

*Non piangere perché una cosa è finita
Sorridi perché è accaduta.
-Gabriel Garcia Marquez-*

*Alla mia famiglia
e a tutti i meravigliosi compagni di viaggio
che custodirò sempre nel cuore.
Grazie.*



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

Dipartimento di Innovazione nei Sistemi Biologici Agroalimentari e Forestali (DIBAF)

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE AMBIENTALI (XXVII CICLO)

TITOLO DELLA TESI:

**Contaminazione da isomeri dell'esaclorocicloesano
nella Valle del fiume Sacco (Lazio): risultati e prospettive**

Settori scientifico-disciplinari: CHIM/06 - AGR/18

Dottoranda:

Isabella Carastro

Tutor interno:

Dott.ssa Roberta Bernini

Tutor esterno:

Prof. Bruno Ronchi

Coordinatore del Corso di Dottorato:

Prof. Maurizio Petruccioli

Viterbo, 17 luglio 2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 La Valle del fiume Sacco	pag. 1
1.1.1 <i>Sviluppo industriale</i>	pag. 1
1.1.2 <i>Inquinamento ambientale</i>	pag. 3
1.1.3 <i>Indagini ambientali ed epidemiologiche</i>	pag. 5
1.1.4 <i>Interventi e provvedimenti di enti istituzionali</i>	pag. 7
1.2 Gli isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH): inquinanti organici persistenti	pag. 9
1.2.1 <i>Proprietà chimico-fisiche</i>	pag. 9
1.2.2 <i>Produzione ed utilizzo in campo agronomico</i>	pag. 12
1.2.3 <i>Livelli ambientali in Italia e nel mondo</i>	pag. 13
1.2.4 <i>Tossicità</i>	pag. 14
1.2.4.1 <i>Effetti tossici sugli animali</i>	pag. 14
1.2.4.2 <i>Effetti tossici sull'uomo</i>	pag. 15
1.2.5 <i>Diffusione e persistenza nei vari comparti ambientali</i>	pag. 16
1.2.6 <i>Tecniche di bonifica ambientale di siti contaminati</i>	pag. 19
1.2.6.1 <i>Tecniche biologiche</i>	pag. 21
1.2.6.2 <i>Fitorimedio</i>	pag. 24
1.3 Le tecniche analitiche utilizzate per la determinazione degli HCH	pag. 26
1.3.1 <i>Gas-cromatografia</i>	pag. 26
1.3.2 <i>Spettroscopia Infrarossa (IR)</i>	pag. 29
1.4 Il progetto di ricerca	pag. 32
 2. RISULTATI SPERIMENTALI E DISCUSSIONE DEI DATI	 pag. 34
2.1 <i>Area oggetto di studio e campionamenti</i>	pag. 34
2.2 <i>Determinazione analitica degli HCH in campioni di suolo e soprassuolo</i>	pag. 36
2.3 <i>Determinazione analitica degli HCH in matrici inerenti</i>	pag. 62
<i>l'allevamento dei bovini da latte</i>	
2.4 <i>Determinazione analitica degli HCH in campioni alimentari</i>	pag. 66
2.5 <i>Determinazione analitica degli HCH in campioni di pioppo</i>	pag. 66
 3. CONCLUSIONI	 pag. 72
 4. PARTE SPERIMENTALE	 pag. 74

<i>4.1 Materiali e strumentazione</i>	pag. 74
<i>4.2 Metodi di estrazione degli HCH</i>	pag. 75
<i>4.3 Determinazione degli HCH tramite gas-cromatografia</i>	pag. 78
<i>4.4 Elaborazioni statistiche dei dati gas-cromatografici</i>	pag. 84
<i>4.5 Determinazione degli HCH tramite Spettroscopia IR</i>	pag. 85

5. BIBLIOGRAFIA	pag. 86
------------------------	---------

1. INTRODUZIONE

1.1 La Valle del Fiume Sacco

1.1.1 Sviluppo industriale

La Valle del Sacco, situata nel cuore del Lazio meridionale, fa riferimento in massima parte alla provincia di Frosinone e, per un breve tratto, a quella di Roma, costituendo la più ampia sezione pianeggiante del Lazio interno (*Figura 1*). Il fiume che la percorre, da cui deriva la denominazione, nasce a Colle Cero dal versante orientale dei Monti Prenestini, scorre a sud-est per 87 Km, confluisce nel Liri e prosegue nella pianura pontina fino a sfiorare il confine campano. Con il suo percorso articolato, che alterna restringimenti a zone di ampia portata (16.000 litri al secondo), questo fiume ha, da sempre, rappresentato la principale risorsa idrica della zona, concorrendo all'espansione dei centri urbani della provincia e al potenziamento dell'economia agricola ed industriale.¹

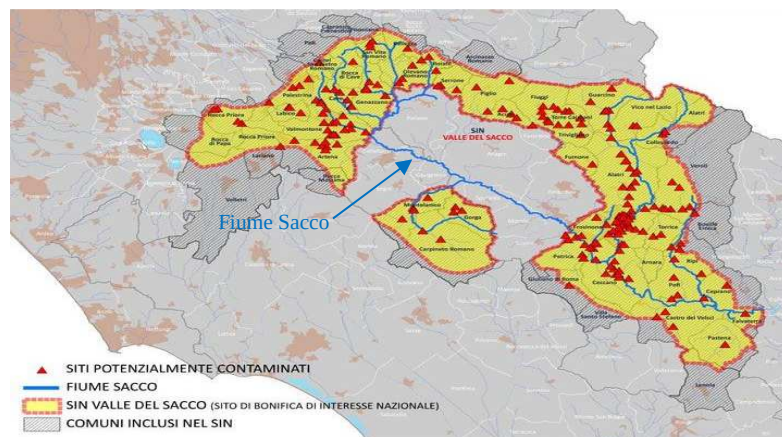


Figura 1. Collocazione geografica della Valle del Fiume Sacco (Lazio).

Fin dagli inizi del Novecento infatti, la Valle del Sacco è stata protagonista di un importante sviluppo industriale, in particolare, ad opera dell'industria bellica Bomprini Parodi Delfino (BPD) che nel 1911 acquistò in questa zona, i suoi primi 34 ettari di terreno. Il territorio scelto rispondeva perfettamente alle esigenze logistiche, politiche ed amministrative di un'industria bellica: era costituito da un terreno collinoso con conformazione adatta a ricavare gallerie per i collaudi balistici, era distante dai centri abitati, aveva un corso d'acqua in grado di soddisfare fabbisogno idrico e una stazione ferroviaria, con la quale gli stessi stabilimenti si sarebbero allacciati tramite specifici raccordi. Inoltre, i monti Lepini, grazie alla loro fitta rete boschiva, rappresentavano una naturale difesa in caso di offensiva militare, ed esistevano già le concessioni amministrative per l'utilizzo dell'acqua del fiume, in quanto mutuabili dai precedenti stabilimenti agricoli.²A partire dalla fine del 1913, quindi, furono attivati i reparti per la produzione di acido nitrico, per la purificazione della glicerina e venne rafforzato il reparto per produzione della balistite e della dinamite, portando alla formazione di una vera e propria "città-fabbrica" dove strutture abitative e servizi nacquero intorno agli stabilimenti, andando a modellare un'area urbana

autosufficiente. La prima guerra mondiale comportò una fortissima crescita della produzione locale che passò dagli iniziali 1000 kg di balistite al giorno del 1913 ai 3500 kg del 1915.³ Lo sviluppo strutturale degli stabilimenti non si arrestò neppure una volta terminato il conflitto mondiale. I terreni agricoli subirono profonde trasformazioni dovute ad alcuni piani di ampliamento della BPD che andarono ad interessare l'area agricola e il patrimonio forestale del comune di Ceccano. La superficie totale dell'industria si ampliò dai 340.000 mq del 1913 ai 1.450.000 del 1928, per arrivare ai 6.228.000 del 1965.⁴ Tra il 1918 e il 1927, inoltre, la BPD estese i propri interessi imprenditoriali verso la produzione di calce e cementi a cui seguirono altre attività, come la produzione di prodotti intermedi (acido solforico, glicerina) e di prodotti ricavati dall'utilizzo dei cascami di tali lavorazioni (perfosfati minerali, solfato ammoniaco). Un'ulteriore fase di espansione dell'azienda si ebbe durante il secondo conflitto mondiale con la creazione di nuovi reparti, atti ad ampliare la gamma delle produzioni esplosive (dinamiti, polveri di lancio) e nuovi stabilimenti per la produzione di tritolo e nitrocellulosa.

Al termine della seconda guerra mondiale, fu messa in opera una vera e propria azione di riconversione produttiva partendo dall'agricoltura, che venne sottoposta a tentativi di trasformazione e rilancio grazie allo sviluppo di un'attività zootecnica specializzata e all'adeguamento di ampi spazi dedicati al granoturco come alimento strategico per l'alimentazione animale, con incisiva introduzione di sementi ibride, rivelatesi capaci di apportare più alte rese percentuali.⁵ Soltanto a partire dal secondo dopoguerra l'industria divenne prerogativa assoluta del processo di ricostruzione provinciale, grazie all'aumento delle importazioni di materie prime e di tecnologie che favorirono una massiva crescita dell'industria chimica e di molte aziende private che diedero avvio al potenziamento della propria produzione. Tra queste, la BPD potenziò il collegamento con il mercato chimico in due precise direzioni, quella industriale, specializzandosi nei sistemi di sintesi dell'anidride ftalica, maleica e delle resine di poliestere, e quella agricola, avviando una specifica sezione dedicata a prodotti destinati all'industria agroalimentare come antiparassitari, insetticidi, anticrittogamici, diserbanti e fertilizzanti fosfatici. Tra il 1955 e il 1956, inoltre, fu avviata una nuova sezione tessile in località "Castellaccio", con uno specifico impianto per la produzione di una fibra sintetica poliammidica che più di altri vide un intensissimo progresso, divenendo, a metà anni sessanta ben cinque volte più grande dell'originario. Nonostante questo enorme sviluppo, l'esistenza di numerose realtà industriali che determinavano una frammentazione della proprietà terriera non permetteva di garantire il mantenimento di una azienda autonoma. Per questo motivo, tra il 1961 e il 1963, venne istituito il cosiddetto "*Nucleo di industrializzazione della Valle del Sacco*" che permetteva di congiungere in un unico asse tutte le realtà sparse sul territorio, al fine di irrobustire l'intero settore del bacino della Valle sfruttando al meglio le risorse naturali. A seguito di approfondite indagini, venne selezionata un'area compresa in larghezza tra l'Autostrada del Sole ed il fiume Sacco, ed in lunghezza fra il bosco Faito e le sorgenti di Mola dei Frati, presso Ferentino, per una estensione totale di 400 ettari di terreno da destinare alle nascenti industrie. Alla fine dello stesso anno, i competenti organi governativi approvarono la trasformazione del nucleo in "*Area di sviluppo*

industriale”, formalizzando giuridicamente una fase di crescita ormai avviata in tutta la provincia.⁶ Tra i nuovi insediamenti spiccavano ancora i nomi della BPD, Osim Plocco e Snia Viscosa e, più a sud, furono abbastanza rapidi gli interventi di costruzione di nuovi opifici quali, ad esempio, quelli della Plasti Sud nel comune di Ferentino. Seguirono successivamente le seguenti industrie: Clipper Oil Italiana, Italfornaci, Cemamit, Xiloplast, Ilfem Sud e Klopman. Quest’ultima, produttrice di tessuti sintetici come il poliestere ed il vinile, rispondeva, più di altre fabbriche, non solo al mercato nazionale, ma anche a quello dell’intero bacino del Mediterraneo.⁷ Il 31 marzo 1970 il Consiglio dei Ministri approvò il piano regolatore dell’area. La superficie passò, pertanto, dagli iniziali 400 a 2500 ettari di estensione. Nel 1971 il 44% della popolazione attiva risultava impiegata nel settore industriale, mentre nel settore agricolo risultava impiegata poco meno del 21%. Alla data del 30 ottobre 1980 le unità industriali ammontavano a 138 senza considerare quelle che in quello stesso ciclo erano ancora in fase di preparazione. Di lì a poco l’industria chimica si sarebbe sviluppata a tal punto da divenire il tratto caratteristico dell’intera area.

1.1.2 Inquinamento ambientale

Le prime evidenze di inquinamento della Valle del Sacco si manifestarono già a partire dalla seconda guerra mondiale, ma è solo con la ristrutturazione degli apparati istituzionali che fu verificata una prima seria alterazione della qualità ambientale di questo territorio. Nel 1947, infatti, alcuni agricoltori del luogo inviarono alla prefettura di Frosinone un esposto avente come oggetto “*Inquinamento acque del fiume Sacco*” con il quale informavano il Ministero dell’Agricoltura di una serie di casi di morie di pesci riscontrati nell’area che mettevano in seria discussione l’approvvigionamento ittico locale.⁸ Tra il 1949 ed il 1950 chiari sintomi di degrado furono registrati anche presso altre località del frusinate, come sulle rive dei fiumi Melfa, Rapido e Liri. Nel corso di questi anni, infatti, varie realtà produttive avevano ottenuto i nulla osta per le attività di carico e scarico industriale, nonostante fosse già stata riconosciuta ufficialmente la responsabilità di alcune delle suddette aziende nelle attività di sversamento nelle acque del Sacco di materiale potenzialmente dannoso. L’inquinamento fluviale in quel lasso di tempo risultava circoscritto ad un preciso perimetro territoriale, nel quale operavano noti stabilimenti per la lavorazione di materiali acidi e cascami di origine chimica, come specificato dalle relazioni dei laboratori di analisi di Frosinone.⁹ Attraverso le molteplici relazioni delle Unità Sanitarie Locali e grazie alle comunicazioni che la Prefettura intratteneva con il Ministero della Sanità, verso la fine degli anni Sessanta il problema dell’inquinamento si imponeva in tutta la sua dimensione: era, ormai, chiara la consapevolezza delle complicazioni che riguardavano i nessi tra la scarsa regolamentazione in materia di gestione idrica e l’assenza di sistemi di depurazione; preoccupazioni, peraltro, sollevate anche dalle crescenti proteste degli abitanti dell’area. Soprattutto tra l’estate e l’autunno del 1968 andò accumulandosi una notevole mole di informazioni sui siti che più risentivano della non regolamentata utilizzazione delle acque fluviali e delle conseguenze che questo fenomeno comportava principalmente sull’agricoltura. La tipologia di tossicità riscontrata evidenziava quali potessero essere le aziende direttamente responsabili di gravi casi di

contaminazione da organoclorurati e acidi di diversa natura. Infatti, fu evidenziata la diffusione ambientale di sostanze chimiche, quali insetticidi, antiparassitari e relativi metaboliti nei prodotti agricoli e negli animali. In particolare, gli effetti devastanti della diffusione di tali sostanze furono evidenziati dall'ingresso nella catena alimentare di alcuni isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH), potenti pesticidi della famiglia dei composti organoclorurati impiegati sin dagli anni '50 per il trattamento delle sementi, dei suoli, degli alberi da frutta e del legname, come antiparassitari per gli animali domestici e di allevamento e in alcuni preparati farmaceutici.¹⁰ Dagli anni '70 la produzione degli HCH diminuì fino alla totale cessazione ma questo provvedimento comportò il loro stoccaggio in varie discariche a cielo aperto presenti in loco. Purtroppo, a causa della loro elevata persistenza ambientale e della lisciviazione da parte delle acque piovane, consistenti residui furono incanalati nei fossi Savo e Cupo, creando un ingresso costante nel fiume Sacco. Nel 1971 le condizioni del fiume in prossimità di Ceccano divennero disastrose e misero a dura prova la salute dei cittadini: 66 analisi svolte dall'Ufficio Medico Provinciale nello stesso anno constatarono la quasi totale assenza di sistemi di depurazione degli scarichi che già da anni defluivano nel fiume Sacco senza previo trattamento. Nonostante ciò, nel 1975 alcune delle ditte, ritenute responsabili di questo grave stato ambientale, ottennero il rinnovo delle autorizzazioni per lo scarico dei reflui senza alcun sistema di controllo. Non solo, nel 1977 un'indagine condotta dal Consiglio Nazionale delle Ricerche rilevò per la prima volta che nel polo industriale anche lo smaltimento dei rifiuti tossici solidi, provenienti dagli stabilimenti delle lavorazioni chimiche, non avveniva in modo regolare. I rifiuti, come si legge in uno dei passaggi delle relazioni elaborate a seguito delle indagini *“venivano sistemati in appositi fusti metallici, ed inviati al campo spazzatura, per poi essere bruciati insieme ad altri residui di lavorazione”*.¹¹ Il citato “campo spazzatura” era sostanzialmente una buca a cielo aperto nella quale venivano interrati tutti i rifiuti. Si denotava, quindi, già nel 1977, oltre al palese sversamento di liquami tossici che avveniva nei pozzi defluenti nel fiume, anche un'altra delle possibili cause di alterazione qualitativa delle risorse idriche e dei danni registrati in alcune colture circostanti gli impianti di lavorazione. Le industrie, di fatto, per molto tempo attinsero alle risorse idriche locali sfruttando la scarsissima regolamentazione e i ritardi infrastrutturali che riguardavano i sistemi di depurazione tanto che, come risultò presto evidente, non fu solo il fiume Sacco a risentire dell'inquinamento ambientale, ma anche diversi altri corsi d'acqua e bacini inferiori.¹² Durante gli anni '80, i palesi segnali di inquinamento misero a dura prova l'efficienza dei governi locali. All'inizio del decennio, alla Regione Lazio fu affidata la realizzazione di una piattaforma depurativa per i rifiuti industriali e la ricerca di aree di scarica controllata dietro supervisione del Ministero dei Lavori Pubblici, con un auspicio di svolgimento non oltre il 1984 ed uno stanziamento totale di 62 miliardi di lire. Dopo un breve periodo di apparente miglioramento delle condizioni idrologiche e faunistiche delle aree rurali, alcuni eventi e congiunture tecniche concorsero ad impedire il procedere delle opere di bonifica.¹³ Inoltre, una serie di gravi disfunzioni dei nuovi sistemi di depurazione, nonché la scarsa attenzione riservata a tali apparati, si rivelarono tra le cause principali di nuovi ed ulteriori problemi di contaminazione. In questa situazione di

caos, i comuni iniziarono a prendere iniziative autonome rispetto alle direttive centrali vietando l'utilizzo delle acque del fiume Sacco per scopi irrigui, balneazione o approvvigionamento per il bestiame. Gli atti, le notifiche, i rilevamenti che attestavano uno stato di avanzato degrado si susseguirono fino al 1990, quando un'indagine congiunta della Guardia di Finanza di Colleferro e della USL locale rivelò la presenza di enormi quantitativi di rifiuti industriali abbandonati nelle aree in prossimità del perimetro precedentemente occupato dagli stabilimenti BPD consistente in circa 4 ettari di suolo su cui attualmente sono collocate altre aziende.¹⁴ Nonostante l'obbligo di bonifica del 1993 di tutti i siti inquinati della Corte di Cassazione del Tribunale di Velletri, poco o nulla cambiò fino a quando nel 2005 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, nel corso di alcuni controlli previsti, riscontrò in un campione di latte proveniente da una azienda agricola del luogo, un valore di β -esaclorocicloesano circa 20 volte superiore al livello consentito dalla normativa comunitaria. Questo rilevamento ha determinato storicamente l'inizio dello stato di emergenza ambientale del bacino fiume Sacco e il riconoscimento della Valle come sito di interesse nazionale.

1.1.3 Indagini ambientali ed epidemiologiche

A seguito dell'emergenza scaturita dai controlli del 2005, il Presidente della Regione Lazio venne nominato Commissario Delegato per la promozione delle attività di sorveglianza ambientale ed epidemiologiche finalizzate a garantire la tutela della sanità pubblica e la sicurezza delle produzioni agricole. A tal fine, vennero effettuati continui monitoraggi della Valle a livello agricolo, zootecnico, ambientale e sanitario con l'istituzione di un'apposita Unità di Crisi, composta dal Dipartimento di Chimica di Roma, dal Dipartimento di Prevenzione dei Servizi Veterinari dell'ASL di Roma e Frosinone, dall'Area di Sanità Veterinaria e Tutela degli Animali della Regione Lazio.¹⁵ Tale Unità mise immediatamente in atto una serie di verifiche in tutte le aziende agricole considerate a rischio, nelle quali nel frattempo la produzione giornaliera di latte e prodotti alimentari era stata destinata alla distruzione, seguite dalle analisi sui capi di bestiame "positivi" per i quali fu previsto l'abbattimento. Dai risultati ottenuti emerse che 32 aziende bovine, 1 bufalina e 9 ovine, distribuite lungo l'alta e media Valle del fiume Sacco, presentavano concentrazioni elevate di β -esaclorocicloesano in campioni di latte e foraggi utilizzati per l'alimentazione animale con un andamento inversamente proporzionale alla distanza dall'alveo fluviale. Nel giro di pochi mesi vennero abbattuti 5000 capi di bestiame e distrutti 1.533.000 Kg di foraggi prodotti nella zona, compromettendo seriamente l'intera economia zootecnica.¹⁶ Elevati livelli elevati di esaclorocicloesano furono riscontrati anche nelle acque adiacenti l'area industriale ex-BPD, in pozzi privati di Colleferro, nelle aree ripariali fino a 200 metri dal fiume e nei suoi sedimenti a valle dell'area.¹⁷ Successive analisi, effettuate tra il 2007 e il 2010, evidenziarono che in prossimità di eventi alluvionali, i livelli di esaclorocicloesano tendevano ad aumentare nelle acque, nel suolo e nel sottosuolo, dimostrando che la contaminazione non fosse più alimentata solo dal complesso industriale ma era da ricondurre principalmente ai sedimenti fluviali sui quali evidentemente risultavano adsorbiti gli

inquinanti organici. Tali composti, infatti, in coincidenza degli eventi alluvionali e della conseguente turbolenza delle acque tendevano a tornare in sospensione e ad accumularsi nei vari comparti ambientali.¹⁸ Le indagini condotte, inoltre, misero in evidenza che l'esaclorocicloesano utilizzato come insetticida a tutela delle produzioni agricole fino al 1975 fosse stato prodotto in ingenti quantitativi fino alla fine degli anni '80 nell'area industriale di Colleferro (RM). Infatti, nel 1989 in un'area all'interno dei possedimenti ex-BDP furono rinvenuti numerosi fusti interrati contenenti residui di lavorazioni industriali che presentavano ingenti quantitativi di esaclorocicloesano. Tali indagini, congiunte a quelle ambientali, confermarono l'associazione causale tra la somministrazione di foraggi e/o alimenti prodotti in terreni contaminati lungo il fiume Sacco e i livelli non conformi nel latte e nelle carni. Di conseguenza, si concluse che la presenza di esaclorocicloesano nelle varie matrici ambientali ed alimentari dovesse essere imputata ad un processo contaminazione a catena scaturito dal non corretto smaltimento dei rifiuti e dalla presenza di discariche a cielo aperto che nel corso del tempo avevano contaminato l'intera catena trofica fino ad arrivare all'uomo. In considerazione di queste conclusioni, accanto al monitoraggio ambientale vennero avviati una serie di studi epidemiologici sulla popolazione a rischio. Tra questi, il progetto denominato *"Studio epidemiologico nazionale dei territori e degli insediamenti esposti a rischio inquinamento"* svolto nel 2011 dal Dipartimento di Biologia e Biotecnologie dell'Università di Roma La Sapienza e il progetto di monitoraggio sulla *"Salute della popolazione nell'area della Valle del Sacco"* affidato all'ASL di Roma nel triennio 2010-2013. Con entrambi i progetti, l'estesa indagine di sorveglianza clinica sulla concentrazione di β -esaclorocicloesano nel sangue, e i controlli di salute periodici dei residenti ad una distanza di 1 Km dal fiume Sacco, dimostrarono una contaminazione di carattere cronico dovuta all'assorbimento e all'accumulo nel tempo di tale pesticida con tassi di mortalità elevati e con un notevole aumento di varie patologie respiratorie e tumorali riconducibili alla contaminazione chimica. In particolare, fu osservato prevalere tra gli uomini un eccesso di mortalità per tumore dello stomaco e di malattie dell'apparato digerente; tra le donne per malattie dell'apparato circolatorio. I dati emersi, inoltre, misero in luce numerosi effetti biologici negativi quali, perturbazioni del pattern lipidico della funzionalità renale, della steroidogenesi e una chiara associazione con alterazioni cognitive.^{19,20} Ulteriori studi condotti nel complesso industriale di Colleferro evidenziarono picchi di mortalità nei lavoratori di alcune industrie dell'area^{21,22} e nella popolazione residente.²³ Altri indagini riportarono un'associazione tra l'esposizione a sostanze organoclorurate e gli effetti nocivi sulla salute dell'uomo, tra cui il tumore del cervello,²⁴ del pancreas,²⁵ della tiroide, i sarcomi dei tessuti molli,²⁶ il morbo di Parkinson²⁷ e l'alterazione dello sviluppo nei bambini.²⁸ Infine, una recente indagine nazionale, condotta sui disturbi respiratori nell'infanzia, ha mostrato nette evidenze di asma bronchiale tra i residenti di Colleferro.²⁹

1.1.4 Interventi e provvedimenti di enti istituzionali

L'imponente disastro ambientale ed umano, confermato dalle numerose indagini effettuate, richiese al contempo un ulteriore intervento da parte delle Istituzioni attraverso la realizzazione di una serie di provvedimenti volti alla messa in sicurezza e al risanamento del territorio. Grazie alle ordinanze del 10 giugno 2005 N. 3441 e del 14 luglio 2005 N. 3447, il Presidente del Consiglio dei Ministri definì i compiti e l'organizzazione dell'Ufficio Commissariale, individuando le risorse economiche utili per i primi interventi. Segnatamente, l'Art.1 del Decreto Ministeriale n. 3441/05, e successive modifiche ed integrazioni, affidarono all'Ufficio Commissariale il compito di provvedere alla messa in sicurezza, perimetrazione e caratterizzazione dell'area interessata dal grave inquinamento ambientale, nonché alla programmazione e all'esecuzione di opportuni interventi di bonifica. La perimetrazione dell'area industriale riguardò un'estensione di circa 800 ettari ai quali vennero aggiunti 700 ettari di territorio destinato all'uso zootecnico ed agricolo. Successivamente, venne disposta anche la perimetrazione dell'area a rischio di contaminazione comprendente le porzioni individuate tra le aree esondabili e le porzioni di territorio rientranti nella fascia di 100 metri dall'argine del fiume. L'area inizialmente perimetrata fu successivamente estesa con ulteriori provvedimenti a seguito dell'autodenuncia dei proprietari di terreni risultati contaminati da isomeri dell'esaclorocicloesano e di analisi che evidenziarono la loro presenza in prodotti della coltivazione in campo. Inoltre, sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi di monitoraggio, venne richiesto ai soggetti obbligati pubblici e privati di adottare alcune necessarie azioni di messa in sicurezza d'emergenza che permisero di attuare il confinamento delle aree dove le matrici ambientali risultavano già pesantemente compromesse e, al contempo, di attenuarne lo stato di contaminazione. Tra queste, le ordinanze tuttora in vigore, relative all'interdizione all'uso agricolo di coltivazioni *food* delle aree ripariali e al divieto d'uso delle acque da pozzo, salvo analisi e certificazione da parte dell'ente di controllo. In aggiunta, furono emanati provvedimenti volti ad effettuare la pulizia della rete delle acque bianche nell'area degli stabilimenti industriali di Colleferro, la verifica della tenuta delle cisterne interrate nella valle e la rimozione presso impianti autorizzati delle porzioni di suolo e sottosuolo che presentavano i più alti valori di contaminazione (*hot spot*).¹⁸

Nel contempo, fu costituito uno specifico gruppo di lavoro, coordinato dal Direttore del Dipartimento di Prevenzione e Igiene degli Alimenti e della Nutrizione dell'ASL di Roma, incaricato di procedere al monitoraggio dei pozzi sul territorio del bacino del fiume Sacco interessato dall'emergenza. Alle misure fin qui citate, si aggiunsero diverse proposte di risanamento del territorio per l'eliminazione del rischio di contaminazione nella filiera agroalimentare. Ad esempio, nel 2006 la Regione Lazio, in collaborazione con diversi istituti di Ricerca, diede avvio ad una serie di progetti mirati alla bonifica del territorio. Tra questi, quello del 2008 con l'Istituto di Biologia Agro-Ambientale e Forestale (IBAF) del CNR di Roma, volto alla verifica della possibilità di produrre bioenergia con effetti di disinquinamento del suolo contaminato da isomeri dell'esaclorocicloesano nella Valle del fiume Sacco. In particolare sono state avviate procedure per la brevettazione di un processo di bonifica di suoli agrari contaminati da

esaclorocicloesano mediante l'uso di piante, enzimi e batteri selezionati. La sperimentazione, condotta in due aree agricole e/o ripariali interdette agli usi umani, ha previsto l'esecuzione di *test* su cloni di piante molto produttive nella fase giovanile e adatte alla coltivazione in turni brevi, in associazione con ammendanti a rilascio graduale di ossigeno e vari sistemi biologici (batteri e funghi) in grado di rendere più rapida la degradazione degli inquinanti presenti fino a profondità variabili tra 0.5 ed 1 metro. Il progetto, completato nel 2011, ha evidenziato l'efficacia del processo di bonifica *in situ*, confermando i risultati precedentemente ottenuti nei laboratori e nelle serre dell'Istituto, e consentendo di ottenere una riduzione della contaminazione da esaclorocicloesano del 30%. Tali risultati, sebbene incoraggianti, lasciavano ancora aperta la questione della contaminazione ambientale che richiedeva e, richiede a tutt'oggi, monitoraggi ambientali costanti.³⁰ Nonostante le condizioni ancora molto critiche della Valle, nel gennaio 2013 il Ministero dell'Ambiente convertì la Valle del Sacco da sito di interesse nazionale - e quindi con tutti gli investimenti a livello nazionale previsti - a sito di interesse regionale gettando ancora più nello sconforto cittadini, allevatori e lavoratori. Fortunatamente il ricorso presentato dalla Regione Lazio, ha portato nel 2015 all'annullamento da parte del TAR di tale provvedimento con il conseguente ripristino dell'intero bacino del fiume Sacco a "*Sito di Interesse Nazionale (SIN)*", riconoscendone a tutt'oggi lo stato di emergenza ambientale.

1.2 Gli isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH): inquinanti organici persistenti

1.2.1 Proprietà chimico-fisiche

Per “inquinanti organici persistenti”, comunemente indicati con l'acronimo POPs, si intendono una serie di sostanze organiche tossiche, bioaccumulabili e disponibili al trasporto ambientale anche a lunga distanza. Alcune di queste, vengono immesse direttamente nell'ambiente a seguito di una loro specifica utilizzazione, come nel caso dei pesticidi; altre vengono rinvenute a seguito di eventi accidentali; altre ancora possono essere presenti in quanto sottoprodotti di attività industriali.³¹

Dal punto di vista chimico, la quasi totalità di tali inquinanti sono composti clorurati ed aromatici che presentano una scarsa solubilità in acqua ed una buona lipoficità: tendono, infatti, ad attraversare le strutture fosfolipidiche delle membrane biologiche e ad accumularsi negli organismi viventi. Il bioaccumulo porta ad elevate concentrazioni e quindi ad elevate esposizioni nei livelli più alti delle catene trofiche.³² Inoltre, sono volatili e, pertanto, possono essere trasportati in atmosfera su lunghe distanze.

Nello specifico, le sostanze attualmente riconosciute come “inquinanti organici persistenti” possono essere suddivise in tre principali categorie: 1) pesticidi (aldrin, clordano, clordecone, *p*-diclorodifeniltricloroetano o DDT, dieldrin, endrin, eptacloro, esaclorocicloesano, mirex, toxafene); 2) prodotti industriali (policlorobifenili, esabromobifenile); 3) sottoprodotti di processi industriali (diossine, furani, idrocarburi policiclici aromatici).³³

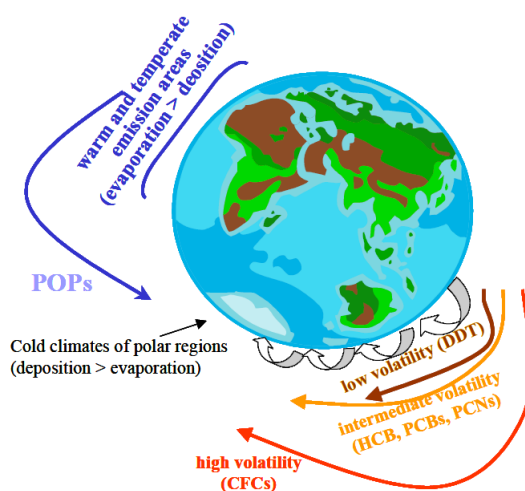


Figura 2. Meccanismo di trasporto globale degli inquinanti organici persistenti.

Tra questi, assume un particolare rilievo l'esaclorocicloesano (HCH). In realtà, con tale dizione si comprendono vari isomeri (illustrati in Figura 3) indicati con le lettere greche α , β , γ , δ , ϵ , η , θ . Chimicamente, tali composti presentano una struttura ciclica a sei termini e differiscono tra loro per le sostituzioni in posizione assiale ed equatoriale dei sei atomi di cloro presenti nell'anello.

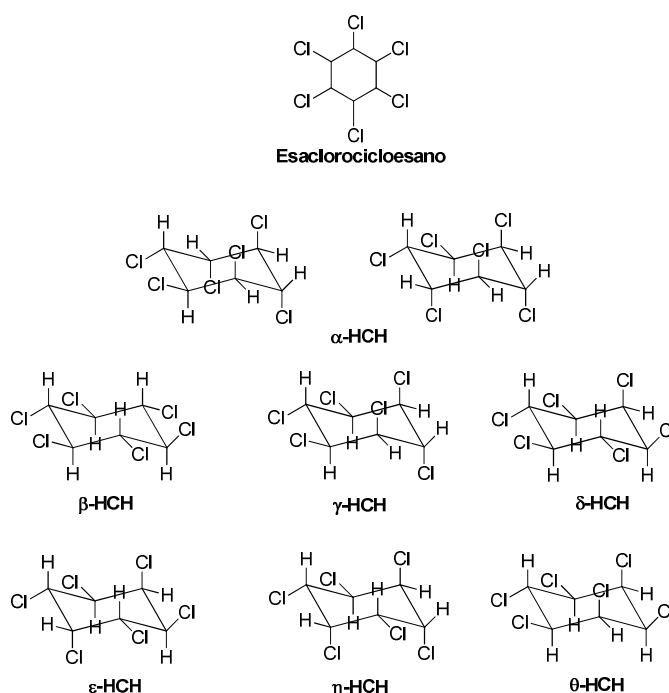


Figura 3. Struttura chimica degli otto isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH).

Generalmente, gli HCH sono stabili alla luce, alle alte temperature e agli acidi mentre si degradano in ambiente alcalino.³⁴ Comparati con altri composti organoclorurati, come il DDT, gli HCH risultano essere più solubili in acqua e maggiormente volatili. Queste proprietà giustificano perché tali sostanze possano essere ritrovate in tutti i comparti ambientali (acqua, sedimenti, aria e animali).

Tra gli isomeri indicati, il γ -HCH, anche noto come *lindano*, è quello con la più alta attività pesticida ed ha trovato impiego non solo nel trattamento delle sementi, dei suoli e degli alberi da frutto ma anche come antiparassitario nella cura di animali domestici e in alcuni preparati farmaceutici sotto forma di lozioni, creme e shampoo per la cura e la prevenzione nell'uomo della pediculosi e della scabbia. Tuttavia, in agricoltura ha trovato un largo uso un prodotto commerciale, denominato "HCH tecnico", avente la seguente composizione percentuale: α -HCH (60-70%), β -HCH (5-12%), γ -HCH (10-12%) δ -HCH (6-10%) ed ϵ -HCH (3-4%).³⁵

In *Tabella 1* sono riportate alcune delle più importanti proprietà chimico-fisiche degli isomeri α , β , γ e δ -HCH che, come risulta, sono sensibilmente diverse tra loro. Tali differenze sono attribuibili alla diversa disposizione (assiale/equatoriale) degli atomi di cloro. Infatti, come atteso, il β -HCH avente tutti gli atomi di cloro in posizione equatoriale, è caratterizzato da una pressione di vapore più bassa degli altri isomeri e da un fattore di bioconcentrazione (BCF) nel grasso umano più elevato e, pertanto, risulta caratterizzato da una elevata persistenza ambientale e biologica. Al contrario, la presenza di atomi di cloro in posizione assiale rende gli isomeri più facilmente disponibili alla degradazione enzimatica da parte di microrganismi, come osservato per il γ e l' α -HCH.⁴⁰

Tabella 1. Proprietà chimico-fisiche degli HCH.

Proprietà	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	δ -HCH
Temperatura di ebollizione (°C)	159-160	309-310	112-113	138-139
Pressione di vapore (Pa)	$(1.6 \pm 0.9) \times 10^{-2}$	$(4.2 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(5.3 \pm 1.4) \times 10^{-3}$	2.1×10^{-3}
Log K _{ow}	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.1	3.7 ± 0.5	4.1 ± 0.02
BCF nei tessuti adiposi umani	20 ± 8	527 ± 140	19 ± 9	8.5
BCF nei tessuti adiposi di animali acquatici	2.6 ± 0.5	2.9 ± 0.3	2.5 ± 0.4	---

BCF= Fattore di bioconcentrazione nel grasso umano

Le proprietà chimico-fisiche degli HCH influenzano anche altri fenomeni, come la capacità di passare dalla superficie del suolo all'atmosfera e il loro comportamento all'interno del suolo stesso. Ad esempio, la volatilità del *lindano* può essere modificata da fattori, quali l'umidità del terreno, la temperatura o da processi di capillarità. Inoltre, elevate quantità di sostanza organica favoriscono la persistenza degli HCH nel terreno a causa della loro capacità di legarsi a tale componente.

L'isomerizzazione degli HCH rappresenta un altro importante aspetto che influenza la stabilità e il relativo cambiamento nella concentrazione di alcuni isomeri nei vari comparti ambientali. Dati riportati in letteratura mostrano che reazioni di isomerizzazione possono essere osservate in processi abiotici e biotici. Isomerizzazioni abiotiche del γ -HCH nella forma α sono state osservate in soluzioni acquose esposte ai raggi ultravioletti. In particolare, è stato dimostrato che il processo di fotodegradazione è direttamente proporzionale all'intensità della luce solare e alla temperatura.³⁶ Ulteriori dati di letteratura hanno mostrato che l'isomerizzazione dell'isomero β in α , γ e δ può verificarsi in acqua deionizzata.³⁷ Isomerizzazioni biotiche del γ -HCH in α -HCH sono, invece, state osservate in sedimenti e in acque marine in condizioni anossiche ad opera di batteri quali *Pseudomonas putida*³⁸ ed *Echerichia Coli*.³⁹

1.2.2 Produzione ed utilizzo in campo agronomico

Nonostante l'HCH tecnico sia stato sintetizzato per la prima volta nel lontano 1825, le relative proprietà come pesticidi sono note solo dal 1942.⁴⁰ Nel mondo e soprattutto in Italia, l'utilizzo di *lindano* è stato consistente. Essendo dotato di una larga gamma di attività insetticida, questo pesticida ha trovato numerose applicazioni. In campo agricolo, ad esempio, il suo utilizzo è stato fondamentalmente di tipo preventivo, mirato alla lotta degli insetti terricoli. Infatti, tale composto ha trovato un largo impiego nella geo-disinfestazione utilizzando formulati polverulenti o granulari. In alternativa, il *lindano* è stato utilizzato nella preparazione di esche e nei trattamenti liquidi, come polvere bagnabile. Prodotti antiparassitari da utilizzare in campo agronomico a base di tale composto hanno trovato impiego, in tutte le regioni, in quantità sempre crescenti dagli anni '50 fino agli anni '80. In particolare, tra gli anni '60 e '70, sono stati raggiunti i valori massimi di consumo (circa 20.000 quintali/anno).⁴¹ L'analisi del consumo per regioni e per anno indica che circa il 50% dei prodotti è stato utilizzato nel Nord-Italia, il 20% e il 30%, rispettivamente, nel Centro e nel Sud-Italia.

Nel 1975, il Decreto del Ministero della Sanità ha introdotto delle limitazioni all'utilizzo del *lindano* in campo agricolo, consentendone l'uso per il trattamento del terreno prima della semina, per la disinfestazione dei cereali nei magazzini e sulle sementi e per le coltivazioni della barbabietola. Pertanto, la diminuzione del consumo di prodotti contenenti γ -HCH è iniziata negli anni '80 ma è stata evidente solo dal 1987. Poiché la concentrazione del principio attivo nei diversi prodotti è variata nel corso degli anni, l'analisi dei consumi non consente di stimare la quantità effettivamente utilizzata in Italia. In generale, è stato calcolato, per il periodo 1970-1996, un consumo totale di *lindano* pari a 135.000 tonnellate. Nella maggior parte degli altri paesi europei, le restrizioni d'uso e le revoche sono state introdotte in anni successivi rispetto all'Italia. Tra i paesi nordici l'uso del *lindano* è stato sospeso nel 1987 in Finlandia; tra il 1989 e il 1995 in Svezia, Olanda, Norvegia, Danimarca; nel 1990 in Unione Sovietica.⁴² A livello mondiale è stato stimato un consumo annuale di HCH pari a 40.000 tonnellate nel 1980 e di 29.000 tonnellate nel 1990.⁴³ Una successiva analisi della distribuzione del consumo di HCH tecnico nei diversi continenti ha indicato un consumo globale, tra il 1948 e il 1997, di 9.7×10^6 tonnellate. Il valore massimo è stato raggiunto nel periodo 1970-1980 per poi avere un decremento con l'introduzione delle revoche in Cina, in India e Unione Sovietica.⁴⁴ In Cina la produzione è stata vietata nel 1983, ma gli stock residui sono stati utilizzati fino al 1985; nel Nord-America, l'utilizzo dell'HCH tecnico è stato proibito in Canada e negli Stati Uniti nel 1970, in Messico è continuato fino al 1993.⁴⁵ Dal novembre 2006, l'uso del *lindano* è stato proibito in 52 paesi e sottoposto a norme restrittive in altri 33. Nel 2009, una ulteriore restrizione internazionale nell'uso del γ -HCH in agricoltura è stata incrementata dalla Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti. La Convenzione, firmata dalla maggior parte degli stati mondiali, manca ancora della ratificazione da parte di Irlanda, Stati Uniti, Russia e paesi minori dell'Africa e dell'Asia. È stata anche proibita la produzione degli isomeri α e β -HCH, normalmente sottoprodotti del *lindano*.

1.2.3 Livelli ambientali in Italia e nel mondo

Le concentrazioni dei vari isomeri HCH e quella totale sono state determinate in matrici ambientali quali piante, suolo, acqua ed aria e nei tessuti animali di diverse specie. Queste determinazioni sono tuttora eseguite per evidenziare il trasporto globale dei diversi isomeri e il loro destino ambientale. Poiché il β -HCH è, come già detto, l'isomero più persistente alla degradazione batterica e il meno volatile,⁴⁶ la sua presenza nelle matrici ambientali e/o biologiche rappresenta un indicatore di contaminazione locale da HCH tecnico. La presenza, invece, nell'aria e nel mare del continente artico degli isomeri α e γ , molto più volatili, indicherebbe un trasporto su lungo raggio; questi isomeri tenderebbero quindi a migrare più rapidamente e a depositarsi prevalentemente nelle regioni polari. Nella neve della regione artica canadese, ad esempio, la concentrazione totale di HCH ha superato la concentrazione risultante dalla somma di tutti gli altri composti organoclorurati.⁴⁷ Le concentrazioni di *lindano* misurate nell'aria sono risultate generalmente basse: a livello di ng/m³ in aree urbane e agricole; a livello di mg/m³ in ambienti confinati quali, ad esempio, le serre dopo lo spargimento dell'insetticida. Considerando la diffusione degli HCH nell'atmosfera, le più alte concentrazioni sono state rilevate nell'emisfero nord e in prossimità dei paesi con più elevato consumo. Nelle acque di superficie sono state ritrovate concentrazioni di *lindano* comprese tra 0.01-0.1 mg/l, con picchi di 12 mg/l nei fiumi contaminati con acque reflue. La contaminazione da residui di HCH è risultata più elevata nelle acque di superficie alle latitudini nord, nel golfo dell'Alaska e del nord nord del Pacifico. Nelle acque profonde il *lindano* è stato rilevato a livelli di 3-163 ng/l.

In letteratura è riportato che la distribuzione degli inquinanti nei sedimenti costituisce una misura attendibile dei livelli di contaminazione dei laghi. In Italia, nei sedimenti del lago di Garda⁴⁸ e del lago artificiale di Simbirizzi in Sardegna⁴⁹ sono state misurate, rispettivamente, concentrazioni dell'isomero γ pari a 0.60 e 0.20 mg/kg di sedimento secco. Nel lago di Garda, le concentrazioni degli isomeri β e γ -HCH hanno mostrato una tendenza all'aumento nel periodo 1949-1989, probabilmente per un effetto di accumulo. Concentrazioni più basse dell'isomero γ sono state recentemente misurate nel lago Trasimeno, in provincia di Perugia.⁵⁰ La presenza di tali isomeri nei sedimenti dei laghi è probabilmente imputabile sia all'uso recente di *lindano* nelle coltivazioni di barbabietole da zucchero, sia all'utilizzo di prodotti a base di HCH negli anni precedenti la sua revoca. Numerose specie animali sono state utilizzate per valutare la contaminazione ambientale dei vari isomeri dell'HCH, la loro evoluzione nel tempo e la loro diffusione a lunga distanza. Ad esempio, i pesci sono stati utilizzati come specie sentinella per valutare la contaminazione di fiumi in Italia. L'aumento della concentrazione degli isomeri α e γ osservato nel tessuto muscolare delle trote in un tratto del Po, localizzato a valle della confluenza del Lambro, ha permesso di individuare in tale fiume la fonte più rilevante di contaminazione.⁵¹ Per valutare il trasporto a lunga distanza degli HCH, i residui degli isomeri sono stati misurati nei tessuti di alcune specie marine (anche mammiferi) del continente Artico. Ad esempio, concentrazioni di HCH comprese tra 300 e 900

mg/kg sono state misurate nel tessuto adiposo degli orsi bianchi polari. I livelli di HCH nel grasso di 11 specie diverse di cetacei maschi adulti sono risultati significativamente più elevati negli animali dei mari freddi rispetto a quelli dei mari tropicali. L'analisi dei diversi isomeri dell'HCH ha mostrato che questi erano diversamente distribuiti nelle specie marine esaminate. Ad esempio nei 13 mammiferi marini del nord-Pacifico e del nord-Atlantico, il β -HCH è risultato l'isomero preponderante nel grasso di alcune specie mentre gli isomeri α e γ lo sono risultate in altre.⁵²

1.2.4 Tossicità

1.2.4.1 Effetti tossici sugli animali

Sebbene i meccanismi di azione degli HCH negli animali siano ancora oggetto di studi, ben noti, purtroppo, sono gli effetti tossici che tali composti sono in grado di produrre. Tra questi, quelli a carico del sistema nervoso centrale (SNC). Negli insetti, ad esempio, il γ -HCH agisce sul SNC generando rapide e violente convulsioni che portano rapidamente alla morte.³³ Tali effetti sono stati associati ad una probabile competizione tra il pesticida e l'acido γ -amminobutirrico (GABA) nel legarsi al recettore del GABA.⁵³ Al contrario del γ -HCH, gli isomeri α , β e δ deprimono il sistema nervoso centrale.⁵⁴

Altri effetti tossici imputabili agli HCH coinvolgono le funzionalità renali, polmonari e l'omeostasi biochimica ed ematologica. Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato che inserendo nella dieta di ratti β o γ -HCH è possibile osservare glicosuria (presenza di glucosio nelle urine) senza che siano alterati i livelli di glucosio nel sangue, provocando danni ai tubuli renali accompagnati da cambiamenti morfologici dei polmoni⁵⁵ e da un decremento del numero dei globuli rossi e bianchi.⁵⁶

Ratti trattati con γ -HCH presentano una diminuzione del volume cellulare con un aumento nel siero di fosfatasi alcalina e alanina amminotrasferasi, evidenziando un danno a livello degli epatociti.⁵⁷

Tra gli effetti biochimici da isomeri dell'HCH, si registra anche un incremento nella concentrazione del citocromo P450 e un decremento nell'attività della glutazione reduttasi, glutazione S-trasferasi e della glucosio-6-fosfato deidrogenasi.^{58,59}

Ulteriori effetti nocivi degli isomeri dell'HCH coinvolgono il sistema riproduttivo maschile e femminile con un decremento nella produzione di testosterone, una minore motilità spermatica e un incremento di spermatozoi modificati nei ratti maschi, una riduzione nell'ovulazione e la degenerazione di embrioni nelle femmine.⁶⁰ Recentemente i cosiddetti "estrogeni ambientali" sono diventati oggetto di un intenso dibattito scientifico. Con tale termine si indicano quelle sostanze chimiche in grado di comportarsi, negli organismi viventi, come degli ormoni legandosi ai recettori destinati a tali molecole. Tra queste, molti pesticidi organoclorurati, come gli HCH, possiedono caratteristiche estrogeniche e sono stati implicati nell'eziologia di alcuni tumori.⁶¹ Diversi studi hanno dimostrato che il β -HCH si comporta da estrogeno ambientale. Infatti, la somministrazione nella dieta di giovani femmine di ratto di 50 mg/kg di β -HCH, per 5 giorni, causa un significativo aumento del peso dell'utero. Allo stesso modo, ratti a cui

sono state rimosse le ovaie, trattati con 100 µg/g di β-HCH per 3 giorni, hanno mostrato un significativo aumento del peso secco e dell'altezza delle cellule epiteliali dell'utero.⁶² La vitellogenesi, ovvero il processo di formazione del tuorlo dell'uovo, avviene nelle femmine di pesce durante la stagione riproduttiva.^{63,64} Questo processo può essere indotto artificialmente in maschi e femmine attraverso la somministrazione di estrogeni. Wester e Canton hanno osservato che un'induzione della vitellogenesi nel maschio di pesce può avvenire attraverso la somministrazione di β-HCH (0.1mg/l).⁶⁵

Il meccanismo di azione del β-HCH è stato studiato anche in vitro su cellule mammarie cancerose, osservando come questo pesticida sia in grado di determinare la redistribuzione di recettori estrogenici, l'attivazione di recettori progestinici citosolici e di incrementare la sintesi di pS2 mRNA.⁶⁶

1.2.4.2 Effetti tossici sull'uomo

Gli studi tossicologici degli effetti degli HCH nell'uomo sono ad oggi limitati agli avvelenamenti accidentali e alle esposizioni occupazionali. Sintomi clinici d'intossicazione, quali nausea, vertigini, stato d'agitazione, mal di testa frontale, sono stati osservati in seguito ad assunzioni volontarie e accidentali di *lindano* per via orale. Altri disturbi riscontrati sono stati le contrazioni muscolari, la perdita di equilibrio, l'atassia e il tremore.⁶⁷ Sono stati descritti numerosi casi d'intossicazione causati dall'ingestione di *lindano* a scopo terapeutico, come vermicida. In questo caso l'assunzione di una dose elevata ha provocato convulsioni, nausea e vomito, mentre una dose minore ha comportato essenzialmente nausea. Studi clinici, invece, riportano che l'applicazione cutanea di *lindano*, a concentrazioni ≤5 mg/kg di peso corporeo, non ha causato generalmente effetti neurotossici acuti. La quantità assorbita dall'organismo dipende, in linea generale, sia dalla velocità di penetrazione della sostanza attraverso la cute che dalla sua velocità di rimozione dalla superficie; i pazienti affetti da scabbia, e in particolare le donne, presentano un maggiore assorbimento cutaneo rispetto agli individui sani. I sintomi riscontrati nei lavoratori che operano a contatto con il *lindano* includono parestesia al volto e alle estremità, emicrania e vertigini.⁶⁸

Sono stati condotti molti studi per valutare l'effetto irritante e sensibilizzante del *lindano*. I sintomi osservati negli studi epidemiologici si riscontrano prevalentemente a carico del sistema nervoso centrale e periferico e del fegato ed associati a livelli ematici di γ-HCH ≥20 µg/l.

In alcuni studi epidemiologici è stato valutato il rischio cancerogeno associato al *lindano*. In uno studio del 1993 è stato riscontrato un elevato rischio di tumore cerebrale tra i bambini trattati con shampoo contenenti *lindano*. La casistica è, tuttavia, troppo limitata per consentire una possibile correlazione con la durata e l'intensità dell'esposizione. La IARC (International Agency of Research of Cancer) ha classificato gli HCH nel gruppo 2B (possibili cancerogeni) sulla base di evidenza inadeguata di cancerogenicità nell'uomo e di evidenze sufficienti (per l'isomero α) o limitata (per gli isomeri β e γ HCH) negli animali.⁶⁹

L'esposizione agli HCH è stata valutata nella popolazione generale e nei lavoratori esposti a pesticidi anche attraverso il dosaggio di tali isomeri nel sangue e nel tessuto adiposo. Tra i vari isomeri, il β, per la

sua maggiore stabilità, per la sua più elevata capacità di accumularsi nei tessuti grassi (da 10 a 30 volte superiore all'isomero γ) e per la sua più lenta eliminazione dall'organismo (5 volte inferiore agli altri isomeri) è risultato presente in concentrazioni maggiori nei tessuti ed è, pertanto, il più monitorato. Per questo è stata valutata la possibile associazione tra il tumore mammario e la presenza di HCH nel tessuto adiposo della mammella, anche se i dati disponibili non consentono ancora di trarre delle conclusioni certe. Un'indagine condotta recentemente in Germania ha mostrato che la concentrazione di β -HCH è più bassa nel tessuto mammario di donne affette da tumore maligno rispetto a quella misurata nei controlli, mentre l'isomero γ era risultato al limite della rilevazione strumentale. Poiché gli isomeri α , γ e δ possono ugualmente convertirsi nell'isomero β , le concentrazioni trovate per il β -HCH corrispondono, in parte, anche l'assorbimento del *lindano* ed ovviamente degli altri isomeri.⁷⁰ In tutti i paesi occidentali, i livelli di HCH totale o degli isomeri β e γ nei liquidi biologici hanno mostrato un decremento negli ultimi anni, in conseguenza delle limitazioni d'uso e delle revoche introdotte principalmente intorno agli anni '80. Le concentrazioni di *lindano* misurate nel sangue sono state dell'ordine di 0.1-1 $\mu\text{g/l}$ nella popolazione generale. In alcuni paesi (ad esempio, in India), dove l'uso di questo principio attivo in agricoltura non ha subito restrizioni, le concentrazioni ematiche misurate sono molto più elevate, talvolta al di sopra di 100 $\mu\text{g/l}$. Durante la produzione e l'utilizzazione di prodotti tecnici a base di HCH e/o di *lindano*, concentrazioni dell'isomero γ superiori a 100 $\mu\text{g/l}$ (fino a 340 $\mu\text{g/l}$) sono state misurate nel sangue dei lavoratori esposti. Questi livelli erano spesso associati a sintomi neurologici e ad una funzionalità epatica alterata. Nei campioni di sangue analizzati sono stati ugualmente misurati gli altri isomeri dell'HCH. L'emi-vita dell'isomero β nel sangue intero, stimata in uno studio condotto tra i lavoratori di un impianto di produzione di pesticidi, è risultato di 7.2 anni.⁷¹ Un'emivita di circa un giorno è stata, invece, calcolata per l'isomero γ in uno studio che valutava la penetrazione cutanea dei pesticidi nell'uomo.⁷²

A seguito di uno screening condotto in Italia tra i floricoltori di un'area della Toscana,⁷³ una differenza significativa per tutti gli organoclorurati misurati nel sangue, compreso il *lindano*, è stata evidenziata fra i floricoltori e il gruppo di controllo composto da residenti della stessa area: le concentrazioni medie per il γ -HCH erano, rispettivamente 20.51 e 9.03 $\mu\text{g/l}$. I livelli più elevati di organoclorurati hanno mostrato una correlazione con l'età e con la durata dell'attività lavorativa in floricoltura.

1.2.5 Diffusione e persistenza nei vari comparti ambientali

Come anticipato nei precedenti paragrafi, gli isomeri dell'HCH hanno la capacità di distribuirsi nei diversi comparti ambientali favorendo il loro bioaccumulo in tutta la catena trofica e rappresentando, pertanto, una minaccia sia per l'uomo che per l'ambiente. La presenza e la distribuzione di tali sostanze nel suolo, nell'acqua, nelle piante ed in aria, è dovuta a processi come la volatilità, la degradazione microbica, la lisciviazione, l'assorbimento su particelle di suolo o nelle piante l'assorbimento attraverso l'apparato radicale. Gli isomeri più frequentemente rintracciabili nell'ambiente sono l' α , il β e il γ ; in

particolare, l' α -HCH è più comune negli ambienti acquatici e nell'atmosfera; il β -HCH, lipofilo e stabile, è presente soprattutto nel suolo, nei tessuti animali e nei fluidi biologici. Sono di seguito descritti la diffusione e la persistenza degli HCH nei vari comparti ambientali.

Aria. L'atmosfera rappresenta una delle vie di trasporto di molti inquinanti organici persistenti su scala globale. Questo è reso possibile per l'evaporazione dei contaminanti dalle superfici terrestri e acquatiche, l'adsorbimento sul particolato atmosferico, il trasporto per mezzo delle correnti atmosferiche e la rideposizione sulle superfici terrestri e acquatiche. I parametri di una sostanza che determinano questi meccanismi di trasporto sono la tensione di vapore, la costante della Legge di Henry ed il coefficiente di ripartizione ottanolo-aria (K_{OA}). La tensione di vapore è una misura della tendenza di una sostanza a passare dallo stato puro, liquido o solido, alla fase vapore; la costante della legge di Henry è data dal rapporto tra la concentrazione di una data specie chimica in fase gassosa e quella in fase liquida ed esprime la tendenza di una sostanza a volatilizzare da una sua soluzione acquosa all'atmosfera come risultato combinato dell'influenza della sua pressione di vapore e della sua solubilità; il coefficiente di ripartizione ottanolo-aria (K_{OA}) è una misura della tendenza di una sostanza a migrare da una matrice organica (ad esempio, da una matrice vegetale) all'atmosfera.

Gli HCH, essendo composti definiti "semivolatili", si ripartiscono tra l'atmosfera e le superfici ambientali (particolato atmosferico, suolo, vegetazione, acqua). L'entità della ripartizione è regolata dalla temperatura; in particolare, ad alte temperature tendono a passare in atmosfera mentre a basse temperature tendono ad accumularsi sulle superfici ambientali. Di conseguenza, gli HCH tendono a volatilizzare dalle regioni temperate e tropicali e a condensare nelle regioni più fredde, come le grandi catene montuose, attraverso una serie di cicli di evaporazione e deposizione.⁷⁴ La distribuzione spaziale degli HCH a lungo termine riflette, quindi, le differenze di temperatura presenti nelle diverse regioni del globo: le condizioni ambientali presenti nelle regioni più fredde ne favoriscono l'assorbimento sul particolato atmosferico, la loro condensazione sul suolo, sull'acqua, sul ghiaccio e il loro assorbimento da parte della vegetazione. Inoltre, a basse temperature i fattori ambientali che potrebbero avere qualche effetto sulla loro degradazione sono meno efficaci, favorendo quindi il loro accumulo.

Acqua. Oltre al trasporto per via atmosferica, negli ecosistemi terrestri gli HCH possono essere trasportati verso i sistemi fluviali per erosione o dilavamento e, quindi, raggiungere il mare e gli oceani. Nei sistemi acquatici questi contaminanti possono essere sottoposti a processi di scambio con i sedimenti oppure possono essere rilasciati verso l'atmosfera. La direzione del flusso tra l'acqua e l'atmosfera dipende dalla temperatura: nelle zone temperate il flusso netto è verso l'atmosfera, mentre nelle regioni polari è dall'atmosfera all'acqua. Nell'oceano aperto possono essere trasportati verso zone remote, in particolare le regioni artiche, dalle correnti marine. Nei sistemi acquatici e terrestri, sono trasportati su lunghe distanze nei lipidi di pesci, mammiferi e uccelli migratori. La concentrazione degli HCH nei grandi laghi e nelle acque oceaniche è di circa 1-5 ng/l, ben due ordini di grandezza superiore rispetto ai pesticidi meno solubili come DDT, clordano e dieldrin.

Il trasferimento degli HCH verso le acque profonde avviene per convezione e sedimentazione. Si stima che il tempo di residenza nei sedimenti sia dai 2 ai 10 anni in zone eutrofiche e oligotrofiche. Dati di letteratura mostrano, inoltre, che il l'isomero γ può essere degradato da cianobatteri azoto fissatori,⁷⁵ funghi ed alghe.⁷⁶ L'idrolisi, invece, si verifica soprattutto in condizioni alcaline nelle quali il γ -HCH è idrolizzato rapidamente. Dato che gli isomeri HCH non contengono cromofori che assorbono luce della regione UV, la fotolisi diretta non è possibile mentre può avvenire una fotolisi indiretta. Sostanze come l'acido umico o l'acido fulvico, noti agenti fotosensibilizzanti, sono praticamente ubiquitari in acque naturali e possono assorbire luce e trasferire l'energia eccitante agli HCH. Inoltre, sostanze ossidanti comunemente trovate in acqua naturale, come l'ossigeno singoletto o i radicali perossidici, idrossilici sono in grado di degradare gli HCH con diverse cinetiche di reazione. Questo perché un numero maggiore di atomi cloro in posizione planare nel cicloesano stabilizza la struttura, fornendo un minore guadagno energetico per qualsiasi processo degradativo non offrendo inoltre punti di attacco favorevoli per l'inizio di tale processo. Quindi i tempi di degradazione, già ampi per il *lindano*, sono ancora più lunghi per i suoi contaminati e sottoprodotti di produzione α e β .⁷⁷

Suolo. A causa della loro scarsa polarità, gli isomeri dell'HCH tendono ad associarsi al suolo e ai sedimenti piuttosto che essere rilasciati in atmosfera. La loro scarsa idrosolubilità favorisce il loro assorbimento, in particolare alla frazione organica del terreno. Le molecole sono, pertanto, relativamente immobili ossia migrano lentamente nel suolo, possono essere trasportate solo dalle piogge e dalle acque d'irrigazione. Il processo biodegradativo risulta essere il principale fattore di degradazione degli HCH nel suolo o nei sedimenti; mentre la trasformazione abiotica e le altre tipologie di processi degradativi, non sembrano essere particolarmente significative. Il processo biodegradativo include la dechlorazione idrolitica con la seguente rottura dell'anello ed infine la totale o parziale mineralizzazione. Diversi studi riportano che 71 microorganismi su 147 isolati da terra grassa sono capaci di utilizzare soluzioni di γ -HCH come unica fonte di carbonio.⁷⁸ Il β -HCH, invece, si presenta come l'isomero più persistente con un tempo di dimezzamento di 184 e 100 giorni, rispettivamente su terreno coltivato ed incolto, seguito dal γ -HCH con 107 e 62.1 giorni; dall' α -HCH con 54.4 e 56.1 giorni e dal δ -HCH con 33.9 e 23.4 giorni.

Una ricerca condotta sul suolo e sulla vegetazione di un terreno circostante un sito di interrimento di rifiuti industriali in Germania, a 10 anni dopo l'ultimo scarico di HCH, ha rilevato la presenza dell'isomero β compresa tra l'80 ed il 100% del totale HCH residuo.⁷⁹ In condizioni aerobiche, la degradazione è influenzata sia dal pH che dal potenziale redox.

Nel 2009 è stata studiata la dechlorazione dell'isomero γ ad opera di composti del ferro in diverse condizioni di pH e temperatura.⁸⁰ I risultati hanno mostrato che il composto viene rapidamente ridotto principalmente a benzene, ma anche a clorobifenile. La degradazione fotocatalitica dell'isomero γ è stata studiata in soluzioni acquose ed è stato visto come il *lindano* venga completamente decomposto in CO₂, Cl⁻ e H₂O con la formazione di vari intermedi.⁸¹ Il numero e la natura degli intermedi identificati hanno

indotto a suggerire che il meccanismo di decomposizione del *lindano* è basato su processi sia riduttivi che ossidativi.

Piante. Le piante, in funzione della biodisponibilità nei terreni, assorbono contaminanti organici attraverso l'apparato radicale (*soil-plantpathway*) o l'aerosolizzazione (*air-plantpathway*); l'accumulo è differenziale a seconda della frazione lipidica delle varie parti della pianta.

Nel *soil-plantpathway*, i contaminanti presenti nel terreno possono essere assorbiti dall'apparato radicale della pianta ed essere traslocati nelle parti aeree attraverso lo xilema oppure, specialmente quando l'assorbimento e la traslocazione sono limitati dall'elevata lipofilicità dei contaminati, essere assorbiti, restare nei tessuti radicali, o bioaccumularsi nel fusto della pianta.^{82,83,84}

L'*air-plantpathway* è un'altra via con cui contaminanti lipofilici possono essere assorbiti dalle piante. Tale processo dipende dalla volatilità di composti, come ad esempio gli organoclorurati, dalla superficie del suolo e dal successivo assorbimento sulle foglie delle piante, e potrebbe includere la ripartizione degli HCH presenti nell'atmosfera e la superficie fogliare.^{85,86,87} Composti volatili o composti idrofobici semivolatili, come gli isomeri dell'esaclorocicloesano, infatti, possono depositarsi sulle parti aeree della pianta. Il bioaccumulo dei diversi isomeri HCH nelle essenze vegetali, tuttavia, non appare correlato alla loro proporzione nei suoli di origine, ma è selettivo a favore dell'isomero β .⁸⁸ Tale isomero rappresenta la frazione prevalente di contaminazione nelle piante, anche foraggiere, e persiste in successive generazioni vegetative anche a distanza di anni dalla rimozione della sorgente di contaminazione primaria.⁸⁹ Questa dinamica viene descritta anche nei pochi studi disponibili sulla contaminazione di piante correlata a sospetta o accertata contaminazione dei suoli in aree limitrofe ad una sorgente industriale.^{90,91} Soltanto recentemente le piante sono state utilizzate per il monitoraggio degli HCH nell'ambiente.⁹² Sono stati analizzati per questo motivo la corteccia di albero, aghi di pino, licheni, muschi, e foglie di mango. Questi studi hanno mostrato come residui di HCH siano presenti nelle diverse parti della piante di numerosi campioni raccolti in varie parti del mondo. In particolare è stato riscontrato un aumento nella concentrazione di HCH nella corteccia direttamente proporzionale con l'aumento della latitudine.⁹³

1.2.6 Tecniche di bonifica ambientale di siti contaminati

Con il termine *bonifica ambientale* si intende l'insieme degli interventi messi in atto al fine di ripristinare le condizioni ambientali proprie di uno specifico ecosistema. Tali interventi includono l'individuazione e la caratterizzazione delle fonti di inquinamento; la rimozione o il confinamento della sorgente finalizzati a limitare la dispersione nell'ambiente dei contaminanti. Sono noti numerosi processi teoricamente applicabili per la decontaminazione di un'area inquinata e la scelta della migliore strategia deve essere attentamente valutata in funzione delle caratteristiche dello specifico contaminato e del sito in cui questo è presente.

Generalmente, le diverse tecniche vengono classificate in base al luogo dove avverrà la bonifica e in funzione del principio operativo applicato. Si parla di tecniche *in-situ* se i metodi sono applicati

direttamente al luogo della contaminazione; *ex-situ* se la bonifica avviene a seguito di rimozione dei volumi inquinati. I metodi *ex-situ*, a loro volta, possono essere *on-site* se il trattamento è effettuato sul luogo e *off-site* se i volumi inquinati sono trasportati in impianti diversamente localizzati. Tendenzialmente le tecnologie *in-situ* sono caratterizzate da una maggiore flessibilità nella fase di controllo e gestione del processo alla base della decontaminazione, ma producono un impatto ambientale maggiore e limitano la fruibilità del sito durante le fasi del processo di bonifica.

Un altro modo per classificare le tecniche di bonifica è basato sul principio operativo in base al quale si possono distinguere trattamenti fisici, chimici e biologici.

I trattamenti fisici sono associati alla variazione dello stato fisico degli inquinanti che ne consente il trasferimento tra le diverse fasi del suolo. Tra questi quelli maggiormente conosciuti sono la solidificazione/stabilizzazione e i trattamenti termici. I primi si basano sull'effetto di opportuni agenti chimici (inorganici o organici) che producono una massa stabile caratterizzata da una accresciuta integrità fisica e da una ridotta permeabilità rispetto alla matrice solida del suolo; i secondi si basano sull'incenerimento o la gassificazione che comportano in ogni caso, a differenti condizioni di temperatura, la volatilità degli inquinati e la loro rapida ossidazione con formazione di composti inorganici (CO₂, ossidi di azoto e zolfo, ecc).

I trattamenti chimici riguardano la trasformazione dello stato chimico degli inquinanti finalizzata alla produzione di sostanze caratterizzate da minore tossicità o da una ridotta/incrementata mobilità. Tra questi, particolarmente utilizzati, sono l'ossidazione chimica, realizzata iniettando nella matrice contaminata una miscela costituita da un opportuno agente ossidante che consente la completa trasformazione della sostanza organica inquinante in anidride carbonica e acqua; la riduzione chimica che viene impiegata per trasformare alcuni composti dalla forma ossidata a quella ridotta, qualora quest'ultima presenti una minore tossicità, mediante l'impiego di agenti chimici riducenti; l'estrazione con solventi che consiste nel trasferimento degli inquinanti dalla fase solida alla quella liquida del suolo tramite solventi organici acidi e alcalini al fine di poter successivamente raccogliere ed estrarre un percolato concentrato da avviare ad opportuno trattamento in superficie; la fissazione tramite agenti chelanti che prevede il ricorso all'iniezione di agenti chimici che, legandosi con i contaminati, ne riducono la mobilità nel suolo consentendone l'accumulo in porzioni determinate che possono successivamente essere rimosse e trattate in impianti *ex-situ*.

I trattamenti biologici, invece, si basano sulla decomposizione delle molecole organiche ad opera di microrganismi naturalmente presenti nel suolo (colonie autoctone) ovvero ivi opportunamente inoculati (colonie alloctone); in entrambi i casi, è generalmente necessario garantire la presenza di sostanze indispensabili per il sostentamento dell'attività batterica (nutrienti, donatori di elettroni per i metabolismi aerobici ed accettori di elettroni per quelli anaerobici) e di adeguate condizioni ambientali (pH, temperatura) al fine di accelerare processi che altrimenti potrebbero risultare estremamente lenti.,

1.2.6.1 Tecniche biologiche

Tra le tecniche biologiche di bonifica ambientale, quelle che si avvalgono dell'utilizzo di microrganismi sono ampiamente riportate in letteratura. Infatti, sono numerose le popolazioni di batteri in grado di degradare per via anaerobica o aerobica gli isomeri dell'esaclorocicloesano utilizzando tali pesticidi come unica fonte di carbonio.

Il primo microrganismo ad essere stato isolato in grado di degradare gli HCH è stato il *Clostridium sphenoides*, che, in condizioni anaerobiche ed in ambiente leggermente salino, è in grado di ridurre notevolmente la concentrazione di *lindano* producendo i metaboliti riportati in *Figura 4*.^{94,95}

Analoghe vie di degradazione sono state descritte in letteratura ad opera di *Bacillus sheponoides*⁹⁶ e di batteri della specie *Clostridium rectum* isolato da terreni di risaia.⁹⁷

Successivi studi su tale ceppo hanno permesso di comprendere che l'espressione dell'enzima richiesto per la degradazione del *lindano* è di tipo costitutivo, dimostrando, quindi, come il gene codificante per tale proteina fosse normalmente espresso dal batterio.

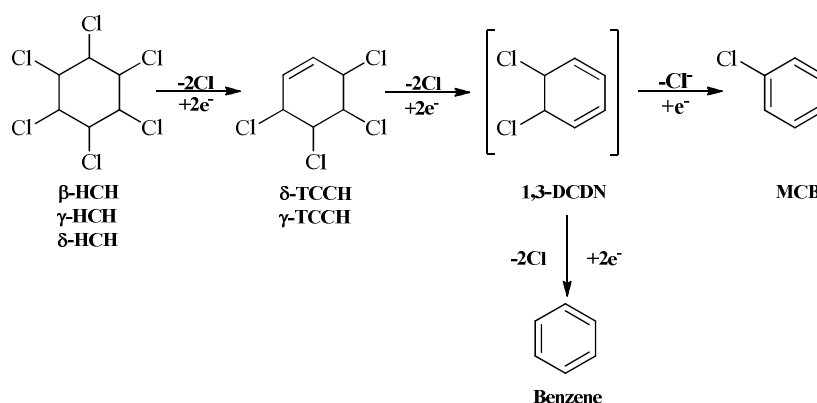


Figura 4. Possibili vie di degradazione del β , γ e δ -HCH per via microbiologica.

Ulteriori dati di letteratura riportano la conversione del *lindano* a γ -TCCH e benzene, in miscele di colture batteriche anaerobiche presenti in fanghi di depurazione⁹⁸ e la formazione di piccole quantità di triclorobenzene e tetraclorobenzene come metaboliti di formazione a seguito di biodegradazione da parte di batteri anaerobi del γ -HCH.⁹⁹

Tra i processi aerobici di degradazione degli isomeri dell'HCH, il pathway maggiormente studiato appartiene al batterio *Sphingomonas paucimobilis* UT26. I numerosi studi effettuati su questo microrganismo hanno, infatti, permesso di comprendere l'intero processo di degradazione individuando gli enzimi, i cofattori coinvolti e tutti i composti intermedi di formazione fino alla completa mineralizzazione del γ -HCH che si verifica in 12 settimane (*Figura 5*).¹⁰⁰

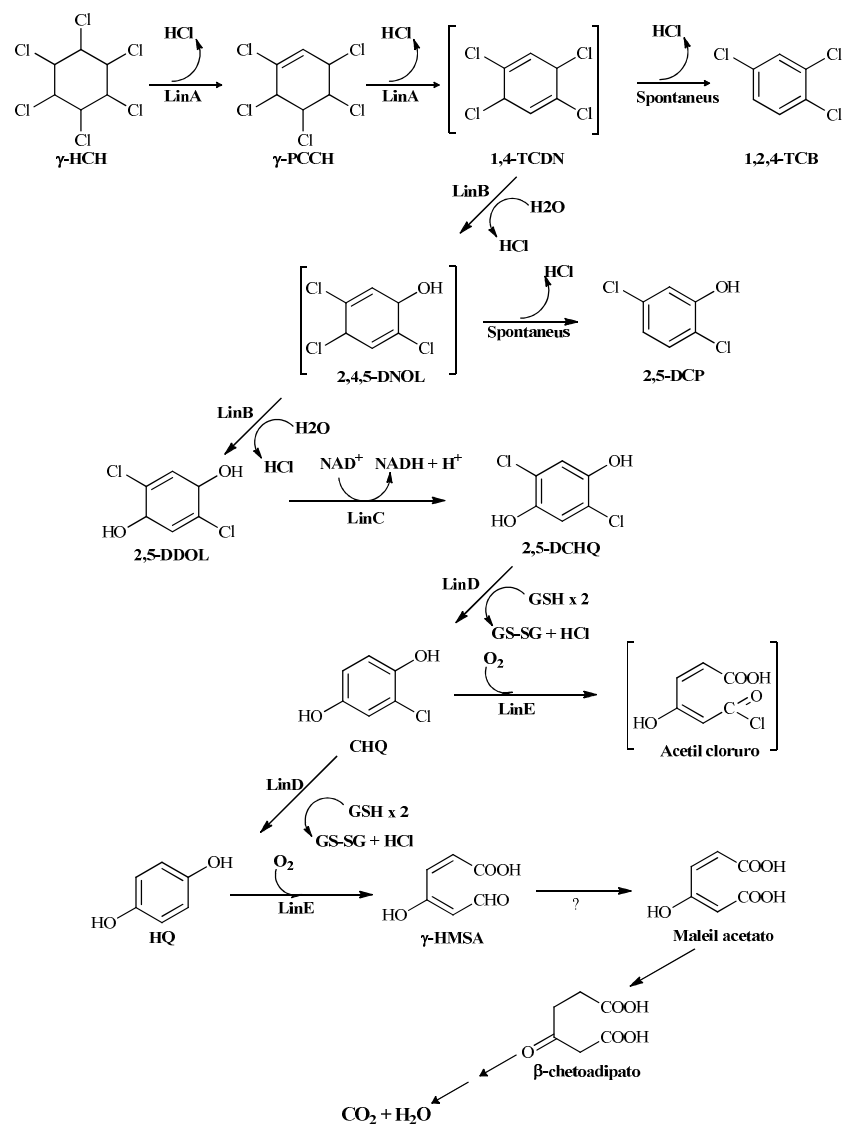


Figura 5. Possibili vie di degradazione aerobica del γ -HCH in *Sphingomonas paucimobilis*.

Come è possibile desumere, in questo caso le vie di degradazione del *lindano* sono più complesse rispetto a quelle studiate nei batteri anaerobi. Inizialmente il γ -HCH è soggetto ad una reazione di dechlorurazione da parte dell'enzima LinA che lo converte in γ -pentaclorocicloesano (γ -PCCH).¹⁰¹ Tale enzima, facente parte della famiglia delle deidroclorinasi, interviene anche nella reazione successiva catalizzando la formazione di un metabolita instabile, il 1,3,4,6-tetracloro-1,4-cicloesene (1,4-TCDN) il quale, a sua volta, produce l'1,2,4-triclorobenzene oppure il 2,4,5-triclorocicloesano (2,4,5-DNOL), da parte dell'enzima LinB, che codifica per una dealogenasi alcalina. Tale composto è successivamente ossidato a 2,5-dicloro-2,5-cicloesadiene-1,4-diolo (2,5-DDOL) che può produrre il 2,5-diclorofenolo (2,5-DCP) oppure il 2,5-dicloroidrochinone in una reazione NAD dipendente catalizzata dall'enzima LinC. Il 2,5-dicloroidrochinone (2,5-DCHQ), grazie all'azione di una deidrogenasi riduttiva (LinD), inizialmente viene convertito in cloroidrochinone (CHQ) e, successivamente, in idrochinone (HQ).¹⁰² In alternativa

l'enzima LinE, che codifica per una diossigenasi, può attaccare l'anello aromatico del CHQ producendo un intermedio aciclico che a sua volta reagisce con l'acqua formando maleilacetato il quale viene successivamente convertito in β -chetoadipato. Tale composto può essere, infine metabolizzato, fino alla degradazione completa ad anidride carbonica ed acqua.¹⁰³

Ulteriori ricerche hanno dimostrato la capacità di batteri aerobi di degradare completamente i diversi isomeri dell'HCH. Tra questi *Pseudomonas spheonoides*, isolato da suoli canadesi, può degradare il lindano producendo γ -PCCH e γ -3,4,5,6-TCCH. Tale microrganismo è anche in grado di crescere in condizioni aerobie ed in un mezzo leggermente salino contenente α e γ -HCH come unica risorsa di carbonio. *Pseudomonas spheonoides* può degradare anche l'1,2,3,4-tetraclorobenzene e l'1,2,4,5-tetraclorobenzene.¹⁰⁴ Nonostante questo microrganismo non sia stato studiato ulteriormente, lavori condotti su altri microrganismi aerobi degradanti il lindano (funghi ed altre specie batteriche) rivelano vie di degradazione simili che conducono alla formazione di diclorofenolo (DCP) e triclorobenzene partendo da γ -PCCH. Tale composto è stato trovato anche come metabolita di degradazione dell' α -HCH in fanghi aerobi.¹⁰⁵

Anche il ceppo di *Pseudomonas vescicularis*, isolato in Olanda da culture arricchite di suoli contaminati, è in grado di degradare l' α -HCH utilizzando tale pesticida come unica fonte di carbonio.¹⁰⁶

Gli esempi riportati mostrano come i microrganismi possano essere fondamentale utilizzati con successo per degradare completamente e quindi biorisanare terreni contaminati dagli isomeri dell'HCH. Non a caso, la ricerca in questo ambito è molto attiva. In particolare, recenti ricerche hanno dimostrato come l'aggiunta di specifici ammendanti possa da una parte stimolare la crescita e l'attività di questi microrganismi e dall'altra accelerare il processo di degradazione. In altri casi si è visto che microrganismi isolati da suoli contaminati, in grado di degradare contaminanti organici, possono essere reinoculati nella rizosfera in concentrazioni elevate (*bioaugmentation*). Tuttavia, è evidente che tali processi risultano complessi da realizzare *in-situ* perché richiedono condizioni ambientali ottimali per la crescita e lo sviluppo dei diversi ceppi di microrganismi. Un'altra importante problematica è legata alla reale biodisponibilità degli inquinanti. Questa dipende dalle proprietà chimiche dell'inquinante, dalla composizione del suolo (pH, potenziale redox, contenuto di materia organica, temperatura, capacità di scambio cationico, composizione chimica e umidità), dalle condizioni ambientali e dall'attività biologica. Fondamentale, ad esempio, è la ripartizione degli inquinanti tra la fase liquida e quella solida del suolo. Gli HCH, delle per le loro caratteristiche chimiche, tendono ad assorbirsi all'humus presente nel terreno diminuendo fortemente la loro mobilità e di conseguenza la loro biodisponibilità alla degradazione. Altri fattori influiscono negativamente sui livelli di biodisponibilità in quanto possono aumentare la volatilità degli HCH all'interno dei compartimenti del suolo o dalla sua superficie. Tra questi, l'elevata temperatura, l'umidità e la pressione di vapore giocano un ruolo fondamentale.

1.2.6.2 Fitorimedio

Un'altra tecnica finalizzata alla concentrazione degli inquinanti all'interno di matrici biotiche è rappresentata dal fitorimedio che sfrutta quei processi biologici, chimici e fisici che permettono l'assorbimento, il sequestro, la degradazione e la metabolizzazione dei contaminanti sia da parte delle piante che dei microrganismi della rizosfera. Il fitorimedio rappresenta una soluzione interessante ai problemi di bonifica ambientale nei casi di contaminazione diffusa su ampie superfici, anche in considerazione dei bassi costi e della sostenibilità ambientale.¹⁰⁷

Le piante permettono la decontaminazione da numerosi inquinanti presenti in differenti matrici, attraverso vari meccanismi biochimici:

- *rizodegradazione* ossia degradazione di un contaminante da parte dei microrganismi presenti nella rizosfera, la cui crescita ed l'attività sono stimulate dai prodotti di fotosintesi essudati dall'apparato radicale;
- *fitodegradazione* ossia degradazione di composti organici all'interno della pianta o all'esterno mediante enzimi essudati dall'apparato radicale;
- *fitoestrazione* assorbimento dei contaminanti a livello delle radici e successivo immagazzinamento nel fusto e nelle foglie;
- *rizofiltrazione* ossia assorbimento di contaminanti, presenti in soluzione acquosa, dalle radici senza traslocazione nella parte aerea, rimanendo localizzati nell'apparato radicale;
- *fitostabilizzazione* ossia interazione di inquinanti organici di natura lipofilica con le superfici idrofobiche dell'humus ed immobilizzazione; a seguito di ciò, gli inquinanti risultano non estraibili né veicolabili agli animali né all'uomo attraverso la catena alimentare;
- *fitovolatilizzazione* assorbimento dei contaminanti, eventuale trasformazione, e volatilizzazione mediante la traspirazione della pianta.

Tra le varie specie, le piante arboree caratterizzate da rapido accrescimento, elevata biomassa ed apparato radicale esteso costituiscono dei buoni candidati per realizzare il *fitorimedio*; inoltre, possono essere impiegate per la produzione di biomassa a scopi energetici. Tra queste, le migliori sono i salici e i pioppi. Dati di letteratura, infatti, mostrano la capacità di piante appartenenti alla famiglia delle *Salicaceae* di crescere nelle condizioni estreme tipiche di aree contaminate e di assorbire ed accumulare nei loro tessuti residui tossici, producendo allo stesso tempo una notevole quantità di biomassa utilizzabile per la produzione di energia. Sia i salici che i pioppi, inoltre, possono essere coltivati mediante piantagioni a turno breve, caratterizzate da una durata circa 15 anni. Tali colture sono considerate una risorsa per le industrie della carta e del legno e negli ultimi anni anche un'importante fonte di energia, rappresentando una valida alternativa ai combustibili fossili per la produzione di calore.^{108,109} Inoltre, possono proteggere i suoli dall'acqua e dall'erosione, stabilizzare i siti contaminati, limitando la diffusione degli agenti tossici inquinanti nelle aree circostanti e contribuire ad un miglioramento paesaggistico delle zone stesse.¹¹⁰

Gli alberi di pioppo, in particolare, posseggono caratteristiche uniche per il fitorimedio essendo piante perenni, di facile propagazione e crescita rapida (soprattutto nella fase giovanile). Inoltre, rilasciano nella rizosfera grandi quantità di carbonio organico trasferendo i loro prodotti di fotosintesi al terreno. Tale capacità rende il loro apparato radicale un luogo ideale per ospitare microorganismi in grado di svolgere una reale attività di fitorizodegradazione di xenobiotici come i contaminanti clorurati. Altra interessante caratteristica è il polimorfismo genetico che conferisce loro adattabilità a varie condizioni climatiche, notevole tolleranza all'accumulo di un dato contaminante e buone capacità di degradazione del medesimo. Partendo da questa variabilità, si può sperimentare in diversi ambienti il materiale vegetale più idoneo per un'applicazione di fitorimedio per contaminanti organici.

Nonostante i suddetti vantaggi, tra le principali limitazioni nell'applicazione del fitorimedio vi è la necessità di mettere in contatto l'apparato radicale della pianta con la matrice contaminata. Infatti, in relazione alla specie considerata e alle condizioni pedoclimatiche, l'apparato radicale generalmente esplora il terreno ad una profondità che varia dai 50 centimetri delle specie erbacee ai circa 5 metri di alcuni salici. Il tempo necessario per completare un intervento di bonifica è un altro aspetto critico nell'uso del fitorimedio in quanto tale tecnica richiede tempi molto lunghi per l'impianto e per l'effettiva rimozione dei contaminanti dal suolo e ciò ne restringe il campo di applicabilità solo ai casi in cui non c'è urgenza di riutilizzare il sito e la contaminazione non costituisce un rischio immediato per l'uomo e l'ambiente.

Il sistema di pioppicoltura a taglio breve (SRC) è stato recentemente introdotto nella Valle del fiume Sacco per il biorisanamento con un progetto che visto coinvolti la Scuola Superiore "Sant'Anna" di Pisa e il Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente dell'Università degli Studi del Molise. A seguito di tale sperimentazione, sono stati selezionati i cloni di pioppo in grado di assorbire attraverso l'apparato radicale gli isomeri dell'HCH o di degradarli attraverso il rizorimedio.¹¹¹I risultati ottenuti sono stati incoraggianti; infatti, è stato individuato un clone di pioppo (Monviso) che, associato ad un inoculo di batteri, compost e perossido di calcio, è stato in grado di degradare in un solo anno il 40% del *lindano* totale. L'efficacia del clone Monviso nella degradazione di gli isomeri dell'HCH è stata imputata ad una maggiore produzione di biomassa a livello radicale: il clone potrebbe aver messo a disposizione più metaboliti in grado di sostenere la proliferazione e l'attività dei ceppi batterici inoculati nella rizosfera. Infatti, nel corso della sperimentazione è stata monitorata sia la popolazione microbica del suolo imperturbato dai trattamenti che la rizosfera delle piante batterizzate con le specie di batteri; da tale monitoraggio si è potuto constatare che la popolazione batterica presente nella rizosfera di tutti i cloni di pioppo ha subito un incremento notevole, in particolare nella rizosfera del clone Monviso.

1.3 Le tecniche analitiche utilizzate per la determinazione degli HCH

1.3.1 Gas-cromatografia

La cromatografia è una tecnica di analisi che permette la separazione, l'identificazione e/o la quantificazione di sostanze presenti in miscela. In generale, le tecniche cromatografiche sono basate sulla differente distribuzione delle specie da separare in due fasi diverse: una *fase stazionaria*, normalmente immobilizzata su di un supporto, ed una *fase mobile*, generalmente un liquido o un gas che fluisce in continuo sulla *fase stazionaria*. A seconda della diversa affinità per le due fasi, infatti, le sostanze da separare tenderanno a fissarsi più o meno fortemente alla fase stazionaria, posizionandosi in zone distinte di quest'ultima permettendone la separazione. In base alle caratteristiche della *fase stazionaria* le tecniche cromatografiche possono essere distinte in: adsorbimento, ripartizione, scambio ionico, esclusione ed affinità. In particolare, nelle analisi di pesticidi la più utilizzata è la cromatografia di adsorbimento in cui la *fase stazionaria* è rappresentata da un solido dotato di siti attivi che formano legami deboli (idrogeno, dipolo-dipolo) con la miscela da separare. Le varie tecniche cromatografiche portano alla registrazione di un cromatogramma, cioè di un tracciato che descrive l'andamento del segnale del rivelatore in funzione del tempo, a partire dall'istante in cui la miscela viene introdotta in colonna. Ogni sostanza che viene eluita esce dalla colonna passa attraverso un rivelatore aumentando (o diminuendo) il segnale della linea di base in modo più o meno repentino e generando un segnale che viene registrato sotto forma di *picco cromatografico* (Figura 6).

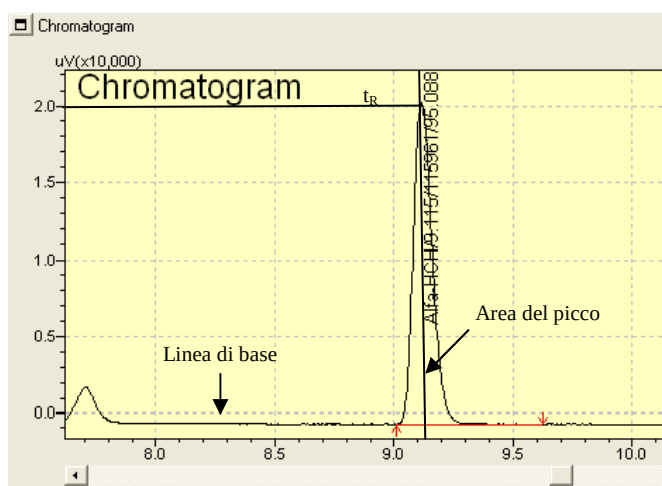


Figura 6. Cromatogramma relativo all' α -HCH.

Ogni *picco cromatografico* è caratterizzato da un *tempo di ritenzione* (t_R), un'altezza e un'area. Il *tempo di ritenzione* è un parametro tipico di una sostanza da analizzare ed è definito come il tempo che impiega un componente della miscela iniettata ad uscire dalla colonna o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector. A parità di condizioni cromatografiche (temperatura, velocità di flusso, tipologia di fase mobile e stazionaria) un composto, indipendentemente dalla quantità, esce sempre allo stesso t_R .

Grazie a questo parametro, è possibile identificare i diversi composti presenti in una miscela. L'*altezza* e l'*area*, invece, sono parametri importanti ai fini dell'analisi quantitativa della miscela da analizzare.

Tra le tecniche strumentali più utilizzate in ambito analitico è inclusa la gas-cromatografia che consente, di effettuare l'analisi qualitativa e quantitativa di miscele anche molto complesse. Nella gas-cromatografia la fase mobile è un gas che fluisce attraverso una colonna in cui si trova la fase stazionaria, che può essere un solido granulare poroso oppure un liquido. A seconda dello stato fisico della fase stazionaria, la gas-cromatografia si può suddividere in cromatografia gas-solido (GSC) e in cromatografia gas-liquido (GLC).

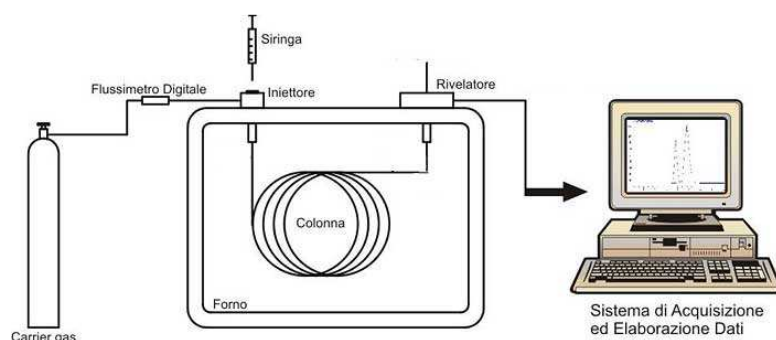


Figura 7. Schema generale di un gas-cromatografo.

Come mostrato in *Figura 7*, in un gas-cromatografo si possono distinguere quattro componenti principali: l'*iniettore*, la *camera termostatica*, il *rivelatore* e l'*elaboratore*.

Il ruolo dell'*iniettore*, posto in “testa” alla colonna, è di assicurare l'istantanea vaporizzazione del campione. Poiché con l'utilizzo di colonne capillari la quantità di campione da iniettare è dell'ordine dei microlitri, sono state messe a punto particolari tecniche di iniezione (*split*, *splitless*) che consentono di far entrare effettivamente in colonna solo una parte del liquido iniettato. L'iniettore è costituito da un corpo termostato, un liner e un setto di silicone. Il corpo termostato, è un cilindro con un sistema di resistenze variabili grazie alle quali è possibile fissare la temperatura ritenuta più adatta per la vaporizzazione della miscela. Al suo interno è posizionato il liner, un tubicino di vetro in cui viene istantaneamente vaporizzato il campione. Il setto di silicone, posto in testa al liner, invece, impedisce la fuoriuscita dei vapori sviluppati all'interno dello stesso facendo in modo che tutta la miscela entri in colonna.

La *camera termostatica* è la porzione dello strumento dove viene collocata la *colonna cromatografica*. Il più diffuso tipo di camera termostatica è quello a circolazione d'aria calda che garantisce una stabilità della temperatura nell'ordine di 0.5°C e il raggiungimento, in tempi brevi, di temperature fino a 400 °C. L'uniformità della temperatura in ogni punto della camera viene garantita da una ventola posta al di sotto di un fondo forato. La colonna cromatografica può essere impaccata o capillare. La più classica delle colonne impaccate ha una lunghezza di 1-2 metri ed un diametro interno nell'ordine di qualche

millimetro. Il materiale più comunemente usato per la costruzione di colonne impaccate è l'acciaio inossidabile ma per sostanze molto reattive si preferisce l'uso di colonne in vetro. La colonna viene riempita con la fase stazionaria, costituita da un supporto inerte di appropriata granulometria, eventualmente imbevuto della fase stazionaria liquida. Le colonne capillari sono le più diffuse, la loro lunghezza è nell'ordine di 15-100 metri con un diametro compreso tra 0.1 e 0.75 mm. La fase stazionaria viene depositata sulle pareti interne della colonna sotto forma di un film sottilissimo. Esistono vari tipi di colonne capillari, in relazione al diametro ed al modo in cui viene eseguito il riempimento. Nelle colonne di diametro inferiore (da 0.25 a 0.30 mm) il liquido di ripartizione viene posto direttamente all'interno sotto forma di un sottilissimo film aderente alle pareti della colonna. Questo tipo di colonna viene identificata dalla sigla WCOT (Wall Coated Open Tubular). In quelle a diametro maggiore (da 0.4 a 0.8 mm), oltre alla soluzione descritta, si ritrovano in commercio colonne in cui la deposizione del liquido di ripartizione ha luogo su di uno strato di materiale poroso che riveste le pareti interne della colonna, e sono chiamate SCOT (SupportCoated Open Tubular).

Il *rivelatore* posto a valle della colonna è in grado di identificare i componenti della miscela presa in esame. I rivelatori possono essere universali e selettivi. I primi consentono di individuare tutti i componenti di una miscela; i secondi rivelano solo particolari categorie di composti. I rivelatori più usati sono il rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), il rivelatore a cattura di elettroni (ECD) e il rivelatore di massa (MS). Nel FID i campioni vengono bruciati per ottenerne la trasformazione in ioni allo stato gassoso. Il carrier viene convogliato verso un ugello a cui giungono anche idrogeno ed aria, necessari per alimentare una piccola fiammella. Una resistenza posta accanto all'ugello provoca l'accensione della fiammella. Quest'ultima si trova circondata da un collettore cilindrico caricato positivamente; il secondo elettrodo del circuito, quello caricato negativamente, è costituito dall'ugello stesso. La microfiamma provoca una debolissima corrente ionica tra gli elettrodi, che vengono mantenuti sotto una differenza di potenziale di circa 300V. Questa corrente, elaborata, amplificata e misurata, viene inviata ad un opportuno registratore e costituisce il rumore di fondo. Quando un componente della miscela raggiunge la fiamma, viene subito ionizzato con conseguente aumento dell'intensità di corrente e quindi rivelato con un segnale più intenso. La sensibilità di questo rivelatore è molto elevata, infatti si può arrivare ai nanogrammi. L'ECD è un rivelatore selettivo costituito da una sorgente radioattiva (^{63}Ni) che emette radiazioni β (elettroni). Gli elettroni, detti primari, emessi dalla sorgente, vengono a trovarsi in un campo elettrico di cui la sorgente costituisce l'anodo, mentre il catodo si trova verso l'uscita. Gli elettroni primari colpiscono il carrier formando ioni positivi ed elettroni secondari. Il flusso di queste cariche costituisce la corrente di fondo e dipende dalla differenza di potenziale tra i due elettrodi. Quando insieme al carrier è presente una sostanza in grado di catturare gli elettroni secondari, si verifica una diminuzione di corrente di fondo. La corrente, elaborata, amplificata e misurata, viene inviata ad un registratore. I limiti di rilevabilità possono essere molto bassi, ad esempio per i pesticidi organoclorurati o derivati del fosforo, si può arrivare a rivelare i picogrammi. Le sostanze maggiormente rivelate sono quelle contenenti

alogeni. Lo *spettrometro di massa* è uno strumento che permette di ottenere informazioni strutturali sugli analiti di interesse, ed è basato sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica (M/z). Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; lo ione molecolare generato in parte si frammenta dando luogo a molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva) e generando cationi e/o radicali cationi (ioni frammento). Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati. Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica. Attraverso questa tecnica è, quindi, possibile misurare le masse molecolari ed ottenere profili di frammentazione specifici per ciascun composto. Si può, così, individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità. Il rivelatore di massa si basa sulla rivelazione di ioni in fase gassosa in condizioni di vuoto spinto; pertanto, l'accoppiamento con un gas-cromatografo, che già prevede campioni in fase gassosa, si realizza facilmente, attraverso l'utilizzo di dispositivi capaci di ridurre il flusso del gas di trasporto prima che venga raggiunta la sorgente di ionizzazione. Esistono due tipi di sorgenti di ionizzazione: elettronica e chimica. Nella ionizzazione elettronica il campione viene bombardato da elettroni ad elevata energia in grado di rompere i legami esistenti all'interno della molecola e frammentandola in ioni. Nella ionizzazione chimica i frammenti si formano grazie agli ioni provenienti da un gas, ad esempio metano. Il campione, una volta ionizzato, entra all'interno del quadrupolo. Questo genera un campo magnetico variabile che devia o lascia passare i diversi ioni. Durante la fase di scansione, il campo magnetico varia nel tempo in modo da far arrivare al rivelatore solo uno ione specifico per volta. Affinché gli ioni arrivino all'interno del quadrupolo con una traiettoria il più parallela possibile, tra la camera di ionizzazione ed il quadrupolo viene inserito un focalizzatore. Recentemente sono stati prodotti spettrometri di massa con un triplo quadrupolo, dove avviene una ulteriore frammentazione dello ione molecolare in ulteriori ioni.

1.3.2 Spettroscopia Infrarossa (IR)

La Spettroscopia Infrarossa (IR) è una tecnica spettroscopica di assorbimento particolarmente utilizzata per ottenere informazioni sulle proprietà strutturali delle molecole. Tale tecnica si avvale della radiazione infrarossa che provoca vibrazioni molecolari consistenti in stiramenti dei legami chimici (*stretching*) e deformazioni degli angoli di legame (*bending*). La luce infrarossa cade tra luce visibile e la radiazione a microonde nello spettro di radiazione elettromagnetica. Questo tipo di luce può essere ulteriormente suddivisa in vicino, medio, e lontano IR. Normalmente, quello più utilizzato è il medio IR in cui la luce ha lunghezza d'onda (λ) da 3×10^{-4} a 3×10^{-3} cm. Quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato eccitato. Questo passaggio di stato induce transizioni tra livelli energetici che si traducono in picchi di assorbimento. Schematicamente un classico spettrofotometro IR è essenzialmente costituito da una sorgente il cui fascio

di luce viene convogliato verso il campione e il riferimento, quest'ultimo costituito solitamente dal liquido in cui tale campione è disciolto (*Figura 8*). Segue il *monocromatore*, la cui funzione è quella di selezionare una specifica lunghezza d'onda, e un *chopper* ossia un sistema ottico a forma di semidisco che negli strumenti a doppio raggio è posto anche dopo la sorgente per sdoppiare il raggio di luce che indirizza alternativamente al rivelatore la radiazione proveniente rispettivamente dal campione e dal riferimento.

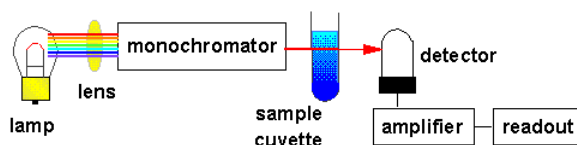


Figura 8. Schema generale di uno spettrofotometro IR.

Il rivelatore è il componente finale che genera un segnale in funzione della concentrazione di analita presente. I rilevatori più diffusi sono le *termocoppie* e i *termistori*; le termocoppie generano una differenza di potenziale a seguito della differenza di temperatura che si stabilisce tra due giunti sensibili, mentre i termistori sono dei componenti resistivi che costituiscono uno dei quattro rami di un ponte di Wheatstone che viene sbilanciato al variare della loro resistenza in funzione della temperatura. La spettroscopia IR più utilizzata è la quella a Trasformata di Fourier (FT-IR): mentre i dispositivi tradizionali misurano direttamente la quantità di energia per ogni frequenza che riesce a passare attraverso il campione, negli FT-IR il fascio è indirizzato ad un dispositivo (beamsplitter) che lo divide in due. Un fascio va a colpire direttamente il campione, mentre il secondo, grazie ad un sistema di specchi mobili, viene indirizzato al campione con un ritardo che è funzione del movimento dello specchio. Un interferometro poi produce un unico tipo di segnale su un interferogramma che mostra la rappresentazione dell'intensità nel dominio del tempo. Applicando la Trasformata di Fourier, un calcolatore permette di ottenere lo spettro infrarosso, che esprime l'intensità nel dominio della frequenza. Dallo spettro infrarosso è possibile trarre utili informazioni per il riconoscimento di una molecola incognita o di gruppi funzionali in una molecola. A tal proposito, al fine di associare un legame a un dato numero d'onda, si utilizzano apposite tavole riportate in bibliografia o librerie elettroniche incluse nel software della strumentazione. In generale, gli spettri IR possono essere registrati come assorbimento o riflettanza. Lo spettro di assorbimento è quello comunemente conosciuto nel quale il campione viene irradiato da una radiazione IR e si misura la trasmittanza (espressa in percentuale) o l'assorbanza della radiazione, trasmessa attraverso il campione o assorbita da esso. Gli spettri in riflettanza sono ottenuti misurando l'intensità della radiazione riflessa in relazione all'intensità della radiazione incidente. Tale metodo permette tempi più brevi di esecuzione. Gli spettri in riflettanza non sono equivalenti a quelli in assorbimento; in genere i moderni strumenti posseggono software di conversione. Il campione, nella riflettanza classica viene posto su un cristallo e irradiato attraverso il cristallo stesso la cui caratteristica

principale è quella di essere trasparente alla radiazione IR utilizzata. Normalmente nelle tecniche IR, i campioni solidi per essere analizzati necessitano di essere sottoposti ad una serie di trattamenti quali la riduzione in strati sottili di pellicola, la fine macinazione con KCl o KBr in modo da ottenere dischi omogenei; la macinazione in apposito mortaio al fine di portarli a sospensione. I liquidi, invece, vengono posti direttamente in una apposita cella a parallelepipedo formata da materiali trasparenti alla radiazione infrarossa, così come i gas sono direttamente campionati in apposite celle cilindriche con finestre trasparenti all'IR. La possibilità di poter abbinare l'FT-IR ad un microscopio ottico (micro-FTIR) ha reso tale tecnica particolarmente vantaggiosa nell'analisi su porzioni molto piccole di campione. In questo caso la zona sulla quale ottenere lo spettro, in riflettanza, viene identificata mediante il microscopio ottico, quindi lo stesso cammino ottico viene percorso dal raggio IR permettendo di registrare, per i campioni di interesse, analisi di stratigrafie (cross-section) in successione separatamente.

1.4 Il progetto di ricerca

L'attività sperimentale condotta durante il triennio di dottorato è inserita in un progetto di ricerca a carattere interdisciplinare dal titolo *“Studio della diffusione di inquinanti organici persistenti in ambiente rurale e stima dei rischi da esposizione per gli operatori del settore agricolo-zootecnico mediante modelli cellulari”* finanziato dall'Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL). Tale progetto, di durata triennale, ha visto come capofila il Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE) e come Responsabile Scientifico il Prof. Bruno Ronchi. Per lo svolgimento sono stati coinvolti ricercatori e tecnici del DAFNE e del DISBEC ed ha visto la partecipazione di 9 aziende agrarie locali della Valle del fiume Sacco che hanno fornito la loro disponibilità ai campionamenti.

Obiettivo principale del progetto è analizzare i rischi da esposizione per gli operatori del settore agricolo-zootecnico che svolgono la loro attività nella Valle del fiume Sacco, un contesto agro-ambientale fortemente compromesso sotto il profilo della qualità e dello stato dell'ambiente, a seguito degli avvenimenti a carattere emergenziale connessi con la diffusione di HCH ampiamente descritti nella parte introduttiva. Per la sua realizzazione, il progetto di ricerca è stato articolato in tre principali attività differenziate per tipologia e/o collocazione temporale nell'ambito dei 36 mesi.

La prima attività, iniziata nel marzo 2012 e conclusasi nel marzo 2015, è stata condotta nel Laboratorio di Chimica Organica (Responsabile: Dott.ssa Roberta Bernini); nel Laboratorio di Biochimica Clinica ed Immunologia del DAFNE (Responsabile: Prof. Bruno Ronchi, Dott. Pier Paolo Danieli) e, quando necessario, presso il Centro Grandi Attrezzature di Ateneo. Ha riguardato prevalentemente la determinazione analitica degli isomeri dell'esaclorocicloesano in varie matrici agro-ambientali provenienti dall'area in oggetto opportunamente campionati.

La seconda attività, ancora in itinere, viene condotta nel Laboratorio di Biochimica Clinica ed Immunologia del DAFNE ed è finalizzata allo studio dei possibili effetti negativi dell'esposizione a breve e medio termine agli HCH. Per perseguire tali obiettivi, sono state allestite colture cellulari di linee differenti (epatociti/cellule degli epitelii intestinali/cellule del sistema immunitario o altro tipo) secondo protocolli operativi internazionali.¹¹² Gli esperimenti condotti sono mirati a studiare gli effetti della vitalità cellulare, dell'integrità delle membrane e della funzionalità mitocondriale (MTT test) in presenza di HCH.

L'ultima attività è finalizzata a correlare i possibili rischi da esposizione per gli operatori del settore agricolo-zootecnico operanti nella Valle del fiume Sacco sulla base di quanto emerso sia dalle determinazioni analitiche dei campioni analizzati che dall'esame dei risultati ottenuti dalla sperimentazione con i modelli cellulari.

Sulla base di quanto premesso, il lavoro svolto durante il triennio di dottorato, ed oggetto della presente tesi, è stato focalizzato su due obiettivi di ricerca. Inizialmente è stata valutata la qualità ambientale della Valle del fiume Sacco mediante opportuni campionamenti di varie matrici di rilevanza agro-ambientale finalizzati alla determinazione analitica degli HCH. In particolare, è stata effettuata la verifica dei livelli di contaminazione da tali pesticidi nel suolo e nel soprassuolo; nell'acqua per l'abbeveraggio degli animali in produzione; in alimenti d'origine animale destinati al consumo umano (latte, carne, miele, uova, ortaggi); in alimenti impiegati nell'allevamento dei bovini da latte. Pertanto, sono stati condotti una serie di campionamenti in varie zone all'interno dell'area di studio per garantire la rappresentatività delle varie matrici. Dopo una fase di pre-trattamento specifica per ogni matrice, ci si è avvalsi di metodi di estrazione accreditati a livello internazionale per l'estrazione degli HCH. Su tali campioni sono state eseguite le analisi gas-cromatografiche. I risultati analitici ottenuti sono stati confrontati con i valori massimi consentiti dalla normativa vigente nazionale ed europea; inoltre, sono stati oggetto di una serie di elaborazioni statistiche per correlarli, per ciascuna azienda a diversi fattori (collocazione geografica, periodo di campionamento, profondità del suolo ...).

Un secondo obiettivo di ricerca ha riguardato la determinazione analitica degli HCH in campioni di pioppo, una pianta arborea utilizzata per il fitorimedio nella Valle del Sacco, per verificarne l'effettiva capacità di assorbimento degli inquinanti. A tale scopo è stato messo a punto un innovativo approccio di tipo dendrochimico tramite una procedura analitica che si è avvalsa, in via preliminare, della spettroscopia IR. Questa parte della ricerca ha richiesto carotaggi di pioppi collocati a diverse distanze dal fiume Sacco, l'analisi degli standard e dei campioni tal quali tramite spettroscopia IR e la successiva validazione dei dati acquisiti tramite gas-cromatografia.

2. RISULTATI E DISCUSSIONI

2.1 Area oggetto di studio e campionamenti

L'area di studio della Valle del fiume Sacco, oggetto del monitoraggio ambientale, e la collocazione geografica delle 9 aziende agricole locali che hanno partecipato al progetto di ricerca sono mostrate in *Figura 9*. Tali aziende, denominate con le lettere **A, B, C, F, G, H, I, L, M**, fanno riferimento alla Cooperativa Produttori Latte Casilina.

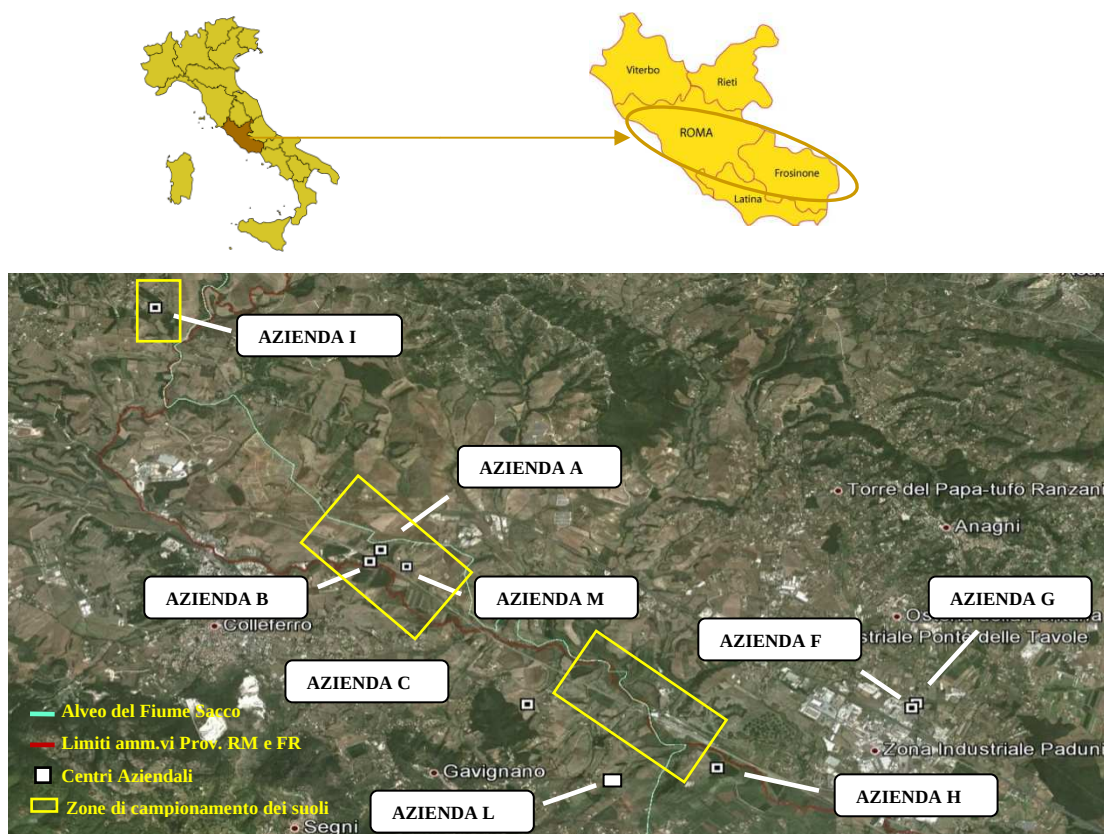


Figura 9. Localizzazione geografica della Valle del fiume Sacco e delle aziende partecipanti al progetto di ricerca.

Inizialmente, per ogni azienda sono state compilate apposite schede con la finalità di acquisire informazioni circa le rispettive coordinate geografiche; l'estensione dei relativi terreni destinati ad uso agricolo; la presenza o assenza di appezzamenti lungo il fiume Sacco; l'indicazione di eventuali aree interdette dalla produzione di colture *food* ossia destinate all'alimentazione umana e dall'utilizzo foraggiero; i piani alimentari adottati per il razionamento degli animali in produzione e la provenienza degli alimenti; eventuali dati relativi al riscontro di "non conformità" di partite di latte e carne conferiti a terzi.

Sulla base di tali informazioni, per ciascuna azienda, sono stati selezionati i siti di prelievo dei campioni di suolo. Lo schema sperimentale per tale campionamento ha previsto prelievi a tre differenti profondità del terreno (0-15, 15-30 e 30-45 cm) sia nelle aree interdette che non, al fine di ottenere

campioni rappresentativi. Tali prelievi sono stati effettuati in due diversi periodi temporali (giugno/ottobre 2012 e giugno/ottobre 2014), di seguito indicati come “I ciclo” e “II ciclo”. Parallelamente, da ciascuna azienda sono stati prelevati campioni di soprassuolo, ortaggi (zucchine, peperoni, melanzane, cicoria, pomodori, broccoli), alimenti zootecnici (razione completa sotto forma di unifeed oppure singoli alimenti e/o mangimi), latte, acqua, uova, carne (grasso, muscolo, fegato, rene) di bovini macellati. Il dettaglio di tutti i campioni è riportato in *Tabella 2*.

Tabella 2. Matrici campionate durante il progetto di ricerca (totale: 345)

Tipologia di campione	Giugno/Ottobre 2012 (I ciclo)	Giugno/Ottobre 2014 (II ciclo)
Suolo	78	78
Soprassuolo	22	23
Unifeed	10	12
Latte	9	9
Acqua	7	8
Uova	10	11
Ortaggi	24	10
Miele	10	--
Carne	10	9
Conserve	3	2

Per ciascuna tipologia di matrice sono stati applicati i metodi di estrazione specifici accreditati (ISO, EPA, IRSA e UNI-EN, si veda la parte sperimentale). Successivamente sono state effettuate le determinazioni quantitative degli HCH tramite gas-cromatografia utilizzando uno strumento con rivelatore a cattura di elettroni (GC-ECD). I campioni positivi ottenuti sono stati successivamente confermati via GC-MS nei laboratori dell'ARPA Lazio, sede di Viterbo, nell'ambito di una collaborazione scientifica che ha portato anche all'elaborazione di una tesi di Laurea del Dott. Pietro Carai che si è laureato nei nostri Laboratori.¹¹³

Sono di seguito riportati i dati analitici GC-ECD ottenuti per ogni tipologia di matrice (*Tabelle 3-9*). Data la loro numerosità, i dati ottenuti sono stati elaborati a livello statistico, utilizzando il programma STATISTICA 10, al fine di fornire una visione generale del livello di contaminazione osservato nelle diverse aziende nell'intero arco temporale di monitoraggio al variare dei diversi fattori presi in considerazione. Per le matrici *soprassuolo*, *unifeed*, *latte* ed *acqua*, le variabili dipendenti elaborate rispetto al fattore “azienda” attraverso l'analisi della varianza (ANOVA ad una via) sono i quattro isomeri HCH (α , β , γ , δ); il loro totale (HCH-totale); il rapporto percentuale dei 2 isomeri risultati più abbondanti (β -HCH/ α -HCH); il rapporto percentuale tra l'isomero più persistente e il totale (β -HCH/HCH-totale); per il *suolo*, tale elaborazione è stata integrata dalle correlazioni delle stesse variabili ad ulteriori fattori, quali il “sito”, il periodo di campionamento (“ciclo”) e la “profondità di campionamento” utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA a due vie). In tutti i casi il confronto della varianza entro i fattori o tra i fattori è stato eseguito mediante confronti post-hoc con il test Fisher LSD con risultati statisticamente significativi se il valore *p* è minore o uguale a 0.05 (ovvero il 5%) o 0.01 (ovvero 1%).

I dati analitici GC-ECD ottenuti dei campioni alimentari (uova, vegetali, miele, latte e conserve) non sono tabulati in quanto sono risultati inferiori al limite di determinazione.

2.2 Determinazione analitica degli HCH in campioni di suolo e soprassuolo

Come precedentemente riportato, per ogni sito, il suolo è stato prelevato a tre diverse profondità (0-15, 15-30 e 30-45 cm). Ogni campione è stato ottenuto tramite un *pooling* di tre repliche, attraverso carotaggi all'interno di un quadrato avente i lati della lunghezza di 10 metri. I dati analitici per tale matrice, ottenuti tramite GC-ECD, sono mostrati nelle *Tabelle 3 e 4*; riportano, per ciascun HCH, i risultati riferiti al primo e al secondo ciclo di campionamento (rispettivamente in colore nero e blu). Ogni campione è stato contraddistinto da una lettera che indica l'azienda nell'ambito della quale è stato prelevato; segue un codice alfanumerico per le aziende **A** e **B**, numerico per le aziende **C**, **H**, **I**, **M** ad indicare il sito di identificazione all'interno di una stessa azienda. I siti indicati in grassetto, inoltre, fanno riferimento alle zone interdette all'uso agricolo. Per ogni sito sono indicati tre valori, che corrispondono alle tre diverse profondità di campionamento.

Dall'esame dei dati analitici ottenuti, si può osservare come nei suoli prelevati sia presente una diffusa contaminazione da HCH, con numerosi campioni aventi valori superiori a 0.01 mg/kg per ciascun isomero. Tale valore rappresenta il limite di legge dei composti organoclorurati riportato nel Testo Unico Ambientale (Decreto Legislativo 152/2001) riferito a terreni in aree adibite ad uso "verde pubblico", non essendo disponibile una normativa specifica per i suoli destinati ad uso agricolo.

Tabella 3. Dati analitici dei campioni di suolo riferiti alle aziende A-C.*

Sito	α -HCH (mg/Kg) I Ciclo	α -HCH (mg/Kg) II Ciclo	β -HCH (mg/Kg) I Ciclo	β -HCH (mg/Kg) II Ciclo	γ -HCH (mg/Kg) I Ciclo	γ -HCH (mg/Kg) II Ciclo	δ -HCH (mg/Kg) I Ciclo	δ -HCH (mg/Kg) II Ciclo
AS1	0.005±0.001	0.014±0.003	0.002±0.001	<LOD	0.002±0.001	0.006±0.001	<LOD	<LOD
	0.010±0.001	0.012±0.003	0.002±0.001	<LOD	0.001±0.001	0.005±0.001	<LOQ	<LOD
	0.003±0.002	0.006±0.001	0.002±0.001	<LOD	0.002±0.001	0.002±0.001	<LOQ	<LOD
AS2	0.001±0.001	0.004±0.001	0.003±0.001	<LOD	0.002±0.001	0.0007±0.0002	<LOD	<LOD
	0.003±0.002	0.004±0.001	0.002±0.001	<LOD	0.0007±0.0001	0.0007±0.0001	<LOD	<LOD
	0.010±0.002	0.003±0.002	0.001±0.001	<LOD	<LOD	0.0007±0.0001	<LOD	<LOD
AS3	0.299±0.032	0.002±0.001	0.437±0.040	0.003±0.002	0.038±0.033	0.0007±0.0001	<LOD	<LOD
	0.186±0.036	0.0008±0.0002	0.151±0.025	0.0009±0.0001	0.053±0.009	0.0008±0.0003	<LOD	<LOD
	0.138±0.024	0.011±0.003	0.457±0.040	<LOQ	0.030±0.003	<LOD	<LOD	<LOD
AS4	0.260±0.030	0.0007±0.0001	0.074±0.010	0.0007±0.0001	0.055 ± 0.009	<LOD	<LOD	<LOD
	0.198±0.028	<LOQ	0.024±0.003	<LOD	0.012 ± 0.002	<LOD	<LOD	<LOD
	0.029±0.005	<LOD	0.005±0.001	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
BS1	0.018±0.003	0.004±0.002	0.067±0.010	0.011±0.001	0.018±0.003	<LOD	<LOD	<LOD
	0.028±0.003	0.005±0.001	0.032±0.006	<LOD	0.011±0.002	0.0011±0.001	<LOD	<LOD
	0.023±0.003	0.004±0.002	0.038±0.006	<LOD	0.018±0.003	0.0007±0.0001	<LOD	<LOD
BS2	0.001±0.001	0.011±0.0002	0.010±0.002	0.010 ± 0.002	0.001±0.001	0.005±0.003	0.006±0.002	<LOD
	0.002±0.001	0.016±0.0003	0.010±0.002	<LOD	0.004±0.001	0.003±0.003	0.006±0.001	<LOD
	0.004±0.001	0.014±0.0003	0.009±0.002	<LOD	0.007±0.001	0.003±0.003	0.005±0.001	<LOD
BS3	0.005±0.001	0.047±0.005	0.001±0.001	0.057±0.001	0.001±0.001	0.008±0.003	0.005±0.001	<LOD
	0.005±0.001	0.011±0.002	0.002±0.001	0.013±0.003	0.002±0.001	0.002±0.001	<LOQ	<LOD
	0.004±0.001	0.013±0.002	0.001±0.001	<LOD	0.001±0.001	0.003±0.001	<LOQ	<LOD
BS4	0.010±0.002	0.002±0.001	0.007±0.001	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
	0.010±0.002	0.002±0.001	0.006±0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	0.007±0.001	0.002±0.001	0.008±0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C1	0.013±0.002	0.002±0.001	0.043±0.003	0.0009±0.0001	0.015±0.008	<LOD	<LOD	<LOD
	0.008±0.002	0.001±0.002	0.009±0.001	<LOD	0.015±0.002	<LOD	<LOD	<LOD
	0.006±0.001	0.002±0.001	0.005±0.001	<LOD	0.004±0.001	<LOD	<LOD	<LOD
C2	0.005±0.001	<LOD	0.008±0.002	<LOD	0.002±0.001	<LOD	<LOD	<LOD
	0.006±0.001	<LOD	0.006±0.001	<LOD	0.001±0.001	<LOD	<LOD	<LOD
	0.004±0.004	<LOD	0.004±0.001	<LOD	0.008±0.002	<LOD	<LOD	<LOD
C4	0.007±0.002	0.007±0.002	0.008±0.003	<LOD	0.005±0.001	<LOD	<LOD	<LOD
	0.003±0.001	0.008±0.002	0.004±0.001	<LOD	0.002±0.001	<LOD	<LOD	<LOD
	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C5	0.008±0.002	<LOD	0.013±0.003	<LOD	0.021±0.003	0.008±0.001	0.009±0.002	<LOD
	0.007±0.001	<LOD	0.009±0.002	<LOD	0.020±0.002	0.001±0.001	<LOD	<LOQ
	0.009±0.003	<LOD	0.007±0.002	<LOD	0.017±0.003	0.001±0.001	<LOD	<LOQ

* Valore ottenuto partendo da 10g di campione di suolo ed espresso come media di tre determinazioni analitiche ± DS

LOD= limite di rilevabilità (α , β e γ) 2 µg/Kg; (δ) 5 µg/Kg; LOQ= limite di quantificazione (α , β e γ) 7 µg/Kg, (δ) 16 µg/Kg

Tabella 4. Dati analitici dei campioni di suolo riferiti alle aziende F-M.*

Sito	α -HCH (mg/Kg) I Ciclo	α -HCH (mg/Kg) II Ciclo	β -HCH (mg/Kg) I Ciclo	β -HCH (mg/Kg) II Ciclo	γ -HCH (mg/Kg) I Ciclo	γ -HCH (mg/Kg) II Ciclo	δ -HCH (mg/Kg) I Ciclo	δ -HCH (mg/Kg) II Ciclo
F1	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
G1	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
G2	0.013±0.003 0.011±0.003 0.008±0.002	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
G3	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
G4	0.005±0.002 0.001±0.001 0.002±0.001	<LOD <LOD <LOD	0.003±0.001 <LOQ <LOD	<LOD <LOD <LOD	0.007±0.002 <LOQ <LOQ	<LOD <LOD <LOD	<LOQ <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
H1	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOQ <LOD <LOQ	<LOD <LOD <LOD	<LOQ <LOD <LOQ	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
H2	0.011±0.002 0.008±0.002 0.008±0.002	0.037±0.007 0.038±0.008 0.022±0.004	0.007±0.002 0.006±0.001 0.006±0.001	0.014±0.003 0.005±0.001 <LOD	0.005±0.001 <LOD <LOD	0.013±0.003 0.009±0.002 <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
H3	<LOD <LOD <LOD	0.0008±0.0001 <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	0.011±0.001 0.003±0.001 <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
H4	0.007±0.001 0.006±0.001 0.006±0.001	0.019±0.001 0.017±0.002 0.015±0.003	0.006±0.002 0.005±0.001 0.005±0.001	0.019±0.003 0.007±0.001 <LOD	<LOD <LOD <LOD	0.006±0.002 0.005±0.001 0.002±0.001	<LOD <LOD <LOD	0.008±0.002 <LOD <LOD
I1	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
I2	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
M1	0.007±0.002 0.003±0.001 <LOD	0.007±0.002 0.008±0.002 <LOQ	0.008±0.003 0.004±0.001 <LOD	0.019±0.003 0.007±0.001 <LOD	0.005±0.001 0.002±0.001 <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	0.007±0.001 0.007±0.001 <LOD
M2	0.029±0.005 0.023±0.005 0.020±0.004	0.001±0.001 0.0007±0.0002 <LOD	0.013±0.002 0.009±0.002 <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD
M3	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD	<LOD <LOD <LOD

* Valore ottenuto partendo da 10g di suolo ed espresso come media di tre determinazioni analitiche ± DS

LOD= limite di rilevabilità (α , β e γ) 2 µg/Kg, (δ) 5 µg/Kg; LOQ= limite di quantificazione (α , β e γ) 7 µg/Kg, (δ) 16 µg/Kg

La *Figura 10* descrive i grafici corrispondenti all'elaborazione statistica delle variabili HCH-totale; α -HCH; β -HCH; γ -HCH; δ -HCH rispetto al fattore "azienda", utilizzando i dati riportati nelle *Tabelle 3-4*. Come evidenziato nel primo grafico, le aziende **A**, **B**, **C**, **H** ed **M** sono risultate avere i valori più elevati di HCH-totale. Tra queste, l'azienda **A** ha presentato il maggiore livello di contaminazione, con differenze statisticamente significative ($p < 0.01$) rispetto alle altre. Al contrario, le aziende **F**, **G**, **I** sono risultate le meno contaminate, mostrando nella norma un contenuto di HCH-totale al di sotto dei limiti di rilevabilità. Invece, dall'analisi dell'andamento generale dei singoli isomeri nelle diverse aziende, si è osservato che gli isomeri α , β e γ sono stati quelli maggiormente rilevati, con una predominanza dell' α -HCH e del β -HCH, mentre l'isomero δ ha mostrato, per quasi la totalità dei campioni, valori al di sotto del limite di determinazione. Tra tutte, l'azienda **A** è quella che ha presentato, per ciascun isomero, differenze statisticamente significative ($p < 0.01$), con valori di α e β ampiamente al di sopra di 0.01 mg/kg.

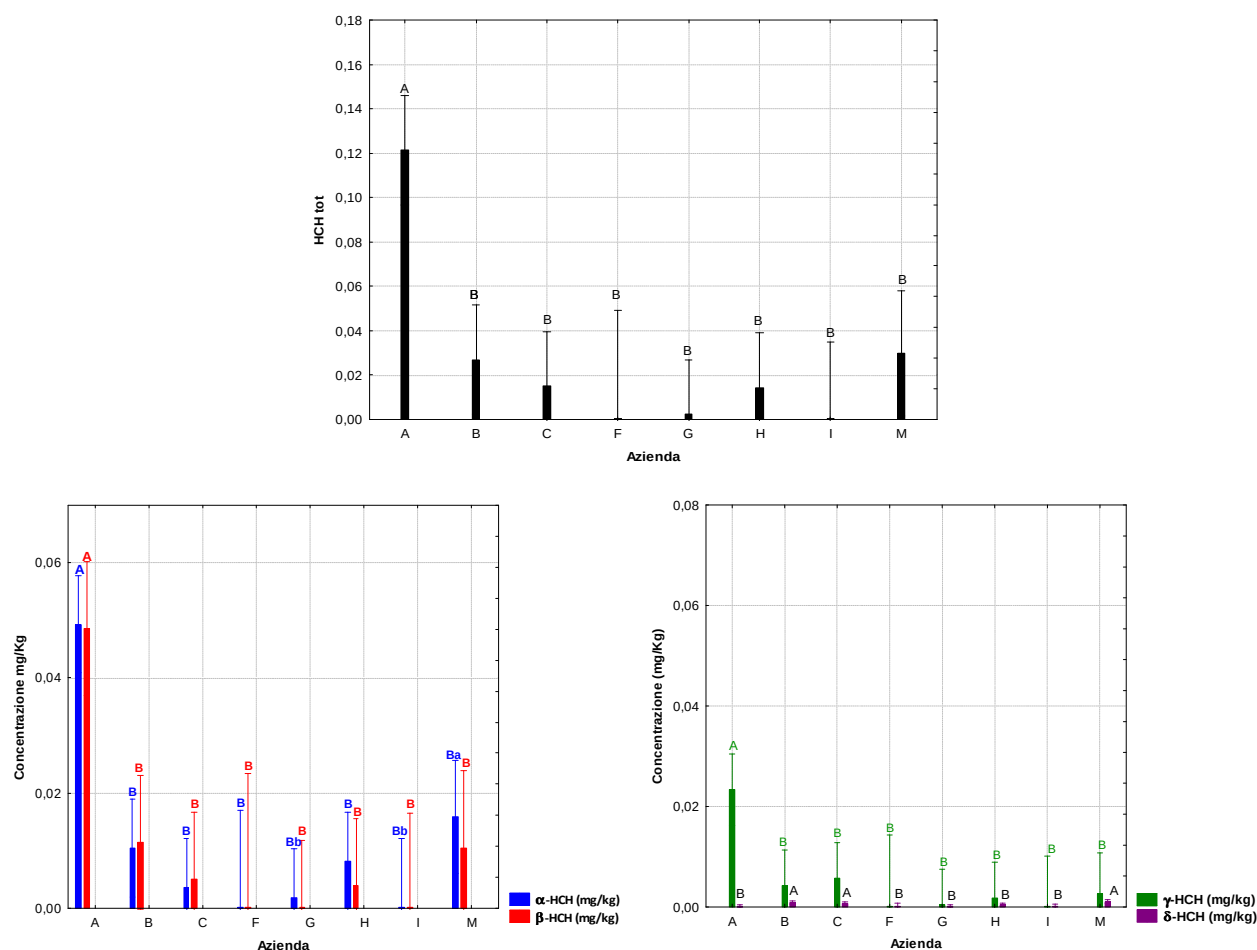


Figura 10. Livelli di concentrazione di HCH-totale e di ogni singolo isomero nelle aziende oggetto di studio.

^{A,B} $p < 0.01$ tra le diverse aziende per il contenuto di HCH-totale

^{A,B} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ per lo stesso isomero tra le diverse aziende.

Per comprendere al meglio l'andamento del livello di contaminazione ed eventuali cambiamenti tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento, di seguito vengono presentati e discussi i risultati ottenuti per ogni azienda.

Azienda A. I siti di campionamento del suolo per l'azienda **A** sono mostrati in *Figura 11* e comprendono sia zone interdette (**AS1** e **AS3**) che non interdette (**AS2** e **AS4**) all'utilizzo agricolo.

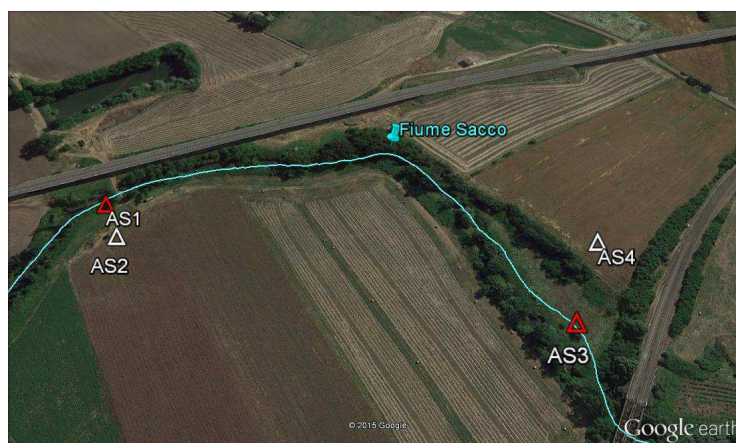


Figura 11. Collocazione dei siti campionati nell'azienda **A** rispetto al tracciato del fiume Sacco.

In *Figura 12* è riportata la distribuzione generale dei diversi isomeri dell'HCH nei 4 siti campionati, in base ai dati analitici ottenuti e mostrati in *Tabella 3*. Come si può osservare nel grafico di sinistra, sono state riscontrate differenze significative ($p < 0.01$) per gli isomeri α , β e γ in tutti i siti analizzati; tra questi, **AS3** è risultato avere le concentrazioni più elevate, seguito da **AS4**, **AS1** e **AS2**. In particolare, **AS1** e **AS2** hanno mostrato dei livelli di contaminazione per la maggior parte dei valori al di sotto di 0.01mg/kg. Nel grafico di destra viene, invece, riportato il rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale (barre celesti) e il rapporto percentuale β -HCH/ α -HCH (barre gialle). In questo caso, sono state osservate differenze significative ($p < 0.01$) soltanto per il sito **AS3** con rapporti elevati a favore dell'isomero β sia rispetto al HCH-totale che all'isomero α . Tali risultati sembrano confermare una diretta correlazione tra la contaminazione del suolo e la vicinanza al fiume Sacco. Infatti, il sito **AS3**, come mostrato nella mappa, fa parte di una zona interdetta, situata a ridosso del fiume.

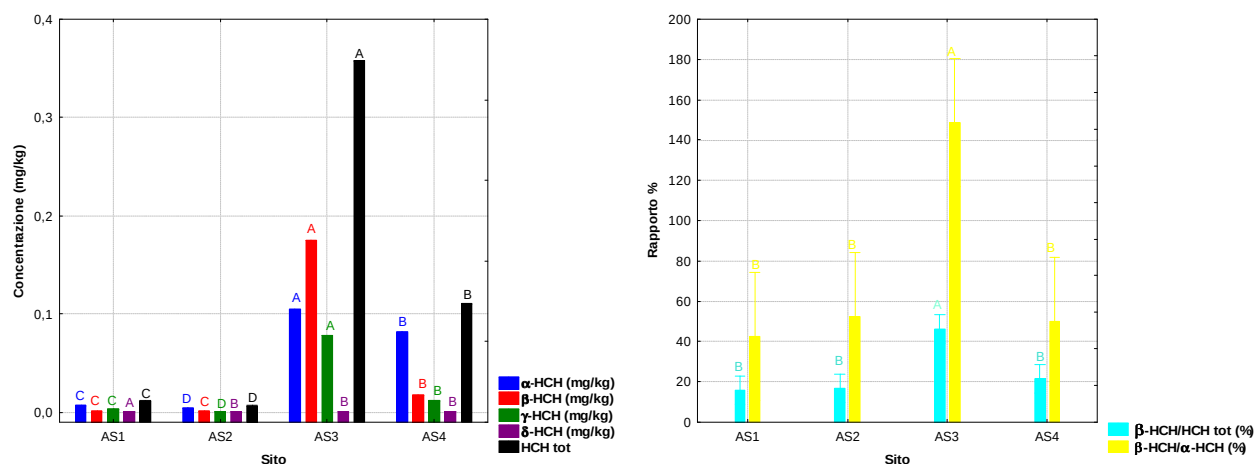


Figura 12. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nei siti della azienda A (grafico di sinistra).

^{A,B,C,D} $p < 0.01$ per uno stesso isomero in siti diversi.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH tot e β -HCH/ α -HCH tra i diversi siti dell'azienda A (grafico di destra).

^{A,B} $p < 0.01$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra siti diversi.

La Figura 13 fornisce un'analisi più dettagliata dei dati raccolti, mostrando l'andamento della concentrazione dei diversi isomeri nel primo e nel secondo ciclo di campionamento.

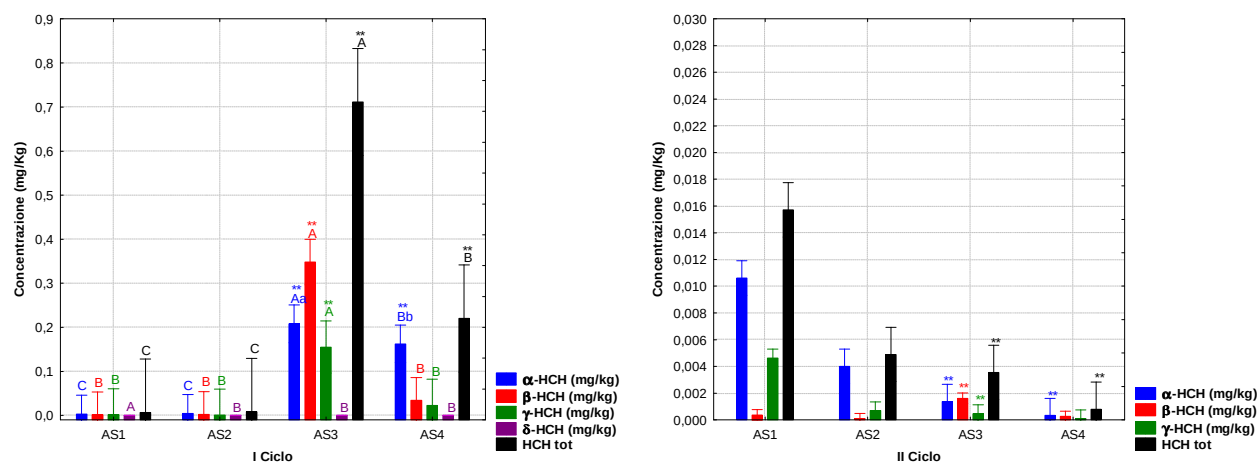


Figura 13. Distribuzione degli isomeri HCH nel I ciclo di campionamento nei siti dell'azienda A (grafico di sinistra).

Distribuzione degli isomeri HCH nel II ciclo di campionamento nei siti dell'azienda A (grafico di destra).

^{A,B,C} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ per ciascun isomero tra siti diversi entro lo stesso ciclo;

^{**} $p < 0.01$ per ciascun isomero per uno stesso sito tra cicli diversi.

I dati elaborati hanno mostrato una diminuzione del livello di contaminazione nei siti AS3 e AS4 nel secondo ciclo di campionamento, con differenze significative ($p < 0.01$) tra i due cicli nel sito AS3 per gli isomeri α , β , γ e per il contenuto di HCH-totale; nel sito AS4 per il contenuto di α e HCH-totale. I siti AS1 e AS2, invece, hanno confermato nel secondo ciclo un livello di contaminazione al di sotto di 0.01 mg/Kg, ad eccezione dell' α -HCH e dell'HCH-totale nel sito AS1 interdetto. I cambiamenti nei livelli di contaminazione, osservati in particolar modo per AS3 ed AS4, potrebbero essere stati determinati da vari processi verificatisi nella matrice presa in considerazione. Il suolo, infatti, è un compartimento ambientale particolarmente dinamico sia al suo interno (composizione, pH, pedofauna, umidità) che

all'interfaccia con l'esterno (per effetto della temperatura, delle piogge e del vento) ed è soggetto ad una serie di variabili che agiscono in sinergia contribuendo ad una modificazione del livello di contaminazione. Di conseguenza, la diminuzione della concentrazione degli isomeri dell'HCH nei siti **AS3** ed **AS4** potrebbe essere stata determinata dall'azione di componenti biotiche ed abiotiche che, interagendo con le specifiche caratteristiche chimico-fisiche dei diversi isomeri, potrebbe aver favorito processi di trasporto, degradazione e volatilizzazione. Infatti, nonostante la loro scarsa motilità e volatilità, numerosi studi riportano come, ad esempio, un aumento del contenuto di umidità del terreno sia in grado di influenzare positivamente la volatilizzazione degli isomeri dell'HCH sia dalla superficie del suolo che all'interno del suolo stesso, favorendo effetti capillari attraverso i quali i contaminanti più solubili (γ e δ -HCH) sarebbero in grado di lasciare la superficie del suolo più velocemente e contaminanti più volatili (α e β -HCH) potrebbero scomparire più rapidamente.¹¹⁴ Altri studi, riportano, invece, come un aumento della temperatura potrebbe diminuire fortemente il legame degli isomeri α , γ e δ -HCH alla frazione organica del terreno, favorendone la loro volatilizzazione.¹¹⁵ Inoltre, come già ampiamente discusso nella parte introduttiva, è nota la capacità di numerosi microrganismi del terreno di utilizzare come unica fonte di carbonio gli isomeri α , β , γ e δ , metabolizzandoli completamente¹¹⁶ o promuovendo reazioni di isomerizzazione, come quella del γ in α e del β in α , γ o δ -HCH,^{117,118} in grado di modificare sia la relativa concentrazione di ciascun isomero ma anche la struttura chimica e la polarità, determinandone ancora una volta un aumento o una diminuzione della solubilità, volatilità e capacità di assorbimento al terreno. Inoltre, è ben nota la capacità di alcune specie vegetali di veicolare contaminanti dal suolo ad organi e tessuti vegetali (radici, fusti e foglie).¹¹⁹

I grafici mostrati in *Figura 14* mettono in relazione tutte le variabili considerate con il fattore “profondità di campionamento”.

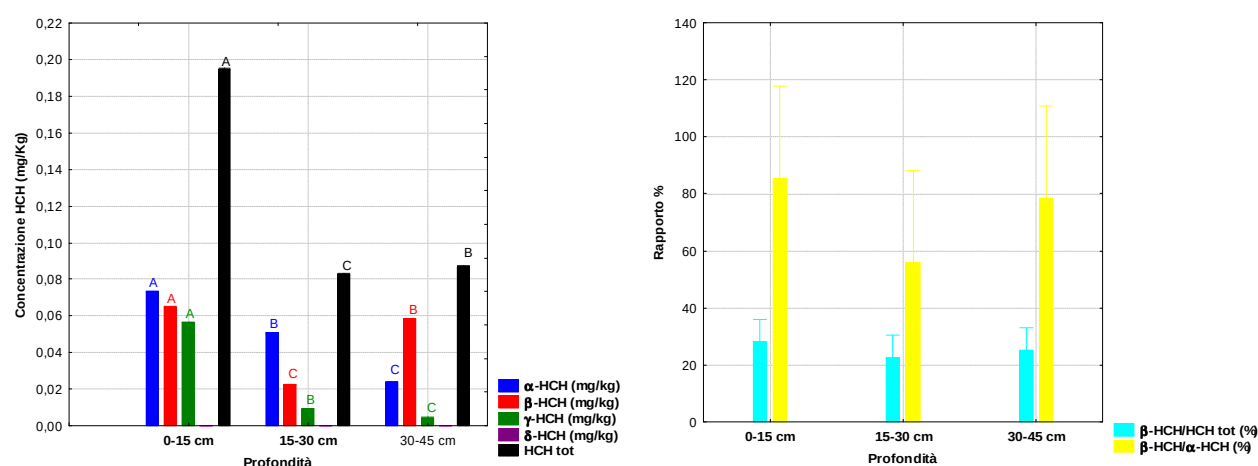


Figura 14. Distribuzione degli isomeri HCH rispetto al fattore “profondità di campionamento” nell’azienda **A** (grafico di sinistra).

^{A,B,C} $p < 0.01$ tra le diverse profondità per ciascun isomero.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra le diverse profondità di campionamento nell’azienda **A** (grafico di destra).

Come si può osservare dal grafico di sinistra, la concentrazione di ciascun isomero è risultata diminuita significativamente con l'aumentare della profondità ($p < 0.01$); mentre non sono state osservate variazioni significative tra le tre profondità nel rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e α -HCH/ β -HCH. Questa diretta proporzionalità tra la diminuzione del livello di contaminazione e l'aumento della profondità potrebbe essere dovuta alla capacità degli isomeri in oggetto di legarsi alla sostanza organica presente nel suolo, più abbondante nei primi 10-15 cm del profilo dove si accumulano maggiormente i residui vegetali e gli ammendanti organici, diminuendo fortemente la loro mobilità. Tale aspetto potrebbe rappresentare un vantaggio in termini di controllo dell'inquinamento ambientale perché permetterebbe di bloccare la diffusione di questi inquinanti, impedendo la contaminazione degli strati più profondi e delle falde acquifere. Nonostante tale aspetto, sono noti fenomeni di mobilità lungo il profilo del suolo fino al raggiungimento degli strati più profondi ciò anche in relazione alle lavorazioni agricole del terreno (aratura profonda, rippatura).¹²⁰

La Figura 15 scende maggiormente nel dettaglio, mettendo in relazione le variabili alle tre profondità a seconda del ciclo di campionamento. Mentre nel secondo ciclo non viene osservata nessuna differenza significativa tra le tre profondità, probabilmente a causa della diminuzione del livello di contaminazione, il grafico di sinistra, riferito al primo ciclo di campionamento, mostra una diminuzione della concentrazione degli isomeri α , β e γ in relazione all'aumento della profondità. Tuttavia, variazioni significative ($p < 0.05$) sono state osservate solo per l'isomero α tra la prima (0-15 cm) e la terza profondità (30-45 cm); per il β tra la prima e le altre due profondità di campionamento. L'analisi del livello di contaminazione nei diversi siti in rapporto alla profondità ha evidenziato differenze significative tra il primo ed il secondo strato di suolo campionato per l'isomero α ($p < 0.05$), l'isomero γ ($p < 0.01$) e per il contenuto di HCH-totale ($p < 0.01$) nel sito **AS3** e tra la prima e la terza profondità per l' α -HCH ($p < 0.05$) nel sito **AS4** come confermato in Figura 16.

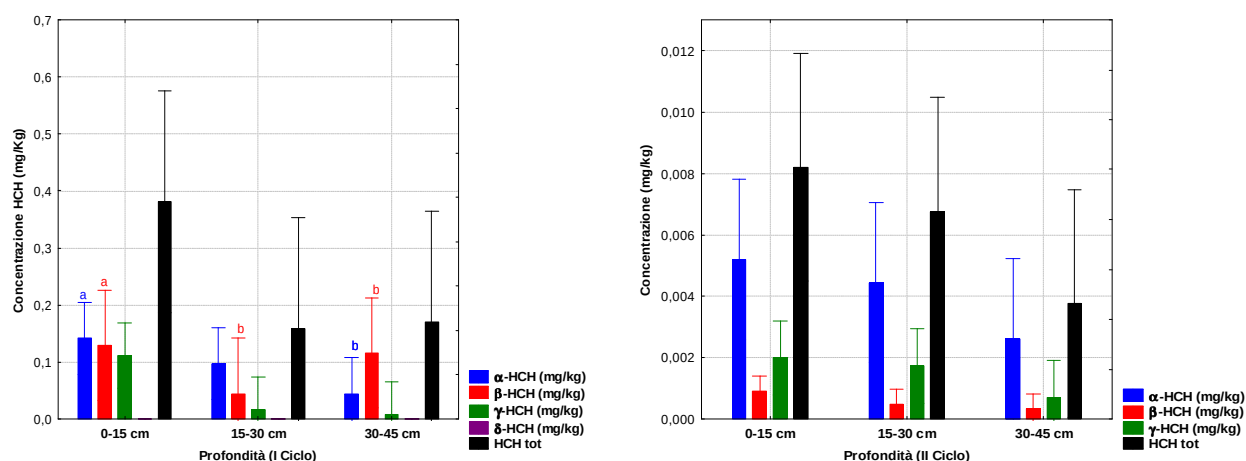


Figura 15. Distribuzione degli isomeri HCH nel I Ciclo in rapporto alla profondità, nell'azienda A (grafico di sinistra).

Distribuzione degli isomeri HCH nel II Ciclo in rapporto alla profondità, nell'azienda A (grafico di destra).

^{a,b,c} $p < 0.05$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso ciclo.

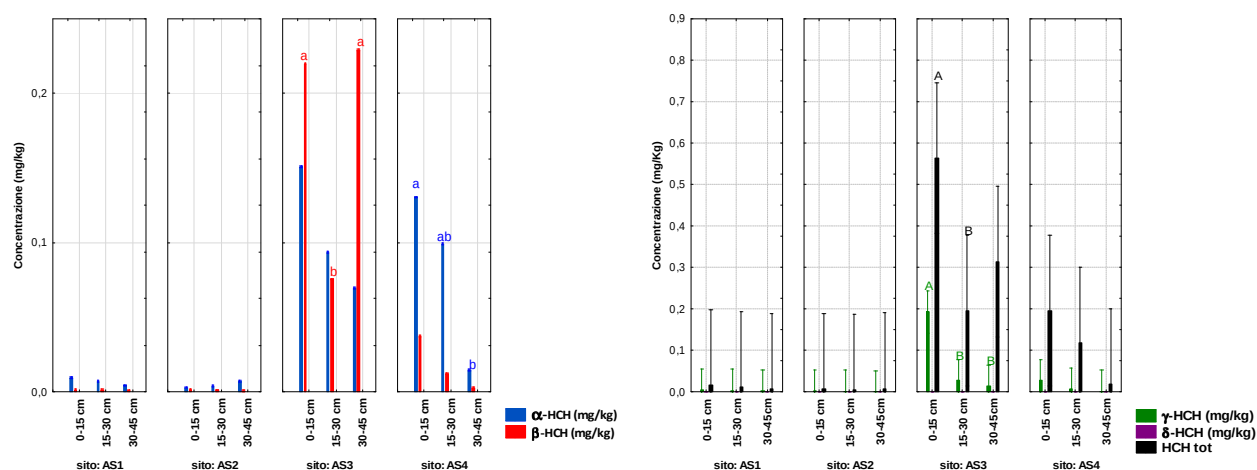


Figura 16. Distribuzione degli isomeri HCH in base alla profondità in ciascun sito dell'azienda **A**.
^{A,B} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro ogni sito.

Azienda **B**. Per l'azienda **B** sono stati campionati 4 siti, 2 interdetti (**BS1**, **BS3**) e 2 non interdetti (**BS2**, **BS4**), la cui localizzazione è mostrata in Figura 17.



Figura 17. Collocazione spaziale nei siti campionati nell'azienda **B** rispetto al tracciato del fiume Sacco.

Anche i dati ottenuti dall'analisi di questi campioni, mostrati in Tabella 3, sono stati sottoposti ad una serie di elaborazioni statistiche per comprenderne al meglio l'andamento e gli eventuali cambiamenti verificatisi tra un ciclo di campionamento e l'altro. I grafici mostrati in Figura 18 ci permettono di visualizzare lo stato di contaminazione del suolo di questa azienda, mettendo in relazione il livello di contaminazione da HCH riscontrato nei due cicli di campionamento.

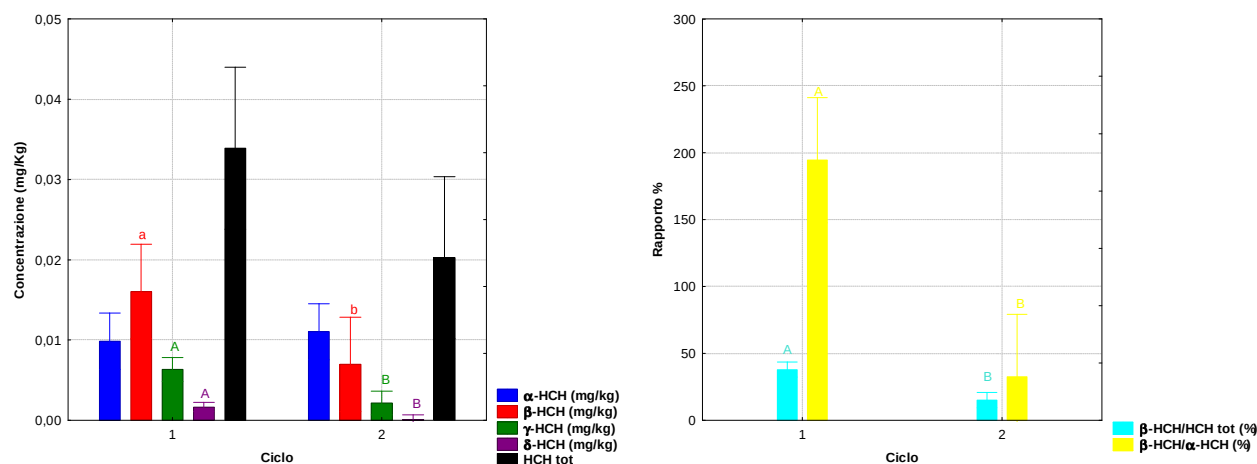


Figura 18. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nei due cicli di campionamento per l'azienda **B** (grafico di sinistra).
 $_{A,B} p < 0.01$ $_{a,b} p < 0.05$ per uno stesso isomero tra cicli diversi.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH totale e β -HCH/ α -HCH nei due cicli di campionamento per l'azienda **B** (grafico di destra).

$_{A,B} p < 0.01$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra cicli diversi.

Il grafico di sinistra, pur confermando la presenza dei 4 isomeri in entrambi i cicli, ha evidenziato una diminuzione significativa del livello di contaminazione per il β ($p < 0.05$), il γ ed il δ -HCH ($p < 0.01$). Tale andamento è stato confermato anche nel grafico di destra in cui viene mostrato i rapporti percentuali β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH. Questi valori, infatti, risultano essere significativamente diminuiti ($p < 0.01$) tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento, a causa di una diminuzione della concentrazione dell'isomero β . La Figura 19 scende maggiormente nel dettaglio mettendo in relazione le variabili di interesse, riscontrate nell'azienda B, rispetto ai fattori "ciclo di campionamento" e "sito".

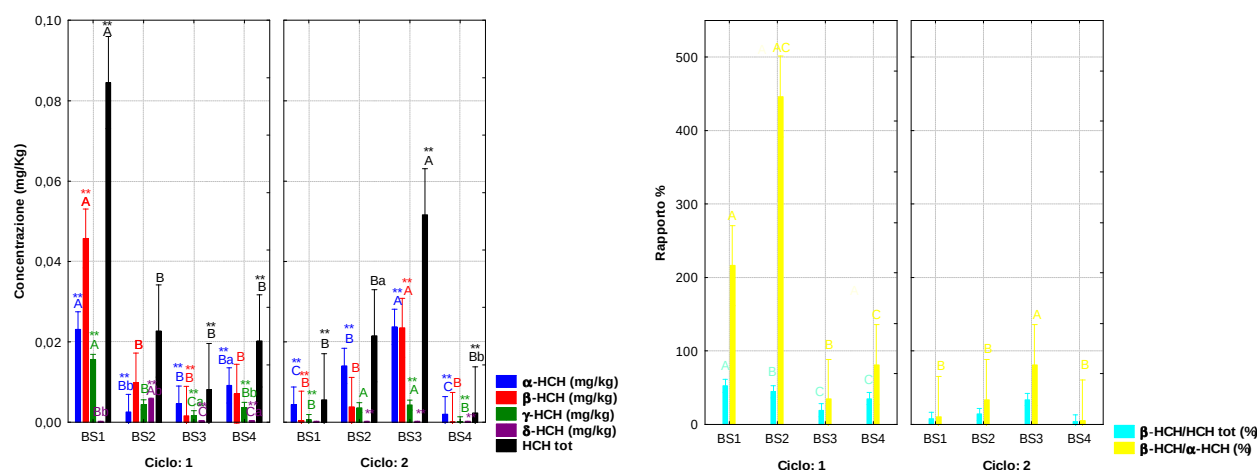


Figura 19. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nel I e nel II ciclo di campionamento, nei siti dell'azienda **B** (grafico di sinistra).

$_{A,B,C} p < 0.01$ $_{a,b} p < 0.05$ per ciascun isomero tra siti diversi entro lo stesso ciclo.

$_{**} p < 0.01$ tra ciascun isomero per uno stesso sito tra cicli diversi.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH per ogni sito dell'azienda **B** (grafico di destra).

$_{A,B,C} p < 0.01$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra siti diversi entro lo stesso ciclo.

Analizzando la situazione all'interno dello stesso ciclo di campionamento, cambiamenti significativi sono stati individuati per gli isomeri α , β , γ e δ -HCH tra 4 siti. In particolare, nel primo ciclo, il sito **BS1** (interdetto) è quello che ha mostrato livelli di contaminazione maggiori con elevate concentrazioni di β -HCH. Nei siti **BS2**, **BS3** e **BS4**, invece, sono stati individuati livelli rilevabili per gli isomeri α , β , γ e δ -HCH, anche se al limite o al di sotto di 0.01 mg/Kg. La situazione appena descritta è stata riscontrata anche dall'analisi del rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale in cui sono state osservate differenze significative ($p < 0.01$) per i vari siti dell'azienda **B**, con valori più elevati, come atteso, nel sito **BS1**. Nel secondo ciclo di campionamento, invece, il livello di contaminazione più elevato è stato osservato nel sito interdetto **BS3**, in particolare per gli isomeri α e β . Anche in questo caso, il rapporto percentuale β -HCH/ α -HCH mostra differenze significative ($p < 0.01$) con un notevole aumento nel sito **BS3**. Oltre che all'interno dello stesso ciclo, anche la comparazione dei siti tra cicli diversi ha mostrato cambiamenti significativi ($p < 0.01$). In particolare, è stata osservata una diminuzione della concentrazione degli isomeri α , β , e γ nel sito **BS1**; α e δ nel sito **BS2**; α , γ e δ nel sito **BS4**. Il sito **BS3**, al contrario, ha evidenziato un aumento nel livello di contaminazione per gli isomeri α , β , e γ . Questo cambiamento verificatosi per il sito **BS3**, che, tra tutti, è quello più vicino al fiume Sacco, potrebbe essere attribuito a fenomeni di esondazione avvenuti tra i due cicli di campionamento. La *Figura 20*, invece, mette in relazione l'andamento della contaminazione dei diversi isomeri dell'HCH in base alla profondità di campionamento in ciascun ciclo.

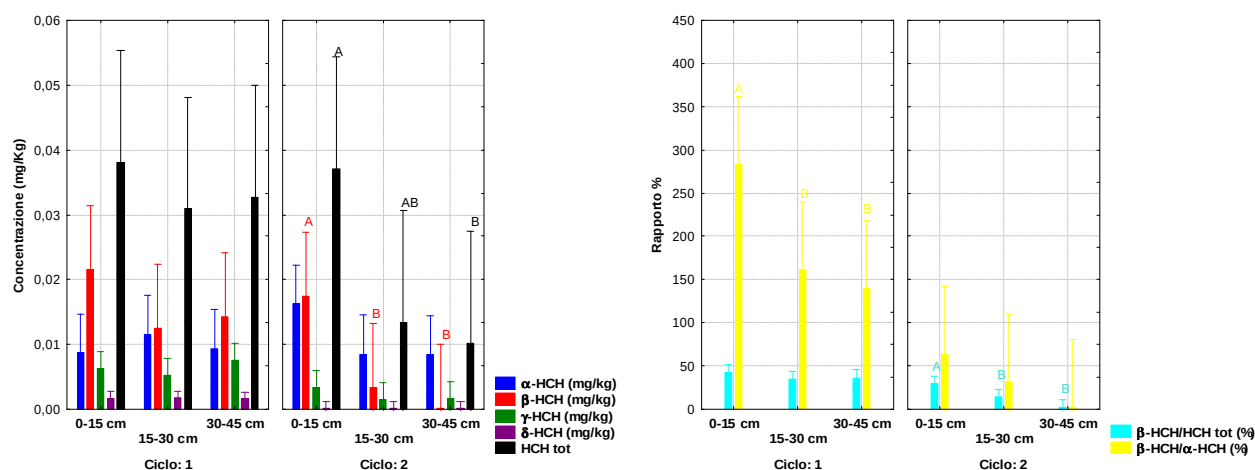


Figura 20. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nel I e nel II ciclo di campionamento in rapporto alla profondità nell'azienda **B** (grafico di sinistra).

^{A,B} $p < 0.01$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso ciclo.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH in rapporto alla profondità nell'azienda **B** (grafico di destra).

^{A,B} $p < 0.01$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra le diverse profondità entro lo stesso ciclo.

In questo caso, differenze statisticamente significative sono state riscontrate per l'isomero β , per il contenuto totale di HCH e per il rapporto percentuale del β -HCH/HCH-totale nel secondo ciclo di

campionamento tra la prima e le altre profondità; nel primo ciclo di campionamento per il rapporto percentuale β -HCH/ α -HCH tra la prima e le altre due profondità. La non significativa diretta proporzionalità tra la diminuzione del livello di contaminazione e la profondità riscontrata per l'azienda **B** e successivamente per altre aziende potrebbe essere attribuita ad una diminuzione della sostanza organica che potrebbe comportare un conseguente aumento della mobilità degli HCH, i quali a causa della loro discreta solubilità in acqua potrebbero percolare negli strati più profondi.

Un'analisi più dettagliata, mostrata in *Figura 21*, ha permesso di osservare che la distribuzione dei diversi isomeri in rapporto alla profondità all'interno di ciascun sito campionato, è risultata essere significativa soltanto per il sito **BS3** che ha mostrato un aumento del livello di contaminazione nel secondo ciclo di campionamento per gli isomeri α e β e per l'HCH-totale.

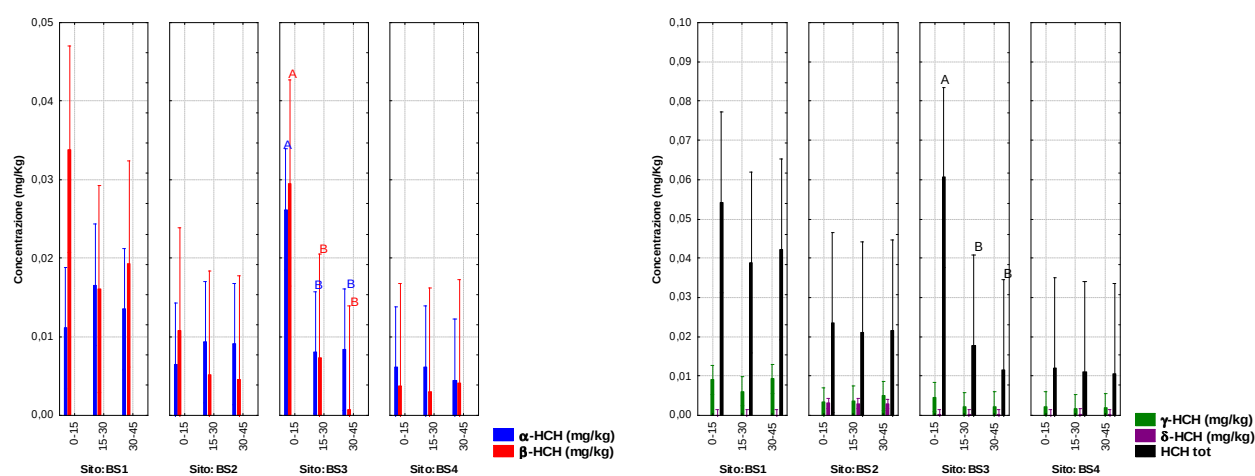


Figura 21. Distribuzione degli isomeri HCH alla tre profondità nei diversi siti dell'azienda **B**.

^{A,B} $p < 0.01$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso sito.

Azienda C. I 4 siti campionati per l'azienda C sono mostrati in *Figura 22*. In questo caso C1 e C5 sono in zone interdette; C2 e C4 in quelle non interdette.

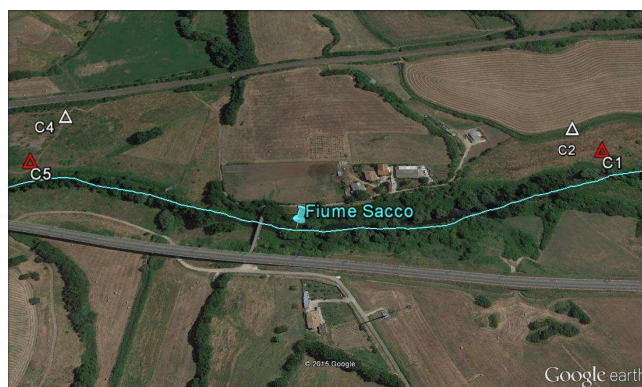


Figura 22. Localizzazione spaziale dei siti campionati nell'azienda C rispetto al tracciato del fiume Sacco.

I dati analitici ottenuti al GC-ECD per questa azienda, riportati in *Tabella 3*, hanno mostrato una situazione diversa tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento. Come riportato in *Figura 23*, il livello di contaminazione di ogni singolo isomero è risultato essere significativamente diminuito ($p < 0.01$) nel secondo ciclo di campionamento anche se i risultati ottenuti nel primo, per tutti gli isomeri dell'HCH si sono mantenuti al di sotto (α e δ) o leggermente al di sopra (β e γ) di 0.01 mg/Kg. Il contenuto di HCH-totale, invece, come mostrato, è risultato essere particolarmente elevato nel primo ciclo, così come anche i rapporti percentuali β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH.

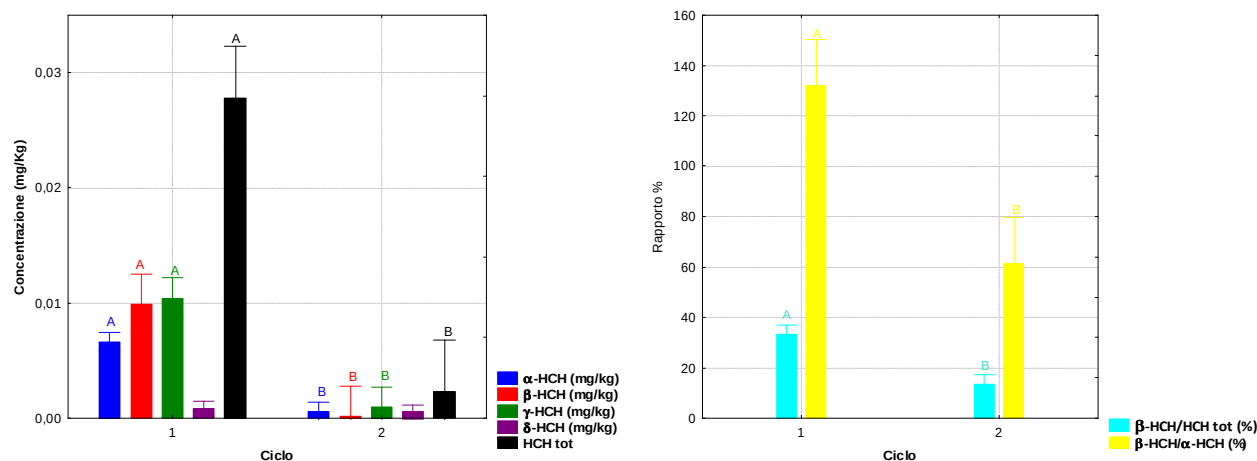


Figura 23. Distribuzione degli isomeri α , β , e γ e δ -HCH nel I e nel II ciclo nell'azienda C (sinistra).

^{A,B} $p < 0.01$ per ciascun isomero tra cicli diversi.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH totale e β -HCH/ α -HCH nel I e nel II ciclo di campionamento nell'azienda C (destra).

^{A,B} $p < 0.01$ rapporto β -HCH/HCH totale e β -HCH/ α -HCH tra cicli diversi.

La *Figura 24* riporta un'analisi più dettagliata della contaminazione nei vari siti mettendo in relazione il livello di contaminazione sia all'interno dello stesso ciclo che tra cicli diversi.

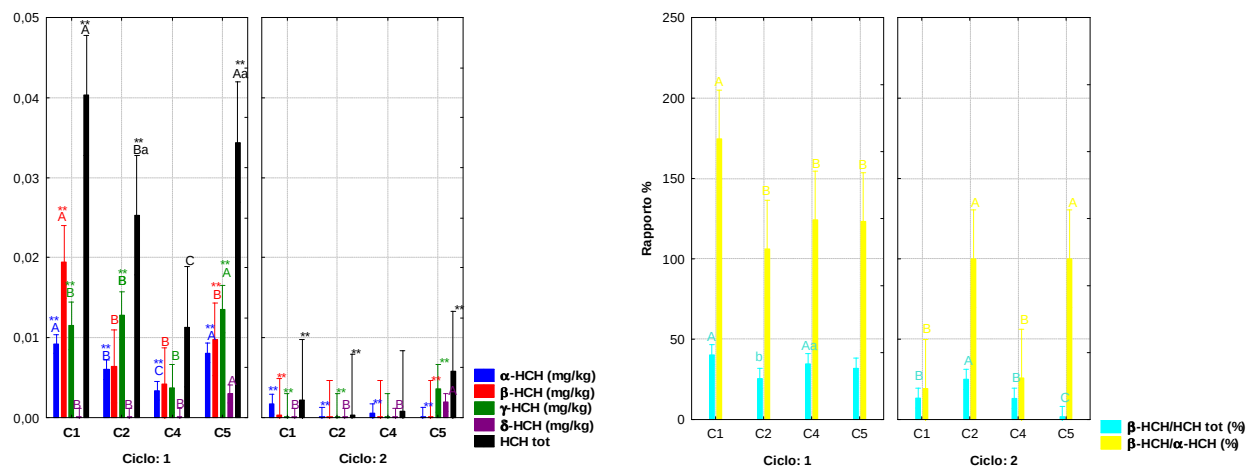


Figura 24. Distribuzione degli isomeri HCH nel I e II ciclo di campionamento, nei siti dell'azienda C (grafico di sinistra).

^{A,B,C} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ per ciascun isomero tra siti diversi entro lo stesso ciclo;

^{**} $p < 0.01$ tra ciascun isomero per uno stesso sito tra cicli diversi.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH per ogni sito dell'azienda C (grafico di destra).

^{A,B} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra siti diversi entro lo stesso ciclo.

Nel primo ciclo sono state osservate differenze significative ($p < 0.01$) per gli isomeri α , β , γ e δ nei 4 siti campionati con il livello più elevato di contaminazione per i siti interdetti **C1** e **C5**. In particolare, il sito **C1** ha mostrato un'elevata concentrazione di β -HCH, come osservabile anche dal rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH con differenze significative rispetto a tutti gli altri siti. Nel sito **C5**, invece, valori rilevabili sono stati riscontrati per tutti gli HCH con livelli relativi all'isomero γ al di sopra di 0.01 mg/Kg. Non trascurabili, inoltre, sono risultati i valori ottenuti per il sito **C2** (non interdetto) in particolar modo per l'isomero γ . Tale sito non risulta essere particolarmente lontano dal sito interdetto **C1** situato a sua volta a ridosso del fiume Sacco. Nel secondo ciclo, invece, non sono state osservate differenze significative per i vari isomeri nei diversi siti, ad eccezione dell'isomero δ del sito **C5**. Mettendo in relazione i dati ottenuti nei due cicli di campionamento, è stato osservato un notevole cambiamento tra il primo ed il secondo con una variazione significativa del livello di contaminazione nei siti **C1**, **C2** e **C5** per tutti gli isomeri dell'HCH. Questa notevole diminuzione della contaminazione, in particolare nei siti **C1** e **C5**, potrebbe essere determinata, come già spiegato per l'azienda **A**, dalle numerose dinamiche che possono interessare la matrice suolo e coinvolgere questi contaminanti. L'analisi del livello di contaminazione in funzione del fattore "profondità" (evidenziata in Figura 25) ha mostrato, relativamente al primo ciclo di campionamento, un decremento significativo passando dalla prima alle altre due profondità di suolo ($p < 0.05$) per tutti gli isomeri dell'HCH.

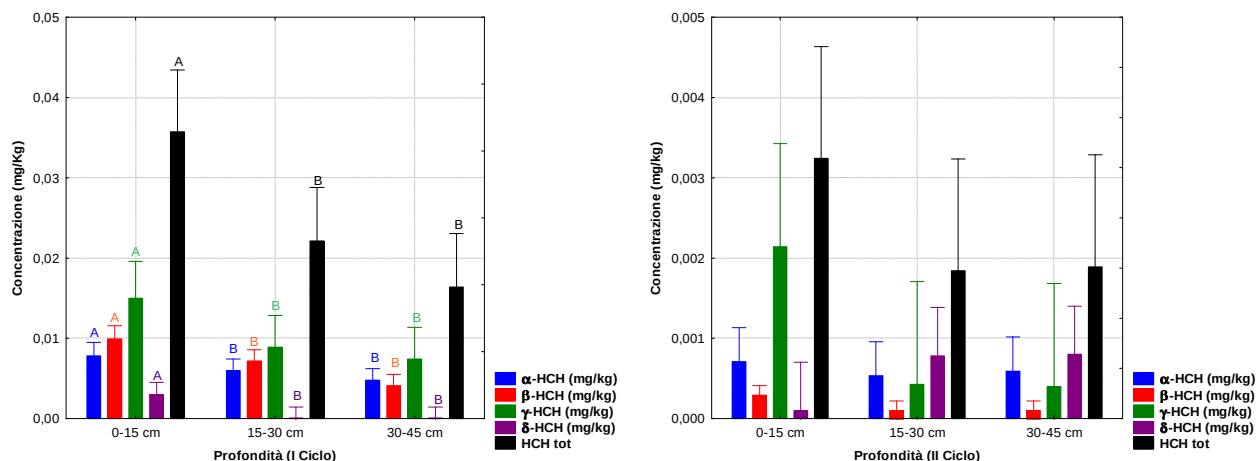


Figura 25. Distribuzione degli isomeri α , β e γ e δ -HCH in funzione della profondità di campionamento, nel I ciclo (grafico di sinistra) e II ciclo (grafico di destra) per l'azienda C.
^{A,B} $p < 0.01$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso ciclo.

Nel secondo ciclo, invece, i livelli riscontrati per ciascun isomero sono risultati per la maggior parte al di sotto del limite di determinazione; gli unici valori di concentrazione sono stati rilevati per l' α -HCH nei siti C1 e C4, per il β nel sito C1 e per il γ -HCH nel sito C5; tuttavia, sono troppo vicini tra di loro da rendere il rapporto aumento della profondità/diminuzione della concentrazione di isomero statisticamente significativo.

La Figura 26 fornisce dei dati più dettagliati sul comportamento dei 4 isomeri nei diversi siti, in funzione della profondità. In entrambi i grafici è osservabile, per tutti i siti dell'azienda C, una relazione significativa tra il livello di contaminazione dei 4 isomeri dell'HCH e la profondità di campionamento. Tale contributo è attribuibile soprattutto all'andamento dei dati ottenuti nei campioni derivanti dal primo ciclo di campionamento. In particolare, nei siti C1, C2 e C4 per gli isomeri α , β e per l'HCH-totale all'aumentare della profondità, è diminuito il valore di concentrazione; aspetto non riscontrabile, invece, per il sito C5 per l' α , il γ -HCH e il contenuto di HCH-totale.

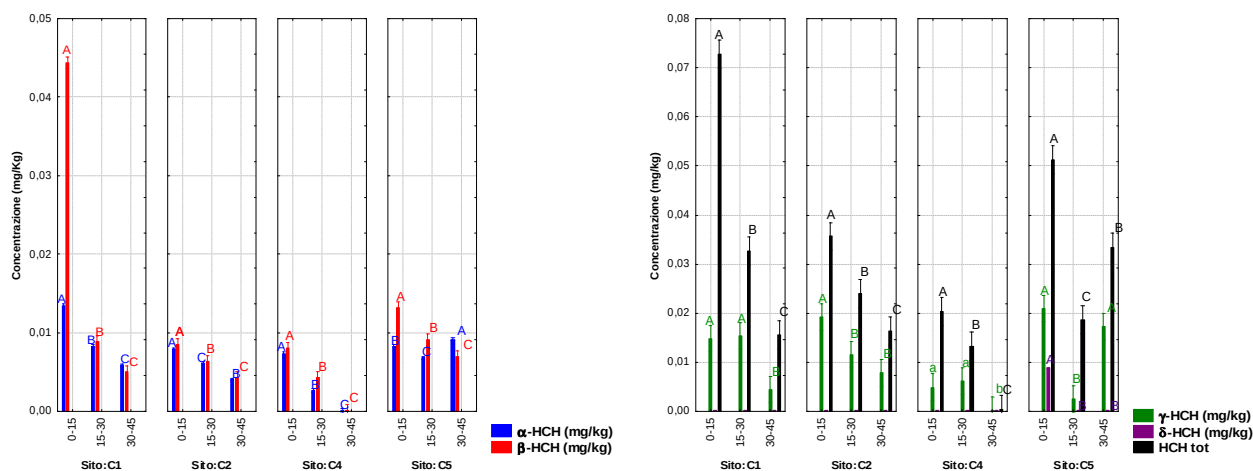


Figura 26. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ per ogni profondità di campionamento in ciascun sito dell'azienda C.
^{A,B,C} $p < 0.01$ ^{a,b,c} $p < 0.05$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso sito.

Azienda **H**. I 2 siti interdetti (**H2** e **H4**) e i 2 non interdetti (**H1** e **H3**) campionati per l'azienda **H** sono mostrati in *Figura 27*.



Figura 27. Localizzazione spaziale dei siti campionati nell'azienda **H** rispetto al tracciato del fiume Sacco.

Come per l'azienda **C**, anche i dati ottenuti per l'azienda **H** riportati in *Tabella 4* hanno mostrato ad una prima analisi un cambiamento nel livello di contaminazione tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento come riportato in *Figura 28*. Cambiamenti significativi ($p < 0.01$) sono stati osservati per l' α e il γ -HCH e il conseguente contenuto di HCH-totale con un aumento della concentrazione di tali pesticidi nel secondo ciclo. Questo aspetto è stato confermato anche dall'andamento significativo del rapporto percentuale β -HCH/ α -HCH.

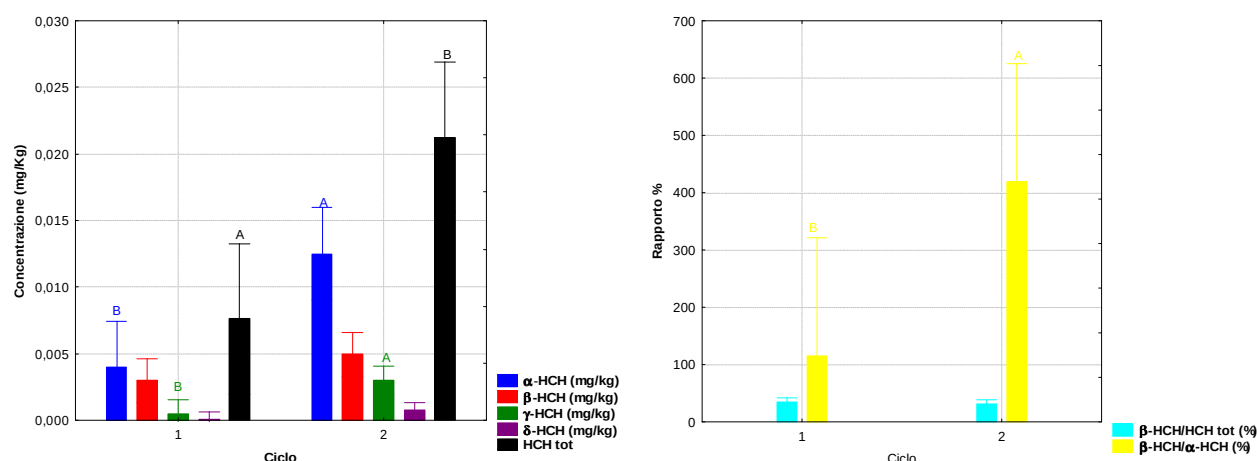


Figura 28. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nei due cicli di campionamento per l'azienda **H** (grafico di sinistra).
^{A,B} $p < 0.01$ per ciascun isomero tra i due cicli.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH nei due cicli di campionamento per l'azienda **H** (grafico di destra).

^{A,B} $p < 0.01$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra i due cicli.

I grafici riportati in *Figura 29* permettono di comprendere quali siano le principali differenze riscontrate per i diversi isomeri dell'HCH, nei siti campionati. Infatti, risulta evidente come il cambiamento nel livello di contaminazione osservato tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento sia imputabile principalmente ai siti **H2** ed **H4** entrambi interdetti e localizzati vicino al fiume Sacco. In

particolare, in questi siti sono state riscontrate differenze significative, tra i due cicli di campionamento, per gli isomeri α e γ e per il contenuto di HCH-totale con un notevole aumento della loro concentrazione nei campioni derivanti dal secondo ciclo di monitoraggio; il β -HCH, al contrario, non ha mostrato variazioni significative nei livelli di contaminazione se non all'interno dello stesso ciclo di campionamento dove si è confermato essere presente maggiormente nei siti **H2** ed **H4** interdetti. I siti **H1** ed **H3** non interdetti, invece, hanno presentato valori al di sotto del limite di determinazione per i 4 isomeri analizzati, in entrambi i cicli di campionamento, ad eccezione del β -HCH nel sito **H3** che ha mostrato una concentrazione più elevata nel secondo ciclo. L'aumento dei livelli di contaminazione nei siti interdetti **H2** ed **H4** potrebbe essere stato determinato, anche in questo caso, da fenomeni di esondazione del fiume, le cui acque avrebbero potuto facilmente raggiungere queste aree più vicine alle sue rive.

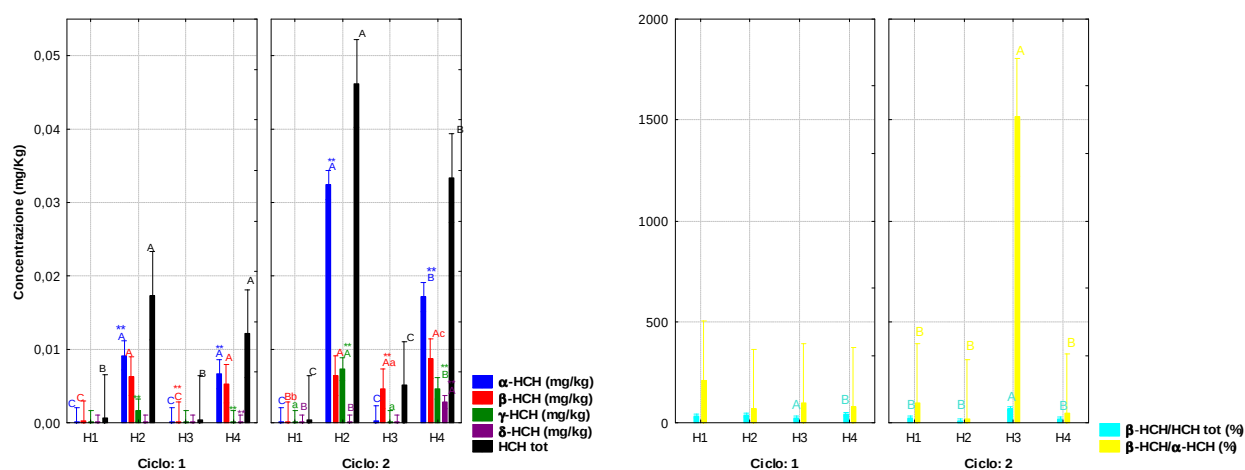


Figura 29. Distribuzione degli isomeri HCH nel I e II ciclo di campionamento nei siti dell'azienda **H** (grafico di sinistra).

A,B,C $p < 0.01$, a,b,c $p < 0.05$ per ciascun isomero tra siti diversi entro lo stesso ciclo;

** $p < 0.01$ tra ciascun isomero in uno stesso sito tra cicli diversi.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH per ogni sito dell'azienda **H** (grafico di destra).

A,B,C $p < 0.01$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH per ogni sito entro ciascun ciclo.

Le Figure 30 e 31 ci permettono di comprendere al meglio la distribuzione dei 4 isomeri in rapporto alle 3 diverse profondità di campionamento. Come mostrato in Figura 30, nel primo ciclo non è stata riscontrata una differenza significativa nella concentrazione dei diversi isomeri alle diverse profondità, cosa che invece è stata osservata nel secondo ciclo per gli isomeri β , γ e δ . In questo caso, infatti, la concentrazione dell'isomero β è diminuita in modo progressivo passando dalla prima alla terza profondità di campionamento del suolo; mentre per gli isomeri γ e δ la differenza di concentrazione è risultata essere significativa soltanto tra il primo ed il terzo livello di campionamento. Anche i rapporti percentuali β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH hanno presentato variazioni significative soltanto nel secondo ciclo, in particolare rispetto alla terza profondità.

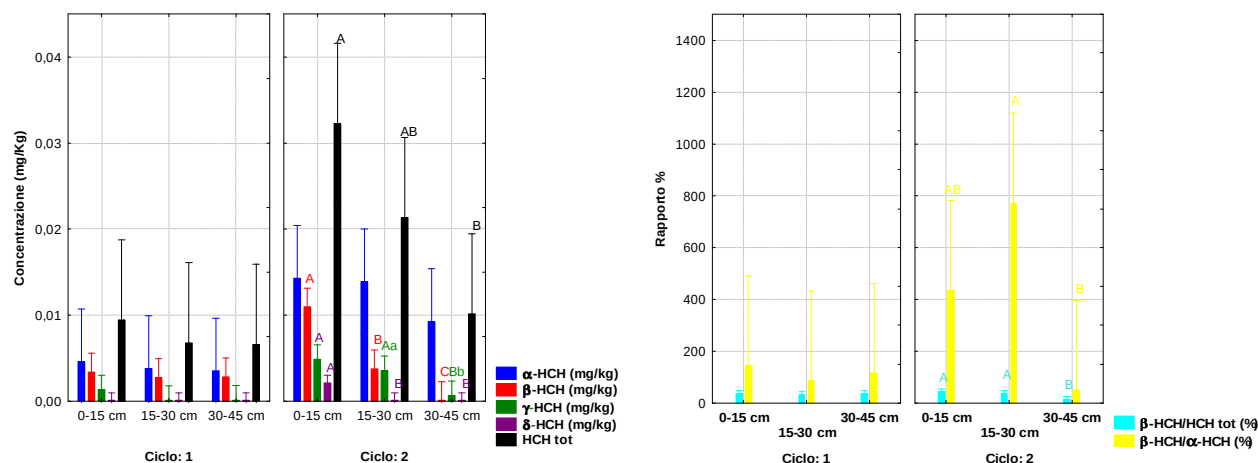


Figura 30. Distribuzione degli isomeri HCH nel I e II ciclo in rapporto alla profondità nell'azienda **H** (grafico di sinistra).

^{A,B} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso ciclo.

Rapporto percentuale β-HCH/HCH-totale e β-HCH/α-HCH per ogni ciclo nell'azienda **H** (grafico di destra).

^{A,B} $p < 0.01$ β-HCH/HCH-totale e β-HCH/α-HCH tra le diverse profondità entro uno stesso ciclo.

L'andamento di ciascun isomero per ogni sito, alle 3 diverse profondità (come mostrato in *Figura 31*), ha evidenziato nuovamente differenze significative nel sito **H3** per l'isomero γ e l'HCH-totale; nel sito **H4** per l'isomero δ e l'HCH-totale.

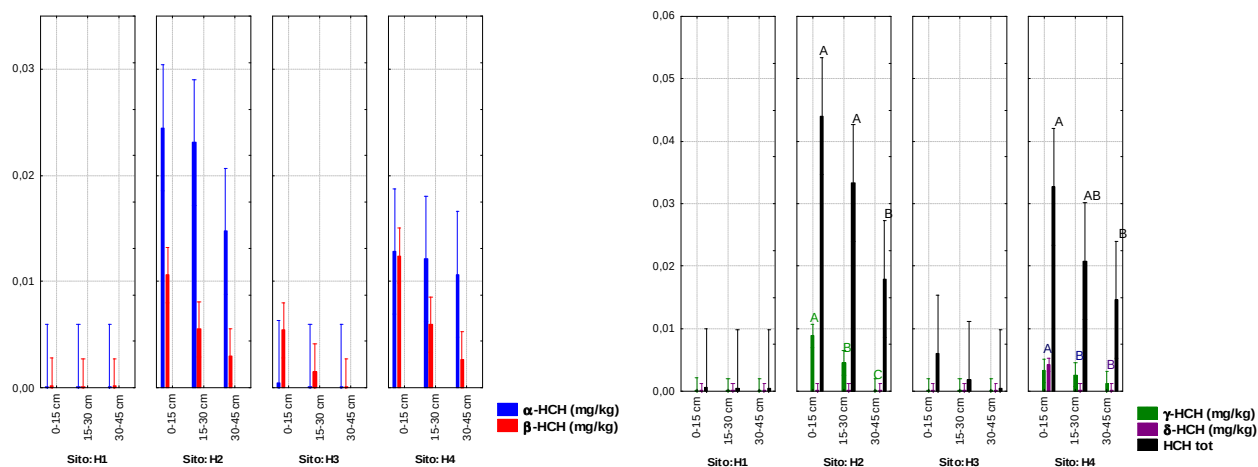


Figura 31. Distribuzione degli isomeri α, β, γ e δ per ogni profondità di campionamento in ciascun sito dell'azienda **H**.

^{A,B,C} $p < 0.01$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso sito.

Azienda **M**. Per l'azienda **M** sono stati campionati soltanto 3 siti, **M1** interdetto; **M2**, **M3** non interdetti (Figura 32), in quanto non aveva ulteriori appezzamenti nell'area di studio.



Figura 32. Localizzazione spaziale dei siti campionati nell'azienda **M** rispetto al tracciato del fiume Sacco.

I risultati ottenuti per questi siti sono stati elaborati e riportati nelle Figure 33-35. I grafici di Figura 33 mostrano una situazione sostanzialmente invariata per gli isomeri α e β e per il contenuto di HCH-totale tra i due cicli di campionamento.

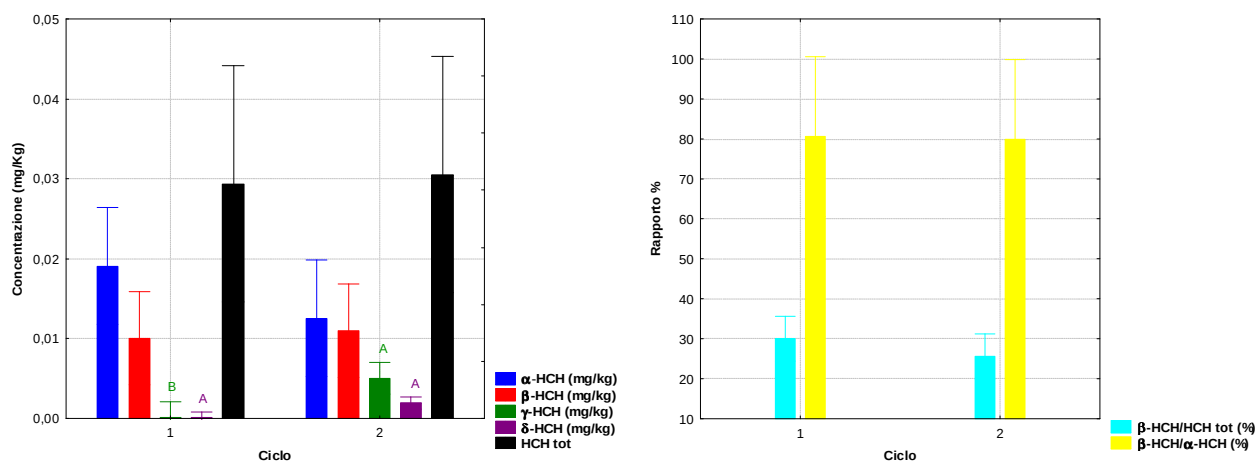


Figura 33. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nei due cicli di campionamento per l'azienda **M** (grafico di sinistra).

^{A,B} $p < 0.01$ per ciascun isomero tra i due cicli.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH tot e β -HCH/ α -HCH nei due diversi cicli di campionamento per l'azienda **M** (grafico di destra).

Differenze significative, invece, sono state rilevate per gli isomeri γ e δ anche se tali valori si sono comunque mantenuti al di sotto di 0.01 mg/Kg. Anche il grafico di destra mostra valori significativamente non rilevanti per i rapporti β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH. L'analisi della distribuzione degli isomeri nei diversi siti ha confermato il livello di contaminazione più elevato per il sito **M1** (interdetto) in entrambi i cicli, con differenze significative ($p < 0.01$) per gli isomeri α , β e per l'HCH-totale nel primo

ciclo; per gli isomeri α , β , γ , δ e per l'HCH-totale nel secondo ciclo di campionamento rispetto ai siti **M2** ed **M3** (Figura 34).

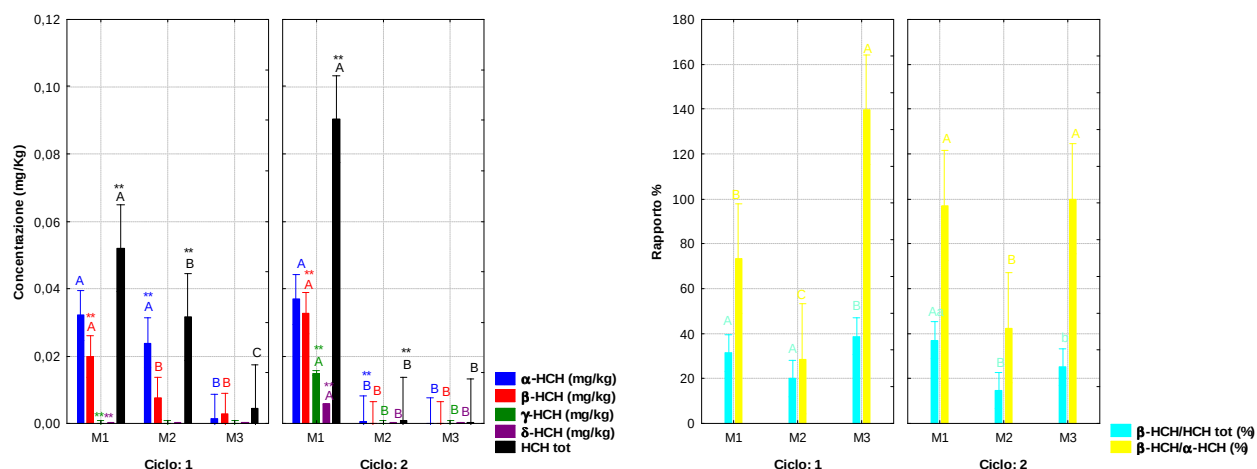


Figura 34. Distribuzione degli isomeri HCH nel I e II ciclo di campionamento, nei siti dell'azienda **M** (grafico di sinistra).

^{A,B,C} $p < 0.01$ per ciascun isomero tra siti diversi entro il ciclo;

^{**} $p < 0.05$ tra ciascun isomero per uno stesso sito in cicli diversi.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH per ogni sito dell'azienda **M** (grafico di destra).

^{A,B} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra i siti diversi entro uno stesso ciclo.

Analizzando il rapporto dei diversi isomeri nello stesso sito ma in diversi cicli di campionamento, si è riscontrato un aumento significativo ($p < 0.01$) della contaminazione in **M1** per gli isomeri β , γ e δ ; è stata, invece, osservata una diminuzione della contaminazione in **M2**, in particolare per l' α -HCH. Anche i rapporti β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH hanno rivelato variazioni significative tra i diversi siti all'interno dei due cicli di campionamento. L'analisi dell'andamento dei diversi isomeri in funzione della profondità nei due diversi cicli (Figura 35) ha mostrato nel primo ciclo di campionamento una diminuzione significativa degli isomeri α , β e dell'HCH-totale tra la prima e la terza profondità; analogamente per i rapporti β -HCH/HCH totale e β -HCH/ α -HCH tra la prima e le altre due profondità di campionamento.

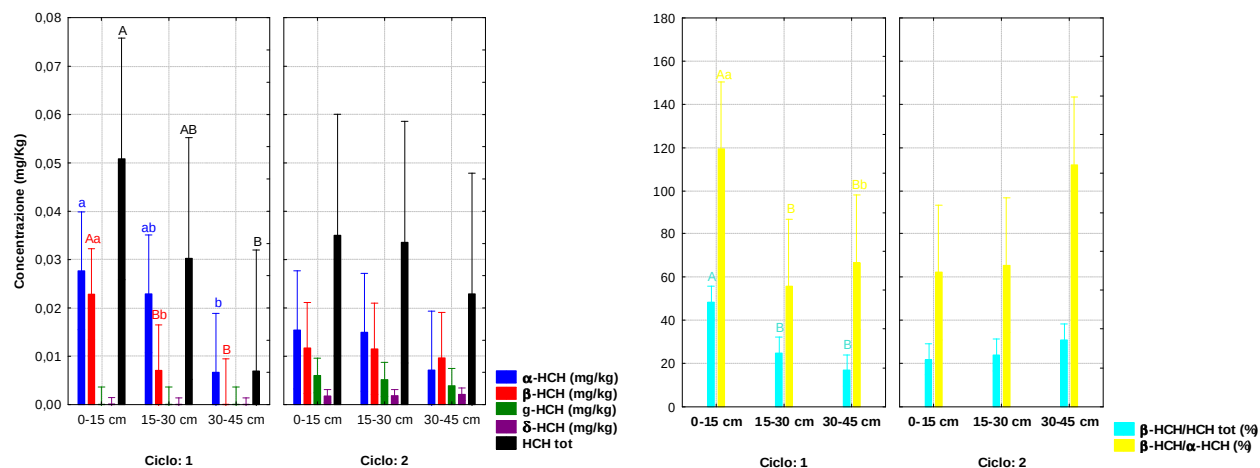


Figura 35. Distribuzione degli isomeri HCH nel I e II ciclo in rapporto alla profondità nell'azienda **M** (grafico di sinistra).

^{A,B} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso ciclo.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH per ogni ciclo nell'azienda **M** (grafico di destra).

^{A,B} $p < 0.01$ rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra le diverse profondità entro uno stesso ciclo.

L'analisi che ha preso in esame i diversi siti, illustrata in *Figura 36*, ha evidenziato una diminuzione della concentrazione degli isomeri all'aumentare della profondità di campionamento soltanto nel sito **M1**. In particolare, variazioni significative ($p < 0.01$) tra il primo ed il terzo livello di profondità sono state evidenziate per l'isomero α , mentre differenze significative tra il primo e le altre due profondità di campionamento sono state riscontrate per l'isomero β . I risultati delle analisi effettuate nell'azienda **M** hanno sembrato confermare la correlazione tra il livello di contaminazione e la vicinanza dal fiume Sacco.

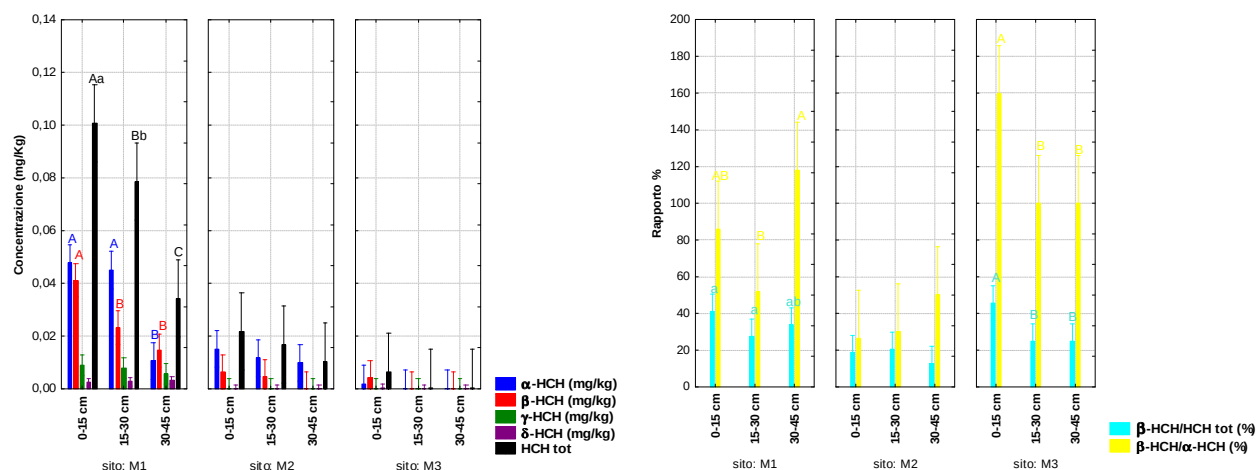


Figura 36. Distribuzione degli isomeri HCH nei siti nell'azienda **M** in rapporto alla profondità (grafico di sinistra).

^{A,B} $p < 0.01$ tra le diverse profondità per ciascun isomero entro lo stesso sito.

Rapporto percentuale β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH alle tre profondità in ogni ciclo dell'azienda **M** (grafico di destra).

^{A,B} $p < 0.01$ ^{a,b} $p < 0.05$ nel rapporto β -HCH/HCH-totale e β -HCH/ α -HCH tra le diverse profondità entro uno stesso sito.

Aziende **F**, **G**, **I**. La collocazione dei siti campionati nelle aziende **F**, **G** ed **I** è mostrata in *Figura 37*. Per l'azienda **F** è stato possibile campionare un solo sito in una zona non interdetta; per l'azienda **G** sono stati campionati 4 siti: **G1** e **G3** in zone non interdette; **G2** e **G4** in zone interdette. L'azienda **I** si colloca per intero in una zona del comune di Genazzano (RM) non interessata dall'evento di contaminazione da isomeri dell'HCH che ha dato luogo all'emergenza agro-ambientale oggetto di studio. Per tale azienda sono stati campionati 2 siti **I1** (in prossimità del fiume Sacco) e **I2**, entrambi in aree non interdette dall'utilizzo *food* del suolo. Come atteso, i risultati ottenuti al GC-ECD, riportati nella *Tabella 4*, hanno mostrato dei valori al di sotto del limite di determinazione per tutti gli isomeri dell'HCH nei campioni derivanti dalle aziende **F** e **I**. Nell'azienda **G**, invece, valori positivi sono stati rilevati nei campioni di suolo raccolti durante il primo ciclo di campionamento.



Figura 37. Localizzazione spaziale dei siti campionati nelle aziende **F**, **G** ed **I** rispetto al tracciato del fiume Sacco.

Come mostrato nel primo grafico a sinistra della *Figura 38*, differenze significative ($p < 0.01$) tra il primo ed il secondo ciclo sono state osservate per l'isomero α e per il contenuto di HCH-totale. In particolare, il sito **G2** è quello che ha presentato i valori più elevati per l' α -HCH e l'HCH-totale rispetto agli altri siti sia all'interno dello stesso ciclo che tra cicli diversi; il sito **G4**, invece, ha mostrato i livelli di concentrazione maggiori per gli isomeri β , γ e δ all'interno dello stesso ciclo e tra cicli diversi. Tali valori tuttavia, si sono mantenuti ampiamente al di sotto di 0.01 mg/Kg.

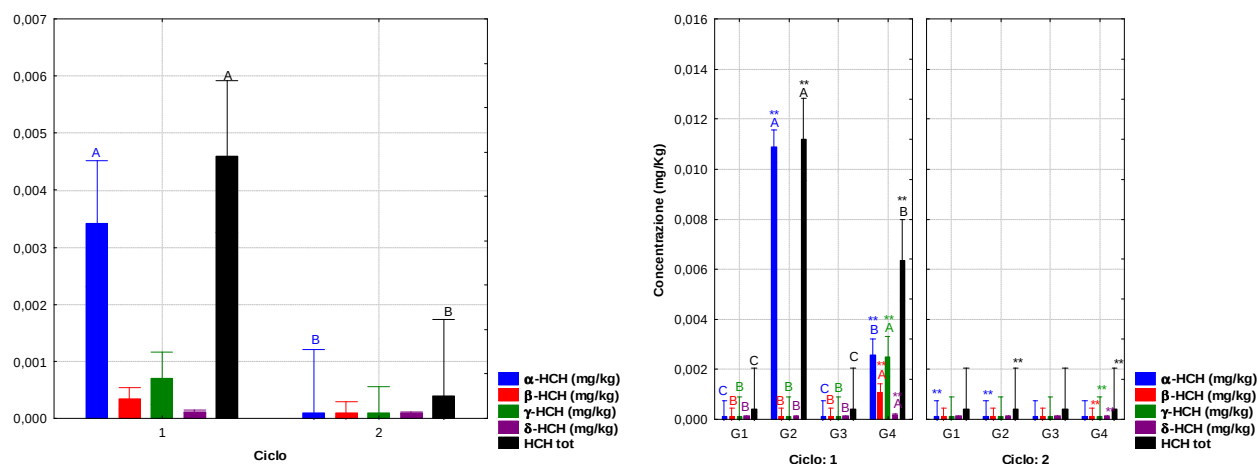


Figura 38. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nei due cicli di campionamento per l'azienda **G** (grafico di sinistra)
^{A,B} $p < 0.01$ per ciascun isomero tra i due cicli.

Distribuzione degli isomeri HCH nei due cicli di campionamento, nei siti dell'azienda **G** (grafico di destra)
^{A,B,C} $p < 0.01$ tra ciascun isomero per siti diversi entro lo stesso ciclo;
^{**} $p < 0.01$ per ciascun isomero per uno stesso sito tra cicli diversi.

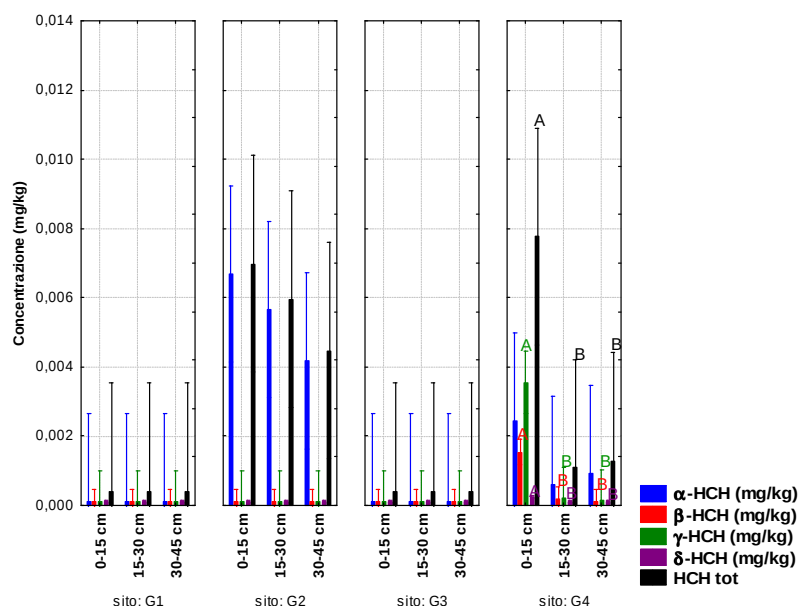


Figura 39. Distribuzione degli isomeri HCH nei nei siti nell'azienda **G** in rapporto alla profondità.
^{A,B} $p < 0.01$ per ciascun isomero entro ogni sito alle diverse profondità.

L'analisi dell'andamento dei diversi isomeri in base alla profondità di campionamento (Figura 39) ha mostrato, invece, variazioni significative soltanto nel sito **G4**. Differenze tra il primo e gli altri due strati di campionamento sono state osservate, infatti per gli isomeri β , γ e δ e per l'HCH-totale.

Nel corso del campionamento dei suoli, per ogni azienda partecipante al progetto di ricerca, sono stati raccolti anche campioni di soprassuolo consistenti in essenze erbacee in consorzio polifita (prevalentemente siti non lavorati e non utilizzati per la produzione di foraggi o granelle di cereali) o monospecie (siti lavorati). Ogni campione è stato identificato da un codice alfanumerico o numerico equivalente a quello di campionamento del suolo (Tabella 5).

Tabella 5. Tipologia di soprassuolo campionata in ogni sito di ciascuna azienda.

Sito di campionamento	Interdetto	Tipologia di soprassuolo (I ciclo)	Tipologia di soprassuolo (II ciclo)
AS1	SI	Incolto	Incolto
AS2	NO	Seminato (erbaio misto)	Seminato (erbaio misto)
AS3	SI	Incolto	Incolto
AS4	NO	Erbaio misto	Erbaio misto
BS1	SI	Incolto	Seminato (erbaio misto)
BS2	NO	Lavorato	Seminato (erbaio misto)
BS3	SI	Incolto	Mais (post-raccolta)
BS4	NO	Lavorato	Incolto
C1	SI	Incolto	Incolto
C2	NO	Incolto	--
C4	NO	Incolto	Incolto
C5	SI	Incolto	Incolto
F1	NO	Erbaio	Erbaio
G1	NO	Lavorato	Lavorato
G2	SI	Lavorato	Lavorato
G3	NO	Erbaio graminacee	Erbaio graminacee
G4	SI	Erbaio graminacee	Erbaio graminacee
H1	SI	--	Seminato (erbaio misto)
H4	NO	--	Seminato (erbaio misto)
I1	NO	Mais	Mais
I2	NO	Mais	Mais
M1	SI	Incolto (prato naturale)	Incolto (prato naturale)
M2	NO	Erbaio misto	Erbaio misto
M3	NO	Erbaio di medica ed altre essenze	Erbaio di medica ed altre essenze

I risultati analitici ottenuti al GC-ECD, per questa matrice sono riportati in *Tabella 6* con i siti interdetti indicati in grassetto. Per i campioni disponibili, sono mostrati i risultati ottenuti sia nel primo che nel secondo ciclo di campionamento.

Tabella 6. Dati analitici dei campioni di soprassuolo prelevati nell'area oggetto di studio

Sito	α -HCH (mg/Kg) I Ciclo	α -HCH (mg/Kg) II Ciclo	β -HCH (mg/Kg) I Ciclo	β -HCH (mg/Kg) II Ciclo	γ -HCH (mg/Kg) I Ciclo	γ -HCH (mg/Kg) II Ciclo	δ -HCH (mg/Kg) I Ciclo	δ -HCH (mg/Kg) II Ciclo
AS1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AS2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AS3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
AS4	<LOD	0.021±0.001	<LOD	<LOD	<LOD	0.023±0.001	<LOD	<LOD
BS1	<LOD	<LOD	<LOD	0.046±0.003	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
BS2	<LOD	0.007±0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.057±0.002
BS3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
BS4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C1	<LOD	0.038±0.002	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C2	<LOD	--	<LOD	--	<LOD	--	<LOD	--
C4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
F1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
G1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
G2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
G3	<LOD	0.026±0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
G4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
H1	--	0.007±0.001	--	<LOD	--	<LOD	--	<LOD
H4	--	0.005±0.001	--	<LOD	--	<LOD	--	<LOD
I1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
I2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
M1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
M2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
M3	<LOD	<LOQ	<LOD	0.016±0.002	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ

* Valore ottenuto partendo da 10g di soprassuolo ed espresso come media di tre determinazioni analitiche $\pm$ DS

-- Campione non disponibile per l'analisi

LOD= limite di rilevabilità (α , β e γ) 2 μ g/Kg; (δ) 5 μ g/Kg; LOQ= limite di quantificazione (α , β e γ) 7 μ g/Kg, (δ) 16 μ g/Kg

Come risulta, la maggior parte dei valori ottenuti si trova al di sotto del Limite di Determinazione o, nel caso del campione derivante dall'azienda **M3**, per gli isomeri α , γ e δ nel secondo ciclo di campionamento al di sotto del Limite di Quantificazione. Residui di isomeri dell'HCH sono stati rilevati soltanto nel secondo ciclo di campionamento e hanno riguardato i campioni derivanti dalle aziende **A**, **B**, **C**, **G** ed **H**; al contrario, le aziende **F** ed **I** hanno mostrato un contenuto di HCH al di sotto del limite di rilevabilità. La *Figura 40* riporta un'elaborazione grafica dei dati ottenuti prendendo in considerazione le variabili di interesse rispetto al "fattore" azienda.

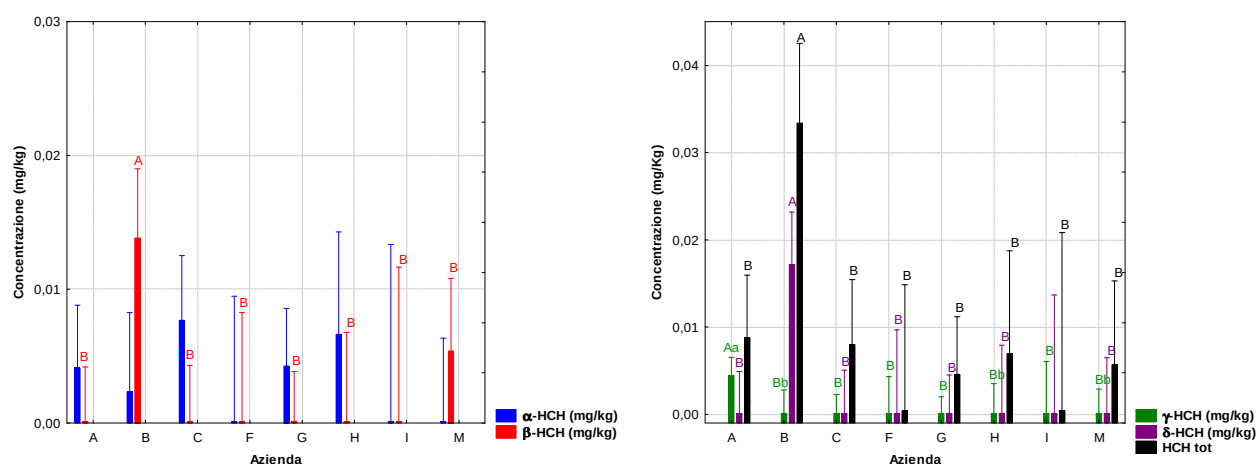


Figura 40. Livelli di concentrazione degli isomeri α , β , γ e δ e dell'HCH-totale nelle aziende oggetto di studio.

^{A,B} $p < 0.01$, ^{a,b} $p < 0.05$ per ciascun isomero tra le diverse aziende.

In particolare:

- ✓ nell'azienda **A**, soltanto il campione **AS4**, che al momento del prelievo presentava una formazione vegetale costituita da erbaio misto (leguminose e graminacee), ha mostrato la presenza degli isomeri α e γ al di sopra dei limiti di legge per materie prime destinate al razionamento degli animali da latte (0.01 mg/Kg, DM del 21/05/1999). In particolare, differenze significative ($p < 0.01$) sono state osservate per l'isomero γ rispetto a tutte le altre aziende;
- ✓ l'azienda **B** ha mostrato la presenza dell'isomero β nel campione **BS1**; degli isomeri α e δ nel campione **BS2**, entrambi appena seminati per colture vegetali costituite da erbaio misto, con valori al di sopra del limite normativo. Tale azienda, infatti, ha presentato differenze significative ($p < 0.01$) per gli isomeri β , δ e per il valore di HCH-totale;
- ✓ nell'azienda **C**, soltanto nel sito **C1** che al momento del prelievo si presentava incolto, sono stati registrati livelli di contaminazione per l'isomero α al di sopra del limite analitico. In particolare, il sito ha presentato i livelli di concentrazione più elevati per tale isomero anche se non sono state riscontrate differenze significative con le altre aziende;
- ✓ l'azienda **G**, con il sito **G3** coltivato a graminacee, e l'azienda **H**, con i siti **H1** e **H4** coltivati ad erbaio misto, hanno presentato un livello di contaminazione da α -HCH con valori al di sopra dei limiti ministeriali ma non statisticamente significativi rispetto alle altre aziende;
- ✓ nel sito **M3** dell'azienda **M**, coltivato ad erba medica (leguminosa) ed altre essenze è stata riscontrata la presenza dell'isomero β ; tuttavia, anche in questo caso, non sono state osservate differenze significative con le altre aziende.

Nonostante i dati di letteratura riportino che di norma le piante non siano in grado di veicolare composti organici clorurati apolari, evidenze sperimentali, tra cui anche i risultati ottenuti in questa tesi, indicano che gli isomeri dell'HCH possono essere assorbiti dall'apparato radicale e veicolati verso i compartimenti epigei, a differenza di altri composti clorurati, come il DDT, che tendono a rimanere confinati nel distretto radicale. Esperimenti effettuati su suoli intenzionalmente contaminati, al fine di osservare se vi fossero differenze tra le diverse specie vegetali nella capacità di traslocare gli isomeri dell'HCH dal suolo, alle radici, al germoglio ed ai semi, hanno rivelato che le leguminose presentano una maggiore capacità di accumulare tali composti nella parte epigea (fusti, foglie, semi) sia in presenza del contaminante in forma disponibile che in forma non disponibile.¹²¹ Per i cereali, quali in particolare mais e riso, invece, il quantitativo di HCH veicolato ai germogli è risultato essere di gran lunga inferiore, con una parte consistente immagazzinata nella pianta in forma "legata" e quindi non recuperabile con le normali tecniche di estrazione.

Nel corso del tempo diverse ipotesi affiancate da approcci di tipo modellistico e da analisi sperimentali, hanno fornito visioni contrastanti sulla presenza e sull'accumulo di contaminanti organoclorurati in specie vegetali. Secondo alcuni autori, ad esempio, la porzione lignificata del tessuto

vegetale potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nella compartimentalizzazione di questi composti; secondo altri, invece, l'accumulo degli inquinanti nel tessuto vegetale dipenderebbe dall'equilibrio che questi raggiungono nella ripartizione tra i diversi comparti ambientali (suolo/aria/tessuto vegetale).

Ulteriori studi sperimentali, affiancati da approcci di tipo modellistico, hanno dimostrato l'importanza della presenza dell'acqua quale mezzo che facilita la risalita dei composti organici idrofobici da parte delle piante. In particolare, alcuni autori hanno confrontato i potenziali d'accumulo da una pianta appartenente alle graminacee, la *loïssa*, nei confronti dell'erbicida *trifluralin* e del *lindano*, che presentano caratteristiche di idrofobicità diverse ($\log K_{ow}$ rispettivamente pari a 5.34 e 3.72).¹²² Per tali pesticidi è stato stimato il "fattore di concentrazione nelle piante", espresso in mg/l, che vale rispettivamente 128.9 per il *trifluralin*, il composto più idrofobico, e 15.01 per il *lindano*.

In conclusione, in base a quanto emerso dalla letteratura e dai dati ottenuti, sembra plausibile ipotizzare che le diverse specie vegetali presentino una differenziale tendenza ad accumulare, metabolizzare e compartimentalizzare i composti organoclorurati, ed in particolare gli isomeri dell'HCH, sebbene la ripartizione di tali sostanze dipenda da un insieme di fattori (tipo e composizione di suolo, disponibilità d'acqua, variabili climatiche), ognuno dei quali gioca un ruolo preciso aumentando o diminuendo tale capacità.

2.3 Determinazione analitica degli HCH in campioni inerenti all'allevamento dei bovini da latte

Per quanto riguarda il sistema d'allevamento dei bovini da latte nell'area di studio, le matrici sottoposte ad analisi per la presenza di HCH sono state l'unifeed (miscela composta da foraggi e concentrati che viene somministrata due o più volte al giorno alle bovine in lattazione e, talora, anche alle altre categorie di bovini in allevamento), il latte e l'acqua destinata all'abbeveraggio. I risultati ottenuti tramite GC-ECD sono riportati nelle *Tabelle 7-9*. Anche in questo caso, ogni campione analizzato è stato contraddistinto da una lettera indicante l'azienda di appartenenza.

Tabella 7. Risultati analitici dei campioni di unifeed prelevati nell'area oggetto di studio

Sito	α -HCH (mg/Kg) I Ciclo	α -HCH (mg/Kg) II Ciclo	β -HCH (mg/Kg) I Ciclo	β -HCH (mg/Kg) II Ciclo	γ -HCH (mg/Kg) I Ciclo	γ -HCH (mg/Kg) II Ciclo	δ -HCH (mg/Kg) I Ciclo	δ -HCH (mg/Kg) II Ciclo
A	0.073±0.004	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
B	0.014±0.002	0.012±0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.003±0.001	<LOD	<LOD
F	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
G1	<LOD	0.011±0.002	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
G2	<LOD	0.004±0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.019±0.003
H	--	<LOD	--	<LOD	--	<LOD	--	<LOD
I1	<LOD	<LOD	<LOD	0.007±0.001	<LOD	<LOD	0.012±0.001	<LOD
I2	--	<LOD	--	<LOD	--	<LOD	--	<LOD
L	0.093±0.002	0.004±0.001	<LOD	0.004±0.001	<LOD	<LOQ	0.024±0.002	0.004±0.001
M1	<LOD	0.038±0.002	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
M2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.004±0.002	0.004±0.001

* Valore ottenuto partendo da 10 g di unifeed ed espresso come media di tre determinazioni analitiche ± DS

-- Campione non disponibile per l'analisi

LOD= limite di rilevabilità (α , β e γ) 2 µg/Kg; (δ) 5 µg/Kg; LOQ= limite di quantificazione (α , β e γ) 7 µg/Kg, (δ) 16 µg/Kg

I risultati presentati in *Tabella 7* per la matrice unifeed hanno mostrato dei valori, per la maggior parte dei campioni, al di sotto del Limite di Determinazione. Soltanto alcuni campioni sono risultati positivi con diversi valori medi, al di sotto del limite di 0.01 mg/Kg riportato nel Regolamento Europeo CE 396 del 2005.

Un confronto dettagliato tra i due cicli riportato in *Figura 41*, ha mostrato variazioni significative ($p < 0.01$) per gli isomeri α , β , γ e per l'HCH-totale. Nello specifico nel secondo ciclo di campionamento, è stata osservata una diminuzione del livello di contaminazione per l'isomero α e per l'HCH totale e un aumento di tale livello per gli isomeri β e γ .

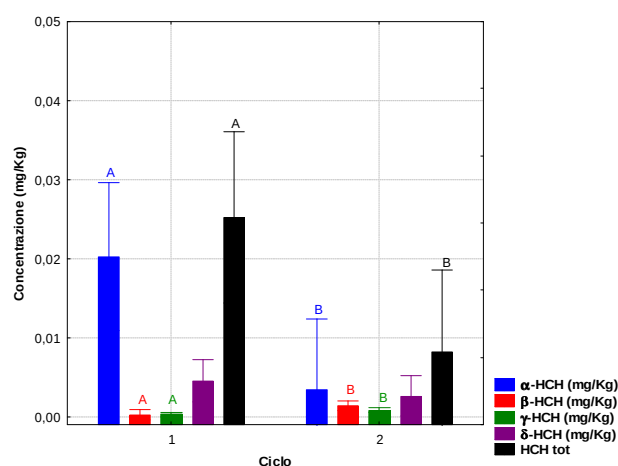


Figura 41. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nei campioni di *unifeed* nei due cicli di campionamento (grafico di sinistra).

^{A,B} $p < 0.01$ per ciascun isomero tra i due cicli.

L'analisi delle variabili di interesse (*Figura 42*) in rapporto ai fattori “azienda” e “ ciclo di campionamento” ha permesso di comprendere al meglio quali fossero le aziende responsabili di tali variazioni. In particolare:

- ✓ le aziende **A**, **B** ed **L** hanno presentato livelli di contaminazione elevati per l'isomero α nel primo ciclo di campionamento. Tale andamento è risultato essere significativamente diminuito assieme al contenuto di HCH-totale, nelle aziende **A** e **L** nel secondo ciclo di campionamento nel quale sono stati riscontrati valori rilevabili di α -HCH anche nelle aziende **G** ed **M**;
- ✓ le aziende **I** e **L** hanno presentato valori positivi per l'isomero β con differenze statisticamente significative tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento;
- ✓ l'azienda **C** è stata l'unica ha mostrare valori rilevabili dell'isomero γ nel secondo ciclo di campionamento;
- ✓ le aziende **G**, **I**, **L** ed **M** hanno evidenziato la presenza dell'isomero δ con una diminuzione significativa del livello di contaminazione nelle aziende **I** e **L** ed un aumento significativo nella concentrazione di tale isomero nell'azienda **G**, nel secondo ciclo di campionamento.

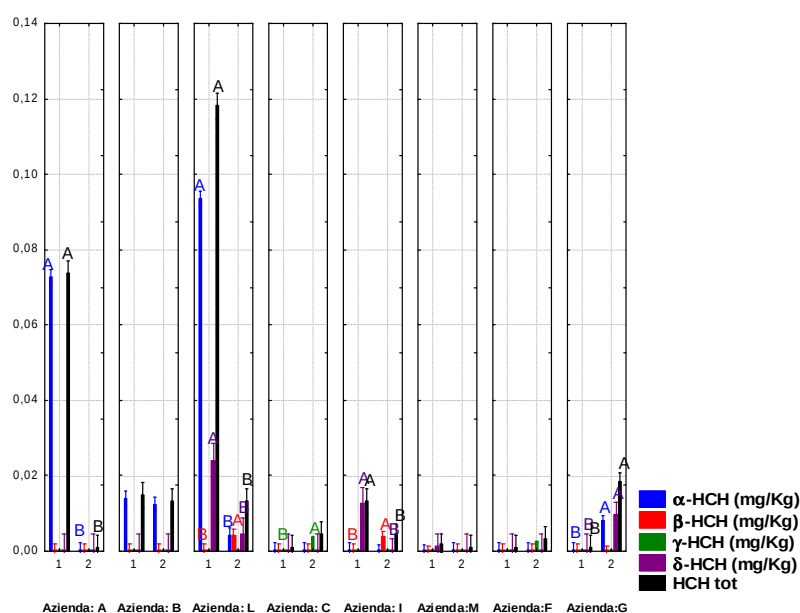


Figura 42. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nei campioni di *unifeed* nelle diverse aziende (grafico di destra).
^{A,B} $p < 0.01$ per ciascun isomero entro ogni azienda tra cicli diversi.

L'andamento generale del livello di contaminazione osservato nelle diverse aziende ha confermato, nella norma, i risultati analitici ottenuti per le matrici suolo e soprassuolo.

Per la matrice latte, come riportato in *Tabella 8*, soltanto 3 campioni appartenenti alle aziende **B**, **C** ed **L** hanno presentato valori positivi per il β -HCH nel corso delle analisi effettuate nel primo ciclo di campionamento. In particolare, le aziende **B** e **L**, che avevano mostrato anche livelli elevati di contaminazione da HCH nell'*unifeed*, hanno presentato valori al di sopra di 0.003 mg/l (Regolamento Europeo 396/2005).

Tabella 8. Dati analitici dei campioni di latte dell'area oggetto di studio

Sito	α -HCH (mg/l) I Ciclo	α -HCH (mg/l) II Ciclo	β -HCH (mg/Kg) I Ciclo	β -HCH (mg/l) II Ciclo	γ -HCH (mg/l) I Ciclo	γ -HCH (mg/l) II Ciclo	δ -HCH (mg/l) I Ciclo	δ -HCH (mg/l) II Ciclo
A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
B	<LOD	<LOD	0.005±0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C	<LOD	<LOD	0.003±0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
F	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
H	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
I	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
I	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
L	<LOD	<LOD	0.003±0.01	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

* Valore ottenuto partendo da 15 ml di latte ed espresso come media di tre determinazioni analitiche $\pm$ DS

LOD= limite di rilevabilità (α , β e γ) 2 μ g/Kg; (δ) 5 μ g/Kg; LOQ= limite di quantificazione (α , β e γ) 7 μ g/Kg, (δ) 16 μ g/Kg

I risultati ottenuti analizzando i campioni di acqua, riportati in *Tabella 9*, hanno evidenziato una diminuzione del livello di contaminazione tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento con risultati positivi e al di sopra del limite pari a 0.01 µg/l (D.Lvo 31/2001) soltanto nel primo ciclo di campionamento.

Tabella 9. Dati analitici dei campioni di acqua dell'area oggetto di studio

Sito	α -HCH (mg/l) I Ciclo	α -HCH (mg/l) II Ciclo	β -HCH (mg/Kg) I Ciclo	β -HCH (mg/l) II Ciclo	γ -HCH (mg/l) I Ciclo	γ -HCH (mg/l) II Ciclo	δ -HCH (mg/l) I Ciclo	δ -HCH (mg/l) II Ciclo
A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.028±0.001	<LOD	<LOD	<LOD
B	0.021±0.002	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
C	0.020±0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
F	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.016±0.001	<LOD	<LOD	<LOD
G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
I	0.020±0.001	<LOD	<LOD	<LOD	0.015±0.001	<LOD	0.046±0.002	<LOD
L	--	<LOD	--	<LOD	--	<LOQ	--	<LOD
M	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.038±0.002	<LOD	<LOD	<LOD

* Valore ottenuto partendo da 500 ml di acqua ed espresso come media di tre determinazioni analitiche $\pm$ DS

LOD= limite di rilevabilità (α , β e γ) 2 µg/Kg; (δ) 5 µg/Kg; LOQ= limite di quantificazione (α , β e γ) 7 µg/Kg, 16 (δ) µg/Kg

In particolare, le aziende **B**, **C**, **I** sono state quelle che hanno mostrato differenze significative per l'isomero α rispetto a tutte le altre (*Figura 43*). Tra queste, le aziende **B** e **C**, localizzate particolarmente vicino al fiume Sacco, sono quelle che, in generale, hanno confermato un livello di contaminazione da HCH nel latte e nell'unifeed. Concentrazioni non trascurabili dell'isomero γ sono state osservate nelle aziende **A**, **F**, **I** e **M**.

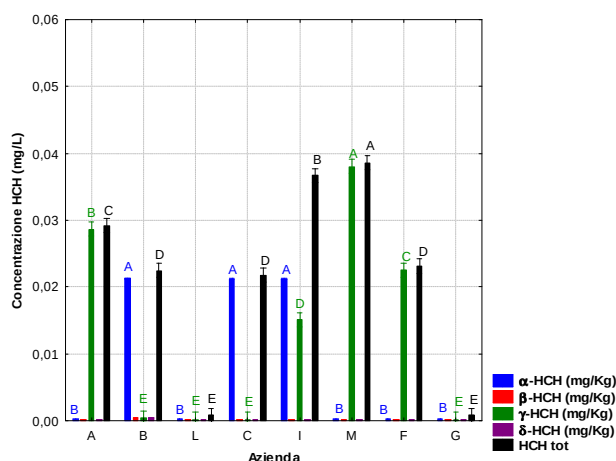


Figura 43. Distribuzione degli isomeri α , β , γ e δ -HCH nei campioni di acqua nelle diverse aziende.
^{A,B} $p < 0.01$ per ciascun isomero tra le diverse aziende.

2.4 Determinazione analitica degli HCH in campioni alimentari

Come precedentemente detto, nel corso del progetto sono stati prelevati anche un numero significativo di campioni alimentari, oltre al latte prodotto nelle aziende in studio. In particolare, per ogni azienda partecipante sono stati acquisiti campioni di uova, carne, ortaggi, conserve e miele per un totale di 94 campioni distribuiti tra primo e secondo ciclo. I risultati analitici ottenuti per ciascun campione analizzato con il GC-ECD hanno mostrato un livello di contaminazione al di sotto del Limite di Determinazione. Tali risultati possono essere giustificati ancora una volta considerando che gli isomeri dell'HCH tendono maggiormente a legarsi alla sostanza organica del terreno, accumulandosi particolarmente in tale compartimento ambientale. Non a caso, infatti, tra le varie matrici analizzate il suolo è quello che ha mostrato i livelli di contaminazione più elevati. Se da una parte questo aspetto rappresenta un grave problema in termini di inquinamento ambientale, dall'altra, potrebbe limitare le conseguenze negative degli HCH nei livelli più alti della catena trofica.

2.5 Determinazione analitica degli HCH in campioni di pioppo

Il *fitorimedia* ed, in particolare il sistema di pioppicoltura a taglio breve (SRC), è una delle tecniche di bonifica utilizzate per il risanamento della Valle del fiume Sacco. Come riportato precedentemente, infatti, gli isomeri dell'HCH possono essere accumulati nei tessuti delle piante, come il legno e la corteccia, attraverso l'assorbimento radicale o l'aerosolizzazione dal suolo.

Al fine di verificare l'effettivo assorbimento di tali contaminanti da parte dei pioppi, sono stati effettuati dei carotaggi di alcune piante collocate nell'area oggetto di studio a cura del Prof. Gianluca Piovesan. I campioni risultanti sono stati analizzati tal quali, in via preliminare, con la spettroscopia micro-FTIR. In letteratura l'utilizzo di tale tecnica per l'individuazione di inquinanti nelle piante risulta essere noto solo nel caso specifico della contaminazione da metalli pesanti. Un recente studio ha, infatti, riportato l'utilizzazione di tale tecnica nella valutazione del livello di contaminazione da metalli pesanti di suoli alluvionati utilizzando la riflettanza del suolo nel medio infrarosso.¹²³

Considerata l'esiguità di questi dati, l'innovatività della procedura nonché la rapidità dei tempi di analisi, si è ritenuto interessante verificare l'applicabilità della spettroscopia micro-FTIR per l'analisi dei pioppi, al fine di comprendere quali fossero le dinamiche di accumulo e il destino degli HCH in queste piante. Per condurre tale studio ci si è avvalsi della collaborazione scientifica della Dott.ssa Claudia Pelosi del Dipartimento di Beni Culturali (DISBEC). Nell'area di studio sono stati selezionati 2 alberi di pioppo: il primo (denominato *pioppo1*) situato ad una distanza di circa 500 metri dalla riva sinistra del fiume Sacco (diametro: 65 cm; età: 25 anni) ed il secondo (*pioppo 2*) localizzato sulla riva del fiume (denominato: diametro: 55 cm; età: 26 anni). Il pioppo considerato come "controllo" è stato individuato in una zona non contaminata dagli HCH, in particolare in provincia di Viterbo (diametro: 50 cm; età: 15 anni). Su ciascun pioppo sono stati effettuati campionamenti tramite carotaggio. I campioni risultanti sono stati sottoposti tal quali ad analisi con la spettroscopia micro-FTIR. In *Figura 44* sono riportati gli spettri

registrati. Lo spettro (a) è relativo alla miscela dei 4 isomeri dell'HCH; gli spettri (b), (c), (d), (e) si riferiscono alle carote di pioppo campionate e fanno riferimento rispettivamente al controllo; al controllo cui è stata aggiunta una goccia della miscela di HCH; al *pioppo 1* e al *pioppo 2* riferiti all'anno di accrescimento 2005.

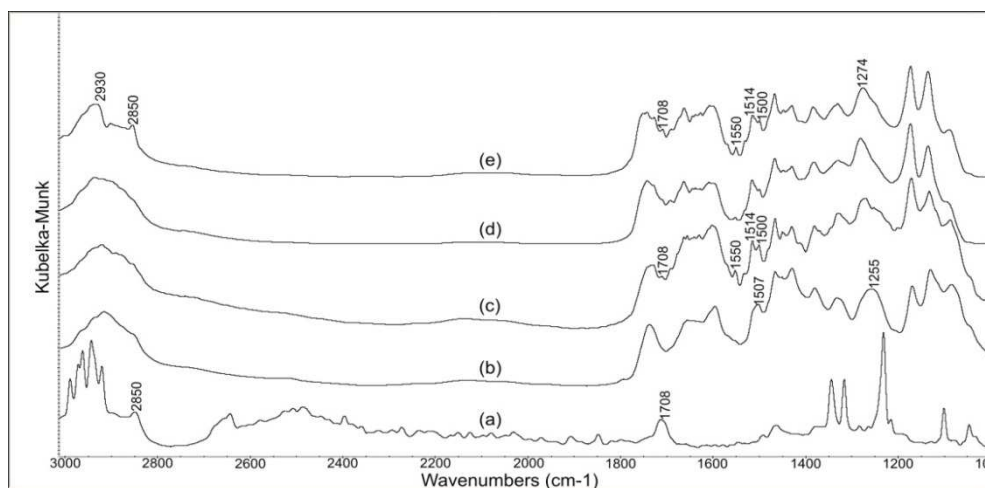


Figura 44. Spettri micro-FTIR (zona allargata: 3000-1000 cm^{-1}).
 (a) miscela di HCH standard; (b) controllo; (c) controllo con una goccia di HCH;
 (d) *pioppo1*, anello corrispondente all'anno 2005; (e) *pioppo2*, anello corrispondente all'anno 2005.

La scelta di analizzare, inizialmente, l'anno di accrescimento 2005 per i 2 pioppi è stata dettata dagli eventi occorsi nell'area oggetto di studio in quel preciso anno, durante il quale, come precedentemente riportato, è stato riscontrato un picco di contaminazione da HCH in campioni di latte. Come mostrato in Figura 45, lo spettro (a) ha mostrato un assorbimento caratteristico degli idrocarburi alogenati tra 1400 e 1000 cm^{-1} , dovuto alle vibrazioni di stretching dei legami C-Cl. A questa banda, si aggiunge un evidente assorbimento a 1708 cm^{-1} . Tra tali assorbimenti, è risultato significativo per lo scopo in oggetto questo ultimo picco, essendo la zona compresa tra 1400 e 1000 cm^{-1} caratteristica anche della lignina.^{124,125} Infatti, negli spettri (c) ed (e), corrispondenti al campione di pioppo contaminato con la miscela di HCH e al *pioppo 2*, è stata riscontrata la banda di assorbimento caratteristica degli HCH a 1708 cm^{-1} . Tale assorbimento, al contrario, non è presente nel controllo e nel *pioppo 1*, localizzato in un'area lontana dal fiume. Nello spettro (e), inoltre, sono stati osservati anche alcuni cambiamenti nelle bande a 1507 e 1255 cm^{-1} associate alla lignina. In particolare, la banda a 1507 cm^{-1} , dovuta alla vibrazione dello scheletro dell'anello aromatico di tale polimero, è risultata splittata in due picchi (1514 e 1500 cm^{-1}) ed è apparsa una nuova banda a 1550 cm^{-1} ; l'ampia banda a 1255 cm^{-1} si è spostata significativamente a 1274 cm^{-1} e si è presentata come una sua "spalla". Queste osservazioni sono state interpretate come un ulteriore dato di conferma della presenza di una contaminazione da isomeri dell'HCH, dovuta ad una possibile interazione chimica tra questi contaminanti e la lignina. I due picchi a 1514 e a 1500 cm^{-1} e il debole assorbimento a 1500 cm^{-1} sono stati osservati anche nello spettro micro-FTIR del *pioppo 1* (d) a suggerire l'eventuale

presenza di tracce di HCH anche nel pioppo lontano dal fiume, in corrispondenza dell'anno in cui la contaminazione ha avuto il picco maggiore.

I risultati ottenuti per il *pioppo 2* sono stati ulteriormente approfonditi attraverso l'analisi micro-FTIR di campioni legnosi relativi ad anni di accrescimento compresi tra il 2002 e il 2008, come mostrato in *Figura 45*.

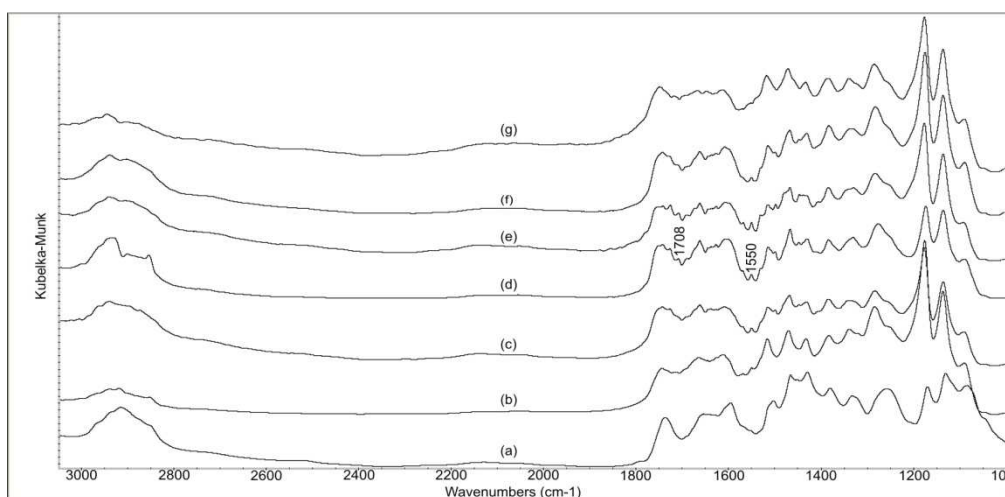


Figura 45. Spettri micro-FTIR (3000-1000 cm^{-1}): (a) controllo; (b) *pioppo 2*, anno 2002; (c) *pioppo 2*, anno 2004; (d) *pioppo 2*, anno 2005; (e) *pioppo 2*, anno 2006; (f) *pioppo 2*, anno 2007; (g) *pioppo 2*, anno 2008.

Anche in questo caso, il caratteristico assorbimento a 1708 cm^{-1} , considerato diagnostico per la presenza di HCH, è stato osservato negli spettri delle carote del *pioppo 2* relativamente a tutti gli anni di accrescimento studiati.

Sulla base dello screening preliminare ottenuto dopo le indagini micro-FTIR, le carote del *pioppo 1* e del *pioppo 2* sono state sottoposte alle analisi GC-ECD e GC-MS. Tuttavia, per avere a disposizione un'adeguata quantità di campione necessaria per effettuare l'estrazione, il materiale risultante dagli anelli di accrescimento delle carote dei pioppi è stato unito in 4 periodi temporali (1991-1996; 1997-2000; 2001-2004 e 2005-2008). I risultati ottenuti via analisi GC per i due pioppi sono mostrati nelle *Tabella 10* e *11*.

Tabella 10. Dati analitici ottenuti al GC-ECD per le carote del *pioppo 1*.*

Anno	α -HCH (mg/Kg)	β -HCH (mg/Kg)	γ -HCH (mg/Kg)	δ -HCH (mg/Kg)
1991-1996	0.024±0.001	< LOD	< LOD	< LOD
1997-2000	0.102±0.008	< LOD	< LOD	< LOD
2001-2004	0.080±0.002	< LOD	< LOD	< LOD
2005-2008	0.274±0.002	< LOD	< LOD	< LOD

* Valore ottenuto partendo da 10 g di materiale legnoso ed espresso come media di tre determinazioni analitiche $\pm$ DS, LOD (α , β e γ) = 2 $\mu\text{g/Kg}$; LOD (δ) = 5 $\mu\text{g/Kg}$; LOQ (α , β e γ) = 7 $\mu\text{g/Kg}$; LOQ (δ) = 16 $\mu\text{g/Kg}$.

Come riportato in *Tabella 10*, per il *pioppo 1* gli isomeri β , γ e δ -HCH hanno mostrato valori al di sotto del Limite di Determinazione, mentre l'isomero α è stato riscontrato in piccole quantità variabili a seconda dell'arco temporale preso in considerazione.

Tabella 11. Dati analitici ottenuti al GC-ECD per le carote del *pioppo 2*.*

Anno	α -HCH (mg/Kg)	β -HCH (mg/Kg)	γ -HCH (mg/Kg)	δ -HCH (mg/Kg)
1991-1996	< LOD	0.625±0.036	0.023±0.001	< LOD
1997-2000	< LOD	0.680±0.025	0.015±0.001	< LOD
2001-2004	< LOD	1.381±0.025	< LOD	< LOD
2005-2008	< LOD	2.035±0.097	0.183±0.006	0.238±0.015

* Valore ottenuto partendo da 10 g di materiale legnoso ed espresso come media di tre determinazioni analitiche±DS,
LOD (α , β e γ) = 2 µg/Kg; LOD (δ) = 5µg/Kg; LOQ (α , β e γ) = 7 µg/Kg; LOQ (δ) = 16 µg/Kg.

Al contrario, il *pioppo 2* ha mostrato una maggiore concentrazione degli isomeri β , γ e δ . Nonostante elevati livelli di contaminazione degli isomeri γ e δ siano stati trovati nei campioni corrispondenti all'arco temporale 2005-2008, il β -HCH è quello riscontrato in concentrazioni maggiori, in accordo con la sua elevata persistenza ambientale. In particolare, per tale isomero è stato osservato un notevole aumento della concentrazione passando dal periodo 1997-2000 a 2005-2008 (0.680 mg/kg e 2.035mg/kg, rispettivamente). Tale picco di bioaccumulo potrebbe essere collegato all'esondazione del fiume Sacco avvenuta nell'anno 2004.¹²⁶ E' noto, infatti, che nei sistemi acquatici gli HCH sono sottoposti a processi di scambio con i sedimenti rilasciati dall'erosione a seguito di eventi alluvionali.¹²⁷ Anche se non sono note le dinamiche che determinano l'accumulo ed il destino ambientale degli HCH in specie arboree, la veicolazione di altri composti organoclorurati e aromatici policiclici è ben documentata in letteratura.^{128,129,130} Recentemente è stato riportato uno studio sulla traslocazione di policiclobifenili (PCB) dalle radici al fusto di pioppi giovani.¹³¹ Questo ed altri studi teorici hanno mostrato che i PCB con una costante di ripartizione ottanolo/acqua $K_{ow} < 5$ potrebbero traslocare dalle radici al fusto principale per poi raggiungere i fusti secondari in un tempo inferiore ai 20 giorni di sperimentazione.¹³² Al contrario, nei PCB più lipofili con un valore di $K_{ow} > 5$, il processo di migrazione dalle radici al fusto non si verificherebbe.¹³³ Tenendo conto che i principali isomeri dell'HCH hanno K_{ow} compresa tra 3.72 e 4.14¹³⁴ e un valore del fattore di concentrazione nel flusso di traspirazione (TSCF) dal fusto, per il pioppo, tra 1.58 (γ -HCH) e 1.17 (δ -HCH), la loro traslocazione da terreni contaminati alle radici e al tronco potrebbe ragionevolmente verificarsi, come confermato nelle analisi ottenute al micro-FTIR e GC-ECD. Inoltre, valori particolarmente bassi della costante di Henry per questi contaminanti (tra 3.5×10^{-8} e 4.5×10^{-7}) impedirebbero il loro passaggio dal sistema xilematico del fusto alle foglie e di conseguenza dalle foglie all'aria.¹²³ In questo modo, negli alberi di pioppo, l'assorbimento degli isomeri dell'HCH attraverso le radici e la loro risalita nel fusto non sarebbe controbilanciata dal loro rilascio nell'ambiente attraverso l'interfaccia foglia-aria, determinandone come osservato, il bioaccumulo o la metabolizzazione.¹²⁵ Questo ultimo processo, in particolare, implicherebbe una biotrasformazione all'interno dell'alburno, ossia della

parte legnosa più giovane del fusto. Se tali fenomeni si fossero verificati nei campioni di pioppo analizzati, si sarebbero venuti a formare dei composti xenobiotici secondari difficilmente estraibili senza la degradazione delle matrici di cellulosa e lignina dell'alburno. Tuttavia anche l'accumulo di HCH nell'alburno del pioppo richiede notevoli proprietà di assorbimento da parte del materiale legnoso verso queste molecole. In questo caso, dati di letteratura sullo studio delle proprietà di assorbimento del *lindano* nel legno di quercia e salice hanno mostrato che la migrazione di composti moderatamente lipofili potrebbe aver luogo attraverso il sistema xilematico ad una velocità di risalita di diversi metri all'anno.¹²⁵ Questi dati sembrano essere compatibili con quanto osservato nel caso in esame nei diversi anelli di accrescimento. Inoltre, il processo di accumulo tempo-dipendente degli isomeri dell'HCH negli anelli degli alberi di pioppo potrebbe essere ulteriormente spiegato dal fatto che analogamente ad altre piante, i pioppi possiedono un sistema xilematico diffuso il quale potrebbe aver contribuito alla diffusione e, quindi, all'accumulo di questi contaminanti nei diversi anelli permettendo di registrare un livello di contaminazione non solo dagli anni successivi al 2004, ma anche negli anni precedenti, come confermato dalle analisi GC. Inoltre, i diversi valori di concentrazione riscontrati potrebbero essere dovuti al fatto che nel pioppo il flusso xilematico non è uniforme, ma diminuisce rapidamente con la profondità dell'alburno. Studi riportati in letteratura, infatti, dimostrano che il flusso idraulico nell'alburno negli ultimi 3-5 anelli scende del 30% rispetto all'anello di accrescimento più esterno.¹³⁵ Questo dato confermerebbe l'aumento di concentrazione osservato nelle analisi GC per i raggruppamenti degli anni più recenti. Per giustificare ulteriormente i dati ottenuti e le ipotesi formulate sui processi che determinano l'accumulo differenziale degli HCH osservato negli anelli di accrescimento degli alberi di pioppo, sono state sottoposte alle analisi GC-ECD anche le cortecce dei *pioppi 1* e *2*. I risultati ottenuti, mostrati in *Tabella 12*, hanno evidenziato la presenza del β -HCH in entrambi i campioni, anche se con diversi livelli di concentrazione.

Tabella 12. Dati analitici ottenuti al GC-ECD per la corteccia del *pioppo 1* e del *pioppo 2*.*

<i>Pioppo</i>	α -HCH (mg/Kg)	β -HCH (mg/Kg)	γ -HCH (mg/Kg)	δ -HCH (mg/Kg)
1	< LOD	0.127±0.003	< LOD	< LOD
2	< LOD	0.250±0.009	< LOD	< LOD

* Valore ottenuto partendo da 10 g di materiale legnoso ed espresso come media di tre determinazioni analitiche±DS,
LOD (α , β e γ) = 2 µg/Kg; LOD (δ) = 5µg/Kg; LOQ (α , β e γ) = 7 µg/Kg; LOQ (δ) = 16 µg/Kg.

I dati analitici di β -HCH inferiori nella corteccia rispetto alle carote ci hanno consentito di ipotizzare che la principale via di contaminazione possa essere l'interfaccia suolo-radici a seguito dei fenomeni di esondazione. Non a caso il *pioppo 2*, come descritto precedentemente, è collocato lungo il percorso del fiume Sacco, in una zona che è stata monitorata anche negli anni precedenti e che aveva mostrato un'elevata contaminazione del suolo da α e β -HCH (fino a 0.300 mg/kg).¹³⁶ Tuttavia, l'accumulo nella corteccia dell'isomero β appartenente anche al *pioppo 1* suggerisce la possibilità che tali contaminanti

possano essersi diffusi anche attraverso il sistema aria-suolo. I pesticidi, infatti, possono essere assorbiti, oltre che dall'apparato radicale anche da quello fogliare per poi penetrare all'interno del fusto. Alcuni autori hanno riscontrato discreti quantitativi di PCB nella corteccia di querce che crescono anche a 14 km di distanza da aree contaminate da tali inquinanti.

Il fenomeno del bioaccumulo nelle piante, pur rappresentando un valido strumento di depurazione per i terreni contaminati, apre un importante quesito sulla sicurezza nell'utilizzo successivo del materiale legnoso, per scopi commerciali o per la produzione di bioenergia. Durante la combustione dei trucioli di legno, infatti, si potrebbe incorrere nella formazione di metaboliti clorurati pericolosi per l'ambiente e per l'uomo.^{137,138}

3. CONCLUSIONI

L'attività sperimentale condotta durante il triennio di dottorato è stata idealmente divisa in due parti.

La prima parte è stata finalizzata al monitoraggio del livello di contaminazione da isomeri dell'HCH nella Valle del fiume Sacco analizzando diverse matrici agro-ambientali. A tale scopo, sono stati raccolti 345 campioni di origine ambientale, animale ed alimentare prelevati da aziende locali partecipanti al progetto in due diversi periodi di campionamento: giugno/ottobre 2012 (primo ciclo) e giugno/ottobre 2014 (secondo ciclo). I risultati analitici, ottenuti via gas-cromatografia, hanno mostrato una situazione generale di contaminazione da HCH nelle varie matrici, con i più alti valori per gli isomeri α , β e γ . Tra queste, nel suolo è stato riscontrato il livello di contaminazione più elevato. I risultati acquisiti possono essere giustificati sulla base delle proprietà chimico-fisiche degli HCH, in particolare, la scarsa solubilità in acqua, la bassa volatilità e la loro tendenza a legarsi alla sostanza organica del terreno diminuendo fortemente la mobilità e favorendone la persistenza in tale comparto ambientale. Per questa matrice, nei campioni prelevati dalle aziende localizzate vicino al fiume Sacco è stata confermata la presenza degli HCH sia nel primo che nel secondo ciclo di campionamento mentre nei campioni prelevati dalle aziende localizzate lontano dal fiume le analisi hanno mostrato, per la maggior parte, valori al di sotto dei limiti di determinazione, confermando la correlazione tra la contaminazione del suolo e la vicinanza al fiume Sacco. Nonostante questo andamento generale, sono stati osservati cambiamenti nel livello di concentrazione dei diversi isomeri tra i due cicli di monitoraggio, almeno in alcuni siti appartenenti a queste aziende. Nello specifico, tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento sono state osservate diminuzioni significative nei siti interdetti **AS3**, **BS1**, **C1**, **C5** per gli isomeri α , β e γ -HCH; nel sito **C2** non interdetto per gli isomeri α e γ -HCH; nei siti non interdetti **BS4**, per gli isomeri α , β e δ -HCH; **BS2** per gli stessi isomeri ad esclusione del β -HCH; nei siti non interdetti **AS4**, **C4** ed **M2** per l'isomero α . Tali cambiamenti possono essere stati giustificati, come ampiamente discusso, dai numerosi processi che avvengono sia all'interfaccia suolo-atmosfera che all'interno del suolo stesso, grazie all'azione di componenti biotiche ed abiotiche, le quali, potrebbero favorire il trasporto, la volatilità, la degradazione o l'isomerizzazione dei diversi contaminanti. Al contrario, aumenti significativi tra il primo ed il secondo ciclo di campionamento sono stati osservati nei siti interdetti **H2**, **H4**, **BS3** per gli isomeri α , β e δ e nel sito **M1** per gli isomeri β e δ ; nel sito **H3** per l'isomero β e nel sito **M2** per l'isomero α . Tali incrementi possono essere rapportati alle esondazioni del fiume Sacco avvenute nel gennaio 2013 e nel febbraio 2014. Inoltre, l'analisi del rapporto percentuale tra la forma isomerica più stabile (il β -HCH) e l'isomero α è indicativa, da una parte, del fatto che la natura della sorgente di contaminazione possa essere rappresentata dagli stoccaggi incontrollati degli scarti della lavorazione del *lindano* e, dall'altra, che l'emergenza agro-ambientale sia sostenuta da uno stato cronico di contaminazione. I risultati analitici ottenuti per le altre matrici analizzate hanno mostrato livelli di contaminazione da HCH al di sotto del limite di determinazione per tutti i campioni di origine alimentare e per la maggior parte delle matrici

soprassuolo, unifeed, latte ed acqua in cui, comunque, valori positivi di HCH sono stati riscontrati di norma nelle aziende caratterizzate da livelli di contaminazione maggiore del suolo. In conclusione, lo studio analitico condotto in questa tesi, unico per la quantità di campioni analizzati, ha evidenziato un livello di contaminazione ambientale persistente nella Valle del fiume Sacco che richiede a tutt'oggi un continuo monitoraggio ed efficaci interventi di bonifica per il recupero ed il risanamento del territorio.

La seconda parte del lavoro sperimentale è stata rivolta allo studio sull'accumulo differenziale degli isomeri dell'HCH negli anelli di piante di pioppo utilizzate per la bonifica della Valle del fiume Sacco, grazie alla loro nota capacità di assorbire, attraverso le radici, gli HCH presenti nel suolo (fitorimedio). Utilizzando un approccio combinato di analisi (micro-FTIR, da una parte; GC-ECD e GC-MS, dall'altra), è stato possibile dimostrare, per la prima volta, l'esistenza di elevati livelli di bioaccumulo di HCH in campioni di legno e nella corteccia di alberi di pioppo provenienti dalla Valle del fiume Sacco, permettendoci di fornire un'ipotesi plausibile sulle modalità e sulle motivazioni per i quali tali contaminanti si accumulano in specifiche porzioni della pianta. I risultati ottenuti hanno mostrato un livello di contaminazione e bioaccumulo elevato nei campioni provenienti dal pioppo localizzato vicino al fiume Sacco, soprattutto negli anelli di accrescimento relativi agli anni 2005-2008 in cui nell'area in esame si è verificato il picco di inquinamento da HCH. Inoltre, l'utilizzo della tecnica micro-FTIR, come tecnica preliminare per uno screening dei livelli di contaminazione, ha permesso di effettuare indagini sugli anelli di accrescimento delle piante, oggetto di studio, in modalità non distruttiva e senza richiedere alcun pre-trattamento del campione. I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'approccio dendrochimico utilizzato si prospetta come un efficace strumento di analisi per acquisire informazioni importanti in studi di biomonitoraggio che consentono di produrre mappe di rischio per la contaminazione da inquinanti organici.

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 Materiale e strumentazione

I solventi e gli standard α , β , γ and δ -HCH (sostanze solide con un grado di purezza pari al 99.8%) sono stati forniti da Sigma-Aldrich.

L'estrazione e le purificazioni delle matrici analizzate sono state effettuate utilizzando la seguente strumentazione disponibile presso i Laboratori di Chimica Organica e di Biochimica Clinica ed Immunologia del DAFNE e il Centro Grandi Attrezzature di Ateneo:

- ✓ bilancia analitica Precisa XT 120
- ✓ centrifuga refrigerata Thermo IEC CL30-CL30R
- ✓ agitatore orbitale S150 - Stuart Scientific
- ✓ bagnetto riscaldante Julabo PC
- ✓ evaporatore rotante Heidolph LaboRota 4000
- ✓ sonicatore Ultrasonic cleaner (Soltech)
- ✓ estrattore multiplo (Varian) con 20 postazioni.

Per le purificazioni SPE, sono state utilizzate le seguenti cartucce:

- ✓ C18 di capacità 3 ml, contenente 500 mg di fase solida con particelle di 55 μm e pori di 70 Å (Phenomenex)
- ✓ florisil di capacità 3 ml, contenente 500 mg di fase solida con particelle di 170 μm e pori di 80 Å (Phenomenex)
- ✓ ossido di alluminio neutro, capacità 6 ml (Macherey-Nagel)
- ✓ florisil Superclean ENVI, capacità 6 ml (Supelco) fornite da Sigma-Aldrich.

Le analisi gas-cromatografiche sono state condotte utilizzando uno strumento Shimadzu GC-17A disponibile presso il Laboratorio di Biochimica Clinica ed Immunologia del DAFNE equipaggiato di una pre-colonna (0.53 mm x 5 m x 0.14 μm , Restek), una colonna capillare Rtx®-CLPesticides2 (0.18 mm x 20 m con fase solida Crossbond® Restek) e di un rivelatore a cattura d'elettroni (ECD). Le analisi sono state condotte utilizzando l'iniettore in modalità splitless a $T=280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ed il rivelatore impostato a $T=330\text{ }^{\circ}\text{C}$. Come *carrier* è stato utilizzato l'elio 6.0 e come gas di *make-up* per il rivelatore, l'azoto 5.5 (Rivoira).

Gli spettri GC-MS sono stati eseguiti utilizzando un gascromatografo Agilent 7890A con rilevatore di massa Agilent 5975C che è stato messo a disposizione, per gli scopi di questa tesi, dall'Arpa Lazio di Viterbo. Tale strumento è dotato di una colonna capillare "SemiVolatiles" (Phenomenex) avente come fase fissa un copolimero di dimetil polisilossano (95%) e fenil arilenico (5%), brevettata con la denominazione Enviro-Inert™. Le analisi sono state condotte utilizzando l'iniettore MMI alla temperatura costante di $260\text{ }^{\circ}\text{C}$, in modalità pulse-splitless con un flusso iniziale di 30 psi per 0.5 minuti, e a seguire di 200 psi per 1.5 min. Le temperature del quadrupolo e della sorgente sono state impostate, rispettivamente, a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $230\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alla transfer-line è stata assegnata una temperatura costante di $320\text{ }^{\circ}\text{C}$.

°C. Le analisi sono state eseguite in modalità SCAN con una finestra compresa tra PM=30-450. Come *carrier* è stato usato l'elio 6.0 (SIAD) al flusso costante di 1.2 ml/min.

Gli spettri infrarossi sono stati ottenuti utilizzando un microscopio IR Nicolet Centaurus equipaggiato con un rivelatore MCT e collegato spettrofotometro IR a Trasformata di Fourier, Nicolet Avatar 360 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), disponibile presso il Laboratorio di Diagnostica per la Conservazione ed il Restauro del DISBEC.

I carotaggi delle piante di pioppo sono stati effettuati, utilizzando il “succhiello di Pressler” che ha permesso di ottenere carote del diametro di 5 mm. L'analisi degli anelli di accrescimento è stata effettuata incidendo le carote con un bisturi per l'intera lunghezza parallelamente alla sezione trasversale del legno. Le larghezze degli anelli degli alberi sono state misurate con un micrometro scorrevole interfacciato con un computer.

4.2 Metodi di estrazione degli HCH

Suolo e carote di pioppo. Dopo il prelievo, i campioni di suolo sono stati conservati alla temperatura di 4 °C fino al pretrattamento che è consistito nell'essiccazione a bassa temperatura ($T < 40^{\circ}\text{C}$) e frantumazione-vagliatura finalizzate all'omogeneizzazione; i campioni di pioppo, dopo essere stati essiccati all'aria, sono stati sminuzzati e macinati al fine di ridurli in polvere. Quindi il materiale risultante dagli anelli di accrescimento delle carote dei pioppi è stato unito in 4 periodi temporali (1991-1996; 1997-2000; 2001-2004 e 2005-2008). Di seguito ogni campione è stato sottoposto all'estrazione, utilizzando il metodo ISO 10382.¹³⁹

Tale metodo consiste di due fasi: *a) estrazione con solventi organici; b) estrazione in fase solida (SPE).* *a)* Al campione da analizzare (10 g), posto in una beuta, sono stati aggiunti 25 ml di acetone. La miscela è stata posta in agitazione per 15 minuti al termine dei quali sono stati aggiunti 25 ml di etere di petrolio. Dopo ulteriori 15 minuti, per filtrazione è stata recuperata la fase organica. L'estrazione è stata quindi ripetuta aggiungendo 25 ml di etere di petrolio. Successivamente, gli estratti organici riuniti sono stati caricati in un imbuto separatore nel quale sono stati aggiunti 250 ml di acqua distillata. La fase organica raccolta è stata, quindi, disidratata su sodio solfato anidro, filtrata e concentrata allontanando il solvente per distillazione a pressione ridotta fino ad ottenere un volume finale di 10 ml. La soluzione ottenuta è stata trasferita in una falcon e ulteriormente concentrata fino al volume di 1 ml utilizzando un leggero flusso di azoto a temperatura ambiente. *b)* Il campione proveniente dalla fase precedente è stato trasferito nella cartuccia di ossido di alluminio neutro ed eluito fino all'approssimarsi del menisco della fase liquida alla fase assorbente. A questo punto, sono stati aggiunti 20 ml di etere di petrolio. Infine, gli estratti organici, recuperati e concentrati sotto leggero flusso di azoto, sono stati solubilizzati in 1 ml di esano.

Latte. Di ciascun campione raccolto da ogni animale (300-400 ml) è stato prelevato un volume di ca. 250 ml suddiviso in aliquote da 50 ml travasate in idonei barattoli a tenuta conservati in contenitori adiabatici a T=4 °C fino al momento dello stoccaggio definitivo in laboratorio a -20°C.

Tra i metodi riportati per la preparazione dei campioni a partire dalla matrice “latte”, si è ritenuto opportuno utilizzare il metodo accreditato ISO-8260:2012.¹⁴⁰ In accordo al metodo, il latte da analizzare, è stato scongelato in frigo e successivamente portato a alla temperatura di 35-40 °C. Dopo averlo agitato energicamente dal basso verso l’alto, è stato raffreddato velocemente fino alla temperatura di 20 °C con un bagno di acqua e ghiaccio. Successivamente si è proceduto con le seguenti tre fasi estrattive:

a) estrazione con solventi organici dei grassi e degli HCH; b) estrazione criogenica per l’isolamento degli HCH dai grassi; c) estrazione in fase solida (SPE) per la purificazione degli HCH.

a) Un campione di 15 ml di latte è stato versato in un imbuto separatore con 15 ml di metanolo e 150 mg di sodio ossalato. L’imbuto è stato agitato per circa un minuto. Successivamente sono stati aggiunti 7.5 ml di dietil etere e l’imbuto è stato agitato nuovamente per un minuto. Infine sono stati aggiunti 7.5 ml di etere di petrolio ed è stata ripetuta l’agitazione per un minuto. Per favorire la separazione delle due fasi, il campione è stato trasferito in una falcon e centrifugato a 1500 rpm per 5 minuti. Al termine, la fase organica recuperata è stata trasferita in una beuta mentre la fase acquosa è stata nuovamente versata nell’imbuto separatore estraendo da questa due volte con 15 ml di etere di petrolio/dietil etere=1:1. Le fasi organiche recuperate e riunite sono state disidratate su solfato di sodio anidro (3 g); dopo filtrazione i solventi organici sono stati allontanati per distillazione a pressione ridotta mantenendo il bagno d’acqua alla temperatura di 35-40°C. Si è ottenuto un estratto di grasso pari a 500-600 g. *b)* 500 mg di estratti sono posti in un tubo da centrifuga. A questi sono stati aggiunti 3 ml di una soluzione di acetonitrile/cloruro di metilene=3:1. La soluzione è stata agitata vigorosamente e posta in una centrifuga ad un’accelerazione radiale di 1200 g a -15 °C per 20 minuti. Il surnatante ottenuto è stato trasferito in un’altra falcon e il grasso residuo solubilizzato lentamente scaldandolo con un bagno d’acqua a 40 °C. Una seconda estrazione è stata ripetuta con le stesse modalità operative. Le due fasi organiche ottenute sono state riunite e poste a 35 °C sotto leggero flusso di N₂ per concentrare il campione fino a 2-3 ml di soluzione (*soluzione A*). *c)* Inizialmente è stata condotta un’ estrazione in fase solida della *soluzione A* utilizzando cartucce di silice C18. La cartuccia è stata condizionata con 10 ml di etere di petrolio, 5 ml di acetone e 5 ml di metanolo. La *soluzione A* è stata caricata sulla cartuccia ed eluita fino all’approssimarsi del menisco della fase liquida alla fase assorbente. Dopo 3 minuti, si è eluito con 10 ml di acetonitrile con un flusso pari ad una goccia ogni 3 secondi. La soluzione eluita è stata posta in un tubo da centrifuga ed il solvente evaporato sotto N₂ a 35 °C. Il residuo ottenuto è stato quindi solubilizzato in 2 ml di esano e agitato ottenendo la *soluzione B*. Successivamente è stata condotta una seconda estrazione in fase solida utilizzando cartucce di silice Florisil. Ogni cartuccia è stata condizionata con 10 ml di esano. La *soluzione B* è stata caricata sulla cartuccia ed eluita fino all’approssimarsi del menisco della fase liquida alla fase assorbente. Dopo 3 minuti, si è eluito con 10 ml di una soluzione di etere di petrolio/dietil etere=98:2 con

flusso pari ad una goccia al secondo. Le frazioni sono state riunite in un tubo da centrifuga e l'eluizione è stata protratta utilizzando 12 ml di una soluzione di etere di petrolio/dietil etere=85:15 con flusso di una goccia ogni 3 secondi. Le frazioni eluite sono state riunite. Dopo l'aggiunta di 100 µl di dodecano, la soluzione è stata agitata e il solvente allontanato tramite distillazione a pressione ridotta alla temperatura di 35-40 °C. L'estratto finale ottenuto è stato solubilizzato in 1ml di esano.

Acqua. I campioni di acqua sono stati conservati in aliquote di 500 ml alla temperatura di -20°C fino al momento del processo estrattivo. Il metodo utilizzato per l'estrazione di isomeri dell'HCH da tale matrice è stato il metodo IRSA 5090¹⁴¹ che consiste in una estrazione in fase solida con cartucce C18. Inizialmente la colonna è stata condizionata con 10 ml di una miscela di diclorometano/metanolo=80:20 e successivamente riempita con 4 ml di metanolo lasciando, ogni volta, eluire il solvente fino all'approssimarsi del menisco della fase liquida alla fase assorbente. Si è caricato, quindi, il campione, pari a 500 ml di acqua e si è lasciato eluire fino a mandare la colonna a secco, per evitare di recuperare acqua nella fase successiva. Quando la colonna si è asciugata completamente, si è eluito con 10 ml di una miscela di diclorometano/metanolo=80:20 e successivamente con 4 ml di metanolo. Gli estratti organici recuperati, sono stati concentrati per distillazione a pressione ridotta, alla temperatura di 35°C, fino ad un volume di 5 ml dal quale il solvente è stato allontanato completamente utilizzando un leggero flusso di N₂ a temperatura ambiente. L'estratto finale ottenuto è stato solubilizzato in 1ml di esano.

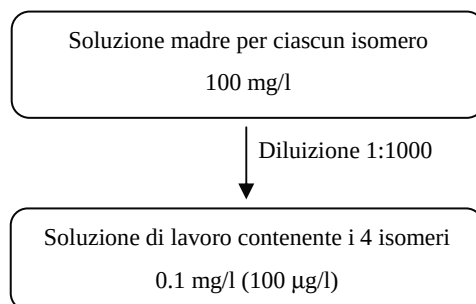
Soprassuolo ed unifeed. Tali matrici sono state inizialmente sottoposte a pre-trattamento (essiccamento a T<40°C e sminuzzatura/macinazione) al fine di ridurli allo stato di polvere. Successivamente sono stati sottoposti ad estrazione, utilizzando il metodo EPA 3550C.¹⁴² In accordo con tale metodo, il campione da analizzare (10g) è stato posto in una beuta nella quale sono stati aggiunti 25 ml di una miscela acetone/esano=1:1. Tale miscela è stata sonicata per 3 minuti, al termine dei quali l'estratto è stato fatto decantare (10 minuti) per poi essere filtrato all'interno di una falcon. Il processo appena descritto, è stato ripetuto per altre due volte, al termine delle quali gli estratti recuperati sono stati centrifugati ad una bassa velocità, lasciando successivamente decantare (10 min). L'estratto raccolto, è stato concentrato per distillazione a pressione ridotta, alla temperatura di 35°C, fino ad ottenere un volume finale di circa 5 ml. La soluzione ottenuta è stata trasferita in una falcon e sottoposta SPE. Nonostante, il metodo EPA non riporti tale fase, il passaggio è sembrato necessario al fine di ottenere un estratto ottimale per l'analisi GC-ECD. Come riportato in letteratura,¹⁴³ le cartucce florisil Superclean ENVI, utilizzate per l'estrazione in fase solida, sono state prima condizionate utilizzando 10 ml di una miscela esano/acetato di etile=80:20, facendo eluire il solvente fino a portare la colonna a secco. Quando la colonna si è asciugata completamente, si è caricato il campione facendo eluire il solvente fino all'approssimarsi del menisco della fase liquida alla fase assorbente. Si è eluito, quindi, con 10 ml di una miscela esano:acetato di etile=80:20. Gli estratti organici recuperati, sono stati concentrati per distillazione a pressione ridotta, alla temperatura di 35°C, fino ad un volume di 5 ml dal quale il solvente

è stato allontanato completamente utilizzando un leggero flusso di azoto a temperatura ambiente. L'estratto finale ottenuto è stato solubilizzato in 1ml di esano.

Vegetali, uova, carne, miele e conserve. L'estrazione degli isomeri dell'HCH in matrici alimentari è stata effettuata utilizzando il metodo UNI EN 15662:2009.¹⁴⁴ In accordo a tale metodo, il campione da analizzare (10 g) è stato introdotto in un tubo da centrifuga da 50 ml e sono stati aggiunti 10 ml di acetonitrile, e una miscela di sali per estrazione che conteneva 4 g di MgSO₄, 1 g di NaCl, 1 g di sodio citrato diidrato e 0.5 g di sodio citrato sesquidrato. La miscela ottenuta è stata, quindi, centrifugata alla velocità di 3000 giri per 5 minuti. E' seguita, quindi, la fase di purificazione del campione, dove il surnatante, ottenuto dalla fase estrattiva, è stato trasferito in una falcon contenente carbone attivo. Dalla nuova miscela sono stati prelevati 5 ml di estratto seccati grazie ad un leggero flusso di N₂. L'estratto finale ottenuto è stato solubilizzato in 1ml di esano.

4.3 Determinazione degli HCH tramite gas-cromatografia

Per arrivare a stabilire una metodica valida a determinare i contaminanti di interesse nelle matrici oggetto di studio, è stato necessario individuare le condizioni gas-cromatografiche ottimali che permettessero di separare gli isomeri α , β , γ e δ -HCH. A tale scopo, è stata preparata una soluzione madre per ciascuno standard pesando 10 mg di α , β , γ e δ -HCH solubilizzati in 100 ml di esano, ottenendo una concentrazione finale, per ciascuno di essi, di 100 mg/l. Da queste, è stata preparata una soluzione di lavoro contenente tutti gli isomeri alla concentrazione di 0.1 mg/l (100 μ g/l) che è stata iniettata al GC-ECD (*Schema 1*).



Schema 1. Preparazione della soluzione di lavoro contenente gli isomeri α , β , γ e δ -HCH per le analisi GC-ECD.

Dopo varie prove sperimentali, la programmata di temperatura ottimale che ha permesso una buona separazione dei 4 isomeri dell'HCH è risultata essere quella riportata in *Tabella 13*.

Tabella 13. Programmata utilizzata nelle analisi degli HCH tramite GC-ECD.

<i>Gradiente (°C/min)</i>	<i>T(°C)</i>	<i>T(min)</i>
--	150	0
4	250	0
20	320	2

In *Tabella 14* sono riportati i corrispondenti tempi di ritenzione dei 4 isomeri e in *Figura 46*, è mostrato il cromatogramma ottenuto dall'analisi GC-ECD, per la soluzione di lavoro 100 µg/l, nel quale è possibile distinguere chiaramente i 4 isomeri.

Tabella 14. Tempi di ritenzione di α , β , γ e δ -HCH analizzati tramite GC-ECD.

Isomero	t_R
α -HCH	9.115
γ -HCH	10.331
β -HCH	10.764
δ -HCH	11.771

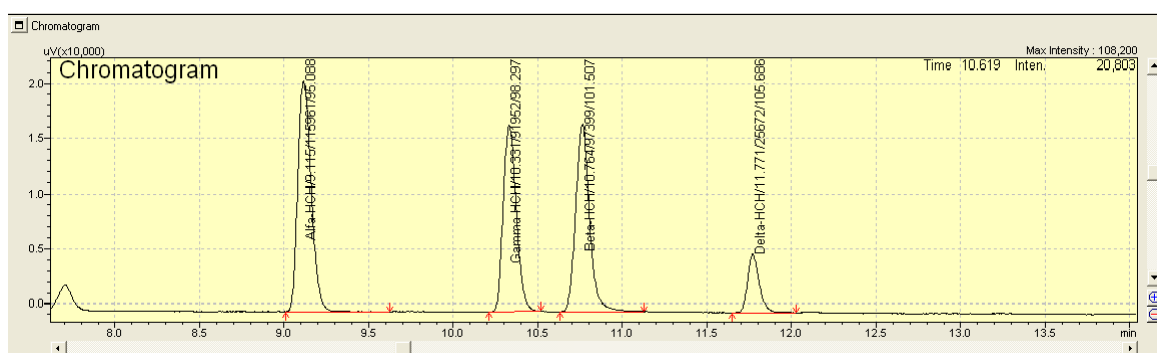
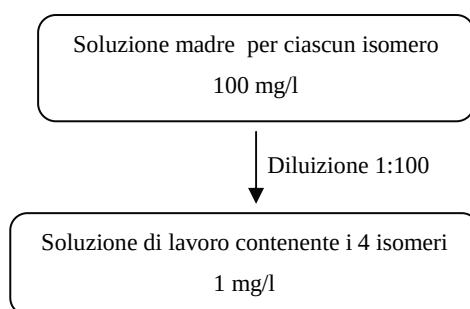


Figura 46. Cromatogramma degli isomeri α , β , γ e δ -HCH alla concentrazione di 100 µg/l.

Un analogo studio è stato condotto tramite GC-MS. Dalle soluzioni madre precedentemente preparate (100 mg/l) è stata ottenuta una soluzione di lavoro dei quattro isomeri con concentrazione pari a 1mg/l (*Schema 2*).



Schema 2. Preparazione della soluzione di lavoro contenente gli isomeri α , β , γ e δ -HCH per le analisi GC-MS.

Tale soluzione iniettata al GC-MS ha permesso di individuare la programmata di temperatura che ottimizzasse la separazione dei picchi (*Tabella 15*). In *Tabella 16*, sono riportati i tempi di ritenzione degli standard e gli ioni di riferimento, e in *Figura 47*, è mostrato lo spettro di massa ottenuto dall'analisi GC-MS con la frammentazione dei picchi alla concentrazione di 1mg/l.

Tabella 15. Programmata utilizzata nelle analisi GC-MS.

Gradiente (°C/min)	T (°C)	t (min)
--	100	0.75
35	210	0
3	240	0
20	300	1

Tabella 16. Parametri analitici di α , β , γ e δ -HCH ricavati tramite GC-MS.

Isomero	t_R	Ione principale (Abbondanza %)	Ione secondario (Abbondanza %)	Ione secondario (Abbondanza %)
α -HCH	5.378	180.9 (100)	218.9 (81.5)	110.9 (48.7)
β -HCH	5.668	180.9 (100)	108.9 (91.0)	218.9 (90.5)
γ -HCH	5.761	180.9 (100)	218.9 (79.8)	110.9 (68.8)
δ -HCH	6.125	180.9 (100)	218.9 (90.2)	111.0 (69.1)

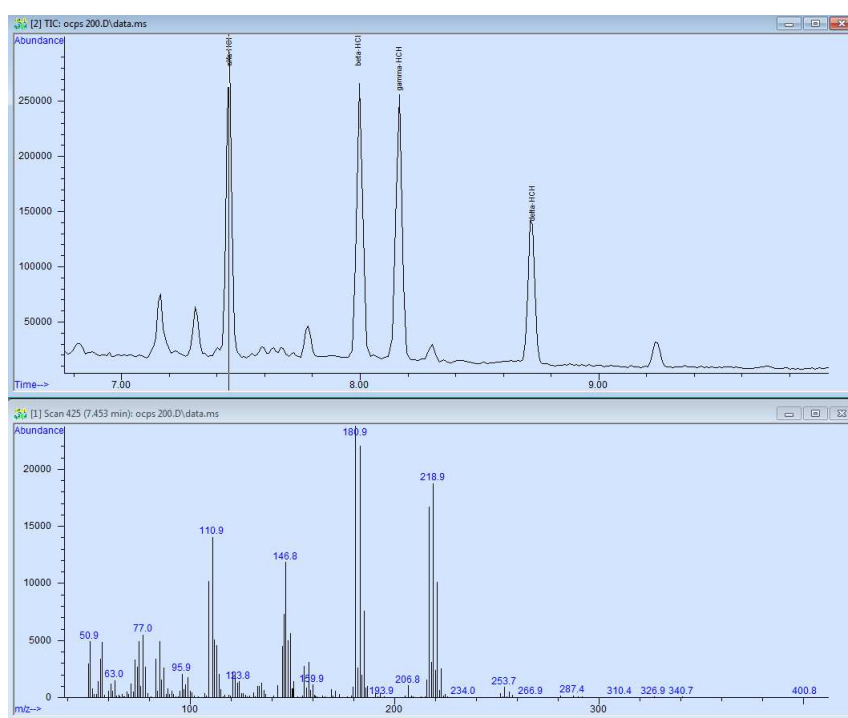
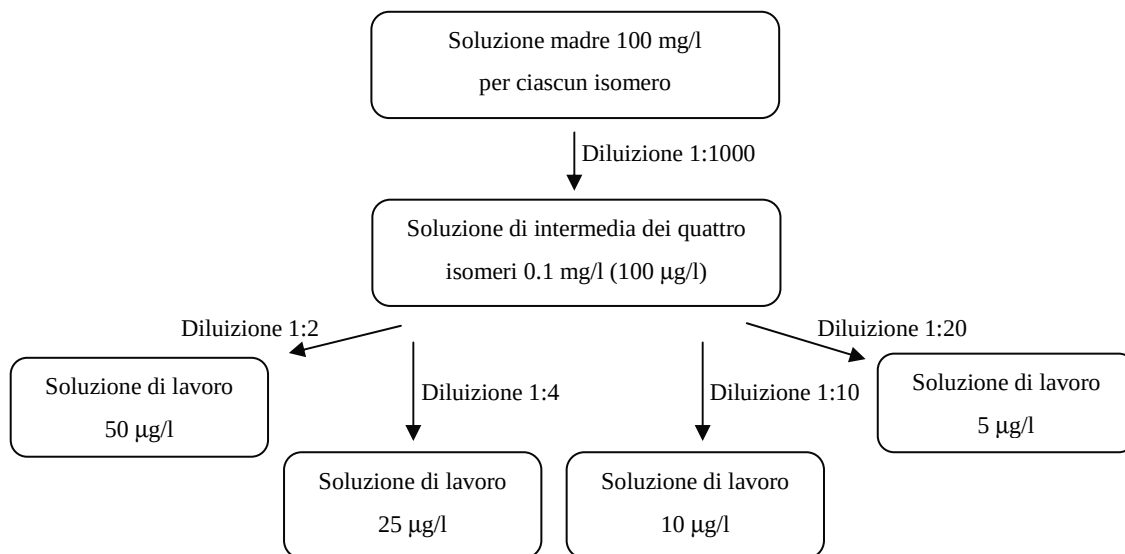


Figura 47. Spettro di massa degli isomeri α , β , γ e δ -HCH alla concentrazione di 1mg/l.

Per la determinazione quantitativa degli isomeri α , β , γ e δ -HCH tramite analisi GC-ECD sono state costruite due rette di calibrazione al fine di coprire un range di concentrazione da 5 a 500 $\mu\text{g/l}$ utilizzando il metodo dello standard esterno. Per la prima retta di calibrazione, si è proceduto alla preparazione di una serie di soluzioni standard partendo dalle soluzioni madre preparate per l'identificazione dei t_R dei 4 isomeri, in cui la concentrazione per ogni isomero è pari a 100 mg/l (Schema 3). Da queste, è stata preparata la soluzione intermedia unica, contenente i quattro isomeri dell'HCH, alla concentrazione 0.1mg/l (100 $\mu\text{g/l}$) e quindi le soluzioni di lavoro, ottenute attraverso una serie di diluizioni, con concentrazioni da 5 a 50 $\mu\text{g/l}$.



Schema 3. Preparazione delle soluzioni standard per la prima retta di calibrazione.

Per ogni soluzione sono state effettuate 3 iniezioni, alternando un bianco nel passaggio da una concentrazione e l'altra ottenendo, per tutti gli isomeri, modelli di calibrazione altamente lineari ($r^2=0.999$). A titolo di esempio viene riportata la retta ottenuta per l' α -HCH (Figura 48).

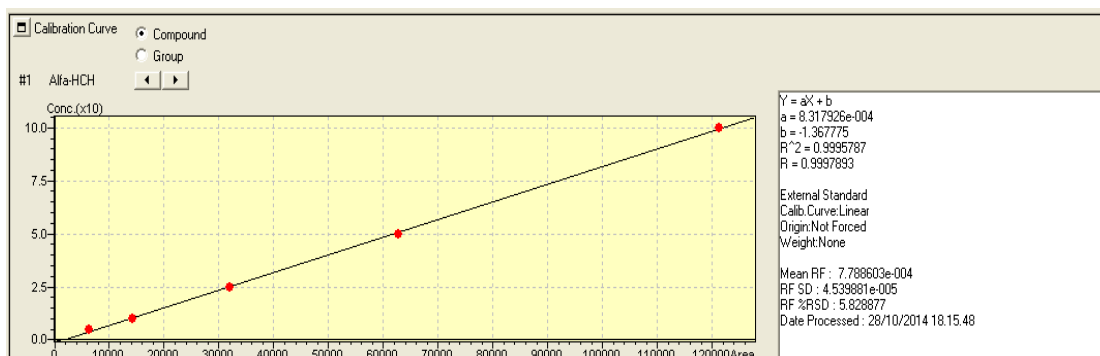
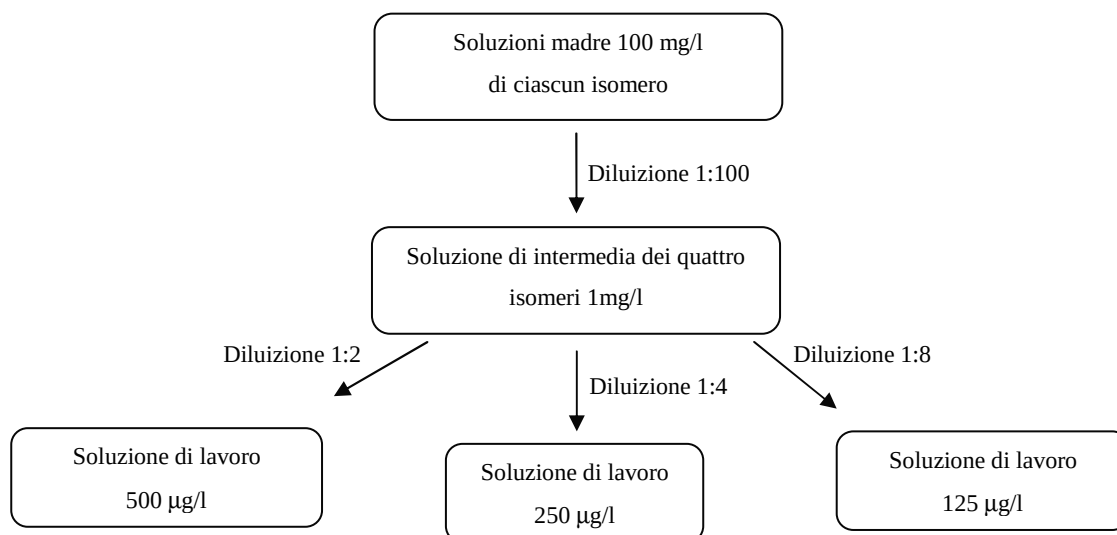


Figura 48. Prima retta di calibrazione ottenuta per l'isomero α -HCH

Per la seconda retta di calibrazione, dalle soluzioni madre precedentemente preparate per ciascun isomero alla concentrazione di 100 mg/l è stata ottenuta una soluzione intermedia unica di 1 mg/l dalla quale sono state preparate le successive soluzioni di lavoro con concentrazioni da 125 a 500 µg/l come mostrato nello Schema 4.



Schema 4. Schema di preparazione delle soluzioni standard per la seconda retta di calibrazione

Anche in questo caso, per ogni soluzione sono state effettuate 3 iniezioni alternando un bianco nel passaggio da una concentrazione e l'altra ottenendo, per tutti gli isomeri, modelli di calibrazione altamente lineari ($r^2 = 0.999$). A titolo di esempio viene riportata la retta ottenuta per l' α -HCH (Figura 49).

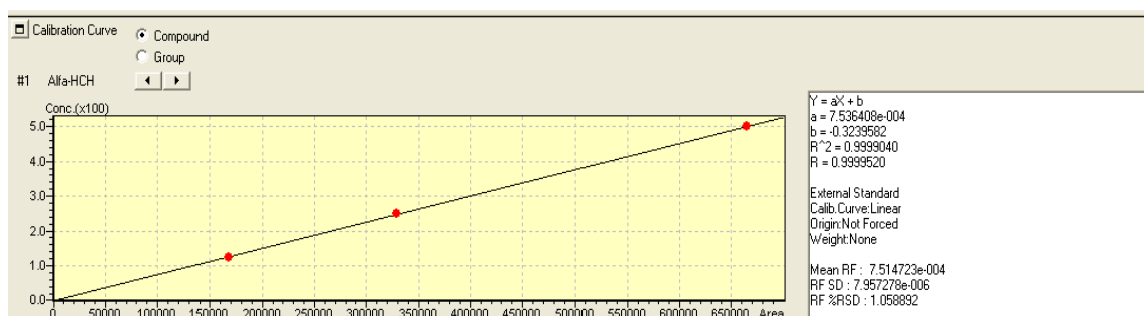
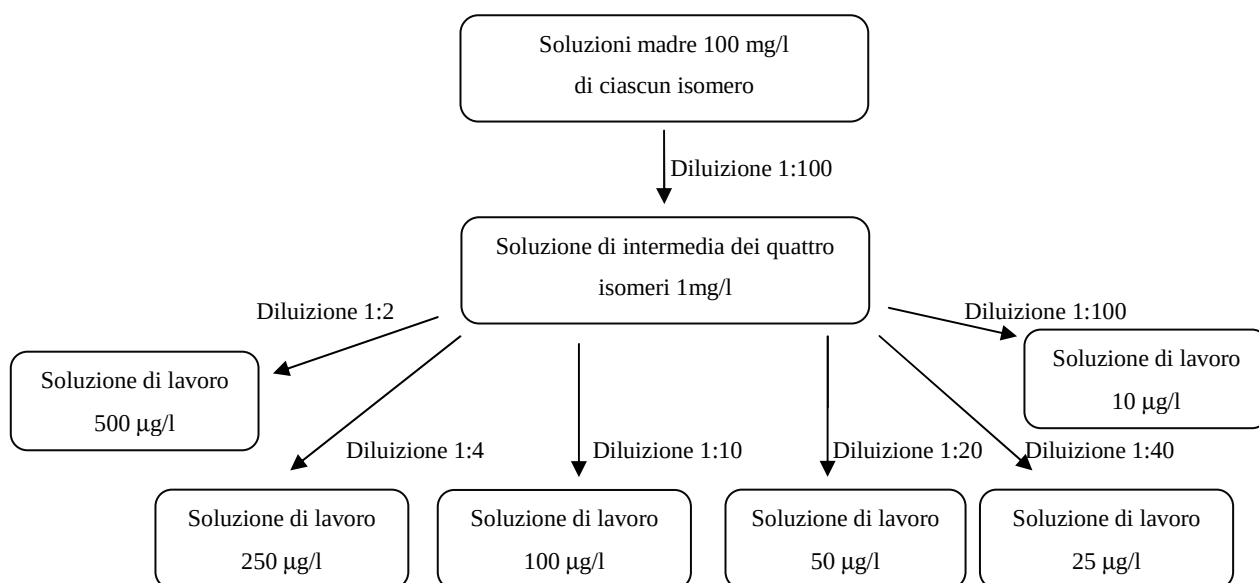


Figura 49. Seconda retta di calibrazione ottenuta per l' α -HCH

Un analogo lavoro è stato condotto per la costruzione della retta di calibrazione per il GC-MS coprendo in un range di concentrazione da 500 a 10 $\mu\text{g/l}$. Anche in questo caso dalle soluzioni madre di ciascun isomero precedentemente preparate (100 mg/l) è stata ottenuta una soluzione intermedia unica (1mg/l), dalla quale attraverso una serie di diluizioni (Schema 5) sono state preparate le soluzioni di lavoro 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/l}$ ottenendo per i singoli isomeri modelli di calibrazione altamente lineari ($r^2 = 0.99$).



Schema 5. Schema di preparazione delle soluzioni standard per la retta di calibrazione del GC-MS

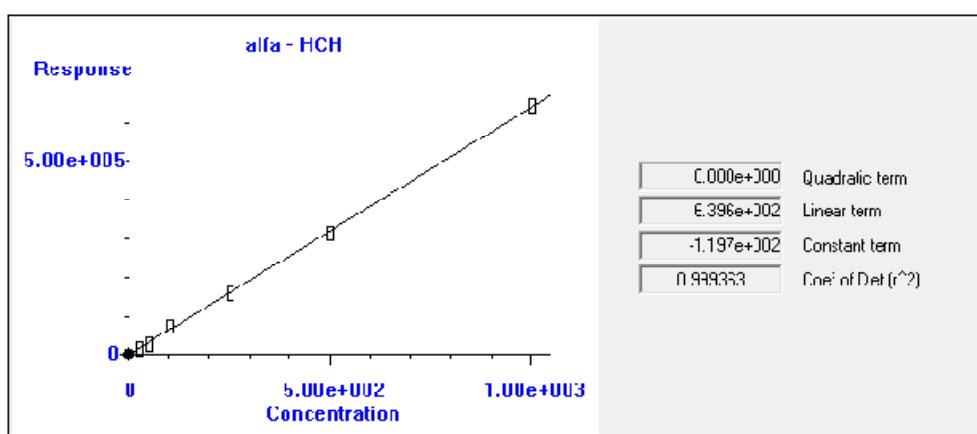


Figura 50. Retta di calibrazione ottenuta al GC-MS per l' α -HCH.

Calcolo del Limite di Determinazione (LOD) e del Limite di Quantificazione (LOQ). In base alla definizione riportata nel metodo ISO 11843, si definisce Limite di Rilevabilità (LOD) “la più bassa concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco che può essere rilevato con un certo grado di sicurezza, ma non necessariamente determinato quantitativamente”.

A tale scopo, prima di procedere all'analisi dei campioni prelevati nell'area oggetto di studio, 10 campioni di ciascuna matrice raccolti in un'azienda non contaminata da α , β , γ e δ -HCH (situata nel comune di Roiate (RM)) sono stati sottoposti alle corrispondenti procedure analitiche di estrazione e iniettati al GC-ECD al fine di misurare i rumori di fondo del segnale cromatografico, nell'intorno dei tempi di ritenzione degli standard. Le prove effettuate non hanno mostrato la presenza di interferenze con i picchi di assorbimento dei composti di interesse. A seguito di tali evidenze per ciascun isomero sono

state preparate ed iniettate in triplicato al GC-ECD, soluzioni di standard a concentrazione decrescente (1-10 µg/l) prossime ad un presunto LOD.¹⁴⁵ I risultati ottenuti hanno permesso di rilevare un picco significativo per gli isomeri α , β e γ alla concentrazione iniettata di 3 µg/l e per l'isomero δ alla concentrazione di 8 µg/l, con altezza dalla mediana pari rispettivamente a 4,1 (α , β e γ) e 4,7 volte l'altezza del rumore di fondo (δ). Di conseguenza il valore dell'LOD è risultato essere pari a 2 µg/l per l' α , il β , e il γ -HCH e 5 µg/l per l'isomero δ . Di conseguenza il valore dell'LOD è risultato essere pari a 2 µg/l per l' α , il β , e il γ -HCH e 5 µg/l per l'isomero δ .

Il Limite di quantificazione (LOQ) definito come “la minima concentrazione di analita quantificabile” è stato calcolato, nel nostro caso, come 3.3 LOD.

Un analogo lavoro è stato condotto per l'individuazione dell'LOD e dell'LOQ per il GC-MS. Anche in questo caso sono state preparate ed iniettate in triplicato al GC-MS soluzioni di standard a concentrazione decrescente (5-20 µg/l) prossime ad un presunto LOD.

I risultati ottenuti hanno permesso di rilevare un picco significativo per gli isomeri α , β e γ alla concentrazione iniettata di 12 µg/l e per l'isomero δ alla concentrazione di 22 µg/l con altezza dalla mediana pari a 4.5 volte l'altezza del rumore di fondo. Di conseguenza il valore dell'LOD è risultato essere pari a 8 µg/l per l' α , il β e il γ e 15 µg/l per l'isomero δ . Il limite di quantificazione (LOQ) è stato calcolato come 3.3 LOD.

I campioni pretratti come indicato nei paragrafi precedenti sono stati iniettati (1µl) sia in GC-ECD che in GC-MS utilizzando un autocampionatore, alternando un bianco (esano) ogni campione per evitare il cosiddetto “effetto memoria” e l'accumulo in colonna di eventuali composti poco volatili presenti nella matrice. Ciascun campione è stato iniettato tre volte per ottenere un valore medio, espressione di un dato analitico attendibile.

4.4 Elaborazioni statistiche dei dati gas-cromatografici

I dati ricavati sono stati elaborati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) attraverso il programma STATISTICA 10 (StatSoftInc., USA).

4.4 Determinazione degli HCH tramite spettroscopia micro-FTIR

La determinazione degli isomeri dell'HCH nelle carote di pioppo tramite micro-FTIR è stata svolta presso il Laboratorio di Diagnostica per la Conservazione ed il Restauro del DISBEC (Responsabile: Dott.ssa Claudia Pelosi). Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando un microscopio IR Nicolet Centaurus equipaggiato con un rivelatore MCT e collegato ad un Nicolet Avatar 360 trasformata di Fourier Spettrometro (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) con il quale sono state effettuate analisi stratigrafiche (cross-section) in successione degli anelli, esaminati anno per anno dal 1991 al 2008 di ciascuna carota di pioppo. In particolare, per ciascuna area del campione sono state registrate 128 scansioni nell'intervallo spettrale $600-4000\text{ cm}^{-1}$ in modalità riflessione con una risoluzione di 4 cm^{-1} . I dati spettrali sono stati raccolti con il software Omnic 8.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Per la “contaminazione artificiale” del bianco rappresentato da carote di pioppo provenienti da un sito non contaminato (Viterbo), su ogni anello esaminato è stata aggiunta una goccia di una soluzione in esano contenente 5 mg di ciascun isomero α , β , γ e δ -HCH. Dopo evaporazione del solvente, il campione è stato analizzato tramite micro-FTIR.

5. BIBLIOGRAFIA

- ¹ De Vecchis, G. *Per una geografia del Lazio*. Kappa, Roma, **2007**, pp. 9-12 e 70-91.
- ² Proia, N. *La terra del Sacco e dei Lepini: monografia storico-ecologica su due nostre perle paesaggistiche: i monti Lepini e il fiume Sacco*. Comune di Anagni, **1995-1997**.
- ³ Il gruppo industriale BPD, Stabilimento Arti Grafiche A. Pizzi s.p.a., Milano, **1962**, pp. 11.
- ⁴ Colajacomo, A. *Lineamenti per una storia di Colferro*. Roma, **1967**, pp. 180-184.
- ⁵ Baris, T.; Casmirri, S. *Un potere locale tra seconda guerra mondiale e dopoguerra: strategie e orientamento della chiesa ciociara tra il 1943 e il 1948 in: lo Stato in periferia*. **2003**, Università degli Studi di Cassino, Viella, Roma.
- ⁶ Battista, F. *Dal nucleo di industrializzazione all'area di sviluppo della provincia di Frosinone*. In "La giornata dell'industria". Atti del Convegno, **1968**, Cassino, pp.11-13.
- ⁷ Mastracco, F.; Pompeo, C. *Consorzio per l'area di sviluppo industriale della provincia di Frosinone*. **1981**. Tipografia Pasquarelli, Sora, pp. 38-40.
- ⁸ Archivio di Stato di Frosinone, Prefettura, II Vers., Serie I, b. 1252, f. *Scarichi industriali*, s.f. *Inquinamento fiume Sacco*.
- ⁹ Scarichi industriali, s.f. *Ditta Annunziata*, Prefettura, II Vers., Serie I, b. 1252.
- ¹⁰ Industria, ambiente e territorio. *Per una storia ambientale delle aree industriali italiane*, Il Mulino, **2009**, Bologna, pp. 124-127.
- ¹¹ Frosinone, esposti inquinamento e Ceccano, contenente il sottofascicolo Clipper Oil, in: ASF, Prefettura, V vers., b. "ce-g". Cfr. ASF, Prefettura, II vers., b. 1182, f. Contributi alla provincia da parte della "Isveimer".
- ¹² ASF, Prefettura, II Vers., serie I, b. 1252, f. *Scarichi industriali*.
- ¹³ Iannucci, F. *Licenza di inquinare*, in "Il Messaggero", 5 luglio 1985. Cfr. Interrogazione parlamentare dell'On. Fini del 14 maggio 1985, in ASF, Prefettura, V vers., b. *Inquinamento*, f. *Bacino fiume Sacco*.
- ¹⁴ Ruzzenenti, M.; http://www.industriaeambiente.it/schede/valle_del_sacco/, **2013**.
- ¹⁵ Scavia, G.; Babsa, S.; Sala, M. IV Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria, Epidemiologia: strumenti per conoscere, agire e decidere in Sanità Pubblica Veterinaria, 11-12 dicembre **2008**, Università degli Studi "Sapienza" Roma.
- ¹⁶ Mataloni, C.; <http://www.sinforma.smplhost.com/cittadini/>, **2013**. *Fusti tossici nella Valle del Sacco: anni di ordinaria follia*.
- ¹⁷ *Ambiente e salute nelle attività del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente: esperienze, nuove sfide e proposte operative*. XII Conferenza del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, **2014**, Atti a Convegno, Brindisi.
- ¹⁸ Relazione attività. Settembre **2011**. Comune di Colferro. Sito di Interesse Nazionale del Bacino del Fiume Sacco.
- ¹⁹ Relazione tecnica delle attività condotte nel quadro del progetto "Salute della popolazione nell'area della Valle del Sacco" "Azioni di controllo, monitoraggio e informazione ambientale". **2010-2013**, Dipartimento di Epidemiologia della ASL Roma E.
- ²⁰ Pirastu, R.; Gruppo di lavoro Sentieri. *Progetto Sentieri- Studio epidemiologico nazionale dei territori e degli insediamenti esposti a rischio da inquinamento*, **2011**. Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin, Sapienza Università di Roma.
- ²¹ Rapiti, E.; Fantini, F.; Dell'Orco, V.; Fano, V.; Blasetti, F.; Bracci, C.; Forastiere, F.; Comba, P. Cancer mortality among chemical workers in an Italian plant. *Eur. J. Epidemiol.* **1997**, *13*, 281-285.
- ²² Blasetti, F.; Bruno, C.; Comba, P.; Fantini, F.; Grignoli, M. Studio di mortalità dei lavoratori addetti alla costruzione di carrozze ferroviarie a Colferro. *Med. Lav.* **1990**, *81*, 407-413.
- ²³ Palange, S.; Ascoli, V.; Carnovale-Scalzo, C.; Forastiere, F.; D'Ippoliti, D.; Lo Presti, E.; Di Domenicantonio, R.; Pasetto, R.; Perucci, C.A. Stime di incidenza del mesotelioma pleurico nel Lazio. *Med. Lav.* **2004**, *95*, 45-54.
- ²⁴ Wrensch, M.; Bondy, M.L.; Wiencke, J. Environmental risk factors for primary malignant brain tumors: a review. *J. Neurooncol.* **1993**, *17*, 47-64.
- ²⁵ Garabrant, D.H.; Held, J.; Langholz, B. DDT and related compounds and risk of pancreatic cancer. *J. Nat. Cancer Inst.* **1992**, *84*, 764-771.
- ²⁶ Saracci, R.; Kogevinas, M.; Bertazzi, P.A. Cancer mortality in workers exposed to chlorophenoxy herbicides and chlorophenols. *Lancet.* **1991**, *338*, 1027-1032.
- ²⁷ Semchuk, K.; Love, E. Effects of agricultural work and other proxy-derived case-control data on Parkinson's disease risk estimates. *Am. J. Epidemiol.* **1995**, *141*, 747-754.
- ²⁸ Rogan, W.J.; Gladen, B.C. PCBs, DDE, and child development at 18 and 24 months. *Ann. Epidemiol.* **1991**, *1*, 407-413.
- ²⁹ Sestini, P.; De Sario, M.; Bugiani, M.; Bisanti, L.; Giannella, G.; Kaisermann, D.; Frasca, G.; Lombardi, E.; Petronio, M.G.; Dell'Orco, V.; Indinnimeo, L.; Brunetti, L.; La Grutta, S.; Gruppo Collaborativo SIDRIA-2. *Epidemiologia & Prevenzione* **2005**, *29* (2 Suppl), 24-31.
- ³⁰ Consiglio Nazionale delle Ricerche. Piano triennale di attività del CNR 2008-2011. Dipartimento di Biologia Agro-ambientale, Roma.
- ³¹ Jones, K.C.; De Voogt, P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environ. Poll.* **1999**, *100*, 209-221.
- ³² Tanabe, S.; Iwata, H.; Tatsukawa, R. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Sci. Total Environ.* **1994**, *154*, 163-177.
- ³³ Willett, K. L.; Ulrich, E. M.; Hites, R. A. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 2197-2207.
- ³⁴ Buser, H.; Muller, M.D. Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 664-672.
- ³⁵ Chessels, M.J.; Haweker, D.W.; Connell, D.W.; Papajcsik, I.A. Factor influencing the distribution of lindane and isomers in soil of an agricultural environment. *Chemosphere* **1988**, *17*, 1741-1749.
- ³⁶ Malaiyandi, M.; Shah, S.M. Factors Influencing the Distribution of Lindane and Other Hexachlorocyclohexanes in the Environment. *J. Environ. Sci.* **1984**, *A19*, 887-910.

- ³⁷ Deo, P.G.; Hansan, S.B.; Majumder, S.K. Isomerization of γ -HCH in aqueous solution. *J. Environ. Sci. Health.* **1980**, *15*, 147-164.
- ³⁸ Benezet, H.J.; Matsumura, F. Isomerization of γ -HCH to β -HCH in the environment. *Nature* **1973**, *243*, 480-481.
- ³⁹ Vonk, J.W.; Quirijns, J.K. Anaerobic formation of α -hexachlorocyclohexane from γ -hexachlorocyclohexane in soil and by *Escherichia coli*. *Pest. Biochem. Physiol.* **1979**, *12*, 68-74.
- ⁴⁰ Smith, A.G. Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. *Hand. Pesti. Toxicol.* **1991**, *2*, 731-915.
- ⁴¹ Traina, M. E.; Urbani, E.; Rescia, M.; Mantovani, A. L'insetticida lindano: identificazione dei rischi possibili per la riproduzione umana. *Rapporti Istisan*, **2001**, 3-6.
- ⁴² Walker, K.; Vallero, D. A.; Lewis, R. G. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 4373-4378.
- ⁴³ Li, Y. F.; McMillan, A.; Scholtz, M. T. Global HCH usage with 1° x 1° Longitude/Latitude Resolution *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 3525-3533.
- ⁴⁴ Breivik, K.; Pacyna, J. M.; Münch, J. Use of α -, β -, γ - esachlorocyclohexane in Europe. *Sci. Tot. Environ.* **1999**, *239*, 151-163.
- ⁴⁵ Li, Y. F. Spatial Distribution of Hexachlorocyclohexanes in Agricultural Soils in Zhejiang Province, China, and Correlations with Elevation and Temperature. *Sci. Tot. Environ.* **1999**, *232*, 121-158.
- ⁴⁶ Li, Y.F. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Sci. Tot. Environ.* **1999**, *232*, 121-158.
- ⁴⁷ Barrie, L.A.; Gregor, D.; Hargrave, B.; Lake, R.; Muir, D.; Shearer, R.; Tracey, B.; Bidelman, T. Arctic contaminants: sources, occurrence and pathways. *Sci. Tot. Environ.* **1992**, *122*, 1-74.
- ⁴⁸ Bossi, R.; Larsen, B.; Premazzi, G. Polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in bottom sediment cores of lake Garda (Italy). *Sci. Tot. Environ. Poll.* **1992**, *121*, 77-93.
- ⁴⁹ Kalajzic, T.; Bianchi, M.; Muntai, H.; Kettrup, A. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in the sediments of an Italian drinking water reservoir. *Chemosphere* **1998**, *36*, 1615-1625.
- ⁵⁰ Poletti, A.; Proietti, G.; Murgia, S.M.; Selvaggi, R.; Poletti, L.; Ludovisi, A. Interference from sulfur in chlorinated pesticides gas chromatographic analysis in lake sediments. *Annali di Chimica.* **2000**, *90*, 503-507.
- ⁵¹ Galassi, S.; Viganò, L.; Sanna, M. Bioconcentration of organochlorine pesticides in rainbow trout caged in the river Po. *Chemosphere* **1996**, *9*, 1729-1739.
- ⁵² Breivik, K.; Pacyna, J. M.; Münch, J. Use of α -, β -, γ - esachlorocyclohexane in Europe. *Sci. Tot. Environ.* **1999**, *239*, 151-163.
- ⁵³ Hayes, W.J.; Laws, E.R., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, **1991**, pp 731-745.
- ⁵⁴ Rosa, R.; Rodriguez-Farre, E.; Sanfeliu, C.J. Cytotoxicity of hexachlorocyclohexane isomers and cyclodienes in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 1930-1933.
- ⁵⁵ Pomes, A.; Rodriguez-Farre, E.; Sunol, C. Lindane cytotoxicity in cultured neocortical neurons is ameliorated by GABA and flunitrazepam. *Dev. Brain Res.* **1993**, *73*, 85-89.
- ⁵⁶ Srinivasan, K.; Ramesh, H.P.; Radhakrishnamurty, R. Factors responsible for increased excitability of dentate gyrus granule cells during exposure to lindane. *J. Environ. Sci. Health.* **1984**, *19*, 456-466.
- ⁵⁷ Van Velsen, F.L.; Danse, L.H.J.C.; Van Leewen, F.X.R.; Dormans, J.A.M.A.; Van Longten, M.J. The subchronic oral toxicity of the β -isomer of hexachlorocyclohexane in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1986**, *6*, 697-712.
- ⁵⁸ Ceron, J.J.; Panizo, C.G.; Montes, A. Toxicological effects in rabbits induced by endosulfan, lindane, and methylparathion representing agricultural byproducts contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, *54*, 258-265.
- ⁵⁹ Kumar, A.; Dwivedi, P.P. Relative induction of molecular forms of cytochrome P-450 in γ -hexachlorocyclohexane exposed rat liver microsomes. *Arch. Toxicol.* **1988**, *64*, 479-481.
- ⁶⁰ Agrawal, D.; Sultana, P.; Gupta, G.S. Influence of hexachlorocyclohexane on phosphoinositides in rat erythrocyte membranes and brain. *Food. Chem. Toxicol.* **1991**, *29*, 459-462.
- ⁶¹ Prasad, A.K.; Pant, S.C.; Kumar, R.; Srivastava, S.P. Reproductive toxicity and tissue concentrations of lindane in adult male rats. *Human Exp. Toxicol.* **1995**, *14*, 484-488.
- ⁶² Alm, H.; Tiemann, U.; Torner, H. Influence of organochlorine pesticides on development of mouse embryos in vitro. *Reprod. Toxicol.* **1996**, *10*, 321-326.
- ⁶³ Loeber, J.G.; Van Velsen, F.L. Structure-Activity Relationships of Chemicals Causing Endocrine, Reproductive, Neurotoxic, and Oncogenic Effects. *Food. Addit. Contam.* **1984**, *1*, 63-66.
- ⁶⁴ Bigsby, R.M.; Caperell-Grant, A.; Madhukar, B.V. Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 865-869.
- ⁶⁵ Sumpter, J.P.; Jobling, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* **1995**, *103*, 173-178.
- ⁶⁶ Lazier, C.B.; MacKay, M.E. Vitellogenin gene expression in teleost fish. *Biochemistry and molecular biology of fishes, Vol.2*; Hochachka, Mommsen, Eds; Elsevier Science Publishers: Amsterdam. **1993**, pp 391-405.
- ⁶⁷ Steinmetz, R.; Young, P.C.M.; Camperell-Grant, A.; Gize, E.A.; Madhukar, B.V.; Ben-Jonathan, N.; Bigsby, R.M. Novel estrogenic action of the pesticide residue β -hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 5403-5409.
- ⁶⁸ Mallatou, H.; Pappas, C.P.; Kondyli, E.; Albanis, T.A. Pesticide residues in milk and cheeses from Greece. *Sci. Tot. Environ.* **1997**, *196*, 111-120.

- ⁶⁹ Brassow, H.; Baumann, K.; Lehnert, G. Occupational exposure to hexachlorocyclohexane: II. Health conditions of chronically exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Heal.* **1981**, *48*, 81-87.
- ⁷⁰ Walsh, L.P.; Stocco, D.M. Effects of lindane on steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression. *Biol. Reprod.* **2000**, *63*, 1024-1033.
- ⁷¹ Jung, D.; Becher, H.; Edler, L.; Flesch-Janys, D.; Gurn, P.; Konietzko, J.; Manz, A.; Papke, O.J. Elimination of β -hexachlorocyclohexane in occupationally exposed persons. *Toxicol. Environ. Heal.* **1997**, *51*, 23-34.
- ⁷² Feldmann, R.J.; Maibach, H.I. Toxicol. Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Appl. Pharm.* **1974**, *28*, 126-132.
- ⁷³ Bigazzi Grasso, C.; Capei, R.; Marottini, E. Aspetti attuali del problema dei residui di insetticidi, *Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunità.* **1989**, *1*, 741-752.
- ⁷⁴ Wania F.; Mackay D. Measurement of the vapor pressure of several low volatility organochlorine chemicals at low temperature with a gas saturation method. *Chemosphere* **1993**, *22*, 10-18.
- ⁷⁵ Kar, S.; Singh P. K. Detoxification of Pesticides Carbofuran and Hexachlorocyclohexane by blue green algae *Nostoc muscorum* and *Wolfeabharadwajae*. *Microb. Lett.* **1979**, *32*, 115-120.
- ⁷⁶ Macholz, R. M.; Kujawa M. Recent state of lindane metabolism. *Res. Rev.* **1985**, 119-149.
- ⁷⁷ Ngabe, B.; Bidleman, T. F.; Falconer, R. L. Base Hydrolysis of α - and γ -Hexachlorocyclohexanes, *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 1930-1933.
- ⁷⁸ MacRae, I. C.; Raghu, K.; Castro, T. F.J. Persistence and biodegradation of four common isomers of benzene hexachloride in submerged soils. *Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 911-914.
- ⁷⁹ Sahu S.K.; Patnaik K.K.; Bhuyan S.; Sethunathan N. Mineralization of α -isomer, γ -isomer and β -isomer of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Soil Biol. Biochem.* **1993**, *25*, 387-391.
- ⁸⁰ Heinisch, E.; Jonas K.; Klein S. HCH isomers in soil and vegetation from the surroundings of an industrial landfill of the former GDR. *Sci. Tot. Environ.* **1993**, *134*, 151-159.
- ⁸¹ Liu, X.; Peng, P. A.; Fu, J.; Huang, W. Effects of FeS on the transformation kinetics of γ -hexachlorocyclohexane. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 1822-1828.
- ⁸² Baber, J.L.; Kurt, P.B.; Thomas, G.O.; Jones, K.C. Air-side and plant-side resistances influence the uptake of airborne PCBs by evergreen plants. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 4282-4287.
- ⁸³ Miur, D.C.G.; Segstro, M.D.; Welbourn, P.M.; Toom, D.; Eisenreich, S.J.; McDonald, C.R.; Whelpdale, D.M. Patterns of accumulation of airborne organochlorine contaminants in lichens from the upper great lakes region of Ontario. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 1201-1210.
- ⁸⁴ Simonich, S.L.; Hites, R.A. Vegetation: atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 939-943.
- ⁸⁵ Paterson, S.; Mackay, D.; Bacci, E.; Calamari, D. Environmental behaviour and pathways of human exposure to dieldrin. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 886-871.
- ⁸⁶ Schreiber, L.; Schönherr, J. Leaf surface microflora may significantly affect studies on foliar uptake of chemicals. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*, 153-159.
- ⁸⁷ Welsch-Pausch, K.; McLachlan, M.S.; Umlauf, G. Determination of the Principal Pathways of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans to *Lolium multiflorum*. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 1090-1098.
- ⁸⁸ Calvelo Pereira, R.; Camps-Arbestain, M.; Rodríguez Garrido, B.; Macías, F.; Monterroso, C., *Environ. Poll.* **2006**, *144*, 210-217.
- ⁸⁹ Abhilash, P. C.; Jamil, S.; Singh, V.; Singh, A.; Singh, N.; Srivastava S. C. *Chemosphere.* **2008**, *72*, 79-86.
- ⁹⁰ Calvelo Pereira, R.; Monterosso Martinez, M.C.; Martinez Cortizas, A.; Macias, F. Behaviour of α -, β -, γ - and δ -hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of the contaminate site. *Sci. Tot. Environ.* **2010**, *408*, 5583-5591.
- ⁹¹ Heinisch, E.; Jonas, K.; Klein, S. HCH isomers in soil and vegetation from the surroundings of an industrial landfill of the former GDR, 1971-1989. *Sci. Tot. Environ.* **1993**, *134*, 151-159.
- ⁹² Simonich, S. L.; Hites, R. A. Organic Pollutant Accumulation in Vegetation. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2905-2914.
- ⁹³ Simonich, S. L.; Hites, R. A. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science* **1995**, *269*, 1851-1854.
- ⁹⁴ Macrae, I.C.; Raghu, K.; Bautista, E.M. Anaerobic degradation of the insecticide Lindane by *Clostridium sp.* *Nature.* **1969**, *221*, 859-860.
- ⁹⁵ Heritage, A.D.; Macrae, I.C. Identification of intermediates formed during the degradation of hexachlorocyclohexane by *Clostridium sphenoides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, *33*, 1295-1297.
- ⁹⁶ Jangow, G.; Haider, K.; Ellwardt, P. Anaerobic degradation and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **1977**, *115*, 285-292.
- ⁹⁷ Ohisa, N.; Kurihara, N.; Nakajima, M. ATP synthesis associated with the conversion of hexachlorocyclohexane related compounds. *Arch. Microbiol.* **1982**, *131*, 330-333.
- ⁹⁸ Maule, A.; Plyte, S.; Quirk, A.V. Dehalogenation of organochlorine insecticides by mixed anaerobic microbial population. *Pest. Biochem. Physiol.* **1987**, *27*, 229-236.
- ⁹⁹ Deo, P.G.; Karanth, N.G.; Karanth, N.G.K. Biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in soil and food environment. *CR Crit. Rev. Microbiol.* **1994**, *20*, 57-78.
- ¹⁰⁰ Sahu, S.K.; Patnaik, K.K.; Bhuyan, S.; Sethunathan, N. Degradation of soil-applied isomers of hexachlorocyclohexane by *Pseudomonas sp.* *Soil Biol. Biochem.* **1993**, *25*, 387-391.
- ¹⁰¹ Imai, R.; Nagata, Y.; Senoo, K.; Wada, H.; Fukuda, M.; Takagi, M.; Yano, K. Dehydrochlorination of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) by γ -HCH-assimilating *Pseudomonas pneumobacillus*. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 2015-2017.

- ¹⁰² Nagasawa, S.; Kikuchi, R.; Nagata, Y.; Takagi, M.; Matsuo, M. Aerobic mineralization of γ -HCH by *Pseudomonas paucimobilis* UT26. *Chemosphere* **1993**, *26*, 1719-1728.
- ¹⁰³ Nagata, Y.; Ohtomo, R.; Miyauchi, K.; Fukuda, M.; Yano, K.; Takagi, M. Cloning and sequencing of a 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase gene whose product is involved in degradation of gamma-hexachlorocyclohexane by bacterium *Sphingomonaspaucimobilis* UT 26. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 3117-3125.
- ¹⁰⁴ Miyauchi, K.; Lee, H.S.; Fukuda, M.; Takagi, M.; Nagata, Y. Cloning and characterization of linR, involved in regulation of downstream pathway for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonaspaucimobilis* UT 26. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1803-1807.
- ¹⁰⁵ Kumari, R.; Subudhi, S.; Suar, M.; Dhingra, G.; Raina, V.; Dogra, C.; Lal, S.; Van der Meer, J.R.; Holliger, C.; Lal, R. Cloning and characterization of *lin* genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonaspaucimobilis*starin B90. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 6021-6028.
- ¹⁰⁶ Langenhoff, A.A.M.; Staps, J.J.M.; Pijls, C.; Alphenaar, A.; Zwiep, G.; Rijnaarts, H.H.M. Intrinsic and stimulated *in situ* biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH). *Water Air Soil Pollut.* **2002**, *2*, 171-181.
- ¹⁰⁷ Manzano, M.A.; Paeale, J.A.; Sales, D.; Quirga, J.M. Enhancement of aerobic microbial degradation of polychlorinated biphenyl in soil microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22*, 699-705.
- ¹⁰⁸ Baker, A.J.M.; Brooks, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1989**, *1*, 81-126.
- ¹⁰⁹ Dickmann, D.I.; Stuart, K.W. The culture of poplars in Eastern North America. *Michigan State University Publications, East Lansing, Michigan*. **1983**
- ¹¹⁰ Perttu K.L. (1999). Environmental and hygienic aspects of willow coppice in Sweden. *Bio. Bioen.* **16**, 291-97.
- ¹¹¹ Di Baccio, D.; Tognetti, R.; Sebastiani, L.; Vitagliano C. Responses of *Populus deltoides* P.nigra (P. x euramericana) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol.* **2003**, *159*, 443-452.
- ¹¹² Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Lacetera, N.; Nardone, A. *J. Dairy Sci.*, **2002**, *24*, 300-302.
- ¹¹³ Carai P. Tesi di Laurea in Scienze Ambientali, Università degli Studi della Toscana, AA 2012/2013. Determinazione gascromatografica degli isomeri dell'esachlorocicloesano in campioni di suolo della Valle del fiume Sacco. Relatori: Dott.ssa R. Bernini; Prof. B. Ronchi.
- ¹¹⁴ Spencer, W.F.; Clith, M.M. Pesticide volatilization as related to water loss from soil. *J. Environ. Qual.* **1973**, *2*, 284-289.
- ¹¹⁵ Glotfelty, D.E.; Schomburg, C-J. Volatilization of pesticide from soil. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, **1989**, Madison, WI.
- ¹¹⁶ El Beit, I.O.D.; Wheelock J.V.; Cotton, D.E. factors affecting soil residues of dieldrin, endosulfan, γ -HCH, dimethoate, and pyrolan. *Environ. Safety* **1981**, *5*, 135-160.
- ¹¹⁷ Deo, P.G.; Karanth, N.G.; Karanth, N.G.K. Biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in soil and food environment. *Crit. Rev. Microbiol.* **1994**, *20*, 57-78.
- ¹¹⁸ Malaiyandi, M.; Shah, S.M.; Lee, P. Fate of alpha- and gamma hexachlorocyclohexane isomers under simulated environmental condition. *J. Environ. Sci. Health* **1982**, *17*, 283-297.
- ¹¹⁹ Pereira, C.; Monterosso, C.; Marcias, F.; Camps-Arbestain, M. Distribution pathways of hexachlorocyclohexane isomers in a soil-plant-air system. A case study with *Cynarascolymus* L. and *Erica* sp. Plants grown in a contaminate site. *Environ. Poll.* **2008**, *135*, 350-358.
- ¹²⁰ Ahmed, M.T.; Ismail, S.M.M.; Mabrouk, S.S. Residues of some chlorinated hydrocarbon pesticides in rain water, soil and ground water, and their influence on some soil microorganisms. *Environ. Int.* **1998**, *24*, 665-670.
- ¹²¹ Verma, A.; Pillai, M. K. K. Bioavailability of soil-bound residues of DDT and HCH to certain plants. *Soil Biol. Biochem.* **1991**, *23* 347-351.
- ¹²² Li, H.; Sheng, G.; Sheng, W.; Xu, O. Uptake of trifluralin and lindane from water by ryegrass. *Chemosphere.* **2002**, *48*, 335-341.
- ¹²³ Kooistra, L.; Wehrens, R.; Leuven, R.S.E.W.; Buydens, L.M.C. Possibilities of visible-near-infrared spectroscopy for the assessment of soil contamination in river floodplains. *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *446*, 97-105.
- ¹²⁴ Agresti, G.; Bonifazi, G.; Calienno, L.; Capobianco, G.; Lo Monaco, A.; Pelosi, C. et al. Surface investigation of photo-degraded wood by colour monitoring, infrared spectroscopy and hyperspectral imaging. *J. Spectr.* **2013**, *1*, 1-13.
- ¹²⁵ Pelosi, C.; Agresti, G.; Calienno, L.; Lo Monaco, A.; Picchio, R.; Santamaria, U. et al. Application of spectroscopic techniques for the study of the surface changes in poplar wood and possible implications in conservation of wooden artifacts. *Proc. SPIE 8790, Optics for Arts, Architecture, and Archaeology IV* **2013**, Vol. 8790, 879014/1-14.
- ¹²⁶ Rianna, M.; Rozos, E.; Efstratiadis, A.; Napolitano, F. Assessing different levels of model complexity for the Liri-Garigliano catchment simulation. EGU General Assembly 2011. Geophysical Research Abstracts, vol. 13. European Geosciences Union Vienna, <http://itit.ntua.gr/en/docinfo/1118/>. Accessed 27 February 2015.
- ¹²⁷ Kolaříková, K.; Von Tümpling, W.; Bartels, P. Bioaccumulation of HCH isomers in selected macroinvertebrates from the Elbe River: sources and environmental implications. *Environ. Mon. Ass.* **2013**, *185*, 4333-4346.
- ¹²⁸ Simonich, S.L.; Hites, R.A. Organic Pollutant accumulation in vegetation. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2905-2914.
- ¹²⁹ Simonich, S.L.; Hites, R.A. Relationships between socioeconomic indicators and concentrations of organochlorine pesticides in tree bark. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 999-1003.
- ¹³⁰ Burken, J.G.; Schnoor, J.L. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 3379-3385.
- ¹³¹ Liu, J.; Schnoor, J.L. Uptake and translocation of lesser-chlorinated polychlorinated biphenyls (PCBs) in whole hybrid poplar plants after hydroponic exposure. *Chemosphere* **2008**, *73*, 1608-1616.

-
- ¹³² Trapp, S.; Miglioranza, K.B.; Mosbæk, H. Sorption of lipophilic organic compounds to wood and implications for their environmental fate. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 1561-1566.
- ¹³³ Zhou, W.; Zhai, Z.; Wang, Z.; Wang, L. Estimation of *n*-octanol/water partition coefficients (K_{ow}) of all PCB congeners by density functional theory. *J. Mol. Struct.* **2005**, *755*, 137-145.
- ¹³⁴ ATSDR. Toxicological profile for α , β , γ , and δ -hexachlorocyclohexane. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **2005**, Atlanta, Georgia, USA.
- ¹³⁵ Lambs, L.; Muller, E. Sap flow and water transfer in the Garonne River riparian woodland, France: first results on poplar and willow. *Ann. For. Sci.* **2002**, *59*, 301-315.
- ¹³⁶ Ronchi B.; Danieli, P.P. Contamination by persistent chemical pesticides in livestock production systems. Impact of pollution on animal products, in: Faye, B., Sinyavskiy, Y., (Eds.), NATO science for peace and security series C: Environmental security. Springer Netherlands, **2008**, pp. 147-162.
- ¹³⁷ Salthammer, T.; Klipp, H.; Peek, R.D.; Marutzky, R. Formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) and polychlorinated dibenzofurans (PCDF) during the combustion of impregnated wood. *Chemosphere* **1995**, *30*, 2051-2060.
- ¹³⁸ Sinkkonen, S.; Mäikelä, R.; Vesterinen, R.; Lahtiperä, M. Chlorinated dioxins and dibenzothiophenes in fly ash samples from combustion of peat, wood chips, refuse derived fuel and liquid packaging boards. *Chemosphere* **1995**, *31*, 2629-2635.
- ¹³⁹ Method ES ISO 10382:2002. Soil quality- Determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls – Method using capillary gas-liquid chromatography with electron-capture detection.
- ¹⁴⁰ Method ES ISO 8260:2012. Milk and milk products – Determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls – Method using capillary gas-liquid chromatography with electron-capture detection.
- ¹⁴¹ IRSA 5990:2003. Metodi analitici per le acque. Composti Clorurati.
- ¹⁴² EPA Method 3550C: 2007. Ultrasonic extraction.
- ¹⁴³ Barriada-Pereira, M.; Castro-Gonzales, M.J.; Muniategui, L.; Lopez, P.; Prada, D.; Fernandez, E. Determination of 21 organochlorine pesticides in tree leaves using solid phase extraction clean-up cartridges. *J. Chrom. A* **2004**, *1061*, 133-139.
- ¹⁴⁴ UNI EN 15662:2009. Determinazione dei residui di pesticidi utilizzando GC-MS e/o LC-MS/MS dopo estrazione/separazione con acetonitrile e purificazione mediante SPE dispersiva - Metodo QuEChERS modificato con e senza idrolisi alcalina.
- ¹⁴⁵ Li, H.; Deng, Z.; Liu, R.; Loewen, S.; Tsao, R. Ultra-performance liquid chromatographic separation of geometric isomers of carotenoids and antioxidant activities of 20 tomato cultivars and breeding lines. *Food Chem.* **2012**, *508*–517.