

SULLA PRESENZA DI RESIDUI DI ANTIPARASSITARI ORGANICI CLORURATI DI SINTESI NELLE ACQUE MARINE COSTIERE ED IN MOLLUSCHI E CROSTACEI COMMESTIBILI

In prosecuzione di alcune ricerche già rese note, sulla contaminazione ambientale da residui di antiparassitari (aa.) organici di sintesi clorurati in Liguria [1-2], si è voluto approfondire un aspetto particolare del problema, vale a dire quello della presenza di tali residui nelle acque marine costiere ed in molluschi lamelibranchi e crostacei. Tali studi rivestono una notevole importanza dato il consumo dei sopraindicati alimenti nel nostro Paese e per la particolarità dei molluschi in special modo di concentrare, nel loro organismo, sostanze nutritive ed anche microrganismi, attraverso l'alimentazione e la respirazione.

Il rilevamento dei residui nelle acque marine costiere, oltre ad essere strettamente in relazione col problema della contaminazione dei molluschi, come ovvio, interessava anche in funzione del ritrovamento di quantità variabili di aa. nelle acque di torrenti e fiumi della Liguria [3].

Scopo della presente nota è quello di riportare i risultati di una serie di rilevamenti del tipo suesposto, effettuati nel 1967 e 1968 con le modalità in appresso indicate.

Per quanto riguarda gli esami sui molluschi e crostacei, essi sono stati effettuati su esemplari prelevati dal commercio in diverse zone della Liguria ed inoltre su campioni di mitili (*m. galloprovincialis*) prelevati direttamente da allevamenti situati sulla costa tirrenica ed adriatica.

La succitata proprietà dei molluschi la-

mellibranchi di concentrare sostanze disciolte e sospese, oltre a microrganismi [4, 5, 6], è legata alla loro struttura anatomica: come noto essi hanno un corpo bilaterale simmetrico, ricoperto ai lati dai lembi del mantello scendenti dal dorso, rivestiti dalla conchiglia, costituita da due valve. Le branche (lamellari) sono rivestite da un epitelio ciliato che provoca l'afflusso dell'acqua e delle sostanze in essa disciolte o sospese alla cavità epibranchiale ed alla cloaca. La quantità di liquidi che i bivalvi filtrano è enorme rispetto al loro volume: secondo Galtsoff [7] 7 litri all'ora, secondo Willemsen [8] circa 2 litri (differenze legate quasi certamente alle diversità di condizioni ambientali oltreché alla specie esaminata).

Nella presente nota si riferiscono i risultati di esami eseguiti su campioni dei seguenti animali:

Molluschi lamelibranchi: mitilo comune (*Mytilus galloprovincialis*), vongola (*Amigdalula decussata*), dattero marino (*Lithophaga lithophaga*);

Crostacei: gamberi (*palaemon serratus*) e scampi (*nephrops norvegicus*).

Vengono inoltre esposti i risultati di esami eseguiti su campioni di acque marine costiere, prelevati a circa 10-20 metri da riva, alla profondità di 25-50 cm., in diversi punti delle coste tirreniche ed adriatiche settentrionali, in alcuni casi in corrispondenza di allevamenti di *m. galloprovincialis*.

1) Determinazione dei residui di aa. in molluschi e crostacei.

Dopo aver esaminato la possibilità di impiegare per queste analisi le tecniche consigliate da Dale e da Richardson [9, 10], si è adottata la seguente metodica che è abbastanza semplice e che permette in pratica un buon recupero dei residui presenti (superiore all'85% in base ad alcune prove di controllo).

In essa i molluschi (in numero di 50), scampi (in quantità di 100 g.) e gamberi (in quantità di 100 g.) di ogni campione raccolto, venivano accuratamente puliti sulla superficie esterna.

Quindi mentre gli scampi ed i gamberi venivano privati del guscio, per i molluschi si procedeva come segue: si praticava anzitutto una piccola apertura lungo il margine di chiusura delle valve per aspirare con una pipetta Pasteur il liquido intervalvare, che veniva conservato per l'analisi. Poi, reciso con un bisturi il tendine intervalvare, si aprivano le valve e si separava il corpo del mollusco dal guscio e lo si riuniva al liquido in precedenza estratto.

Il materiale da analizzare veniva quindi triturato finemente mediante omogeneizzatore (omni-mixer) a 3500 giri/minuto per 10 minuti primi, avendo cura di evitare un riscaldamento del miscuglio, mediante immersione del recipiente in acqua refrigerata a 4° C.

Parte aliquota (25 g.) dell'omogeneizzato si mescolava in mortaio di vetro con 20 g. di florisil (60/100 mesh, attivato per 2 ore a 650 °C e quindi addizionato con acqua bidistillata, in ragione del 5% del suo peso): il tutto si trasferiva quantitativamente in colonna cromatografica (vetro pyrex, diametro interno 20 mm.) sopra ad uno strato di lana di vetro (10 mm.) e di florisil (15 g.), prelavati con 50 ml. di miscela di cloruro di metilene ed etere di petrolio (1:1). L'eluazione veniva effettuata mediante 500 ml. di miscela di cloruro di metilene ed etere di petrolio (4:1) bidistillati. Disidratato l'eluato con 10-15 g. di solfato di sodio anidro, lo si concentrava fino a poche gocce per riprenderlo infine con 0.3 ml. di esano.

Particolare cura veniva posta durante la fase della concentrazione (a 40 °C su b.m.,

in corrente d'azoto) per evitare che l'eluato andasse completamente a secco, poiché si è potuto confermare che in questo caso si ha facilmente una perdita dei residui, probabilmente per la difficoltà di ridisciogliersi successivamente nell'esano.

2) Determinazione dei residui di aa. in campioni d'acqua marina.

La tecnica usata è stata in un primo tempo quella impiegata nelle precedenti ricerche effettuate nel campo delle acque superficiali (Kahn e Wayman), che consiste nell'estrazione continua di un campione di 10 litri, attraverso tre estrattori posti in serie [11]. Data la scarsa concentrazione di residui rilevata sin dall'inizio nei primi campioni, non è stato possibile, nonostante l'elevata sensibilità delle tecniche impiegate, ridurre il volume dei campioni analogamente a quanto fatto nelle precedenti ricerche.

Peraltro, allo scopo di ridurre fastidiose interferenze da parte di tracce di inquinanti occasionali, si è adottato nel corso dello studio, al posto dei tre estrattori in serie, un semplice matraccio da 5 litri, lo stesso usato per il campionamento, in cui, dopo il prelievo, si aggiungeva in laboratorio un volume noto di solvente. Per ciascun campione si effettuavano due prelievi in parallelo con due matracci graduati da 5 litri ciascuno. Effettuata l'estrazione (su agitatore magnetico) per 4 ore, si riunivano le due frazioni di solvente impiegato, procedendo quindi come nella tecnica precedentemente impiegata [2].

3) Analisi gas-cromatografica ed analisi cromatografica su strato sottile.

Per le presenti ricerche è stato usato un gas-cromatografo Aerograph 205, con colonne di vetro pyrex (onde evitare la decomposizione dei residui di aa.) di lunghezza pari a 300 mm., diametro di 1/8", iniettori in vetro ed iniezione diretta in colonna.

Il detector a cattura di elettroni, del tipo concentrico, è stato già descritto, in altra nota [1, 2], e rimandiamo ad essa per ulteriori dettagli.

Peraltro, accanto alle colonne usualmente utilizzate nei laboratori dell'Istituto di Igiene dell'Università di Genova, si è riscontrato di una certa utilità, per ottenere l'identificazione di alcuni aa., confrontare i risultati

delle separazioni ottenute su colonne mono-fase con quelli emergenti da una colonna «mista» costituita da QF 1 (3%) mescolato con DOW 11 (5%) ambedue su aeropak 100-120, in proporzione di 1:1.

Per la determinazione quantitativa si è ricorsi, come d'uso, al confronto dell'area dei picchi ottenuti, con quella di quantità note di soluzione standard, mentre per la conferma qualitativa si è impiegata la tecnica della cromatografia su strato sottile su lastre di vetro (200 x 200 mm.), ricoperte con gel di silice G (spessore 0.25 mm.), essicate per un'ora a 110 °C prima dell'analisi.

Lo sviluppo si effettuava con tetracloruro di carbonio e l'evidenziazione delle macchie si aveva, dopo aver spruzzato la superficie con soluzione di rodamina B, mediante osservazione alla luce di Wood. Per ogni lastra si eseguiva il confronto degli Rf del campione in esame con gli Rf di una miscela di standard di aa. contemporaneamente cromatografata [12].

RISULTATI

1 - Molluschi e crostacei.

I livelli di contaminazione da aa. misurati nei campioni di molluschi e crostacei del commercio, esclusi quelli provenienti direttamente dai vivai ed il numero dei campioni positivi per la ricerca dei residui sono riportati nella tabella n. 1.

In essa le concentrazioni sono riportate

in p.p.b. (parti per miliardo). I livelli di contaminazione da aa. misurati invece nei campioni di molluschi (*m. galloprovincialis*) prelevati direttamente da vivai ed il rispettivo numero dei campioni positivi per la ricerca dei residui sono riportati nella tabella n. 2.

Come può osservarsi in queste due tabelle, le concentrazioni massime sono risultate nei molluschi e crostacei del commercio alquanto inferiori (per tutti gli aa. considerati) rispetto a quelle rilevate nei mitili dei vivai.

I valori massimi nel primo caso si aggirano da meno di 0.1 ppb (endrin, eptaclor) a 6.2 ppb (DDE), mentre nel secondo caso si va da meno di 0.1 ppb (endrin) a ben 113 ppb (p, p-DDT).

I valori mediani oscillano rispettivamente da meno di 0.1 ppb (endrin, eptaclor) a 1.9 ppb (p, p-DDT) nei molluschi e crostacei del commercio, mentre raggiungono 48 ppb (p, p-DDT) nei molluschi (mitili) dei vivai.

Le concentrazioni minime dei residui, che è stato possibile rilevare, erano tutte inferiori a 0.1 ppb.

I più tossici degli aa. ricercati (dieldrin, endrin) sono risultati presenti più raramente degli altri composti, ricercati in parallelo, ed in concentrazioni più modeste.

I più frequenti aa. riscontrati sono stati i due isomeri del DDT ed il metabolita DDE (in oltre il 50% dei campioni esaminati): tali sostanze erano anche quelle che hanno fatto rilevare le concentrazioni più elevate nei mitili da vivaio esaminati.

TABELLA N. 1 - Frequenza dei residui di antiparassitari organici di sintesi clorurati in campioni di molluschi e crostacei del commercio in Liguria (1967-1968)
(p.p.b. = parti per miliardo)

ANTIPARASSITARIO	N. campioni esaminati	% campioni positivi	Concentrazione riscontrata in aa. (ppb)		
			Mediana	Minima	Massima
Aldrin	57	16	0.8	< 0.1	2.2
Lindano (γ -BHC)	57	19	0.9	< 0.1	2.4
DDE	57	58	1.5	< 0.1	6.2
o, p-DDT	57	63	0.5	< 0.1	0.9
p, p-DDT	57	64	1.9	< 0.1	3.4
Dieldrin	57	19	0.4	< 0.1	1.7
Endrin	57	8	< 0.1	< 0.1	0.1
Eptaclor	57	5	< 0.1	< 0.1	0.1

**TABELLA N. 2 - Frequenza dei residui di antiparassitari organici di sintesi clorurati
in campioni di molluschi (*m. galloprovincialis*) provenienti direttamente da vivai italiani
(1967-1968)
(p.p.b. = parti per miliardo)**

ANTIPARASSITARIO	N. campioni esaminati	% campioni positivi	Concentrazione riscontrata in aa. (ppb)		
			Mediana	Minima	Massima
Aldrin	12	42	1.2	0.1	3.7
Lindano (γ -BHC)	12	42	1.3	0.1	3.0
DDE	12	66	14.0	0.1	44.0
o, p-DDT	12	83	33.0	0.1	113.0
p, p-DDT	12	83	48.0	0.1	100.0
Dieldrin	12	25	0.6	0.1	10.5
Endrin	12	16	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Eptaclor	12	25	< 0.1	< 0.1	0.3

Nota: Limite inferiore di rivelazione: 0.02 ppb.

2 - Acqua marina costiera.

I campioni di acqua marina costiera esaminati provenivano, come detto, da varie località italiane, ivi comprese le zone in cui sorgono i vivai di mitili. Le concentrazioni di residui riscontrate in essi sono riferite nella tabella n. 3, espresse in ppb.

Il limite inferiore di sensibilità del metodo impiegato era inferiore a $5 \cdot 10 \times 10^{-3}$ ppb, in pratica, tenendo conto del volume dei campioni, di 5-10 nanogrammi/litro.

I risultati ottenuti consentono di rilevare

la scarsa frequenza di aa. in quantità apprezzabili nei campioni di acque marine esaminate.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Le ricerche condotte sulla contaminazione da residui di aa. clorurati organici delle acque marine costiere italiane e di alcuni tipi di alimenti marini (molluschi e crostacei) hanno permesso di constatare come anche in questo settore ambientale, di larga

**TABELLA N.3 - Frequenza dei residui di antiparassitari organici di sintesi clorurati
in campioni di acque marine costiere italiane
(1967-1968)
(p.p.b. = parti per miliardo)**

ANTIPARASSITARIO	N. campioni esaminati	% campioni positivi	Concentrazione riscontrata in aa. (ppb)		
			Mediana	Minima	Massima
Aldrin	33	15	0.009	< 0.005	0.030
Lindano (γ -BHC)	35	21	0.016	< 0.005	0.075
DDE	31	53	0.035	< 0.005	0.090
o, p-DDT	27	51	0.022	< 0.005	0.065
p, p-DDT	25	53	0.068	< 0.005	0.140
Dieldrin	30	33	0.010	< 0.010	0.035
Endrin	31	46	0.008	< 0.010	0.025
Eptaclor	30	7	0.006	< 0.005	0.015

Nota: Limite inferiore di rivelazione: < 0.005 ppb (Aldrin, Lindano, DDT, Eptaclor).
< 0.010 ppb (Dieldrin, Endrin).

importanza per il nostro Paese, esista un certo grado di inquinamento da aa.

Tali risultati confermano le precedenti determinazioni effettuate nel nostro Istituto su campioni di alimenti e di grasso umano [1, 2]. Nell'acqua marina si sono evidenziati gli aa. a concentrazioni molto più modeste che negli alimenti e comunque anche inferiori, ad esempio, di quelle in precedenza accertate in alcuni corsi d'acqua della Liguria: ciò non può stupire se si pensi soltanto alle possibilità di diluizione e di degradazione di queste sostanze.

Dall'altro lato nei molluschi e crostacei del commercio si sono rilevate concentrazioni superiori a quelle riscontrate nell'acqua di mare con valori piuttosto elevati nei mitili provenienti direttamente dai vivai.

Ciò presenta a nostro avviso la seguente possibilità di interpretazione (a parte quella legata alle diverse capacità di concentrazione da parte dei diversi molluschi già ventilata da diversi Autori) che si riallaccia al problema dell'inquinamento batteriologico dei molluschi di allevamento: gli esemplari che provengono direttamente dai vivai risentirebbero delle maggiori possibilità di inquinamento delle acque marine costiere da parte di liquami e corsi d'acqua, essendo purtroppo in molti casi i vivai situati in zone che non offrono le migliori garanzie di purezza delle acque. Proprio per ovviare a questo inconveniente i molluschi vengono spesso, prima dell'immissione in commercio, stabulati in acque più pure, onde sfruttare la loro capacità di autodepurazione per ridurre la carica batterica, sempre notevole, data la tipica dinamica del loro sistema di nutrizione.

Confrontando peraltro i risultati ottenuti con quelli che ci è stato possibile raccogliere dalla bibliografia più recente a nostra disposizione, si nota che le concentrazioni misurate altrove sono perlopiù uguali o superiori, per gli stessi antiparassitari.

Così per le ostriche della costa Atlantica e del Golfo del Messico (fra i nostri campioni non abbiamo però compreso questa specie di molluschi, perché di consumo infinitamente più limitato in Italia, almeno in queste prime ricerche) Bugg e coll. [13] hanno rilevato in oltre 100 campioni la presenza di almeno un residuo di aa. clorurati, in più del 94% dei campioni esaminati, e fino a 5

diversi residui in più del 30% dei campioni, con le seguenti concentrazioni massime:

— aldrin	: 0.03 (ppm)
— BHC-lindano	: 0.50 (ppm)
— DDE	: 0.12 (ppm)
— p, p-DDT	: 0.22 (ppm)
— dieldrin	: 0.03 (ppm)
— endrin	: 0.07 (ppm)
— eptaclor	: meno di 0.01 (ppm)

Notiamo che questi risultati non sono peraltro direttamente confrontabili con quelli ottenuti nelle presenti ricerche, poiché si riferiscono a campioni analizzati dopo aver eliminato l'acqua intervalvare, mentre nel nostro caso i campioni di molluschi erano costituiti dal corpo dei molluschi stessi più l'acqua intervalvare.

In conclusione, nei campioni di molluschi e crostacei esaminati, sono stati rilevati anche se non costantemente, residui di antiparassitari organici clorurati di sintesi.

Le concentrazioni riscontrate non costituiscono, in base alle attuali conoscenze, un motivo di allarme per la salute pubblica [14, 15, 16]. La presenza di concentrazioni più elevate in mitili, fra i più diffusi del mercato italiano, provenienti direttamente da vivai, indica peraltro, come risulta dal contemporaneo reperimento, sia pure a livelli più modesti, nelle acque marine costiere, degli stessi residui di aa., che tale tipo di contaminazione costituisce un problema potenziale, che richiede una costante sorveglianza con particolare riguardo nelle zone costiere ove affluiscono corsi d'acqua provenienti da zone coltivate ove si presume vengano impiegati notevoli quantitativi di antiparassitari.

BIBLIOGRAFIA

- [1] KANITZ S., CASTELLO G., «Giornale di Igiene e Med. Prev.», 7, 1, 1966.
- [2] KANITZ S., CASTELLO G., «Giornate fitopatologiche 1967», Atti del Convegno, pag. 49, Bologna 1967.
- [3] PETRILLI F. L., CROVARI P., KANITZ S., «Giornale di Igiene e Med. Prev.», 8, 271, 1967.
- [4] PETRILLI F. L., «Ig. Moderna», 31, 309, 1938.
- [5] PETRILLI F. L., «Ig. Moderna», 36, 133, 1943.

- [6] BRAGA A., MAGLIANO E. M., PAOLUCCI S., «Ig. Moderna», 60, 794, 1967.
- [7] GALTSOFF P. S., «J. Amer. Publ. Health», 26, 245, 1936.
- [8] WILLEMSSEN J., «Arch. Neer. Zool.», 10, 153, 1952.
- [9] DALE W. E., CURLEY A., CUETO C., «Life sciences», 5, 47, 1966.
- [10] RICHARDSON A. J., BUSH B., DAVIES J. M., «Arch. Environ. Health», 14, 703, 1967.
- [11] KAHN L., WAYMAN G. H., «Anal. Chem.», 36, 1340, 1964.
- [12] KOVACS M. F. JR., «J. Assoc. Offic. Agr. Chemists», 46, 884, 1963.
- [13] BUGG J. C., HIGGINS J. E., ROBERTSON E. A., «Pest. Monit. J.», 1, 3, 9, 1967.
- [14] DUGGAN R. E., BARRY H. C., JOHNSON L. Y., «Science», 151, 3706, 101, 1966.
- [15] U.S. Food and Drug Adm. press release, April 9, 1967.
- [16] Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 28, 1-2-1968, p. 635.

RIASSUNTO

L'Autore ha ricercato, con analisi gas-cromatografiche, la presenza di residui di alcuni antipa-

rassitari (aldrin, DDE, DDT, dieldrin, endrin, lindano, eptaclor) in molluschi e crostacei del commercio in Liguria, in mitili prelevati direttamente da vivai italiani ed in campioni di acque marine costiere.

Sono stati così evidenziati in parte dei campioni analizzati residui di antiparassitari in concentrazioni fino a 113 parti per miliardo (DDT) nei molluschi e fino a 0.1 parti per miliardo (DDT) nell'acqua di mare. Tali concentrazioni, mentre non costituiscono motivo di allarme per la salute pubblica, fanno ritenere utili ulteriori ricerche in questo campo.

SUMMARY

The Author has measured residues of some pesticides (aldrin, lindane, DDT, dieldrin, endrin, heptaclor) in shellfish and crustacean samples commercially available in Italy, in mollusks directly sampled from fisheries and also in coastal seawater.

Residue concentrations up to 113 p.p.b. (DDT) were detected in mollusks (*mytilus galloprovincialis*) while in the sea-water residue levels were lower, on the average, up to a maximum of 0.1 p.p.b. (DDT).