



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale (*ordinamento ex
D.M. 270/2004*)
in Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Ricostruzione di paleofuochi e
attività antropiche attraverso lo
studio del profilo verticale di
carote lacustri.

Relatore

Prof. Dario Battistel

Laureanda

Maddalena Spigariol
Matricola 830666

Anno Accademico

2014 / 2015

Indice

Introduzione	4
Idrocarburi Policilici Aromatici.....	7
Levoglucosano	10
Steroli fecali.....	11
Metodi Analitici per la determinazione di IPA, Levoglucosano e Steroli fecali	12
Africa orientale: <i>the burning continent</i>	13
Scopo della tesi	20
Materiali e metodi	21
Materiali e reagenti	21
Decontaminazione materiale	22
Strumentazione	22
Estrazione mediante <i>Pressurized Liquid Extraction</i> (PLE).....	22
Turbovap	23
Estrazione in fase solida (SPE)	25
Procedura di derivatizzazione	26
Gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS).....	27
Sedimenti Lacustri (Lago Vittoria).....	30
Quantificazione	35
Precisione	37
Calcolo del limite di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ).....	37
Risultati e discussione.....	39
Messa a punto del metodo	39

Metodo Cromatografico.....	40
Discussione dei risultati.....	49
Ricostruzioni paleoambientali nel lago Vittoria.....	49
Attività degli incendi.....	53
Attività incendiaria locale o regionale?.....	55
Attività incendiaria e vegetazione.....	59
Attività incendiaria e attività antropica.....	62
Incendi e attività antropica. Considerazioni su uno studio analogo.....	69
Conclusioni.....	71
Bibliografia.....	74

Introduzione

Le emissioni antropiche, incluse quelle legate alle emissioni di gas serra e di sottoprodotti provenienti da incendi da biomassa, sono attualmente responsabili dell'alterazione del sistema climatico globale ad una velocità che, su scala geologica, non è mai stata osservata in precedenza. Evidenze dell'impatto antropico sui cambiamenti climatici in corso sono supportate da un ampio numero di evidenze, tra cui la correlazione tra l'incremento della temperatura, le emissioni di biossido di carbonio in atmosfera e l'innalzamento del livello medio del mare, oltre che a un possibile impatto sulla circolazione sia atmosferica che oceanica. In particolare, le combustioni da biomassa sono ad oggi responsabili del 50% delle emissioni di CO₂, ed è ampiamente riconosciuto che tali emissioni potrebbero influenzare futuri cambiamenti climatici [1]. Gli incendi, infatti, hanno effetti diretti sullo stoccaggio globale del carbonio, sulla chimica dell'atmosfera (ingresso di CO₂, CH₄, NO_x) e sulla biodiversità degli ecosistemi [1]. Tuttavia, l'aerosol continua ad essere uno degli aspetti meno compresi del sistema climatico, sia di quello moderno che di quello passato. Secondo l'ipotesi formulata da Ruddiman nel 2003 [2], l'aerosol di origine antropica potrebbe aver alterato il sistema climatico globale per millenni, già a partire dai fenomeni di disboscamento risalenti a circa 7000 anni fa. Queste considerazioni si basano sull'evidenza di un incremento della concentrazione dei gas serra durante il tardo Olocene, rispetto a quelle del precedente periodo interglaciale (Eemiano) [2-4]. Tale incremento, secondo Ruddiman [2], potrebbe essere stato causato dallo sviluppo di pratiche agricole ad opera delle prime società umane, incluso il disboscamento mediante l'utilizzo del fuoco.

Con queste premesse, risulta chiara l'importanza di comprendere il meccanismo naturale ed il contributo antropico che regola gli eventi incendiari nel contesto del cambiamento climatico globale. L'aumento della frequenza degli incendi viene spesso indicato anche nelle proiezioni del Intergovernmental Panel on Climate Changes [2-5]. Tuttavia, la distinzione tra contributo antropico e naturale sulle cause degli incendi è una sfida scientifica ancora aperta [6,7]. In questo contesto, la ricostruzione degli antichi incendi e il loro legame con le attività umane nel passato può sicuramente fornire utili informazioni per comprendere quale sia e quale sia stato l'effettivo contributo antropico rispetto agli eventi incendiari [6,7].

I laghi sono archivi ambientali sensibili al cambiamento climatico in grado di fornire diverse informazioni paleo-ambientali. Diversamente dai sedimenti marini, numerosi laghi sono caratterizzati da tassi di sedimentazione relativamente elevati, e consentono una più elevata risoluzione temporale del segnale paleo-ambientale [8].

Per quanto riguarda la ricostruzione di paleofuochi in sedimenti lacustri, sia su scala locale che regionale, un approccio diffusamente utilizzato consiste nel conteggio del *charcoal* sedimentario [9]. Questo approccio ha consentito la ricostruzione sia della frequenza che dell'intensità degli incendi durante l'intero Olocene, in diverse regioni nel mondo [9-14]. Tuttavia, l'analisi del *charcoal* presenta alcuni limiti metodologici. Le analisi del *charcoal* sedimentario richiedono infatti relativamente grandi quantitativi di sedimento, generalmente 1-5 cm³, e i pretrattamenti dei campioni possono portare ad una frammentazione del *charcoal* di dimensioni maggiori (*macrocharcoal*), alterando i conteggi di quest'ultimo [9,15]. Va osservato, inoltre, che i processi chimico-fisici che

controllano la deposizione del *charcoal* e la sua possibile degradazione possono influenzare l'interpretazione dei dati.

Oltre al *charcoal* anche alcuni biomarcatori, ossia composti chimici conservati nel materiale geologico, che possono essere ricondotti ad un organismo o ad un particolare processo [16], possono essere impiegati per la ricostruzione degli incendi dalle analisi di sedimenti lacustri. Tra questi, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e alcuni monosaccaridi anidri, quali il levoglucosano possono essere impiegati per la ricostruzione di paleofuochi [1,6,17]. Contrariamente al *charcoal*, l'utilizzo di questi biomarcatori presenta alcuni vantaggi. Ad esempio, poiché è stato dimostrato che, a differenza del *charcoal*, sia gli IPA che il levoglucosano possono essere determinati in matrici di ghiaccio [18], questi possono consentire un confronto diretto tra archivi lacustri e ghiacciai, che potrebbero potenzialmente fornire indicazioni sulla natura locale, regionale o globale del segnale.

Ricostruire gli incendi, tuttavia, non è sufficiente per stabilire il loro legame con le attività antropiche. A questo scopo, l'utilizzo di alcuni specifici marcatori molecolari, quali gli steroli fecali, rappresenta un'ottima alternativa per ricostruire la presenza di siti antropici, per inferire la densità demografica e per ricostruire eventuali attività di allevamento [17,6].

Poiché in questa tesi, sia gli IPA che il levoglucosano che gli steroli fecali verranno utilizzato come marcatori molecolari degli incendi e della presenza umana, queste classi di composti verranno discusse di seguito in maggior dettaglio.

Idrocarburi Policiclici Aromatici

Gli idrocarburi policiclici aromatici comprendono una vasta serie di composti organici costituiti da una struttura planare, formati dalla fusione di due o più anelli benzenici. Il numero di anelli può variare da due a sette e, a seconda della posizione in cui è avvenuta la fusione, si individuano diversi isomeri.

Gli IPA possono essere prodotti da idrocarburi saturi in carenza di ossigeno. Pirosintesi e pirolisi sono i due meccanismi principali che possono spiegare la loro formazione. Gli idrocarburi a corta catena possono formare IPA attraverso la pirosintesi. Quando la temperatura supera i 500°C, i legami carbonio-idrogeno e carbonio-carbonio si rompono per formare radicali liberi. Questi a loro volta si combinano con l'acetilene, che condensa velocemente, formando strutture aromatiche resistenti alla degradazione termica [19]. L'aggiunta di ulteriori radicali idrocarburici porta alla formazione di IPA a maggior peso molecolare [20]

La pirosintesi è il principale meccanismo che contribuisce alla formazione di IPA. Recentemente, Lima et al. (2005) [21] hanno esaminato e discusso alcuni dei fattori (tipo di combustibile, quantità di ossigeno e temperatura di reazione) che influenzano la produzione e il comportamento in ambiente degli IPA derivanti da combustione.

Possono essere distinte due classi di IPA: a) IPA a minor peso molecolare, ovvero quelli aventi da due a tre anelli benzenici, e b) IPA a maggior peso molecolare, aventi da quattro a sette anelli benzenici. Da questo studio emerge che la resistenza all'ossidazione e alla riduzione chimica tende a diminuire con l'aumentare del peso molecolare. Questa caratteristica influenza le differenti percentuali con cui gli IPA sono assorbiti sul particolato atmosferico. In particolare, se hanno meno di quattro anelli aromatici, questi rimangono allo stato gassoso e vengono velocemente ossidati. Al

contrario, se gli anelli aromatici sono più di quattro, essi vengono assorbiti dal particolato e possono essere trasportati in atmosfera. La tensione di vapore e la stabilità in acqua, inoltre, decrescono in modo logaritmico con l'aumentare del peso molecolare. Ne consegue che il loro comportamento chimico-fisico, la distribuzione nell'ambiente e l'accumulo variano sensibilmente al variare del peso molecolare [21].

Il trasporto, la deposizione e le trasformazioni chimiche di questi composti variano a seconda che si trovino in fase gassosa o condensati sulla superficie di particelle [22].

Gli IPA con un numero superiore a 5 anelli benzenici sono caratterizzati da una temperatura di condensazione relativamente alta e tendono ad essere condensati sulla superficie del particolato. Questi IPA sono classificati come IPA a "bassa mobilità" e si depositano rapidamente vicino alla sorgente [23]. Gli IPA a minor peso molecolare (2-3 anelli), invece, si trovano più frequentemente in fase gassosa [24,25]. In questo stato gli IPA possono subire dispersione atmosferica a livello globale ed accumularsi preferenziale nelle regioni polari [23-26].

La rimozione degli IPA dall'atmosfera può essere realizzata mediante deposizione secca o umida di particelle e vapore. La deposizione secca o umida degli IPA dall'atmosfera dipende dalle loro proprietà fisico-chimiche (solubilità in acqua, costante di Henry e pressione di vapore), dalla loro tendenza a trovarsi in una delle due fasi e da parametri meteorologici (pioggia, umidità, temperatura). Generalmente gli IPA presenti in fase gassosa si dissolvono dentro nubi e gocce di pioggia [26-28] mentre gli IPA legati a particelle vengono eliminati dall'atmosfera per precipitazione [29].

Sebbene molti IPA derivanti da combustione (pirogenici) si depositino vicino alla loro sorgente, un trasporto atmosferico a lunga distanza è altrettanto possibile.

Alcuni studi inoltre suggeriscono che, in assenza di luce solare alcuni IPA possono reagire con l'ossigeno molecolare, ma questa reazione sembra essere molto lenta e quindi trascurabile come meccanismo di degradazione.

Poiché questi composti sono per lo più formati durante la combustione incompleta e la pirolisi dei combustibili fossili o legno [19] essi risultano essere marcatori, seppur non specifici, della combustione da biomassa.

Va comunque osservato che, nonostante generalmente gli IPA non siano marcatori specifici della combustione da biomassa, uno di questi, il retene, è stato proposto come marcatore specifico per la combustione del legno di conifere [30-33], in quanto si forma a partire dall'acido abietico e dall'acido primarico presenti nel legno, durante il processo di combustione [33-35].

Levoglucosano

A differenza degli IPA, il levoglucosano è un marcatore specifico della combustione da biomassa. Infatti, i biopolimeri del legno, composti da cellulosa (40-50% in peso di legna secca), emicellulosa (20-30% in peso di legna secca) e lignina (20-30% in peso di legna secca) [36,37], durante il processo di combustione subiscono una decomposizione ossidativa. La decomposizione della cellulosa per combustione avviene in due fasi. La prima è caratterizzata da una temperatura minore ai 300°C. In questa fase avvengono la depolimerizzazione, l'eliminazione dell'acqua, l'ossidazione e infine la formazione di carbone.

La seconda fase avviene a temperature superiori a 300°C e comprende la scissione attraverso transglicosilazione, fissione e reazioni di disproporzionamento, con la formazione di prodotti volatili e zuccheri anidri. Questo processo genera prodotti di reazione specifici quali il levoglucosano (1,6- anhydro-β-D-glucopyranose).

Nonostante una buona parte del levoglucosano prodotto venga trasformato a causa di ulteriori reazioni di ossidazione associate al processo di combustione, questo zucchero viene emesso in grande quantità nell'aerosol (circa 40-1200 mg/Kg di biomassa combusta) e può essere rilevato sul particolato anche a distanze considerevoli rispetto alle sorgenti di combustione [38].

Inoltre la presenza di levoglucosano non è mai stata osservata nel fumo generato da carbone o da altri combustibili fossili [38].

Steroli fecali

Diverse sostanze organiche a basso peso molecolare di origine biologica presenti nei prodotti di rifiuto umani e animali sono stati proposti come indicatori biologici di contaminazione fecale [39-41]. I biomarcatori fecali sono costituiti dagli steroidi, che includono steroli e stanoli [42]. Tali marcatori hanno raggiunto un ruolo sempre di maggior importanza per stabilire la presenza antropica e come questa abbia influito sull'ambiente circostante.

Nelle feci umane il coprostanolo costituisce circa il 60% del totale degli steroli presenti [43]. I profili di steroli fecali negli erbivori invece vedono prevalere principalmente fitosteroli, come lo stigmastanolo prodotto nell'intestino dei ruminanti tramite la biodegradazione del sitosterolo e dello stigmasterolo. Al contrario, il contenuto di steroli nelle feci di uccelli è altamente variabile e dipendente in larga misura la dieta dell'animale. La degradazione di steroli e stanoli nell'ambiente è favorita da condizioni aerobiche, dove i batteri possono degradare il coprostanolo in situ e formare il suo epimero 5β -cholestan- 3α -ol (epicoprostanolo) [42,44]. La velocità di questi processi decresce notevolmente con l'aumentare della profondità e le condizioni anossiche inibiscono la degradazione [45]. Questi composti, a causa della loro natura idrofoba, tendono a legarsi con il particolato, ostacolando così la loro rimozione in ambienti acquatici, e, pertanto, possono essere conservati nei sedimenti per millenni [41,46]. Questa relativa stabilità suggerisce che questi composti possono essere usati come traccianti molecolari in contesti archeologici o integrati in ricostruzioni climatiche[47].

Metodi Analitici per la determinazione di IPA, Levoglucosano e Steroli fecali

Come mostrato in letteratura, IPA, levoglucosano e steroli, poiché presentano una diversa struttura chimica, vengono estratti e analizzati con procedure differenti.

Per quanto riguarda la procedura di estrazione, gli IPA vengono generalmente estratti con una soluzione di esano-diclorometano (ESA:DCM 1:1), gli steroli con diclorometano (DCM), mentre per il levoglucosano si preferisce il metanolo (MeOH). Nonostante il levoglucosano sia generalmente analizzato attraverso cromatografia liquida, l'analisi strumentale può essere eseguita per tutti e tre gli analiti mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa. Tuttavia, a causa della polare presenza di gruppi idrossilici che conferiscono una certa polarità ai composti, steroli e levoglucosano devono subire una procedura di derivatizzazione prima di poter essere iniettati al gascromatografo [18,48-54].

Nella seguente tabella vengono riassunti i principali passaggi delle differenti procedure analitiche.

Tabella 1 Analiti e rispettivi metodi di estrazione e analisi strumentale.

ANALITA	ESTRAZIONE	ANALISI STRUMENTALE
IPA	ESA:DCM	GC-MS
Steroli	DCM	GC-MS (derivatizzazione)
Levoglucosano	MeOH	LC-MS; GC-MS (derivatizzazione)

Sulla base di queste considerazioni è pertanto possibile ipotizzare la possibilità di sviluppare un metodo analitico capace di determinare queste tre classi di analiti in uno stesso campione.

La possibilità di avere un metodo analitico in grado di determinare questi biomarcatori nei sedimenti lacustri consentirebbe di discriminare l'origine degli incendi, riuscendo a stabilire se sono naturali o dovuti a cause antropiche. Potrebbe quindi essere applicato a un sito di interesse in cui è stata ipotizzata l'influenza antropica sull'evoluzione degli incendi.

Africa orientale: *the burning continent*

Nel continente africano, in particolare nell'area orientale, gli incendi da biomassa si verificano con un'elevata frequenza [55,56], gli incendi boschivi e della savana africana rappresentano attualmente quasi un terzo delle emissioni globali derivanti dalla combustione da biomassa [57,58]. Per questo motivo l'Africa è anche conosciuta come *the burning continent*. Anche se oggi quasi tutti gli incendi sono indotti dagli esseri umani e il regime degli incendi è strettamente controllato dal ciclo delle precipitazioni, gli incendi nella savana tropicale sono la principale fonte di emissioni di carbonio su scala globale (60% del totale) [59].

Il movimento latitudinale della zona di convergenza intertropicale (ITCZ) fa sì che sia presente un clima umido, tale da consentire la crescita di vegetazione rigogliosa, intervallato da un periodo notevolmente secco che, al contrario, favorisce il verificarsi d'incendi [60]. Ciononostante, la colonizzazione umana è spesso collegata ad una alterazione del regime del fuoco [61,62]. Purtroppo però si conosce molto poco riguardo alla frequenza ed all'intensità degli incendi avvenuti nel passato.

Nell'Africa orientale, più precisamente nella Rift Valley, ci sono diversi laghi che potrebbero risultare utili archivi climatici per la ricostruzione di paleofuochi, tra cui il lago Vittoria.

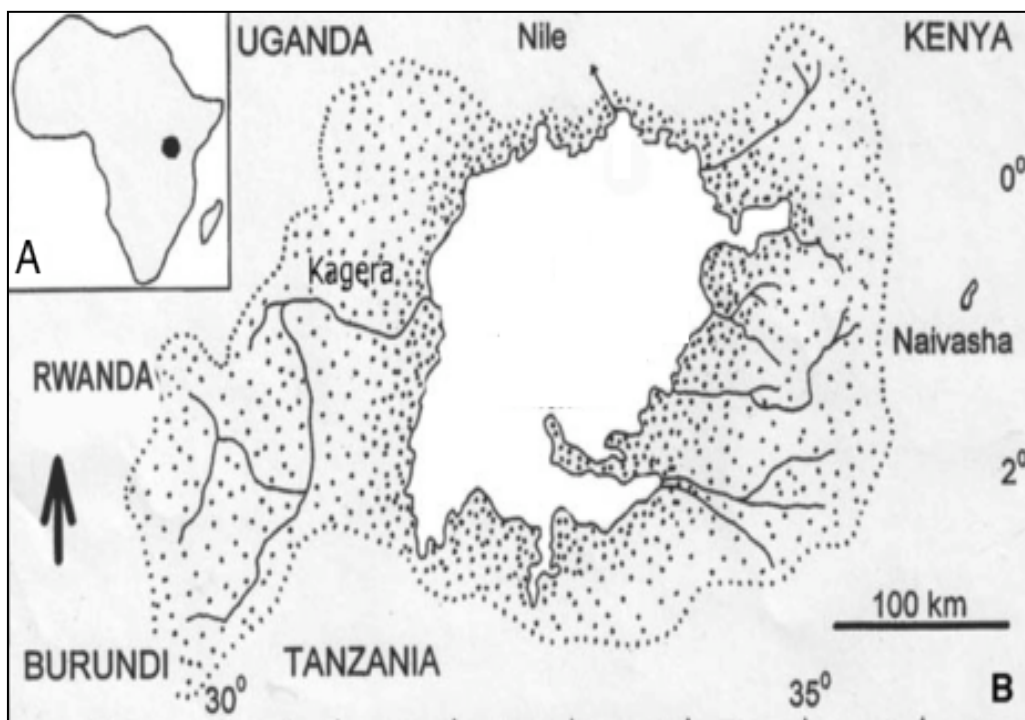


Figura 1 A)Africa con in evidenza il bacino del lago Vittoria B)bacino del lago Vittoria nel particolare.

Il lago Vittoria è situato nella parte orientale del continente africano, più precisamente nella Rift Valley, tra le latitudini $0^{\circ} 20' N$ - $3^{\circ} S$ e longitudini $31^{\circ} 40' E$ - $34^{\circ} 53' E$ [63].

È il più grande lago d'acqua dolce nei tropici e il secondo più grande nel mondo. L'area del bacino è di 194.000 km^2 e la superficie del lago con i suoi 68.000 km^2 comprende il 35% di esso [64]. La superficie del lago è condivisa da Kenya (6%), Uganda (43%) e Tanzania (51%), mentre il bacino comprende porzioni di Ruanda e Burundi. È la patria di più di 30 milioni di persone, la cui sussistenza dipende da esso [64].

La quota superficiale del lago è circa 1.135 m s.l.m. , mentre il bacino è costituito da una serie di altopiani a gradini con un altitudine media di 2700 m , ma arriva anche a toccare i 4000 m o più nelle zone di montagna [63].

Lungo gran parte del perimetro del lago, ma in particolar modo a nord e a sud, il litorale risulta molto irregolare e, in alcuni punti, parzialmente sommerso[65]. Il Lago Vittoria è

relativamente poco profondo, con una profondità media di 45 m e una massima di 80 m. Il fiume principale che arriva al lago è il fiume Kagera [64].

In generale il clima del bacino del lago Vittoria è un insieme di un clima di tipo equatoriale, con abbondanti piogge che si verificano durante tutto l'anno, soprattutto nelle vicinanze del lago, e un clima semi arido, caratterizzato da siccità intermittente, in alcuni casi anche in aree a breve distanza dal lago [63]. La variabilità diurna, stagionale e annuale del clima del bacino è dovuta sia a circolazioni a grande che a meso-scala. I modelli di vento e di pressione che governano il clima della regione includono tre flussi d'aria principali: il flusso d'aria proveniente dal Congo, i monsoni provenienti da Sud-Est e i monsoni provenienti da Nord-Est.

La massa d'aria proveniente dal Congo è umida, termicamente instabile e quindi associata a piogge. I monsoni da Nord-Est, invece, sono termicamente stabili e relativamente secchi e spiegano in parte le condizioni relativamente aride in gran parte dell'Africa orientale.

Due volte l'anno un centro di bassa pressione segue il sole lungo l'equatore. Le precipitazioni più abbondanti sono associate a questo tragitto e sono distribuite in modo bimodale durante l'anno. Nel bacino del lago Vittoria i picchi di precipitazioni si verificano tra Marzo - Maggio e Ottobre - Dicembre [66]. In aggiunta a questo passaggio di bassa pressione, sul lago Vittoria si trova un centro di bassa pressione permanente [67]. Quest'ultimo probabilmente è originato sia dalle correnti che dalle caratteristiche orografiche del luogo. La sua presenza produce una grande quantità di pioggia. Anche la presenza del lago stesso influisce sulle precipitazioni sul bacino [68]. È stato stimato che le precipitazioni calano di 2,5 cm per miglio, allontanandosi dal lago

verso l'entroterra settentrionale. Nel bacino la quantità di precipitazioni annue generalmente aumenta con l'altitudine e va da meno di 63 cm di più di 190 cm[68].

La maggior parte delle precipitazioni che si verifica sul bacino lo lascia attraverso l'evaporazione. È stato proposto che circa l'82% dell'acqua che arriva al lago viene persa attraverso l'evaporazione [69]. Il bilancio idrico del lago è governato, infatti, principalmente dalle precipitazioni più che dai suoi immissari: circa l'80% delle immissioni è dato dalle precipitazioni. Per questo motivo, il lago Vittoria viene descritto da alcuni ricercatori come “controllato dall'atmosfera” [64].

La vegetazione presente nel bacino è abbastanza varia. Solo nella porzione di bacino che si trova in Uganda sono stati mappati, in scala 1:500,000, circa 35 unità vegetazionali [70]. Queste unità sono altamente frammentate e intercalate.

Le savane sono dominate prevalentemente da specie di *Acacia*, *Albizia* *Butyrospermum* o *Combretum* per quanto riguarda gli alberi, e di *Cymbopogon*, *Hyparrhenia* o *Loudetia* tra le specie erbacee.

L'aspetto generale, dominato dalla savana e dalla prateria, è intervallato da tre diversi tipi di vegetazione: bosco, palude e foresta.

Spingendoci a Sud-Ovest, nella porzione relativamente secca del bacino, troviamo un bosco di leguminose detto anche “miombo”, in cui i generi predominanti sono *Brachystegia* e *Isoberlinia*. Questo vasto bosco ricopre circa un terzo della Tanzania e parte dell'Africa centrale [71].

Le coste del lago Vittoria, i piccoli laghi ad ovest e le pianure alluvionali lungo i fiumi sono caratterizzate da paludi. Molte di queste sono dominate da *Cyperus papyrus*, ma lungo il lago sono presenti anche specie di *Miscanthidium violaceum* e *Sphagnum*

[72]. Alcune delle aree inondate vicino al lago Vittoria supportano foreste, e nei pressi del delta del fiume Kagera sono presenti esemplari di conifere della specie *Podocarpus* [65]. Blocchi consistenti di foresta, sono oggi limitati solo alle aree dove le precipitazioni sono di minimo 120 cm, quindi negli altopiani all'estremità del bacino, o lungo le coste a nord e a ovest del lago Vittoria. In questi luoghi predominano foreste di sempreverdi, come quelle di *Juniperus procera* [73]. Mentre dove la stagione secca è più pronunciata elementi caducifoglie diventano importanti.

Sia dal punto di vista climatico che edafico la gran parte del bacino sembra capace di supportare estese foreste. Ampie aree di savana contengono *patches* isolati di foreste così piccoli da non poter essere mappati. Questo mosaico è un risultato della pressione antropica. Una volta però, che queste pressioni sono alleviate, la ricolonizzazione da parte delle foreste è rapida [70,74,75]. Tuttavia, le coltivazioni e il pascolo hanno frammentato abbastanza la vegetazione naturale, l'impatto umano principale è dovuto all'uso del fuoco. La combustione stimola la produzione di erba fresca, usata come foraggio per il bestiame o come paglia [70].

Quattromila anni fa ha avuto inizio, nell'Africa orientale, quello che viene definito come Neolitico Pastorale, che è proseguito per più di due millenni e mezzo, lasciando il posto all'età del ferro poco più di mille anni fa [76]. Con Neolitico Pastorale o Neolitico dell'Africa orientale si intende quel periodo in cui è avvenuto un passaggio dalla caccia e raccolta all'agricoltura [77].

Le trasformazioni sembrano essere state favorite sia da cambiamenti climatici ambientali sia da migrazioni di popolazioni.

Nel corso della sua lunga esistenza, il neolitico pastorale è andato incontro a grandi trasformazioni, ognuna delle quali ha generato una gamma diversa di stili di ceramiche, tradizioni litiche e diverse pratiche di sussistenza e di regolamento. Per questo motivo questa entità temporale può essere suddivisa in tre fasi: precoce, evolutiva e tarda.

Il nostro studio, che racchiude un arco temporale che va da un massimo di 2150 anni fa ad un minimo di 1240 anni fa, coincide con quello che viene definito come tardo Neolitico Pastorale (1900 BP-1300 BP) [77] e che corrisponde più o meno con quella che gli archeologi definiscono come Età del Ferro, che si divide in: *prima età del ferro* (EIA) e *tarda età del Ferro* (LIA) e che comprende gli ultimi duemila anni nell' Africa sub-equatoriale. Questi termini si riferiscono a unità archeologiche con specifici usi e costumi. Solitamente quando parliamo di EIA prendiamo in considerazione i primi agricoltori che utilizzavano utensili di ferro (probabilmente di lingua bantu) [78]. C'è una prova indiretta che 3000 anni fa ci sia stata una prima comparsa di una società dell'età del ferro pastorale nella Rift Valley centrale del Kenya [76]. Una conferma di questo sviluppo arriva dalla Deloraine Farm, un sito che si trova a Nord Ovest del lago Nakuru, i cui reperti mostravano ceramiche associate a utensili di ferro, scorie, ugelli, abbondanti resti di bovini (insieme con alcuni caprini e pochi animali selvatici), e la prova di consumo di cereali [79-81].

La comparsa dell'età pastorale del ferro è presa come esempio per rappresentare una cultura, dove non solo si cominciava a usare utensili di ferro, ma che inoltre cominciava a praticare un regime non specializzato di sussistenza pastorale che potrebbe includere anche un principio di tecniche di semina e raccolta [81]. Generalmente gli archeologi attribuiscono questi cambiamenti nella cultura e nelle tradizioni a diffusione o

migrazione. In questo caso una possibile spiegazione è data dalla migrazione delle popolazioni Bantu, che si sono spostate da ovest verso l'Africa orientale [75].

Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è duplice. Il primo obiettivo è quello di combinare diverse metodologie chimico-analitiche, già sviluppate in letteratura, al fine di validare un metodo unico capace di determinare tre diverse classi di composti quali IPA, steroli fecali e levoglucosano, in piccole quantità di sedimento lacustre. In questa tesi, la qualità del dato è stata valutata, principalmente, in termini di precisione, limiti di rilevabilità e quantificazione, poiché questi parametri risultano critici nelle ricostruzioni paleo ambientali. Tali analiti, infatti, sono spesso utilizzati come marcatori molecolari per la ricostruzione degli incendi (IPA e levoglucosano) e della presenza e attività umana (steroli fecali).

Il secondo obiettivo di questa tesi è invece più ambizioso. Ci si prefigge, infatti, di utilizzare il metodo analitico sopradescritto per proporre un approccio innovativo nella risoluzione di una delle più complesse e discusse sfide scientifiche in campo paleo ambientale, ossia la discriminazione del contributo antropico e naturale negli incendi del passato. A questo proposito è stata scelta una carota di sedimento lacustre prelevata dal lago Vittoria che interessa un periodo storico compreso tra i 1240 e i 2150 anni fa. Questo archivio ambientale è di particolare interesse, in quanto l'Africa orientale è stata teatro di brusche variazioni delle attività incendiare e, in questo periodo storico, corrispondente all'età del Ferro, ha visto un intensificarsi delle attività antropiche. Questi eventi, tuttavia, benché noti da studi archeologici e da ricostruzioni di incendi effettuate analizzando il *charcoal* in sedimenti di alcuni laghi limitrofi, non sono mai stati messi in relazione diretta. In questa tesi, per la prima volta, l'approccio analitico consentirà di sincronizzare il segnale ambientale legato all'attività degli incendi con la presenza e attività antropiche, nel continente africano.

Materiali e metodi

Materiali e reagenti

I solventi impiegati, diclorometano (DCM), n-esano, metanolo (MeOH), acetonitrile (ACN), acetone e acido cloridrico (HCl, 33%), con grado di purezza pesticidi, sono stati acquistati da *Romil Ltd.*, Cambridge, GB.

La terra di diatomee e la sabbia di Ottawa, impiegate per l'estrazione con PLE, sono state fornite da *Applied Separation Inc.* (Allentown, PA, USA)

Sono stati utilizzati sia standard dei composti nativi, sia standard marcati: per gli idrocarburi policiclici aromatici (mix^{IPA}), gli steroli (FeSt) e il levoglucosano (LGV):

- Nativi:

mix^{IPA} (naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene pirene, benzo(a)antracene, crisene e retenete) 2 ng/μl;

FeSt (coprostanolo, epicoprostanolo, colesterolo, β-sitosterolo e stigmastanolo)¹
10 ng/μl;

LGV (levoglucosano, mannosano e galactosano)² 10 ng/μl.

- Marcati:

mix^{IPA13}C (acenaftilene¹³C, fenantrene¹³C, crisene¹³C) 10 ng/μl;

FeSt (colesterolo¹³C₂ e colesterolo¹³C₃, che differiscono per il numero di C)
10 ng/μl;

LGV (levoglucosano¹³C, mannosano¹³C) 10 ng/μl.

¹ Per il nostro studio saranno presi in considerazione solo colesterolo e stigmastanolo.

² Per il nostro studio verrà preso in considerazione solo il levoglucosano.

Come derivatizzante è stato usato *N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide* (BSTFA + 1% TMC), alla quale si farà riferimento in seguito con l'abbreviazione BSTFA.

La procedura di purificazione via SPE è stata condotta con cartucce monouso di silice neutra da 2 g acquistate presso *Discovery*® con modello: DCS-Si SPE.

Decontaminazione materiale

La vetreria è stata lavata con acqua e detergente *Contrad*®, asciugata con acetone e decontaminata con tre aliquote di DCM, n-esano e MeOH, rispettivamente. La medesima procedura di decontaminazione è stata eseguita anche sul materiale monouso, come pipette *Pasteur* e vials.

Strumentazione

Estrazione mediante *Pressurized Liquid Extraction* (PLE)

Con questo strumento, attraverso l'utilizzo di piccoli volumi di solvente e in tempi brevi, è possibile effettuare estrazioni efficienti e riproducibili. Il processo avviene grazie agli elevati valori di temperatura e di pressione ai quali è possibile impostare lo strumento. L'alta temperatura rende il campione più solubile e garantisce una maggiore diffusione del solvente, mentre l'alta pressione ne impedisce l'evaporazione. Con queste condizioni operative, l'estrazione degli analiti dal campione solido si rivela più efficace. Il sedimento, insieme alla sabbia di Ottawa e alla terra di diatomee, è introdotto in un supporto cilindrico in acciaio inossidabile (*vessel*) che viene chiuso con dei tappi muniti di guarnizione di gomma. Durante il ciclo estrattivo, il solvente, attraversando le linee del PLE, entra nella *vessel* ed interagisce con il campione. L'estrazione viene condotta

in condizioni di temperatura e pressione controllate. Alla fine di ogni ciclo, il solvente viene raccolto in un apposito contenitore. Un ultimo passaggio viene eseguito facendo fluire N₂ per evitare la contaminazione nel caso di analisi successive e per raccogliere l'eventuale solvente rimasto nelle linee.

Condizioni sperimentali: i campioni sono stati estratti con una miscela di DCM:MeOH 9:1 a una pressione di 1000 PSI e una temperatura di 100°C, con una statica di 5 minuti.



Figura 2 Pressurized liquid extraction (PLE).

Turbovap

Il *Turbovap*® II (CaliperLife Science, Hopkinton, MA, USA) è uno strumento che consente di ridurre il volume del campione in modo controllato e impostando le condizioni di lavoro più adeguate. Il Turbovap contiene sei postazioni, a ognuna delle quali è associato un erogatore da cui fuoriesce un continuo flusso di azoto che permette la concentrazione del campione.

In ogni postazione viene inserito un ditale di vetro (Zyrmark®) di 200 ml di volume contenente l'estratto. I ditali sono immersi in acqua a temperatura controllata.

Il raggiungimento del volume finale di 500 μl viene segnalato da un sensore ottico con successiva interruzione dell'erogazione di N_2 . Il pannello di controllo presente sullo strumento permette di selezionare la temperatura del bagno ad acqua, la pressione del gas, la postazione di lavoro e la modalità di concentrazione manuale, da impostare qualora sia necessario ridurre il solvente a volumi inferiori a 500 μl . In questo caso il Turbovap è stato utilizzato sia prima che dopo l'estrazione in fase solida (*clean up*) dei campioni.

Condizioni sperimentali: i campioni, dopo essere stati estratti, sono stati portati a 500 μl mantenendo una temperatura di 23°C e una pressione di 6-7 bar. Dopo l'estrazione in fase solida le tre frazioni sono state trattate separatamente:

- I frazione(IPA): è stata concentrata a circa 100 μl a una T di 23°C e una P di 6-7 bar;
- II frazione (steroli): è stata portata a secco a una T di 35°C e una P di 6-7bar; e successivamente ripresa con 100 μl di DCM.
- III frazione (Levoglicosano): è stata concentrata circa 100 μl a una T di 35°C e una P di 6-7bar.



Figura 3 Turbovap

Estrazione in fase solida (SPE)

L'estrazione in fase solida con solvente (SUPELCO, VISIPREP™ DL) è una tecnica preparativa che consente la separazione di analiti aventi differente natura chimica. Il processo di purificazione avviene grazie all'interazione tra l'estratto, eluito nella cartuccia dalla fase mobile, e la fase stazionaria, che può essere silice, allumina, fluorisil o resine, a seconda della natura del campione da trattare. Le diverse componenti di quest'ultimo, dunque, possono essere trattenute o fluire lungo il letto della colonna, a seconda della scelta di appropriata fase mobile e stazionaria. La maggiore precisione e accuratezza dell'analisi sono raggiunte attraverso l'aumento della concentrazione delle molecole monitorate, grazie l'eluizione dell'estratto con piccoli volumi di solvente. Altri vantaggi che possono derivare dall'utilizzo di questa strumentazione sono la minore esposizione ad agenti tossici e perdita dei campioni, l'evaporazione minima del solvente e i pochi *steps* operativi costituenti la procedura.



Figura 4 Strumentazione adottata per la solid phase extraction (SPE).

Condizioni sperimentali: i campioni estratti, dopo essere stati concentrati a 500µl nel Turbovap, sono stati inseriti, grazie a una pipetta *Pasteur*, in una cartuccia monouso di silice neutra precedentemente condizionata con 40 ml di una miscela di ESA:DCM1:1. In seguito, per separare i diversi analiti, il campione è stato eluito con tre diversi solventi.

- Gli IPA sono stati eluiti con 15 ml di ESA:DCM 1:1.
- Gli steroli con 40 ml di DCM
- Il levoglucosano con 30 ml di ACN.

L'eluato di ogni frazione è stato raccolto in una vial pulita e decontaminata.

Procedura di derivatizzazione

Il frazionamento è indispensabile, infatti i tre biomarker devono subire procedure diverse per poter essere analizzati tutti tramite gascromatografia, in quanto questa tecnica non è idonea per lo studio di composti polari e idrofili, come steroli e levoglucosano con le colonne gascromatografiche HP-5-ms comunemente utilizzate in gascromatografia. È opportuno quindi che questi composti vengano resi più volatili mediante derivatizzazione.

Esistono diverse tecniche di derivatizzazione. In questa tesi è stata usata la *sililazione*.

La reazione di sililazione consente di convertire i gruppi ossidrilici negli equivalenti trimetilsilil derivati, e presenta un prodotto principale per ogni sostanza e un'alta efficienza di conversione. [82]. Esistono diversi agenti sililanti, tra cui: *trimetilclorosilano* (TMCS), *N-metil-trimetilsililtrifluoroacetammida* (MSTFA),

N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetammide (BSTFA) o *N*-(*t*-butildimetilsilil)-*N*-metiltrifluoroacetammide (MTBSTFA) [83-86].

Per questo lavoro è stato usato come derivatizzante il BSTFA; il prodotto finale della reazione è la forma sililizzata del composto di partenza.

Condizioni sperimentali:

- II frazione(steroli): ai 100 µl di DCM sono stati aggiunti 100 µl di BSTFA; la soluzione è stata scaldata per un'ora a 70°C in Termoblocco.
- III frazione (levoglucosano): prima di iniziare la procedura di derivatizzazione i 100µl di ACN sono stati portati a secco sotto flusso di azoto, in seguito sono stati aggiunti 100µl di BSTFA e 100µl di Piridina (catalizzatore) la soluzione è stata tenuta per un'ora a 70°C in Termoblocco.

Gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS)

L'identificazione e la quantificazione dei composti avviene grazie all'uso di un gascromatografo (Agilent Technologies 5975c inert MSD) utilizzato in modalità SIM (Single Ion Monitoring).

I componenti si distribuiscono su due fasi, una mobile e una stazionaria. In questa tesi è stata utilizzata una colonna cromatografica da 60 mt HP5-ms. Dopo essere stato iniettato il campione viene vaporizzato e viene trasportato grazie a un flusso di elio (fase mobile). Gli analiti presenti nel campione interagiranno poi con la fase stazionaria per la quale avranno differente affinità.

Il campione viene frammentato in ioni più piccoli grazie all'interazione con un fascio di elettroni prodotto dalla sorgente ad impatto elettronico (EI). In seguito, solamente gli ioni carichi positivamente, caratterizzati da uno specifico rapporto massa/carica (m/z), vengono analizzati dal quadrupolo e registrati da un software specifico.



Figura 5 Gascromatografo accoppiato a spettrometro di massa.

Condizioni sperimentali: in Tabella 2 sono riportate le condizioni sperimentali usate per l'identificazione degli analiti tramite GC-MS.

Tabella 2 Condizioni sperimentali usate per l'identificazione degli analiti tramite GC-MS.

	SCALA TEMPERATURE	RUN TIME
CORSA CROMATOGRAFICA IPA	70 °C per 1,5 min poi 10 °C/min fino a 150 °C per 10 min poi 3 °C/min fino a 300 °C per 15 min	Run Time 84,5 min 30 min (Post Run) a 305 °C
CORSA CROMATOGRAFICA STEROLI	110 °C per 5,5 min poi 15 °C/min fino a 210 °C per 0 min poi 2 °C/min fino a 300 °C per 10 min	Run Time 67,2 min 15 min (Post Run) a 315 °C
CORSA CROMATOGRAFICA LEVOGLUCOSANO	110 °C per 5,5 min Poi 15 °C/min fino a 210 °C per 0 min Poi 2 °C/min fino a 220 °C per 5 min	Run Time 22,2 min 10 min (Post Run) a 300 °C

Sedimenti Lacustri (Lago Vittoria)

I campioni analizzati in questo lavoro di tesi si riferiscono ai primi 45 cm di uno dei carotaggi raccolti nella spedizione dell'8 aprile del 1995 nel lago Vittoria. In particolare ci riferiamo alla carota V95-1P. Il campionamento del sedimento è stato condotto con un carotiere a pistone a una profondità di 65,8 m, nella parte centro-orientale del lago ($00^{\circ}27'63''\text{S}$ - $33^{\circ}25'09''\text{E}$). La carota ha una lunghezza complessiva di 9,16 m e ricopre un intervallo di circa 20000 anni.

Per la datazione dei campioni ci siamo basati sull'*age model* proposto da Johnson et. al. [87] sulla base della datazione al radiocarbonio (vedi Figura 7). La velocità di sedimentazione è stata assunta costante e pari a 0.051 cm y^{-1} .

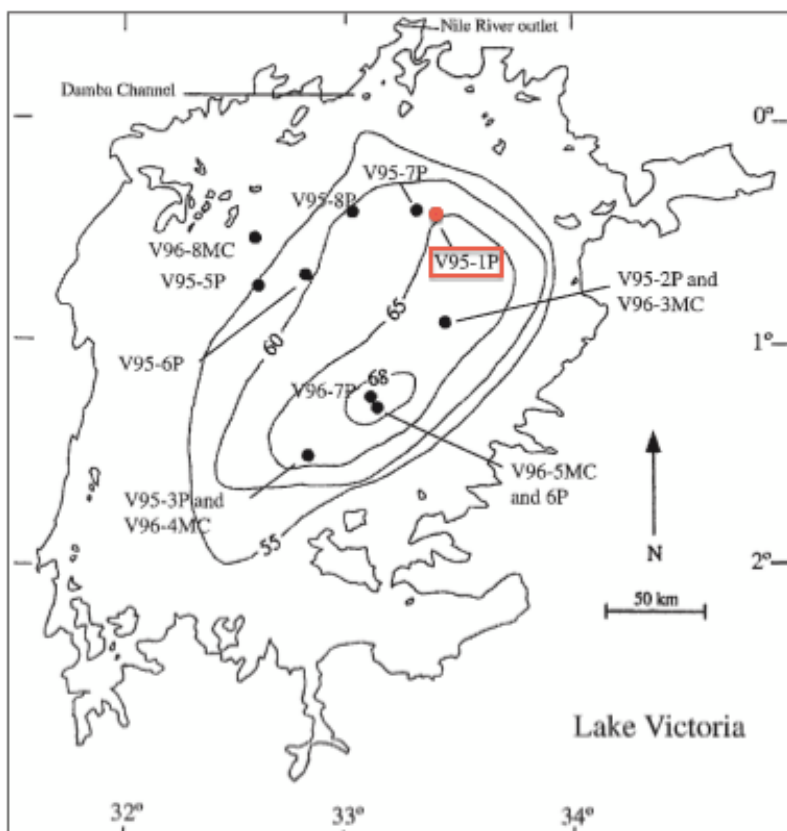


Figura 6 Mappa batimetrica del lago vittoria, (linee batimetriche in m) in rosso il carotaggio preso in considerazione nel seguente lavoro di tesi.

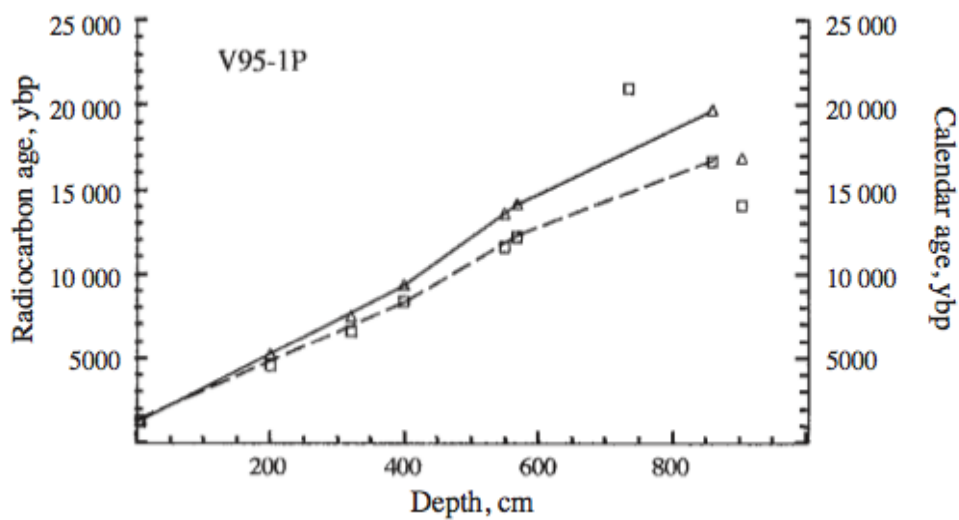


Figura 7 Radiocarbon Age Model espresso in year before present (ybp) [87].

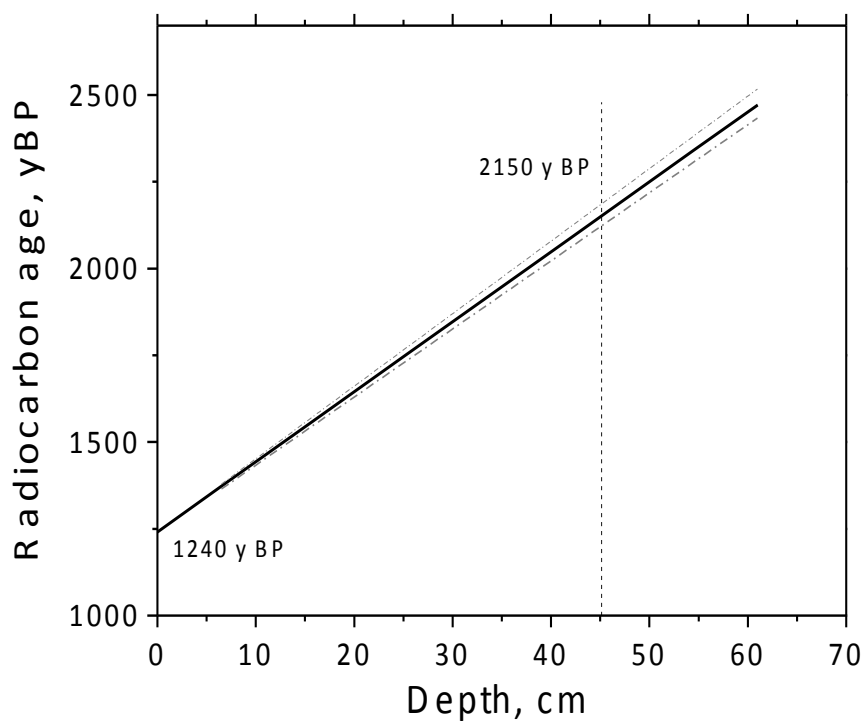


Figura 8 Radiocarbonage model espresso in year before present (ybp).

Come possiamo notare delle immagini (Figure 7-8), il punto individuato ad una profondità di 0 cm non corrisponde al presente. Questo perché la prima parte del

sedimento (circa 1 m) non è stata presa in considerazione a causa di evidenti effetti di rimescolamento (Johnson, comunicazione personale).

In questa tesi sono stati analizzati 19 campioni (corrispondenti ad un intervallo di profondità di 1 cm) sub-campionati nei primi 45 cm disponibili della carota. In Tabella 3 sono riportati i dettagli relativi ai campioni analizzati.

Tabella 3 profondità (cm) e relativa età

CAMPIONE	PROFONDITÀ MINIMA (CM)	PROFONDITÀ MASSIMA (CM)	ETÀ
1	0	1	1251.1
2	4	5	1331.8
3	6	7	1372.1
4	8	9	1412.4
5	10	11	1452.8
6	12	13	1493.1
7	14	15	1533.4
8	16	17	1573.8
9	20	21	1654.4
10	22	23	1694.8
11	28	29	1815.8
12	30	31	1856.1
13	32	33	1896.5
14	34	35	1936.8
15	36	37	1977.1
16	38	39	2017.5
17	40	41	2057.8
18	42	43	2098.1
19	44	45	2138.5

I sedimenti del seguente carotaggio, nella parte superiore, sono caratterizzati da fango di diatomee omogeneo. Più in profondità, sulla base della tessitura dei sedimenti, sono state identificate due discontinuità. Sopra la discontinuità superiore (circa 700 cm) vi è uno strato di 1 cm contenente frammenti di conchiglie e frammenti di piante macroscopiche. Gli ultimi 60 cm del sedimento sono caratterizzati da fango di diatomee

disomogeneo di colore nero verdastro, la disomogeneità è data da “frammenti” di circa 0,5 cm di diametro, dovuti alla presenza di granelli di sabbia, frammenti di materiale vegetale terrestre e piccole radici [88]. La sezione di carotaggio presa in considerazione in questa tesi si riferisce ai primi 45 cm. Essa è caratterizzata da fango di diatomee di colore nero verdastro. Benché su questi campioni non sia disponibile uno studio granulometrico dettagliato del sedimento, dalle informazioni a nostra disposizione [87,89-91], tale sedimento risulta indicativamente caratterizzato da una predominante componente di limo e argilla. Lungo la sezione presa in considerazione, comunque, non sono presenti strutture o componenti grossolane [88].

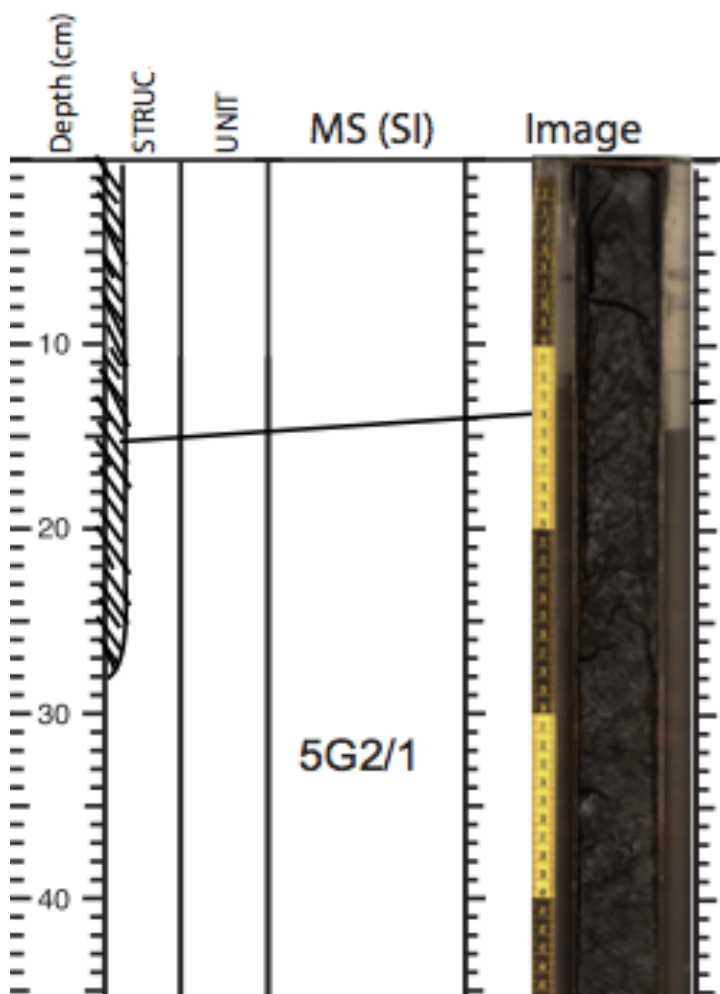


Figura 9 Primi 45 cm del carotaggio v95-1p

I sedimenti risalenti all'Olocene nel lago Vittoria sono insolitamente ricchi in materia organica, cosa che riflette l'elevata produttività biogenica nel lago e il relativamente basso input di sedimenti terrigeni dal terreno circostante. La concentrazione del carbonio organico (TOC) nella sezione analizzata in questa tesi varia da un minimo del 15% ad un massimo di 20% in peso. Queste condizioni caratterizzano tutto il sedimento dell'Olocene [88,92].

Quantificazione

Poiché la sensibilità strumentale non è identica per i diversi analiti, è necessario correggere le concentrazioni trovate attraverso i fattori di risposta, ovvero soluzioni che contengono in concentrazioni note i composti nativi e marcati ^{13}C corrispondenti agli analiti da determinare. Queste soluzioni vengono sottoposte ad analisi gascromatografica nelle stesse condizioni dei campioni e, poiché la variante nativa e marcata di uno stesso composto hanno masse differenti, lo spettrometro di massa è in grado di distinguere tra le due. Dal confronto delle aree sarà perciò possibile calcolare il valore del fattore di risposta per ogni congenero secondo la formula:

$$FR_i = \frac{[A_i \cdot C_{is}]}{[A_{is} \cdot C_i]}$$

Dove:

A_i = area del picco del composto nativo

A_{is} = area del picco del composto marcato

C_i = concentrazione del composto nativo nella soluzione

C_{is} = concentrazione del composto marcato nella soluzione.

La quantificazione dei composti analizzati viene ottenuta attraverso il confronto diretto dell'area dei picchi degli standard marcati ^{13}C che vengono aggiunti a monte (*standard interno*) e a valle (*standard di recupero*) della fase preanalitica. Si dà per assunto che i marcati aggiunti prima dell'estrazione abbiano lo stesso comportamento chimico-fisico degli analiti e di conseguenza interagiscano allo stesso

modo con la matrice, i solventi e tutti i materiali con cui il campione viene a contatto. Perciò possiamo asserire che le perdite di analita che si verificano nella preparazione del campione devono essere le stesse degli standard aggiunti in concentrazione nota, in questo modo quindi sarà possibile alla concentrazione iniziale. Il calcolo dell'efficienza di recupero viene calcolato con la seguente equazione:

$$\%R_{is} = \frac{[A_{is} \cdot Q_{rs} \cdot 100]}{[Q_{is} \cdot A_{rs} \cdot FR_{is}]}$$

dove:

A_{is} = area del picco del composto marcato aggiunto prima dell'estrazione (standard interno).

Q_{rs} = quantità assoluta dello standard per il recupero aggiunto prima dell'analisi

Q_{is} = quantità assoluta dello standard interno aggiunto prima dell'estrazione

A_{rs} = area del picco del composto marcato aggiunto prima dell'analisi (standard recupero)

FR_{is} = fattore di risposta calcolato per lo standard interno per confronto con lo standard recupero.

Il calcolo della concentrazione degli analiti nel campione viene determinato come segue:

$$C_x = \frac{[A_x \cdot Q_{is}]}{[A_{is} \cdot V \cdot FR_i]}$$

dove:

A_x = area del picco dell'analita;

Q_{is} = quantità assoluta dello standard interno aggiunto prima dell'estrazione;

A_{is} = area del picco del composto marcato aggiunto prima dell'estrazione (standard interno)

V = volume di aria campionato;

FR_i = fattore di risposta per il composto nativo.

Precisione

La precisione è definita come il grado di concordanza tra diverse misurazioni di un campione eseguite con la stessa procedura. Tale parametro è indice anche della ripetibilità del metodo analitico e viene espresso in termini di coefficiente di variazione percentuale, CV, ossia:

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{X}} \right) \cdot 100$$

Dove:

S = deviazione standard relativa;

\bar{X} = media dell'insieme dei dati.

Calcolo del limite di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ)

I limiti di rivelabilità e di quantificazione indicano, rispettivamente, la concentrazione di analita corrispondente al segnale minimo significativo e il valore minimo che lo strumento può rilevare per effettuare una misurazione quantitativa.

Utilizzando le formule riportate di seguito sono stati calcolati i due parametri, a cui si è potuto risalire impiegando i valori dell'intercetta e della pendenza ricavate dalla retta di calibrazione.

$$LOD = \frac{\text{Intercetta} \cdot 3}{\text{Pendenza}}$$

$$LOQ = \frac{\text{Intercetta} \cdot 10}{\text{Pendenza}}$$

Risultati e discussione

Messa a punto del metodo

Come accennato nella parte introduttiva di questa tesi, il metodo analitico è stato inizialmente sviluppato sulla base di metodi precedentemente proposti per i singoli analiti riportati in letteratura [48-54]. In Figura 10 è riportata schematicamente la procedura che si intende testare.

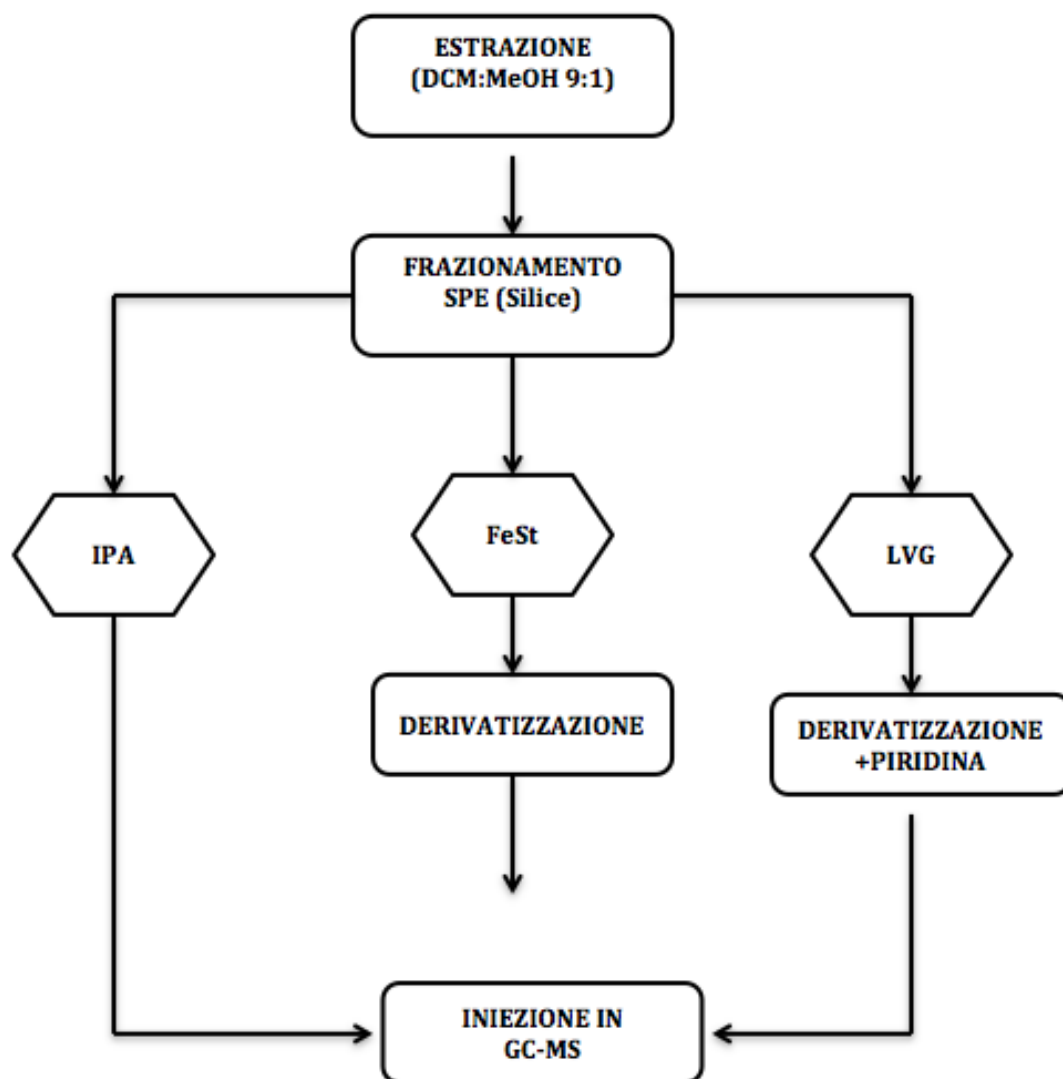


Figura 10 Schematizzazione procedura analitica.

Metodo Cromatografico.

Inizialmente, è stato verificato il metodo gascromatografico (GC-MS). A tale scopo una soluzione contenente $2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ di IPA (mix^{IPA}) è stata iniettata nelle condizioni strumentali riportate nella sezione materiali e metodi (vedi pagina 29). In Figura 11 è riportato un cromatogramma registrato in modalità single ion monitoring (SIM).

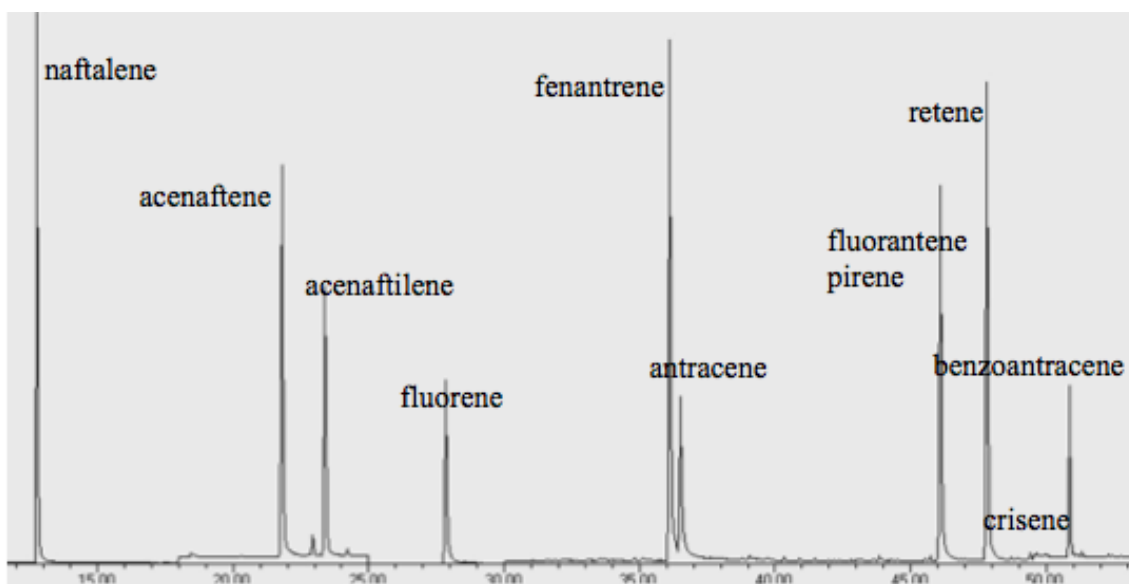


Figura 11 Cromatogramma GC-MS in modalità SIM di una soluzione contenente una miscela di IPA ($10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$).

Come si osserva dalla figura, la corsa cromatografica consente una buona separazione dei picchi, e l'ordine di eluizione è funzione del peso molecolare dei composti, come aspettato.

Analogamente è stata preparata una soluzione contenente $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ di levoglucosano. Poiché il levoglucosano è un composto polare, prima dell'iniezione è stato derivatizzato, come descritto in dettaglio nella parte di Materiali e Metodi (pag. 26).

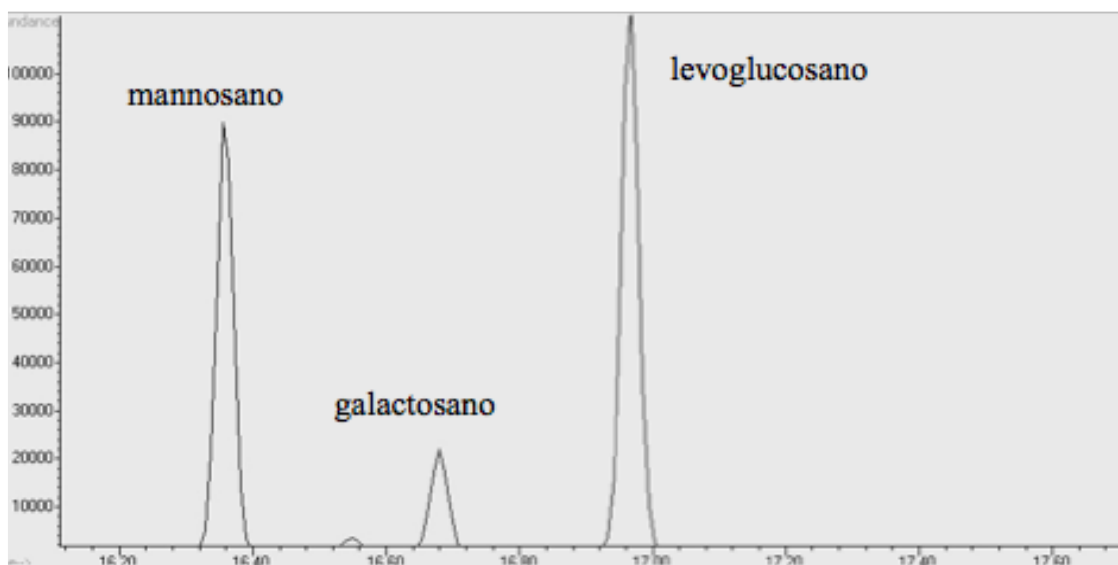


Figura 12 Cromatogramma GC-MS in modalità SIM di una soluzione contenente una miscela di Levoglucosano ($10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$).

Il cromatogramma registrato e mostrato in Figura 12, presenta tre picchi. I primi due picchi corrispondono agli isomeri del levoglucosano presenti nella soluzione standard, ma che non verranno utilizzati in questa tesi. La presenza del picco caratterizzato da una buona efficienza, dimostra comunque che la derivatizzazione è stata eseguita con successo.

In Figura 13 è invece riportato il cromatogramma ottenuto iniettando una soluzione contenente $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ di FeSt. Anche in questo caso i picchi mostrano una buona separazione e la derivatizzazione (vedi Materiali e Metodi) è stata eseguita opportunamente.

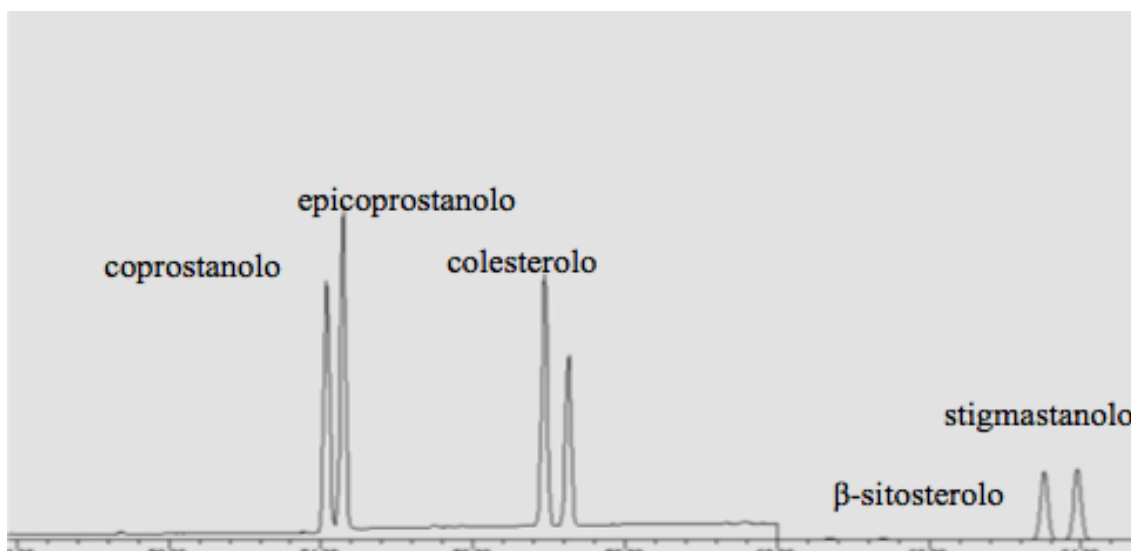


Figura 13 Cromatogramma GC-MS in modalità SIM di una soluzione contenente una miscela di FeSt ($10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$).

Come appare evidente dallo schema mostrato in Figura 10, il passaggio che richiede una più attenta valutazione, in quanto non vi sono indicazioni disponibili in letteratura, è quello legato al frazionamento degli analiti mediante colonnine in silice. Per queste ragioni, sono state valutate le condizioni (tipo di solvente e volumi) ottimali per separare le tre diverse classi di composti, sfruttando il loro diverso grado di polarità.

A questo scopo, IPA, levoglucosano e steroli fecali, vengono aggiunti in quantità note (100 ng assoluti per ogni composto) in testa alla cartuccia e vengono fatti eluire con diversi solventi. Inizialmente viene fatta eluire una miscela ESA:DCM 1:1 e vengono raccolte tre aliquote da 15 ml ciascuna. Dopo il frazionamento sono stati aggiunti 100 ng assoluti di ^{13}C fenantrene, ^{13}C colesterolo e ^{13}C levoglucosano come standard di

recupero per gli IPA, gli steroli e il levoglucosano, rispettivamente. Le tre aliquote, analizzate hanno mostrato che gli IPA escono nella prima frazione di 15 ml, (Figura 14), mentre sia levoglucosano che gli steroli, a causa della loro maggiore polarità, non vengono eluiti con la miscela di ESA:DCM.

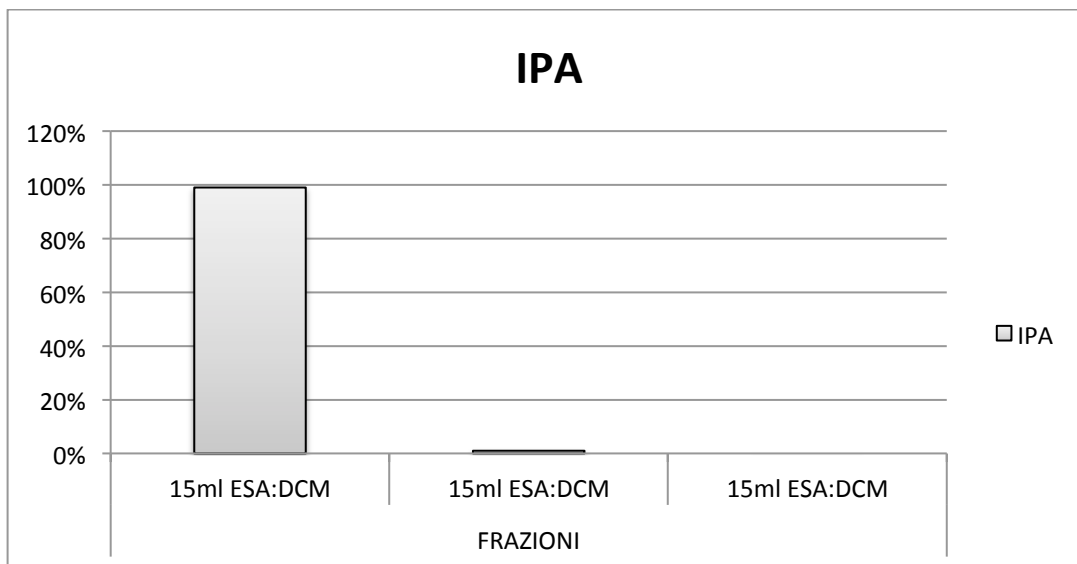


Figura 14 Quantità di IPA eluita in funzione dei volumi di eluizione.

Al fine di stabilire le condizioni di eluizione degli steroli, è stato utilizzato un solvente più polare per eluire la seconda frazione. In questo caso sono state fatte eluire tre aliquote da 15 ml di DCM.

I risultati mostrano che per far eluire completamente gli steroli è necessario un volume di almeno 30 ml di DCM. Tale volume è stato sovradimensionato ed è stato scelto di usare 40 ml di DCM. (Figura 15).

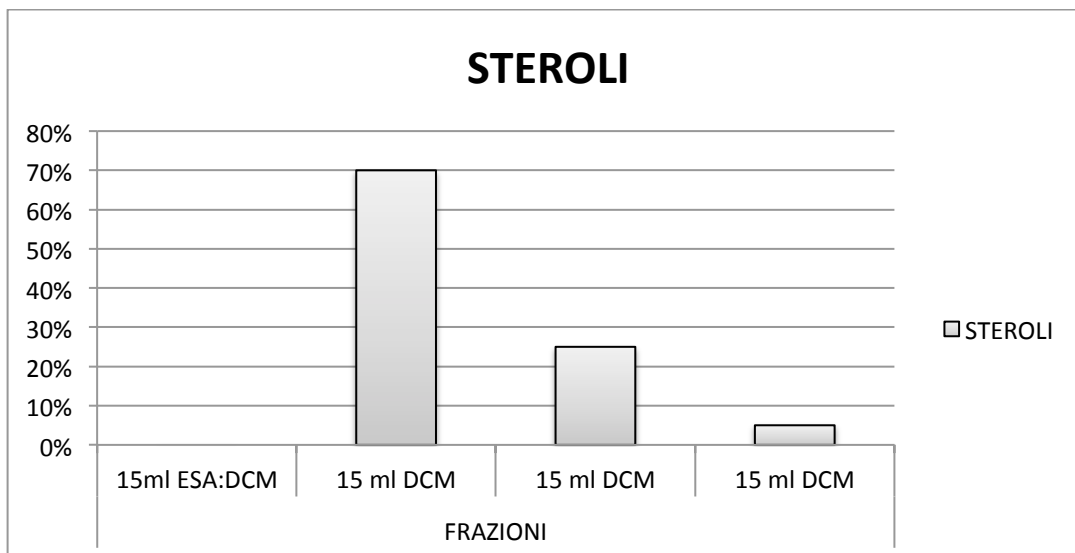


Figura 15 Quantità di Steroli eluita in funzione dei volumi di eluizione.

Anche in questo caso, l'analisi del levoglucosano ha mostrato che esso non viene eluito nelle frazioni di DCM.

Per eluire il levoglucosano è stato scelto come solvente l'ACN, più polare del DCM. Dalle analisi GC-MS è stato valutato che un volume di 30 ml ACN è adeguato per eluire completamente il levoglucosano (Figura 16).

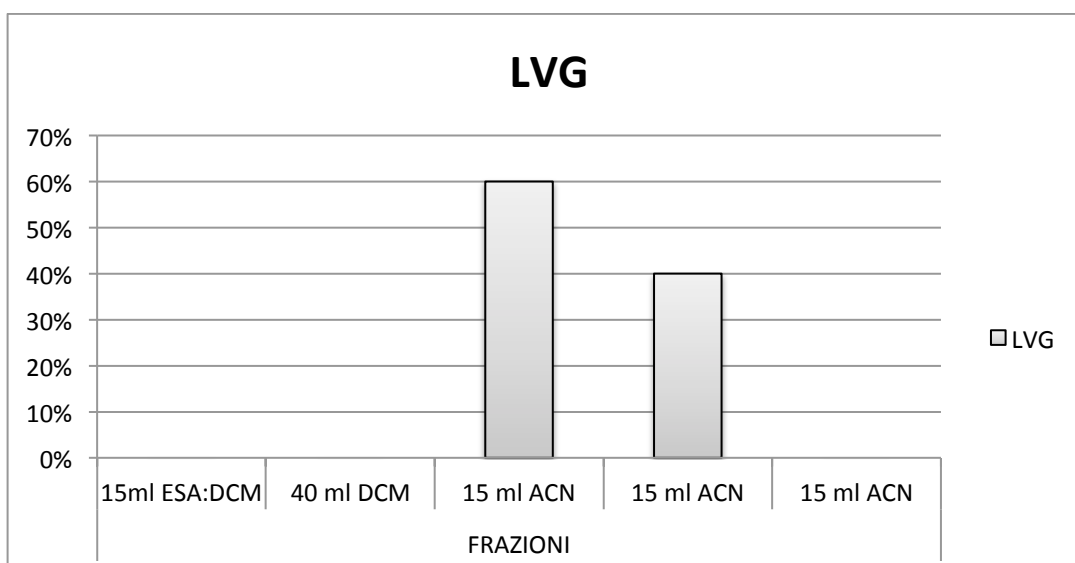


Figura 16 Quantità di levoglucosano eluita in funzione dei volumi di eluizione.

In Tabella 4 vengono riportati i solventi scelti per l'estrazione di ogni analita e il volume ottimizzato. Queste condizioni saranno impiegate negli studi successivi.

Tabella 4 solventi e rispettive quantità scelti per il frazionamento degli analiti.

ANALITA	SOLVENTE	QUANTITA'(ml)
IPA	ESA:DCM	15ml
STEROLI	DCM	40ml
LEVOGLUCOSAN	ACN	30ml

Per quanto riguarda l'estrazione, sulla base dei metodi proposti in letteratura [48-54], è stato scelto di utilizzare il PLE come tecnica di estrazione e una miscela di DCM:MeOH 9:1, capace di estrarre tutti le classi di composti di interesse. I parametri della tecnica impiegati per l'estrazione sono riportati nella sezione Materiali e Metodi. Il metodo proposto e schematizzato in Figura 10 è stato testato su alcuni campioni di prova e ne sono state valutate le performance analitiche. Tali campioni di prova erano costituiti da sedimenti prelevati lungo il fiume Sile che presentavano un contenuto di materia organica di circa 8-10%. Anche se non sono state condotte misure granulometriche sul campione, il contenuto di materia organica (simile a quello dei campioni del lago Vittoria sul quale si vuole applicare il metodo) può dare delle indicazioni sull'effetto apportato da una matrice reale sulle performance del metodo analitico proposto.

I campioni di sedimento fluviale sono stati seccati a peso costante, macinati e fortificati con un 100 ng di fenantrene (^{13}C), colesterolo($^{13}\text{C}_2$) e levoglucosano (^{13}C) marcati ^{13}C .

Il sedimento è stato quindi invecchiato per 24 ore, al fine di lasciare che si stabilissero delle interazioni tra il sedimento e i composti studiati. Successivamente sono stati aggiunti acenaftilene (^{13}C), colesterolo ($^{13}\text{C}_3$) e mannosano (^{13}C), come standard interni per il fenantrene (^{13}C), il colesterolo ($^{13}\text{C}_2$) e levoglucosano (^{13}C), rispettivamente. I campioni di sedimento sono stati quindi estratti, purificati e analizzati in triplicato, seguendo il metodo schematizzato in Figura 10.

Tabella 5 Risultati in percentuale delle prove dell'effetto matrice.

PROVE	¹³C IPA	¹³C STEROLI	¹³C LVG
PROVA 1	98,5%	97,0%	94,0%
PROVA 2	96,0%	97,7%	95,0%
PROVA 3	98,0%	96,9%	95,0%

Come mostrato dai risultati riportati in Tabella 5, i recuperi dei composti di interesse sono molto vicini al valore aspettato (100%), suggerendo che l'estrazione mediante PLE utilizzando DCM:MeOH 9:1 ha una elevata accuratezza rispetto a tutti gli analiti indagati. Inoltre le tre repliche indicano una piccola variabilità.

Per il calcolo della precisione, avendo un quantitativo di sedimento limitato e non essendo possibile fare più misurazioni con lo stesso campione, ci si è serviti dello stesso sedimento usato per le prove di effetto matrice. In questo caso, poiché nel sedimento i composti nativi di interesse erano già presenti nel campione, gli standard marcati sono stati utilizzati per la quantificazione dei composti nativi. In questo modo non è possibile stabilire un valore di recupero, ma la determinazione della precisione e del limite di rilevabilità è più congruente con le quantità di analita che ci si aspetta di determinare in un campione reale. Queste analisi sono state eseguite in triplicato e la precisione è stata calcolata con la formula riportata nel capitolo precedente. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 6. Come si osserva dalla Tabella, la precisione del metodo varia da 9 a 18% a seconda degli analiti considerati. I valori di precisione danno un'indicazione

della riproducibilità del metodo. Nell'applicazione del metodo tali valori di precisione verranno utilizzati per stabilire la variabilità delle concentrazioni di analiti che saranno determinate nei campioni di sedimento del lago Vittoria.

Per il calcolo dei limiti di rilevabilità e quantificazione sono stati analizzati i bianchi procedurali. Attraverso l'analisi del bianco, lo strumento rivela un segnale di fondo che tiene conto dell'ambiente, dei reagenti e della strumentazione che è stata impiegata in tutti i passaggi individuati nel metodo. I risultati di LOD e LOQ quindi, permettono di capire se il segnale di un campione, rilevato dallo strumento, è significativamente diverso dal background ambientale.

LOD e LOQ sono stati definiti nella parte Materiali e Metodi e i valori ottenuti sono riportati in Tabella 6.

Tabella 6 valori di precisione, LOD e LOQ.

	PRECISIONE	LOD	LOQ
PAH	9-16%	0 ng.ass	25 ng.ass
LEVOGLUCOSANO	13-16%	5 ng.ass	70 ng.ass
STEROLI	12-18%	20 ng.ass	50 ng.ass

Discussione dei risultati

Ricostruzioni paleoambientali nel lago Vittoria.

Il metodo riportato e discusso nella sezione precedente è stato impiegato per la determinazione di IPA, levoglucosano e dei principali steroli fecali (coprostanolo e stigmastanolo) nei 19 campioni di sedimento del lago Vittoria. Sulla base del *age model*, proposto [87] e discusso in precedenza (vedi pag. 30), tali campioni ricoprono un intervallo temporale stimato tra i 1240 e i 2150 anni BP. Ogni campione che corrisponde ad un intervallo di profondità di 1 cm è rappresentativo di un intervallo temporale di 5 anni. Le concentrazioni dei diversi biomarcatori sono state normalizzate per la quantità di sedimento estratto (peso secco). Va sottolineato che, generalmente, nelle ricostruzioni paleoambientali non vengono riportate le concentrazioni dei proxy considerati, bensì i loro flussi [94,95]. In questo modo è possibile tener conto delle possibili differenze nel tasso di sedimentazione. Tuttavia, considerando che, sulla base degli elementi a disposizione e delle incertezze associate all'*age model*, il tasso di sedimentazione è stato assunto costante, gli andamenti delle concentrazioni e dei corrispondenti flussi non differiscono (a meno di un fattore moltiplicativo), e pertanto non influiscono sulle considerazioni paleoambientali che verranno discusse di seguito. In questa tesi, nei grafici che seguiranno, verranno riportati i valori di concentrazione, che riteniamo più affidabili e utili per un confronto diretto con altri campioni ambientali. Va comunque osservato che le incertezze associate all'*age model* non influiscono sul sincronismo tra gli andamenti dei biomarcatori considerati, in quanto questi ultimi sono stati determinati nel medesimo campione. Nelle Tabelle 7 e 8 sono

riportate le concentrazioni dei biomarcatori considerati, sottratti del valore del bianco procedurale

Tabella 7 concentrazioni dei biomarcatori considerati, sottratti del valore del bianco procedurale.

Depth (cm)	Naftalene	Acenaftilene	Acenaftene	Fluorene	Fenantrene	Antracene	Fluorantene	Pirene
(ng g ⁻¹)								
0,5	236,2	40,5	165,5	253,0	564,8	115,8	323,8	136,3
4,5	249,1	71,0	378,4	380,0	494,0	28,3	120,6	45,3
6,5	313,5	47,5	195,6	154,5	314,2	18,5	95,4	31,8
8,5	393,9	90,6	462,7	234,5	482,8	22,2	85,0	24,9
10,5	314,7	65,5	266,9	415,6	1063,9	56,1	218,5	94,2
12,5	368,1	83,6	481,4	270,6	554,0	31,8	155,4	52,4
14,5	756,5	110,0	678,0	1063,0	592,4	21,3	161,9	61,5
16,5	369,5	104,4	499,5	497,3	555,9	26,9	139,8	65,2
20,5	186,3	55,1	195,4	229,5	268,7	54,3	123,9	39,1
22,5	232,5	59,1	373,4	171,3	356,3	15,8	47,5	15,9
28,5	86,2	48,8	258,1	285,1	279,2	50,6	139,4	43,9
30,5	179,2	81,1	427,5	541,0	477,7	59,7	153,1	48,7
32,5	300,4	74,7	467,1	440,0	536,4	41,6	156,3	50,4
34,5	274,9	36,6	257,2	238,3	336,3	10,2	63,7	24,9
36,5	285,9	56,9	271,6	259,1	382,6	37,2	151,0	45,7
38,5	127,2	56,8	295,8	330,5	345,9	42,6	138,7	44,7
40,5	267,6	36,9	226,2	149,6	210,5	15,7	45,6	16,6
42,5	195,5	64,8	417,7	486,0	473,0	43,8	139,3	43,5
44,5	141,3	73,7	469,0	502,9	447,9	68,8	125,2	37,9
Media	277,8	66,2	357,2	363,2	459,8	40,1	136,0	48,6
σ	143,4	21,1	135,2	210,5	185,2	24,9	62,4	27,9

Tabella 8 concentrazioni dei biomarcatori considerati, sottratti del valore del bianco procedurale.

Depth (cm)	Benzo(a)Antracene	Crisene	Retene	ΣIPA	Coprostanol	Stigmastanol	Levoglucozan
(ng g ⁻¹)							
0,5	9,3	37,1	7,0	1889,8	132,0	1332,3	238,3
4,5	8,4	25,5	32,9	1838,0	254,0	1391,7	380,7
6,5	4,8	7,0	6,5	1195,8	101,8	1280,0	368,0
8,5	8,0	5,1	18,3	1836,6	437,2	1566,4	419,8
10,5	19,6	132,9	31,4	2689,8	571,6	1883,6	377,3
12,5	12,5	27,5	11,1	2061,0	328,0	1448,0	329,4
14,5	18,7	34,5	29,5	3541,8	207,6	1782,2	720,6
16,5	7,0	168,2	36,5	2486,7	187,7	1637,1	574,7
20,5	11,4	82,7	1,6	1268,6	235,9	1420,9	525,4
22,5	27,7	20,5	4,2	1346,6	131,8	1207,9	343,4
28,5	26,0	50,4	3,9	1300,1	123,4	1118,5	193,0
30,5	31,5	56,1	3,8	2089,8	224,4	973,1	103,5
32,5	14,6	44,4	4,2	2162,6	231,2	963,4	673,9
34,5	2,4	223,4	4,7	1507,0	334,3	1340,0	485,1
36,5	21,3	50,6	3,3	1601,7	115,5	1105,4	438,7
38,5	20,5	49,2	4,0	1494,5	129,0	938,7	565,2
40,5	4,9	16,5	2,1	1032,6	90,2	885,8	278,6
42,5	19,1	47,7	3,0	1975,9	193,3	2025,3	318,0
44,5	22,3	42,6	2,0	1978,0	147,6	1236,4	384,8
Media	15,3	59,0	11,1	1857,7	219,8	1344,0	406,2
σ	8,5	56,7	12,1	601,0	124,5	324,9	157,8

Attività degli incendi

Come spiegato in precedenza, sia IPA, che in questa prima valutazione saranno riportati come somma complessiva (Σ IPA), sia il levoglucosano (LVG) sono proxy di eventi incendiari. Il confronto tra gli andamenti degli IPA e del levoglucosano nei sedimenti del lago Vittoria nell'arco temporale compreso tra 1250-2125 anni BP è riportato in Figura 17.

Nel caso degli IPA, si osserva un generale incremento della concentrazione e quindi dell'attività incendiaria, nel periodo che va da 1350 a 1550 anni BP, con un massimo attorno ai 1500 anni BP. Un'attività incendiaria meno intensa e temporalmente più breve è inoltre evidente a circa 1900 anni BP e a 2100 anni BP. I valori di Σ IPA in questi ultimi due periodi differiscono statisticamente dai valori di background, che sono stati considerati come una deviazione standard aggiunta al valor medio di tutti i punti (vedi Tabelle 7 e 8).

L'andamento delle concentrazioni di levoglucosano risulta invece maggiormente affetto da un errore procedurale. Tuttavia, i valori di concentrazione di levoglucosano nel periodo 1350-1550 anni BP risultano significativamente più elevati del background, così come nel periodo 1800-2050 anni BP. Le concentrazioni di levoglucosano in questi due periodo risultano tuttavia simili, differentemente da quanto osservato nel caso degli IPA.

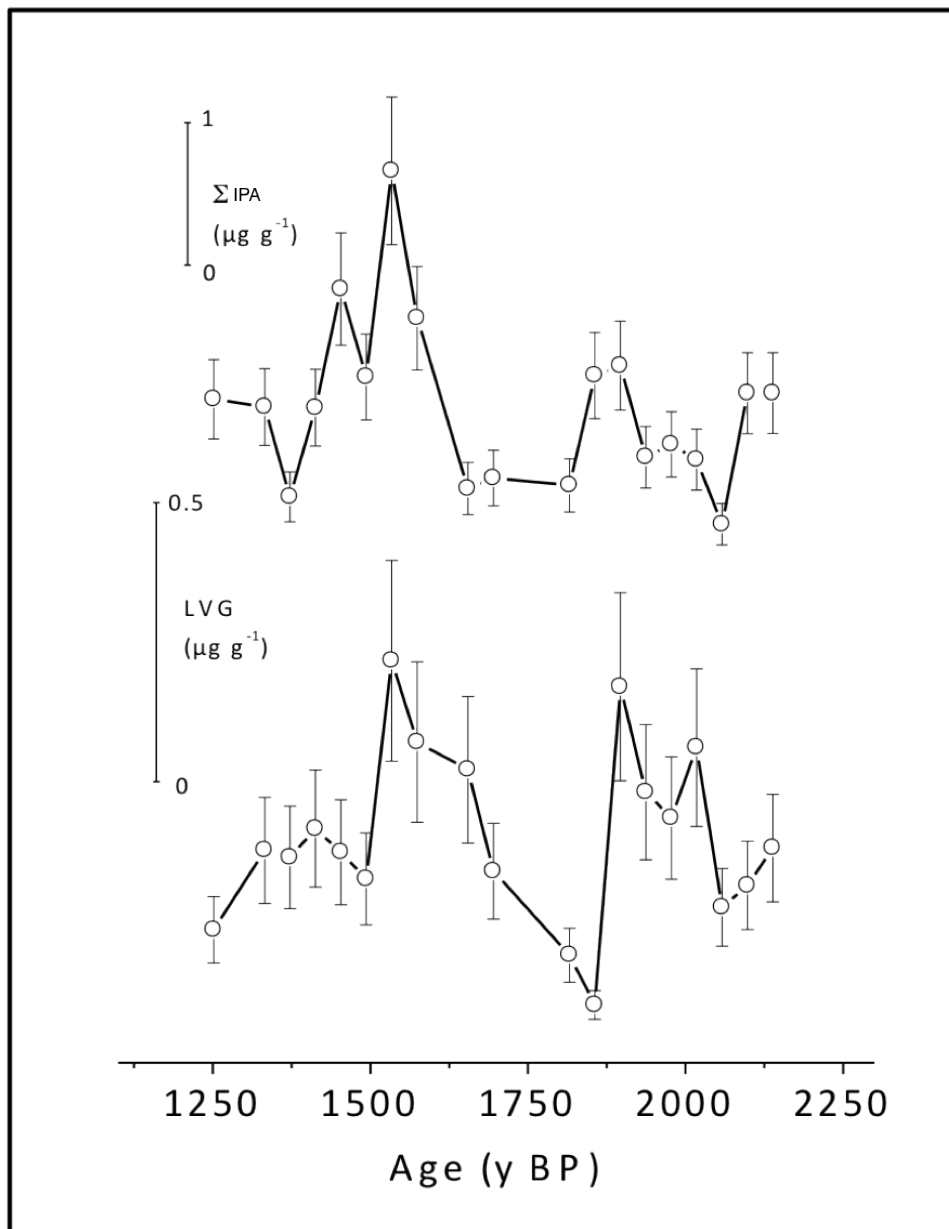


Figura 17 Andamenti dell'attività incendiaria ricostruita nei sedimenti del lago Vittoria.

Gli andamenti mostrati in Figura 17, quindi, indicano una maggiore intensità del segnale incendiario nei periodi 1350-1550 anni BP e 1800-2050 anni BP. Tale segnale è ragionevolmente attribuibile a combustioni da biomassa in quanto il levoglucosano è un tracciante specifico di tali processi. La differenza delle intensità dei segnali, invece, potrebbe essere dovuta sia ad una diversa sorgente del segnale, sia ad un diverso tipo di

trasporto. Gli IPA, infatti possono essere prodotti in seguito ad attività vulcanica [96], Anche se, al meglio della nostra conoscenza, nel periodo indagato non sono state riportate evidenze di un'attività vulcanica.

Considerando che sia il levoglucosano che gli IPA individuano gli stessi periodi di attività incendiaria e considerando che le concentrazioni di quest'ultimi presentano una minore varianza, si è deciso di prendere in considerazione l'andamento degli IPA nei confronti successivi come rappresentativo dell'attività incendiaria.

Attività incendiaria locale o regionale?

Per capire se il segnale dell'attività incendiaria osservato avesse carattere locale o fosse legato ad un trasporto su più ampia scala, gli andamenti delle concentrazioni di IPA sono state confrontate con le attività incendiarie ricostruite sulla base dei flussi di *charcoal* in altri laghi dell'Africa orientale, situati lungo la Rift Valley: il lago Masoko e il lago Katinda (Figura.18).

Il lago Masoko (770 m s.l.m.) si trova in Tanzania, la sua profondità raggiunge i 39 m per un diametro di 700 m. Il bacino del lago ricopre una superficie di 0.5 km² [97]. Il lago Katinda (1024 m s.l.m.) si trova appena a sud dell'equatore, nella parte occidentale dell'Uganda. Ha una superficie di circa 50 ettari e una profondità massima di soli 18 m [98].

Nonostante questi due laghi abbiano dimensioni molto ridotte se confrontati con il lago Vittoria, trovandosi tutti nella Rift Valley potrebbero comunque fornire indicazioni sulle attività incendiarie dell'intera area e quindi confermare o meno i dati da noi ottenuti.

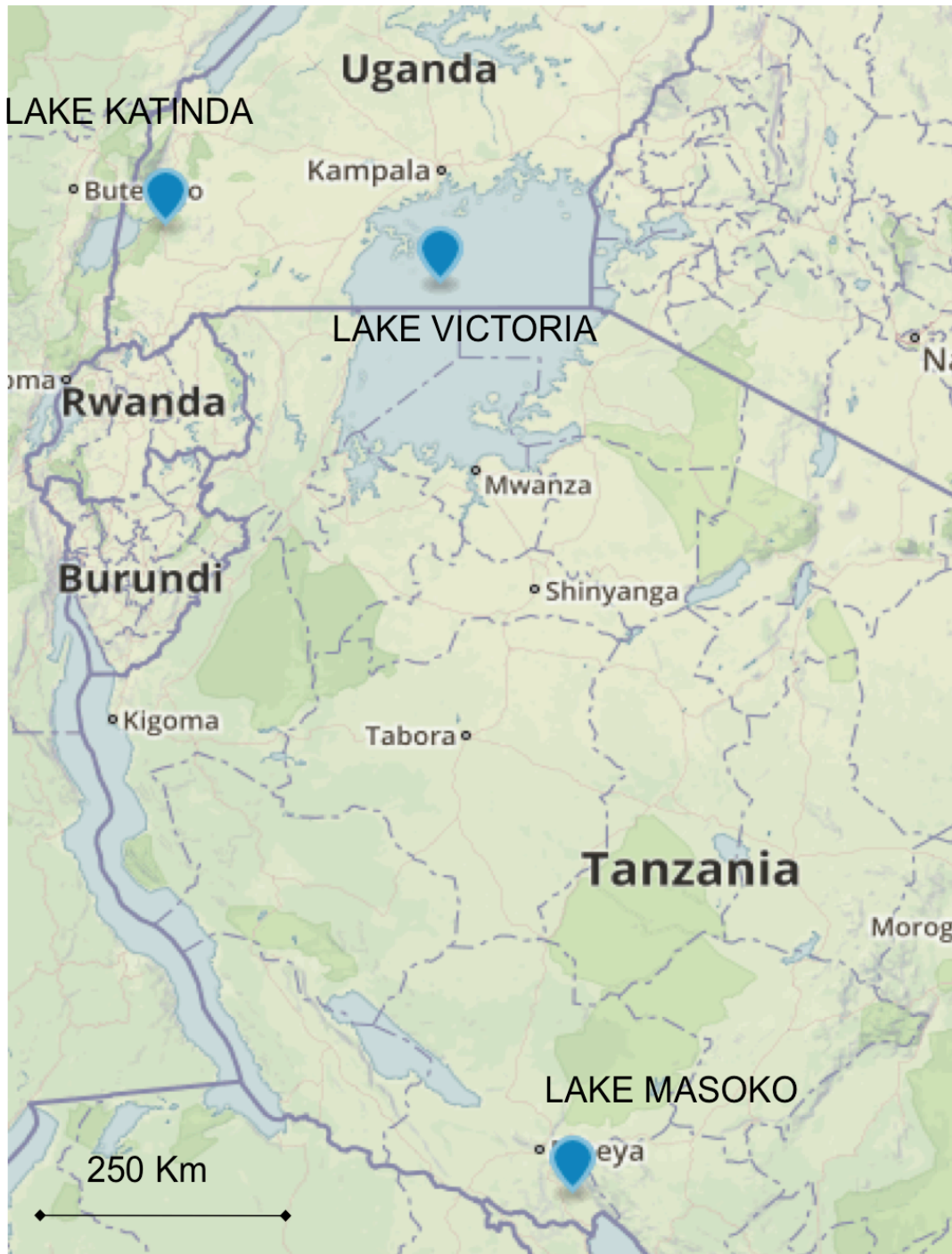


Figura 18 Cartina geografica comprendente lago Vittoria, lago Katinda e lago Masoko.

In Figura 19 sono riportati gli andamenti del flusso di *charcoal* del lago Katinda e Masoko, e le concentrazioni di IPA registrate nel lago Victoria. Nel lago Katinda, sono riconoscibili due periodi caratterizzati da una maggiore attività incendiaria che presentano un massimo più marcato intorno a 1700 anni BP e un altro a circa 2050 anni BP di minore intensità.

L'analisi dei flussi di *charcoal* nel lago Masoko mostra invece un aumento dell'attività incendiaria intorno a 1500 anni BP.

Paragonando i tre grafici, possiamo notare che, come per il lago Vittoria, anche nel lago Masoko c'è un incremento dell'attività incendiaria intorno ai 1500 anni BP, mentre il picco intorno ai 1900 anni BP che mostra il grafico riferito al lago Vittoria, nello studio del lago Masoko non sembra essere particolarmente marcato.

Se prendiamo in considerazione, invece, lo studio dei sedimenti del lago Katinda e lo confrontiamo con quello del lago Vittoria, non vediamo questa corrispondenza. Tuttavia anche l'andamento del *charcoal* nel lago Katinda mostra due picchi periodi di intensa attività incendiaria. In quest'ultimo caso, è interessante osservare che i due periodi osservati nel lago Katinda anticipano gli eventi del lago Victoria di circa 150 anni. E che la distanza tra i due picchi in entrambi i casi è di circa 350 anni.

I dati forniti dallo studio sul lago Masoko sembrano suggerire che gli eventi incendiari osservati 1500 anni fa siano di carattere regionale, mentre per quanto riguardagli eventi di combustione avvenuti nel periodo precedente il segnale sembra essere locale piuttosto che regionale. La mancata corrispondenza dell'andamento mostrato dallo studio dei sedimenti del lago Katinda rispetto agli altri due potrebbe essere attribuita ad un diverso tipo di trasporto o ad un carattere locale del segnale. Tuttavia, non è da escludere l'ipotesi di un errore nella datazione che spiegherebbe l'anticipo degli eventi

incendiari nel lago Katinda di circa 150 anni. Un'altra possibile spiegazione può essere legata ad una diversa circolazione locale delle masse d'aria e quindi del segnale degli incendi osservato nei sedimenti. In ogni caso, sembra plausibile ipotizzare che un aumento marcato e generalizzato dell'attività incendiaria abbia interessato l'africa orientale per un periodo di circa 200 anni circa 1500-1600 anni BP.

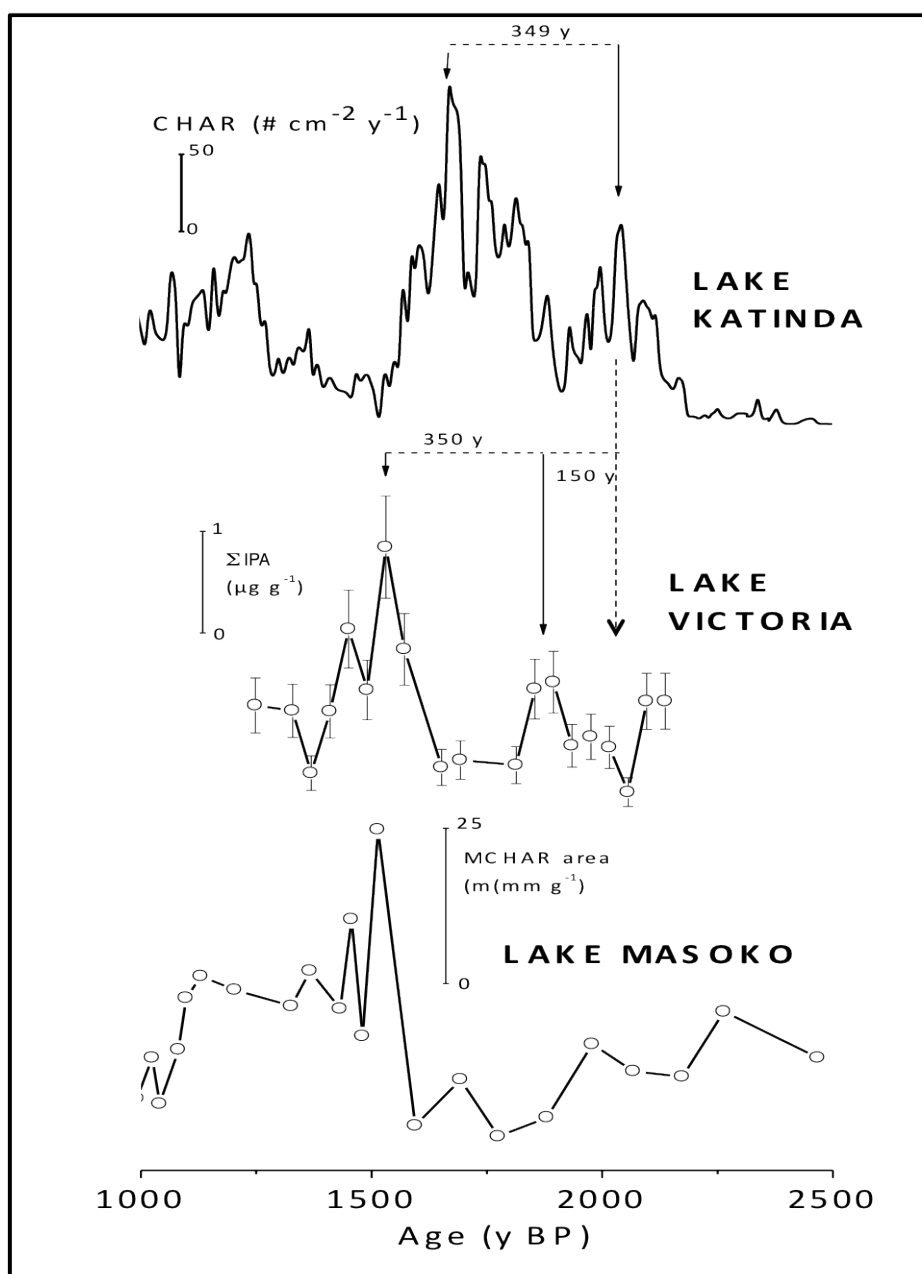


Figura 19 Andamenti dell'attività incendiaria ricostruita da sedimenti dei laghi Katinda, Vittoria e Masoko.

Attività incendiaria e vegetazione

La Figura 20 mostra il confronto tra quattro grafici: i primi due si riferiscono all'andamento percentuale del polline di piante arboree ricostruiti dalle analisi palinologiche effettuate nei sedimenti del lago Katinda e lago Masoko. Questi due grafici mostrano un andamento simile e sono caratterizzate da una diminuzione di polline proveniente da piante arboree. Nel primo caso, questa diminuzione comprende un periodo che va più o meno da 1300 anni fa a 1600 anni fa. Nel secondo caso, invece, la diminuzione è più marcata intorno ai 1500 anni fa. È interessante comunque osservare che queste diminuzioni corrispondono ad un incremento dell'attività incendiaria.

In Figura 20 è anche riportato l'andamento della concentrazione di retene nei sedimenti del lago Vittoria. In questo caso, si osserva un generale seppur altalenante aumento della concentrazione di retene da un periodo che va più o meno da 1250 anni fa a 1600 anni fa.

Nonostante gli IPA generalmente non siano usati come marcatori specifici, in quanto provenienti da qualsiasi evento di combustione (anche in seguito ad attività vulcanica), il retene è stato ampiamente proposto come biomarker per la combustione di legno di conifere [30-33].

Tale idrocarburo, infatti, si forma a partire dall'acido abietico e dall'acido primarico presenti nel legno, durante il processo di combustione [33-35]. La presenza del retene dovuto a questo tipo di processi è giustificata dalla presenza di diversi esemplari di conifere tra cui *Podocarpus* [65] e *Juniperus procera* [74] nella regione dei grandi laghi in Africa, sia ai giorni nostri che nel periodo studiato.

Se confrontiamo gli ultimi due grafici, vediamo che il retene mostra un aumento della concentrazione solo in corrispondenza di uno dei due picchi presenti nel grafico degli IPA, quello datato intorno ai 1500 anni BP. Possiamo quindi dedurre che, dei due eventi di combustione mostrati nel quarto grafico solamente in uno, quello corrispondente al retene, la combustione di conifere abbia contribuito marcatamente.

L'andamento del retene nel lago Victoria è apparentemente in contraddizione con le osservazioni palinologiche, in quanto un aumento della combustione del legno di conifera sembra incidere maggiormente nei fenomeni di combustione in un periodo dove i pollini di piante arboree suggeriscono invece una diminuzione di questo tipo di vegetazione. Una possibile interpretazione a questa apparente incongruenza verrà discussa in seguito.

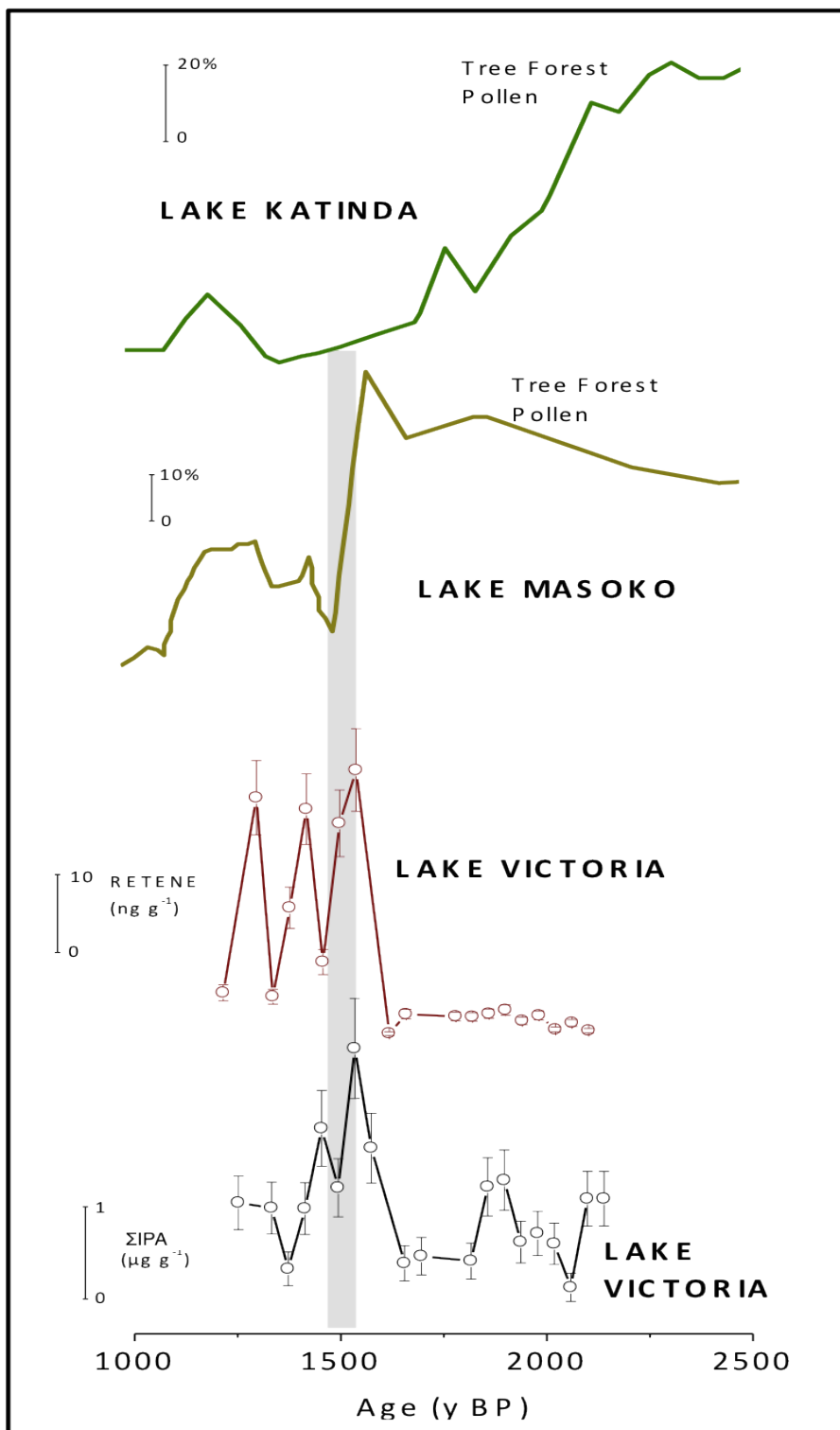


Figura 20 Confronto andamenti % polline nei laghi KAtinda e Masoko con concentrazione di retene e IPA nel lago Vittoria.

Attività incendiaria e attività antropica

Poiché la presenza umana potrebbe aver influito sull'attività incendiaria, in questo paragrafo verrà discussa la possibile relazione tra questi due aspetti.

In Figura 21 è riportato il confronto tra l'andamento della concentrazione del coprostanolo e di IPA e del retene.

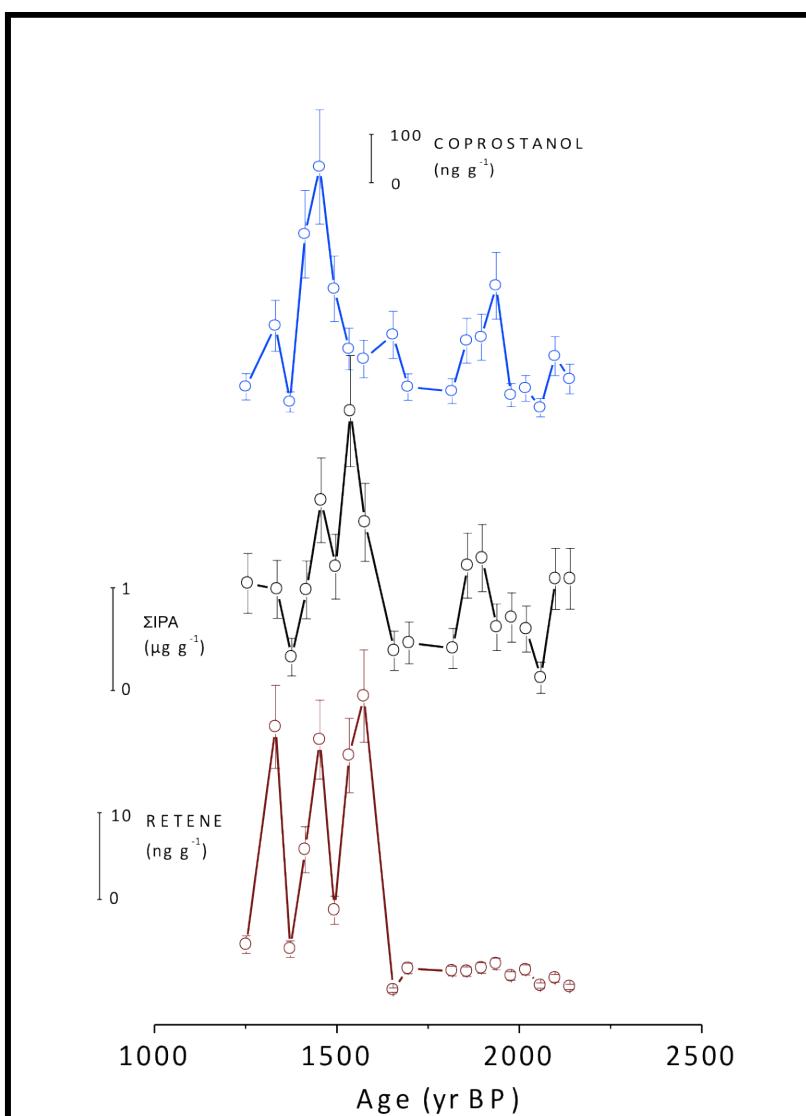


Figura 21 Confronto concentrazione coprostanolo, IPA e retene nel lago Vittoria.

L'andamento del coprostanolo mostra due massimi, uno intorno a 1950 anni BP e uno più marcato corrispondente a circa 1400 anni fa. Notiamo che il massimo aumento di

coprostanolo, che si verifica intorno ai 1400 anni fa, risulta leggermente più recente rispetto al massimo della concentrazione di IPA e dall'inizio dell'aumento di retene.

È stato usato il coprostanolo perché, come già spiegato, è un biomarcatore specifico di attività antropiche in quanto costituisce circa il 60% del totale degli steroli presenti nelle feci umane [43].

Come riportato nella sezione introduttiva di questa tesi, il periodo storico che abbiamo preso in considerazione corrisponde a quello che gli archeologi definiscono come la prima Età del Ferro [78] periodo che è stato caratterizzato dalle migrazioni delle popolazioni Bantu.

Le presunte vie di espansione dei popoli di lingua bantu sono state tracciate dagli archeologi e se ne riconoscono due principali. La prima parte dalle regioni dell'Africa occidentale, attraverso la foresta equatoriale fino ad arrivare alla regione dei grandi laghi ad est, per procedere poi verso il Botswana. La seconda dalle foreste a ovest si sposta verso sud, lungo la costa occidentale; come schematizzato in Figura 22.



Figura 22 Migrazioni popolazioni Bantu.

È presumibile che le popolazioni di lingua Bantu abbiano introdotto, attraverso le loro migrazioni, l'agricoltura e la metallurgia e di conseguenza lo sviluppo di villaggi semipermanenti, in luoghi prima caratterizzati dalla presenza di popolazioni di soli raccoglitori, pastori e cacciatori-raccoglitori. L'opinione più diffusa è che la pastorizia si diffuse nella regione dei Grandi Laghi circa 2000 anni fa a partire dalle migrazioni dal nucleo originale di Bantu [99].

Queste notizie storiche possono aiutarci a spiegare l'andamento del segnale del coprostanolo osservato nel lago Victoria (vedi Figura 20). E' possibile, infatti, che il periodo caratterizzato da un'intensa attività incendiaria, intorno a 1500 anni BP, sia avvenuto per cause antropiche, forse proprio ad opera di queste popolazioni di lingua

bantu, che per insediarsi e favorire le pratiche di agricoltura e allevamento hanno incendiato parte di foresta. Non è comunque da escludere l'ipotesi che l'aumento dell'attività incendiaria abbia favorito l'apertura di nuovi spazi ed abbia a sua volta favorito un incremento degli insediamenti umani. In ogni caso, dopo l'occupazione di questi luoghi, la popolazione, avendo trovato condizioni favorevoli, ha cominciato a crescere. Il successivo calo della concentrazione di coprostanolo è ricollegabile a una diminuzione della popolazione. Questo potrebbe essere avvenuto perché, come in ogni dinamica di popolazione, raggiunto un massimo, la popolazione comincia una decrescita. Un'altra spiegazione potrebbe essere data dal ricominciare di altre migrazioni, le cui cause potrebbero essere di altra natura.

Nonostante sia una spiegazione plausibile quella di interpretare l'aumento della concentrazione degli IPA e del retene come conseguenza di un'attività antropica atta a rendere il territorio più idoneo a pratiche come agricoltura ed allevamento, possono essere formulate altre ipotesi. Come abbiamo precedentemente riportato, il periodo che andiamo ad indagare, corrisponde a quella che gli archeologi definiscono come Età del Ferro, che si divide in: *prima età del ferro* (EIA) e *tarda età del Ferro* (LIA) che solitamente prende in considerazione i primi agricoltori facenti uso di utensili di ferro [78]. Va osservato che il ferro non è un metallo facile da lavorare in quanto richiede temperature piuttosto elevate per essere forgiato (1400°C) [100], di forni opportunamente costruiti e di combustibile capace di garantire un elevato potere calorifero.

Come mostrato nella Figura 23, le conifere sono tra le piante che presentano un potere calorifero più elevato. Pertanto, lo sviluppo dell'attività di lavorazione del ferro avrebbe richiesto necessariamente l'utilizzo di legname energetico ed il legno di conifera

sarebbe stata la soluzione più favorevole. Questa suggestiva ipotesi potrebbe spiegare perché, a fronte di una diminuzione di incendi in generale, la combustione del legno di conifera non segua lo stesso andamento. Sembra quindi plausibile differenziare la tipologia degli incendi sulla base dei marcatori molecolari utilizzati in relazione alle necessità delle popolazioni locali, che non dovevano essere finalizzate alla sola agricoltura e pastorizia, ma anche, o forse soprattutto, per la produzione di utensili ferrosi.

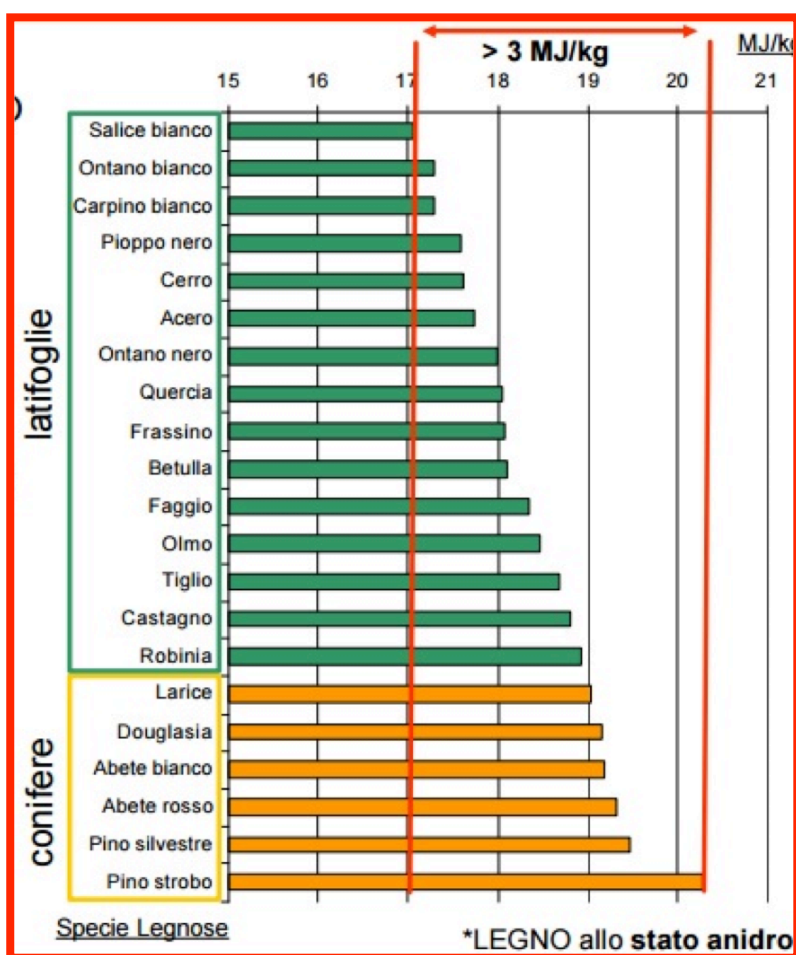


Figura 23 Potere calorifero piante arboree.

Ulteriori informazioni sulle attività antropiche legate alla pastorizia posso essere ottenute dallo studio degli andamenti dello stigmastanolo, un proxy molecolare della

presenza di ruminanti, analogo al coprostanolo, ed è prodotto nell'intestino di questi animali tramite la bioidrogenazione del sitosterolo e dello stigmasterolo [43].

In Figura 24 è riportato l'andamento delle concentrazioni di stigmastanolo, e coprostanolo per confronto. In questo caso, l'errore associato al dato è troppo elevato per poter affermare che ci siano variazioni considerevoli nella concentrazione di stigmastanolo nel corso degli anni. Questa circostanza mette in evidenza l'importanza dell'impiego di un metodo analiticamente solido che previene la formulazione di conclusioni eventualmente scorrette, giustificando ulteriormente lo sforzo speso in questa tesi per la messa a punto e validazione del metodo analitico. Da un punto di vista ambientale, va osservato che le concentrazioni relativamente alte di stigmastanolo potrebbero essere comunque spiegate da un'elevata presenza di ruminanti appartenenti alla fauna selvatica locale, il cui contributo potrebbe essere ragionevolmente molto più importante rispetto alle attività di allevamento nella regione. In ogni caso, sulla base dei risultati ottenuti, sarebbe estremamente speculativo e azzardato proporre altri tipi di interpretazione.

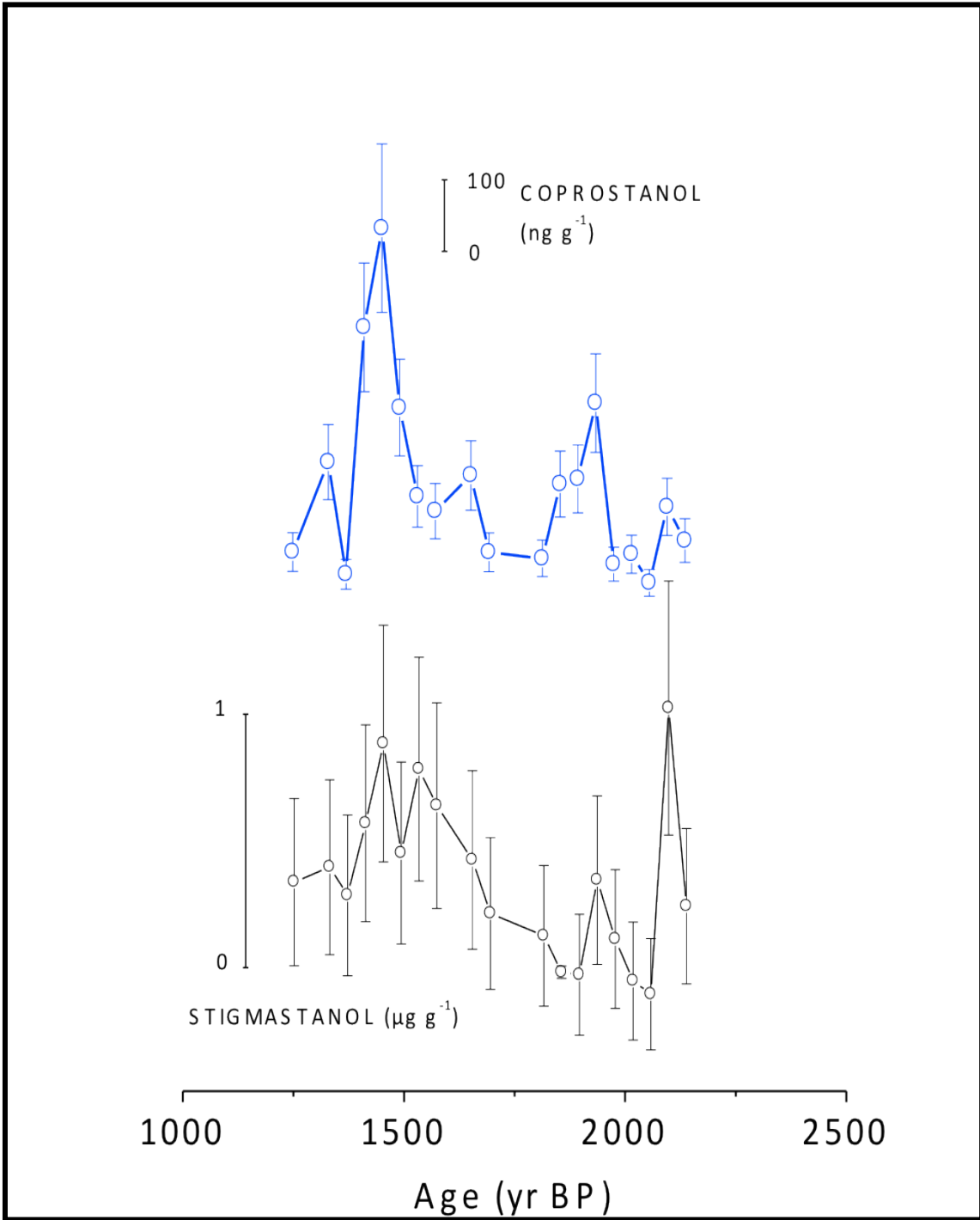


Figura 24 Confronto concentrazioni coprotanolo e stigmastanolo nel lago Vittoria.

Incendi e attività antropica. Considerazioni su uno studio analogo

In Figura 25 e nei paragrafi precedenti, abbiamo messo in relazione l'incremento dell'attività incendiaria (Σ IPA) e la presenza antropica, osservando come all'aumento dell'attività degli incendi seguisse un periodo corrispondente ad un incremento del segnale di coprostanolo, attribuibile ad un aumento demografico locale, circa 100-150 anni più tardi. Questi andamenti hanno suggerito che, anche se la discriminazione tra un incendio di origine naturale e antropica rimane difficile da stabilire con certezza, può esistere una possibile relazione di consequenzialità tra le due tipologie di eventi. Infatti, l'incremento dell'attività degli incendi, naturali o antropici che fossero, devono aver creato le condizioni favorevoli allo sviluppo di più complessi insediamenti umani. È interessante osservare che questo tipo di consequenzialità è già stato osservato in precedenza. Si osservi, infatti, gli andamenti di levoglucosano e coprostanolo mostrati in Figura 25 i quali si riferiscono ad uno studio recentemente condotto utilizzando i sedimenti raccolti dal Lago Trasimeno (Italia) [101]. Come si osserva dalla figura, in questa regione dell'Italia centrale il periodo compreso tra i 3000 e 2260 anni BP è caratterizzato da una intensa attività incendiaria. Ed è interessante osservare che un successivo ed evidente aumento del segnale di coprostanolo viene registrato circa 150-200 anni più tardi. Le analogie con il Lago Victoria sono evidenti e sembrano suggerire, una forte e ragionevole consequenzialità tra gli eventi incendiari e un incremento demografico locale nei primi insediamenti antropici, almeno in questi due casi.

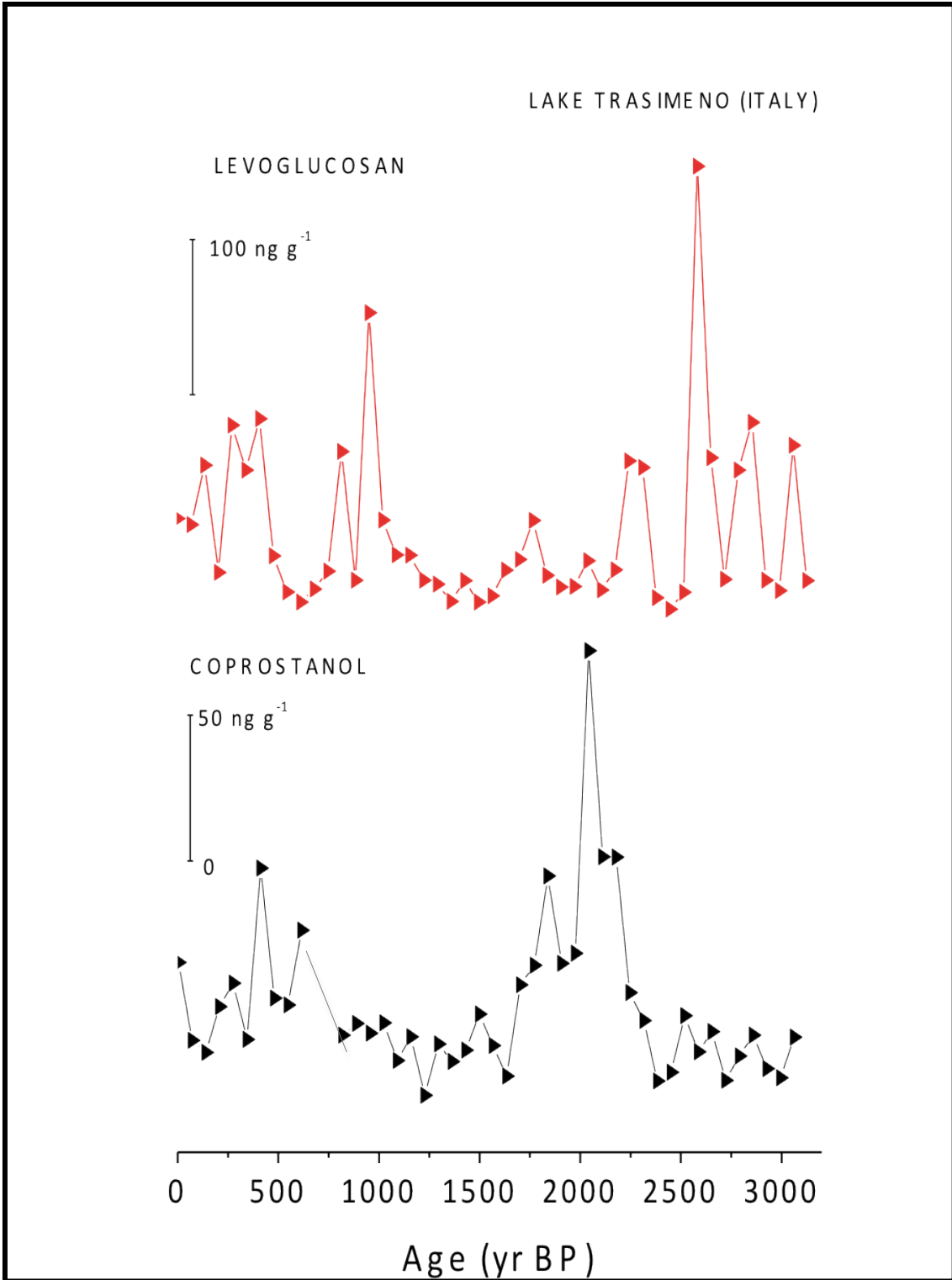


Figura 25 Confronto concentrazione levoglucosano e coprostanolo nel lago Trasimeno.

Conclusioni

Una delle principali sfide scientifiche ancora aperte in campo paleo-ambientale è quella di stabilire il contributo antropico e naturale degli eventi incendiari. Le difficoltà legate alla distinzione di questi due contributi è principalmente legata alla difficoltà di sincronizzare l'attività incendiaria e l'eventuale presenza antropica in uno stesso archivio ambientale. A questo proposito i metodi multi-proxy che si basano sulla determinazione di marcatori molecolari, specifici di tali eventi, in carote di sedimenti lacustri, stanno suscitando un crescente interesse in ambito paleo ambientale. Tuttavia, i metodi chimico-analitici proposti in letteratura sono spesso lacunosi e non sempre adeguati all'analisi di diverse classi di composti in uno stesso campione di sedimento. Le principali difficoltà sono spesso legate all'indisponibilità di grandi quantità di materiale sul quale è possibile applicare metodi analitici che prevedono diverse metodiche pre-analitiche ed analitiche. In questa tesi, è stato inizialmente sviluppato un metodo analitico che potesse analizzare in uno stesso campione di sedimento (0.5-2 g peso secco) alcune classi di composti quali IPA, levoglucosano e alcuni steroli fecali, quali coprostanolo e stigmastanolo. Tali composti, infatti, sono marcatori di combustioni da biomassa (specifici nel caso del levoglucosano) e della presenza antropica (coprostanolo) e della pastorizia (stigmastanolo). Le performance del metodo sono state valutate su un campione di sedimento fluviale di prova che, anche se presenta una tessitura diversa dai campioni che ci si prefiggeva di analizzare, presentava comunque un contenuto di materia organica simile. Il metodo proposto è stato principalmente valutato in termini di precisione e limiti di rilevabilità, che sono i parametri più critici nelle ricostruzioni paleo ambientali.

Il metodo è stato quindi applicato a dei campioni di sedimento lacustre provenienti dal lago Vittoria (Africa Orientale) e che comprendevano un intervallo temporale compreso tra i 1200 e i 2200 anni fa. In questo sito, tale periodo corrisponde allo sviluppo delle attività antropiche legate alla lavorazione del ferro e alle migrazioni del popolo Bantu. La ricostruzione delle attività incendiarie ha mostrato che, seppur con qualche leggera differenza, tale periodo è contraddistinto da due periodi di maggiore attività incendiaria tra i 1350 a 1550 anni fa e tra i 1900 e 2100 anni fa. Tale risultato è particolarmente significativo, in quanto le analisi di due diversi marcatori molecolari forniscono le stesse indicazioni. Gli andamenti degli incendi sono stati inoltre confrontati con il record del *charcoal* registrato in altri archivi lacustri limitrofi. Tale confronto ha mostrato un'interessante corrispondenza tra il segnale degli incendi nel lago Vittoria e quello del *charcoal* nel lago Masoko, suggerendo una più regionale estensione del fenomeno.

Altrettanto significativo è risultato il confronto tra la ricostruzione dell'attività incendiaria e la presenza antropica. Infatti, diversamente da quando aspettato, l'incremento dell'attività incendiaria sembra anticipare lo sviluppo antropico. Tale circostanza può essere spiegata considerando che una maggiore deforestazione possa portare a più favorevoli condizioni per lo sviluppo antropico, ma non necessariamente l'incremento dell'attività incendiaria ha cause antropiche. Anche se un analogo pattern è già stato osservato nei sedimenti del lago Trasimeno (Italia) nel periodo romano, queste considerazioni rimangono circostanziali.

Ulteriori indicazioni sulla possibile causa antropica del più recente periodo incendiario osservato in questo record, sono state invece ottenute dall'analisi di un particolare IPA, il retene. Tale idrocarburo, infatti, è specifico della combustione di particolari legni di

conifere. L'andamento di questo idrocarburo è particolarmente interessante. Esso infatti non segue il trend della somma degli IPA, ma aumenta improvvisamente e rimane a valori elevati anche dopo la diminuzione del picco di attività incendiaria a circa 1500 anni fa. A fronte di una diminuzione di intensità o frequenza di incendi in questo periodo, vi è stata una selettiva combustione di legno di conifera. Tale circostanza è stata messa in relazione con l'inizio e il proseguo delle prime attività umane legate alla lavorazione del ferro, dove una maggiore quantità di calore è richiesta, ed è ragionevole pensare che tale energia venisse ricavata dalla combustione di legni con un più elevato potere calorifero, quali le conifere.

La ricostruzione delle attività di allevamento e pastorizia, benché note da studi archeologici non ha portato a nessun risultato, in quanto la variabilità del segnale misurato era troppo elevata e non è stato possibile stabilire differenze significative tra i valori osservati. Tale circostanza potrebbe essere dovuta ad un elevato background attribuibile alla fauna locale. In ogni caso, quest'ultimo risultato ha messo in evidenza l'importanza della valutazione delle performance analitiche del metodo, senza le quali non sarebbe stato possibile evidenziare quest'ultimo aspetto.

Bibliografia

- [1] Denis E. H., Toney J. L., Tarozo R., Scott Anderson R., Roach L. D., & Huang Y. *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lake sediments record historic fire events: Validation using HPLC-fluorescence detection*. *Organic Geochemistry*, 45(2012) 7–17.
- [2] Ruddiman W. F. *Began Thousands of Years Ago*. *Climatic Change*,(2003) 61, 261–293.
- [3] Power M.J., Marlon J., Ortiz, N., Bartlein P.J., Harrison S.P., Mayle F.E., Ballouche, A., Bradshaw R., Carcaillet C., Cordova C., Mooney S., Moreno P., Prentice I.C., Thonicke, K., Tinner, W., Whitlock C., Zhang Y., Zhao, Y., Anderson R.S., Beer R., Behling H., Briles C., Brown K.J., Brunelle A17, Bush, M., Camill P, Chu, G.Q., Clark J., Colombaroli D., Daniels M., Dodson J., Doughty E., Edwards M.E., Fisinger W., Foster D., Gaillard M.J., Gavin D.G., Gobet E., Haberle S., Hallett D.J., Higuera P., Hope G., Horn S., Inoue J., Kaltenrieder P., Kennedy L., Kong Z.C., Larsen C., Long C.J., Lynch J., Lynch B., McGlone M., Meeks S., Mensing S., Meyer G.41, Minckley T., Mohr J, Newnham R., Noti R., Oswald, W., Pierce J., Richard P.J.H., Shuman B.J., Takahara H., Toney J., Turney C., Umbanhower C., Vandergoes M., Vanniere B., Vescovi E., Walsh M, Wang X., Williams N., Wilmshurst J., Zhang J.H., *Changes in fire regimes since the Last Glacial Maximum: an assessment based on a global synthesis and analysis of charcoal data*. *Climate Dynamics*. (2008) 30, 887–907.
- [4] Vavrus S., Ruddiman W.F. Kutzbach J.E. *Climate model tests of the anthropogenic influence on greenhouse- induced climate change: the role of early human agriculture, industrialization, and vegetation feedbacks*. *Quaternary Science Reviews*. (2008) 27, 1410–1425.
- [5] <http://www.ipcc.ch>
- [6] D'Anjou R.M., Bradley R.S., Balascio N.L. Finkelstein D.B. *Climate impacts on human settlement and agricultural activities in northern Norway revealed through sediment biogeochemistry*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2012), 109(50) 20332-20333.
- [7] Marlon J. R., Bartlein P. J, Daniau A.L., Harrison S. P, Power M. J., Tinner W., Tracy S., *Global biomass burning: A synthesis and review of Holocene paleofire records and their controls*, *Quat. Sci. Rev.* (2013) 65, 5–25.
- [8] Castañeda I. S., Schouten S. *A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments*. *Quaternary Science Reviews*. (2011)30. 21-22.

- [9] Whitlock C., Larsen C., *Charcoal as a fire proxy*. In: Smol, J.P., Birks, J.B., Last, W.M. (Eds.), *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. (2001) 3 pp. 75–97.
- [10] Clark J.S., *Fire and climate change during the last 750 yr in northwestern Minnesota*. *Ecological Monographs*. (1990) 60, 135–159.
- [11] Niklasson M., Drakenberg B. *A 600-year tree-ring fire history from Norra Kvills National Park, southern Sweden: Implications for conservation strategies in the hemiboreal zone*. *Biological Conservation*. (2001). 101, 63–71.
- [12] Whitlock C., Anderson R.S., *Methods and interpretation of fire history reconstructions based on sediment records from lakes and wetlands*. In: Swetnam, T.W., Montenegro, G., Veblen, T.T. (Eds.), *Fire and Climate Change in the Americas*. Springer, New York. (2003). pp. 3–31.
- [13] Prichard S.J., Gedalof Z., Oswald W.W., Peterson D.L., *Holocene fire and vegetation dynamics in a montane forest, North Cascade Range, Washington, USA*. *Quaternary Research*. (2009). 72, 57–67.
- [14] Margolis E.Q., Balmat J., *Fire history and fire-climate relationships along a fire regime gradient in the Santa Fe Municipal Watershed, NM, USA*. *Forest Ecology and Management*. (2009). 258, 2416–2430.
- [15] Power M.J., Marlon J.R., Bartlein P.J., Harrison S.P., *Fire history and the global charcoal database: a new tool for hypothesis testing and data exploration*. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. (2010). 291, 52e59.
- [16] Peterse F., Kim J.H., Schouten S., Kristensen D.K., Kos N., Sinninghe Damsté J.S. *Constraints on the application of the MBT/CBT palaeothermometer at high latitude environments (Svalbard, Norway)*. *Organic Geochemistry*. (2009) 40, 692-699.
- [17] Kirchgeorg, T., Schüpbach, S., Kehrwald, N., McWethy, D. B., & Barbante, C. *Method for the determination of specific molecular markers of biomass burning in lake sediments*. *Organic Geochemistry*. (2014) 71, 1–6.
- [18] Zennaro, P., Kehrwald, N., McConnel, J.R., Schüpbach, S., Maselli, O., Marlon, J., Vallelonga, P., Leuenberger, D., Zangrando, R., Spolaor, A., Borrotti, M., Barbaro, E., Gambaro, A., Barbante, C., 2014. *Fire in ice: two millennia of Northern Hemisphere fire history from the Greenland NEEM ice core*. *Climate of the Past Discussion*. (2014)10, 809–857.
- [19] Manahan, S. E. *Environmental chemistry*. 9. ed Boca Raton: Taylor and Francis Group, LLC. ISBN. (2010) 978-1-4200-5920-5.

- [20] Wiersum U.E., *The formation of polycyclic aromatics, fullerenes and soot in combustion. The mechanism and the environmental connection*. Polycyclic Aromatic Compounds. (1996)11, 291–300.
- [21] Lima A.L.C., Farrington J.W., Reddy C.M. *Combustion-derived polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment-a review*. Environmental Forensics. (2005) 6, 109–131.
- [22] Harner T., Bidleman T.F., *Octanol-air partition coefficient for describing partile/gas partitioning of aromatic compounds in urban air*. Environmental Science and Technology. (1998) 32, 1494–1502.
- [23] Wania F., Mackay D. *Tracking the distribution of persistent organic pollutants*. Environmental Science and Technology. (1996) 30, 390–396.
- [24] Subramanyam V., Valsaraj K.T., Thibodeaux L.J., Reible, D.D. *Gas-to-particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urban atmosphere*. Atmospheric Environment. (1994) 28, 3083–3091.
- [25] Lee R.G.M., Jones K.C., *The influence of meteorology and air masses on daily atmospheric PCB and PAH concentrations at an UK site*. Environmental Science and Technology. (1999) 33, 705–712.
- [26] Van Jaarsveld J.A., Van Pul W.A.J., De Leeuw F.A., *Modelling transport and deposition of persistent organic pollutants in the European region*. Atmospheric Environment. (1997) 31, 1011–1024.
- [27] Golomb D., Barry E., Fisher G., Varanusupakul P., Koleda M., Rooney T., *Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons near New England coastal waters*. Atmospheric Environment. (2001) 35, 6245–6258.
- [28] Offenberg J., Baker J. *Precipitation scavenging of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons along an urban to over-water transect*. Environmental Science and Technology. (2002) 36, 3763–3771.
- [29] Ravindra K., Sokhi R., Vangrieken R. *Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation*. Atmospheric Environment. (2008) 42(13), 2895–2921.
- [30] Fine P.M., Cass G.R., Simoneit B.R.T. *Chemical characterization of fine particle emissions from fireplace combustion of woods grown in the north-eastern United States*. Environmental Science and Technology. (2001) 35, 2665e2675.
- [31] Standley L.J., Simoneit B.R.T., *Characterization of extractable plant wax, resin and thermally matured components in smoke particles from prescribed burns*. Environmental Science and Technology. (1987) 21, 163–169.

- [32] Simoneit B.R.T., Rogge W.F., Mazurek M.A., Standley L.J., Hildemann L.H., Cass G.R., *Lignin pyrolysis products, lignans and resin acids as specific tracers of plant classes in emissions from biomass combustion*. Environmental Science and Technology. (1993) 27, 2533e2541.
- [33] Ramdahl T. *Retene e a molecular marker of wood combustion in ambient air*. Nature. (1983) 306, 580e582.
- [34] Schauer J.J., Rogge W.F., Hildemann L.M., Mazurek M.A., Cass G.R., Simoneit B.R. *Source apportionment of airborne particulate matter using organic compounds as tracers*. Atmos. Environ. (1996) 30, 3837–3855.
- [35] Simcik M.F., Eisenreich S.J., Golden K.A., Liu S.-P., Lipiatou E., Swackhamer D.L., Long D.T. *Atmospheric loading of polycyclic aromatic hydrocarbons to Lake Michigan as recorded in the sediments*. Environmental Science and Technology. (1996) 30, 3039–3046.
- [36] Petterson, R.C. *The chemical composition of wood*. In: Rowell, R. (Ed.), Chemistry of Solid Wood, Adv. Chem. Series 207, American Chemical Society, Washington, DC. (1984) pp. 57—126.
- [37] Sergejewa A.S., *Chemie des Holzes und der Cellulose*. Theodor Steinkopff Verlag, Dresden. (1959) 143 pp.
- [38] Simoneit B. R. T., Schauer J. J., Nolte C. G., Oros, D. R., Elias V. O., Fraser M. P., Rogge W. F. and Cass G. R. *Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles*. Atmospheric Environment. (1999) 33, pp. 173-182.
- [39] Miyabara Y., Sugaya N. Sugaya J., and Suzuki S. *Estimation of urobilin as a fecal pollution indicator in the aquatic environment*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. (1994) 53, 77–84.
- [40] Elhmmali M.M., Roberts DJ, Evershed R.P. *Bile acids as a new class of sewage pollution indicator*. Environmental Science and Technology. (1997) 31, 3663–3668.
- [41] Szucs S., Sárváry A., Cain T., Adány R. *Method validation for the simultaneous determination of fecal sterols in surface waters by gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatographic Science. (2006) 44(2), 70–6.
- [42] Bull I.D., Lockheart M.J., Elhmmali M.M., Roberts D.J., e Evershed R.P. *The origin of faeces by means of biomarker detection*. Environment International. (2002) 27(8) 647-54.
- [43] Leeming R., Ball A., Ashbolt N., Jones G., Nichols P., *Distinguishing between human and hanimal sources of faecal pollution*, Australian Journal of Chemistry. (1994) 61, 434-435

- [44] Wardroper A. M. K., Maxwell J. R. and Morris R. J. *Sterols of a diatomaceous ooze from Walvis Bay*. *Steroids*. (1978) 32:203– 221 12.
- [45] Daughton C.G. *Real-time estimation of small-area populations with human biomarkers in sewage*. *Sci Total Environ*. (2012) 414:6-21.
- [46] Hatcher P.G., McGillivray P.A. *Sewage contamination in the New York Bight. Coprostanol as an indicator*. *Environmental Science and Technology*. (1979) 13 1225–29
- [47] Birk J.J., Dippold M., Wiesenberg G.L.B., Glaser B. *Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gaschromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*. (2012) 1241, 1-10.
- [48] Benfenati E., Cools E., Fattore E., Fanelli R. *A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples*. *Chemosphere*. (1994) 29(7), 1393– 1405.
- [49] Battistel D., Piazza R., Argiriadis E., Marchiori E., Radaelli M., Barbante C. *GC-MS method for determining faecal sterols as biomarkers of human and pastoral animal presence in freshwater sediments*. (2015)
- [50] Bae M. S., Lee J. Y., Kim Y. P., Oak M. H., Shin J. S., Lee K. Y., Kim Y. J. *Analytical methods of levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning, by four different techniques*. *Asian Journal of Atmospheric Environment*. (2012) 6(1), 53–66.
- [51] Denis E. H., Toney J. L., Tarozo R., Scott Anderson R., Roach L. D., Huang Y. *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lake sediments record historic fire events: Validation using HPLC-fluorescence detection*. *Organic Geochemistry*. (2012), 45, 7–17.
- [52] Kehrwald N., Zangrando R., Gabrielli P., Jaffrezo J. L., Boutron C., Barbante C., & Gambaro, A. *Levoglucosan as a specific marker of fire events in Greenland snow*. *Tellus, Series B: Chemical and Physical Meteorology*. (2012) 64(1), 1–10.
- [53] Poster D. L., Schantz M. M., Sander L. C., Wise S. a. *Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2006) 386(4), 859–81.
- [54] Kirchgeorg T., Schüpbach S., Kehrwald N., McWethy D. B., Barbante C. *Method for the determination of specific molecular markers of biomass burning in lake sediments*. *Organic Geochemistry*. (2014) 71, 1–6.
- [55] Delmas R., Loudjani P., Podaire A. and Menaut J.C.: *Biomass burning in Africa: an assessment of annually burnt biomass*. In Levine, J.S., editor, *Global biomass*

burning: atmospheric, climatic, and biosph-eric innplications, Cambridge, MA: MIT Press. (1991) 126-33

- [56] Lacaux J.-P., Cachier H. Delmas R.: *Biomass burning in Africa: an overview of its impact on atmospheric chemistry*. In Crutzen, P. and Goldammer, J.G., editors, Fire in the environment. The ecological, atmospheric, and climatatic importance of vegetation fires, Chichester: Wiley. (1993) 159-92.
- [57] Andreae M.O.: *Biomass burning: its history, use, and distribution and its impact on environmental quality and global climate*. In Levine, J.S., editor, Global biomass burning: atmospheric, climatic, and biosph-eric implications, CambridgeMA: MIT. (1991) Press, 3-21
- [58] Hao W.M., Liu M.H. and Crutzen P.J. *Estimates of annual and regional releases of CO₂ and other trace gases to the atmosphere from fires in the tropics, based on FAO statistics for the period 1975-1980*. In Goldammer, J.G., editor, Fire in the tropical biota. Ecosystem processes and global challenges, Berlin: Springer. (1990) 440-62.
- [59] Mouillot F. Field C. B.: *Fire history and the global carbon budget: a 1°×1° fire history reconstruction for the 20th century*, Glob. Change Biol., (2005) 11, 398–420
- [60] Pyne S.J. *The fires this time, and next*. Science. (2001) 294, 1005-1006.
- [61] Pyne S.J. Goldammer J.G. *The culture of fire: an introduction to anthropogenic fire history*. In Goldammer, J.G., editor, Sediment records of biomass burning and global change, Berlin: Springer. (1990) 71-115. Rhodes, A.N.
- [62] Van Wilgen B.W., Everson C.S. Trollope W.S.W.: *Fire management in Southern Africa: Some examples of current objectives, practices and problems*. In Goldammer, J.G., editor, Fire in the tropical biota. Ecosystem processes and global challenges, Berlin: Springer. (1990) 179-215.
- [63] Mbungu W., Ntegeka V., Kahimba F. C., Taye M., Willems P. *Temporal and spatial variations in hydro-climatic extremes in the Lake Victoria basin*. Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C. (2012) 50-52, 24–33.
- [64] Kizza M., Westerberg I., Rodhe A., Ntale H. K. *Estimating areal rainfall over Lake Victoria and its basin using ground-based and satellite data*. Journal of Hydrology. (2012) 464-465, 401–411.
- [65] Kendall R. L. *An Ecological History of the Lake Victoria Basin*. Ecological Monographs. (1969) 39(2), 121–176.
- [66] Jackson S. P. *Climatological Atlas of Africa*. Comm. Tech. Coop. Afr. S. Sahara. Joint Project No. 1. CCTA/CSA Lagos-Nairobi. (1961)

- [67] Cochran W. G. *Some methods for strengthening the common X² tests*. Biometrics. (1954) 10: 417-451
- [68] Pallister J. W.. *The Geology of Southern Men go*. Geol. Surv. of Uganda. (1959) Report No. 1. 124 p
- [69] Hurst, H. E.. *The Nile*. Constable, London. (1957) 331 p.
- [70] Langdale-Brown H., Osmaston A., Wilson J. G. *The Vegetation of Uganda and its Bearing on Landuse*. Govt. Uganda, Entebbe. (1964) 159 p.
- [71] Directorate OP Overseas Surveys. *Vegetation map of East Africa, 1 : 4,000,000*. D. O. S. (Misc.) 299E. London. (1961)
- [72] Visser S. A.. *A study in the decomposition of Cyperius papyrus in the swamps of Uganda, in natural peat deposits, as well as in the presence of various additives*. E. Afr. agric. For. J. (1964) 29, 268-287
- [73] Adams R.P.. *Juniperus procera of East Africa: Volatile leaf oil composition and putative relationship to J. excelsa*. Biochem Syst Ecol. (1990) 18, 207-210.
- [74] Thomas A. S.. *The vegetation of the Sese Islands, Uganda*. J. Ecol. (1941) 29, 330-353
- [75] Dale I. R. *Is East Africa drying up?* E. Afr Agric. J. (1952) 17: 116-118.
- [77] Bower J *The pastoral neolithic of East Africa*. J World Prehist. (1991) 5(1):49-82.
- [76] Bower J. Nelson C. M. *Early pottery and pastoral cultures of the central Rift Valley, Kenya*. Ma. (1978) 13, 554-66
- [78] Huffman T. N.. *Iron Age Migrations and the Ceramic Sequence in southern Zambia: excavations at Gundu and Ndonde*. Johannesburg: Witwatersrand University Press. (1989)
- [79] Ambrose S. H. *Excavations at Detoraine, Rongai, 1978*. Azania. (1984c) 19, 79-104.
- [80] Cohen M.. *A reassessment of the stone bowl cultures of the Rift Valley, Kenya*. Azania. (1970) 5, 27-38.
- [81] Sutton J. E. G. *Deloraine and the Rift Valley sequence*. Nyame Akuma (1987a). 29, 34-36.
- [82] Pietrogrande M.C., Zampolli M.G., Dondi F., Szopa C., Sternberg R., Buch A., Raulin F. *In situ analysis of the Martian soil by gas chromatography: Decoding of complex chromatograms of organic molecules of exobiological interest*. Journal of Chromatography A. (2005) 1071, 255-261,

- [83] Kawamura K. Ikushima K. Environmental *Seasonal changes in the distribution of dicarboxylic acids in the urban atmosphere*. Science and Technology. (1993) 27, 2227– 2235.
- [84] Kawamura K., Imai Y., Barrie L.A. *Photochemical production and loss of organic acids in high Arctic aerosols during long-range transport*. Atmospheric Environment. (2005) 39, 599–614,
- [85] de Abreu-Mota M.A., de Moura Barboza C.A., Bicego M.C., Martins C.C., *Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil. A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability*. Chemosphere. (2014) 103,156-163.
- [86] Vane C.H., Kim W., McGowan S., Leng M.J., Heaton T.H.E., Kendrick C.P., Swann G.E.a., *Sedimentary records of sewage pollution using faecal markers in contrasting peri-urban shallow lakes*. The Science of the Total Environment. (2010) 409(2), 345-56
- [87] Johnson T.C., Kelts K., Odada E. *The holocene history of Lake Victoria*. Ambio. (2000) 29,2–11
- [88] Talbot M. R. Laerdal T.. *The Late Pleistocene - Holocene palaeolimnology of Lake Victoria, East Africa, based upon elemental and isotopic analyses of sedimentary organic matter*. J. Paleolimnol. (2000) 23, 141-164
- [89] Shackleton, N.J., Berger, A., Peltier, W.R., *An alternative astronomical calibration of the lower Pelistocene timescale based on ODP site 677*. Transactions of the Royal Society of Edinburgh Earth Sciences. (1990) 81, 251–261.
- [90] Terry R.D., Chilingar G.V. *Summary of concerning some additional aids in studying sedimentary formations by M.S. Shvetsov*. Journal of Sedimentary Petrology (1995). 25, 229–234.
- [91] Prokopenko A.A., Williams D. F., Karabanov E. B., Khursevich G. K. *Continental response to Heinrich events and Bond cycles in sedimentary record of Lake Baikal, Siberia*. Global and Planetary Change. (2001) 28 217–226
- [92] Tyson R. V. *Sedimentary Organic Matter: Organic Facies and Palynofacies*. Chapman and Hall, London, United Kingdom. (1995) 615 pp.
- [93] Marlon J. R., Kelly R., Danialu A.L., Vanni re B., Power M. J., Bartlein P., Higuera P., Blarquez O., Brewer S., Br ucher T., Feurdean A., Gil-Romera G., Iglesias V., Maezumi, S. Y., Magi B., Mustaphi C. J. C., Zhihai T.: *Reconstructions of biomass burning from sediment charcoal records to improve datamodel comparisons*, Biogeosciences Discuss. (2015) 12, 18571-18623,

- [94] Clark J.S. Hussey T.C. Estimating the mass flux of charcoal from sedimentary records: effects of particle size, morphology, and orientation. *The Holocene*. (1996) 6, 129-44.
- [95] Gschwend P.M., Hites R.A., Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the northeastern United States. *Geochim. Cosmochim. Acta*. (1981) 45, 2359–2367.
- [96] Wild, S.R., Jones, K.C., *Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget*. *Environmental Pollution*. (1995) 88, 91–108.
- [97] Thevenon F., Williamson D., Vincens A., Taieb M., Merdaci O., Decobert M., & Buchet, G.. *A late-Holocene charcoal record from Lake Masoko, SW Tanzania: climatic and anthropologic implications*. *The Holocene*. (2003) 13, 785–792.
- [98] Colombaroli D., Ssemmanda I., Gelorini V., Verschuren D.. *Contrasting long-term records of biomass burning in wet and dry savannas of equatorial East Africa*. *Global Change Biology*. (2014) 20(9), 2903–14.
- [99] Harlan J. R., *The Archaeology of Africa: Food, Metals and Towns*, T. Shaw, P. J. J. Sinclair, B. Andah, A. Okpoko, Eds. (Routledge, London,). (1993), pp. 53– 60
- [100] Brandt D., Warner, J.C. *Metallurgy Fundamental.s* Goodheart-Wilcox Publisher. (1999)
- [101] Kirchgeorg T., Battistel D., Argiriadis E., Polonia A., Gasperini L, Bonatti E., Barbante C., *Geophysical Research Letter*, Submitted.

