



Università degli Studi di Padova
Facoltà di Scienze MM FF NN

Laurea di primo livello in Biologia
Curriculum Biologia Marina

Elaborato di Laurea

**Valutazione della contaminazione da pesticidi
organoclorurati in organismi dello stagno di Vaccarès,
Riserva nazionale di Camargue (Francia)**

Tutor: Dott.ssa Maria Gabriella Marin
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott. Hélène Roche
Laboratoire d'Ecologie
Université Paris XI

Laureanda: Samantha Collarin

Anno Accademico 2006-2007

INDICE

| | |
|--|----|
| PREMESSA | 1 |
| 1. INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1 L'area di studio | 2 |
| 1.2 Obiettivi dello studio..... | 3 |
| 2. MATERIALI E METODI | 5 |
| 2.1 Le specie studiate..... | 5 |
| 2.2 I pesticidi organoclorurati indagati | 6 |
| 2.3 I metodi utilizzati..... | 7 |
| 2.3.1 Preparazione dei campioni | 7 |
| 2.3.2 Estrazione dei lipidi..... | 7 |
| 2.3.3 Estrazione dei microinquinanti organoclorurati | 8 |
| 2.3.4 Dosaggio degli organoclorurati..... | 8 |
| 2.3.5 Analisi degli isotopi stabili | 9 |
| 2.3.5.1 <i>Procedura analisi</i> | 9 |
| 2.3.5.2 <i>La tecnica della spettrometria di massa</i> | 9 |
| 2.3.5.3 $\delta^{15}N$ e livello trofico..... | 10 |
| 2.3.5.4 $\delta^{13}C$ e regime alimentare..... | 11 |
| 3. RISULTATI | 13 |
| 3.1 Contaminazione da pesticidi organoclorurati..... | 13 |
| 3.2 Composizione isotopica delle specie..... | 18 |
| 4. DISCUSSIONE | 20 |
| 5. CONCLUSIONE | 22 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 23 |

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

CF-IRMS Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry

CPG Cromatografia in fase gassosa

DDT Diclorodifeniledicloroetano

IPA Idrocarburi policiclici aromatici

HCB Esaclorobenzene

γ -**HCH** Esaclorocicloesano = Lindano

LC₅₀ Concentrazione letale mediana

LT Lipidi Totali

OC Pesticidi Organoclorurati

PCB Policlorobifenili

PDB Pee Dee Bélemnite

PS Peso Secco

RCE Rilevatore a cattura di elettroni

RNNC Riserva Naturale Nazionale di Camargue

SPE Solide Phase Extraction

UNESCO United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation

PREMESSA

Il presente lavoro è stato svolto nel Laboratorio di Ecotossicologia che fa parte dell'Unità di Ecologia Sistemica ed Evoluzione dell'Università Parigi-Sud. Le ricerche svolte in questo laboratorio sono finalizzate essenzialmente allo studio dell'impatto degli xenobiotici sugli ecosistemi acquatici. In particolare, le indagini iniziate nel novembre del 2000 e tuttora in corso hanno lo scopo di determinare gli effetti a lungo termine della contaminazione su alcuni organismi di una zona umida protetta, la Camargue, regione situata nel Sud della Francia. Studi precedenti realizzati nella stessa area avevano già dimostrato nei tessuti di diversi pesci la presenza di elevati livelli di pesticidi organoclorurati, utilizzati come conservanti nelle risiere vicine. Inoltre si erano riscontrati idrocarburi policiclici aromatici (IPA), trasportati per via atmosferica e provenienti dal grande complesso petrolifero di Fos-sur-Mer, e policlorobifenili (PCB), la cui immissione in ambiente è riconducibile principalmente alle attività industriali presenti nel bacino del Rodano (Coulet, 1998).

Nel corso del mio tirocinio ho valutato i livelli di contaminazione da pesticidi organoclorurati in invertebrati e pesci, provenienti dallo stagno di Vaccarès. Ho utilizzato analisi cromatografiche e indagato il livello trofico delle specie analizzate con il metodo degli isotopi stabili.

1. INTRODUZIONE

1.3 L'area di studio

La Riserva Naturale Nazionale di Camargue (RNNC) è una delle più vaste aree protette dell'Europa occidentale con oltre 13000 ettari (Fig.1). Creata nel 1927, è situata nel sud della Francia, al centro del delta del Rodano. Nel 1970, con la nascita del Parco Naturale Regionale di Camargue (85000 ha), si è cercato di

preservare questo ambiente naturale, attraverso una gestione controllata dell'attività agricola e delle condizioni idrauliche nei territori limitrofi. Ricca di un patrimonio naturale floristico e faunistico eccezionale, la Riserva Naturale di Camargue è stata dall'UNESCO classificata Riserva Internazionale della Biosfera nel 1977.

La Camargue presenta un mosaico complesso di habitat terrestri ed acquatici: dune, praterie di alofite, terreni fangosi e umidi. Diverse lagune sono situate nella parte centrale e meridionale del Parco. Lo stagno di Vaccarès, il principale corpo idrico della riserva (6300 ha), presenta una bassa profondità, con un livello inferiore a 1 m e 80 cm ed una salinità variabile.

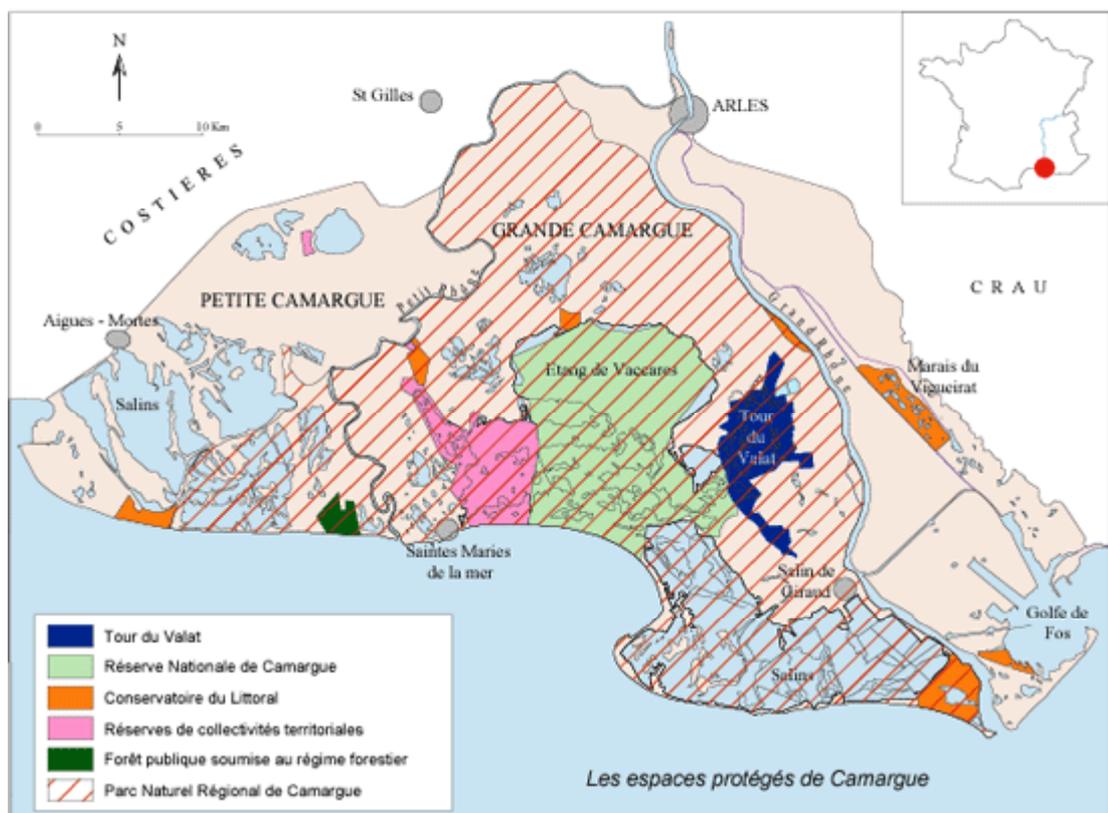


Fig.1: Il territorio Parco Naturale della Camargue (da: www.reserve-camargue.org).

Un gradiente crescente di salinità si osserva da nord a sud, avvicinandosi al mare. Il bilancio idrico dipende tuttavia dalle variazioni stagionali - un'intensa evaporazione nel periodo estivo e abbondanti piogge in autunno - e dall'apporto di acqua dolce dai canali, che convogliano circa $50 \times 10^6 \text{ m}^3$ d'acqua per anno nella laguna (Roche *et al.*, 2000). I gestori della riserva inoltre operano un controllo sugli apporti di acqua di mare, garantendo così il mantenimento di valori

medi annui di salinità intorno al 17⁰/₀₀ (Coulet, 1998). Le variazioni spaziali e temporali di salinità hanno permesso l'instaurarsi di una complessa e stabile rete trofica, caratterizzata dalla presenza di specie d'acqua dolce e salata (fig.2)

La laguna di Vaccares risulta comunque sottoposta a notevoli perturbazioni antropiche (Ramade 1997). Dal 1945 lungo il perimetro della riserva si è rapidamente sviluppata la risicoltura, attività che necessita di grandi volumi d'acqua, la quale viene pompata dal Rodano. I canali d'irrigazione scaricano nella laguna di Vaccarès, principalmente attraverso il canale di Fumemorte, le cui acque sono pertanto contaminate da diversi prodotti chimici di uso agricolo, fertilizzanti e pesticidi. Questi a loro volta si riversano in parte negli stagni della riserva. Gli idrocarburi aromatici policiclici sono trasferiti per via atmosferica dal vento di sud-est, il mistral, che batte frequentemente sulla regione, portando in Camargue inquinanti atmosferici emessi dal grande complesso petrolchimico di Fos-sur-mer e dalla città di Marsiglia, situata ad appena 40 km dalla riserva (Buet *et al.*, 2001). Alcune ricerche condotte precedentemente hanno evidenziato la presenza di inquinanti organici persistenti, quali pesticidi organoclorurati e idrocarburi aromatici policiclici nei pesci della laguna (Buet 1998; Roche *et al.*, 2000; Roche *et al.*, 2001, Roche *et al.*, 2003). In particolare, tra i pesticidi organoclorurati riscontrati alcuni sono attualmente vietati, come il lindano e la dieldrina, altri sottoposti a limitazioni nell'uso, come l'endosulfan, altri leciti (fipronil, eptaclor).

1.4 Obiettivi dello studio

Grazie alla loro elevata liposolubilità, i pesticidi tendono ad accumularsi nella frazione lipidica, a livello cellulare e tissutale. Da questa condizione dipende anche la loro capacità di essere trasferiti lungo le catene alimentari, attraverso la predazione, in un processo definito come biomagnificazione. La conseguenza di questo fenomeno è un aumento della concentrazione dei contaminanti nei predatori, rispetto alle loro prede, e il complessivo manifestarsi dei livelli più alti di contaminazione alla sommità della rete trofica. Sulla base di queste premesse, si sono volute indagare le concentrazioni di organoclorurati (lindano, dieldrina, fipronil, endosulfan e eptaclor) in diverse specie di invertebrati e pesci della laguna di Vaccarès, caratterizzati da ruoli trofici diversi, al fine di valutare possibili diversi livelli di bioaccumulo. Per descrivere la rete trofica della laguna, evidenziando possibili condizioni di biomagnificazione, è stato utilizzato invece il metodo degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto (Minagawa e Wada, 1984 ; France,1995).

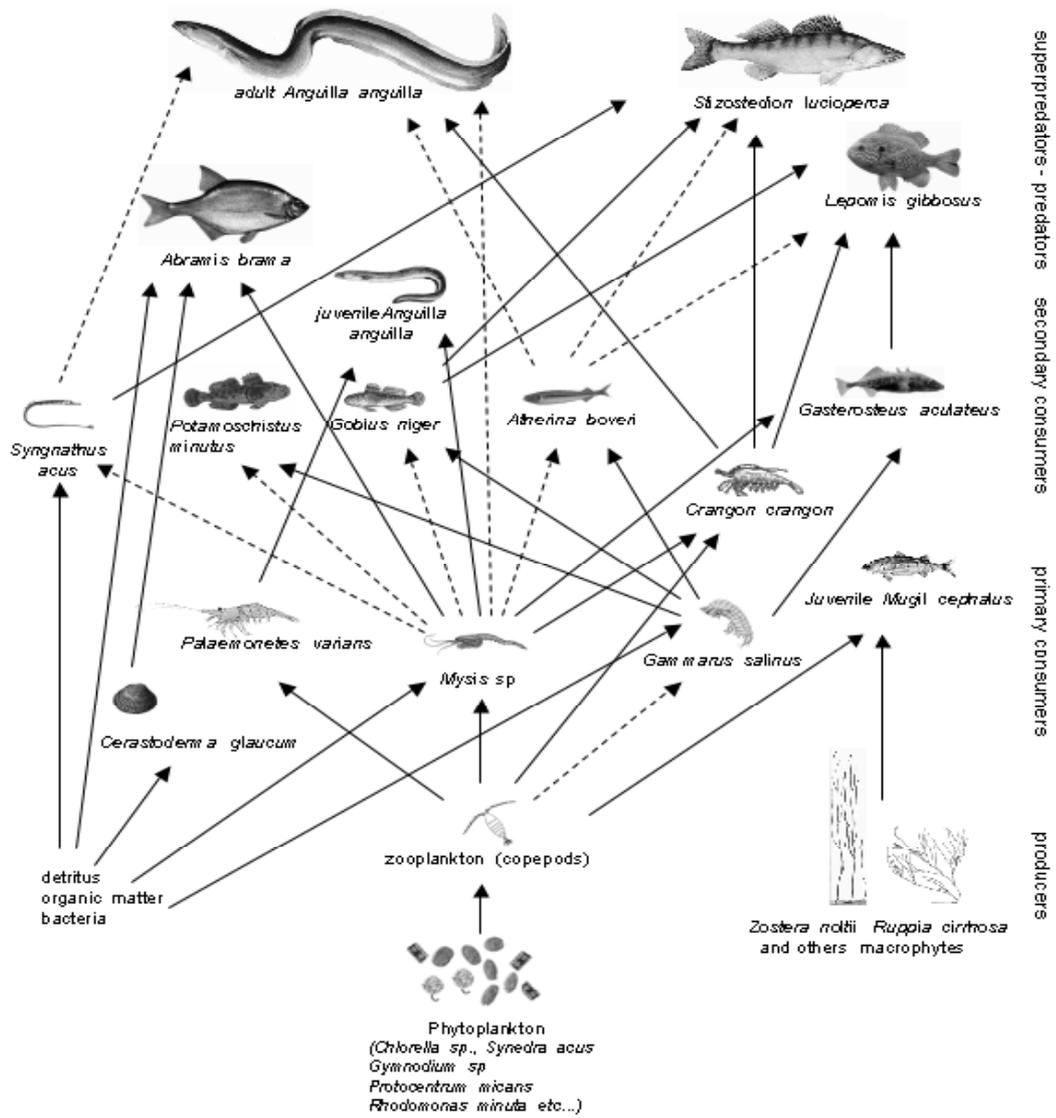


Fig. 2 Rete trofica dello stagno di Vaccarès (da Persic *et al.*, 2004)

2. MATERIALI E METODI

2.1 Le specie studiate

Nel presente studio sono state utilizzate tre specie di pesci: l'abramide (*Abramis brama*), il ghiozzo (*Pomatoschistus microps*) e l'anguilla (*Anguilla anguilla*). E' stato inoltre indagato un mollusco bivalve della famiglia dei Cardiidae, *Cerastoderma glaucum*, che per le sue caratteristiche di organismo bentonico filtratore può essere considerato un buon bioindicatore delle condizioni ambientali.

Abramis brama (Linnaeus, 1758)

Distribuito tra l'Europa e l'Asia, *Abramis brama* è un Ciprinide bentopelagico, che può raggiungere dimensioni superiori agli 80 cm. Si nutre di alghe, insetti, larve, piccoli crostacei, molluschi e piccoli pesci. Può sopravvivere per lunghi periodi fuori dall'acqua (www.fishbase.org).

Pomatoschistus microps (Linnaeus, 1758)

Pomatoschistus microps è una specie demersale di dimensioni piuttosto ridotte, fino a 9 cm di lunghezza. Presenta una distribuzione piuttosto vasta che comprende le coste orientali dell'Atlantico, dalla Norvegia al Marocco, il Mar Baltico e il Mediterraneo occidentale. Vive in estuari, lagune ed in acque costiere. Si nutre di larve, piccoli crostacei, molluschi bivalve, gasteropodi e piccoli pesci. (www.fishbase.org).

Anguilla anguilla (Linnaeus, 1758)

L'anguilla europea è una specie migratrice catadroma, che presenta distribuzioni differenti a seconda dello stadio evolutivo. Le anguille nascono nel Mare dei Sargassi, restano due anni nelle acque superficiali dell'Atlantico, sotto forma di larve leptocefali e vengono portate dalle correnti fino alle coste europee; qui si trasformano in ceche prima di migrare in acqua dolce dove restano per un periodo mediamente compreso fra 4 e 8 anni. Sotto forma di anguille gialle diventano sedentarie; si trasformano poi un'ultima volta in anguille argentate e intraprendono il viaggio di ritorno verso il Mar dei Sargassi, dove muoiono dopo aver deposto le uova. Vivono anche fino a 15 anni. Le femmine possono raggiungere il metro di lunghezza, ma hanno generalmente una misura media di 60 cm, mentre i maschi hanno dimensioni comprese tra 50 e 30 cm.

L'anguilla è un pesce predatore: negli ambienti di acqua dolce o salmastra si nutre principalmente di larve, vermi, crostacei, piccoli molluschi e di piccoli pesci (www.fishbase.org).

Cerastoderma glaucum (Poiret,1789)

Cerastoderma glaucum è un mollusco bivalve che vive nella sabbia o nel fango ad una profondità di 5 centimetri circa. E' molto comune in estuari, lagune salate e baie riparate. Raggiunge una grandezza massima di 5 cm e può vivere fino a 5 anni. E' un organismo filtratore: come consumatore primario si nutre di microalghe, come secondario di protozoi (www.marlin.ac.uk).

2.2 I pesticidi organoclorurati indagati

Endosulfan

L'endosulfan commerciale è un miscuglio di due isomeri (α - e β -) i cui tempi di emivita in acqua dolce, a temperatura ambiente e in presenza di luce, sono di 2 settimane. Poco solubile in acqua, si idrolizza rapidamente in condizioni alcaline, molto più lentamente in condizioni di aumentata acidità. In questo caso, la persistenza può aumentare fino a circa 5 mesi. E' utilizzato come agente fitosanitario, dai terreni agricoli può diffondersi in parte nell'atmosfera e in parte raggiungere le acque dolci attraverso processi di lisciviazione e di ruscellamento. Sono stati dimostrati effetti neurotossici e genotossici. Nei pesci d'acqua dolce è stata valutata una LC₅₀ a 96 ore compresa tra 0.37 e 2.1 μ g/L. (Persic, 2004)

Fipronil

Commercializzato dal 1993 il fipronil è un insetticida utilizzato prevalentemente per il trattamento di cereali. Ha una tossicità molto elevata (per inalazione, ingestione, contatto): agisce bloccando i canali del cloro a livello del sistema nervoso centrale. E' considerato estremamente pericoloso per l'ambiente acquatico.

Lindano

Utilizzato come insetticida e antiparassitario a partire dagli anni '40, in Francia è stato proibito nel 1998. I prodotti commerciali utilizzati a scopo dispersivo, sono dei miscugli di cinque isomeri dell'esaclorocicloesano. Tuttavia è l'isomero γ -HCH il responsabile delle proprietà insetticide. Poco solubile in acqua (7.3 ppm a 25°C), è un composto molto stabile, poco sensibile all'azione della luce e degli ossidanti. E' estremamente tossico per gli insetti, da 5 a 20 volte più del DDT, ma anche per numerose specie di vertebrati, compreso l'uomo (Ramade 1977). Il suo effetto neurotossico si realizza attraverso un'alterazione della conduzione nervosa a livello delle sinapsi neuronali causata da sovrapproduzione di acetilcolina (Joy e Albertson, 1987).

Dieldrina

Vietata in Francia per uso agricolo dal 1972, la dieldrina è tuttora utilizzata per la lotta agli insetti xilofagi. Praticamente insolubile in acqua (0.186 ppm a 25-29°C) è fortemente lipofila; ha una persistenza in ambiente valutabile in alcune decadi. Tutte queste caratteristiche, i favoriscono i processi di bioaccumulo e di biomagnificazione (Ramade, 1987,1999). Anch'essa neurotossica, agisce tuttavia attraverso meccanismi diversi, a livello dei recettori GABA. Recenti studi hanno dimostrato che la dieldrina ha effetti cancerogeni ed estrogenici (Snedeler, 2001; Soto *et al.*, 1994).

Eptaclor

E' un insetticida che agisce per contatto, ingestione o inalazione. Molto stabile alla luce e in aria, l'eptaclor è soggetto a degradazione per idrolisi in acqua o per epossidazione microbica nel terreno, dove ha un tempo di emi-vita di una decina di mesi. L'eptaclor epossido, suo principale metabolita, presenta una forte tendenza alla bioaccumulazione. A causa delle sue proprietà cancerogene è vietato nella maggior parte dei paesi occidentali; in Francia ha ancora un uso limitato in agricoltura.

2.3 I metodi utilizzati

2.3.1 Preparazione dei campioni

Gli individui campionati sono stati misurati e pesati. Successivamente, sono stati allestiti campioni dal peso fresco di circa 1 g di tessuto muscolare prelevato da ogni singolo pesce. Per i bivalvi si sono costituiti dei pool di 2-3 individui. Un frammento di tessuto muscolare per ogni pesce e un pool di bivalvi sono stati utilizzati per determinare la percentuale di acqua per differenza di peso dopo passaggio in stufa a 60°C per 24 ore.

2.3.2 Estrazione dei lipidi

Sulla base del peso fresco misurato, i campioni sono stati ripresi in 20-40 ml di reagente di Folch modificato (Folch_{modif}: diclorometano 2 ; metanolo 1 (v/v)) che ha la proprietà di sciogliere i lipidi (Folch *et al.*, 1957). Per facilitare l'estrazione, i tessuti sono stati omogenizzati con un omogenizzatore Polytron PT-MR 2100, e lasciati poi depositare per due ore a temperatura ambiente. In seguito i lipidi totali sono stati recuperati dopo due filtrazioni. La prima filtrazione, rapida, ha permesso di separare i tessuti dai lipidi totali e da altre molecole, in particolare aminoacidi e sali minerali. I tessuti delipidati sono stati pesati, prima e

dopo un passaggio in stufa a 60° C per 24 ore (poi conservati a -80° C per la misura dei rapporti isotopici). La frazione liquida è stata fatta evaporare per mezzo di un evaporatore rotante Büchi. Il residuo secco così ottenuto è stato quindi ripreso con 20 ml di cloroformio. La seconda filtrazione, lenta, ha permesso di separare i lipidi dalle altre molecole presenti nella soluzione di cloroformio. Una volta evaporato il cloroformio, il deposito ottenuto è stato pesato, rappresentando la frazione dei lipidi totali (LT). I LT sono poi stati rimessi in sospensione in 2 ml di esano per l'estrazione degli organoclorurati.

2.3.3 Estrazione dei microinquinanti organoclorurati

L'estrazione dei microinquinanti organoclorurati dalla fase lipidica avviene tramite una cromatografia di assorbimento in fase solida (SPE, Solide Phase Extraction), utilizzando una colonna, la cui fase stazionaria è composta da florisil o da silicato di magnesio polare (MgO₃Si) (Durand *et al.*, 1989). La colonna è attivata da 4 ml di esano ed il campione contenente la frazione lipidica è posto in cima alla colonna. Per i nostri campioni la colonna di Florisil Bond Elut VARIAN è stata posizionata su un sistema Vac Elut, il quale permette di accelerare la separazione per aspirazione. I campioni sono stati eluiti utilizzando due solventi con polarità leggermente diversa che consentono il recupero di due diverse frazioni di organoclorurati: i meno polari, pp'DDT, PCBs e HCB attivati con l'aggiunta di 2 ml di esano, i più polari, Lindano, Eptaclor, Aldrina, Dieldrina, Endosulfan e Fipronil, attivati aggiungendo 4 ml di esano/etere ($V_{\text{etere}}/V_{\text{tot}}=5\%$).

In seguito in soluzione, ognuno in 1 ml di esano.

2.3.4 Dosaggio degli organoclorurati

I differenti tipi di contaminanti contenuti in ogni frazione lipidica sono stati analizzati grazie ad una cromatografia in fase gassosa (CPG) su colonna capillare (Autosystem XL, Perkin-Elmer), associata ad un rivelatore di elettroni. Questo metodo sembra essere il migliore per l'analisi dei composti organoclorurati (Branch 1993, Schenk *et al.*, 1996).

La tecnica consiste in una cromatografia di divisione dei soluti in forma gassosa, tra la fase gassosa mobile (N₂ o Ar/ CH₄) e la fase stazionaria, che può essere solida o liquida. I diversi soluti vengono iniettati tramite una microsiringa Hamilton da 10 µl nella camera di vaporizzazione, in cui la temperatura è tale da rendere immediata la vaporizzazione. I picchi corrispondenti alle sostanze iniettate hanno tempi di ritenzione diversi secondo la differente affinità per la fase stazionaria o mobile. Alla loro uscita dalla colonna i soluti vengono individuati dal rivelatore a cattura di elettroni (RCE). Il RCE emette allora un segnale elettronico, captato dall'integratore che lo traduce sottoforma di un cromatogramma.

2.3.5 Analisi degli isotopi stabili

Questo approccio si basa sulla variazione del rapporto fra gli isotopi pesanti e leggeri, sia del C che dell'N, nei diversi sistemi biologici, come conseguenza di un processo naturale, il frazionamento isotopico. Minagawa e Wada (1984) hanno dimostrato che nei tessuti di un predatore il rapporto fra gli isotopi dell'N ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) cambia rispetto a quello presente nelle sue prede, con un progressivo arricchimento nella concentrazione di ^{15}N rispetto a quella di ^{14}N passando a livelli trofici superiori. Il risultato è un aumento del fattore $\delta^{15}\text{N}$ (deviazione rispetto al rapporto isotopico standard) dell'ordine di $3-4\text{‰} \pm 1\text{‰}$ tra un livello trofico e quello successivo. Gli isotopi stabili del C presentano un arricchimento di circa 1‰ tra due livelli trofici successivi (Vander Zanden *et al.*, 1999). La stabilità degli arricchimenti isotopici in ^{13}C e ^{15}N permette l'utilizzo dei valori di $\delta^{15}\text{N}$ e di $\delta^{13}\text{C}$ come indicatori del livello trofico di appartenenza e della principale fonte di carbonio primario (Vander Zanden e Rasmussen, 1999). I valori di arricchimento nel tessuto muscolare dei pesci sono considerati rappresentativi di quelli dell'individuo intero (Peterson e Fry, 1987).

2.3.5.1 Procedura analitica

Il tessuto delipidato ottenuto dopo la filtrazione rapida e conservato a -80°C è stato utilizzato per questa analisi secondo un procedimento in tre fasi :

I. Liofilizzazione: permette l'eliminazione dell'acqua dal tessuto secco senza modificare la sua composizione.

II. Polverizzazione: tramite un polverizzatore a biglie consente di ottenere una polvere ultra fine

III. Peso preciso del campione secco: 1mg di tessuto in polvere di ciascun campione viene pesato e posto in una capsula di stagno a tenuta ermetica di 3.3×5 mm per l'analisi isotopica mediante spettrometria di massa.

2.3.5.2 La tecnica della spettrometria di massa

Le misure del rapporto isotopico sono effettuate con la tecnica della spettrometria di massa a flusso continuo CF-IRMS (Continuous Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry), il cui principio consiste nel separare gli isotopi del carbonio o dell'azoto allo stato gassoso. La descrizione dettagliata di questa tecnica è rappresentata in figura 3.

Lo spettrometro è costituito da una camera di combustione, nella quale i campioni sono portati allo stato gassoso (N_2 e CO_2), fatti poi passare in una colonna a cromatografia capillare, che svolge la funzione di purificare e separare i diversi gas. Questi vengono ionizzati da un fascio di elettroni emessi a flusso continuo da un filamento di tungsteno portato ad alta temperatura nella camera ionizzante e accelerati da una differenza di potenziale tra la fonte ionizzante e una placca forata collegata a terra, con aperture posizionate a 1 cm l'una dall'altra.

Questi ioni passano attraverso un analizzatore di massa (fig. 4) formato da una calamita che crea un campo magnetico perpendicolare al piano dello spettrometro, dando loro una traiettoria circolare, il cui raggio dipende dalla massa dello ione.

Questo sistema, tenuto sotto vuoto per evitare collisioni tra ioni, permette di separare gli isotopi con masse diverse, ognuno dei quali arriva sul rilevatore situato sulla propria traiettoria, che conta il numero di impatti di ioni e trasmette dei segnali ad un analizzatore, che li traduce a sua volta in rapporti isotopici.

Le misure della composizione isotopica di un campione non danno la quantità esatta di ciascuno degli isotopi presenti nel campione, ma il loro rapporto. Questo valore permette di calcolare una differenza relativa tra il rapporto isotopico del campione e il rapporto isotopico di un campione standard di riferimento:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ o } \delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [(R \text{ campione} / R \text{ standard}) - 1] \times 1000$$

dove R è il rapporto isotopo pesante/isotopo leggero dell'elemento considerato.

Per convenzione internazionale, i valori del δ sono espressi relativamente ad uno standard, il cui δ è arbitrariamente fissato a zero. Il riferimento per il carbonio è la Pee Dee belemnite (PDB), ovvero il carbonato di calcio di un fossile calcareo, la belemnite, proveniente da una formazione rocciosa, Pee Dee, nella Carolina del Sud. Questo fossile è ricco in ^{13}C e il suo rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.01$. Poiché i campioni organici ed inorganici sono poveri in ^{13}C in confronto a questo standard, il $\delta^{13}\text{C}$ sarà negativo.

Per l'azoto, lo standard utilizzato è l'azoto atmosferico N_2 .

2.3.5.3 $\delta^{15}\text{N}$ e livello trofico

La determinazione del livello trofico (LT) degli animali attraverso la misura del $\delta^{15}\text{N}$ si basa sul frazionamento isotopico e sulla relazione esistente tra rapporti isotopici nella fonte alimentare e nel suo consumatore (Minagawa e Wada, 1984). Il livello trofico di un organismo può essere calcolato con la formula seguente:

$$\text{LT} = \lambda + (\delta^{15}\text{N}_{\text{organismo analizzato}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{organismo alla base della rete trofica}}) / X$$

dove λ è il livello trofico degli organismi alla base della rete trofica e X il tasso medio di arricchimento per livello trofico nella rete trofica considerata.

2.3.5.4 $\delta^{13}\text{C}$ e regime alimentare

Il valore del rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dipende dalla fonte primaria di carbonio. In ambienti lacustri, ad esempio si evidenziano due principali fonti di energia: la produzione primaria litorale, sostenuta prevalentemente da alghe bentoniche e quella eupelagica sostenuta da fitoplancton. I diversi valori di $\delta^{13}\text{C}$ osservati nelle due categorie di produttori primari si riflettono in quelli dei loro consumatori, indicando quindi per questi ultimi una base alimentare diversa (France, 1995).

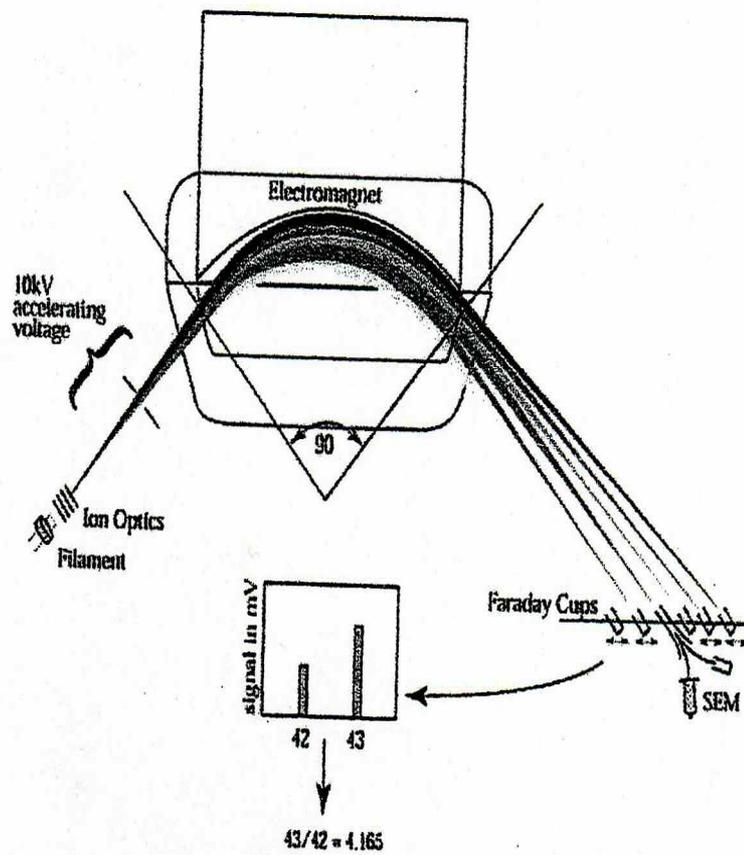


Fig.4 Schema dell'analizzatore di massa

3. RISULTATI

3.1 Contaminazione da pesticidi organoclorurati

Il profilo di contaminazione dell'insieme degli organismi analizzati mostra la presenza dei 5 pesticidi indagati, seppure con livelli variabili a seconda del composto (Fig.5).

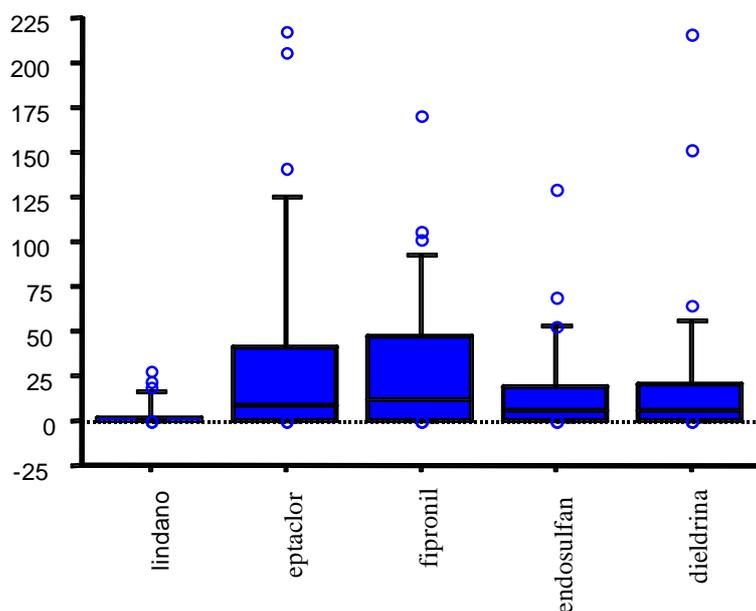


Fig. 5 Concentrazione di OC negli organismi dello stagno di Vaccarès. Rappresentazione in box plot raffigurante la mediana (linea orizzontale), la media (colonna), l'intervallo in cui cade il 90% dei valori (barra verticale) e i valori estremi, n = 30.

Il lindano è il pesticida meno abbondante; il fipronil e l'eptaclor raggiungono concentrazioni vicine a 175 ng per g di tessuto secco per il primo e superano 200 ng/g per il secondo. L'elevato biocumulo di fipronil non è sorprendente, poiché è ancora utilizzato nelle risaie della Camargue. Al contrario l'alto livello di concentrazione dell'eptaclor non conferma la restrizione dell'uso di questo pesticida. L'alfa-endosulfan e la dieldrina presentano delle concentrazioni relativamente simili; tuttavia il primo è ancora usato nelle zone agricole limitrofe alla Riserva, mentre la seconda è rigorosamente vietata per il trattamento dei terreni agricoli già da una trentina d'anni. Si ritiene quindi che la dieldrina possa essere ancora usata per il trattamento delle sementi.

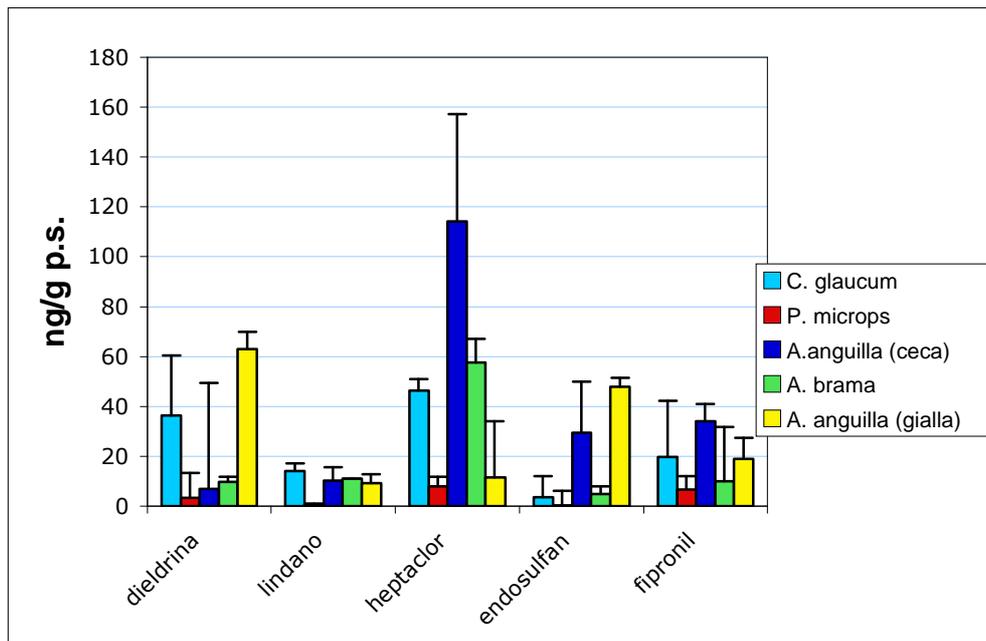


Fig. 6 Profili di contaminazione di ognuno dei cinque pesticidi indagati nelle diverse specie: media \pm S.E., n = 6.

In figura 6 vengono rappresentati per ciascuno dei pesticidi analizzati i livelli di contaminazione nelle diverse specie. Anche in questo caso, si può notare che il lindano presenta in ogni specie concentrazioni inferiori a quelle di tutti gli altri OC, riflettendo una riduzione del rilascio in ambiente a seguito del divieto totale di impiego a partire dal 1998. Per quanto riguarda le altre sostanze, l' eptaclor mostra la concentrazione più elevata in assoluto nell'anguilla ceca; valori elevati sono presenti anche in anguilla gialla e nell'abramide. Per la dieldrina, si osservano livelli maggiori di accumulo nelle giovani anguille e in *C. glaucum*, i più bassi invece nell'abramide. Infine, livelli più alti di fipronil sono stati misurati in *C. glaucum* e nell'abramide, nonostante la diversa posizione trofica e le diverse caratteristiche ecofisiologiche dei due organismi.

Nelle Figure 7, 8, 9 e10 sono visualizzate le concentrazioni medie dei composti organoclorurati in ciascuna specie.

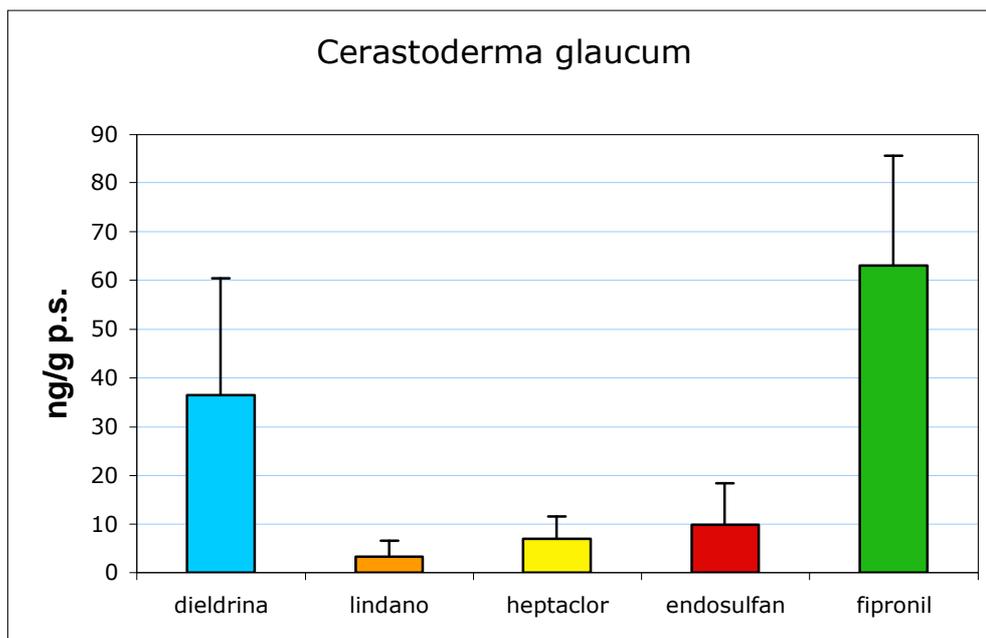


Fig.7 Concentrazione di OC in *Cerastoderma glaucum* : media ± S.E., n = 6.

In *C. glaucum* si osserva una concentrazione molto elevata di fipronil (63 ± 22.7 ng/g), utilizzato recentemente, così come di dieldrina (36.5 ± 23.9 ng/g) (Fig.7). Questo bivalve si rivela essere un buon bioaccumulatore, anche grazie alle sue abitudini fossorie e di filtratore con una base alimentare particolarmente ricca di detrito.

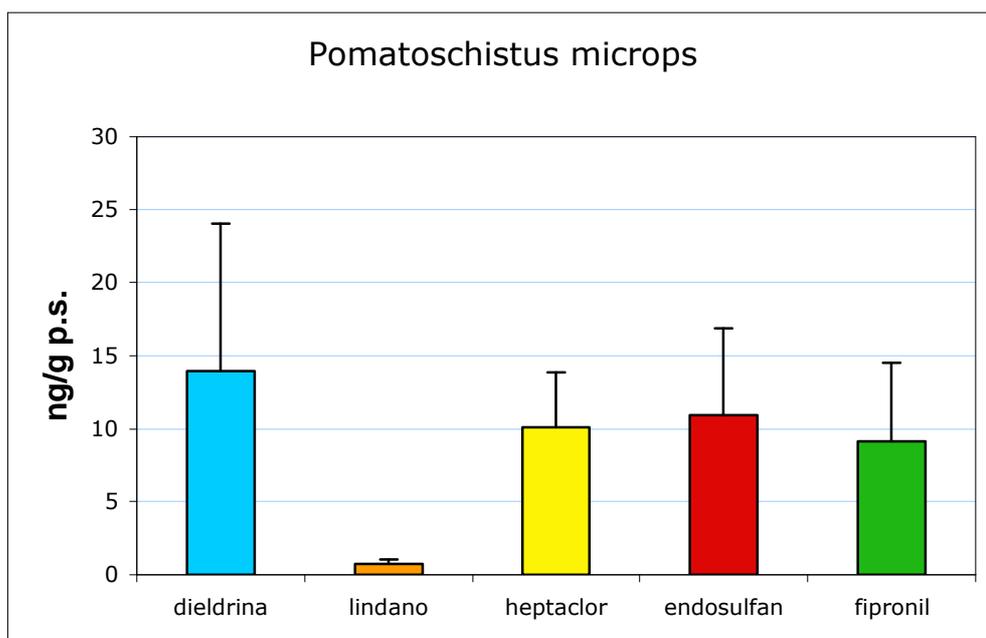


Fig.8 Concentrazione di OC in *Pomatoschistus microps* : media ± S.E., n = 6.

I livelli di contaminazione da OC nel ghiozzo riportati in fig.8 risultano simili per tutte le molecole, eccetto il lindano, che ha una concentrazione molto bassa ($0.7 \pm 0,3$ ng/g p.s.)

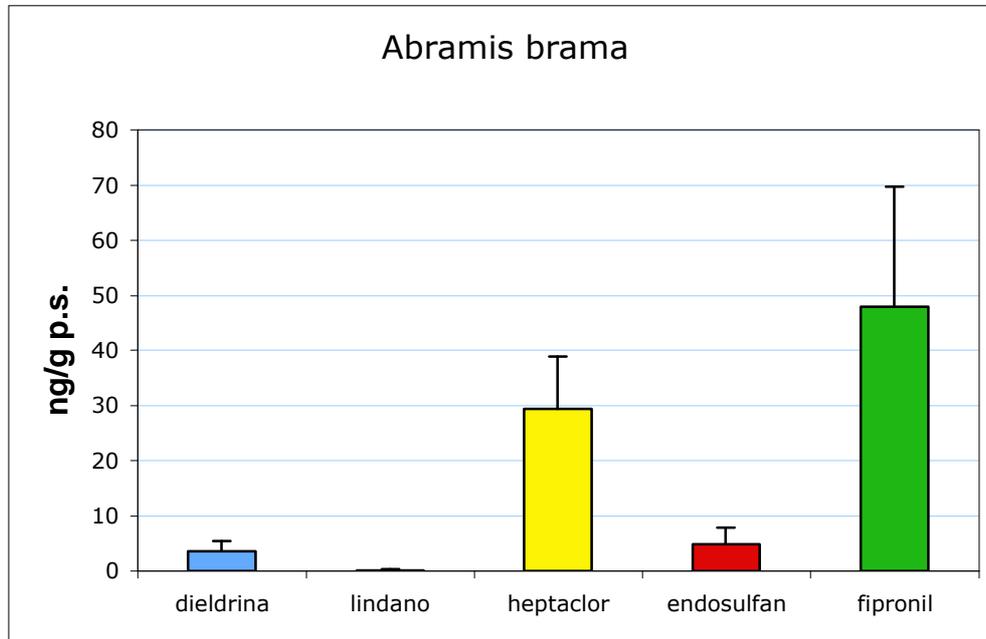


Fig.9 Concentrazione di OC in *Abramis brama* : media \pm S.E., n = 6.

In *A. brama* (Fig. 9) si nota invece un pattern di accumulo molto più variegato. Il fipronil e l'epataclor sono particolarmente abbondanti (47.9 e 29,4 ng/g, rispettivamente). Si può ipotizzare che questa variabilità rifletta in parte particolari condizioni di esposizione che si sono determinate in occasione dei trattamenti di fertilizzazione delle vicine risaie.

In figura 10 si possono confrontare i risultati relativi ai livelli di contaminazione da OC nei due stadi di sviluppo dell'anguilla: ceca e anguilla gialla. La ceca mostra valori di bioaccumulo decisamente maggiori rispetto all'anguilla gialla. E' ipotizzabile che l'alta concentrazione di eptaclor e di alfa-endosulfan (114.3 e 57.6, rispettivamente) sia dovuta ad un diretto coinvolgimento della ceca durante trattamenti fitosanitari.

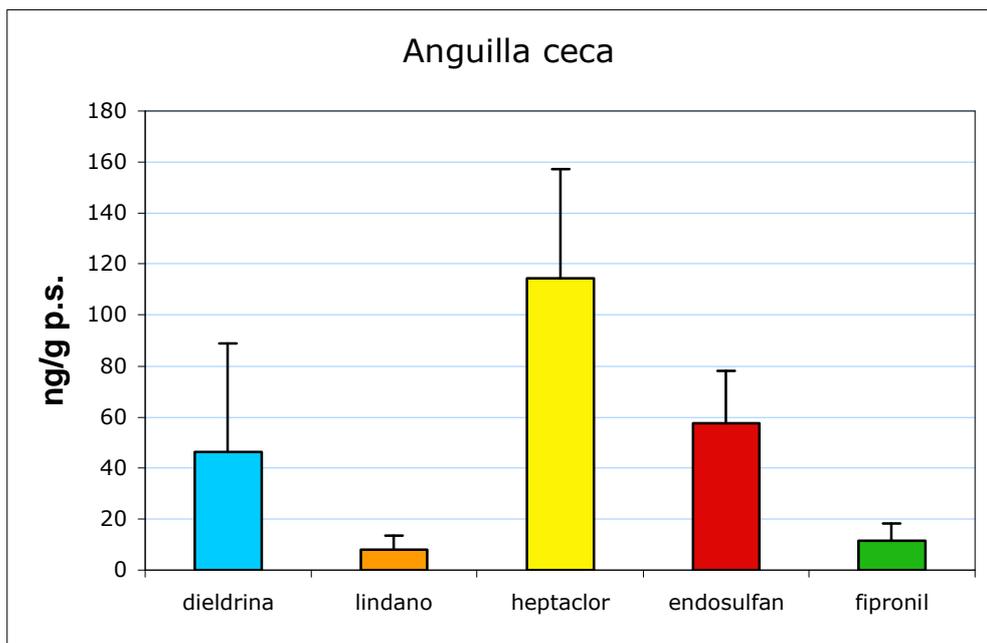


Fig.10 Concentrazione di OC in *Anguilla anguilla* (ceca) : media \pm S.E., n = 6.

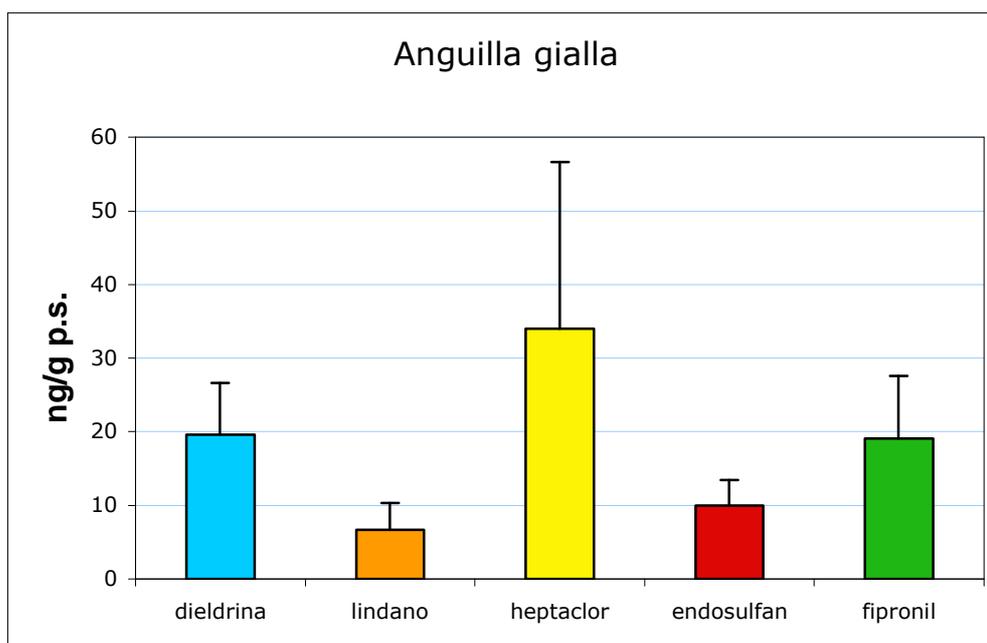


Fig.10a Concentrazione di OC in *Anguilla anguilla* (gialla) : media \pm S.E., n = 6.

3.2 Composizione isotopica delle specie

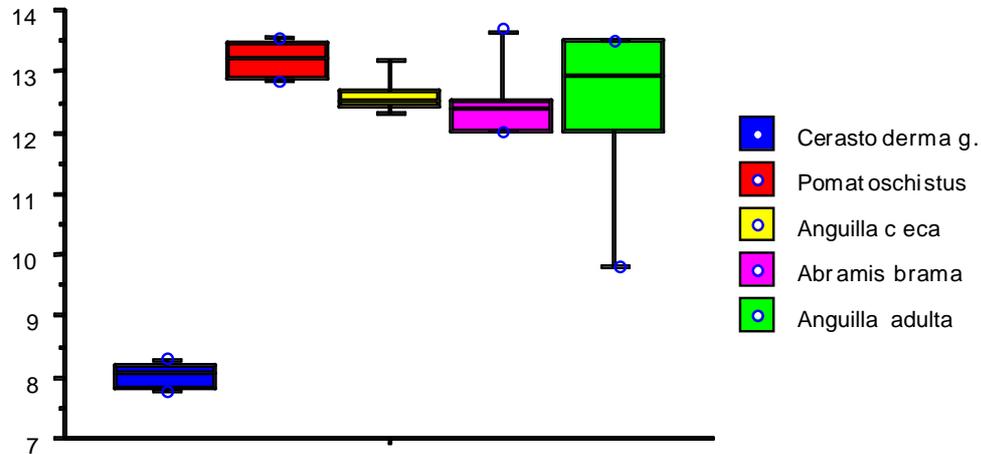


Fig. 11 Valori di $\delta^{15}\text{N}$ nelle specie indagate. Sono indicate mediana (linea orizzontale), intervallo di variazione che comprende il 90% dei dati (box) e l'intervallo massimo di variazione (barra verticale)

In figura 11 sono riportati per le diverse specie i valori di $\delta^{15}\text{N}$, che vengono utilizzati per definire le relative posizioni trofiche. Il valore misurato per *C.glaucum* risulta notevolmente più basso degli altri. Ciò può essere spiegato con la sua diversa posizione trofica (consumatore primario) rispetto alle altre specie. Confrontando i risultati ottenuti con quelli di studi precedentemente svolti nel medesimo laboratorio, il ghiozzo ha in questo caso mostrato una posizione più elevata nella catena trofica, probabilmente in ragione di una sua sovra-alimentazione durante la fine del periodo estivo che ha preceduto il campionamento. Sembra dunque esistere una modulazione del valore di $\delta^{15}\text{N}$ in funzione dello stato nutrizionale. L'anguilla gialla è localizzata ad un livello trofico superiore rispetto alla ceca, anche se accumula meno attivamente i pesticidi.

Complessivamente l'ordine dei livelli trofici trova un buon riscontro nelle precedenti valutazioni (Roche *et al* 2003).

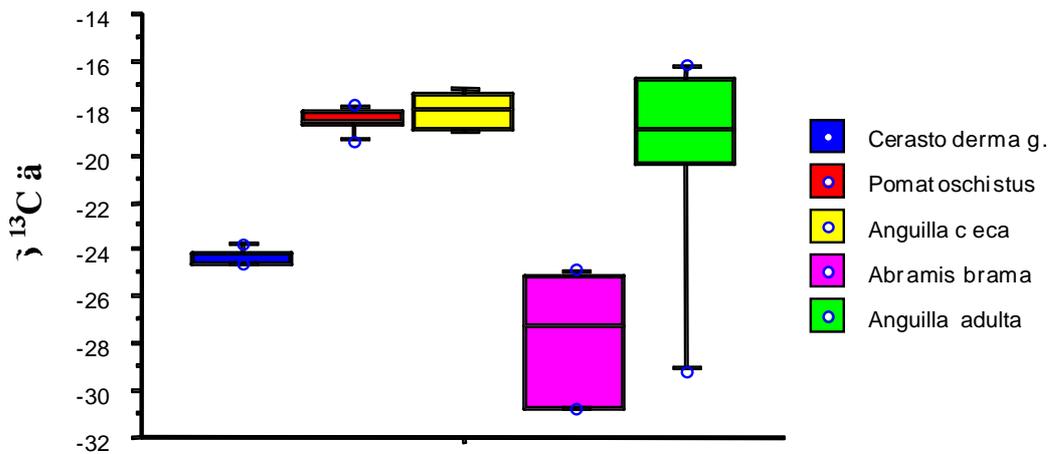


Fig. 12 Valori di $\delta^{13}\text{C}$ nelle specie indagate. Sono indicate mediana (linea orizzontale), intervallo di variazione che comprende il 90% dei dati (box) e l'intervallo massimo di variazione (barra verticale)

I valori di $\delta^{13}\text{C}$ riportati in Figura 12 forniscono indicazioni sulla fonte primaria di carbonio per le diverse specie. E' stato infatti dimostrato che esiste una differenza di determinazione isotopica tra le alghe bentoniche e quelle pelagiche, poiché le prime sono più ricche in ^{13}C rispetto alle seconde. Questa differenza di $\delta^{13}\text{C}$ si ripercuote direttamente sugli organismi consumatori. Persic 2004 riporta per la rete trofica della Laguna di Vaccares valori di $\delta^{13}\text{C} < -20$ per le specie pelagiche e > -20 per quelle bentoniche. I risultati qui ottenuti sono in buon accordo, tranne che nel caso di *C.glaucum*, per il quale sono stati registrati valori decisamente più bassi, che restano di difficile interpretazione.

4. DISCUSSIONE

L'analisi dei cinque pesticidi organoclorurati riscontrati in *C. glaucum*, *P. microps*, *A. brama* e *A. anguilla* rivela una contaminazione di queste specie da parte di tutti i contaminanti ricercati. Il fipronil presenta i valori più alti, conseguenza diretta dell'uso che ancora viene fatto di questo pesticida nelle risaie della Camargue. Per quanto riguarda l'epaetol, la sua concentrazione è incredibilmente elevata se si tiene conto delle restrizioni imposte al suo utilizzo. L'alfa-endosulfan e la dieldrina presentano delle concentrazioni relativamente simili; tuttavia il primo è ancora in uso corrente, mentre la seconda è rigorosamente vietata per il trattamento delle colture da una trentina d'anni. Si ritiene dunque che la dieldrina possa essere ancora utilizzata. Si rileva invece un probabile e definitivo abbandono dell'impiego del lindano, il quale presenta i valori più bassi. I risultati hanno inoltre evidenziato una variazione interspecifica della concentrazione di ogni categoria di organoclorurato. La capacità di bioaccumulare un contaminante dipende infatti dalle caratteristiche metaboliche dell'organismo e dalle caratteristiche chimiche del composto, soprattutto in relazione alla sua persistenza ambientale (Roche *et al.*, 2003). Le variazioni interspecifiche osservate si spiegano anche con la posizione delle specie considerate nella rete trofica. Al fine di determinare la posizione trofica delle specie studiate, è stata utilizzata la tecnica degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto. Minagawa e Wada nel 1984 avevano dimostrato che la misura di $\delta^{15}\text{N}$ può distinguere i diversi livelli di una rete trofica. In effetti, passando da un livello inferiore ad uno superiore, si osserva negli organismi un arricchimento di isotopo pesante ^{15}N dell'ordine del 3-4 ‰ per ogni livello trofico. In questo studio l'ampiezza della variazione in $\delta^{15}\text{N}$ oscilla da 8,4‰ per *C. glaucum* a 13,2‰ per *P. microps*. I risultati non corrispondono ai valori determinati in un'altra stagione e di conseguenza sconvolgono il profilo della catena trofica attesa. Il ghiozzo normalmente presenta una posizione più bassa; si può avanzare l'ipotesi di una sua sovra-alimentazione alla fine dell'estate, quando dominano individui di maggiori dimensioni, dotati dunque di una capacità alimentare superiore (Pampoulie, 2001).

Un arricchimento dell'ordine di 1 ‰ circa è stato dimostrato per quanto riguarda i valori di $\delta^{13}\text{C}$ (France, 1995). Le variazioni interspecifiche del $\delta^{13}\text{C}$ non corrispondono a quelle del $\delta^{15}\text{N}$. Nell'abramide il $\delta^{13}\text{C}$ si è rivelato molto basso rispetto agli altri organismi. È stata dimostrata una differenza di discriminazione isotopica, dovuta probabilmente all'esistenza di due fonti di carbonio: una di materia organica alloctona, come residui di piante di origine terrestre, l'altra rappresentata da produttori primari autoctoni, alghe bentoniche o fitoplancton. Le alghe bentoniche sono inoltre più ricche in ^{13}C rispetto alle alghe pelagiche. I risultati del presente lavoro confermano così l'influenza dell'habitat sulle specie

studiate: l'abramide è infatti un organismo pelagico, mentre gli altri sono bentonici.

Non si sono rilevati invece processi di biomagnificazione. Generalmente, la biomagnificazione è definita come il trasferimento di una sostanza xenobiotica dal cibo all'organismo che se ne nutre, con un aumento di concentrazione che risulta attribuibile esclusivamente ad assunzione per via alimentare. Comunemente, gli studi di biomagnificazione dei contaminanti vengono effettuati su una catena alimentare o una rete trofica molto più estesa, avente alla base le alghe e il fitoplancton e al vertice uccelli acquatici ittiofagi o mammiferi marini (Gray, 2002). Sulla base di questa esperienza, ritengo di poter tuttavia avanzare un'osservazione rispetto alla procedura adottata. Infatti, se da una parte l'analisi del grado di contaminazione è stata effettuata sull'intero corpo degli organismi dei livelli più bassi della rete trofica, dall'altra la medesima indagine è stata condotta soltanto su certi organi per gli individui appartenenti ai livelli trofici più alti. Spesso gli organi in oggetto sono stati il fegato, in cui avvengono alcune reazioni di biotrasformazione degli xenobiotici, e i reni, organi di escrezione delle sostanze in questione; in questi due organi, le concentrazioni di xenobiotici sono sempre risultate superiori a quelle che si trovano nel resto dell'organismo. Nel 1975 Isaacs aveva dimostrato l'esistenza di un processo di bioamagnificazione in un insieme di specie che vivevano in un'area marina chiusa, a differenza di quanto osservato nelle stesse specie raccolte in mare aperto, al largo delle coste californiane. Questo risultato può essere spiegato se si tiene che in un sistema aperto, il predatore ha una scelta di prede più ampia e quindi può esercitare un prelievo alimentare eterogeneo su specie con profili di contaminazione potenzialmente molto diversi. Ne consegue l'impossibilità di rilevare chiari fenomeni di biomagnificazione attraverso i livelli trofici considerati. Deduzioni analoghe possono essere fatte per lo stagno di Vaccarès, le cui condizioni di elevata variabilità stagionale nel regime delle precipitazioni, in temperatura, evaporazione e salinità comportano dei cambiamenti nella composizione delle specie dello stagno nel corso dell'anno. I predatori si nutrono così anche qui di diversi tipi di prede durante i differenti periodi dell'anno.

Infine, è importante notare che ogni specie possiede una propria capacità di metabolizzare ed espellere una determinata sostanza xenobiotica. Ciò significa che se l'organismo di un livello trofico superiore possiede un tasso di metabolizzazione e di escrezione della sostanza superiore al tasso di accumulo della stessa, non ci sarà biomagnificazione. L'entità dell'attività metabolica che porta alla trasformazione e all'eliminazione dei contaminanti può essere valutata attraverso la misura dell'attività di diversi enzimi che intervengono a livello epatico nei processi di biotrasformazione di composti organici naturali e di sintesi.

5. CONCLUSIONI

Questo studio sulla contaminazione dello stagno di Vaccarès ha permesso di confermare la presenza di diversi pesticidi organoclorurati in tutti i livelli della rete trofica. Alcuni risultati suggeriscono un utilizzo ancora in atto di pesticidi vietati come le dieldrina e la mancanza di rispetto delle limitazioni previste per l'uso di insetticidi come l'eptaclor. Per valutare meglio tali ipotesi sarà necessario procedere a specifiche analisi dei livelli di contaminazione dei sedimenti, considerando che fenomeni di risospensione legati a particolari condizioni climatiche potrebbero comportare un rilascio di inquinanti in colonna d'acqua. Per quanto riguarda il lindano, si può invece confermare l'effettivo abbandono del suo uso.

Alcuni risultati per certi aspetti inattesi possono essere dovuti alla scarsa quantità di campioni effettuati, al periodo del prelievo – la fine dell'estate – ed alla qualità e quantità dell'alimentazione nel corso dell'anno, ma anche allo spostamento di alcuni pesci verso la foce dei canali, le cui acque sono indubbiamente più ricche di inquinanti.

6.BIBLIOGRAFIA

- BRANCH H.J., 1993. Gas chromatography for determination of pesticides in aquatic systems analytical bases. Acta. Hydrochim. Hydrobiol., 21: 84-88
- BUET A., ROCHE H., HABERT H., CAQUET T., RAMADE F., 1998. Evaluation du niveau de contamination par les polluants organiques des poissons de la Réserve de Biosphère de Camargue. Proposition d'un plan expérimental pour la validation de biomarqueurs utilisables in situ. Ichthyophysiologica Acta, 21: 61-76
- BUET A., ROCHE H., ANHEIM S., RAMADE F., 2001. Méthode d'évaluation du niveau de contamination des communautés de la réserve de Biosphère de Camargue. Ichthyophysiologica Acta, 23: 57-70
- COULET E., 1998. Plan de gestion de la Réserve de Camargue, Société National de Protection de la Nature, section B, 40 pp
- DURAND G., 1989. Determination of chlorotriazine herbicides, their dealkylated degradation products and organophosphorus pesticides in soil samples by means of two different clean up procedures. Chromatographia. 28: 597-604
- FOLCH J., LESS M., SLOANE-STANLEY G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J.Biol.Chem. 226: 497-509
- FRANCE R.L., 1995. Differentiation between littoral and pelagic food webs in lakes using stable carbon isotope. Limnol. Oceanogr., 40: 1310-1313
- GRAY J.S., 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. Mar. Pollut. Bull. 45: 46-52
- ISAACS J.D., 1975. Assessment of man's impact on marine biological resources. In: Pearson, E.A., de Fraja Frangipane, E. (Eds.), Marine pollution and marine waste disposal. Pergamon Press, pp. 329-340.
- JOY R.M., ALBERTSON T.E., 1987. Interaction of lindane with synaptically mediated inhibition and facilitation in the *Dentate Gyrus*. Neuroendocrinology, 8 : 529-542
- MINAGAWA M., WADA E., 1984. Stepwise enrichment of ¹⁵N along food chains: further evidence and the relation

- between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 48: 1135-1140
- PAMPOULIE C., 2001 Demographic structure and life history traits of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae) in a Mediterranean coastal lagoon (Rhône River delta, France). *Acta Oecologica*, 22: 253-257
- PERSIC A., 2004. Modalités de contamination par les polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires. Application de la méthode des isotopes stables. PhD thèse, Université Paris XI, 160 pp.
- PERSIC A., ROCHE H., RAMADE F., 2004. Stable carbon and nitrogen isotope quantitative structural assessment of dominant species from the Vaccarès Lagoon trophic web (Camargue Biosphere Reserve, France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 60: 2661-2672.
- PETERSON B.J., FRY B., 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 293-320
- RAMADE F., 1977. *Ecotoxicologie*, Masson ed, Paris, 2^{ème} édition, 205pp.
- RAMADE F., 1987. *Ecotoxicology*. 2nd ed., John Wiley and Sons Ltd, Chishester: 88
- RAMADE F., 1997. La conservation des écosystèmes méditerranés. PNUE- plan d'Action pour la Méditerranée – les fascicules du Plan Bleu . *Economica*, Paris, 2nd ed.: 189
- RAMADE F., 1999. *Dictionnaire encyclopédique des pollutions*. Ediscience International , Paris, 710 pp.
- ROCHE H., BUET A., JONOT O., RAMADE F., 2000. Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*) , crucian carp (*Carassius carassius*), catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccarès lagoon (French National Nature Reserve of Camargue) *Aquat. Toxicol.*, 48: 443-459
- ROCHE H., BUET A., RAMADE F., 2002. Relationships between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fish from a protected area: the French National Reserve of Camargue. *Comp. Biochem. Physiol.* 133 C: 393-410
- ROCHE H., BUET A., TIDOU A., RAMADE F., 2003. Contamination du peuplement de poissons d'un étang

de la Réserve Naturelle Nationale de Camargue, le Vaccarès, par des polluants organiques persistants. Rev. Ecol., Terre et vie 59 : 101-111

SCHENK F.J., CALDERON L., PODHORNIAK L.V., 1996. Determination of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in fatty fish by Tandem Solid Phase Extraction Cleanup. J. AOAC Int., 79: 1209-1214

SNEDELER S.M., 2001. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE and dieldrin. Environ. Health Perspect., 109: 35-37

SOTO A.M., CHUNG K.L., SONNENCHEIN C., 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene and dieldrin have estrogenic effect on the estrogensensitive cells. Environ. Health Perspect., 102: 380-382

VANDER ZANDEN M.J., RASMUSSEN J.B., 1999. Primary consumer $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ and the trophic position of aquatic consumers. Ecology, 80: 1395-1403

VANDER ZANDEN M.J., SHUTER B.J., LESTER N., RASMUSSEN J.B., 1999. Patterns of food chain length in lakes: a stable isotope study. Am. Nat., 154: 406-414

Siti Internet consultati :

www.fishbase.org

www.marlin.ac.uk

www.reserve-camargue.org