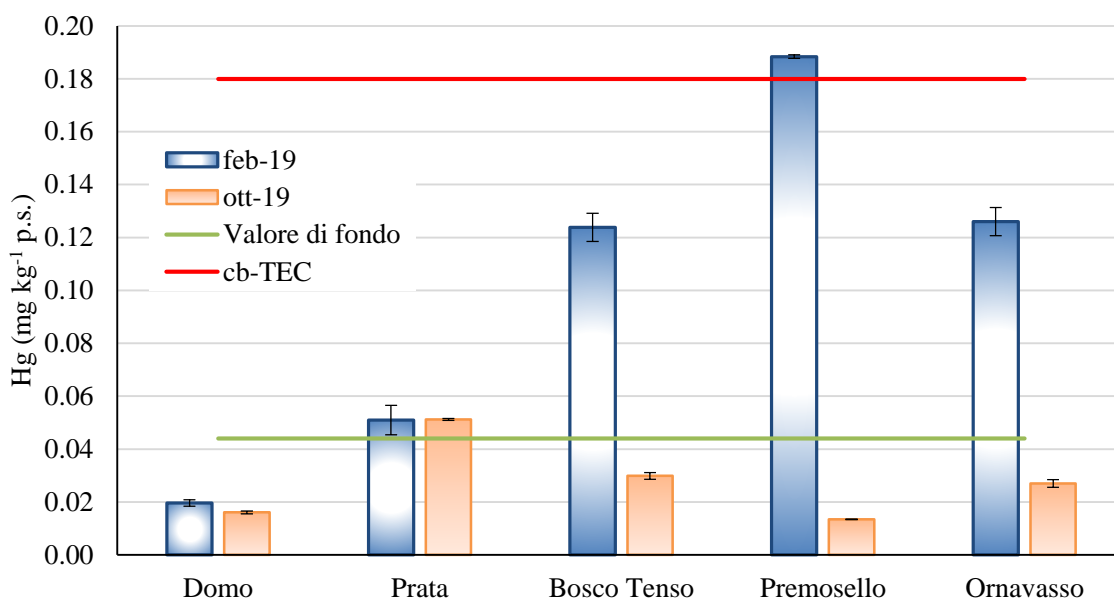


Fig. 5.3- Concentrazioni di mercurio totale nei sedimenti delle varie stazioni del Fiume Toce campionati a febbraio e ottobre 2019. Le stazioni sono ordinate da monte verso valle. La linea rossa rappresenta il valore di cb-TEC (MacDonald et al., 2000), pari a $0,18 \text{ mg Hg kg}^{-1} \text{ p.s.}$; la linea verde rappresenta il valore di fondo stimato da Vignati e Guilizzoni (2011), pari a $0,044 \pm 0,026 \text{ mg Hg kg}^{-1} \text{ p.s.}$

Campionamento del macrobenthos indigeno del Fiume Toce

L'analisi del bioaccumulo di contaminanti negli organismi acquatici nell'ambito del presente programma di ricerca ha avuto come obiettivo di valutare il possibile trasferimento di queste specie chimiche dal comparto abiotico (sedimenti) a quello biotico. Il campionamento degli organismi bentonici è stato effettuato in Febbraio e Ottobre 2019 in 4-5 stazioni del Toce (Domo, Prata, Bosco Tenso, Premosello e Ornavasso). Per la raccolta è stato impiegato un metodo di tipo qualitativo finalizzato ad ottenere biomassa sufficiente per l'analisi chimica degli organismi. I prelievi sono stati effettuati in aree deposizionali (le stesse in cui è stato prelevato il sedimento) mediante retini immanicati. Gli organismi raccolti sono stati smistati nei principali taxa (mediante indagine visiva) direttamente in campo e lasciati spurgare per 6 ore in acqua di fiume, prima del congelamento a -20°C in freezer da campo. I taxa considerati sono stati: Crostacei Gammaridae, Efemerotteri Baetidae e Heptageniidae, Ditteri (Tipulidae, Tabanidae e Limoniidae), già descritti in CIP AIS (2015). I campioni sono stati successivamente liofilizzati e omogeneizzati mediante micromulino a biglie.

Analisi di DDx in organismi bentonici nativi

Dopo la liofilizzazione e l'omogeneizzazione, i campioni sono stati estratti partendo da una quantità di campione pari a $0,2\text{-}0,5 \text{ g}$; il trattamento dei campioni è stato identico a quanto riportato nel capitolo 7 "Indagini sul comparto ittico" per quanto riguarda la determinazione dei DDx e del contenuto lipidico.

La validazione del metodo analitico e il controllo di qualità sono stati effettuati analizzando bianchi e aliquote di materiale certificato, NIST-2974a "Freeze-Dried Mussel Tissue" (specie *Mytilus edulis*), fornito dal National Institute of Standards and Technology (USA). I composti indagati sono stati: p,p'-DDE, p,p'-DDD e p,p'-DDT. Le concentrazioni medie ottenute per i DDx dalle repliche confrontate con il valore di riferimento sono mostrate in Figura 5.4. I valori ottenuti rientravano in

un intervallo di concentrazioni pari a $\pm 30\%$ rispetto ai valori certificati, tranne per quelle del p,p'-DDT, probabilmente a causa dell'elevata volatilità di questo composto che viene parzialmente perso durante le fasi di purificazione del campione stesso.

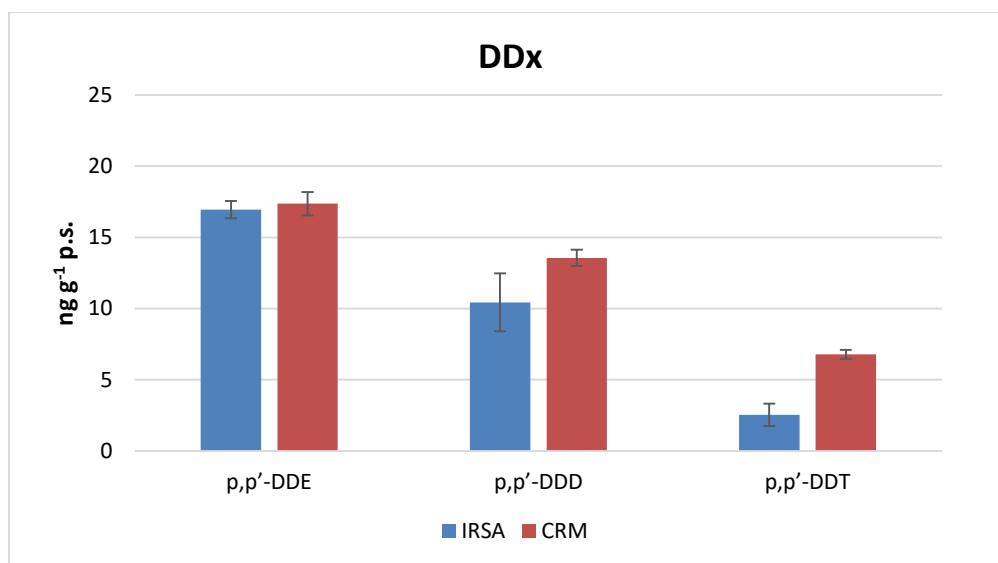
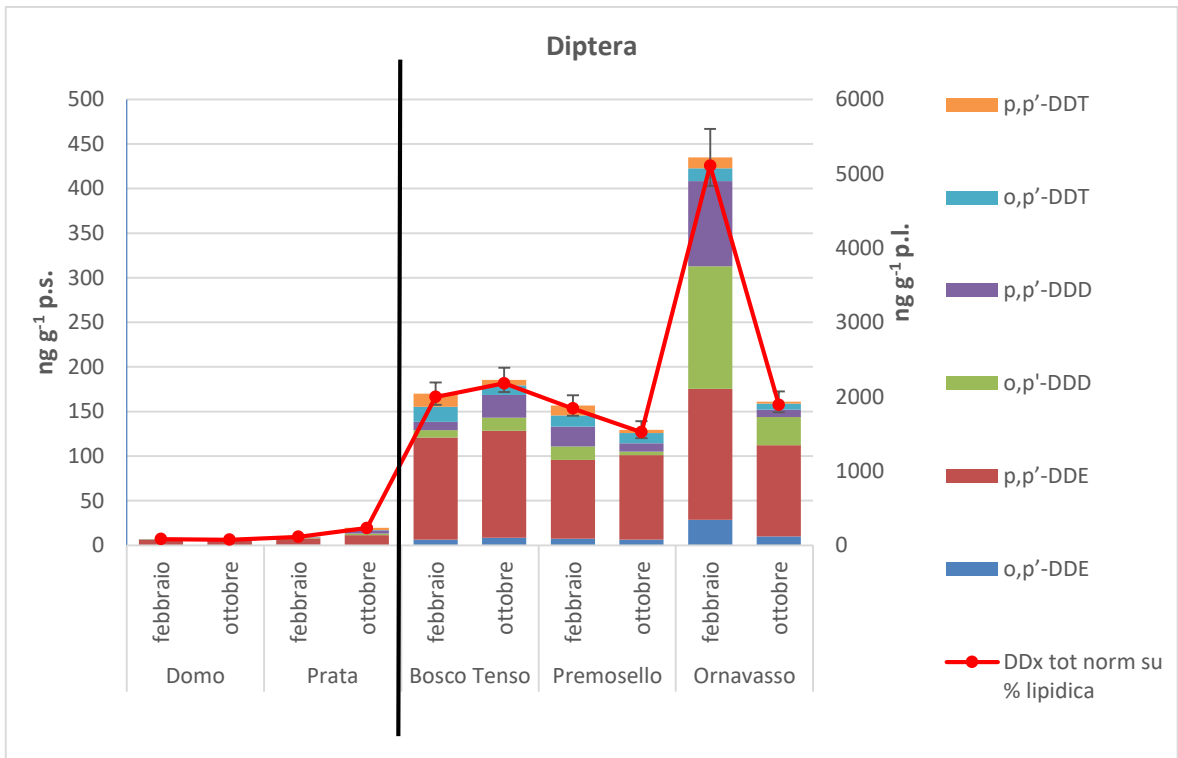
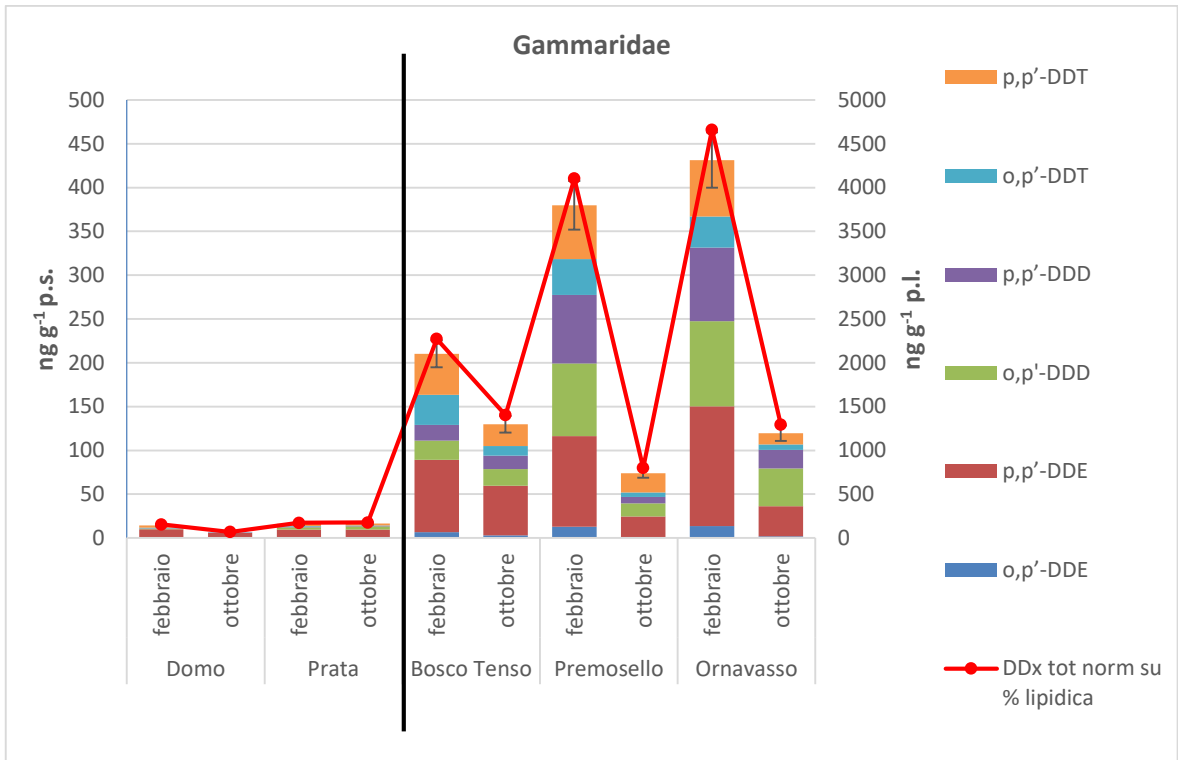


Fig. 5.4 – Risultati del materiale di riferimento NIST-2974a "Freeze-Dried Mussel Tissue" (specie *Mytilus edulis*),

La figura 5.5 mostra le concentrazioni totali di DDX e i contributi dei singoli composti per il macrobenthos per le stazioni del Toce, in entrambi i campionamenti e ordinate secondo un gradiente monte-valle. Le concentrazioni degli inquinanti analizzati aumentano significativamente da monte a valle di un fattore da dieci a venti e le differenze tra siti sono quindi significative. I taxa che bioaccumulano maggiormente, come già avvenuto in passato dal 2016 al 2018, sono i Gammaridi e i Ditteri. I Gammaridi hanno picchi di 378,8 ng g⁻¹ p.s. a Premosello in Febbraio e di 431,37 ng g⁻¹ p.s. a Ornavasso nello stesso mese. I Ditteri raggiungono concentrazioni di DDX totale ad Ornavasso di 435,22 ng g⁻¹ p.s. a Febbraio 2019. Una minor capacità di bioaccumulo, a parità di massa considerata, è stata osservata per Heptageniidi e Baetidi.

La distribuzione percentuale media dei vari composti e metaboliti del DDT è piuttosto simile nelle stazioni a valle e a monte del sito industriale; si è osservata, in entrambi i casi, una netta prevalenza del p,p'-DDE (40-80% del totale) rispetto agli altri composti per Ditteri, Heptageniidi e Baetidi, come avviene principalmente in tutte le matrici biologiche del Lago Maggiore. Il DDE, infatti, è un metabolita che deriva dalla degradazione del DDT in condizioni aerobiche e/o dal metabolismo degli organismi acquatici (pesci, fitoplancton, macrobenthos, ecc.) (Singh et al., 1999) ed è il composto che presenta la maggiore stabilità temporale e tempi di accumulo più rapidi nel tessuto lipidico. Tuttavia, nei Gammaridi e nei Ditteri di Febbraio, nel caso dei picchi di concentrazione, i metaboliti presenti si ripartiscono tra p,p'-DDE, o,p'- e p,p'-DDD in quantità simili.



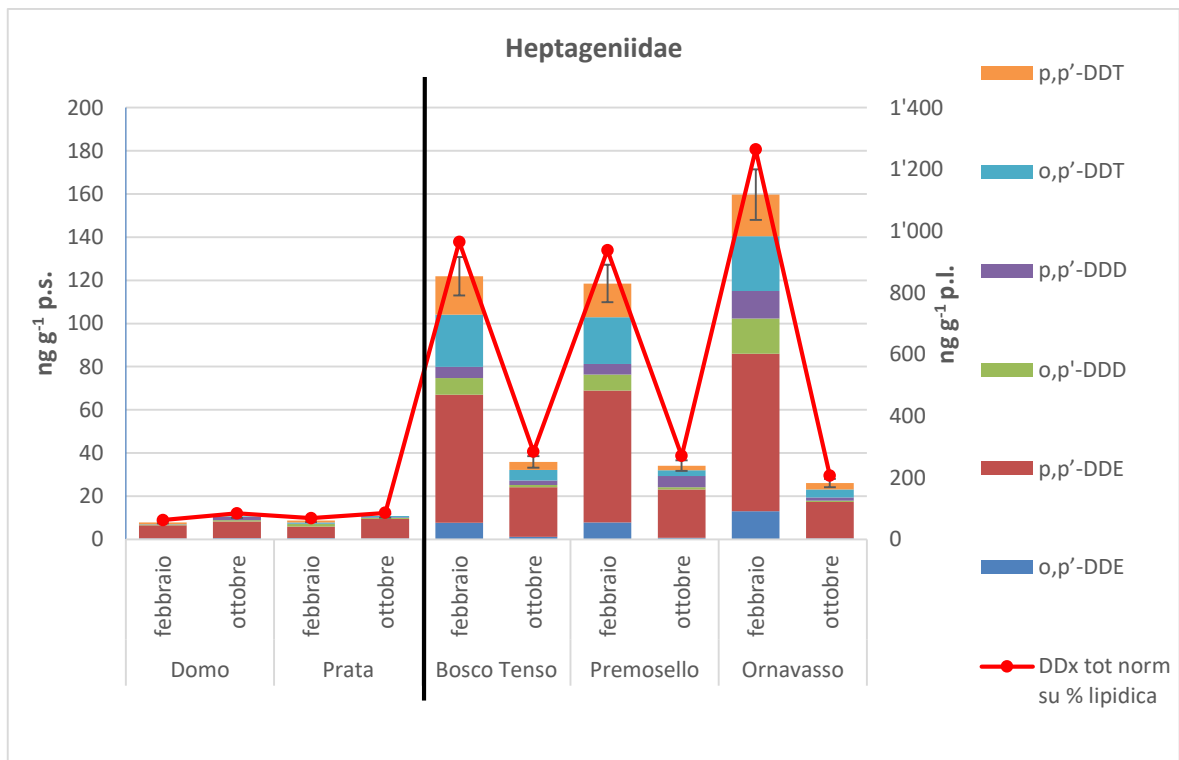
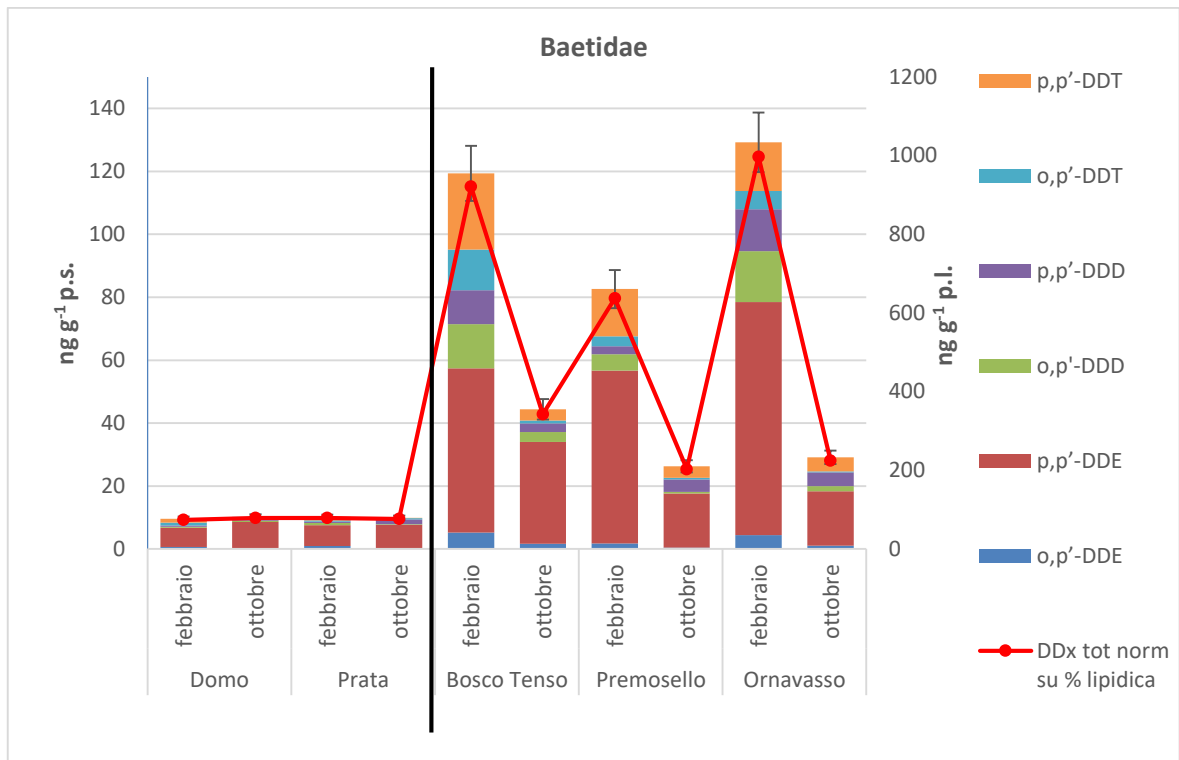


Fig. 5.5 – Concentrazioni di DDx (ng g^{-1} p.s.) nei diversi taxa di macrobenthos, raccolti nelle cinque stazioni del Fiume Toce considerate, a Febbraio ed Ottobre 2019. La linea rossa rappresenta le concentrazioni normalizzate sul peso dei lipidi. La linea nera separa le stazioni di monte con le altre situate a valle del sito produttivo

La normalizzazione su fase lipidica mostra lo stesso andamento dei dati non normalizzati, essendo la % lipidica pressochè costante da un sito all'altro, ma differente per ogni taxon. Le differenze tra taxa confermano che Ditteri e Gammaridi sono gli organismi più contaminati da DDX, e che quindi il bioaccumulo dipende dalla concentrazione lipidica degli organismi stessi.

È stato ampiamente dimostrato che in molti organismi si possono raggiungere concentrazioni di contaminanti molto più elevate rispetto alla concentrazione di queste sostanze nell'ambiente in cui essi vivono. Gli organismi che bioaccumulano possono essere, quindi, utilizzati come indicatori della contaminazione ambientale (Gobas et al., 2000).

Misura delle concentrazioni di mercurio (Hg) negli organismi

L'analisi del mercurio totale è stata condotta mediante analizzatore AMA254 (*Automated Mercury Analyzer*, FKV). L'accuratezza delle analisi è stata verificata utilizzando come materiale certificato il BCR278 *Mussel tissue*, del *Bureau Communautaire de Référence*, per il quale si è ottenuto un recupero del 104% rispetto al valore certificato. Il coefficiente di variazione delle analisi, effettuate in doppio o in triplo, è risultato $\leq 5\%$.

Le concentrazioni risultano generalmente più alte nei Gammaridae e nei Ditteri e più basse negli Heptageniidae e nei Baetidae (Fig. 5.6). Il sito di Domo presenta valori significativamente più bassi rispetto agli altri siti, confermandosi come sito di riferimento: le concentrazioni riscontrate nel biota in questo sito possono essere considerate come valori di background. Le stazioni presentano generalmente un gradiente crescente di concentrazione verso valle, in analogia con le concentrazioni nei sedimenti, con picchi a Bosco Tenso, ossia nel sito immediatamente a valle della sorgente primaria di contaminazione. Inoltre si osserva tendenzialmente una maggiore contaminazione in febbraio rispetto a ottobre, in linea con le concentrazioni nei sedimenti. I valori più elevati si registrano per i Ditteri a Bosco Tenso (0,180-0,200 mg kg⁻¹ p.s.).

Calcolo valori di BSAF per DDX e mercurio

A partire dai risultati delle analisi dei campioni di macrobenthos e di sedimenti, prelevati nelle stesse stazioni, è stato calcolato il valore del BSAF (*Biota Sediment Accumulation Factor*). Questo indice è una misura della biodisponibilità del contaminante per gli invertebrati bentonici. Per i composti organici il BSAF equivale al rapporto tra la concentrazione della sostanza nell'organismo normalizzata sulla frazione lipidica dell'organismo ($C_{B/FL}$) e la concentrazione della sostanza nel sedimento normalizzata sul contenuto del carbonio organico ($C_{S/FOC}$), espresso come segue:

$$BSAF = C_{B/FL} / C_{S/FOC}$$

Per i metalli il BSAF si calcola come rapporto tra la concentrazione del contaminante nell'organismo (C_B) e quella nei sedimenti (C_S):

$$BSAF = C_B / C_S$$

Per il calcolo del BSAF è possibile fare riferimento al Protocollo OECD n. 315 (2008).

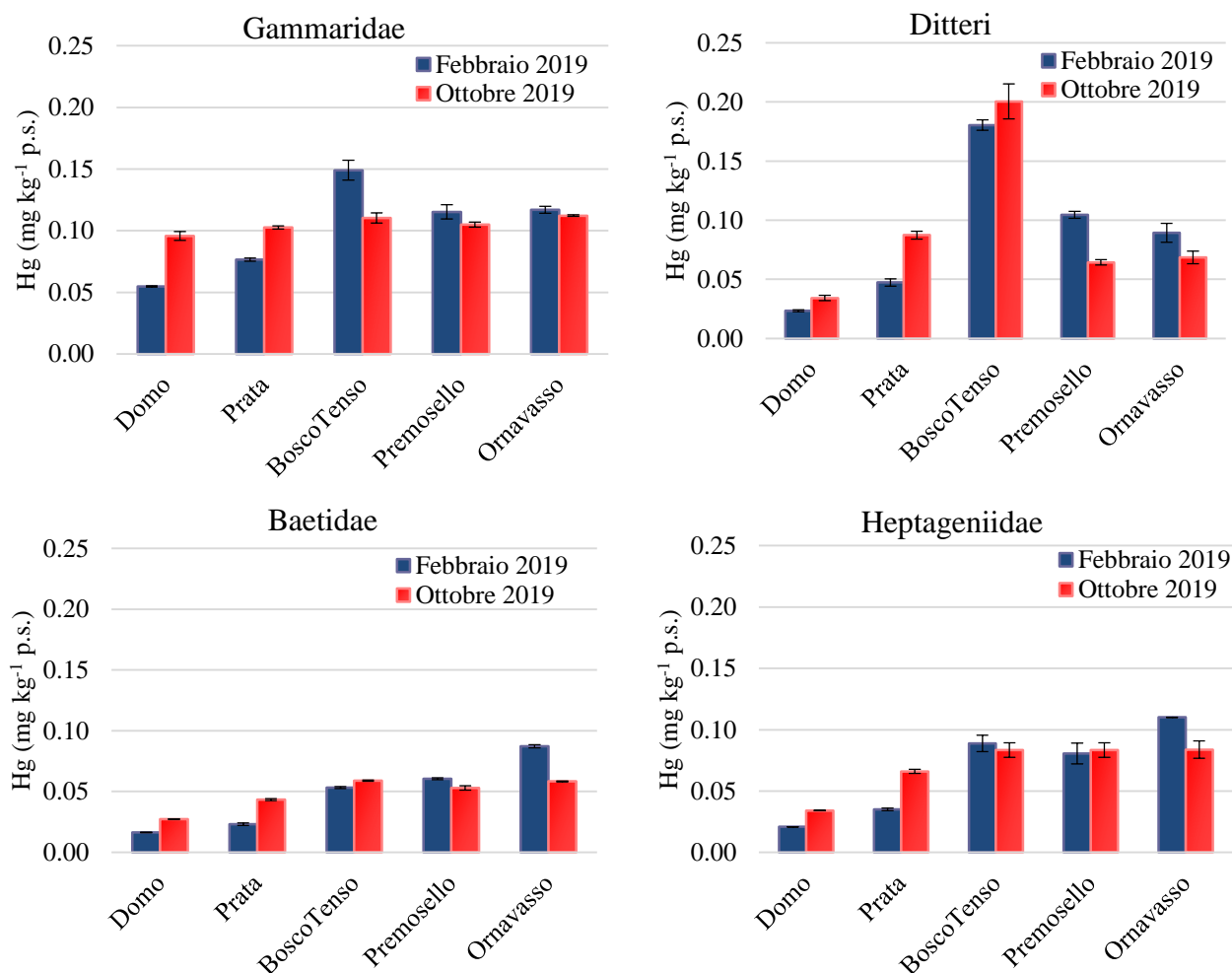


Fig. 5.6. Concentrazione di mercurio totale nei campioni di benthos indigeno prelevati in 5 stazioni del fiume Toce a febbraio e ottobre 2019. In blu sono rappresentati i campioni di febbraio mentre quelli in rosso sono relativi a ottobre. siti sono ordinati da monte a valle.

I valori dei BSAF per i diversi DDx (omologhi e metaboliti) calcolati nelle stazioni del Fiume Toce considerate sono riportati in Tabella 5.2 suddivisi per taxa. Va sottolineato, tuttavia, che il campionamento dei sedimenti è stato condotto raccogliendo diversi subcampioni nelle zone di sedimentazione, mentre gli organismi del macrobenthos sono stati campionati in un'area maggiore a monte e valle del sito di campionamento dei sedimenti, quindi è intrinseca una certa variabilità in questo calcolo, anche legata alle basse concentrazioni presenti nei sedimenti soprattutto nel caso degli o,p'-DDE e -DDT.

In generale si è potuto osservare valori di bioaccumulo molto elevati (>10) nei taxa dei Ditteri e dei Gammaridi, soprattutto nelle stazioni di valle a Prata, Bosco Tenso e Ornavasso per p,p'-DDE e o,p'-DDE, mentre sono risultati generalmente inferiori a 10 in Heptageniidi e Baetidi, in buon accordo con quanto riportato per le concentrazioni misurate in questi organismi. Per i Gammaridi sorprendono valori di o,p'- e p,p'-DDT superiori a 10 che confermano il bioaccumulo del composto parentale sull'esoscheletro esterno e non all'interno degli organismi.

In generale l'elevato valore di BSAF dei DDE potrebbe essere legato alla trasformazione biologica del DDT in DDE o DDD che modifica quindi l'originale *fingerprint* presente nei sedimenti.

Tab. 5.2 – Valori di BSAF calcolati per i taxa campionati per i DDx
 (- = non determinati per mancanza di sufficiente campione).

BSAF		GAMMARIDAE					
		o,p'-DDE	p,p'-DDE	o,p'-DDD	p,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT
DOMO	Primavera	-	-	-	-	-	-
	Autunno	-	7,5	9,5	21,5	2,1	1,1
PRATA	Primavera	-	-	-	-	-	-
	Autunno	-	5,0	-	0,6	-	3,2
BOSCO TENSO	Primavera	2,9	9,3	3,3	7,4	13,7	10,0
	Autunno	5,7	8,2	4,6	11,3	3,8	2,6
PREMOSELLO	Primavera	3,9	10,0	6,6	17,7	14,0	14,1
	Autunno	1,9	6,8	5,2	4,3	3,0	4,2
ORNAVASSO	Primavera	5,8	13,2	4,2	5,6	6,3	2,9
	Autunno	3,0	2,8	1,3	2,9	2,5	0,7

BSAF		DITTERI					
		o,p'-DDE	p,p'-DDE	o,p'-DDD	p,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT
DOMO	Primavera	-	-	-	-	-	-
	Autunno	-	3,7	-	1,4	-	0,3
PRATA	Primavera	-	-	-	-	-	-
	Autunno	-	11,6	-	0,6	-	2,0
BOSCO TENSO	Primavera	4,3	22,2	3,8	4,7	7,3	6,1
	Autunno	8,8	29,5	3,4	2,4	2,2	0,5
PREMOSELLO	Primavera	16,9	54,4	9,1	10,5	26,0	9,8
	Autunno	3,4	14,8	0,9	0,8	1,8	0,2
ORNAVASSO	Primavera	5,3	21,6	1,3	2,3	3,0	0,9
	Autunno	12,5	9,1	12,8	3,4	3,0	0,1

BSAF		BAETIDAE					
		o,p'-DDE	p,p'-DDE	o,p'-DDD	p,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT
DOMO	Primavera	-	-	-	-	-	-
	Autunno	-	3,5	7,6	2,1	10,1	0,6
PRATA	Primavera	-	-	-	-	-	-
	Autunno	-	1,9	-	-	-	0,4
BOSCO TENSO	Primavera	2,9	3,2	0,8	0,7	5,1	2,0
	Autunno	1,9	4,0	0,9	1,7	0,9	0,5
PREMOSELLO	Primavera	0,9	3,4	0,6	0,9	1,2	1,0
	Autunno	0,8	4,8	0,5	0,9	0,9	0,7
ORNAVASSO	Primavera	10,2	3,6	1,1	1,2	2,1	0,4
	Autunno	1,7	1,7	1,1	0,4	0,8	0,1

BSAF		HEPTAGENIDI					
		o,p'-DDE	p,p'-DDE	o,p'-DDD	p,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT
DOMO	Primavera	-	-	-	-	-	-
	Autunno	-	1,7	0,5	0,6	0,8	0,2
PRATA	Primavera	-	-	-	-	-	-
	Autunno	-	1,6	-	0,4	-	0,3
BOSCO TENSO	Primavera	5,3	1,7	0,3	0,3	2,2	0,8
	Autunno	1,5	1,9	1,3	1,3	1,1	0,3
PREMOSELLO	Primavera	1,3	2,0	0,7	3,7	3,7	3,9
	Autunno	0,4	2,0	0,2	0,3	0,9	0,5
ORNAVASSO	Primavera	5,4	2,0	0,5	0,3	1,7	0,3
	Autunno	1,6	1,1	0,5	0,6	1,1	0,1

I valori di BSAF calcolati per il mercurio variano da 0,3 a 7,8 ed evidenziano una capacità di bioaccumulo maggiore, come per i DDx, da parte dei Ditteri e Gammaridae, seguiti da Heptageniidae e, infine, Baetidae (Tab. 5.3). Queste differenze potrebbero essere legate alle loro caratteristiche trofico-funzionali, che determinano una diversa esposizione al contaminante o a una diversa capacità di accumulo. I valori per sono generalmente più elevati in ottobre e, in questa stagione, mostrano picchi nei siti a valle di Pieve Vergonte, in particolare a Premosello e Bosco Tenso.

Tab. 5.3 - Valori di BSAF calcolati per il mercurio per i diversi taxa di macroinvertebrati del Toce campionati a febbraio e ottobre 2019 nelle 5 stazioni del Toce.

Febbraio 2019	Baetidae	Ditteri	Gammaridae	Heptagenidae
Domo	0,8	1,2	2,8	1,1
Prata	0,5	0,9	1,5	0,7
Bosco Tenso	0,4	1,5	1,2	0,7
Premosello	0,3	0,6	0,6	0,4
Ornavasso	0,7	0,7	0,9	0,9

Ottobre 2019	Baetidae	Ditteri	Gammaridae	Heptagenidae
Domo	1,7	2,1	6,0	2,1
Prata	0,8	1,7	2,0	1,3
Bosco Tenso	2,0	6,7	3,7	2,8
Premosello	3,9	4,8	7,8	6,2
Ornavasso	2,2	2,5	4,2	3,1

Bibliografia

- CIPAIS. 2015. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. Rapporto annuale 2014.
- CIPAIS. 2017. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 201
- CIPAIS. 2018. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2017.
- CIPAIS. 2019. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2018.
- Gobas F.A.P.C. & Morrison H.A. 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. In: Boethling RS e Mackay D (Eds.), Handbook of property estimation methods for chemicals. CRC Press, Boca Raton, FL. 189-231.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G., Berger T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 39: 20–31.
- OECD. 2008. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Protocol n.315. Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes. Razavi N.R., Ridal J.J., De Wit W., Brian M., Hickey C., Campbell L.M., Hodson P.V., 2013. Ebullition rates and mercury concentrations in St. Lawrence river sediments and a benthic invertebrate. Environmental Toxicology and Chemistry, 32: 857-865.
- Singh B.K., Kuhad R.C., Singh A., Lal R. & Tripathi K.K. 1999. Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. Critical Reviews in Biotechnology, 19: 197-225.
- Vignati D.A.L. & Guilizzoni P. 2011. Metalli nel Lago Maggiore: livelli naturali e antropici. Acqua & Aria, 1: 22–27.

6. INDAGINE SUI SEDIMENTI DEI TRIBUTARI

Licia Guzzella, Erica Valenti e Claudio Roscioli, Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon, Gianni Tartari, CNR-IRSA, Brugherio (MB)

Campionamento e misura delle concentrazioni di microinquinanti organici

I contaminanti considerati in questa indagine sono stati: il DDT e i suoi metaboliti, i policlorobifenili (PCB), i polibromodifenileteri (PBDE); inoltre sono proseguite le analisi di alcuni due nuovi composti previsti dalla normativa per le sostanze prioritarie da monitorare in acqua, aggiunti al progetto già nel 2016 (CIP AIS, 2017), l'esabromociclododecano (HBCD) e il decabromodifeniletano (DBDPE). Per l'analisi dei sedimenti di Bardello, Boesio, Margorabbia, Tresa, Toce e Ticino emissario, si è seguito lo schema già proposto nei precedenti rapporti, analizzando per ciascun bacino idrografico i composti evidenziati come i più critici (CIP AIS, 2017).

Il campionamento dei sedimenti dei cinque tributari è stato svolto con una frequenza quadrimestrale, ad aprile, luglio ed ottobre 2019; soltanto nel caso del Toce il campionamento è stato posticipato a metà maggio per motivi tecnici; i metodi di campionamento e di trattamento dei campioni sono gli stessi riportati sul rapporto CIP AIS dell'anno 2015 (CIP AIS, 2016). Al momento del campionamento, inoltre, è stato annotato il regime idrologico del fiume. Sul campione liofilizzato e setacciato, è stata condotta la determinazione del carbonio organico, avvenuta per ossidazione del sedimento secco mediante bicromato di potassio ed acido solforico concentrato secondo il metodo Walkley Black (US-EPA, 2002).

I risultati relativi al regime idrologico e al contenuto percentuale di carbonio organico dei tributari sono riportati nella Tabella 6.1.

Il regime idrologico osservato è stato, per tutti i fiumi, di magra ad Aprile 2019, di magra/morbida per Luglio 2019 e Ottobre 2019. Le condizioni idrologiche di morbida in generale favoriscono la deposizione del particolato sospeso in acqua e quindi anche dei contaminanti presenti in tale matrice, mentre in condizione di magra il trasporto del particolato sospeso è ridotto in quanto non si assiste al dilavamento del relativo bacino idrico.

Le percentuali medie di carbonio organico sono risultate pari a: $4,7 \pm 2,2$ per il Ticino emissario, $5,8 \pm 2,2$ per il Margorabbia, $6,6 \pm 0,6$ per il Tresa, $4,0 \pm 1,4$ per il Bardello, $6,7 \pm 1,4$ per il Boesio, $0,8 \pm 0,4$ per Toce. Quindi i fiumi con le maggiori % di carbonio organico sono, come in passato, Ticino Emissario, Margorabbia, Tresa, Bardello e Boesio; spicca il valore sempre molto basso del Toce alla foce. Gli stessi dati espressi in coefficienti di variazione percentuali evidenziano come Toce, Margorabbia e Ticino emissario sia caratterizzati da valori superiori al 40%, indicando una elevata variabilità del contenuto di carbonio organico nei tre campionamenti eseguiti nel 2019.

Tab. 6.1. Regime idrologico e contenuto di carbonio organico (%) nei campioni di sedimento dei tributari e dell'emissario campionati nel corso del 2019.

Regime idrologico	Aprile	Luglio	Ottobre
Ticino Emissario	magra	magra	magra
Margorabbia	magra	magra	magra
Tresa	magra	morbida	morbida
Bardello	magra	morbida	morbida
Boesio	magra	morbida	morbida
Toce (Maggio)	magra	morbida	morbida
Carbonio Organico (%)			
	Aprile	Luglio	Ottobre
Ticino Emissario	3,30	7,16	3,60
Margorabbia	8,36	4,49	4,49
Tresa	7,31	6,37	6,17
Bardello	4,55	2,42	5,08
Boesio	8,02	6,76	5,28
Toce	0,63	0,45	1,28

Misura delle concentrazioni di inquinanti organici

Il metodo di preparazione del campione per quanto riguarda le analisi di DDX, PCB e PBDE è riportato nel rapporto CIP AIS dell'anno 2015 (CIP AIS, 2016), mentre per quanto riguarda i nuovi composti (HBCD e DBDPE) ci si può riferire alla metodica riportata nel capitolo delle analisi sul comparto ittico del 2018 (CIP AIS, 2019).

La validazione del metodo analitico e il controllo qualità sono stati effettuati, analizzando bianchi e aliquote di materiale certificato (CRM, "PAHs, PCBs, and Pesticides in Fresh Water Sediment", number CNS391-50G) per i DDX ogni 6-8 campioni durante l'analisi dei campioni. Le concentrazioni medie ottenute per i DDX dalle repliche confrontate con il valore di riferimento sono mostrate in Figura 6.1. Tutti i valori ottenuti rientravano in concentrazioni pari a $\pm 30\%$ rispetto ai valori certificati.

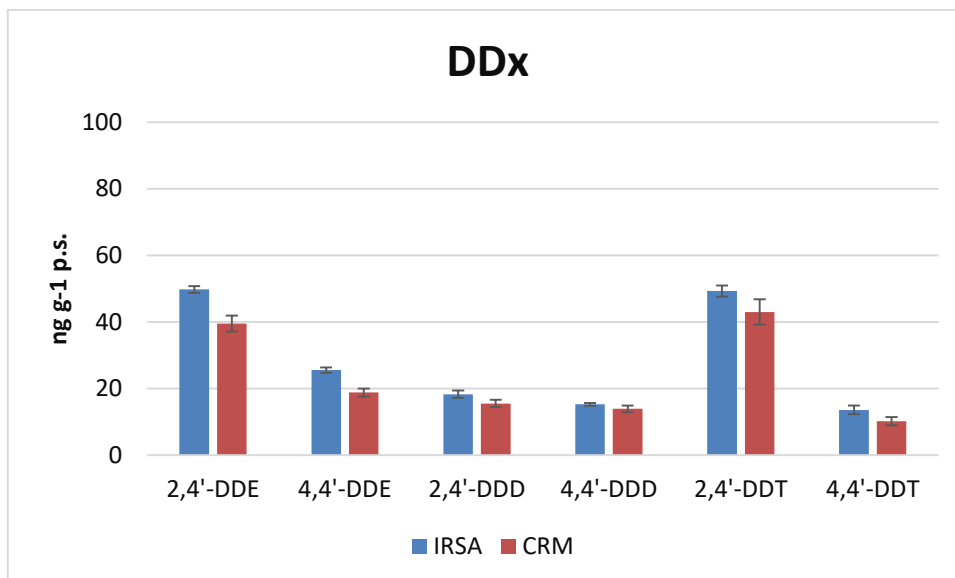


Fig. 6.1. Concentrazioni medie ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento CRM *“PAHs, PCBs, and Pesticides in Fresh Water Sediment”* per i DDx.

Per quanto riguarda i PCBs, non si riscontrano scostamenti maggiori del 30% rispetto ai valori certificati per tutti gli isomeri considerati nelle analisi condotte utilizzando il materiale certificato CRM, *“PAHs, PCBs, and Pesticides in Fresh Water Sediment”* (number CNS391-50G). Le concentrazioni medie dei PCB ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento sono mostrate in Figura 6.2.

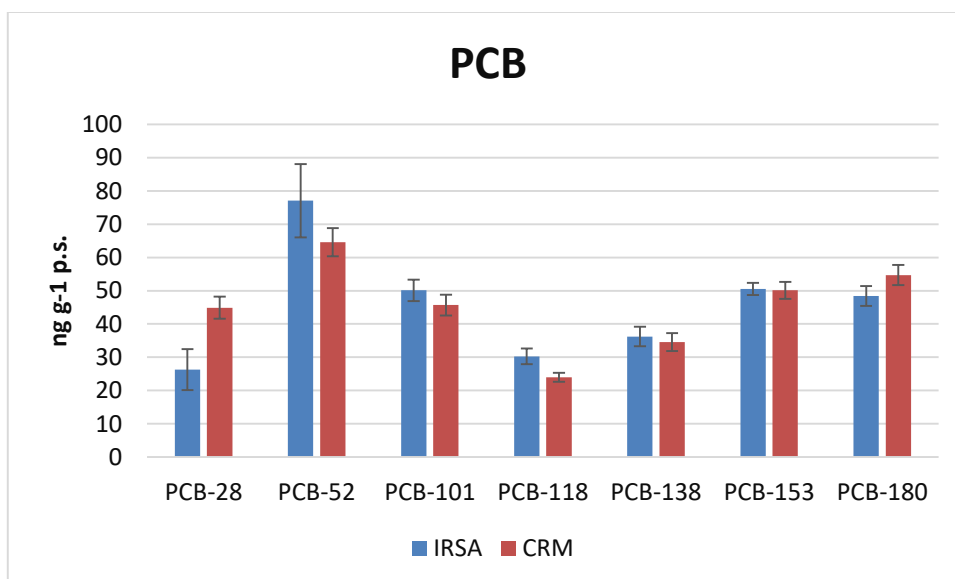


Fig. 6.2. Concentrazioni medie ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento CRM, *“PAHs, PCBs, and Pesticides in Fresh Water Sediment”*, (number CNS391-50G) per i PCB.

Infine per la validazione dei BDEs si sono analizzate aliquote del materiale certificato BROCC - 1169, sedimento fluviale fornito dal Netherlands Institute for Fisheries Research (RIVO); i risultati sono riportati in Figura 6.3. Il confronto fra le misure IRSA e i valori certificati rivela un buon accordo per tutti i congeneri con scostamenti del valore medio IRSA inferiori al 30% rispetto alle concentrazioni certificate.

In tutti i grafici che rappresentano la contaminazione misurata nei fiumi è stata riportata la deviazione standard relativa riferita al materiale certificato.

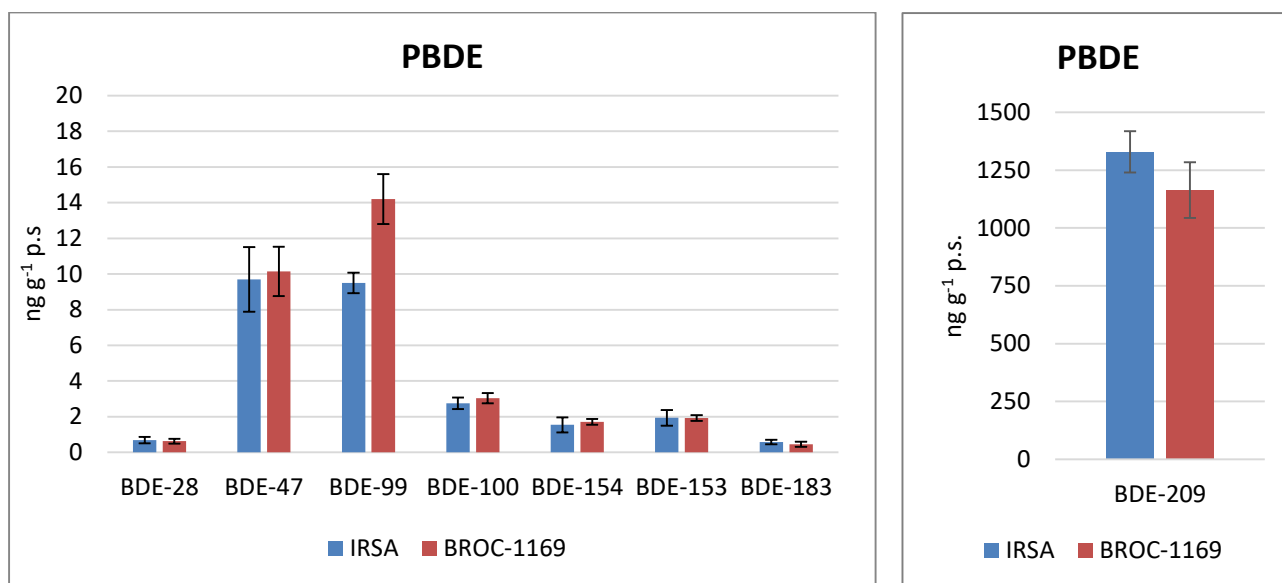


Fig. 6.3. Concentrazioni medie ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento BROCC - 1169 per i PBDE, riportate in due scale verticali differenti per permetterne una miglior visualizzazione.

In Figura 6.4 sono riportati i risultati delle analisi sui DDX relativi al Toce e Ticino Emissario, con i valori dei singoli isomeri e metaboliti espressi in ng g⁻¹ e ng g⁻¹ C.O., quindi normalizzati sul contenuto di carbonio organico.

Le concentrazioni di DDX totali misurate alla foce del Toce nel 2019 sono ridotte rispetto a quelle del 2017-2016, ma maggiori del 2018 con una media di 12,55±4,46 ng g⁻¹ p.s.; l'andamento è variabile nel tempo con il valore massimo a Luglio 2019 sia per le concentrazioni espresse in ng g⁻¹ p.s. che per quelle in ng g⁻¹ C.O. Questo andamento conferma un generale equilibrio di ripartizione tra carbonio organico e livelli di DDX e il composto principale da Luglio 2019 in poi ritorna ad essere il p,p'-DDT.

I livelli di DDX nel Ticino emissario risultano almeno dimezzati rispetto al Toce, ma più stabili con livelli di 4,77±1,85 ng g⁻¹ p.s.; il campione di Ottobre 2019 risulta quello più contaminato se rappresentato in base al contenuto di carbonio organico con prevalenza dei metaboliti p,p'-DDE, o,p'-DDD e p,p'-DDD.

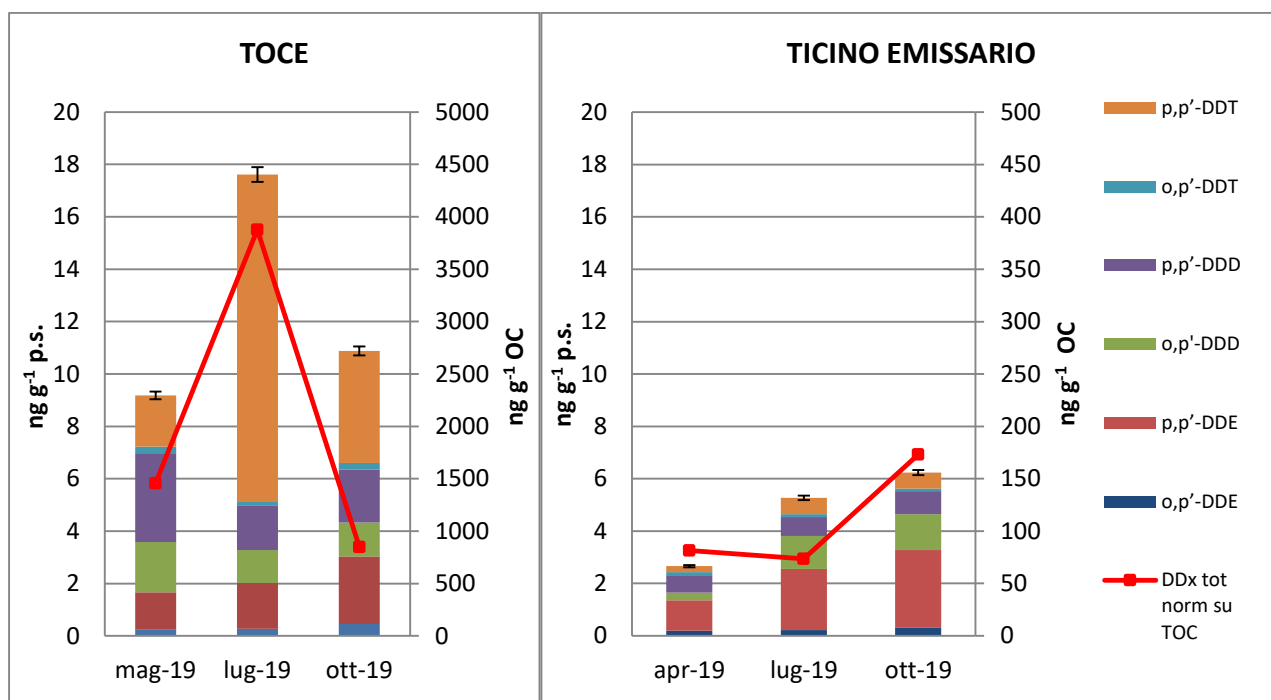


Fig. 6.4. Concentrazioni di DDX (ng g^{-1} p.s. e ng g^{-1} OC) nei sedimenti del Toce e del Ticino Emissario.

La figura 6.5 illustra le concentrazioni totali di PCBs nei sedimenti dei tributari e dell'emissario, con i valori rappresentati sia su peso secco che normalizzati sul contenuto in carbonio organico. Le analisi effettuate per valutare la contaminazione da PCBs hanno dimostrato che il Ticino emissario, il Bardello e il Boesio sono i fiumi maggiormente contaminati come già evidenziato in passato (CIP AIS, 2016, 2017 e 2018); in questi fiumi le concentrazioni medie sono pari a: $19,07 \pm 3,23$ per il Bardello, $14,31 \pm 5,92$ per il Boesio e $8,19 \pm 3,80$ ng g^{-1} p.s. per il Ticino emissario.

Il Fiume Toce ha evidenziato concentrazioni di PCBs inferiori a 2 ng g^{-1} p.s. ritornando a valori molto contenuti e simili a quelli del 2018 e di anni precedenti (CIP AIS, 2017); altri fiumi con concentrazioni molto contenute sono risultati essere il Margorabbia e il Tresa, i quali hanno avuto un andamento piuttosto costante durante il 2019.

Anche normalizzando i dati sul contenuto di carbonio organico dei sedimenti (Figura 6.5) l'andamento delle concentrazioni è simile per la maggior parte dei casi, evidenziando un sostanziale equilibrio tra concentrazioni di contaminanti nei sedimenti e loro contenuto in carbonio organico.

I congeneri più abbondanti in tutti e cinque i tributari sono risultati i PCB-138 e PCB-153 come prevedibile in base alla composizione dalla miscela commerciale utilizzata in passato (Aroclor 1256 e 1260).

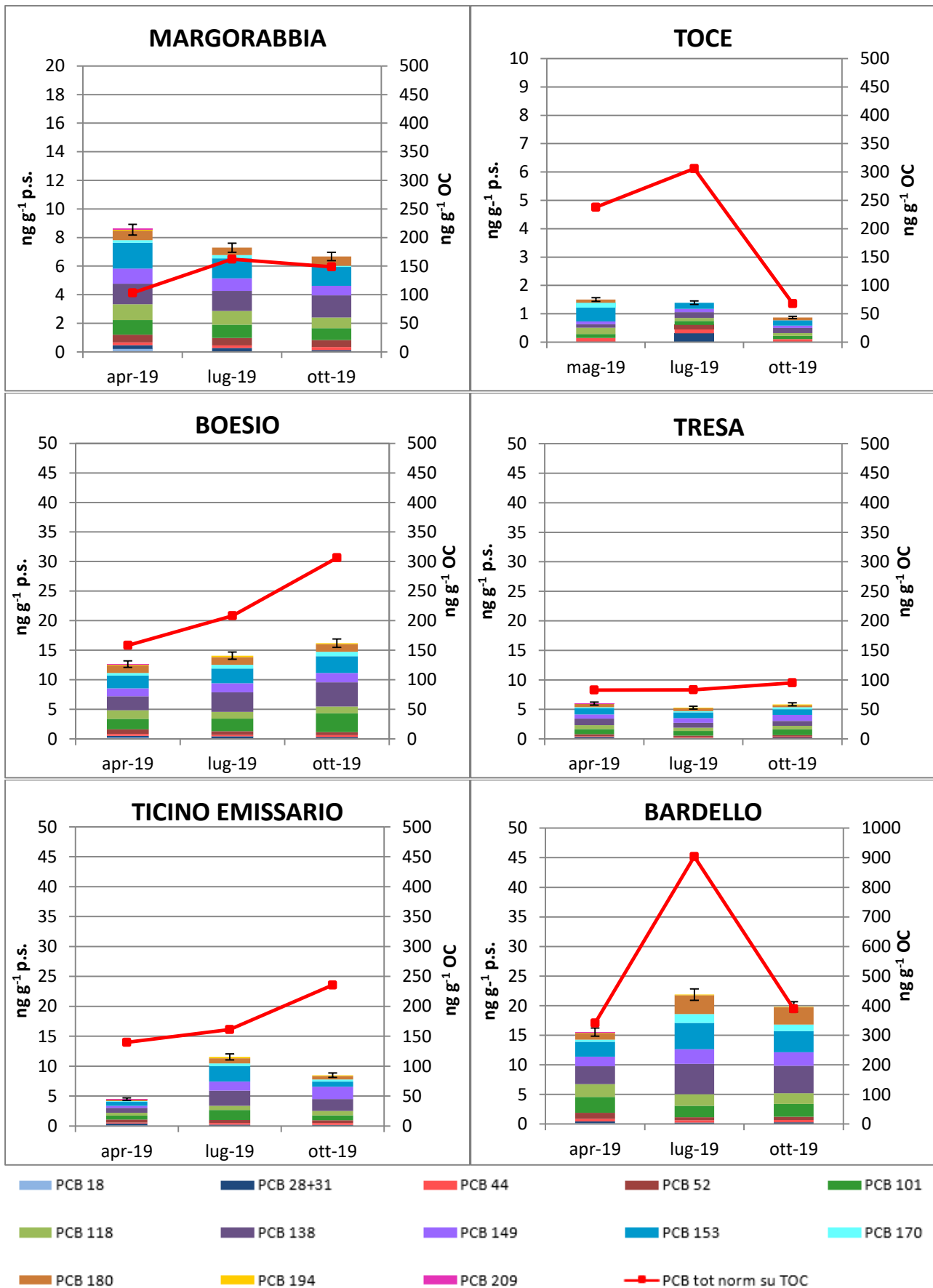


Fig. 6.5. Concentrazioni di PCB tot. (ng g^{-1} p.s. e ng g^{-1} OC) nei sedimenti dei fiumi considerati.

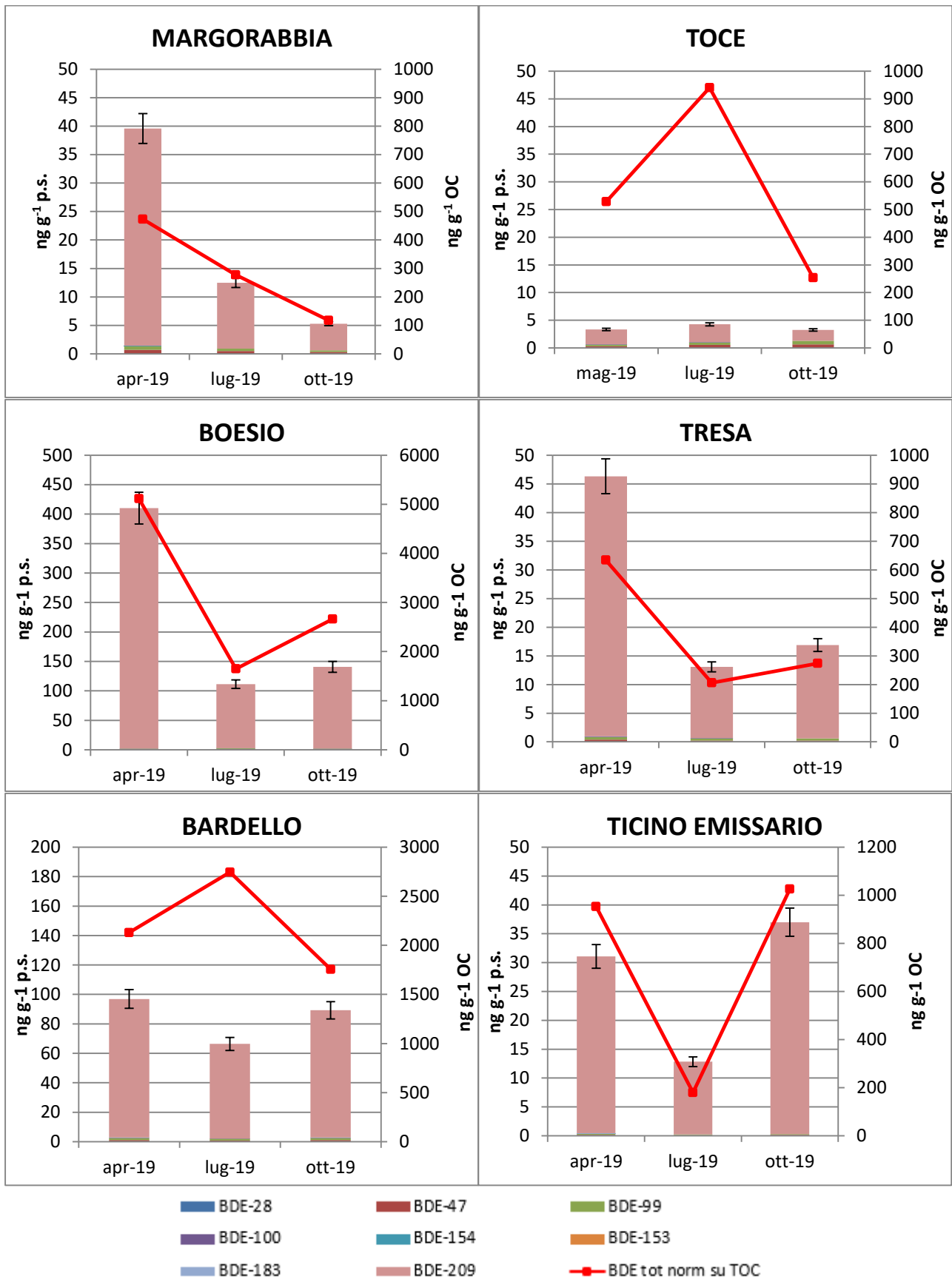


Fig. 6.6. Concentrazioni di BDE tot. (ng g^{-1} p.s. e ng g^{-1} OC) nei sedimenti dei fiumi considerati.

Per quanto riguarda la contaminazione di PBDE, nella Figura 6,6 sono riportate la somma delle concentrazioni dei diversi congeneri nei tre campionamenti stagionali effettuati. Come già evidenziato negli anni precedenti (CIP AIS, 2016 e 2017), il fiume più contaminato risulta essere il Boesio, nel quale la concentrazione di BDE totale è mediamente di $220,7 \pm 164,8$, i livelli sono molto variabile come evidenziato dalla elevata deviazione standard; segue il Bardello con valori medi di $84,2 \pm 15,9$ e il Ticino emissario con valori medi di $26,9 \pm 12,6$, seguono in ordine di importanza il Margorabbia, il Tresa e il Toce. Anche se si considera la contaminazione normalizzata sul contenuto di carbonio organico, la variabilità fra i fiumi rimane simile e quindi sembra essere più collegata a fonti locali di inquinamento.

Come già evidenziato negli anni precedenti il congenere BDE-209 è quello che più contribuisce alla contaminazione da BDE nei tributari del Lago; in media nei campioni la sua presenza è compresa tra un minimo di 72% del totale per quanto riguarda i campioni del Toce ed un massimo di 98-99% del totale nei campioni di Bardello e Boesio, confermando che i tributari Boesio e Bardello sono quelli che maggiormente contribuiscono alla contaminazione del Lago da PBDE.

Passando alle analisi dei nuovi contaminanti inseriti dal 2016 nel progetto CIP AIS, la contaminazione da HBCD, risulta essere misurabile in tutti e tre i campioni di sedimento solo per il Boesio $4,0 \pm 3,34$ ng g⁻¹ p.s e il Bardello $2,20 \pm 1,02$ ng g⁻¹ p.s. Questa contaminazione potrebbe essere associata all'utilizzo del HBCD come ritardante di fiamma nel polistirene espanso (EPS) e nel polistirene estruso (XEPS) in edilizia dalle aziende presenti nel bacino imbrifero dei fiumi. Al contrario, nei campioni prelevati nel Toce, nel Tresa, nel Margorabbia e nel Ticino emissario la contaminazione risulta minima, con concentrazioni al di sotto del limite di rilevabilità nella maggior parte dei casi.

Le concentrazioni di DBDPE misurate per tutti i tributari sono risultate inferiori al valore di LOD (10 ng g⁻¹ p.s.) tranne nel caso del Boesio di Aprile 2019 che raggiunge i $36,3$ ng g⁻¹ p.s. L'elevata contaminazione del Boesio per quanto riguarda i PBDE già osservata nel 2019 e in passato, è probabilmente legata agli scarichi di aziende manifatturiere presenti sul territorio della provincia di Varese che utilizzano ritardanti di fiamma (Guzzella et al., 2008); la presenza del DBDPE si può collegare al suo crescente utilizzo come sostituto della miscela Deca-BDE (Giulivo et al., 2017).

Infine, per valutare la qualità dei sedimenti di ecosistemi d'acqua dolce e marina, sono stati applicati solo per il Ticino emissario e il Toce i valori guida utilizzati negli Stati Uniti (SQG: Sediment Quality Guidelines) per la stima delle concentrazioni ad effetto tossico di alcuni inquinanti prioritari. Tali valori permettono di definire la qualità dei sedimenti e di stimarne il rischio ecologico (MacDonald et al., 2000). MacDonald et al. (2000) hanno effettuato la stima degli effetti tossici sulla base del valore di PEC (*Probable Effect Concentration*) o concentrazione al di sopra della quale è probabile avere effetti tossici sulla fauna macrobentonica di fondo. Long et al. (2006) hanno proposto l'applicazione della media dei quozienti PEC o Q-PEC, ottenuta per le diverse sostanze, allo scopo di definire la tossicità media di miscele di contaminanti presenti nel sedimento. Utilizzando questo metodo di valutazione, i campioni di sedimento sono da considerarsi sicuramente non tossici, se il valore di Q-PEC medio è inferiore a 0,1, mentre per valori di Q-PEC $\geq 0,5$ il rischio di tossicità è elevato e molto elevato se superiore a 2. Il calcolo del valore di Q-PEC è stato condotto per il Ticino emissario e il Toce, in quanto in questi casi è stata indagata una ampia gamma di composti organici tra cui i vari congeneri e metaboliti del DDX e l'insieme di 13 congeneri dei PCBs. Inoltre, non essendo stati stabiliti da MacDonald et al. (2000) valori di riferimento per il BDE, questi non sono stati quindi inclusi nel calcolo. A livello normativo internazionale per il BDE-209 è stato stabilito dal Canadian Environmental Quality Guideline un valore guida nei sedimenti normalizzati sul 1% di C.O. pari a 19 ng g⁻¹ (Canadian Environmental Protection Act, 2013). Un valore di guideline non può però essere utilizzato nel calcolo di PEC/TEC in quanto molto protettivo.

Il valore Q-PEC riportato da Long et al. (2006) per il Fiume Toce è risultato come media dei tre campioni pari a 2,34 unità, uno dei valori più elevati dell'ultimo quinquennio e simile a quello osservato nel 2018, mentre risulta pari a 0,77 per il Ticino emissario. Valori superiori a 2 indicano un rischio di tossicità molto elevato. In questa valutazione, tuttavia, pesano in modo significativo i valori di o,p'-DDD e p,p'-DDD, che sono particolarmente elevati sia nel Toce che nel Ticino emissario e la cui ecotossicità è stata ampiamente dimostrata (MacDonald et al., 2000).

Nell'ambito delle attività del 2019 non è stata prevista l'analisi degli IPA che non sono stati quindi inclusi in questa valutazione.

Misura delle concentrazioni di mercurio nei sedimenti dei tributari

Il programma di attività per il 2019 prevede la quantificazione delle concentrazioni di mercurio totale in due stagioni (primavera e autunno) per Tresa, Margorabbia, Boesio, Bardello e Ticino emissario e in tre stagioni (anche luglio) per il Toce. Tuttavia, le concentrazioni sono state determinate per la stagione estiva anche per gli altri tributari, in modo da fornire più dati interpretativi a supporto delle analisi svolte nell'ambito dell'attività sugli *effect-based tools* (capitolo 8).

L'analisi è stata condotta sugli stessi campioni utilizzati per l'analisi dei microinquinanti organici. Aliquote di campioni solidi, precedentemente liofilizzati e omogeneizzati manualmente o tramite micromulino a biglie, sono state analizzate direttamente mediante lo strumento AMA254 (*Automated Mercury Analyzer*, FKV), utilizzando come materiale certificato il BCR-320R *Channel sediment* dell'*Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, European Commission*. Il recupero medio è risultato del 99,7%. I campioni sono stati analizzati in triplo, ottenendo coefficienti di variazione $\leq 5\%$.

L'analisi ha evidenziato un picco di concentrazione nel Tresa a luglio (0,380 mg kg⁻¹ p.s.), paragonabile al valore di 0,329 mg kg⁻¹ p.s. rilevato nel 2018, che conferma la presenza di sorgenti attive di contaminazione negli anni più recenti (CIPAIS, 2019) (Fig. 6.7). Questo valore risulta superiore al cb-TEC di MacDonald et al. (2000), ossia la soglia al di sotto della quale non sono attesi effetti tossici per gli organismi bentonici (cb-TEC = 0,18 mg kg⁻¹ p.s.).

Anche i valori registrati nel Ticino emissario a luglio e ottobre superano questa soglia (0,242-0,349 mg kg⁻¹ p.s.), ma risultano in linea con la serie storica. In questo caso, la contaminazione deriva principalmente dall'apporto di sedimenti contaminati dalla Baia di Pallanza e, quindi, dal Toce. Anche in quest'ultimo, i valori sono in linea con quelli registrati negli ultimi anni (CIPAIS, 2019) (Fig. 6.7).

Bardello e Boesio mostrano concentrazioni vicine al cb-TEC (Fig. 6.7). È già stato messo in evidenza lo stato di compromissione di questi fiumi, nonché la presenza di aree industriali dismesse caratterizzate da terreni contaminati, che determinano un apporto nelle acque e nei sedimenti (CIPAIS, 2019).

I valori risultano invece contenuti nel Margorabbia, dove l'origine è probabilmente ascrivibile in larga misura alla geochimica del bacino (Fig. 6.7).

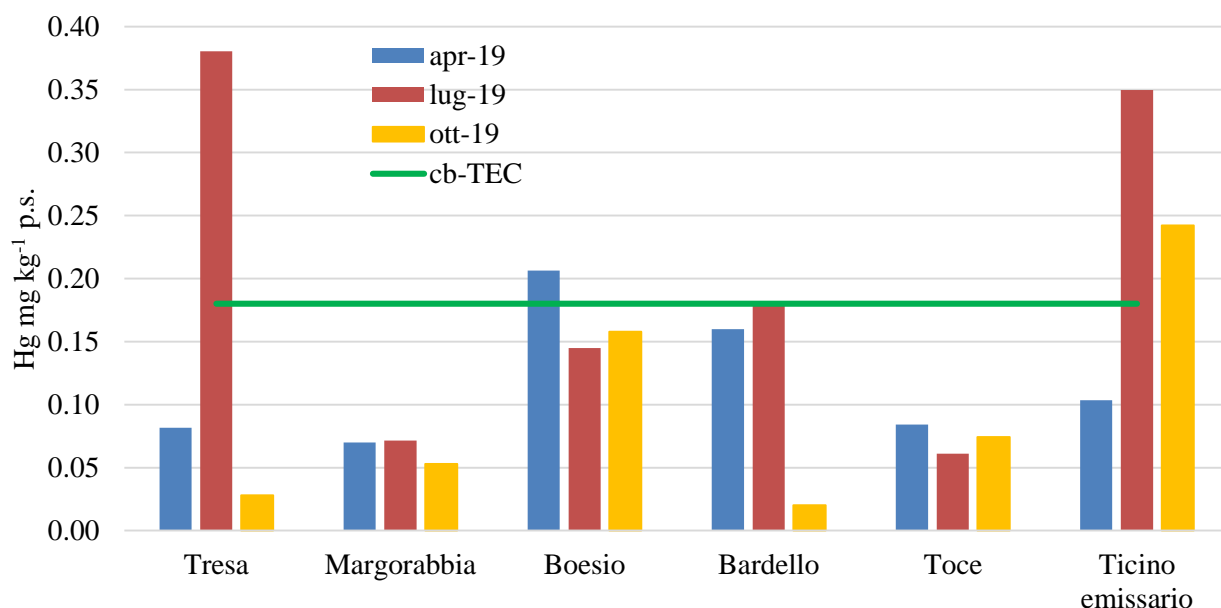


Fig. 6.7. Concentrazioni di mercurio riscontrate in aprile, luglio e ottobre 2019 nei sedimenti dei tributari del Lago Maggiore. La linea verde rappresenta il cb-TEC (MacDonald et al., 2000), pari a 0,18 mg Hg kg⁻¹ p.s.

Bibliografia

- Canadian Environmental Protection Act. 2013. Federal Environmental Quality Guidelines Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs). Environment Canada, 1-25 pp
- CIP AIS. 2008. Monitoraggio della presenza del DDT e di altri contaminanti nell'ecosistema Lago Maggiore - Campagna 2006–2007. Rapporto finale 2001–2007.
- CIP AIS. 2009. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Rapporto annuale 2008.
- CIP AIS. 2010. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Rapporto annuale 2009.
- CIP AIS. 2011. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Rapporto annuale 2010.
- CIP AIS. 2012. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Rapporto annuale 2011.
- CIP AIS. 2013. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2008-2012. Rapporto annuale 2012. Rapporto finale 2008-2012.
- CIP AIS. 2014. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. Rapporto annuale 2013.
- CIP AIS. 2015. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. Rapporto annuale 2014
- CIP AIS. 2016. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. Rapporto annuale 2015 e rapporto triennale 2013-2015.
- CIP AIS. 2017. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2016.
- CIP AIS. 2018. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2017.

- CIPAIS. 2019. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2018. Rapporto finale 2016-2018.
- Giulivo M., Capri E., Kalogianni E., Milacic R., Majone B., Ferrari F., Eljarrat E. & Barcelò D. 2017. Occurrence of halogenated and organophosphate flame retardants in sediments and fish samples from three European river basins. *Science of the Total Environment*, 586: 782-791.
- Guzzella L., Roscioli C. & Binelli A. 2008. Contamination by polybrominated diphenyl ethers of sediments from the Lake Maggiore basin (Italy and Switzerland). *Chemosphere*, 73: 1684-1691.
- Long E.R., Ingersoll C.G. & MacDonald D.D. 2006. Calculation and uses of mean sediment quality guideline quotients: a critical review. *Environmental Science & Technology*, 40: 1726–1736.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G. & Berger T.A. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 39: 20–31.
- US-EPA, 2002. Methods for the determination of Total Organic Carbon (TOC) in soils and sediments. US Environmental Protection Agency. Ecological Risk Assessment Support Center, Office of Research and Development. NCEA-C-1282, EMASC-001, April 2002.
- Vignati D.A.L., Guilizzoni P., 2011. Metalli nel Lago Maggiore: livelli naturali e antropici. *Acqua & Aria*, 1: 22–27.

7. INDAGINI SUL COMPARTO ITTICO

Licia Guzzella, Sara Mattiuzzi, Stefano Tasselli, Claudio Roscioli, Laura Marziali, Lucia Valsecchi, Alfredo Schiavon, CNR-IRSA, Brugherio (MB)
Pietro Volta, Mattia Iaia, Silvia Zaupa, CNR-IRSA, Verbania Pallanza

Campionamento e preparazione del campione

Il campionamento della fauna ittica è stato effettuato stagionalmente come da programma. Sono state campionate le seguenti specie: coregone lavarello (*Coregonus lavaretus*), agone (*Alosa agone*) e gardon (*Rutilus rutilus*).

I campionamenti sono stati effettuati con il supporto della locale cooperativa di pescatori professionisti utilizzando sia reti branchiali multimaglia pelagiche e reti multimaglia da fondo (ancorate) costituite da pannelli con maglie di diversa misura (da 5 a 55 mm) sia reti commerciali, normalmente in uso alla pesca professionale sul Lago Maggiore in uso ai pescatori professionisti che hanno partecipato ai campionamenti.

I pesci sono stati misurati (lunghezza totale L_T , dal vertice del capo al temine della pinna caudale a lobi riuniti) e ne è stato determinato il sesso mediante eviscerazione. Per ogni esemplare è stato prelevato un campione di scaglie per la determinazione dell'età; le scaglie sono state posizionate tra due vetrini portaoggetto e analizzate utilizzando un microscopio a basso ingrandimento. L'identificazione dei soggetti appartenenti alla specie coregone lavarello è stata effettuata mediante analisi congiunta dell'età, lunghezza totale e numero di branchispine del primo arco branchiale. E' questo infatti l'unico metodo per discriminare con ragionevole certezza il lavarello della bondella (*Coregonus macrophthalmus*), l'altro coregonide presente nel Lago Maggiore. A parità di età, il coregone lavarello ha una lunghezza significativamente maggiore della bondella e un numero medio di branchiospine significativamente minore.

Per ogni pesce è stato prelevato il filetto (pelle esclusa) nella regione caudale (tra la pinna anale e la pinna caudale) da entrambi i lati del corpo. I filetti sono stati omogeneizzati (Ultra-Turrax, Janke & Kunkel, Germania) e l'omogeneizzato è stato posto in recipienti di vetro e congelato.

Le caratteristiche dei campioni sono presentate nella tabella 7.1.

Tabella 7.1 – Caratteristiche dei pesci campionati

PRIMAVERA 2019

SPECIE	N	Luogo cattura	LUNGHEZZA±SD	PESO	ETA'
Agone piccolo	5 (3m, 2f)	Ghiffa	22.2 (±0.9)	125.7 (±10.1)	2.0 (±0.44)
Agone grande	5 (2m, 3f)	Intra	28.8 (±1.13)	196.2 (±15.1)	2.8
Lavarello	9 (5m, 4f)	Stresa	38.2 (±1.53)	415.5 (±35.1)	3.2
Gardon	7 (2m, 5f)	Intra	22.2 (±0.9)	135.3 (±27.4)	2.8 (±1.1)

ESTATE 2019

SPECIE	N		LUNGHEZZA±SD	PESO	ETA'
Agone piccolo	5 (3m, 2f)	Ghiffa	23.6 (±1.2)	130.9 (±17.1)	2.1
Agone grande	6 (3m, 3f)	Ghiffa	29.9 (±1.3)	165.2 (±16.8)	3.1 (±0.7)
Lavarello	10 (4m, 6f)	Ghiffa	36.2 (±1.19)	360.5 (±19.1)	2.7
Gardon	8 (3m, 5f)	Ghiffa	22.3 (±1.3)	129.4 (±21.2)	2.8

AUTUNNO 2019

SPECIE	N	LUOGO	LUNGHEZZA±SD	PESO	ETA'
Agone piccolo	5 (4m, 1f)	Oggebbio	22.2 (±0.2)	105.7 (±7.1)	2.5
Agone grande	6 (2m, 4f)	Ghiffa	28.1 (±0.2)	176.2 (±10.1)	3.3 (±0.2)
Lavarello	7 (5m, 2f)	Ghiffa	37.2 (±0.9)	407.5 (±22.1)	2.9
Gardon	5 (4m, 1f)	Intra	21.5 (±0.4)	115.3 (±7.4)	2.2 (±0.2)

INVERNO 2019-20

SPECIE	N	LUOGO	LUNGHEZZA±SD	PESO	ETA'
Agone piccolo	6 (4m, 2f)	Stresa	22.6 (±0.6)	100.9 (±8.1)	2.6
Agone grande	6 (4m, 2f)	Intra	28.2 (±1.1)	175.2 (±12.6)	3.4 (±0.4)
Lavarello	10 (5m, 5f)	Intra	39.2 (±1.2)	340.5 (±16.1)	3.0
Gardon	6 (4m, 2f)	Intra	20.3 (±0.2)	109.4 (±9.2)	2.1

Analisi dei composti organici

Come già riportato nel Rapporto CIP AIS del 2015 il tessuto muscolare delle specie ittiche considerate, preparato da CNR-IRSA di Pallanza, è stato liofilizzato e un'aliquota di campione è stata estratta per la determinazione di DDX, DI-PCB, PCB indicatori, PBDE, HBCD e DBDPE mediante Soxhlet BÜCHI B-811 (Flawill, Svizzera) con solvente *n*-esano:acetone (3:1 v/v), utilizzando il programma di estrazione a caldo. L'estratto è stato poi purificato su una colonnina impaccata con silice acida e Florisil® attivato; il campione è stato eluito *n*-esano:diclorometano (50:50 v/v). Infine i campioni sono stati ridotti di volume con evaporatore a flusso d'azoto Turbovap II.

Un'ulteriore aliquota di campione è stata poi estratta, con lo stesso metodo, per l'analisi dei PCB *dioxin-like* (dl-PCB). L'estratto, al fine di eliminare possibili interferenti quali macromolecole proteiche e/o lipidiche, è stato ridotto di volume per la successiva fase di purificazione mediante la tecnica di esclusione molecolare GPC (Gel Permeation Chromatography). Il prodotto di eluizione è stato ulteriormente ridotto di volume e sottoposto ad una seconda purificazione con passaggio su una colonnina contenente Florisil® montata in serie su una seconda colonnina impaccata di carbone attivo, entrambe lavate con *n*-esano. Nel protocollo di purificazione per i dl-PCB è stata introdotta, rispetto alle analisi di tre anni fa, l'aggiunta di silice acida in cima alla colonnina, per poter eliminare l'eventuale residuo lipidico che permane dopo la GPC e ridurre il più possibile le interferenze in fase di analisi. Dopo aver caricato il campione sulle colonnine di purificazione, sono stati recuperati i PCB mono-orto sostituiti, eluendo con *n*-esano per entrambe le colonnine; dopodichè sono stati eluiti i PCB coplanari, eluendo con toluene solo la colonnina di carbone attivo. Infine entrambi gli eluati raccolti sono stati ridotti di volume mediante Turbovap.

Le analisi di DDX, PCB-i e dl-PCB sono state effettuate mediante gascromatografia e spettrometria di massa a triplo quadrupolo (TSQ 8000 evo, Thermo Fisher Scientific) in modalità MS/MS, mentre i PBDE, HBCD e DBDPE sono stati analizzati mediante spettrometria di massa a trappola ionica (PolarisQ, Thermo Fisher Scientific), sempre in modalità MS/MS. La validazione del metodo analitico e il controllo qualità per PCB indicatori e dl-PCB sono stati effettuati, analizzando bianchi e aliquote di materiale certificato intervallati ogni 6-8 campioni (SRM NIST-1946, "Lake Superior Fish Tissue"). Le concentrazioni medie ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento sono mostrate nelle figure 7.1 e 7.2. Tutti i valori ottenuti da IRSA del materiale di riferimento rientravano in un range di $\pm 30\%$ rispetto al valore del materiale certificato.

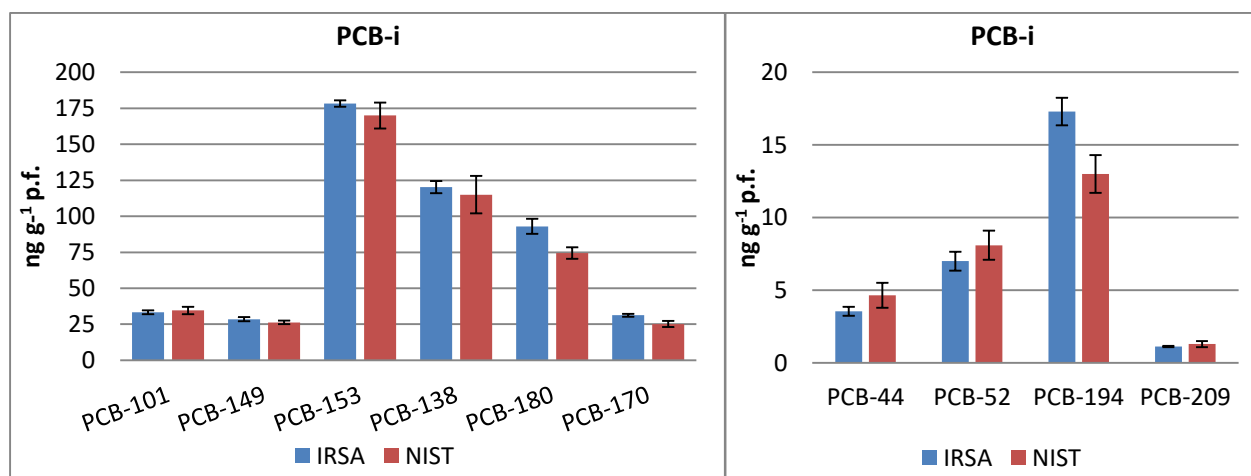


Fig. 7.1 Concentrazioni medie di PCB-i ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento SRM NIST-1946, “Lake Superior Fish Tissue” in due scale verticali differenti per permetterne una miglior visualizzazione.

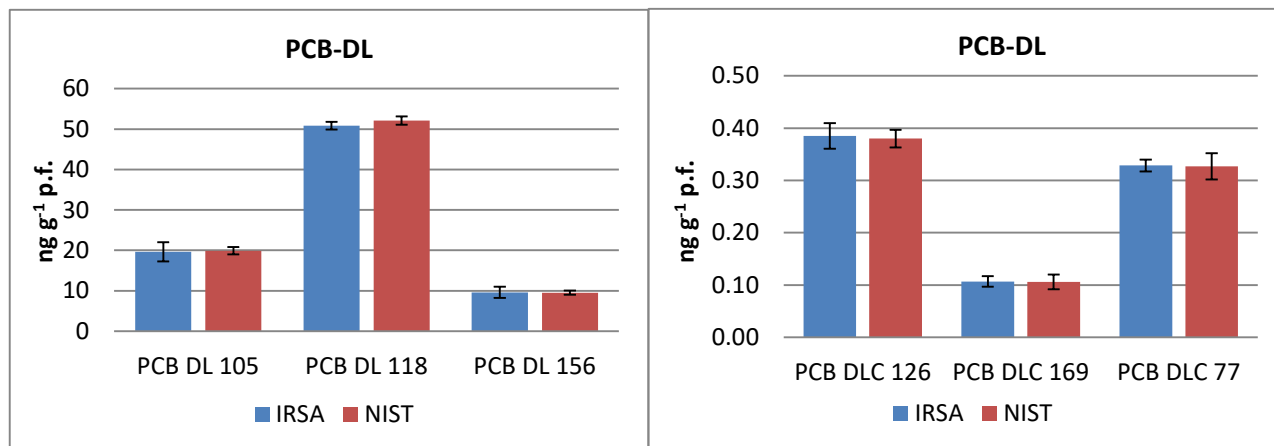


Fig. 7.2. Concentrazioni medie di DI-PCB ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento SRM NIST-1946, “Lake Superior Fish Tissue” in due scale verticali differenti per permetterne una miglior visualizzazione.

Per la validazione del metodo analitico e il controllo qualità dei risultati dei DDx e dei PBDE è stato utilizzato lo stesso materiale certificato (NIST-1946), “Lake Superior Fish Tissue” analizzandone un’aliquota ogni 6 campioni insieme ad un bianco. I risultati sono mostrati nelle figure 7.3 e 7.4 in due scale differenti ed evidenziano come i risultati rientrino nel range del $\pm 30\%$ rispetto al valore del materiale certificato.

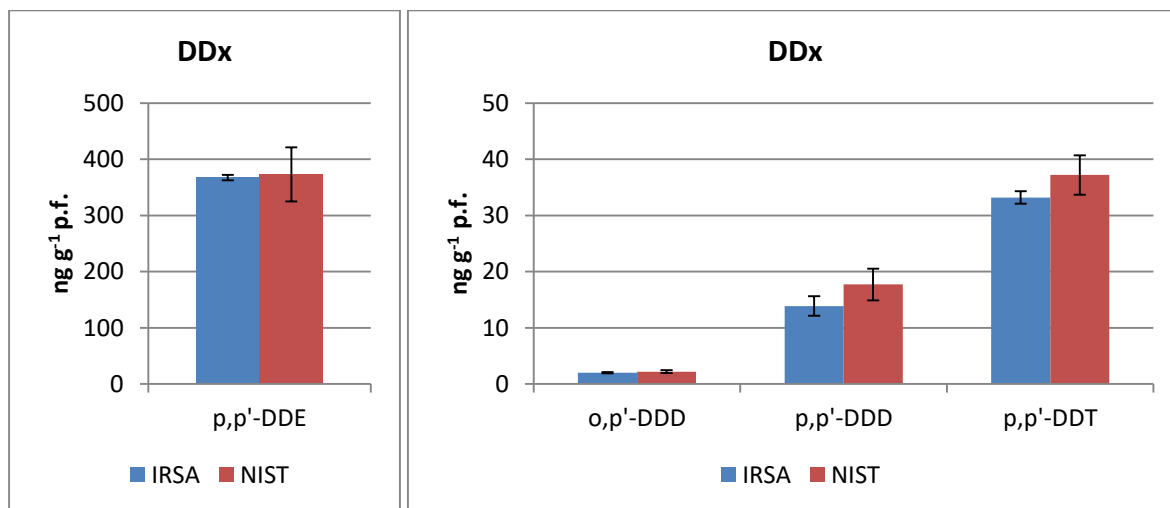


Fig. 7.3. Concentrazioni medie di DDx ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento SRM NIST-1946, “Lake Michigan Fish Tissue” in due scale verticali differenti per permetterne una miglior visualizzazione.

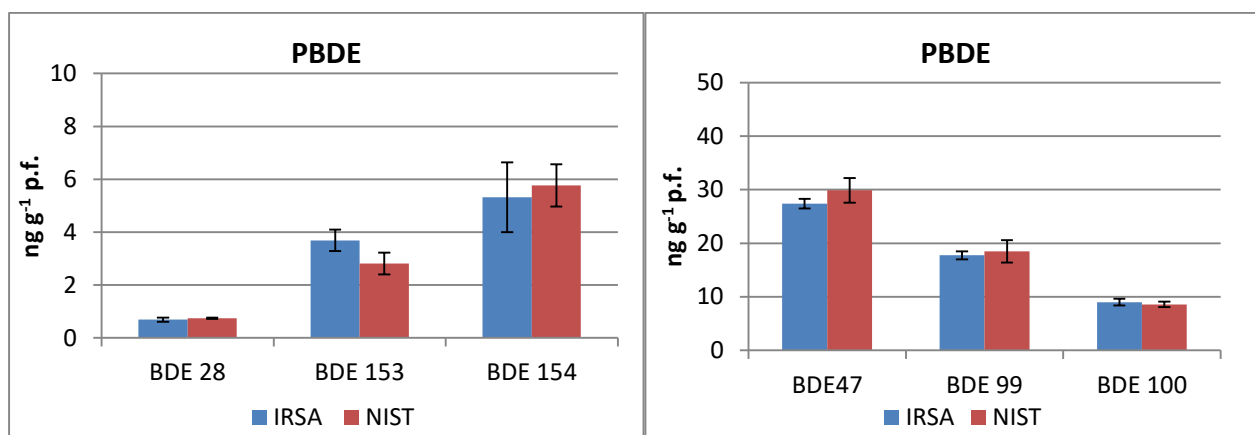


Fig. 7.4. Concentrazioni medie di PBDE ottenute dalle repliche confrontate con il valore di riferimento NIST-1946, “Lake Michigan Fish Tissue” in due scale verticali differenti per permetterne una miglior visualizzazione.

Per la determinazione dei lipidi la misura è stata effettuata mediante determinazione gravimetrica su un'aliquota di campione estratta con la stessa procedura, ma separatamente. L'estratto è stato, in questo caso, essiccato mediante evaporatore rotante, poi posto in stufa a 105°C e pesato ogni mezz'ora fino a che non avesse raggiunto un peso costante. I risultati relativi alle percentuali di lipidi sono riportati in tabella 7.2.

Tab. 7.2. Percentuale lipidica su peso fresco nelle differenti specie ittiche del Lago Maggiore campionate nel corso del 2019.

	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
<i>Agone Piccolo</i>	6,99	6,13	5,43	4,97
<i>Agone Grande</i>	2,67	5,53	7,05	4,23
<i>Coregone</i>	2,55	3,54	4,22	4,20
<i>Gardon</i>	1,26	1,32	2,05	1,49

Tra le tre specie considerate l'agone si conferma essere il pesce più ricco di lipidi, più l'agone piccolo del grande, con una media tra i campioni di agone grande di $4,92 \pm 1,79$ e di agone piccolo $5,88 \pm 0,88$ di lipidi su p.f., seguito dal coregone ($3,63 \pm 0,79$ di lipidi su p.f.) e poi dal gardon ($1,53 \pm 0,36$ di lipidi su p.f.).

Le concentrazioni totali di DDx nelle specie ittiche considerate sono mostrate nelle figure 7.5, 7.6, 7.7 e 7.8. Nei grafici sono indicati, in primis, le concentrazioni di DDx su agone grande e piccolo determinate sia su peso fresco che su base lipidica (linea rossa), successivamente seguono i grafici per il coregone e il gardon. In ogni colonna, inoltre, è mostrato il contributo dei vari composti e metaboliti.

La distribuzione media percentuale dei singoli isomeri e metaboliti nelle due specie di agoni e gardon è risultata simile con una prevalenza soprattutto di p,p'-DDE e poi di o,p'-DDD; la presenza del composto parentale, p,p'-DDT, è invece molto ridotta, in quanto questo composto viene biotrasformato dalle specie ittiche a p,p'-DDE. La presenza del p,p'-DDD nel coregone soprattutto fa, invece, supporre che vi sia stato un adsorbimento attraverso il particolato sospeso, la cui origine potrebbe essere imputabile alla lisciviazione dei suoli contaminati del sito industriale di Pieve Vergonte oppure un'assunzione con la dieta (es. attraverso zooplancton e/o macroinvertebrati).

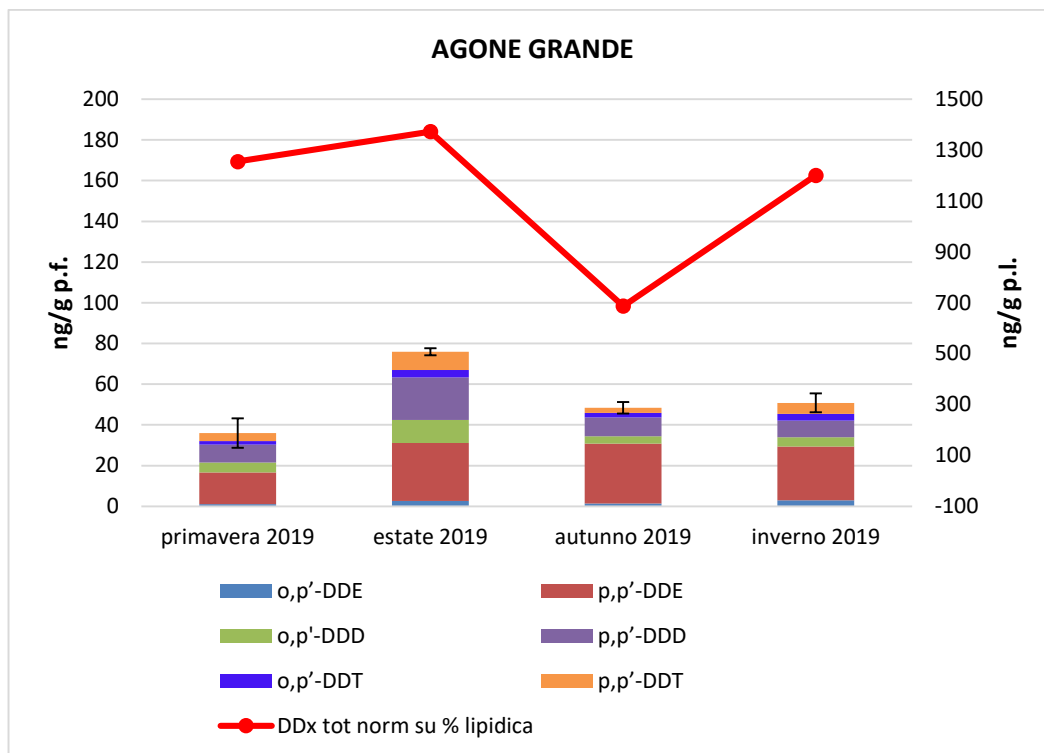


Fig. 7.5 Concentrazioni di DDx totali e singoli isomeri e metaboliti (ng g^{-1} p.f. e ng g^{-1} lip.) negli agoni grandi.

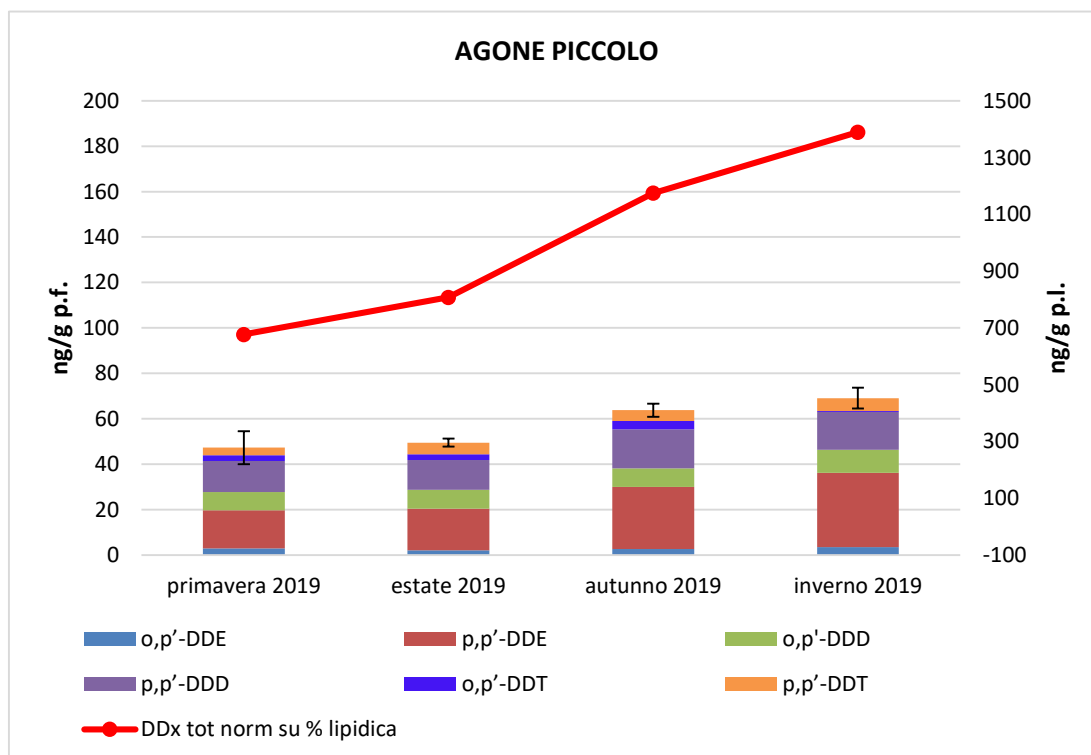


Fig. 7.6 Concentrazioni di DDx totali e singoli isomeri e metaboliti (ng g^{-1} p.f. e ng g^{-1} lip.) negli agoni piccoli.

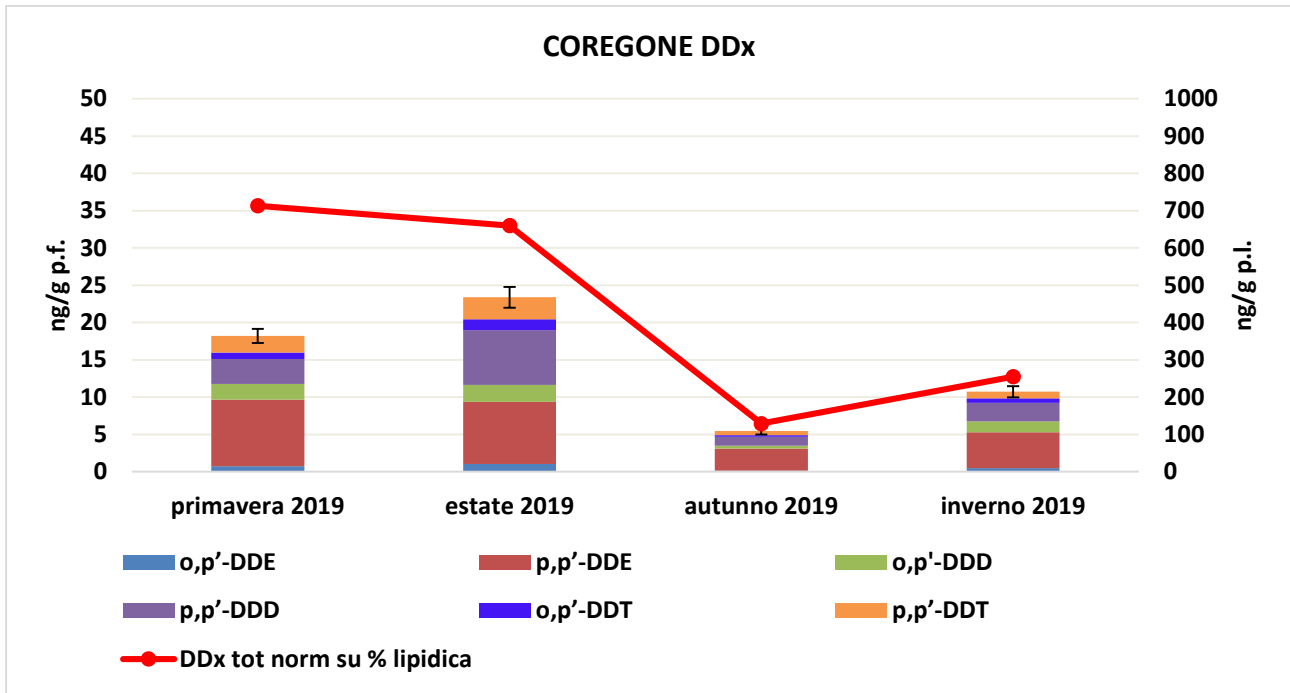


Fig. 7.7 Concentrazioni di DDX totali e singoli isomeri e metaboliti (ng g^{-1} p.f. e ng g^{-1} lip.) nei coregoni

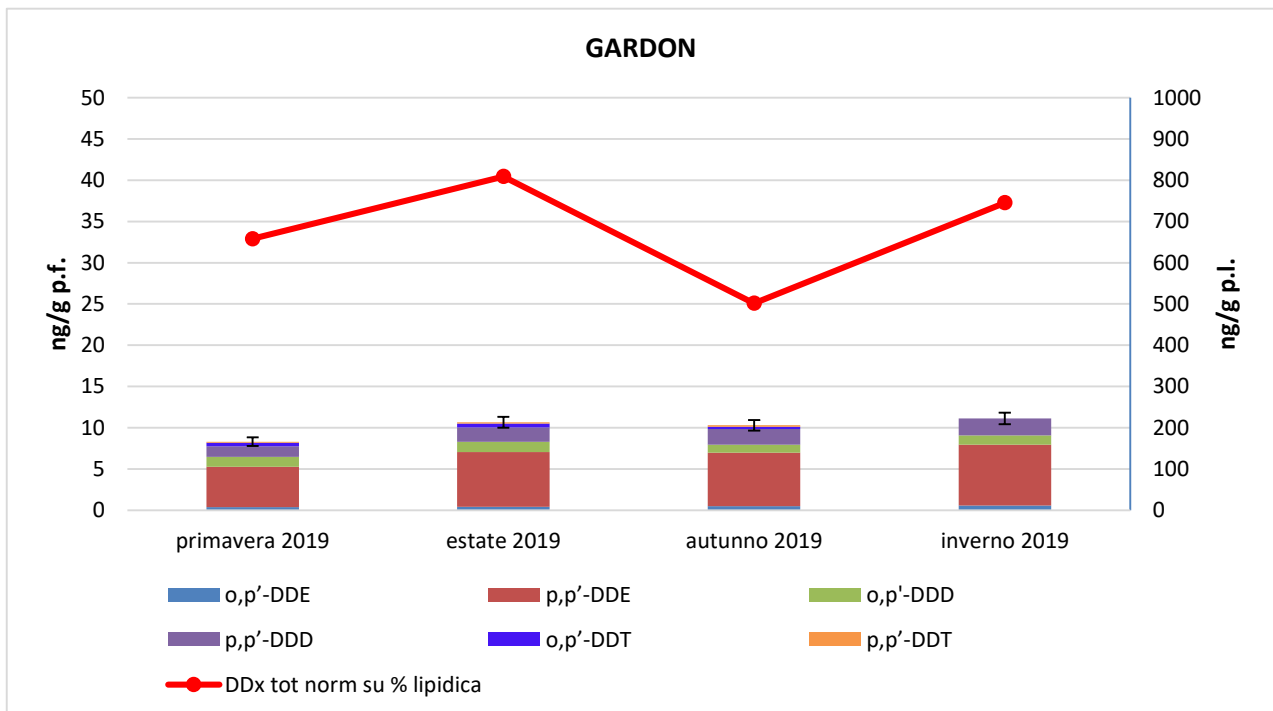


Fig. 7.8 Concentrazioni di DDX totali e singoli isomeri e metaboliti (ng g^{-1} p.f. e ng g^{-1} lip.) nel gardon.

La normativa italiana per la valutazione dello stato di qualità chimico dei corpi idrici con particolare riferimento alla matrice biota (in particolar modo per i pesci, vedi D.L. n.172/2015) prevede un valore soglia di concentrazione del DDX totale pari a 100 ng g^{-1} p.f. per i pesci con più del 5% di grassi e di 50 ng g^{-1} p.f. per i pesci con valori minori o uguali al 5% di grassi.

Nel corso del 2019, tali valori soglia sono stati superati del 38% per l'agone piccolo in inverno 2019-2020 (tale differenza risulta quindi significativa) e in maniera minore, del solo 10%, nell'agone grande sempre in inverno 2019-2020.

Le concentrazioni di DDX nel corso del 2019 sono risultate in media maggiori nei tessuti degli agoni (53 ± 17 e 63 ± 11 ng g⁻¹ p.f. negli agoni, grandi e piccoli rispettivamente), seguiti dai lavarelli (14 ± 8 ng g⁻¹ p.f. nei coregoni) e infine dal gardon (10 ± 1 ng g⁻¹ p.f.). Le concentrazioni quindi differiscono per un fattore 4 per il rapporto agoni/coregoni e di un fattore 2 per coregoni/gardon. Le concentrazioni massime si sono osservate in estate per gli agoni grandi e il coregone, mentre le concentrazioni di DDX risultano stabili per l'agone piccolo e il gardon.

Tali andamenti sono in linea con quelli rilevati negli ultimi anni in termini di concentrazioni totali di DDX tra le tre specie ittiche considerate (CIP AIS, 2016; 2017; 2018).

Se si considerano i dati normalizzati sul contenuto lipidico, gli andamenti sono gli stessi di quelli osservati dalle concentrazioni non normalizzate, evidenziando un sostanziale equilibrio tra il contenuto lipidico e le concentrazioni di DDX presenti nelle specie ittiche considerate. Inoltre con questa elaborazione, le differenze tra specie ittiche si riducono drasticamente.

Confrontando i valori di contaminazione dei due pool corrispondenti ad individui giovani e vecchi di agone, si osserva una maggiore variabilità negli agoni grandi rispetto a quelli giovani, probabilmente a causa di una maggiore disomogeneità nelle età.

Per quanto riguarda i PCB sono stati quantificati i 12 congeneri principali, tra cui 6 PCB indicatori (PCB-i: PCB-28 (+31), in quanto il metodo analitico utilizzato non permette la netta separazione di questi due congeneri, 52, 101, 138, 153, 180), considerati congeneri indicatori della presenza dei PCB totali negli alimenti destinati al consumo umano (Regolamento UE 1259/2011) e altri 6 congeneri (PCB-18, 44, 149, 170, 194, 209) per continuità con le indagini precedenti.

Le concentrazioni di PCB totali nelle specie ittiche considerate sono mostrate nelle figure 7.9, 7.10 e 7.11 in cui sono state riportate le concentrazioni dei PCB misurate sia sul peso fresco, che su base lipidica (linea rossa); inoltre vengono presentati nelle relative colonne tutti i congeneri dei PCB presenti.

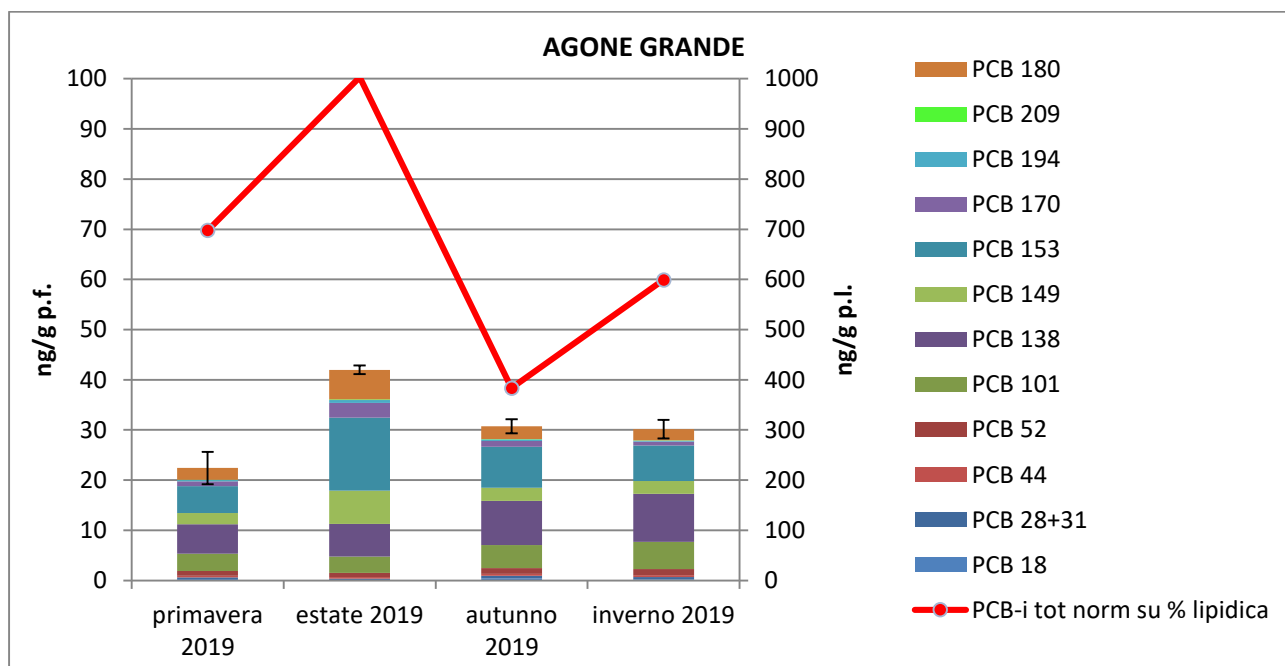


Fig. 7.9. Concentrazioni di PCB e dei relativi congeneri (ng g⁻¹ p.f. e ng g⁻¹ lip.) negli agoni grandi

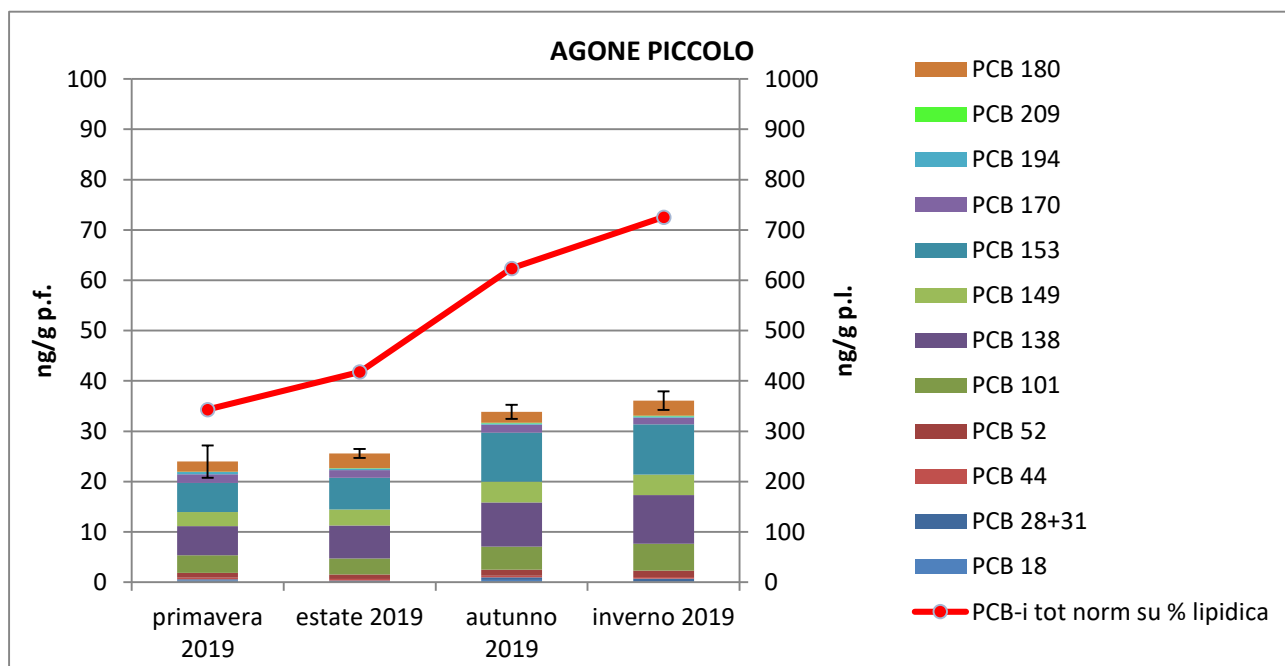


Fig. 7.10. Concentrazioni di PCB e dei relativi congeneri (ng g^{-1} p.f. e ng g^{-1} lip.) negli agoni piccoli

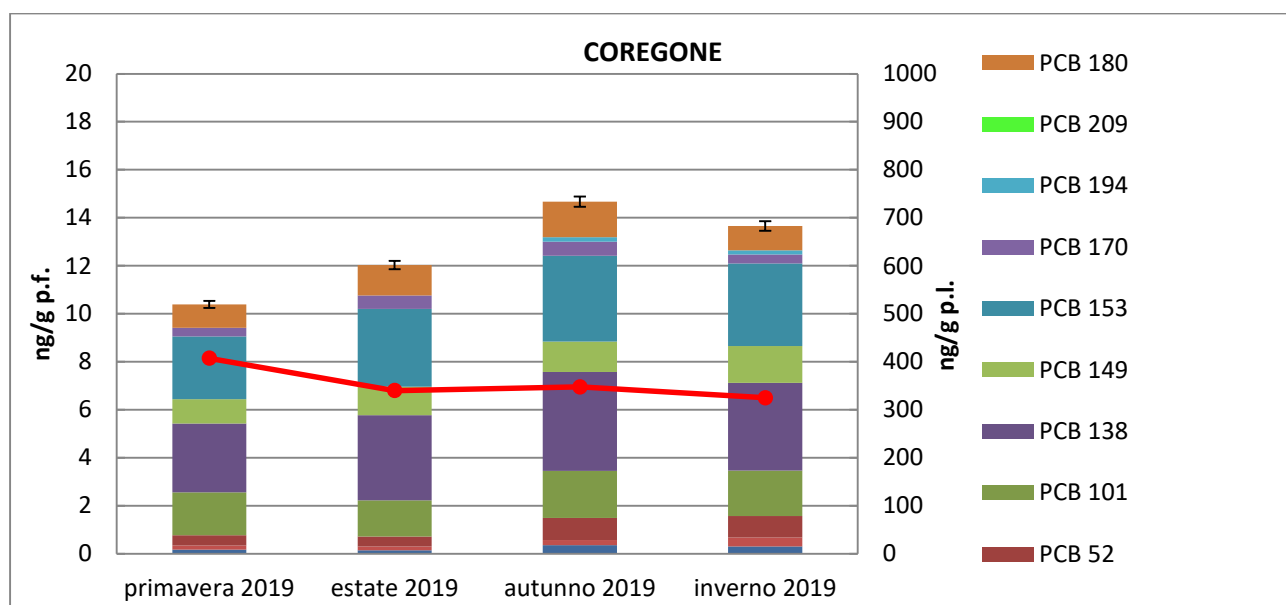


Fig. 7.11. Concentrazioni di PCB e dei relativi congeneri (ng g^{-1} p.f. e ng g^{-1} lip.) nei coregones

Anche per i PCB l'agone risulta la specie più contaminata come già osservato negli anni precedenti (CIP AIS, 2014; 2015; 2016; 2017; 2018); in questa indagine si sono misurate concentrazioni medie di PCB totali pari a $31,97 \pm 15,95$ e $29,88 \pm 5,98$ ng g^{-1} p.f. rispettivamente per gli agoni grandi e piccoli, mentre i campioni di coregone mostrano concentrazioni medie pari a $12,68 \pm 1,88$ ng g^{-1} p.f. Quindi la popolazione più contaminata è rappresentata dall'agone, il pesce grande supera di poco quello piccolo, le differenze nelle concentrazioni medie tra le popolazioni ittiche sono limitate.

L'andamento delle concentrazioni dei PCB è molto simile a quello dei DDX, confermando che i valori misurati dei PCB sono in buon equilibrio rispetto al loro contenuto di lipidi. Nessuna anomalia di concentrazione è stata osservata, ma è evidente che le concentrazioni medie si sono dimezzate negli agoni.

In nessun caso è stato superato il valore limite di $125 \text{ ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ fissato dal Regolamento U.E. 1259/2011 per la somma dei 6 PCB-i per il muscolo di specie ittiche selvatiche d'acqua dolce. I PCB-indicatori rappresentano mediamente tra l'80% e il 82% del totale dei PCB e quindi si confermano essere i principali congeneri presenti, con un contributo percentuale medio molto simile tra i diversi organismi considerati; i congeneri più abbondanti sono risultati essere in tutte le specie e classi di età i PCB 138 e PCB 153.

Per quanto concerne i PBDE, sono stati quantificati 8 congeneri, tra cui 6 congeneri da tri- a esa-BDE (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154), considerati dalla Direttiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo, recepita in Italia dal D.L. n.172/2015, che rappresentano anche i principali costituenti della miscela tecnica Penta-BDE. Altri due congeneri (BDE-183 e 209) sono stati qui considerati, in quanto altrettanto importanti negli studi sul monitoraggio e bioaccumulo, poiché sono i congeneri principali delle miscele tecniche Octa-BDE e Deca-BDE rispettivamente. Le concentrazioni di PBDE totali nelle specie ittiche considerate sono mostrate nelle figure 7.12, 7.13 e 7.14. Nei grafici sono state riportate le concentrazioni dei PBDE determinate sia su peso fresco per ciascun congenero che su base lipidica (linea rossa).

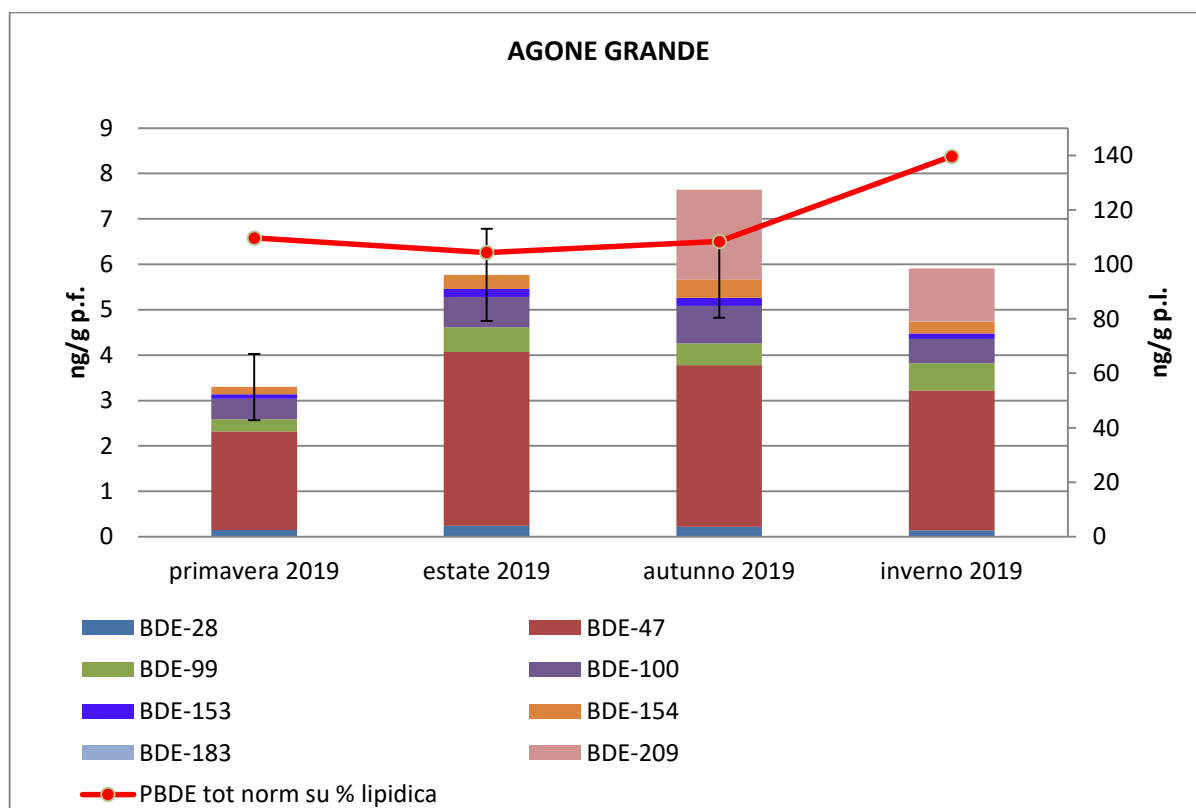


Fig. 7.12. Concentrazioni di PBDE e dei relativi congeneri ($\text{ng g}^{-1} \text{ p.f.}$ e $\text{ng g}^{-1} \text{ lip.}$) negli agoni grandi.

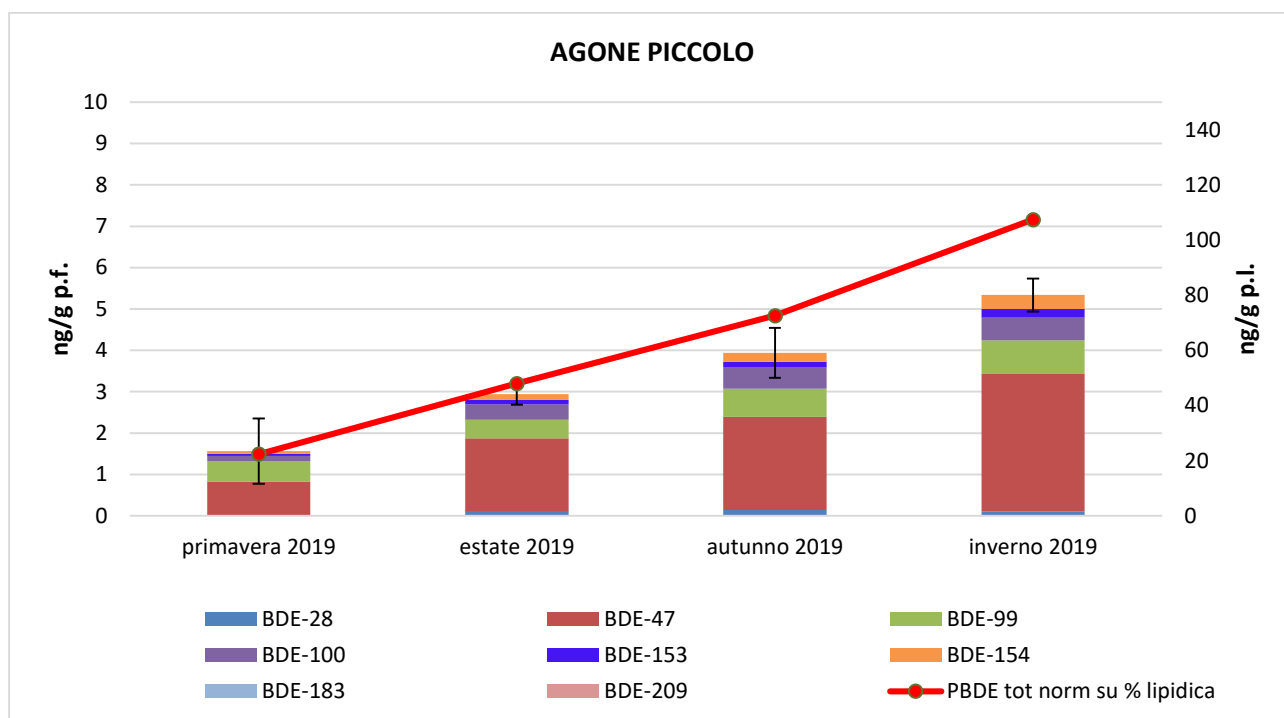


Fig. 7.13. Concentrazioni di PBDE e dei relativi congeneri (ng g^{-1} p.f. e ng g^{-1} lip.) negli agoni piccoli.

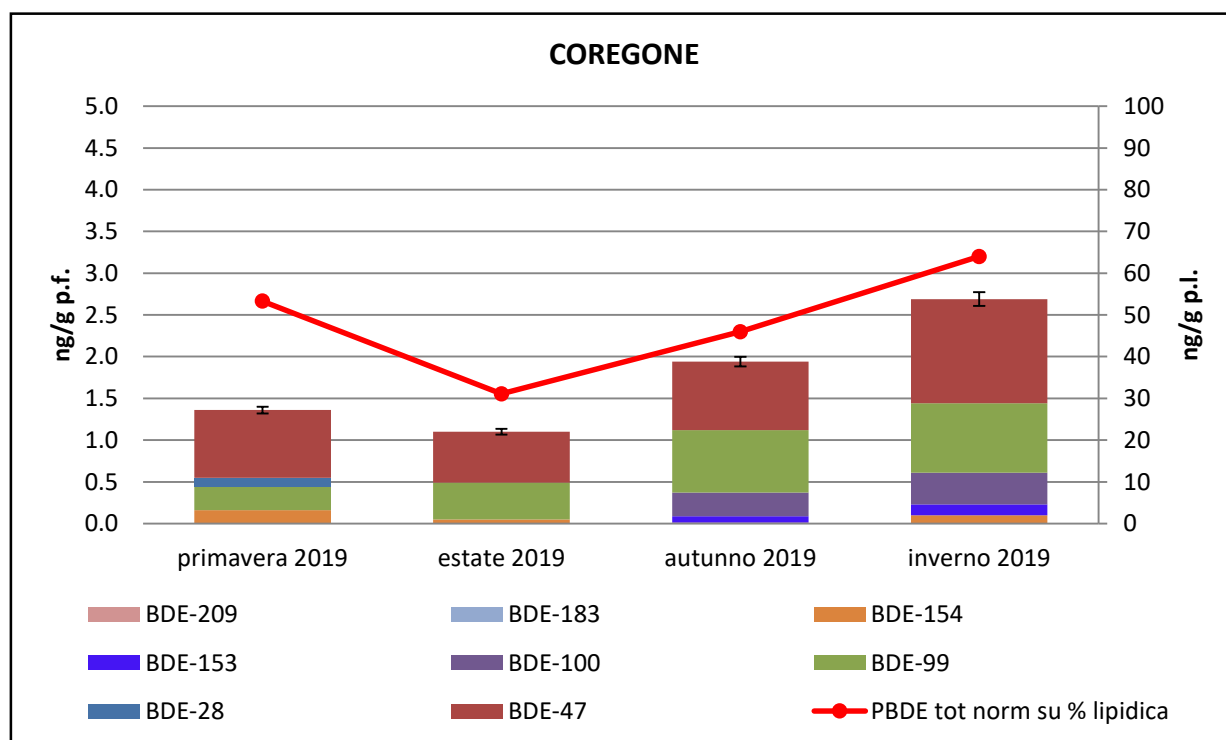


Fig. 7.14. Concentrazioni di PBDE e dei relativi congeneri (ng g^{-1} p.f. e ng g^{-1} lip.) nei coregoni.

Se si considerano le concentrazioni medie totali dei PBDE, l'agone risulta sempre la specie più contaminata e l'individuo adulto risulta meno variabile in concentrazione rispetto a quello giovane, soprattutto passando dalla primavera all'inverno 2019 sia sui dati in p.f. che su quelli normalizzati, se si considera la contaminazione normalizzata sul contenuto lipidico. I coregoni

invece sono risultati i pesci meno contaminati da PBDE e come per il DDx, l'autunno e l'inverno sono caratterizzati da un aumento di contaminazione dei coregoni.

Si sono misurate concentrazioni di PBDE totali pari a $4,83 \pm 1,28$ e $3,45 \pm 1,59$ ng g⁻¹ p.f. rispettivamente negli agoni grandi e piccoli, mentre le concentrazioni medie per i coregoni sono risultate pari a $1,77 \pm 0,78$ ng g⁻¹ p.f., in netto calo rispetto agli andamenti osservati negli anni precedenti 2015-2018 (CIP AIS, 2016; 2017; 2018; 2019).

I principali congeneri si confermano essere i tetra-BDE e i penta-BDE (mediamente BDE-47 = 50-65% e BDE-99=9-15% del totale) in entrambe le specie e le classi di età considerate. Questi congeneri sono caratterizzati dai più alti valori di bioaccumulo. Il BDE-183 è risultato invece praticamente assente, mentre il BDE-209 è presente in concentrazioni molto contenute solo nell'agone grande. La presenza di BDE-209 evidenzia la possibilità che questo composto venga bioconcentrato nelle specie ittiche e di essere biomagnificato nella catena trofica.

La Direttiva 2013/39/UE, recepita in Italia dal D.L. 172/2015 stabilisce per questi composti nel biota un valore limite pari a 8,5 pg g⁻¹ p.f. come standard di qualità ambientale della somma dei componenti della miscela Penta-BDE nel biota al fine di garantire un buono stato chimico delle acque superficiali. Questo valore è da considerarsi molto restrittivo, in quanto calcolato sulla base delle concentrazioni in acqua del BDE più tossico (BDE-44). L'applicazione di questo standard ambientale per la somma di BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154 porta al superamento del limite in tutti i campionamenti stagionali per le specie ittiche del Lago Maggiore considerate.

Per quanto concerne l'HBCD, utilizzato per la produzione del polistirene espanso in edilizia (Regolamento UE 2016/293), le concentrazioni sono risultate sempre appena sopra ai limiti di quantificazione (< 1 ng g⁻¹ p.f.) per gli agoni grandi e quindi rispettano la Direttiva 2013/39/UE sulla qualità idrica dei corpi idrici per il biota (167 ng g⁻¹ p.f.).

Il DBDPE, utilizzato come possibile sostituto del BDE-209, non è mai stato rilevato nei campioni ittici (LOQ = 10 ng g⁻¹ p.f.), probabilmente a causa del suo scarso uso nel bacino imbrifero considerato.

Come per gli anni passati anche nel 2019 è proseguita l'indagine volta alla determinazione della contaminazione da PCB *dioxin like* (dl-PCB) su agoni e coregoni del Lago Maggiore. L'attuale normativa (Direttiva 2013/39/UE, recepita in Italia dal D.L. n.172/2015) stabilisce un valore limite per lo standard di qualità ambientale per il biota pari a 6,5 pg TEQ g⁻¹ p.f. al fine di garantire un buono stato chimico delle acque superficiali. Si è riportato un commento sulla struttura chimica e tossicità dei dl-PCB e sul concetto di TEQ nel rapporto 2013 (CIP AIS, 2014).

Nelle figure 7.15 e 7.16 sono riportate le concentrazioni dei dl-PCB espresse in ng g⁻¹ p.f. e in pg TEQ g⁻¹ p.f. in agoni e coregoni raccolti stagionalmente nel corso del 2019. Il valore soglia di 6,5 pg TEQ g⁻¹ p.f. non è mai stato superato né negli agoni né nei coregoni. Va sottolineato, tuttavia, che il limite di 6,5 pg TEQ g⁻¹ p.f. è fissato, secondo la Direttiva, come somma dei dl-PCB più le diossine e i furani, quindi alla concentrazione dei dl-PCB andrebbe aggiunto il valore di diossine e furani che potrebbe portare ad un superamento della soglia prevista.

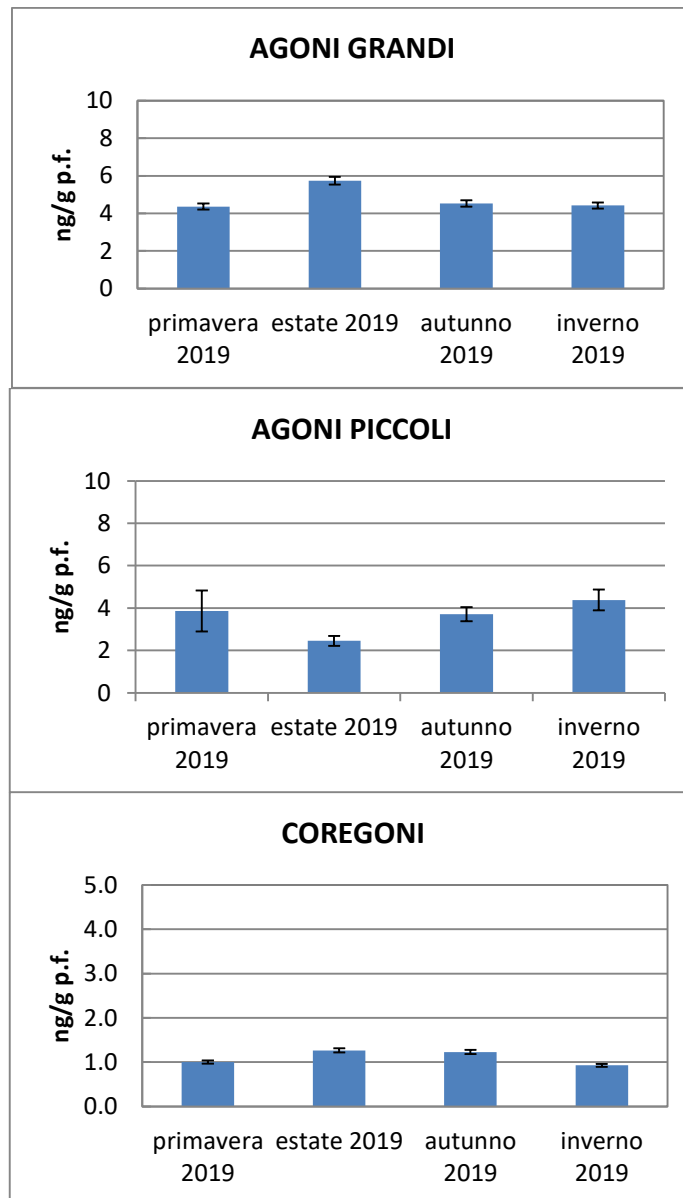


Fig. 7.15. Concentrazioni di dl-PCB totali (ng g⁻¹ p.f.) nelle specie ittiche considerate.

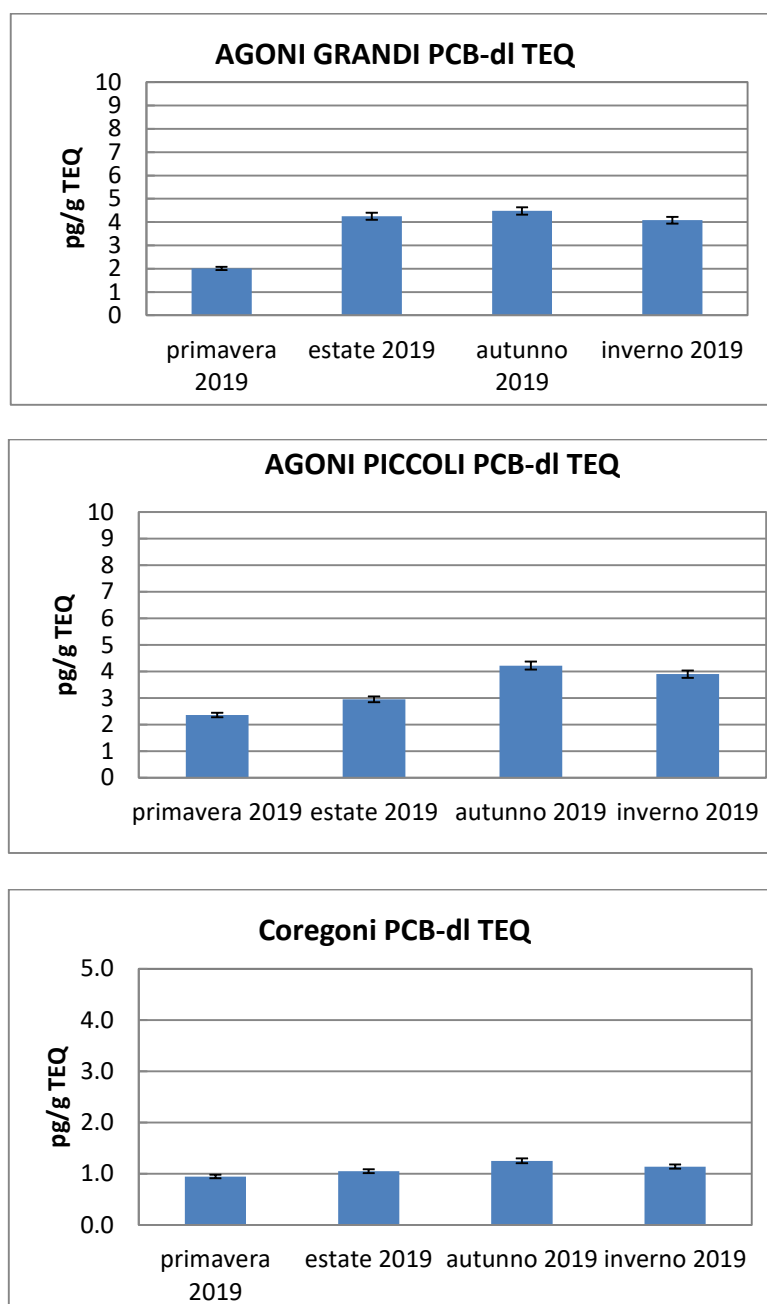


Fig. 7.16. Concentrazioni di DL-PCB TEQ equiv. (pg g^{-1} p.f.) nelle specie ittiche considerate.

Come si può osservare dai valori riportati dalle figure 7.15 e 7.16, l'agone risulta il pesce più contaminato da questa categoria di composti; non si osserva, in entrambe le specie, una differenza significativa di concentrazione nelle diverse classi di età, considerando la variabilità associata ai dati. Non è emerso, inoltre, un particolare andamento stagionale delle concentrazioni, i quattro campionamenti stagionali infatti hanno concentrazioni piuttosto simili, considerando la variabilità dell'analisi chimica.

Per evidenziare l'eventuale presenza di una correlazione statisticamente significativa tra le concentrazioni di dl-PCB e di PCB indicatori (esprese entrambe in ng g^{-1} p.f.), sono state confrontate le concentrazioni delle due serie di dati ottenute dalle analisi svolte nel 2019 nelle due specie considerate. I risultati sono mostrati in figura 18.

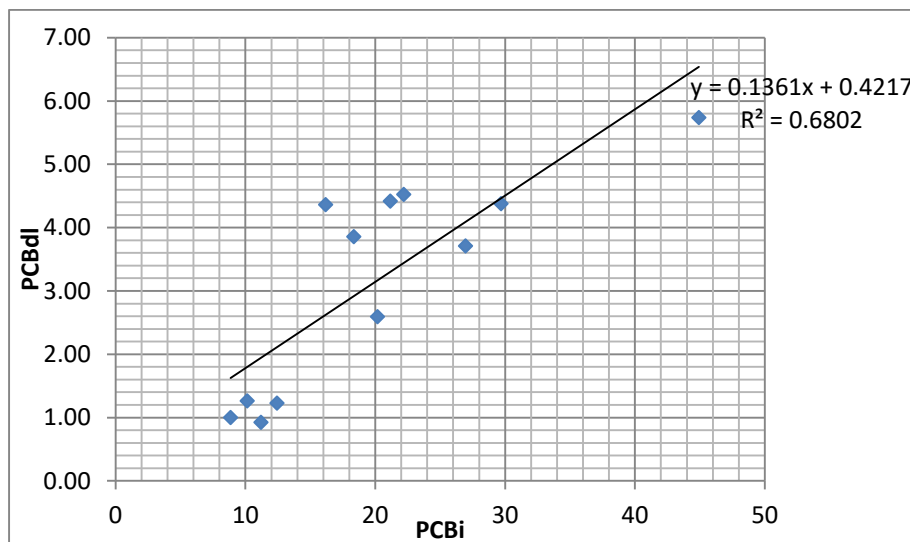


Fig. 7.17. Correlazione tra valori di concentrazioni di dl-PCB e PCB-i (ng g⁻¹ p.f.) in agoni e coregoni nel 2019.

Dalla elaborazione condotta (Figura 7.17) è emersa per agoni e coregoni una tendenza alla correlazione tra i due parametri che non è statisticamente significativa, probabilmente per la scarsità dei dati considerati e la ridotta variabilità dei dati stessi

Misura delle concentrazioni di mercurio totale (Hg)

L'analisi del mercurio totale è stata condotta su pool di tessuto muscolare (liofilizzato e omogeneizzato) di coregone lavarello (*Coregonus lavaretus*), agone (*Alosa fallax lacustris*) e gardon (*Rutilus rutilus*) prelevati a cadenza stagionale nel Bacino di Pallanza. L'analisi è stata condotta con lo strumento AMA254 (*Automated Mercury Analyzer*, FKV). L'accuratezza delle misure è stata verificata mediante analisi del materiale certificato BCR278 *Mussel tissue*, del *Bureau Communautaire de Référence*, per il quale si è ottenuto il valore medio (n = 3) di 0,17 mg kg⁻¹ Hg, con un recupero medio del 92% rispetto al valore certificato. Ogni campione è stato analizzato in triplo, con un coefficiente di variazione percentuale (deviazione standard/valore medio; C.V.%) ≤ 5%.

Le concentrazioni risultano comprese tra 0,045 e 0,187 mg kg⁻¹ Hg p.f. (rispettivamente nel coregone invernale e nell'agone grande primaverile) (Figura 7.18).

Confrontando le tre specie, i valori più elevati sono stati riscontrati per gli agoni e, come osservato nelle precedenti campagne, il pool di individui di taglia minore presenta concentrazioni significativamente più basse rispetto agli individui più grandi (CIPAIS, 2019). Negli agoni piccoli, i valori primaverile ed estivo sono in linea con quelli degli anni precedenti, mentre nelle stagioni successive (autunno e inverno) le concentrazioni di 0,142 mg kg⁻¹ p.f. sono tendenzialmente più elevate rispetto a quelle riscontrate nello scorso triennio di attività (media dei valori autunnali e invernali 2016-2018: 0,105±0,029 mg kg⁻¹ p.f.) (CIPAIS, 2019) e in linea soltanto con quelle registrate nell'inverno 2017 (0,157 mg kg⁻¹ p.f.). Anche per l'agone grande i valori sono generalmente più elevati (media delle quattro stagioni: 0,171±0,017 mg kg⁻¹ p.f.) rispetto a quelli dello scorso triennio (media dei valori 2016-2018: 0,150±0,048 mg kg⁻¹ p.f.) (CIPAIS, 2019)

Le stesse considerazioni valgono per i gardon: le concentrazioni (media delle quattro stagioni: 0,106±0,049 mg kg⁻¹ p.f.) sono tendenzialmente più elevate rispetto a quanto osservato nelle

campagne precedenti (media dei valori 2016-2018: $0,064 \pm 0,016 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.f.}$) e mostrano un picco anomalo di $0,179 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.f.}$ per l'inverno. Quest'ultimo dato sarebbe il più elevato di tutta la serie storica disponibile. In assenza di evidenze altrettanto forti per gli altri pesci e per altri comparti ambientali (sedimenti, organismi macrobentonici), il dato va al momento considerato come un outlier.

I valori per i coregoni sono invece in linea con quelli registrati nello scorso triennio (CIPAIS, 2019).

Confrontando le concentrazioni con lo Standard di Qualità Ambientale per il biota previsto dalla Direttiva europea 2013/39/UE e dalla normativa italiana (D. Lgs. 172/2015), tutti i dati risultano ampiamente superiori al valore soglia di $0,02 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.f. Hg}$, che prende in considerazione la protezione dei predatori terminali delle catene alimentari dal rischio di avvelenamento secondario. Questo risultato conferma i risultati precedenti (CIPAIS, 2019) e quanto osservato in diversi ecosistemi acquatici europei, anche non direttamente interessati da sorgenti di contaminazione (es. Lepom et al., 2012; EEA, 2018).

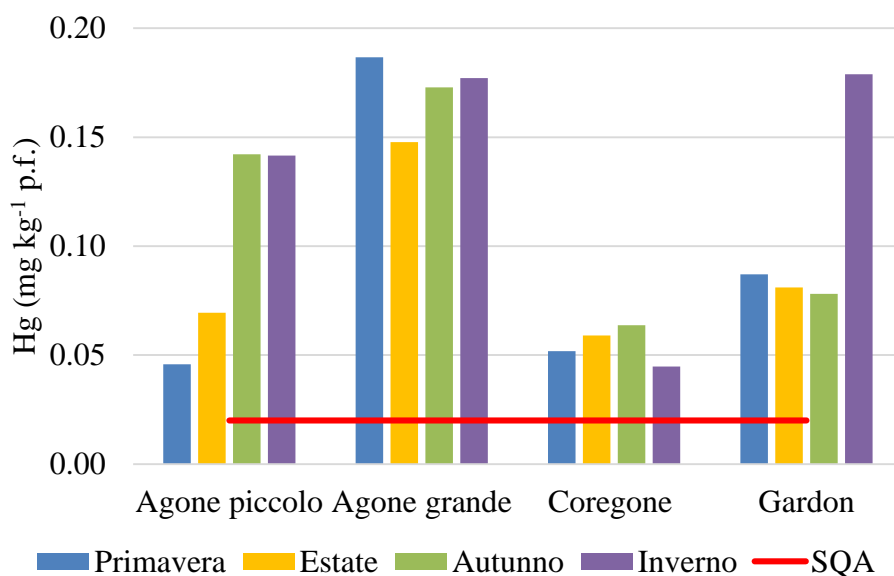


Figura 7.18. Concentrazioni di mercurio nelle tre specie ittiche del Lago Maggiore in diverse stagioni di campionamento del 2019. I risultati sono espressi su peso fresco. La linea rossa rappresenta lo Standard di Qualità Ambientale (SQA) per il biota secondo la normativa europea 2013/39/UE e italiana (D. Lgs. 172/2015), pari a $0,02 \text{ mg Hg kg}^{-1} \text{ p.f.}$.

Bibliografia

- Bloom N.S., 1992. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 49: 1010-1017.
- CIPAIS. 2013. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2008-2012. Rapporto annuale 2012. Rapporto finale 2008-2012.
- CIPAIS. 2014. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. Rapporto annuale 2013.
- CIPAIS. 2015. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. Rapporto annuale 2014
- CIPAIS. 2016. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2013-2015. Rapporto annuale 2015 e rapporto triennale 2013-2015.
- CIPAIS. 2017. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2016.
- CIPAIS. 2018. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2017.
- CIPAIS. 2019. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2018.
- Decreto Legislativo 172/2015. Attuazione della Direttiva 2013/39/UE, che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque. Decreto Legislativo 13 ottobre 2015, n. 172. Gazzetta Ufficiale anno 156, numero 250.
- EEA, European Environmental Agency, 2018. European waters. Assessment of status and pressures 2018. EEA Report No 7/2018
- Guzzella L.M., Novati S., Casatta N., Roscioli C., Valsecchi L., Binelli A., Parolini A., Solcà N., Bettinetti R., Manca M., Mazzoni M., Piscia R., Volta P., Marchetto A., Lami A., Marziali L., 2018. Spatial and temporal trends of target organic and inorganic micropollutants in Lake Maggiore and Lake Lugano (Italian-Swiss water bodies): contamination in sediments and biota. *Hydrobiologia*, online (<https://doi.org/10.1007/s10750-017-3494-7>)
- Lepom P., Irmer U., Wellmitz J., 2012. Mercury levels and trends (1993–2009) in bream (*Abramis brama* L.) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from German surface waters. *Chemosphere* 86: 202-211.
- Regolamento UE 1259/2011 sui tenori massimi dei PCB diossina-simili e dei PCB non diossina-simili nei prodotti alimentari.
- Regolamento UE 2016/293, recante modifica del regolamento CE n. 850/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo agli inquinanti organici persistenti per quanto concerne l'allegato I.
- SANCO, 2011. Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document n. SANCO/12495/2011, 44 pp.
- Volta P., P. Tremolada, M.C. Neri, G. Giussani & S. Galassi, 2009. Age-dependent bioaccumulation of organochlorine compounds in fish and their selective biotransformation in top predators from Lake Maggiore (Italy). *Water, Air & Soil Pollution*, 197: 193-209.

8. EFFECT-BASED METHODS SU DUE SPECIE ITTICHE CAMPIONATE IN QUATTRO TRIBUTARI

Andrea Binelli, Camilla Della Torre, Università degli Studi di Milano

Pietro Volta, CNR-IRSA, Verbania Pallanza

Presupposti e motivazioni

Le analisi chimiche sono uno strumento necessario nelle indagini ambientali perché valutano in modo quali-quantitativo la presenza di contaminanti, tuttavia non riescono a fornire informazioni riguardo ai loro effetti nei confronti degli organismi, che rappresentano la parte più importante in un ecosistema. Perciò, un'analisi di rischio ambientale efficace deve prevedere un'estesa valutazione del trasferimento dei contaminanti dalle matrici abiotiche alle componenti biologiche (biodisponibilità) ed i loro potenziali effetti ecotossicologici.

Al fine di definire il rischio ambientale, in linea con le direttive comunitarie e sulla base delle più recenti acquisizioni scientifiche in materia, è necessario quindi integrare le informazioni derivanti dalla valutazione del grado ed estensione della contaminazione con quelle provenienti dall'analisi dell'accumulo dei contaminanti nel biota e da indagini ecotossicologiche rivolte alla valutazione dei loro effetti a diversi livelli di complessità biologica.

Mediante l'utilizzo di un approccio basato sull'utilizzo di marcatori biologici di esposizione ed effetto, noti come *effect-based methods*, misurati in organismi-sentinella è possibile definire scenari espositivi e individuare le potenziali ripercussioni a livello di organismo, popolazione e comunità.

Il monitoraggio ambientale si è, infatti, arricchito di nuove tecniche d'indagine, che permettono d'individuare e comprendere gli eventi intermedi tra l'esposizione all'inquinante e l'osservazione del danno biologico. Tale metodologia viene definita come *biomarker approach*.

Con il termine *biomarker* si intende “la variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione) la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti” (Depledge, 1994).

Tale approccio ecotossicologico si basa sul fatto che l'esposizione a un contaminante determina un effetto primario a livello molecolare e biochimico e successivamente, mediante un meccanismo a cascata, ai livelli superiori di complessità strutturale, fino alla popolazione e comunità. Nello stesso tempo, l'organismo attiva delle risposte adattative nel tentativo di compensare l'azione tossica dell'inquinante per riportare il sistema ad uno stato di equilibrio omeostatico (Fossi, 1998).

L'applicazione dei *biomarker* in ambiente fornisce, quindi, una risposta che integra tutte le diverse vie di assunzione del contaminante e le eventuali interazioni di esso con altre sostanze presenti nel sito campionato, costituendo uno strumento sia diagnostico, in quanto permettono di valutare lo stato di salute di un organismo bioindicatore, sia prognostico, predicendo in tempi rapidi conseguenze future a più ampia scala (Fossi, 1998).

I vantaggi nell'applicazione di questo tipo di approccio sono molteplici (Fossi 2000):

- fornisce una risposta rapida e sintetica dell'esposizione al contaminante, permettendo di formulare una previsione del pericolo potenziale a cui è sottoposto l'organismo bioindicatore;
- permette di verificare la correlazione tra l'esposizione e l'effetto biologico per composti che non sono bioaccumulabili o che sono rapidamente metabolizzati ed eliminati dall'organismo;
- permette di valutare l'effetto cumulativo della miscela d'inquinanti su un particolare bersaglio;

- mostra sensibilità anche a concentrazioni non elevate dell'inquinante.

Poiché mai è stata eseguita una campagna di monitoraggio, in ambito CIP AIS, utilizzando questo tipo di approccio, nel Progetto 2019-2021 si è ritenuto di cominciare ad utilizzare anche questo tipo di approccio per valutare la contaminazione e i suoi effetti su due specie ittiche (cavedano, *Squalius squalus*; trota fario, *Salmo trutta*) campionate in quattro diversi tributari (Boesio, Margorabbia, San Giovanni e Toce) del Verbano.

Nell'ambito del monitoraggio delle specie ittiche dei tributari del L. Maggiore sono stati analizzati i seguenti biomarkers:

- enzimi di detossificazione: Etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) e glutatione-S-transferasi (GST)
- enzimi antiossidanti: Superossido dismutasi (SOD), Catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GPx)

Il set di biomarker indagati è stato selezionato in ragione del fatto che il sistema detossificante e antiossidante rappresentano le prime risposte compensative, che vengono innescate a livello cellulare, in risposta a una esposizione a contaminanti ambientali di diverso tipo. A causa della situazione sanitaria venutasi a creare negli ultimi mesi non è stato possibile svolgere le analisi relative all'enzima AChE (*biomarker* di neurotossicità), della perossidazione lipidica e carbonilazione proteica (danno ossidativo) e dei micronuclei (*biomarker* di genotossicità) inizialmente previste nel progetto.

Metodi

Campionamento

Il prelievo dei pesci è avvenuto nel mese di luglio 2019 nei seguenti tributari: Boesio, Margorabbia, San Giovanni e Toce. L'attività di campionamento ha coinvolto 3 operatori dell'IRSA di Pallanza e 3 operatori dell'Università degli Studi di Milano e ha previsto l'utilizzo di un elettrostorditore spallabile (modello ELT60IIGI, *Scubla aquaculture*, 1300 W, 600 V) in modalità "corrente continua". Come anodo è stato utilizzato un anello metallico (diametro 35 cm) montato su un manico in vetroresina della lunghezza di 2 metri, mentre come catodo è stata impiegata una treccia in rame della lunghezza di 2 metri.

Per tutti e quattro i corpi idrici il campionamento è stato effettuato lungo il gradiente valle-monte per una lunghezza complessiva di 200 metri circa ogni transetto. La scelta del transetto ha tenuto conto della maggiore eterogeneità d'habitat possibile (raschi, pozze, rifugi, ecc.).

Una volta prelevati, per ogni singolo individuo sono stati registrati lunghezza totale (cm) e peso totale (g). E' stato effettuato, inoltre, un prelievo di sangue dagli archi branchiali, da cui è stato ottenuto uno striscio ematico su vetrino. Successivamente i pesci sono stati sacrificati e sono stati prelevati fegato e cervello, mantenuti in ghiaccio secco per il successivo trasporto in laboratorio. Le analisi biochimiche sono state svolte su ogni singolo individuo, per un totale di 48 campioni analizzati (Tabella 8.1).

Tabella 8.1 Elenco degli esemplari di cavedano e trota fario campionati nei tributari e caratteristiche.
nd (non determinato)

Tributario	Codice	Specie	Lunghezza (cm)	Peso (g)	Età (anni)	Sesso
S. Giovanni	SG-T1	Trota fario	38	563	4	M
S. Giovanni	SG-T2	Trota fario	29	312	2	M
S. Giovanni	SG-T3	Trota fario	24	125	2	M
S. Giovanni	SG-T4	Trota fario	27,5	227	3	F
S. Giovanni	SG-T5	Trota fario	21	125	2	nd
S. Giovanni	SG-T6	Trota fario	21,5	103	2	F
S. Giovanni	SG-C1	Cavedano	48	1320	10	M
S. Giovanni	SG-C2	Cavedano	50	1539	9	F
S. Giovanni	SG-C3	Cavedano	52	1807	8	F
S. Giovanni	SG-C4	Cavedano	45	1226	11	M
S. Giovanni	SG-C5	Cavedano	48	1027	10	M
S. Giovanni	SG-C6	Cavedano	48	1132	10	M
Boesio	BO-T1	Trota fario	44,3	590,44	3	F
Boesio	BO-T2	Trota fario	32,9	289,2	3	M
Boesio	BO-T3	Trota fario	33,5	320,4	3	F
Boesio	BO-T4	Trota fario	31,4	282,6	3	F
Boesio	BO-T5	Trota fario	25,1	128	3	F
Boesio	BO-T6	Trota fario	20	77,2	1	M
Boesio	BO-C1	Cavedano	46	826	9	F
Boesio	BO-C2	Cavedano	44,3	745	10	F
Boesio	BO-C3	Cavedano	52,9	1295	10	F
Boesio	BO-C4	Cavedano	36,5	661	7	M
Boesio	BO-C5	Cavedano	46,6	720	9	F
Boesio	BO-C6	Cavedano	47,4	822	11	F
Margorabbia	M-T1	Trota fario	26,9	149	3	M
Margorabbia	M-T2	Trota fario	22,2	95,76	2	M
Margorabbia	M-T3	Trota fario	21,6	98,6	2	M
Margorabbia	M-T4	Trota fario	24	113,1	3	F
Margorabbia	M-T5	Trota fario	21,8	87	2	nd
Margorabbia	M-T6	Trota fario	18,8	54,2	2	F
Margorabbia	M-C1	Cavedano	53,4	1178,7	10	F
Margorabbia	M-C2	Cavedano	54,5	1484	11	F
Margorabbia	M-C3	Cavedano	51,4	1141,2	9	F
Margorabbia	M-C4	Cavedano	50	857,5	8	F
Margorabbia	M-C5	Cavedano	49,9	1049,9	8	M
Margorabbia	M-C6	Cavedano	54,6	1150,6	10	F
Toce	T-C1	Cavedano	49,5	1634	11	F
Toce	T-C2	Cavedano	53	1708	10	F
Toce	T-C3	Cavedano	48	1312	10	F
Toce	T-C4	Cavedano	60	2430	11	F
Toce	T-C5	Cavedano	53	2320	11	F
Toce	T-C6	Cavedano	46	1036	11	M
Toce	T-T1	Trota fario	30	311,3	3	F
Toce	T-T2	Trota fario	17,5	48,5	2	M
Toce	T-T3	Trota fario	23	104,6	3	nd
Toce	T-T4	Trota fario	23	100,6	2	M
Toce	T-T5	Trota fario	24,5	135,4	3	M
Toce	T-T6	Trota fario	24	135,8	3	M

Analisi Biochimiche

Un'aliquota di tessuto epatico è stata prelevata da ciascun individuo e omogenizzata in buffer fosfato -aggiunto in rapporto 1:10 (peso/volume)- 100 mM (KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) attivato con ditionitrotolo 100 mM e inibitori delle proteasi. Gli omogenati sono stati successivamente centrifugati 30 min a 12000 rpm a 4 °C. I surnatanti ottenuti (frazione S15) sono stato poi aliquotati e conservati a -80 °C per le successive analisi enzimatiche.

- **Attività EROD:** in provette micro-eppendorf sono stati trasferiti 158,5 µL di Tris 50 mM, 50 µL di BSA (5,32 g mL⁻¹ in Tris 50 mM), 12,5 µL di 7-etossiresorufina (ER 100 µM), 10 µL di campione e 19 µL di NADPH (6,7 mM). La reazione è avvenuta al buio per 20 minuti a 37 °C in bagno termostato, le eppendorf sono state poi messe in ghiaccio e addizionate di 200 µL di glicina 2 M per far terminare la reazione. Dopo uno spin di qualche minuto, 250 µL di surnatante sono stati trasferiti in un 96-multi-well plate e la fluorescenza è stata letta a $\lambda_{ex}= 535$ e $\lambda_{em}= 590$ nm tramite l'EnSight™ multimode plate reader. Nello stesso plate sono stati analizzati anche un bianco in triplicato (250 µL di Tris 50 Mm). Il metodo di determinazione dell'attività EROD si basa sulla misura della quantità di resorufina prodotta mediante fluorescenza basandosi su una curva standard di resorufina (0,001 - 1 µM $r^2>0,90$). Ciascun campione è stato analizzato in triplo. L'attività è espressa come pmol resorufina prodotta /min/mg proteine).

- **GST:** l'attività della GST è stata misurata in cuvette da 1,5 mL in plastica, al cui interno sono stati inseriti 880 µL di buffer fosfato 100 mM (pH 7,4), 50 µL di GSH 20 mM, 50 µL di CDNB (1Cl-2,4-dinitrobenzene) 20 mM e 10 µL di campione (in triplicato). La differenza di assorbanza (ΔOD) è stata misurata allo spettrofotometro (Jenway, modello 6715B0) per 1 minuto contro il bianco (1 mL di buffer fosfato) a 340 nm. L'attività è espressa come µmoli/min/mg proteine.

- **SOD:** l'attività della SOD è stata misurata in cuvette da 1,5 mL in plastica al cui interno sono stati inseriti 1280 µL di buffer fosfato 50 mM + EDTA (pH 7,8), 50 µL di ipoxantina 1,5 mM, 50 µL di citocromo C 0,3 mM, 30 µL di acqua deionizzata, 10 µL di campione (in triplicato). Dopo 3 minuti di incubazione a temperatura ambiente al buio sono stati aggiunti 50 µL di XOD (xantina ossidasi) 56,1 mU mL⁻¹. La lettura è stata effettuata allo spettrofotometro a 550 nm, misurando la ΔOD per 1 minuto contro il bianco (40 µL di buffer di omogeneizzazione attivo al posto del campione). I risultati sono stati espressi come unità di attività (U SOD), che si definisce come la quantità di enzima necessario per inibire del 50% la velocità di riduzione del citocromo C.

- **CAT:** l'attività della CAT è stata misurata in cuvette da 3 mL in quarzo al cui interno sono stati inseriti 1950 µL di buffer fosfato 100 mM (pH 7), 1000 µL di H₂O₂ 150 mM e 10 µL di campione (in triplicato). La lettura è stata effettuata allo spettrofotometro a 240 nm, misurando la ΔOD per 1 minuto contro il bianco (3 mL di buffer fosfato). L'attività è espressa come µmoli/min/mg proteine.

- **GPx:** l'attività della GPx è stata misurata in cuvette da 1,5 mL in plastica al cui interno sono stati inseriti 500 µL di buffer fosfato 100 mM (pH 7), 120 µL di acqua deionizzata, 50 µL di GSH 40 mM, 50 µL di NaN₃ 20 mM, 50 µL di GR (glutazione reductasi) 40 U mL⁻¹, 10 µL di campione (in triplicato). Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente al buio sono stati aggiunti 50 µL di NADPH 2,4 mM e dopo un'ulteriore incubazione di 1 minuto a temperatura ambiente al buio sono stati aggiunti 100 µL di H₂O₂ 150 mM. La lettura è stata effettuata allo spettrofotometro a 340 nm, misurando la ΔOD per 1 minuto contro il bianco (750 µL di buffer fosfato pH 7, 100 µL di acqua deionizzata, 50 µL di GSH, 50 µL di NaN₃, 50 µL di GR).

L'attività è espressa come µmoli/min/mg proteine.

Tutte le attività enzimatiche sono state normalizzate sulla quantità di proteine estratte da ogni campione, calcolata mediante il metodo colorimetrico di Bradford (1976). La quantità di proteine è stata calcolata tramite una retta di taratura costituita da diluizioni seriali (da 0,1 a 0,5 mg mL⁻¹ ,

$r^2 > 0,90$) di albumina di siero bovino, leggendo l'assorbanza a 595 nm allo spettrofotometro (Jenway, modello 6715B0).

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software R (versione 3.6.3). Dopo aver saggiato l'omoschedasticità dei dati mediante il test di Shapiro-Wilk e l'omogeneità della varianza mediante il test di Levene, la significatività è stata valutata mediante analisi della varianza a una via (ANOVA), utilizzando i quattro gruppi sperimentali (Boesio, Margorabbia, San Giovanni, Toce) come variabile indipendente e le attività enzimatiche come variabili dipendenti. Le differenze significative tra i gruppi sperimentali sono state identificate mediante il test *post-hoc* di Fisher LSD, considerando come significativo un valore di $p < 0,05$.

Risultati

Cavedano

L'analisi degli enzimi di detossificazione non evidenzia differenze significative tra gli esemplari di cavedano dei diversi tributari. I profili delle due attività EROD e GST sono molto sovrapponibili e mostrano per gli esemplari del Margorabbia i livelli di attività più bassi rispetto agli altri fiumi (Fig. 8.1 e 8.2). Anche i risultati degli enzimi antiossidanti non evidenziano differenze significative tra i campioni prelevati nei diversi tributari (Fig. 8.3, 8.4 e 8.5). E' da notare come la misura dei diversi *biomarkers* sia stata eseguita su ogni singolo esemplare, scelta che ha portato a essere molto protettivi nei confronti della variabilità biologica, ma che ha inevitabilmente determinato un aumento della dispersione dei dati, come evidenziato dall'ampia deviazione standard ottenuta.

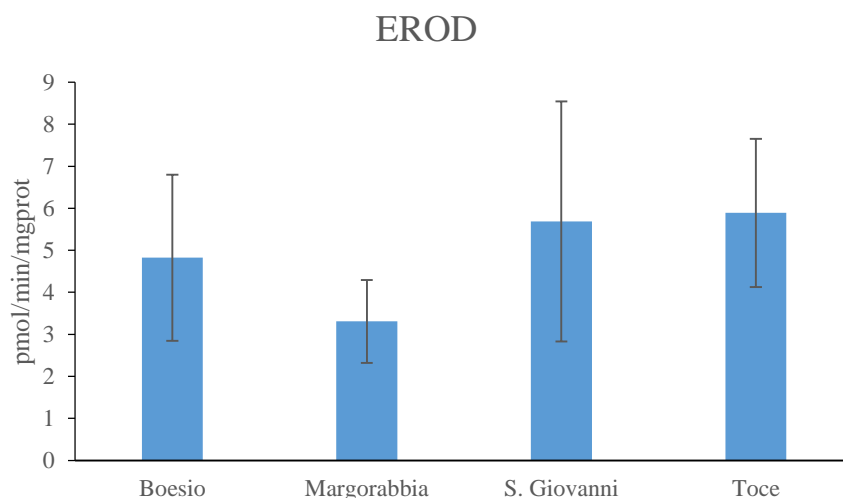


Fig.8.1. Attività EROD (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di cavedano campionati nei tributari del L. Maggiore

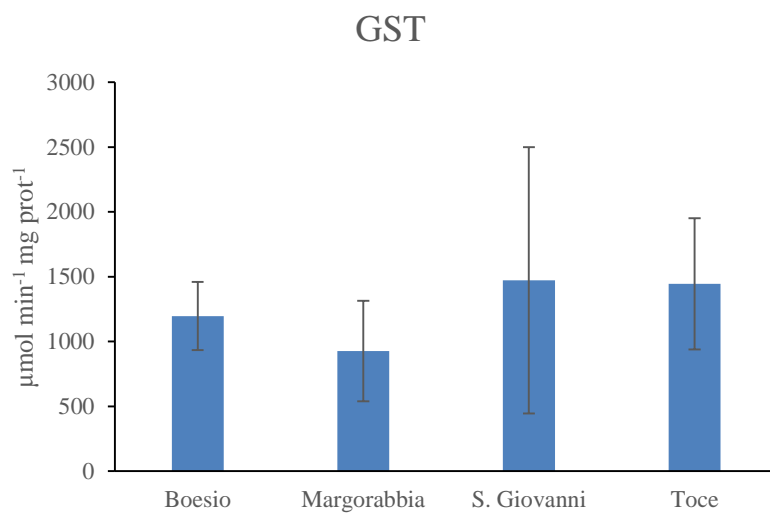


Fig. 8.2. Attività GST (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di cavedano campionati nei tributari del L. Maggiore

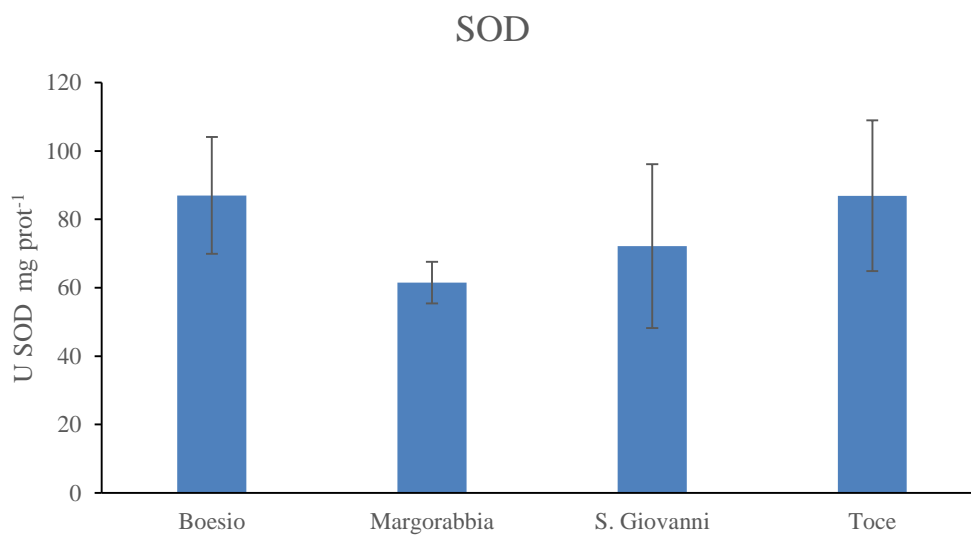


Fig. 8.3. Attività SOD (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di cavedano campionati nei tributari del L. Maggiore

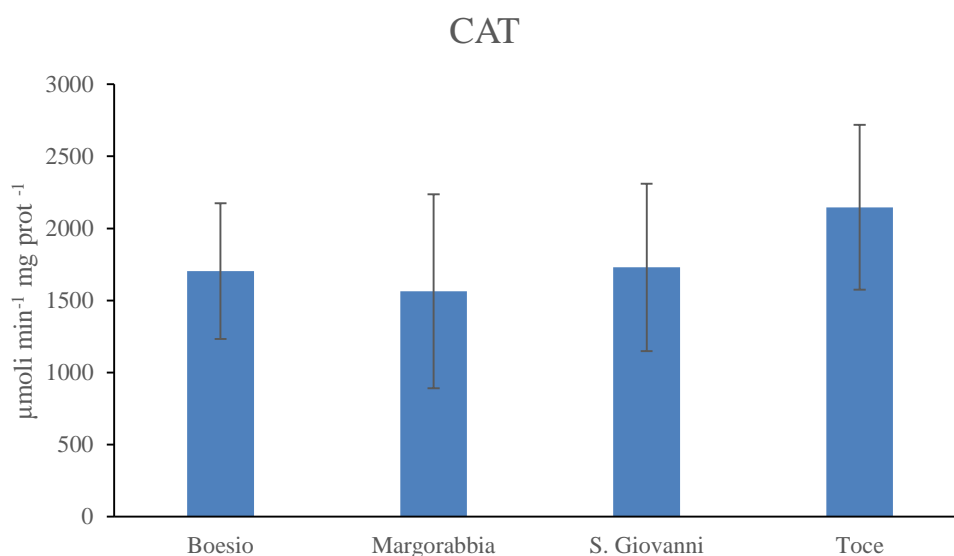


Fig. 8.4. Attività CAT (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di cavedano campionati nei tributari del L. Maggiore

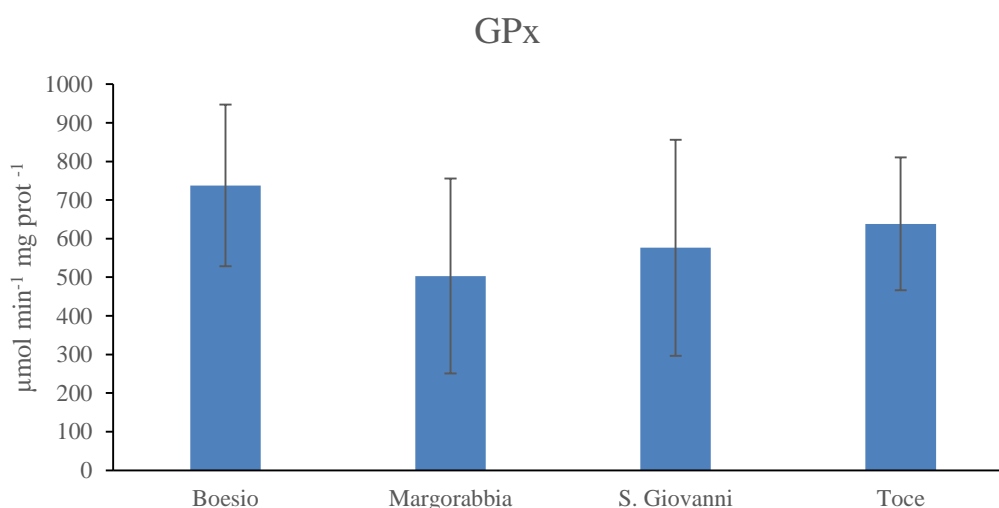


Fig.8.5. Attività GPx (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di cavedano campionati nei tributari del L. Maggiore

I dati biochimici ottenuti sono in linea con quanto evidenziato attraverso le analisi chimiche dei contaminanti prioritari misurati negli stessi esemplari, che per questa specie non hanno evidenziato delle particolari differenze tra i diversi tributari, tali da suggerire situazioni critiche, almeno per questa specie (vedi capitolo 4).

Trota fario

L'analisi degli enzimi di detossificazione non ha evidenziato differenze significative tra gli esemplari di trota fario dei diversi tributari (Fig 8.6, 8.7). Al contrario, i risultati degli enzimi antiossidanti mostrano come nel Boesio ci sia un'attività SOD significativamente più bassa rispetto agli esemplari del Margorabbia e San Giovanni (Fig. 8.8). Inoltre, gli esemplari del Boesio presentano un'attività GPx significativamente più elevata rispetto agli altri tre tributari (Fig. 8.10). L'attività CAT, invece non ha evidenziato differenze tra i diversi tributari (Fig. 8.9).

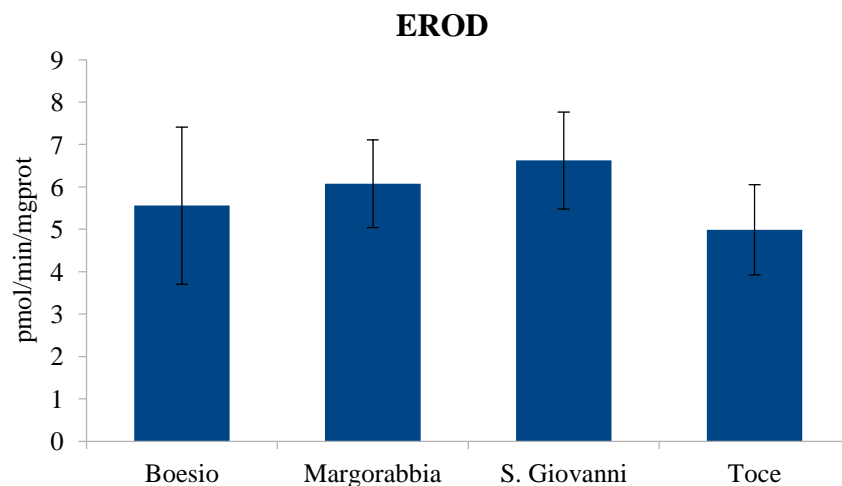


Fig.8.6. Attività EROD (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di trota fario campionati nei tributari del F. Maggiore

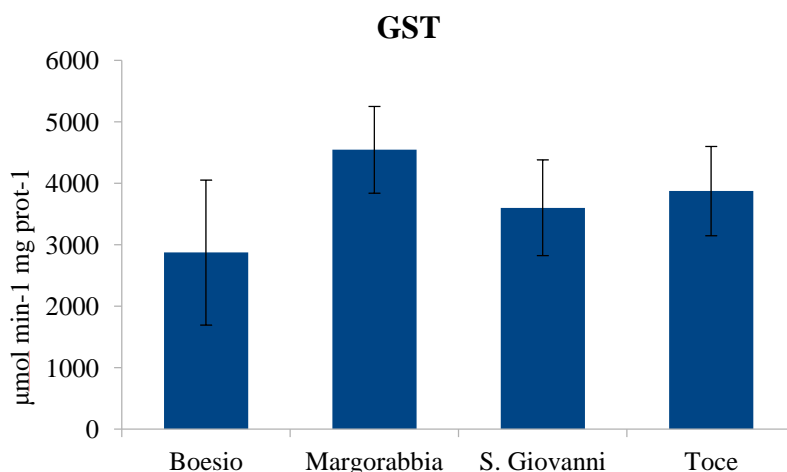


Fig.8.7. Attività GST (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di trota fario campionati nei tributari del L. Maggiore

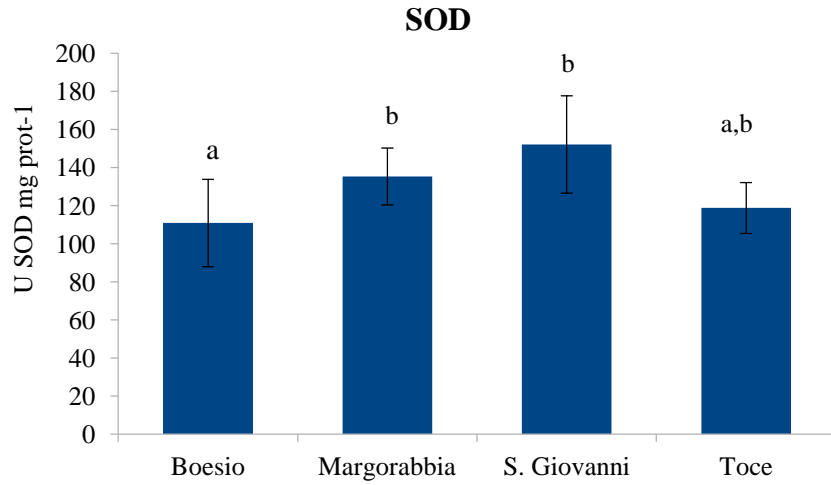


Fig.8.8. Attività SOD (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di trota fario campionati nei tributari del L. Maggiore

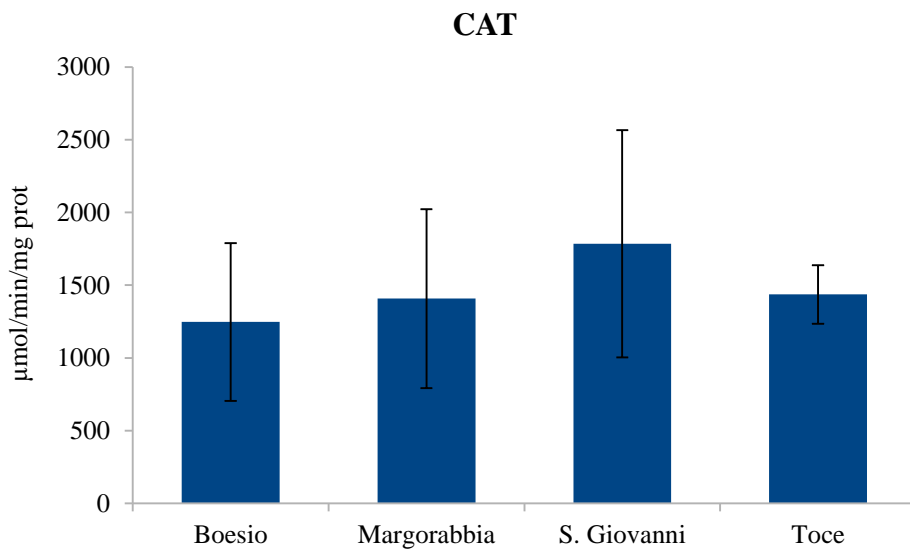


Fig. 8.9. Attività CAT (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di trota fario campionati nei tributari del L. Maggiore

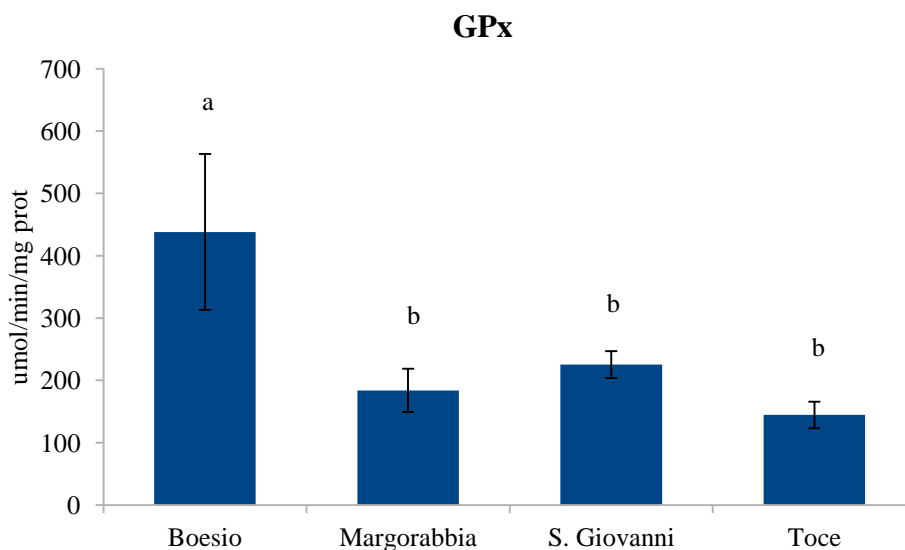


Fig. 8.10. Attività GPx (media±deviazione standard) misurata negli esemplari di trota fario campionati nei tributari del L. Maggiore

I risultati ottenuti sono poco indicativi anche se, comparando anche i dati chimici, è possibile presupporre che gli esemplari residenti nel Boesio sia soggetti a una condizione di stress ossidativo (Fig. 8.8 e 8.10). La SOD è il primo enzima antiossidante ad essere coinvolto nel controbilanciare la tossicità delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), catalizzando la dismutazione di O_2^- in ossigeno molecolare e H_2O_2 . La sua inibizione rispetto agli esemplari campionati negli altri fiumi potrebbe, dunque, suggerire che i contaminanti presenti e biodisponibili in questo tributario siano in grado di determinare una sovrapproduzione di O_2^- nei pesci, la cui tossicità non può essere tamponata dall'attività dell'enzima. Il dato è supportato anche dal risultato dell'attività GPx, che risulta significativamente più elevata nel Boesio rispetto agli altri tributari. La discrepanza nella risposta dei due enzimi è probabilmente dovuta al fatto che il sistema di difesa antiossidante si basa su una serie di reazioni a cascata, per cui la GPx è deputata alla successiva degradazione del perossido di idrogeno prodotto dall'attività della SOD e, quindi, potrebbe mostrare un effetto d'inibizione da substrato ritardato rispetto a questo enzima.

Questa ipotesi potrebbe essere confermata attraverso l'analisi del contenuto di ROS, che purtroppo non è stato possibile misurare. Inoltre, sarebbe stato molto utile svolgere le analisi che erano previste, volte a valutare l'eventuale danno ossidativo su macromolecole, come la perossidazione lipidica e carbonilazione proteica e i danni cito-genetici.

I risultati dei biomarkers per la trota fario sono in effetti confermati dalle analisi chimiche, che hanno evidenziato come il Boesio sia caratterizzato da livelli di DDX e PCB più elevati rispetto agli altri tributari (vedere capitolo 6). Ciò contribuisce a identificare la criticità per questo tributario, per cui la presenza di questi contaminanti sembrerebbe poter determinare degli effetti sulla fauna ittica.

I dati dei biomarkers suggeriscono, infine, come la trota fario sia più suscettibile agli effetti dei contaminanti rispetto al cavedano, probabilmente legato al differente *home range* delle due specie e quindi a un diverso meccanismo di assunzione dei contaminanti. Infatti, il cavedano è onnivoro e bentonico, mentre la trota è carnivora e si nutre di prede presenti nella colonna d'acqua.

Come detto precedentemente, purtroppo, sarebbe stato necessario eseguire la batteria completa di biomarkers, che avrebbe probabilmente potuto dare indicazioni più precise sull'impatto dei contaminanti chimici misurati in queste due specie ittiche.

Bibliografia

- Depledge M., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: non destructive biomarkers in vertebrates. Fossi M.C., Leonzio C., eds. Lewis publishers: 272-295.
- Fossi M.C., 1998. Biomarkers as diagnostic e prognostic tools for wildlife risk assesment: integrating endocrine-distrupting chemicals. *Tox. Ind. Healt* 14 (1-2): 291-309.
- Fossi M.C., 2000. Biomarkers: Strumenti di Diagnosi e Prognosi Ambientale. Rosini ed.: 134pp.
- GoksØyr A., e Förlin L., 1992. The cytocrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and enviromental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22: 287-312.
- Pacheco M., e Santos M.A., 1998. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L.. *Ecotox. Env. Saf.* 40: 71-76.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., 2003. fish bvioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Env., Tox., Pharm.* 13: 57-149.

9. EFFECT-BASED METHODS SU CHIRONOMIDI

Andrea Binelli, Camilla Della Torre, Università degli Studi di Milano

Roberta Bettinetti, Università dell'Insubria, Como

Introduzione

Lo scopo principale di un'indagine ecotossicologica è la valutazione del rischio ambientale dovuto a una o più sostanze inquinanti (*Environmental risk assessment* - ERA). A tale scopo, in presenza di un potenziale contaminante o, più propriamente, di una miscela di contaminanti, occorre valutarne sia l'esposizione che gli effetti. Per quanto riguarda l'esposizione, generalmente vengono utilizzate diverse tecniche analitiche di tipo chimico su matrici biotiche e abiotiche. Per valutare gli effetti, invece, esistono approcci diversi, che possono risultare più o meno idonei a seconda della tipologia del contaminante considerato e che recentemente sono stati raccomandati a livello dell'Unione Europea (UE) all'interno della *Water Framework Directive* (Brack et al., 2019).

Tra i cosiddetti *Effect-based methods* (EBM) possiamo annoverare i classici saggi ecotossicologici (previsti anche dal D. Lgs. 152/06) e i cosiddetti biomarkers, oltre che le nuove metodologie "omiche" (es. proteomica, genomica, lipidomica, metabolomica). I saggi ecotossicologici prendono come riferimento sia endpoint di tossicità acuta, quali la sopravvivenza e l'immobilizzazione, che di tossicità cronica, quali effetti sulla crescita, sviluppo e riproduzione (Blaise and Gagné, 2009). Tali saggi spesso non risultano sufficientemente sensibili, soprattutto per i contaminanti emergenti, le cui concentrazioni ambientali possono essere estremamente basse, talvolta minori delle soglie di effetto misurabili nei diversi modelli biologici. I biomarkers, invece, prendono in considerazione solo endpoint sub-letali, evidenziando delle variazioni di un processo misurabile a livello cellulare o molecolare, risultando quindi particolarmente sensibili a concentrazioni dei contaminanti estremamente basse. Lo scopo dell'impiego dei biomarkers è individuare precocemente gli effetti primari dei contaminanti (*early-warning system*), che potrebbero ripercuotersi sui livelli biologici superiori (organismo, popolazione e comunità).

A causa dell'attuale situazione sanitaria, che non consente attualmente di entrare nei laboratori di ricerca, i dati che saranno presentati risultano ampliamenti incompleti sia come numero di repliche (esposizioni eseguite solo in singolo) sia come numero di biomarkers, che di fatto sono riconducibili solamente alla valutazione dell'attività enzimatica della Glutazione S-Transferasi (GST), uno dei principali enzimi di detossificazione di Fase II, e della Catalasi (CAT), enzima che fa parte della batteria anti-ossidante che combatte l'aumento dello stress ossidativo.

Descrizione dei saggi di esposizione:

Le larve di chironomidi sono state esposte ai sedimenti campionati in 5 diversi tributari al Verbano (Tresa, Boesio, Margorabbia, Toce, Bardello) e nel Ticino emissario nei mesi di giugno, luglio e ottobre 2019. Non è stato, però, possibile esporre le larve ai sedimenti prelevati nel F. Bardello nel luglio 2019 e nel F. Ticino nel giugno 2019 a causa della scarsità del sedimento a disposizione. La descrizione del prelievo dei sedimenti e delle tempistiche di campionamento è presente nel Capitolo 6, dedicato alle analisi chimiche effettuate sui sedimenti fluviali.

L'organismo test *Chironomus riparius* Meigen 1804 proviene da un ceppo mantenuto in laboratorio all'Università dell'Insubria e originariamente derivante da uova dell'Istituto Superiore di Sanità. Gli organismi sono stati allevati in un acquario di 40 L chiuso nella parte superiore con una zanzariera. Nella vasca il substrato è costituito da sabbia silicea di granulometria inferiore a 250 µm con uno spessore di circa 3 cm e circa 8-10 m di acqua di rete (durezza: 320 mg L⁻¹ CaCO₃), mantenuta costantemente areata: L'allevamento è sottoposto ad un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio alla temperatura di 21 °C. L'allevamento è nutrito settimanalmente con 1 g di mangime TetraMin

e il rinnovo dell'acqua completo viene effettuato ogni due mesi circa. I test sono stati effettuati in accordo con la Linea Guida 218 dell'EOCD, con interruzione a 10 giorni.

Un giorno prima dell'esecuzione del test, circa 750 g di sedimento precedentemente setacciato ad umido (500 μm) sono stati posti nei beacker da 1 L con circa 250 mL di acqua; ad ogni beaker sono stati aggiunti 30 mg di mangime in sospensione acquosa (4 g L⁻¹). Il contenuto dei beaker è stato lasciato sedimentare al buio alla temperatura di 21 ± 1 °C per 24 h. Il controllo del test è stato allestito con sedimento ricostruito artificialmente (OECD 218). Non è stato possibile allestire repliche per ciascuna stazione per il quantitativo di sedimento a disposizione in ciascuna data di campionamento.

Il giorno 0, partenza del test, sono state poste 40 larve al primo stadio di sviluppo direttamente nell'acqua sovrastante i sedimenti, accompagnandole gentilmente. Le larve immerse nei beaker avevano circa 2 giorni di età, derivanti dalla schiusa a 21 ± 1 °C di uova prelevate dall'allevamento. I test sono stati effettuati per 10 giorni in un termostato con fotoperiodo luce:buio di 16:8 h e aerazione costante. Ogni tre giorni le larve sono state nutrite con 10 ml della sospensione di Tetramin (4 g L⁻¹) ed è stata aggiunta l'acqua evaporata.

Al termine dei 10 giorni di esposizione le larve sono state separate per setacciatura dal sedimento, sciacquate con acqua deionizzata, asciugate con carta da filtro e surgelate.

Determinazione delle attività enzimatiche

I diversi pool di chironomidi sono stati omogenizzati in 200 μL di tampone fosfato 100 mM a pH 7,4 contenente cloruro di potassio (KCl) 100 mM, EDTA 1 mM, ditioneitrato (DTT) 1 mM come agente riducente e una miscela di inibitori delle proteasi. I campioni omogenati sono stati successivamente centrifugati a una temperatura di 4 °C per 30 minuti a 15.000 g per ottenere la frazione S15 di surnatante, che è stato successivamente prelevato e suddiviso in provette conservate a -80 °C destinate alla valutazione dei biomarker di stress cellulare.

È stato necessario anche effettuare una quantificazione delle proteine presenti nella frazione S15 utilizzando il metodo di Bradford (1976) per normalizzare la risposta enzimatica. Le letture, per ogni campione, sono state eseguite in triplo e l'analisi della cinetica enzimatica è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro 6715 UV/Vis (Jenway, UK).

La Glutazione S-Transferasi (GST) catalizza la reazione tra l'anione tiolato GS⁻ (derivato dalla trasformazione a livello cellulare del GSH in GS⁻ e H⁺) e molecole con gruppi elettrofili, al fine di renderle più idrofile e, quindi, più facilmente eliminabili. Il metodo utilizza come co-substrato per la reazione catalizzata dalla GST l'1-cloro-2,4- dinitrobenzene (CDNB). In cuvette da 1 mL sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- 880 μL di buffer fosfato (80 mM a pH 7,4);
- 50 μL di GSH 1 mM;
- 50 μL di soluzione di CDNB 1 mM in etanolo.

Dopo aver capovolto e mescolato la cuvetta, sono stati aggiunti 10 μL di frazione S15 del campione. La quantificazione dell'attività enzimatica è stata effettuata contro un bianco a 340 nm.

La catalasi (CAT) interviene nella trasformazione del radicale H₂O₂ in ossigeno e acqua. La valutazione dell'attività enzimatica relativa alla CAT consiste, quindi, nel quantificare la diminuzione dei livelli di H₂O₂ per via spettrofotometrica. A tale scopo è stato aggiunto e miscelato in una cuvetta in quarzo da 3 mL quanto segue:

- 1.980 μL di buffer fosfato (66,7 mM a pH 7);
- 1.000 μL di H₂O₂ 50 mM;

- 10 μL di frazione S15 del campione.

La cinetica enzimatica è stata misurata contro un bianco (1 mL H_2O_2 + 2 mL buffer fosfato) a 240 nm, calcolando la differenza di assorbanza in 1 minuto.

Risultati dei biomarkers

Non è stato possibile avere a disposizione saggi in triplicato a causa della situazione sanitaria, che ha impedito di fatto la conclusione dei saggi di esposizione. Inoltre, il numero di larve di chironomidi disponibili per ciascun pool non è risultato sufficiente per avere il quantitativo di tessuti necessario per eseguire la batteria completa di biomarkers. Siamo riusciti, quindi, solamente a ottenere i risultati per i due enzimi GST e CAT.

La figura 9.1 mostra il confronto tra le attività della GST, espressa in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$, misurate nei pools di larve di chironomidi esposte ai sedimenti prelevati nei 5 tributari del Verbano e nel Ticino emissario. Data l'impossibilità di una valutazione statistica, è possibile solo evidenziare delle linee di tendenza, che mostrano come le attività della GST risultino in molti casi decisamente superiori ai controlli. In particolare, le tre esposizioni eseguite con i sedimenti del F. Tresa indicano un netto aumento di tale enzima di detossificazione di Fase II, chiaro indice della presenza costante di contaminanti ambientali lipofili nei sedimenti di questo tributario. Il dosaggio della GST indica come il F. Tresa sia l'ambiente sicuramente più interessato da una contaminazione da composti organici persistenti, in quanto i valori di tale enzima misurati negli altri fiumi risultano sempre inferiori, ad eccezione dei livelli osservati nel Ticino emissario nel luglio 2019 (Fig. 9.1).

L'andamento stagionale non fornisce un chiaro trend, in quanto alcuni fiumi (Margorabbia, Toce e Ticino emissario) hanno mostrato un calo dell'attività GST nel campionamento del mese di ottobre, al termine della stagione estiva, altri (Tresa, Boesio, Bardello) presentano invece un andamento opposto. Interessanti sono gli elevati valori rilevati nel Ticino emissario, che suggeriscono come dal Verbano esca costantemente una miscela d'inquinanti ambientali lipofili, la cui contaminazione andrà a interessare gli ecosistemi posti a valle del L. Maggiore.

Anche l'analisi dei dati legati all'attività CAT (Fig. 9.2) mostra degli spunti di riflessione in quanto, a una prima superficiale osservazione, sembrerebbero non confermare i risultati ottenuti con la GST. Infatti, i livelli più elevati sono stati ottenuti non per il F. Tresa, bensì per il F. Toce, dove sono stati raggiunti valori quasi doppi rispetto ai controlli (Fig. 9.2). In realtà, occorre fare un discorso approfondito per quei livelli di CAT risultati tendenzialmente più bassi rispetto ai controlli, come ad esempio per i tre campioni del F. Tresa e i campioni del mese di ottobre osservati per il F. Toce, F. Bardello e Ticino emissario (Fig. 9.2). Infatti, è opportuno sottolineare come la cinetica enzimatica segua una curva parabolica in quanto, ad elevati livelli di contaminazione, si verifica la cosiddetta "inibizione da substrato" (Regoli et al., 2002), che determina una diminuzione dell'attività enzimatica, anche a livelli inferiori rispetto ai valori basali. Quindi, le basse attività CAT osservate per questi fiumi indicano, in realtà, la presenza di una pesante contaminazione dei sedimenti da composti in grado di aumentare lo stress ossidativo, che confermerebbe, ad esempio, l'innalzamento dell'attività GST osservata nelle larve di chironomidi esposte ai sedimenti prelevati nel F. Tresa (Fig. 9.1). Per essere più chiari, il basso valore di CAT osservato ad ottobre nel F. Toce viene considerato un indicatore di un inquinamento maggiore rispetto agli alti livelli misurati a giugno e luglio 2019 (Fig. 9.2), proprio a causa dell'effetto dell'inibizione enzimatica dovuta a un eccesso di substrato (contaminante), come già spiegato precedentemente. Per confermare tutto ciò sarebbe stato interessante aver potuto misurare anche le attività di altri enzimi anti-ossidanti (SOD e GPx) che, per mancanza di materiale biologico, non è stato purtroppo possibile eseguire.

In conclusione, i due soli biomarkers di cui siamo riusciti a dosare l'attività hanno mostrato come questa tipologia di EBM possa sicuramente servire per discriminare ambienti maggiormente

contaminati (*hot spots*) da zone dove lo stato d'inquinamento è minore. Il grande vantaggio del loro utilizzo, che sta sempre più prendendo piede a livello UE, è quello di mettere in evidenza gli effetti diretti o indiretti di tutta la miscela di contaminanti presenti in un ecosistema e che impattano sugli organismi, al contrario dell'approccio chimico, che riesce ad effettuare una valutazione qualitativa di poche classi d'inquinanti, i cui effetti additivi e/o sinergici possono essere rilevati solamente con un approccio biologico/biochimico, come quello offerto dall'applicazione di una batteria di biomarkers.

Purtroppo, è stato possibile misurare solo l'attività di due biomarkers di "esposizione", che hanno evidenziato due risposte delle larve di chironomidi alla presenza della miscela di contaminanti presenti nei sedimenti fluviali, ma sarebbe utile riuscire ad avere un maggior quantitativo di materiale biologico per poter misurare anche i cosiddetti biomarkers di "effetto", in grado di valutare l'impatto e l'eventuale danno provocato a livello delle macromolecole, come ad esempio la perossidazione lipidica, carbonilazione proteica e i danni al materiale genetico.

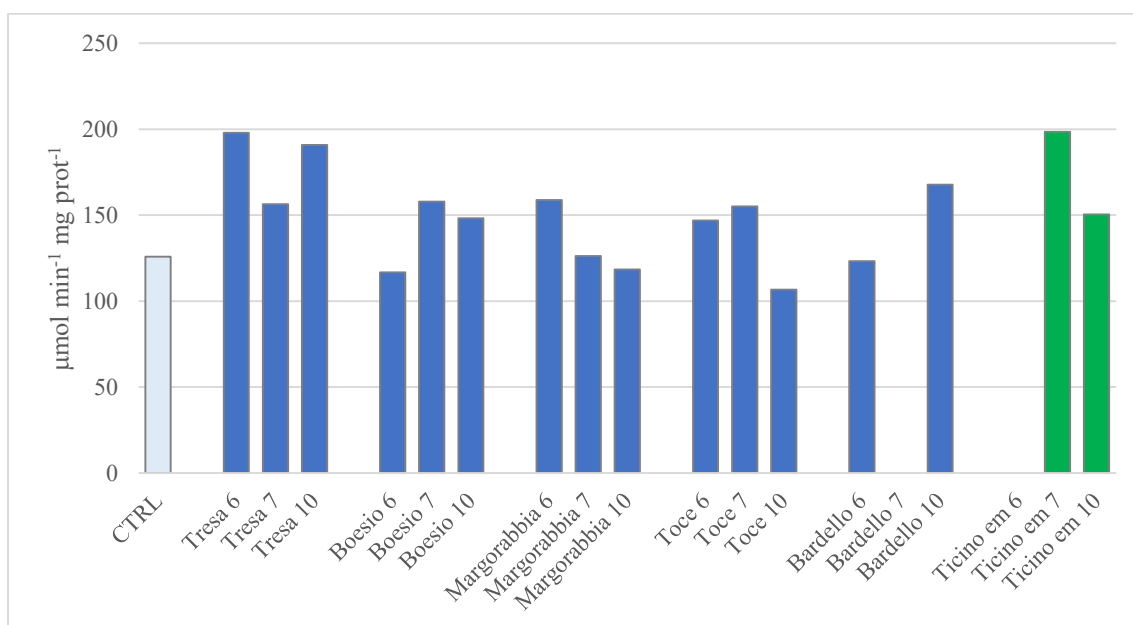


Figura 9.1 Attività della GST misurata nelle larve di chironomidi esposte ai sedimenti dei 6 fiumi campionati nel 2019 (6: giugno; 7: luglio; 10: ottobre 2019).

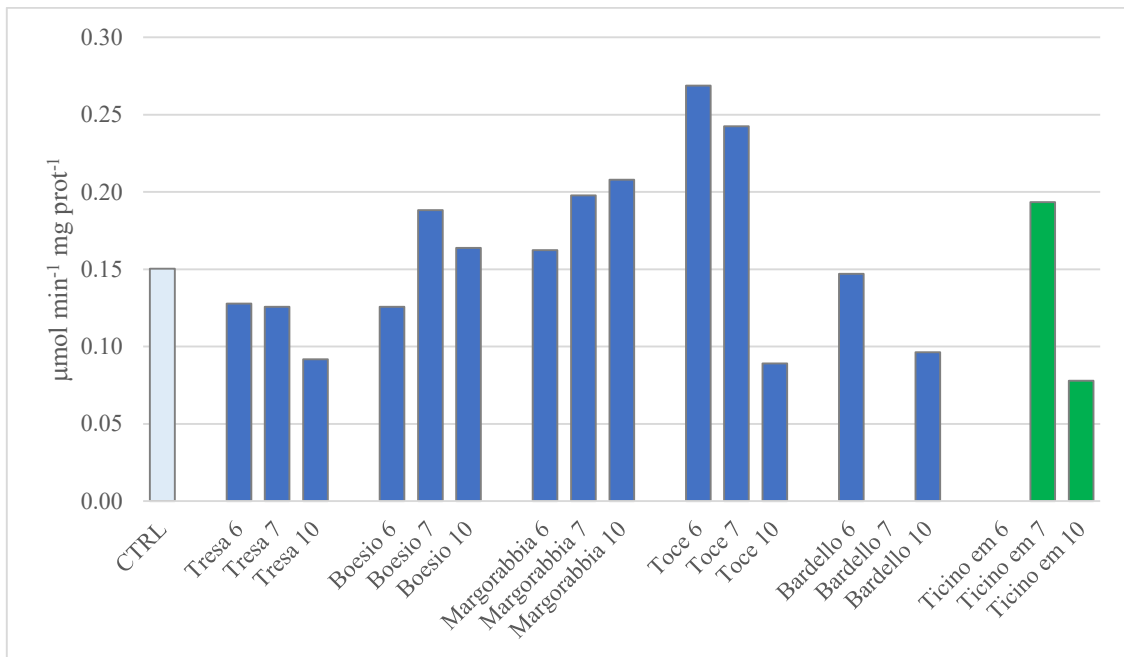


Figura 9.2 Attività della CAT misurata nelle larve di chironomidi esposte ai sedimenti dei 6 fiumi campionati nel 2019 (6: giugno; 7: luglio; 10: ottobre 2019).

Bibliografia

- Blaise, C., Gagné, F., 2009. Bioassays and biomarkers, two pillars of ecotoxicology: past, present and prospective uses. *Fresenius Environmental Bulletin* 18, 135-139
- Brack W., Ait Aissa, S., Backhaus, T., Dulio, V., Escher, B.I., Faust, M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Müller, C., Munthe, J., Posthuma, L., Seiler, T.-B., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Tindall, A.J., de Aragão Umbuzeiro, G., Zhang, X., and Altenburger, R. 2019. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe*, 31: 10.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S. 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin* 44: 912-922.

10. EFFECT BASED METHODS: TEST DI TOSSICITÀ SUBCRONICO CON *HETEROCYPRIS INCONGRUENS* SUI SEDIMENTI DEI TRIBUTARI

Laura Marziali, Alfredo Schiavon, Lucia Valsecchi, CNR-IRSA, Brugherio (MB)

Il programma di attività per il 2019 prevedeva la valutazione della tossicità dei sedimenti dei tributari e del Ticino emissario in tre stagioni (primavera, estate e autunno) tramite il saggio di tossicità cronica sull'ostracode *Heterocypris incongruens*. Questo test è stato riconosciuto nel 2012 dall'Organizzazione Internazionale per la Normazione (ISO) per valutare la tossicità dei sedimenti d'acqua dolce secondo il protocollo ISO 14371:2012. Il test consiste nel contatto diretto (*sediment-contact* test) degli organismi con il sedimento in esame e consente di valutare, dopo un'esposizione di 6 giorni, la tossicità su due endpoints: la mortalità e l'inibizione della crescita. Alcuni studi hanno evidenziato la maggiore sensibilità di *H. incongruens* rispetto ad altri invertebrati bentonici, quali *Chironomus riparius* e *Hyaella azteca* (es. Belgis et al., 2003): per questa ragione si è ritenuto opportuno affiancare questo test al saggio su *C. riparius*. In ogni caso, la possibilità di esporre organismi appartenenti a diversi gruppi tassonomici e con ruoli e caratteristiche ecologiche diverse permette di stimare il rischio per diversi componenti delle comunità acquatiche.

Il saggio è stato condotto su aliquote degli stessi campioni di sedimento utilizzati per i test di *C. riparius*. L'analisi dei microinquinanti organici e del mercurio nei sedimenti è riportata nel capitolo 6. Le cisti dormienti vengono messe per 48 ore in incubatore a 25 ± 1 °C con un'illuminazione costante di 3000 - 4000 lux, immerse in una soluzione di acqua sintetica di moderata durezza. Alla schiusa, si provvede ad alimentare per 4 ore gli ostracodi mediante alga spirulina liofilizzata e polverizzata. Si procede quindi con la misurazione della lunghezza di 10 ostracodi, dopo passaggio in lugol: questa misura, generalmente compresa tra 150 e 250 μm , sarà necessaria per verificare, al termine del test, se gli organismi del controllo abbiano soddisfatto i criteri di validità, ossia che siano cresciuti di 1,5 volte rispetto alla taglia iniziale. Il test viene allestito in piastre in polistirene dotate di pozzetti del diametro di 36 mm (Fig. 10.1). In questo studio sperimentale si è deciso di allestire 4 repliche per ogni sedimento da testare e 4 per il controllo. In ogni pozzetto vengono inseriti 1000 μl di sedimento precedentemente setacciato a 2 mm e omogeneizzato, 2 ml di acqua standard e 10 ostracodi. Per il controllo si utilizza un sedimento di riferimento costituito da sabbia non calcarea, lavata, asciugata e setacciata, di granulometria < 2 mm. In tutti i pozzetti vengono addizionati 2 mL di una sospensione algale di *Scenedesmus* spp. alla concentrazione di $1,5 \times 10^6$ cellule/mL. Infine, le piastre vengono coperte con del parafilm e vengono poste in incubatore a 25 ± 1 °C al buio per sei giorni. In questo lavoro è stato utilizzato il kit commerciale Ostracodtoxkit FTM (MicroBioTests Inc.). Al termine del test si procede con il conteggio degli ostracodi vivi in ogni pozzetto, e con la misurazione degli individui del controllo. Un altro criterio di validità è che nel controllo la mortalità non superi il 20%.

L'effetto si valuta calcolando la percentuale di mortalità, che può essere valutata: a) rispetto ad una soglia ecotossicologica fissa (di solito si considera il 30%, Casado Martinez et al., 2016) (Fig. 10.2a e 10.2b) mediante confronto con il controllo utilizzando il test statistico one-way ANOVA (Fig. 10.2b). Un altro *endpoint* è l'inibizione della crescita, anch'essa valutata: a) rispetto ad un valore soglia (del 35% secondo Casado Martinez et al., 2016) (Fig. 10.3a); b) rispetto al controllo mediante test statistico one-way ANOVA (Fig. 10.3b).



Figura 10.1. Piastre di polistirene allestite con sedimento, sospensione algale e acqua standard per il test con *H. incongruens*

La mortalità mostra valori compresi tra il 5% e il 15% nei tributari, pertanto tutte le percentuali sono inferiori alla soglia ecotossicologica del 30% e anche al criterio di validità del test (mortalità < 20% nel controllo) e, dunque, non si evidenzia tossicità significativa (Fig. 10.2a). Il risultato è confermato dall'analisi statistica, che non ha mostrato differenze significative tra i trattamenti (tributari) e il controllo (Fig. 10.2b).

L'endpoint subletale inibizione della crescita non mostra mai valori superiori alla soglia di tossicità del 35%, anche se nei campioni autunnali del Bardello, del Ticino emissario e del Toce si raggiungono valori di inibizione rispettivamente del 33%, del 23% e del 5% (Fig. 10.3a). L'analisi statistica conferma che gli organismi esposti ai sedimenti del Bardello e del Ticino emissario di ottobre hanno mostrato inibizione significativa rispetto al controllo (Fig. 10.3b). Questo risultato sembra in linea con l'analisi dell'attività della CAT, che è risultata inibita rispetto al controllo in questi campioni.

Si osserva, invece, una stimolazione della crescita in tutti i tributari per i mesi di giugno e luglio (Fig. 10.3a, 10.3b). Questo incremento di dimensioni può essere legato a caratteristiche naturali dei sedimenti, ad esempio, diverse concentrazioni di sostanza organica o diversa granulometria, ma potrebbe anche essere indicare ormesi, ossia stimolazione in risposta alla presenza di basse concentrazioni di contaminanti. I fenomeni di ormesi non sono vengono generalmente considerati come tossicità significativa, soprattutto quando si testano matrici ambientali complesse, che assommano non solo la presenza di miscele di contaminanti, ma anche caratteristiche chimico-fisiche diverse. Casado-Martinez et al. (2016), ad esempio, hanno dimostrato che le frazioni granulometriche più fini (argilla) nei sedimenti possono determinare un effetto inibitorio sulla crescita di *H. incongruens*. Per questa ragione nell'approccio degli *effect-based methods* lo strumento maggiormente utilizzato per valutare gli esiti dell'indagine è il peso dell'evidenza (*weight of evidence*), che combina i risultati ottenuti da diverse linee di evidenza (Wernersson et al., 2015).

In questo lavoro, sebbene i risultati possano essere ancora parziali, si conferma che i fiumi più compromessi sono il Bardello, il Ticino emissario, il Toce e il Tresa. L'evidenza è supportata dai dati chimici, che dimostrano lo stato di contaminazione del comparto sedimenti (capitolo 6). Gli effetti tossici a livello di organismo/popolazione sembrano limitati ad un lieve effetto subletale (inibizione della crescita per *H. incongruens*), in particolare nei campioni autunnali, in linea con l'analisi dei biomarkers di esposizione, in particolare della catalasi.

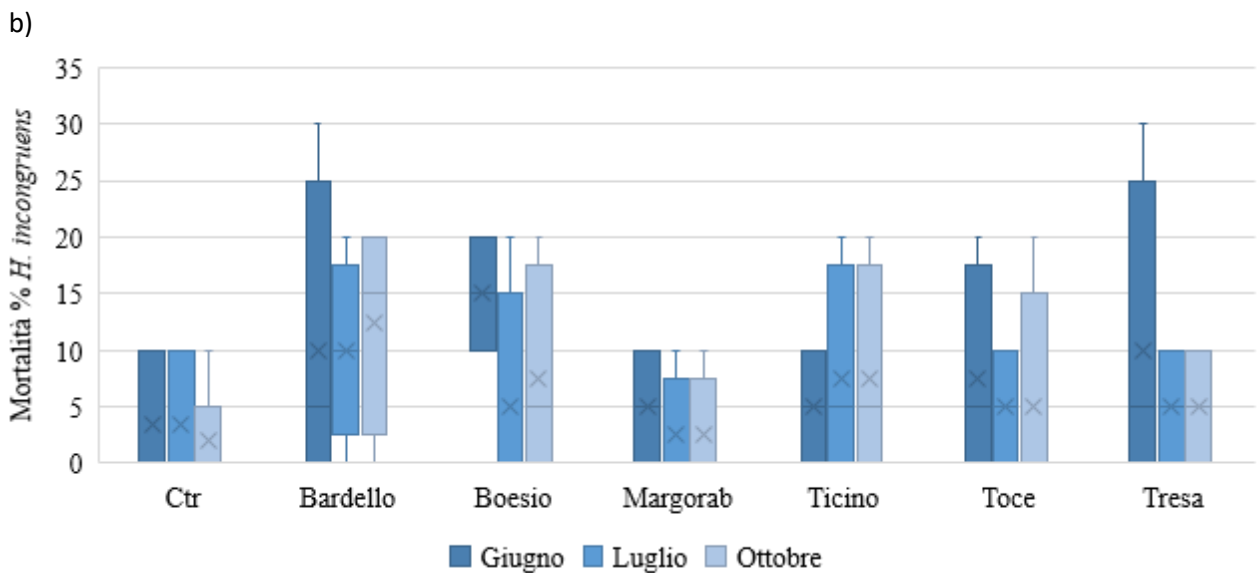
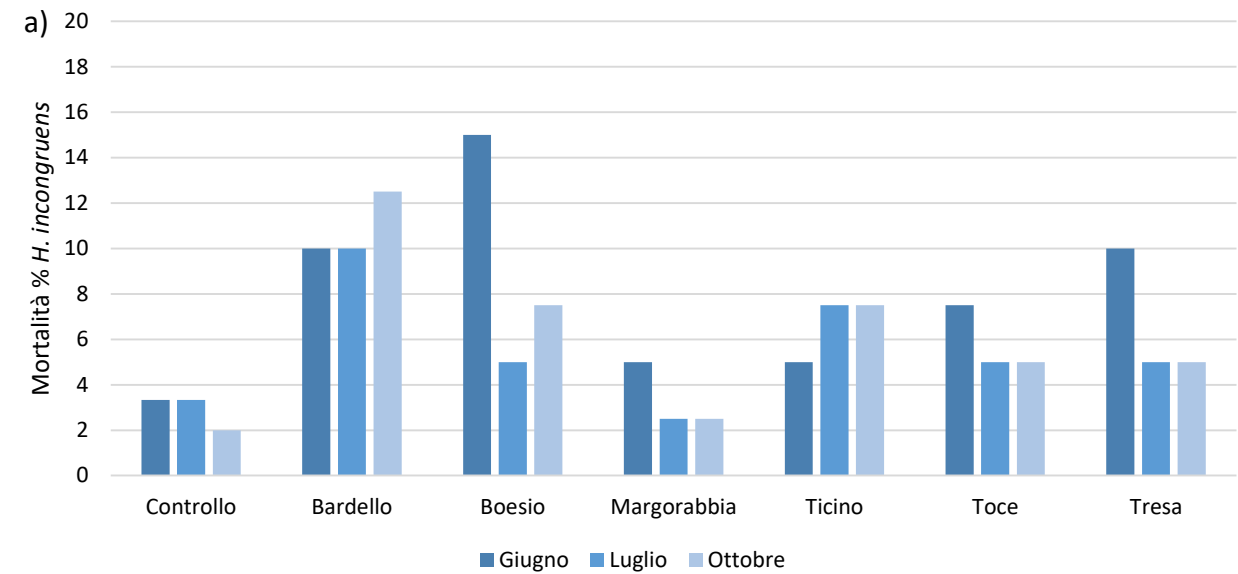


Fig. 10.2. Mortalità relativa al test cronico con *H. incongruens* condotto sui sedimenti dei tributari, considerando a) la somma di tutti gli individui esposti ai sedimenti (mortalità totale); b) diagrammi a scatole e baffi delle percentuali di mortalità, considerando le repliche separatamente: X rappresenta la media, il trattino nelle scatole rappresenta la mediana, i baffi indicano il minimo e il massimo.

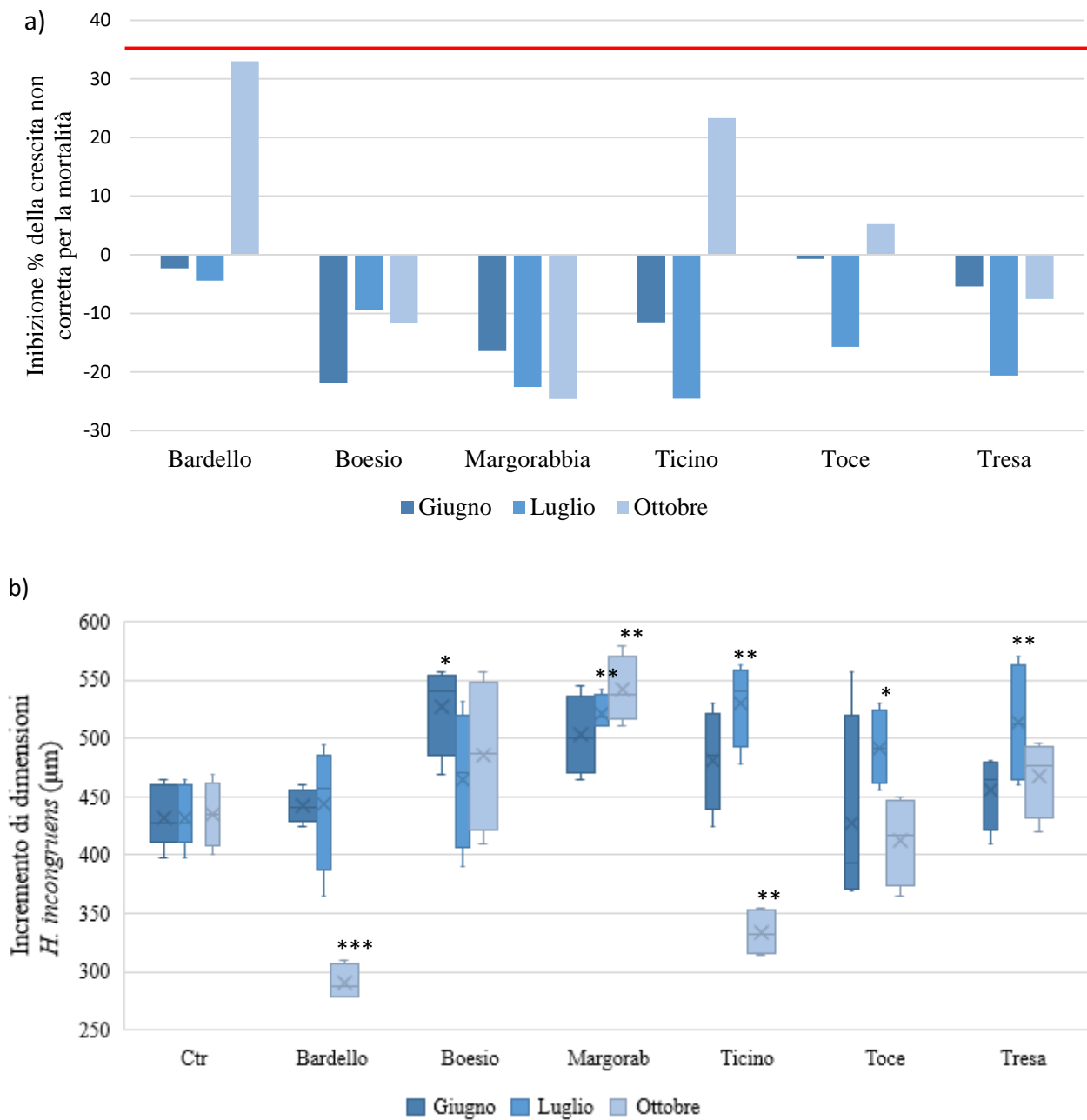


Fig. 10.3. Inibizione della crescita per *H. incongruens* esposto ai sedimenti dei tributari, espressa come: a) inibizione media percentuale calcolata considerando tutti gli individui esposti (la linea rossa rappresenta la soglia di tossicità del 35% secondo Casado-Martinez et al., 2016); b) diagrammi a scatole e baffi dell'incremento di dimensioni considerando le repliche separatamente: box = range interquartile (25°-75° percentile), x = media, trattino orizzontale nel box = mediana, barre = minimo e massimo. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo secondo il test ANOVA seguito da test post-hoc di Dunnett (*= p<0,05; **= p<0,01; ***=p<0,001).

Bibliografia

- Belgis C.Z., Persoone G., Blaise C., 2003. Cyst-based toxicity tests XVI—sensitivity comparison of the solid phase *Heterocypris incongruens* microbiotest with the *Hyalella azteca* and *Chironomus riparius* contact assays on freshwater sediments from Peninsula Harbour (Ontario, Canada). *Chemosphere*, 52: 95-101.
- Casado-Martinez C., Burga-Pérez K.F., Bebon R., Ferard J-F., Vermeirssen E.L.M., Werner I., 2016. The sediment-contact test using the ostracod *Heterocypris incongruens*: Effect of fine sediments and determination of toxicity thresholds. *Chemosphere* 151: 220-224.
- CIP AIS, 2019. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell’ecosistema del Lago Maggiore. Programma 2016-2018. Rapporto annuale 2018. Rapporto Triennale 2016-2018.
- ISO, 2012. Water quality - Determination of freshwater sediment toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda). ISO 14371. ISO/TC 147/SC 5. 16 pp.
- Wernersson A-S., M. Carere, C., Maggi, P Tusil, P. Soldan, A. James, W. Sanchez, V. Dulio, K. Broeg, G. Reifferscheid, S. Buchinger, H. Maas, E. Van Der Grinten, S. O’Toole, A. Ausili, L. Manfra, L. Marziali, S. Polesello, I. Lacchetti, L. Mancini, K. Lilja, M. Linderoth, T. Lundeberg, B. Fjällborg, T. Porsbring, D.G.J. Larsson, J. Bengtsson-Palme, L. Förlin, C. Kienle, P. Kunz, E. Vermeirssen, I. Werner, C.D. Robinson, B. Lyons, I. Katsiadaki, C Whalley, K. den Haan, M. Messiaen, H. Clayton, T. Lettieri, R. Negrão Carvalho, B.M. Gawlik, H. Hollert, C. Di Paolo, W. Brack, U. Kammann, R. Kase, 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe*, 27: 7. DOI 10.1186/s12302-015-0039-4.

11. EVOLUZIONE TEMPORALE DELLE SOSTANZE PERICOLOSE NELL'ECOSISTEMA DEL LAGO MAGGIORE

Aldo Marchetto, CNR-IRSA Verbania Pallanza

Il DDT (diclorodifeniltricloroetano) è un insetticida di sintesi, che è stato largamente diffuso nell'ambiente a partire dal 1939, dapprima per combattere la malaria e successivamente in agricoltura. A causa della sua persistenza nell'ambiente e della sua tendenza ad accumularsi nelle reti trofiche, è stato bandito negli anni '70, ma è stato prodotto a Pieve Vergonte fino al 1997.

Il DDT è poco solubile in acqua e si trova principalmente associato ai sedimenti fini. Nella fig. 11.1 si osserva la forte variabilità della quantità di DDx presente nei sedimenti del Toce e del Ticino emissario, dovuta essenzialmente alle piogge che dilavano i terreni e alle piene che mobilizzano sedimenti inquinati nel Toce.

In fig. 11.1, per evidenziare l'effetto delle forti precipitazioni, nel grafico è stata inserita la portata giornaliera del Toce a Candoglia (dati ARPA Piemonte). Si tenga presente che le analisi dei DDx sono effettuate stagionalmente, e nel grafico andrebbero indicate come punti isolati, in quanto non si può interpolare da un dato all'altro. Le linee che uniscono i punti, in questa figura e nelle successive, hanno solo lo scopo di facilitarne la lettura.

Nel 2017 e 2018 la portata del Toce non ha mai superato i $307 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ e nel 2018 le basse concentrazioni di DDx si correlavano bene con l'assenza di fenomeni meteorologici importanti. Dopo le piene di novembre 2018 e aprile 2019, le concentrazioni nel Toce sono tornate a salire.

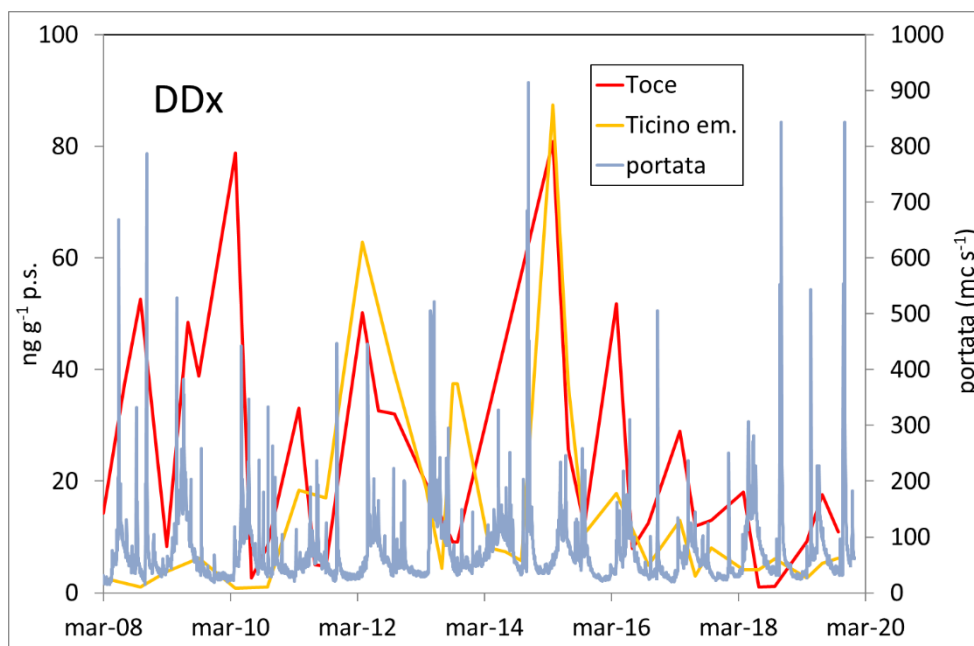


Fig. 11.1 – Concentrazione di DDx nei sedimenti del Fiume Toce e Ticino emissario a confronto con la portata giornaliera del Toce

Negli organismi, i DDX si accumulano nei tessuti grassi, perciò per confrontare tra loro specie diverse occorre esprimere la concentrazione in proporzione alla massa lipidica (fig. 11.2). Anche negli organismi si ha una forte variabilità legata alle condizioni meteorologiche e alla fisiologia degli organismi, in relazione alle dinamiche stagionali. L'aumento di concentrazione nel 2019 rispetto al 2018 è visibile in particolar modo nei molluschi e nei pesci di piccole dimensioni (agoni piccoli).

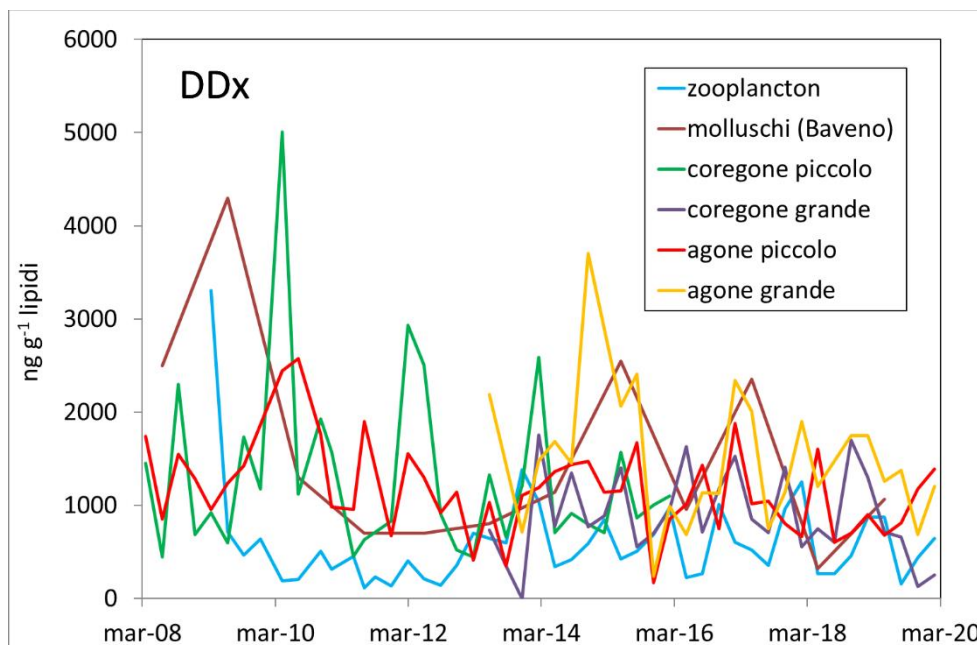


Fig. 11.2 – Concentrazione di DDX nel biota del Lago Maggiore.

L'obiettivo di qualità per il biota è riferito alla concentrazione sul peso fresco e non a quella sul peso lipidico. In effetti, la normativa italiana (Decreto Legislativo 172/2015 che recepisce la Direttiva Europea 2013/39) prevede uno standard di qualità ambientale per la concentrazione del DDX totale (cioè della somma del DDT e dei suoi isomeri e metaboliti) pari a 100 ng/g p.f. per i pesci con più del 5% di grassi e di 50 ng/g p.f. per i pesci con valori minori o uguali al 5% di grassi.

Quindi, per valutare lo stato di qualità del Lago Maggiore, i valori misurati nei pesci del Lago Maggiore sono mostrati in fig. 11.3 riferiti al peso umido.

Per interpretare correttamente la figura, si deve tener conto che generalmente (ma non sempre) gli agoni hanno una percentuale lipidica superiore al 5% e i coregoni inferiore al 5%. Lo standard di qualità ambientale viene superato saltuariamente in entrambe le specie, e negli ultimi anni solo negli agoni.

L'effetto delle piene sulla concentrazione di DDX nel biota è particolarmente visibile nei molluschi, come visibile nella figura 11.4, portata qui a titolo di esempio. La concentrazione misurata nel tessuto del mollusco viene considerata come un indicatore delle concentrazioni presenti nelle acque filtrate dall'animale nell'anno precedente al campionamento, che a loro volta dipendono dalla presenza di eventi di piena. Uno studio più attento degli effetti delle condizioni ambientali sulla risposta del biota verrà inserito nel rapporto finale del triennio.

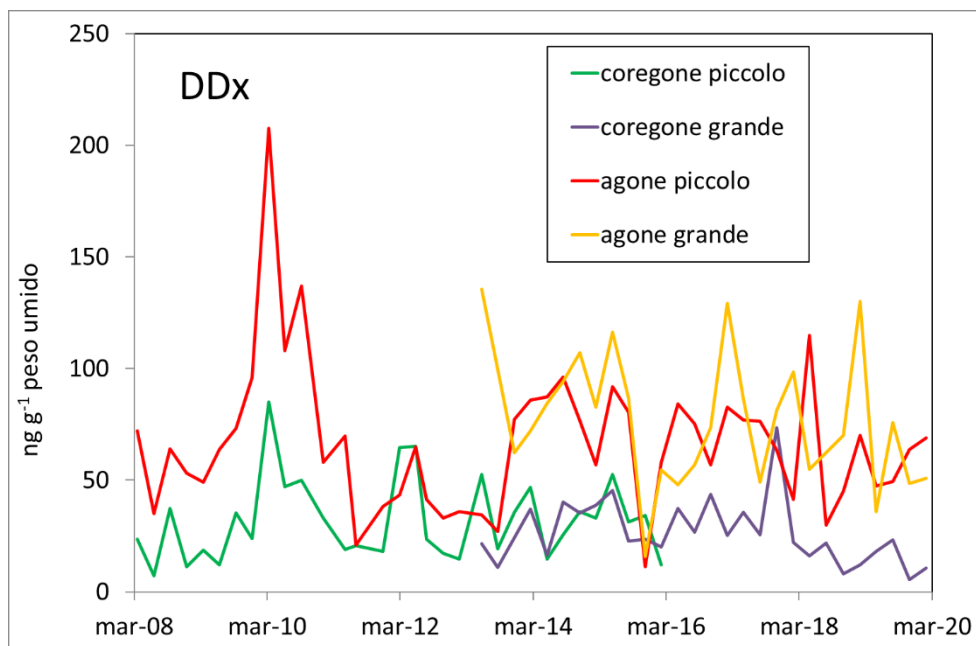


Fig. 11.3 – Concentrazione di DDX nei pesci del Lago Maggiore

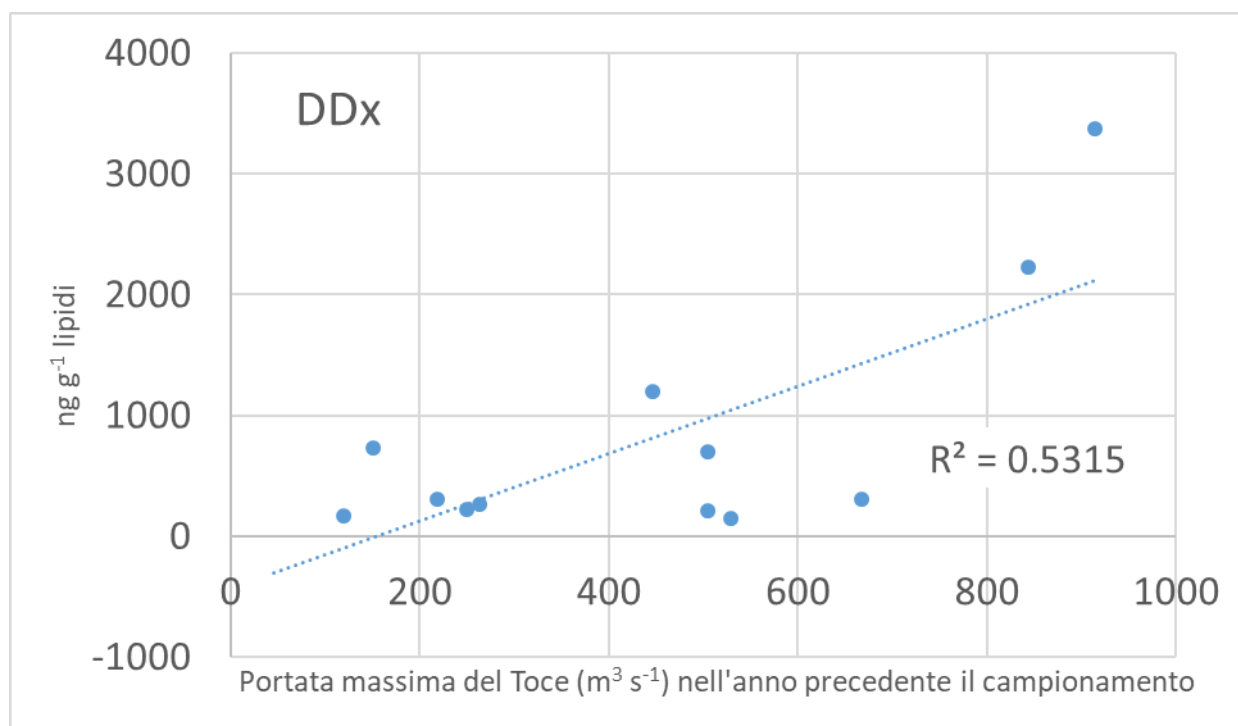


Fig. 11.4 – Relazione tra la concentrazione totale di DDX nei molluschi campionati a Baveno e la portata massima del Toce nell'anno precedente alla data di campionamento

I policlorobifenili (PCB) sono composti di sintesi molto stabili, non infiammabili, usati in passato come isolanti termici ed elettrici, fluidi per circuiti idraulici e scambio termico, lubrificanti, ritardanti di fiamma, e additivi in vari prodotti chimici. Essi persistono a lungo nell'ambiente e possono accumularsi negli organismi lungo le reti trofiche. Alcuni di questi composti hanno tossicità simile alle diossine e vengono denominati PCB-diossina simili (dioxin-like PCB, dl-PCB). Nei sedimenti dei tributari, i valori più alti vengono misurati generalmente nel Bardello, nel Boesio e nel Ticino emissario (fig. 11.5). In questo caso, i picchi di inquinamento differiscono da fiume a fiume e non sembrano correlarsi con l'intensità delle precipitazioni.

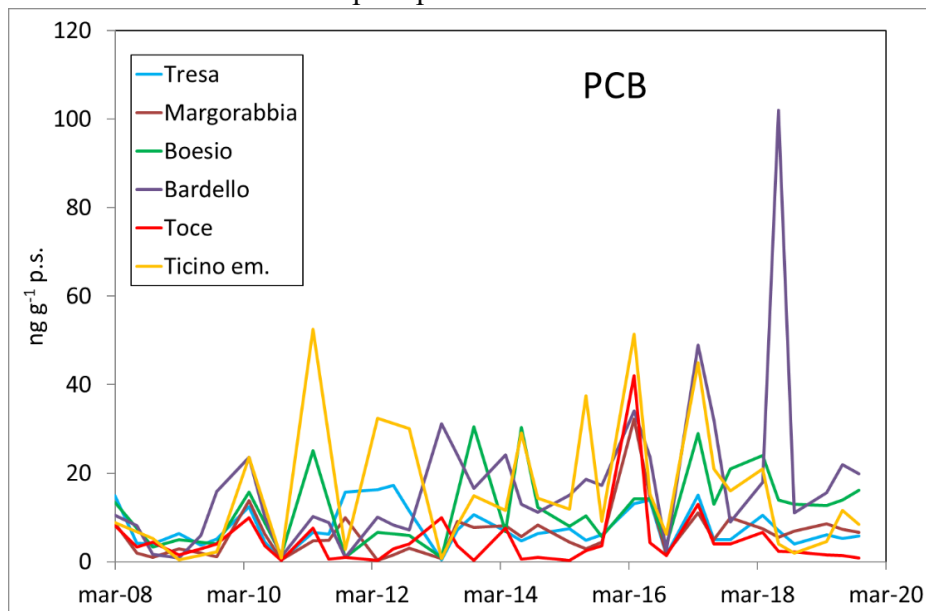


Fig. 11.5 - Concentrazione di PCB nei sedimenti di alcuni immissari e del Ticino emissario

Negli organismi, i PCB si accumulano nei tessuti grassi, perciò per confrontare tra loro specie diverse occorre esprimere la concentrazione in proporzione alla massa lipidica (fig. 11.6). Si nota una forte variabilità legata alla variabilità degli apporti, con concentrazioni minori nei molluschi rispetto ai pesci.

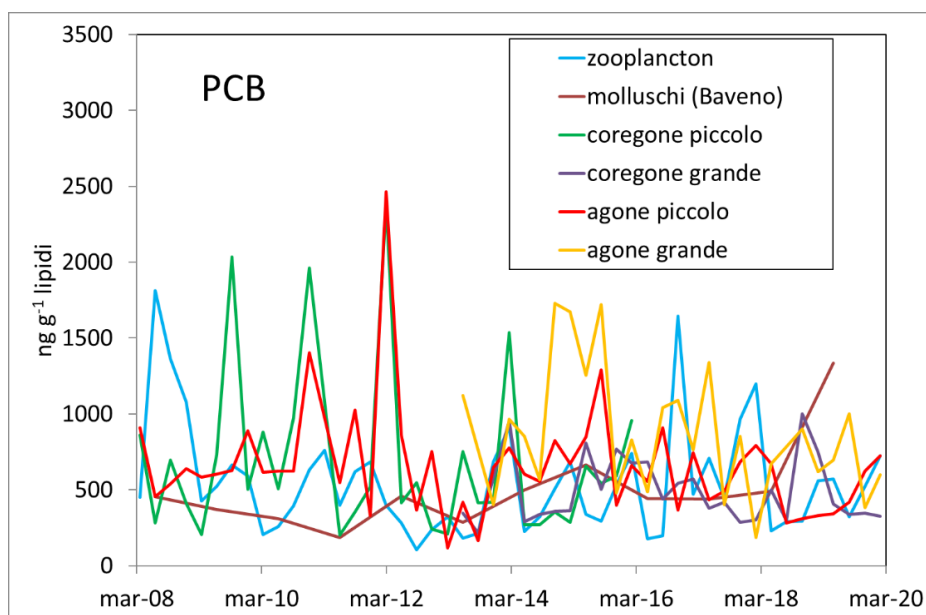


Fig.11.6- Concentrazione di PCB nel biota del Lago Maggiore

Il Decreto Legislativo 172/2015 prevede uno standard di qualità ambientale per la somma di diossine, furani e PCB-diossina simili (PCB-dl) pari $6,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ di tossicità equivalente (TEQ). Nel Lago Maggiore vengono misurati solo i PCB-dl, e quindi occorre tener conto che la somma di diossine e furani (non analizzati) e PCB-dl può raggiungere valori maggiori di quanto qui riportato.

La tossicità equivalente (TEQ) dei PCB-dl misurati nei pesci del Lago Maggiore è mostrata in figura 11.7. A partire dal 2015, il valore soglia di $6,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ non è più stato superato. Negli anni precedenti, invece, lo standard di qualità ambientale era stato superato diverse volte per gli agoni e una sola per i coregoni.

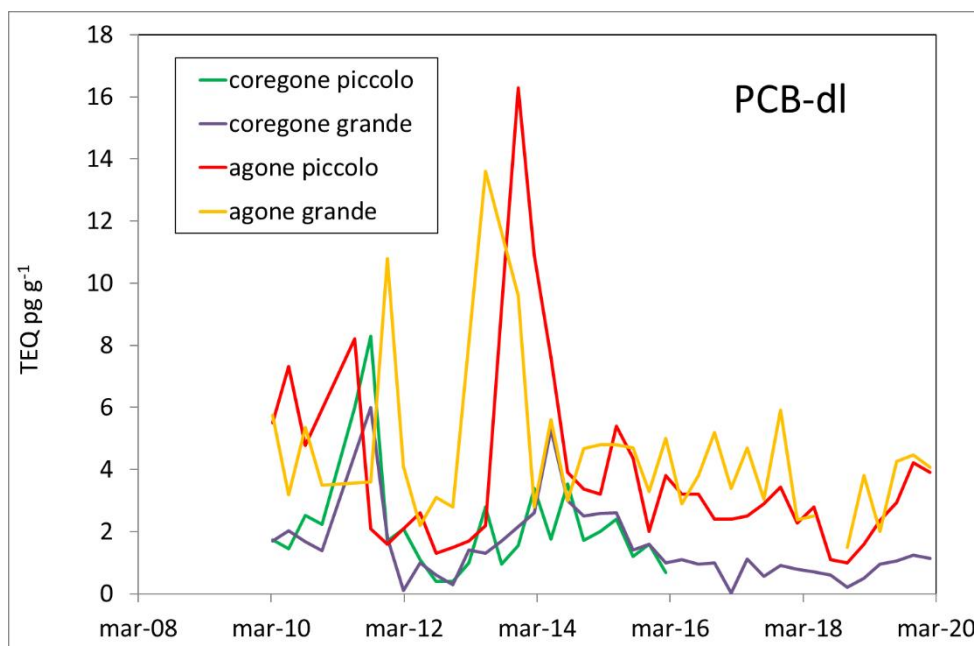


Fig. 11.7– Valori di tossicità equivalente (TEQ) dei PCB-dl nei pesci del Lago Maggiore

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono composti derivanti dai prodotti petroliferi e dai prodotti delle combustioni di materiali organici e idrocarburi.

Nei vertebrati, compresi i pesci, gli IPA sono metabolizzati e non vengono accumulati. Perciò nell'ambito della CIP AIS gli IPA sono stati analizzati soltanto nei molluschi e nei sedimenti dei tributari (recentemente solo del Tresa) e del Ticino emissario.

Anche gli IPA sono poco solubili in acqua e si trovano principalmente associati ai sedimenti fini. Nella fig. 11.8 si vede che una certa variabilità interannuale nel Ticino emissario, e valori più stabili nel Tresa (come negli altri immissari in passato), ad eccezione di un picco molto elevato nel Tresa osservato nel 2015. Il picco di concentrazione nel Ticino emissario nel 2017 potrebbe essere in relazione ritardata con l'apporto del Tresa nel 2015. Nel 2018 e 2019 le analisi di IPA nei tributari non erano previste.

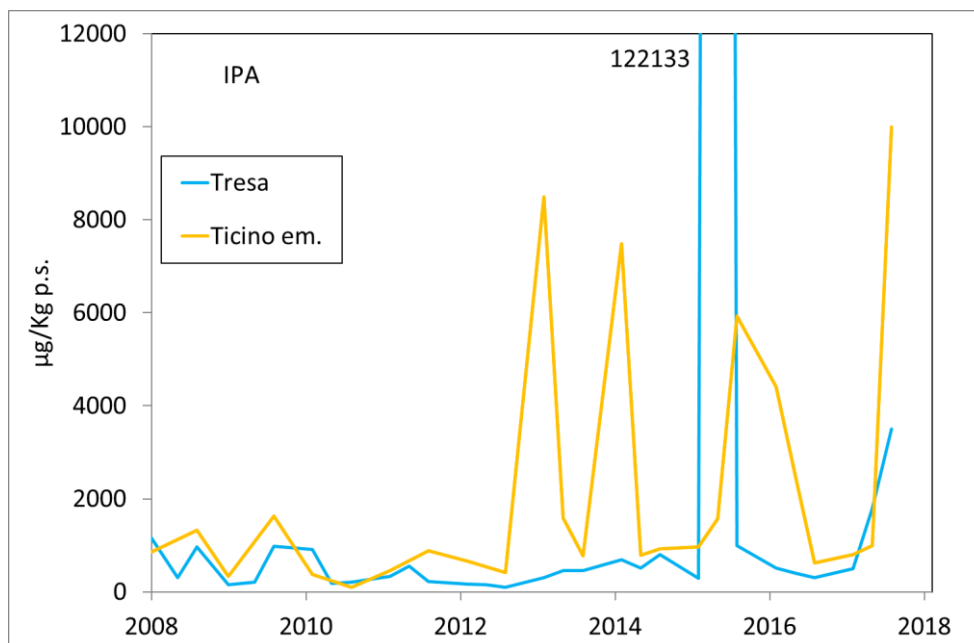


Fig. 11.8 – Concentrazione di IPA nei sedimenti del Tresa e del Ticino emissario

Nei molluschi (fig. 11.9), la variabilità interannuale è modesta in tutte le stazioni, ma si è avuto un netto aumento nel 2014 a Luino (in prossimità della foce del Tresa) e poi nel 2015 in tutto il lago. Nel 2016 le concentrazioni sono ritornate ai valori misurati fino al 2013 per poi risalire ancora nel 2019, in particolare nel Bacino Borromeo.

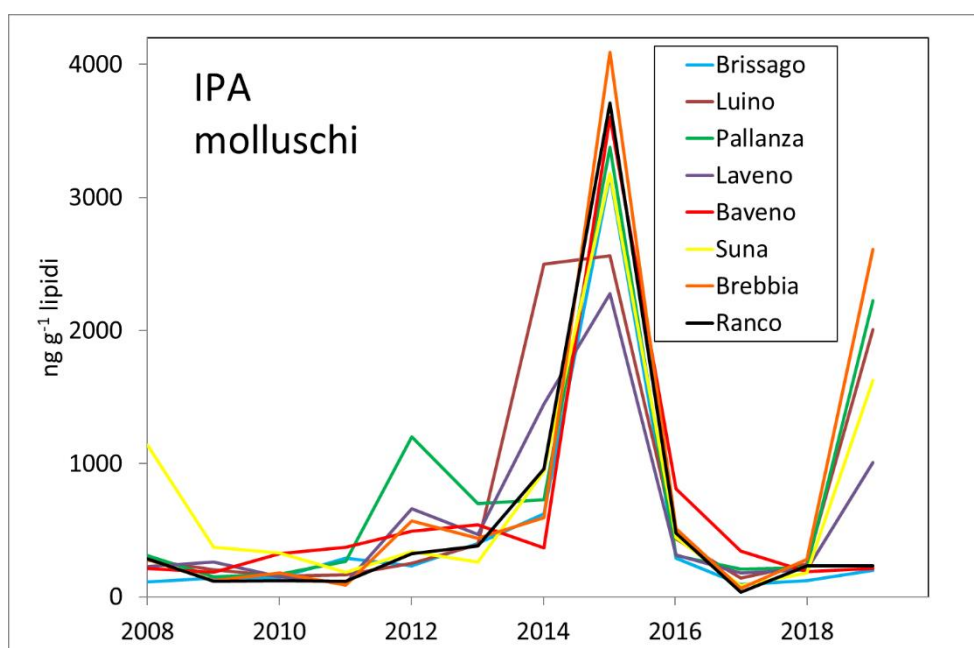


Fig. 11.9 – Concentrazione di IPA nei molluschi del Lago Maggiore

I polibromodifenileteri (PBDE) sono una classe di ritardanti di fiamma alogenati usati come additivi in diversi polimeri organici e presenti, a partire dagli anni '70, in numerosi prodotti commerciali, quali i componenti elettrici ed elettronici (cavi elettrici, plastiche di housing), i materiali isolanti (schiume poliuretatiche), i tessuti (tappezzerie e tendaggi) e negli equipaggiamenti per veicoli. I PBDE sono commercializzati in miscele tecniche prodotte per bromurazione del difeniletere in presenza di un catalizzatore. Tra i possibili congeneri, alcuni penta ed esa-bromurati (BDE-28, 47,

99, 100, 153 e 154) sono ritrovati frequentemente nel sedimento e nel biota insieme al deca-bromurato (BDE-209). Anche i PBDE sono poco solubili in acqua e si trovano principalmente associati ai sedimenti fini.

Nella fig. 11.10 si vede come nel Bardello e nel Boesio vengano misurati regolarmente concentrazioni significative di questi composti, che si trovano anche nel sedimento del Ticino emissario. Il fiume Boesio mostra i più alti picchi di concentrazione superando in ben tre casi i 400 ng g⁻¹ nel 2013, 2016 e 2019.

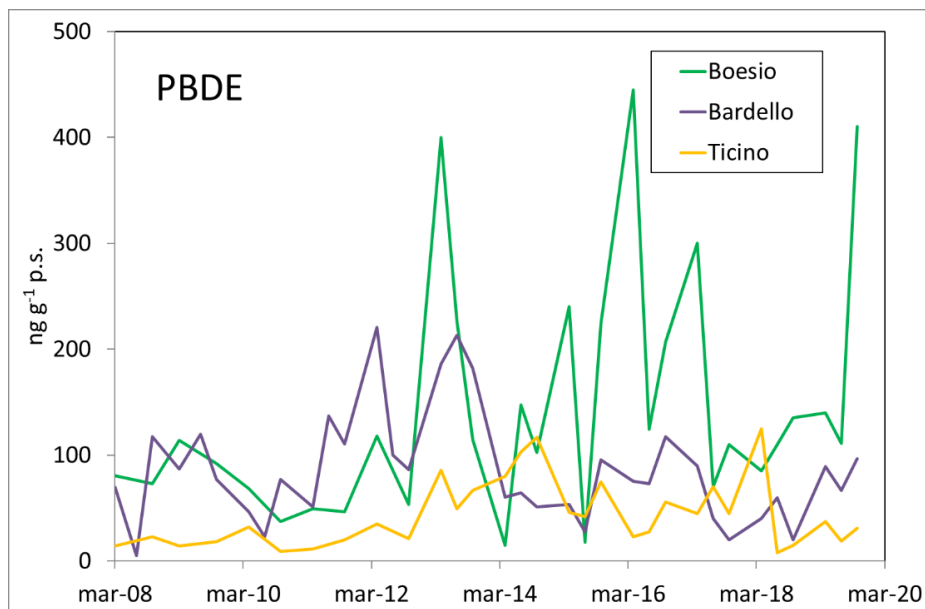


Fig. 11.10 – Concentrazione di PBDE nei sedimenti di alcuni immissari e del Ticino emissario.

I PBDE si accumulano nei tessuti grassi, perciò per confrontare tra loro specie diverse occorre esprimere la concentrazione in proporzione alla massa lipidica (fig. 11.11). Questi composti sono presenti anche nei pesci, con una variabilità interannuale che pare seguire con un breve ritardo la variabilità degli apporti. Le concentrazioni nei molluschi non sono state riportate, perché il dato del 2019 non è ancora definitivo, a causa delle limitazioni operative legate alla pandemia in atto.

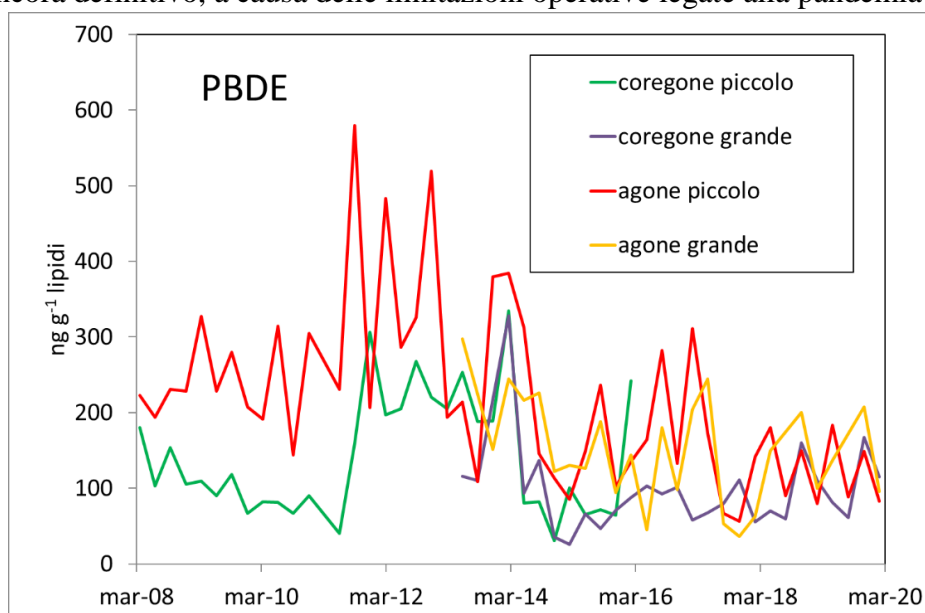


Fig. 11.11 – Concentrazione di PBDE nel biota del Lago Maggiore

La normativa italiana (Decreto Legislativo 172/2015 che recepisce la Direttiva Europea 2013/39) prevede per la classe dei PBDE nel biota che la somma delle concentrazioni dei congeneri BDE-28, 47, 99, 100, 153 e 154 non debba superare il limite di 0,0085 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.f. Nelle specie ittiche la somma delle concentrazioni dei congeneri BDE-28, 47, 99, 100, 153 e 154 supera sempre il limite di 0,0085 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.f. (fig. 11.12), con valori di concentrazioni molto superiori a questa soglia.

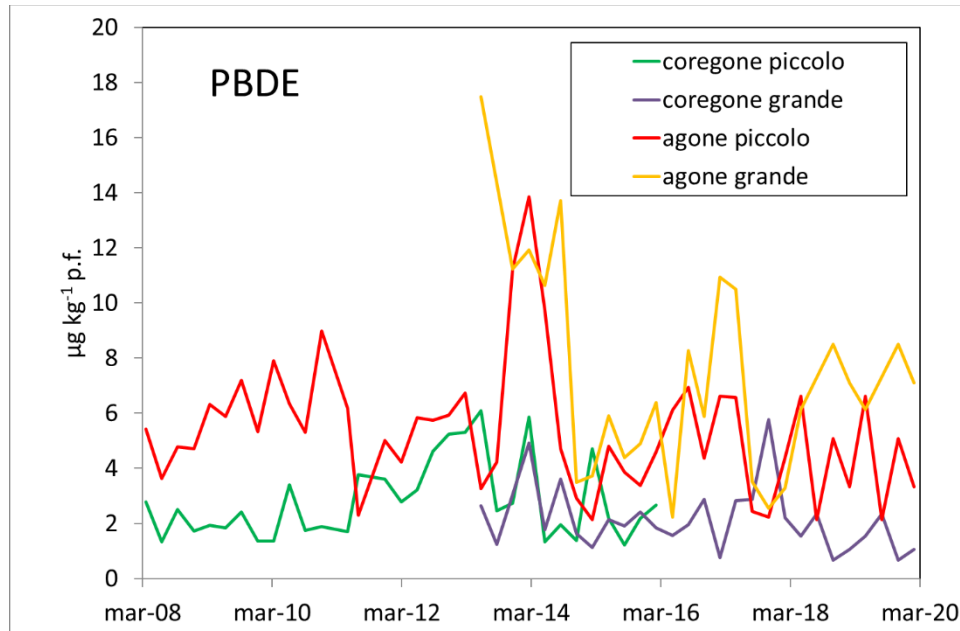


Fig. 11.12 – Somma delle concentrazioni dei PBDE 28, 47, 99, 100, 153 e 154 nei pesci

Il mercurio è un elemento della crosta terrestre, presente naturalmente nell'ambiente. Tuttavia la sua concentrazione nel Lago Maggiore è più elevata del valore di fondo naturale a causa dell'uso di questo elemento per le attività minerarie (già a partire dall'epoca romana) e industriali, come la produzione del feltro per i cappelli (a partire dal XIX secolo) e nelle celle a mercurio per la produzione di cloro e soda nello stabilimento di Pieve Vergonte (a partire dagli anni 1940). Il mercurio può raggiungere gli ecosistemi anche per via aerea, per la precipitazione di particelle di aerosol.

Le concentrazioni di mercurio analizzate nei sedimenti degli immissari (fig. 11.13) mostrano che i valori nel Toce sono generalmente più elevati e presentano una elevata variabilità stagionale e interannuale. Alcuni picchi di concentrazione del Toce si ripetono nel Ticino emissario con un anno di ritardo.

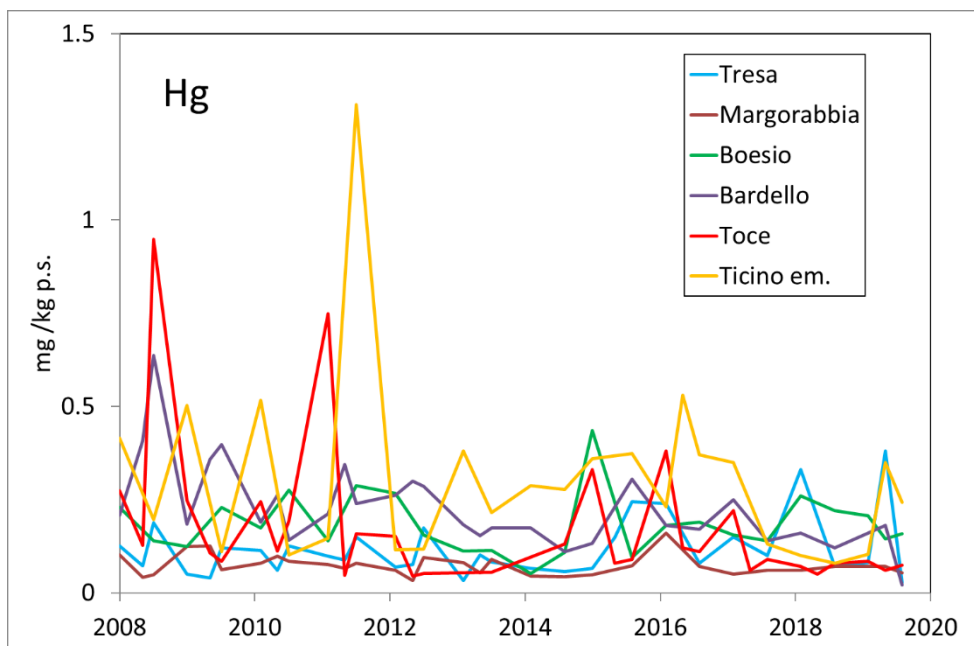


Fig. 11.13 – Concentrazione di mercurio nei sedimenti dei tributari e Ticino emissario

Per quanto riguarda il biota (fig. 11.14), i valori sono espressi in funzione del peso fresco per i pesci, per poter essere confrontati con lo standard di qualità ambientale, e del peso secco per i molluschi e lo zooplancton, per ridurre la variabilità dovuta al contenuto d'acqua.

Le concentrazioni di mercurio nelle due specie di pesce analizzate sono sempre superiori allo standard di qualità, definito dalla normativa italiana (Decreto Legislativo 172/2015 che recepisce la Direttiva Europea 2013/39) che indica il mercurio come una sostanza pericolosa prioritaria e prevede per il biota uno standard di qualità ambientale di 20 ng/g riferito al peso fresco nei pesci.

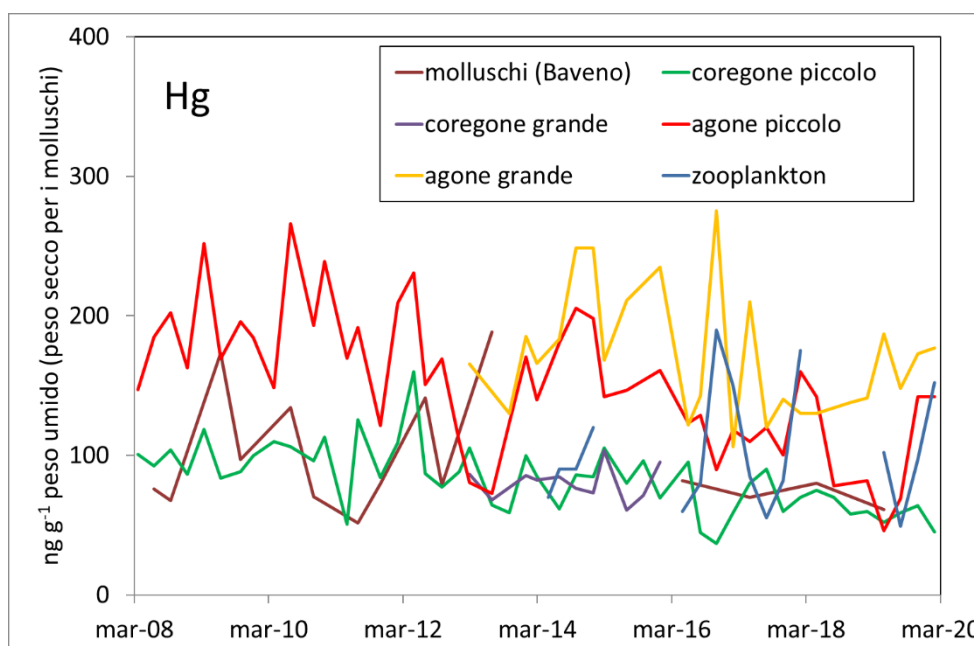


Fig. 11.14 – Concentrazione di mercurio nei molluschi, nello zooplancton e in due specie di pesci del Lago Maggiore

12. GLOSSARIO

Bacino imbrifero: è quella parte di territorio che circonda il lago e che, a causa della sua pendenza, fa da imbuto di raccolta delle acque piovane. Lo spartiacque è la parte più alta del bacino imbrifero per cui le precipitazioni atmosferiche che cadono oltre lo spartiacque non scendono superficialmente verso il lago.

Bioaccumulo: processo attraverso cui sostanze tossiche (per esempio il DDT) si accumulano all'interno di un organismo in concentrazioni crescenti man mano che si sale di livello trofico.

Biocenosi: è l'insieme di flora e fauna che vive in un ecosistema.

Bivalvi: molluschi appartenenti al *Phylum* dei Mollusca. Sono caratterizzati da un corpo protetto da una conchiglia formata da due parti, dette valve.

Biotrasformazione: conversione di una sostanza in altri composti da parte di organismi; comprende la biodegradazione.

BSAF (Biota-Sediment Accumulation Factor): parametro che descrive l'accumulo di composti organici e metalli presenti nei sedimenti nei tessuti degli organismi che ne vivono a contatto.

DDD (diclorodifenildicloroetano): della famiglia degli organoclorurati (OC). Prodotto di degradazione del DDT con proprietà chimico-fisiche simili.

DDE (diclorodifenildicloroetilene): della famiglia degli organoclorurati. Prodotto di degradazione del DDT con proprietà chimico-fisiche simili.

DDT (diclorodifeniltricloroetano): della famiglia degli organoclorurati. E' una sostanza incolore altamente idrofobica usata come potente antiparassitario.

Diossine: le diossine (dibenzo-p-diossine, PCDD e dibenzofurani, PCDF) sono gruppi di sostanze estremamente stabili e persistenti, presenti nel suolo, nell'aria, nei vegetali, negli animali, negli alimenti (in particolare quelle di origine animale come latte e latticini, pesce, carne e uova) e negli esseri umani. Le diossine possono venire prodotte come molecole indesiderate durante processi di combustione (es. fuochi all'aperto, inceneritori di vecchia generazione) e industriali (es. produzione di sostanze chimiche) e da fenomeni naturali (es. attività vulcaniche).

DBDPE (decabromodifeniletano): fa parte dei cosiddetti Novel Bromurated Flame Retardants (NBFRs) e viene usato soprattutto come componente delle miscele contenute negli estintori; altri usi comprendono la creazione di coloranti plastici antifiamma, plastiche per elastomeri e resine sintetiche. Il DBDPE è costituito da due fenili uniti tra loro da un ponte di etano ai quali sono legati 10 atomi di bromo come sostituenti che rendono la molecola stabile ad alte temperature e resistente ai raggi UV ed agli agenti chimici. La sua struttura è molto simile a quella del BDE-209, ma rispetto a quest'ultimo è leggermente più idrofobico. Il DBDPE, essendo attualmente in produzione, può essere rilasciato in ambiente durante la fase produttiva, ma anche a causa dei processi di uso, trasporto, stoccaggio e smaltimento.

Dreissena polymorpha: mollusco bivalve d'acqua dolce. Organismo originario del Mar Nero e della zona del Mar Caspio; specie tra le più invasive comunemente ritrovabile nei corpi d'acqua dell'Europa centrale, America del nord e in molti laghi italiani (es. Como, Garda).

Fingerprint: si riferisce a sostanze o elementi; indicatore specifico di inquinamento.

HBCD (esabromociclododecano) è un composto con 12 atomi di carbonio, 18 di idrogeno e 6 di bromo. In base alla dimensione spaziale occupata dai sostituenti alogenati esistono 16 stereo-isomeri a diversa attività biologica. La miscela tecnica comunemente commercializzata è composta principalmente da 3 isomeri di cui: α -HBCD, β -HBCD e γ -HBCD, con tracce degli altri. L'HBCD ed i suoi isomeri erano utilizzati principalmente nell'edilizia come isolanti ma, in modo minore, anche nelle imbottiture degli arredi, nei tessuti delle automobili e, sempre come isolanti, sui mezzi di trasporto, imballaggi e componenti elettroniche. L'Unione Europea ne ha vietato nel 2016 la produzione, l'immissione in commercio e l'uso sia allo stato puro che all'interno di preparati o di prodotti in concentrazioni superiori allo 0,01% in peso, con alcune eccezioni specifiche per la sua produzione ed uso come polistirene espanso in edilizia.

IPA (idrocarburi policiclici aromatici): sono idrocarburi costituiti da due o più anelli aromatici, quali quello del benzene uniti fra loro, in un'unica struttura generalmente piana. Si ritrovano naturalmente nel carbon fossile e nel petrolio.

Gli IPA di origine petrogenica rappresentano una frazione importante dei combustibili fossili. Carbone, petrolio grezzo e scisti bituminosi contengono elevate concentrazioni di questi composti. Spesso il petrolio rappresenta la principale fonte di IPA nel comparto acquatico su scala globale.

Gli IPA di origine pirogenica sono, invece, generati dalla combustione incompleta o dalla pirolisi (decomposizione termochimica) della sostanza organica. Le principali sorgenti fisse in cui possono avvenire simili reazioni sono: riscaldamento domestico a carbone, olio minerale o legna; impianti termoelettrici; fuochi all'aperto quali incendi boschivi o la bruciatura di stoppie; incenerimento di rifiuti solidi urbani; impianti di gassificazione e cokefazione del carbone; processi termici dell'industria metallurgica, quali la produzione di ferro e acciaio. Le sorgenti mobili sono, invece, rappresentate dal traffico veicolare. L'emissione di IPA da veicoli a motore è considerata una delle maggiori sorgenti di questi contaminanti nelle aree urbane.

Isomero: sono detti isomeri due composti aventi stessa formula bruta e stessa composizione percentuale di atomi, ma aventi proprietà fisiche, e spesso anche comportamento chimico, differenti.

Lipide: della famiglia dei grassi, molecole organiche, presenti in natura, raggruppate sulla base delle loro proprietà comuni di solubilità: sono insolubili in acqua (idrofobici).

Livello trofico: è la posizione di un organismo o di una comunità nella rete trofica: classicamente si distinguono produttori (che svolgono la fotosintesi clorofilliana), consumatori primari (che si nutrono di produttori), consumatori secondari (che si nutrono di consumatori primari), decompositori, ecc. Un organismo o una comunità può però porsi ad un livello trofico differente a seconda dell'età, della taglia o delle condizioni ambientali.

Metabolita: ogni molecola che partecipa attivamente al metabolismo. Anche di sostanza derivata da un'altra.

μg : microgrammo, 10^{-6} grammi, milionesimo di grammo.

ng : nanogrammo, 10^{-9} grammi, miliardesimo di grammo.

Organoclorurati: famiglia di composti organici formati per reazione con il cloro. Possono essere prodotti direttamente o indirettamente dall'uomo, tra questi si annoverano le diossine, i furani, il DDT e i PCB. Per contro, i processi naturali formano un numero molto limitato di composti organoclorurati e in quantità trascurabili.

PBDE (difenileteri polibromurati): sono ritardanti di fiamma cioè composti usati per evitare o ritardare l'estendersi di fiamme in caso di incendio. Sono comunemente utilizzati in molti settori industriali tra cui quello tessile, elettronico e per la produzione di materiale plastico.

PCB (policlorobifenili): della famiglia degli organoclorurati. Classe di composti organici (= congeneri) considerati inquinanti e persistenti dalla tossicità paragonabile a quella della diossina. I PCB venivano utilizzati in passato nella sintesi di antiparassitari, erbicidi, preservanti del legno, vernici, solventi, disinfettanti, come plastificanti nella produzione di adesivi e come fluidi dielettrici nei condensatori e nei trasformatori elettrici, ed ancora oggi utilizzati per alcuni processi industriali. I policlorodifenili costituiscono una famiglia di 209 congeneri diversi che possono essere suddivisi in due gruppi in base alle loro proprietà tossicologiche. Un gruppo, composto da 12 congeneri, possiede proprietà tossicologiche analoghe alle diossine e viene pertanto denominato gruppo di "PCB diossino-simili" (PCB-dl); si tratta di sostanze che sono state incluse nella "Valutazione del rischio di diossine e PCB diossino-simili negli alimenti" effettuata dal comitato scientifico dell'alimentazione umana dell'Unione europea. I dati sulla presenza dei PCB-dl negli alimenti e nei mangimi sono rilevati con modalità diverse, per esempio come somma di tre congeneri di PCB (PCB 138, 153, e 180), come somma di sei congeneri di PCB (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180), spesso nominati PCB indicatori (PCB-i), o come somma di sette congeneri (somma dei sei PCB indicatori più il PCB 118). Questa mancanza di uniformità spesso compromette il confronto diretto dei dati di concentrazione.

PEC: *Probable Effect Concentration*. Concentrazione al di sopra della quale è probabile avere effetti tossici sulla fauna macrobentonica.

PEC-Q: *Probable Effect Concentration Quotient*: concentrazioni misurate per ciascun elemento divise per il corrispondente valore guida. 0,3-0,5: valori soglia al di sopra dei quali è probabile riscontrare effetti tossici sulla fauna bentonica (Long, E.R., C.G. Ingersoll & D.D. MacDonald. 2006. Calculation and uses of mean sediment quality guideline quotients: a Critical review. *Environ. Sci. Technol.*, 40:1726-1736).

pg: picogrammo, 10^{-12} grammi, miliardesimo di milligrammo.

Pirolisi: la pirolisi è un processo di decomposizione termochimica di materiali organici, ottenuto mediante l'applicazione di calore e in completa assenza di un agente ossidante (normalmente ossigeno).

Stratificazione termica: fenomeno che si manifesta nei laghi con lo sviluppo di due strati discreti di acqua a temperatura diversa fra loro ma relativamente omogenea all'interno dello strato.

TEC (*Threshold Effect Concentration*): livello soglia di concentrazione oltre al quale si ha un effetto sul metabolismo degli organismi.

TEF (*Toxic Equivalent Factor*): indice che consente di confrontare la tossicità relativa fra differenti composti (il TEF è relativo alla diossina più pericolosa la TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina). Esistono diverse metodiche per il calcolo del TEF e la più comunemente usata è quella proposta nel 1997 dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità (World Health Organization, WHO) e nota come WHO(97)-TEF.

TEQ: concentrazione tossica equivalente o concentrazione equivalente di tossicità calcolata quale somma delle concentrazioni misurate dei singoli congeneri, ciascuna moltiplicata per il relativo fattore di tossicità (WHO (97)-TEF).