



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Ricerca Sulle Acque



“Applicazione sperimentale di tecniche di fitorimediazione a basso costo in località ex-campo Cimino- Manganeccchia a Taranto”

Report finale

2015



Redatto a cura
dell'ISTITUTO DI RICERCA SULLE ACQUE



Redatto a cura del CNR-IRSA e IBAF-CNR

Responsabile Attività IBAF-CNR - Dott. Angelo Massacci

Responsabile Attività IRSA-CNR - Dott.ssa Anna Barra Caracciolo

Valutazione ed Analisi microbiologiche - Dott.ssa Paola Grenni, Dott.ssa Martina Di Lenola

Valutazione ed Analisi chimiche PCB e metalli - Dott.ssa Valeria Ancona, Dott.ssa Claudia Campanale

Trasferimento Tecnologico - Dott. Vito Felice Uricchio



Indice

| | |
|---|----|
| Attività sperimentale di campo | 6 |
| Premessa | 7 |
| Caratterizzazione iniziale dell'area di studio | 13 |
| <i>Dati di contaminazione</i> | 13 |
| <i>Caratterizzazione microbiologica iniziale</i> | 16 |
| Campionamento nel sito sperimentale dopo 14 mesi dall'impianto..... | 17 |
| <i>Schema Procedura di Campionamento</i> | 17 |
| <i>P1</i> | 19 |
| <i>P2</i> | 21 |
| <i>P3</i> | 22 |
| <i>P4</i> | 23 |
| Protocollo di campionamento degli organi vegetali..... | 24 |
| <i>Materiale ipogeo: Radici</i> | 24 |
| <i>Materiale epigeo: Foglie</i> | 26 |
| Risultati..... | 27 |
| <i>Analisi chimiche del terreno</i> | 28 |
| Grado di reazione del terreno (pH)..... | 28 |
| Contenuto di umidità (%)..... | 30 |
| Contenuto di carbonio organico | 31 |
| <i>Analisi degli inquinanti del terreno</i> | 32 |
| Contaminanti organici (PCB)..... | 32 |
| Contaminanti inorganici (metalli pesanti)..... | 34 |
| <i>Analisi microbiologiche del terreno e della rizosfera</i> | 40 |
| <i>Analisi chimiche dei substrati vegetali</i> | 43 |
| Contenuto di umidità (%)..... | 43 |
| Contaminanti organici (PCB)..... | 44 |
| Contaminanti inorganici (metalli pesanti) | 45 |



| | |
|---|----|
| Fattore di Bioaccumulo (BAF) negli organi vegetali | 46 |
| Fattore di traslocazione (TF) negli organi vegetali..... | 49 |
| Discussione e considerazioni generali..... | 50 |
| Considerazioni conclusive e prospettive future..... | 53 |
| Riferimenti bibliografici..... | 54 |
| Ringraziamenti | 57 |
| Appendice | 58 |
| Metodi applicati | 59 |
| <i>Analisi chimiche del terreno</i> | 59 |
| Contenuto di umidità (%)..... | 59 |
| Grado di reazione del terreno | 59 |
| Contenuto del carbonio organico | 59 |
| <i>Analisi chimiche degli inquinanti del terreno</i> | 60 |
| Analisi dei contaminati organici del terreno (PCB) | 60 |
| Analisi dei contaminati inorganici del terreno (metalli pesanti)..... | 61 |
| <i>Analisi microbiologiche del terreno</i> | 63 |
| Stima dell'Abbondanza microbica totale: conta diretta in epifluorescenza..... | 63 |
| Vitalità cellulare microbica: metodo Live/Dead | 64 |
| Attività microbica totale: Attività deidrogenasica..... | 64 |
| <i>Analisi chimiche dei substrati vegetali</i> | 66 |
| Contenuto di umidità (%)..... | 66 |
| <i>Analisi chimiche degli inquinanti nei substrati vegetali</i> | 66 |
| Analisi dei contaminati organici (PCB) | 66 |
| Analisi dei contaminati inorganici (metalli pesanti)..... | 66 |
| Allegati..... | 67 |
| <i>Allegato 1: Scheda di campionamento P1</i> | 68 |
| <i>Allegato 2: Scheda di campionamento P2</i> | 69 |
| <i>Allegato 3: Scheda di campionamento P3</i> | 70 |





Allegato 4: Scheda di campionamento P4..... 71





Attività sperimentale di campo



Premessa

L'area sperimentale oggetto di studio è costituita da un terreno originario di tipo calcareo mischiato a sedimento di riporto (anche di origine marina). Infatti, il terreno risulta mescolato con resti più o meno grossolani di rifiuti organici ed inorganici, nonché di materiali plastici, calcinacci vari che dimostrano che l'area è stata utilizzata per lungo tempo come una discarica incontrollata. Inoltre, in prossimità dell'area di studio sono presenti dei trasformatori elettrici. La presenza di questi trasformatori elettrici ha determinato una contaminazione diffusa da contaminanti organici persistenti (principalmente da policlorobifenili, PCB) che va ad aggiungersi a quella di tipo inorganico (metalli pesanti) derivante anche dalla presenza, agli inizi del '900, di una piccola armeria, di cui oggi ne rimane solo il vespaio. Pertanto, nella seguente relazione non ci si può riferire ad un suolo omogeneo ed evoluto, ma semplicemente ad un terreno prevalentemente incoerente.

Al fine di migliorare la qualità del terreno anche in termini di nutrienti è stato applicato prima dell'impianto di fitorimediazione, alla concentrazione di 25,78 t/ha, un ammendante compostato misto derivante da scarti solidi urbani, prodotto e fornito dal CIC (Consorzio Italiano Compostatori). La qualità del compost è stata certificata da un laboratorio di analisi ISO/IEC 17025. Lo spargimento di compost è stato effettuato come strategia per il miglioramento del suolo degradato.

Il compost, infatti, gioca un ruolo chiave nel miglioramento della fertilità del suolo a causa del suo elevato contenuto di carbonio organico e di apporto di nutrienti che hanno un generale effetto positivo sulla produttività primaria e direttamente ed indirettamente sulle attività metabolismo delle comunità microbiche naturali che sono i principali responsabili della decomposizione della sostanza organica, del riciclo dei nutrienti e dei processi degradativi, inclusi quelli associati alla rizosfera delle piante.

L'impianto delle 800 talee di pioppo per il fitorimediazione dell'area sperimentale in località ex-campo Cimino-Manganeccchia (Taranto), eseguito in Aprile 2013 è riuscito con successo e di seguito vengono riportate le principali fasi di crescita delle piante.



Le piante sono state costantemente irrigate nella fase iniziale e nei mesi estivi in modo tale da evitarne lo stress idrico.



Figure 1 e 2 - Sviluppo delle talee ad 1 e 3 mesi dall'impianto



Dopo solo 7 mesi le piante hanno avuto un ottimo sviluppo migliorando anche il paesaggio.

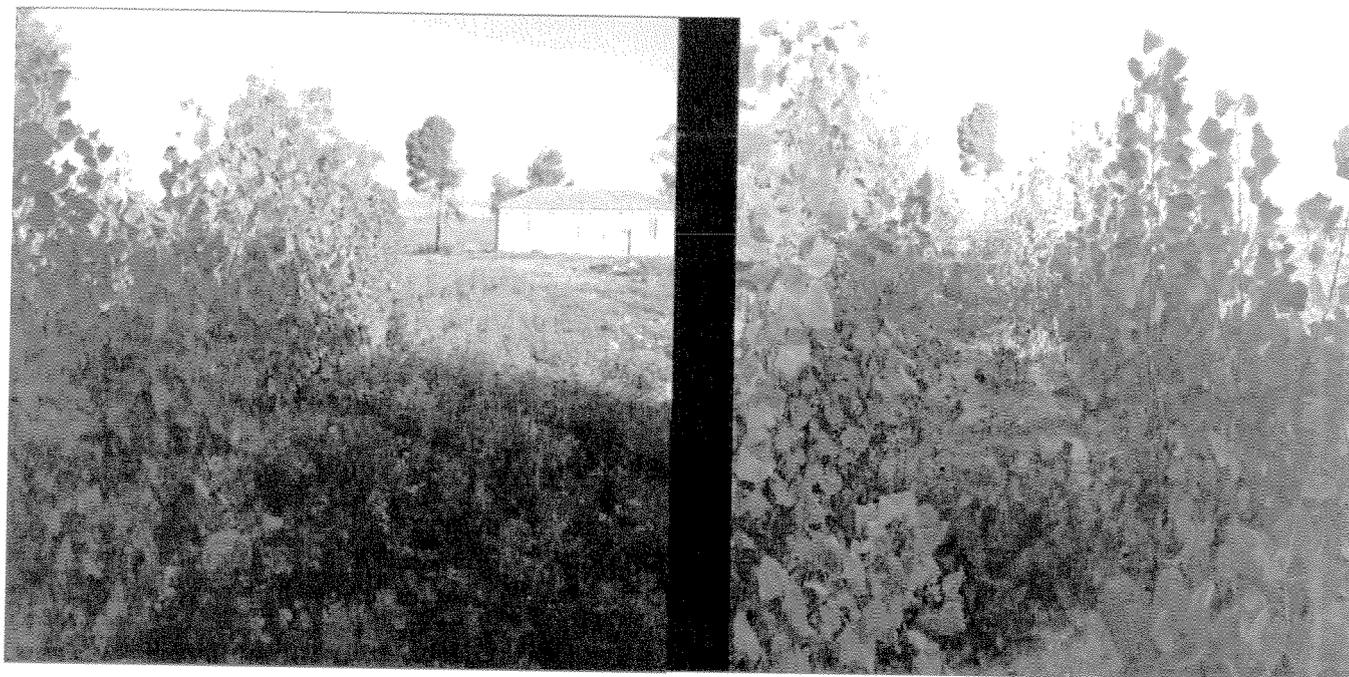


Figure 3 e 4. Immagini relative allo sviluppo delle piante di pioppo dopo 7 mesi dall'impianto sperimentale.

Durante il mese di Gennaio, in corrispondenza del riposo vegetativo dei pioppi, sul terreno è cresciuta una vegetazione di erbe selvatiche (costituita in maniera predominante dalla specie *Sinapis Alba*) e si è provveduto alla potatura e pulitura del terreno.



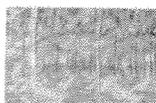


Figure 5 e 6 - Gennaio 2014: riposo vegetativo degli alberi con crescita delle infestanti (immagine a sinistra) e successiva potatura (immagine a destra)

Nel periodo estivo si è osservato un attacco di alcune foglie da parte dell'agente parassitario imenottero *Messa hortulana*, tuttavia le piante hanno rivelato ottime capacità di resistenza e i danni sono stati limitati e non più rilevabili in poco tempo.

Ad 1 anno dall'impianto (aprile 2014) dei pioppi si può rilevare che l'attecchimento delle talee di pioppo è stato > del 99% e che lo sviluppo vegetativo delle talee è stato rapido e rigoglioso.

Pertanto si può affermare che il **clone Monviso** è stato in grado di crescere rigogliosamente sul terreno cronicamente contaminato da PCB e metalli nell'area di studio.



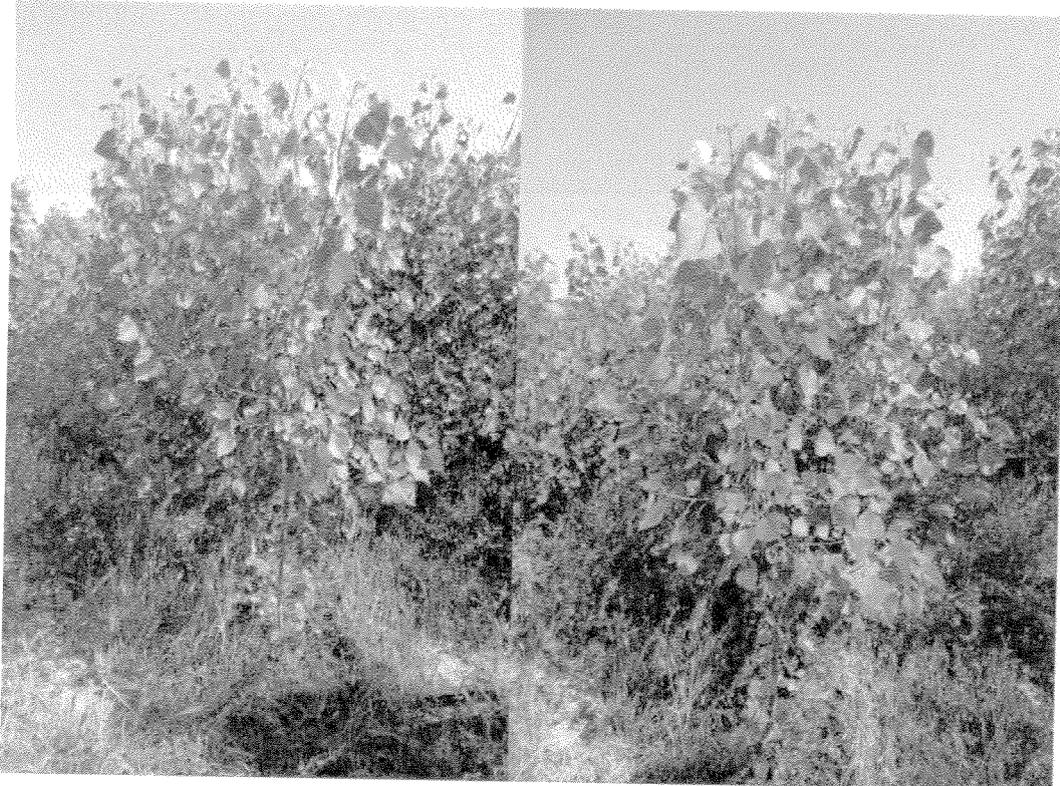
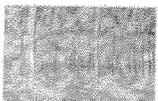


Figure 7 e 8 – Aprile 2014: sviluppo dei pioppi ad 1 anno dall’impianto

Al contrario del successo dei pioppi, l’impianto delle tamerici effettuato a maggio 2013 non ha avuto successo e le 400 piante fornite dall’ARIF non hanno attecchito; è stato pertanto programmato ed effettuato, nella successiva primavera 2014, un nuovo impianto, ma tuttavia anche quest’ultimo non è riuscito. Il primo impianto è stato sicuramente effettuato oltre il periodo più adatto per l’attecchimento di giovani piante a radice nuda; nel caso del secondo impianto di aprile 2014, non si può escludere che il terreno stesso possa non avere avuto le condizioni minime per la crescita di una pianta. In tal punto si può notare come la matrice sia visivamente molto eterogenea, particolarmente lontana da un suolo ed è stata riscontrata la presenza di una contaminazione multipla con concentrazioni significative sia di PCB (superiore a 1000 ppb), che di metalli pesanti (Zn, Pb, Cd, V).





Nei paragrafi di seguito vengono riportate le analisi della **caratterizzazione chimiche e microbiologiche** iniziali dell'area di studio, con particolare riferimento ai punti di terreno più contaminati da PCB e da metalli pesanti nella parcella dove sono presenti i pioppi.

Tale analisi vengono poi confrontate con quelle ottenute dopo il campionamento di giugno 2014 a 14 mesi dall'inizio della sperimentazione di fitorimediazione.



Caratterizzazione iniziale dell'area di studio

Dati di contaminazione

In fase di caratterizzazione dell'area di indagine i campioni di terreno hanno evidenziato la presenza di una contaminazione multipla da contaminanti organici (policlorobifenili, PCB) ed inorganici (metalli pesanti). Sebbene concentrazioni residuali di PCB siano state riscontrate in maniera diffusa in tutta l'area, la presenza di tali contaminanti oltre il valore oltre il valore soglia normativo (60µg/L, D.Lgs. 152/06) è stata rilevato esclusivamente nel campione di suolo P1 ("SI_CAR_12"), localizzato a ridosso dell'attuale recinzione del sito indagato, confinante con un'area in cui è presente un impianto di trasformazione di energia elettrica (vedi valori dei diversi congeneri in Tabella 1, Fig.9).

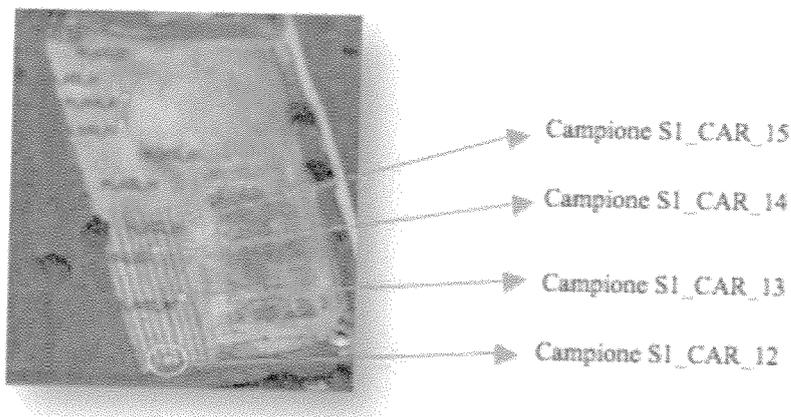
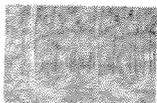


Figura 9 - Indicazione dei punti di prelievo dei campioni di suolo nella campagna di caratterizzazione del sito di indagine.

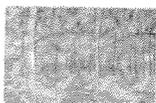
Tabella 1 - Concentrazione di congeneri di PCB (18, 28, 20, 52, 44, 101, 149, 118, 153, 105, 138, 180, 170, 194) del campione di terreno P1 (SI_CAR_12) determinate mediante analisi GC/MS

| µg/kg | 18 | 28 | 20 | 52 | 44 | 101 | 149 | 118 | 153 | 105 | 138 | 180 | 170 | 194 | TOT |
|-------------------|-----|------|-----|------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|--------|
| P1 = SI_CAR_12 | 2,5 | 7,25 | 1,7 | 11,9 | 1,4 | 10,35 | 12,75 | 25,75 | 59,75 | 15,55 | 73,25 | 42,15 | 22,2 | 22,25 | 308,65 |





Come si può notare dalla tabella le analisi al GC/MS del campione di terreno estratto mediante tecnica ASE (*AcceleratedSolventExtraction*) ha evidenziato una concentrazione più elevata per i congeneri 180, 153 e 138.



L'analisi dei metalli, effettuata mediante ICP-MS dei campioni di terreno prelevati in fase di caratterizzazione, ha evidenziato la loro presenza in concentrazioni superiori al valore normativo di riferimento (D. Lgs. 152/06) nei campioni P1, P2, P3 e P4. Particolarmente elevate, risultano le concentrazioni di V, Cr, Zn e Pb (Tabella 2).

Tabella 2 - Concentrazione dei metalli mediante ICP/MS nei campioni di terreno P1, P2, P3 e P4 in fase di caratterizzazione

| µg/kg | Pb | V | Cr | Ni | Zn | As | Se | Cd | Sr | Pb |
|------------------------------|------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Valore soglia (D.Lgs.152/06) | 2 | 90 | 150 | 120 | 150 | 20 | 3 | 2 | 1 | 100 |
| P1 = S1car12 | | 127.40 | 179.55 | 156.20 | 181.28 | | 10.93 | | 5.96 | |
| P2 = S1car13 | | | | | 307.96 | | 9.07 | | 60.86 | 193.81 |
| P3 = S1car14 | 4.32 | 275.70 | 283.69 | | 254.46 | 36.33 | 13.10 | 5.81 | 15.35 | 289.17 |
| P4 = S1car15 | 4.67 | 336.47 | 217.08 | | 556.08 | 29.23 | 12.53 | 11.54 | 10.58 | 199.06 |

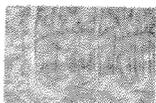


Caratterizzazione microbiologica iniziale

La caratterizzazione microbiologica dei campioni di terreno provenienti dall'area di studio mette in evidenza che l'attività microbica risulta particolarmente bassa nei campioni provenienti dal punto P1 (S1 CAR 12) che è quello in cui sono stati riscontrati i valori più elevati di PCB (Tabella 3).

Tabella 3 - Caratterizzazione microbiologica iniziale relativa ai punti di maggiore contaminazione da PCB (P1) e da metalli (P2, P3, P4)

| | | Abbondanza microbica (N. cellule/g) | Vitalità cellulare (%) | Attività deidrogenasica ($\mu\text{g TPF/g}$) | % acqua |
|----------------------------------|---|--|------------------------------|---|--------------|
| P1 (S1_CAR_12) | 1 | 1.66E+07 | 65.6 | 8.96 | 22.25 |
| | 2 | 1.24E+07 | 54.4 | 9.65 | 20.89 |
| | 3 | 3.42E+07 | 59.1 | 8.26 | 23.61 |
| media | | 2.11E+07 | 59.7 | 8.96 | 22.25 |
| Valori medi sito (P2, P3, P4) | 1 | 9.84E+06 | 57.52 | 84.46 | 4.67 |
| | 2 | 1.40E+07 | 43.16 | 125.22 | 1.04 |
| | 3 | 5.37E+06 | 46.54 | 74.12 | 6.23 |
| media | | 9.72E+06 | 49.07 | 94.60 | 3.98 |



Campionamento nel sito sperimentale dopo 14 mesi dall'impianto

Schema Procedura di Campionamento

Le operazioni di campionamento nell'impianto di pioppi (aprile 2013) si sono svolte in due giorni distinti (24 giugno e 2 luglio 2014). Esse hanno riguardato il prelievo di:

- 16 sub-campioni di terreno/pianta target
- foglie presenti nella parte aerea (ultimo terzo del fusto) di ciascuna pianta target
- radici ove presenti nei sub-campioni di terreno rizosferico e/o situate a ridosso del fusto della pianta target (ad una profondità max 30 cm)

Nello specifico si è provveduto a realizzare i suddetti prelievi in corrispondenza di piante target (P1, P2, P3 e P4) opportunamente individuate sulla base dei punti in cui è stato effettuato il prelievo dei campioni di terreno in fase di caratterizzazione iniziale (10).

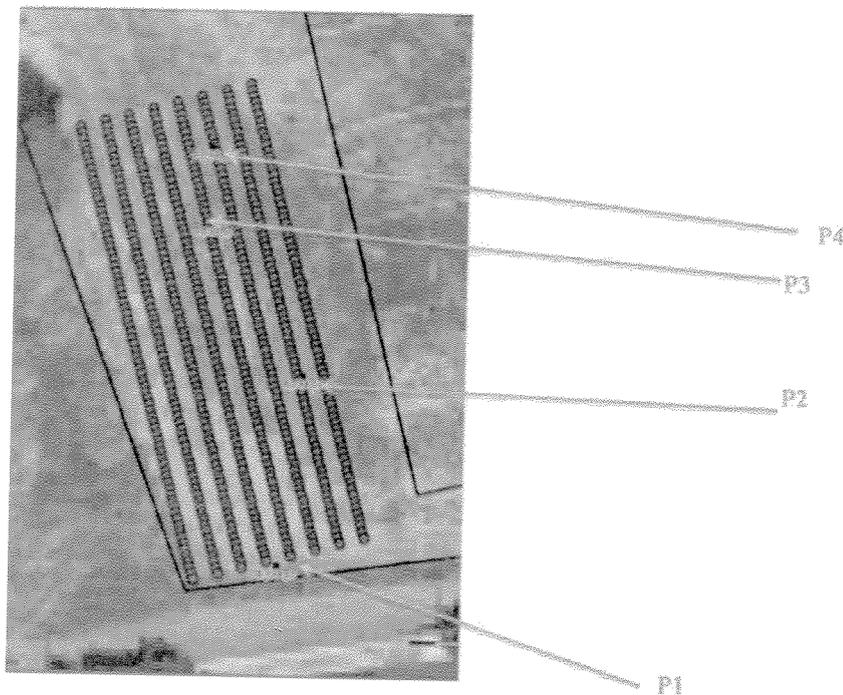


Figura 10: punti di campionamento terreno in fase di caratterizzazione (2013) e relative piante target identificate per il campionamento a 14 mesi (2014)



I campioni di terreno sono stati campionati nella zona limitrofa le radici di ogni pianta a due differenti distanze dal fusto centrale (1 m e 0,25 m) e a due diverse profondità (0-20 cm, 20-40 cm) secondo lo schema seguente:

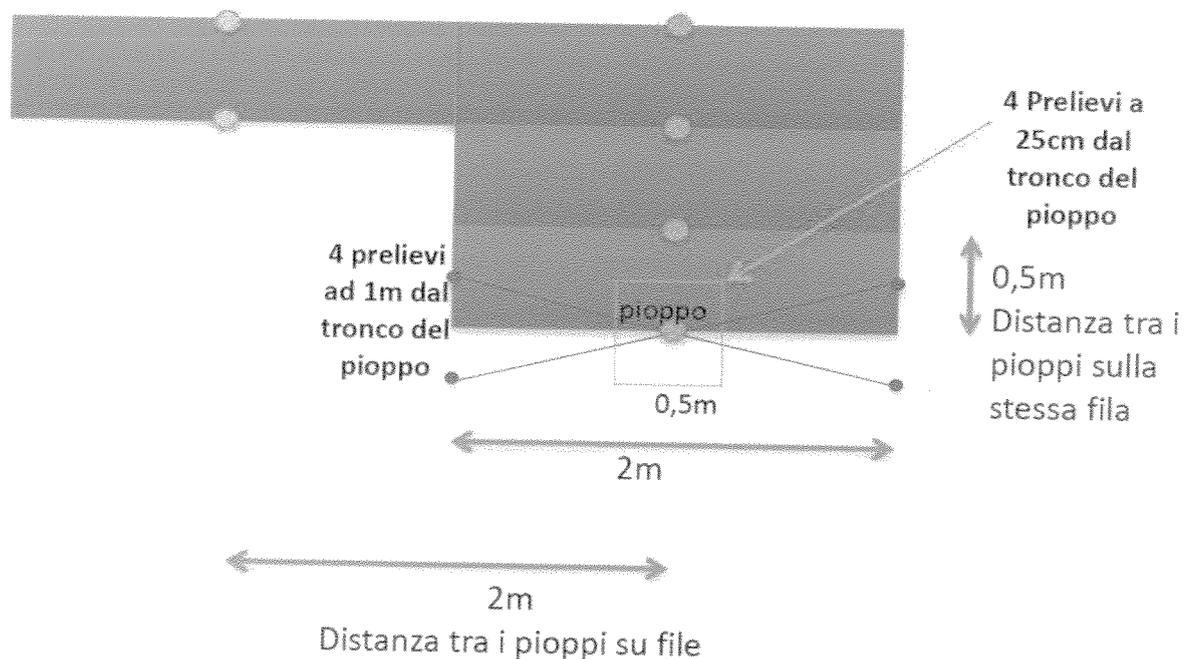


Figura 11 – Schema procedura di campionamento del terreno a diversa distanza e profondità dalla pianta

Nello specifico, con l'ausilio di una trivella a spirale del diametro di 2,5 cm si è proceduto al prelievo, per ciascuna pianta target (P1, P2, P3 e P4), di:

- 4 sub-campioni di terreno (ad 1 m dal tronco) per formare un suolo composito A alla profondità (0-20 cm)
- 4 sub-campioni di terreno (ad 1 m dal tronco) per formare un suolo composito B alla profondità (20-40 cm)



- 4 sub-campioni di terreno (a 25 cm dal tronco) per formare un suolo composito C alla profondità (0-20 cm)
- 4 sub-campioni di terreno (a 25 cm dal tronco) per formare un suolo composito D alla profondità (20-40 cm)

P1



Figura 12 - P1 prima (immagine a sinistra) e dopo (immagine a destra) il prelievo di foglie

La pianta P1 è stata individuata in corrispondenza delle coordinate geografiche del punto di prelievo del campione di terreno S1_CAR_12 (scheda di campionamento P1, *Allegato I*).



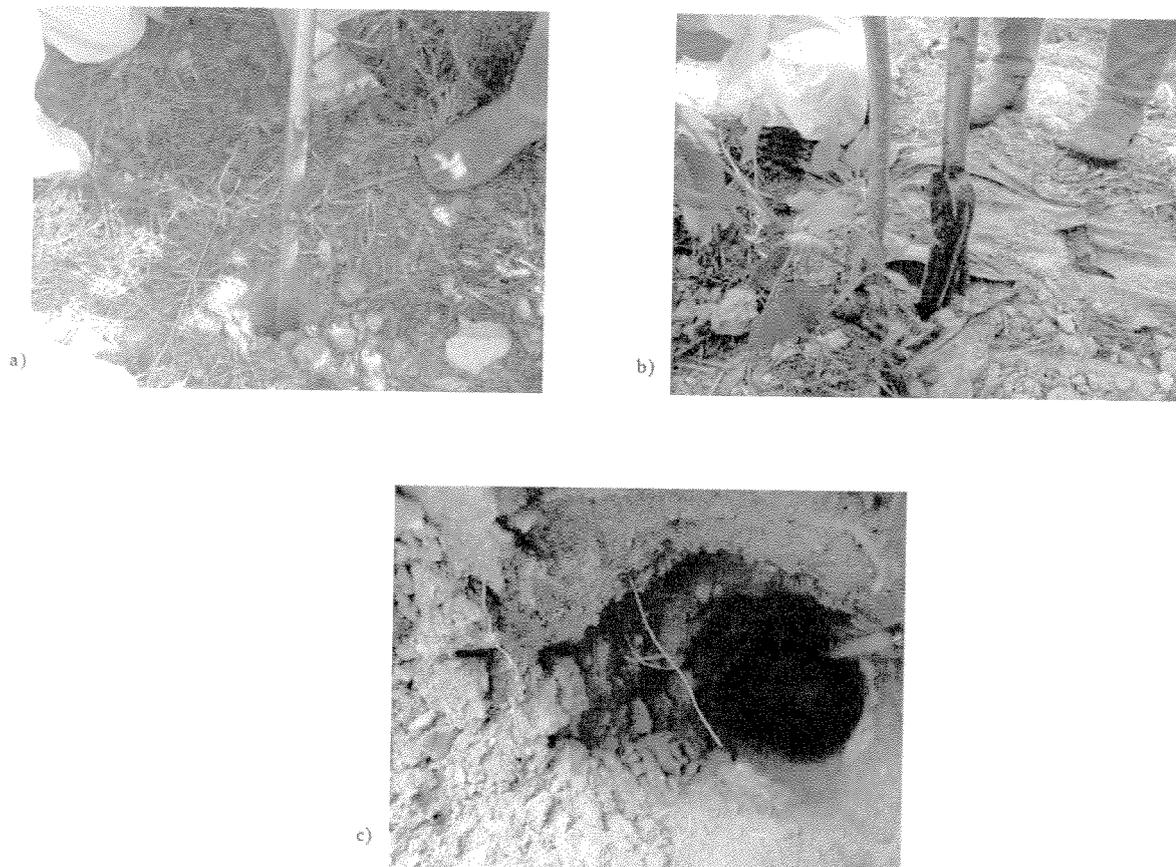


Figura 13 - Utilizzo della trivella per il prelievo dei campioni di terreno (a, b), acquisizione dato di temperatura nello scavo di prelievo a profondità 20-40 cm (c).



P2

La pianta P2 è stata individuata sulla base delle coordinate geografiche del punto di prelievo, realizzato in fase di caratterizzazione, del campione di terreno "SI_CAR_13", (scheda di campionamento P2 (*Allegato 2*)).

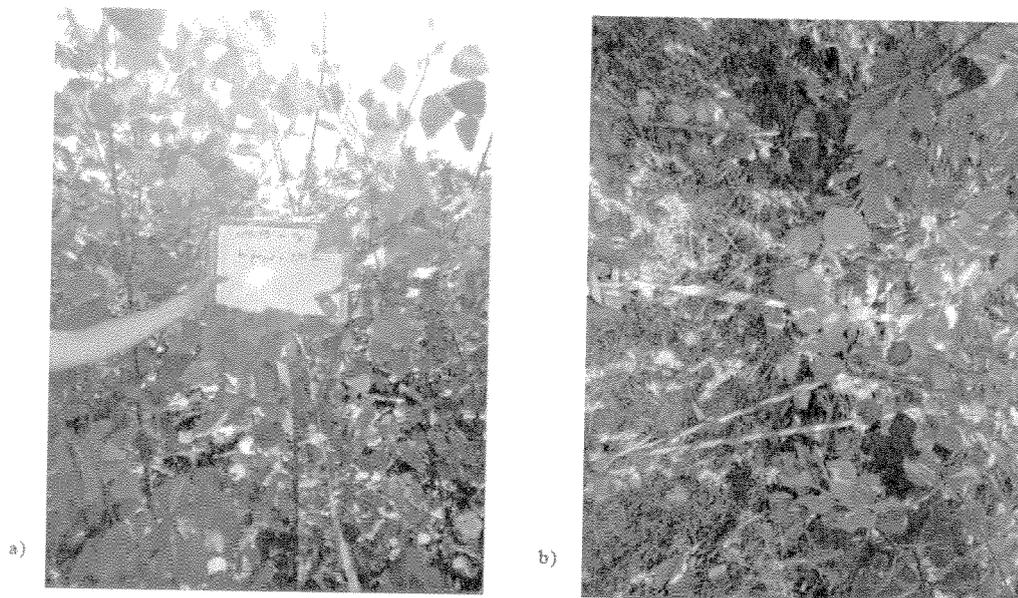


Figura 14 - P2 (a), particolare dei punti di campionamento terreno della P2 (b).



P3

La pianta P3 è stata individuata sulla base delle coordinate geografiche del punto di prelievo, realizzato in fase di caratterizzazione, del campione "SI_CAR_14". In *Allegato 3* si riportano i dati acquisiti durante il campionamento.



Figura 15 - P3 prima del campionamento foglie (a, b), particolare dei punti di campionamento del terreno della P3: a distanza di 1 m dal tronco della pianta (c, d), a distanza di 0,25 m dal tronco della pianta (e, f).



P4

La pianta P4 è stata individuata sulla base delle coordinate geografiche del punto di prelievo, realizzato in fase di caratterizzazione, del campione "S1_CAR_15". I dati raccolti in fase di campionamento di terreno e organi vegetali (foglie e radici) sono riportati nella scheda di campionamento (*Allegato 4*).

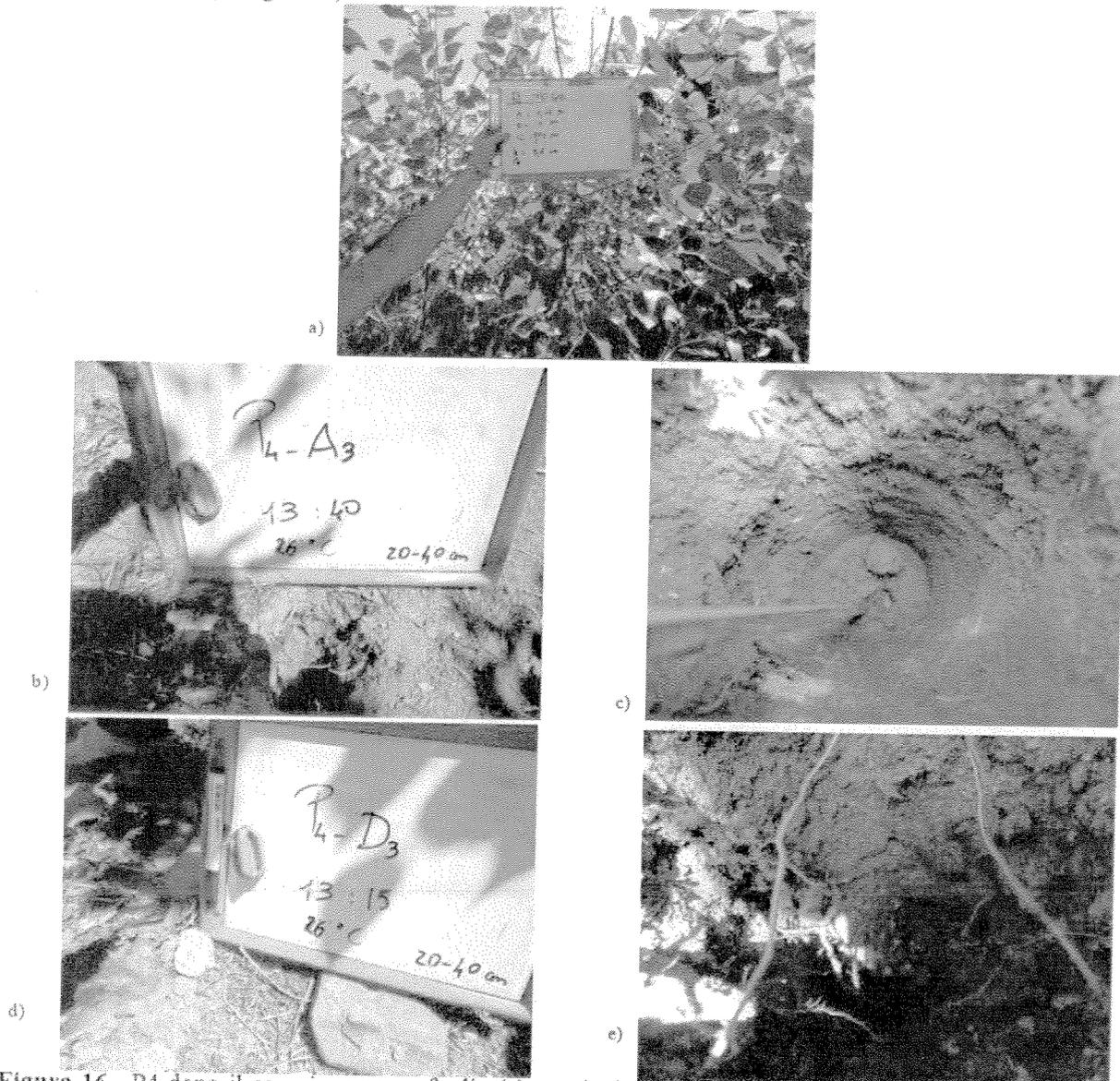


Figura 16 - P4 dopo il campionamento foglie (a), particolare dei punti di campionamento del terreno della P4: a distanza di 1 m dal tronco della pianta (b, c), a distanza di 0,25 m dal tronco della pianta (d, e).



Protocollo di campionamento degli organi vegetali

Materiale ipogeo: Radici

Le radici di ciascuna pianta target (P1, P2, P3 e P4) sono state campionate in concomitanza del prelievo dei sub-campioni di terreno per creare i suoli composti C e D, ovvero a distanza di 25 cm dal tronco del pioppo a 2 profondità di 0-20 cm, terreno superficiale (Suolo C) e 20-40 cm (Suolo D).

Laddove anche a distanza di 1m dal tronco è stata riscontrata la presenza di radici, sono state conseguentemente campionate e classificate.



Figura 17 – Immagine del campionamento radici P1

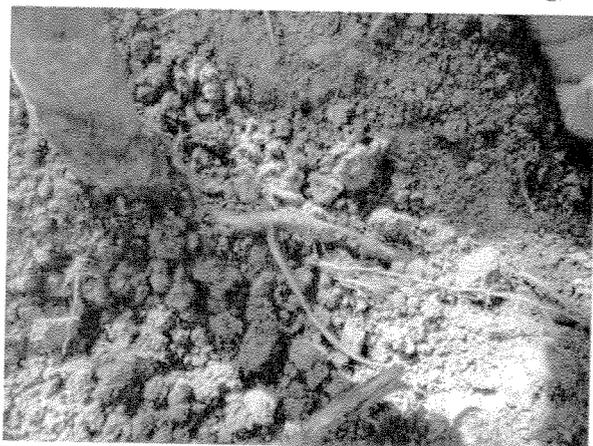


Figura 18 - Immagine del campionamento radici P2





Figura 19 - Immagine del campionamento radici P3

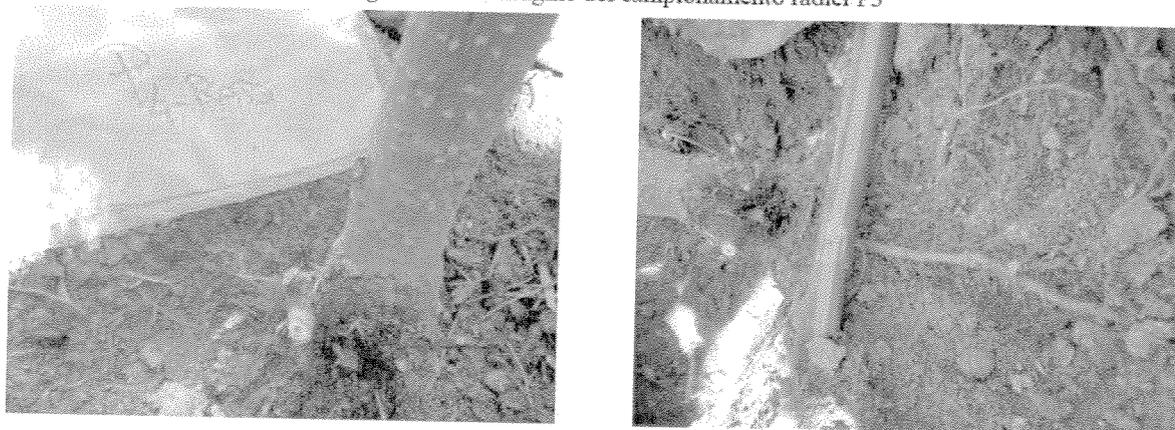


Figura 20 - Immagini del campionamento radici P4

Le radici sono state trovate per la maggior parte in prossimità del fusto a circa 10-20cm di profondità e in minor parte a 25cm dal tronco a 0-20cm di profondità.

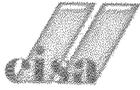
Materiale epigeo: Foglie

Il materiale vegetale epigeo campionato per ciascuna pianta target ha riguardato le foglie della chioma esterna poiché quest'ultime tendono ad accumulare più elementi minerali di quelle della chioma interna, a causa dei loro tassi di traspirazione più elevati.

Per ciascuna pianta spia i campioni (foglie) sono stati prelevati dai rametti apicali situati nella parte alta della chioma (terzo superiore) e collocati in sacchi di polietilene sigillato con una chiusura non metallica. Tutti i tagli dei campioni vegetali sono stati eseguiti con lame di metallo, sciacquate con acetone tra un campione e l'altro per minimizzare la *cross contamination*. I sacchetti di foglie separati per ciascun rametto ed etichettati (A, B, C) sono stati conservati in borsa frigo fino all'arrivo in laboratorio dove sono stati trasferiti a +4°C fino alla determinazione della sostanza secca e delle altre analisi chimiche.



Figura 21- Immagini Campionamento foglie



Risultati



Analisi chimiche del terreno

Grado di reazione del terreno (pH)

I risultati delle analisi del grado di reazione (pH) dei campioni di terreno prelevati in fase di caratterizzazione (2012) sono riportati nella tabella seguente (Tabella 4).

I valori dei campioni "compositi" (A, B, C, D) prelevati nel campionamento di giugno/luglio 2014 effettuato a diverse distanze dal tronco di ciascuna pianta target e a profondità del terreno (vedi *schema di campionamento*) sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 4: Valori di pH determinati nei campioni di terreno prelevati in fase di caratterizzazione (2012)

| Campione | pH (H ₂ O) | pH (KCl) | Classificazione USDA |
|----------------|-----------------------|----------|------------------------|
| S1_CAR_12 = P1 | 7,85 | 7,35 | DEBOLMENTE ALCALINO |
| S1_CAR_13 = P2 | 7,99 | 7,40 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| S1_CAR_14 = P3 | 8,12 | 7,43 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| S1_CAR_15 = P4 | 8,03 | 7,41 | MODERATAMENTE ALCALINO |



Tabella 5: Valori di pH determinati nei campioni di terreno prelevati in fase di monitoraggio (giugno/luglio 2014) relative ai quattro punti di monitoraggio P1, P2, P3 e P4.

| Campione | pH (H ₂ O) | pH (KCl) | Classificazione USDA |
|----------|-----------------------|----------|------------------------|
| P1A | 8,3 | 7,7 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P1B | 8,5 | 7,9 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P1C | 8,5 | 7,9 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P1D | 8,5 | 8 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P1R | 8,6 | 8 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P2A | 8,5 | 7,9 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P2B | 8,5 | 7,9 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P2C | 8,5 | 7,9 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P2D | 8,5 | 7,9 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P2R | 8,5 | 8 | FORTEMENTE ALCALINO |
| P3A | 8,4 | 7,9 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P3B | 8,4 | 7,8 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P3C | 8,1 | 7,9 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P3D | 8,2 | 7,9 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P3R | 8,2 | 7,8 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P4A | 8,3 | 7,9 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P4B | 8,3 | 7,8 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P4C | 8,4 | 7,9 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P4D | 8,4 | 7,8 | MODERATAMENTE ALCALINO |
| P4R | 8,3 | 7,9 | MODERATAMENTE ALCALINO |

A: terreno ad 1 m dal tronco, profondità 0-20 cm;
B: terreno ad 1 m dal tronco, profondità 20-40 cm;
C: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 0-20 cm;
D: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 20-40 cm.
R: terreno adeso e circostante le radici

Le analisi dei campioni prelevati ad un anno dall'impianto dei pioppi mostrano che i terreni delle piante P1 e P2 sono "fortemente alcalini", mentre i terreni prelevati in corrispondenza delle piante P3 e P4 sono "moderatamente alcalini". Le analisi condotte in fase di caratterizzazione evidenziavano valori leggermente inferiori di pH, pertanto, a seguito dell'impianto di pioppi è stato possibile registrare un innalzamento del grado di reazione dei suoli.



Contenuto di umidità (%)

I risultati delle analisi dell'umidità (espressa in %) dei terreni campionati in fase di caratterizzazione sono riportati in Tabella 6 e quelli relativi agli stessi campioni dopo 14-15 mesi dall'impianto delle talee di pioppo sono riportate nella Tabella 7.

Nei campioni di terreno rizosferico (P1R, P2R, P3R, P4R) è possibile evidenziare valori di umidità (%) più elevati rispetto a quelli osservati per i restanti campioni (A, B, C, D) di ciascuna pianta target. Ciò è dovuto al fatto i campioni di terreno rizosferico sono situati in prossimità dell'impianto di irrigazione in utilizzo nei giorni precedenti alle operazioni di campionamento.

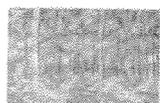
I valori di umidità registrati all'inizio della sperimentazione (Tabella 7) erano più bassi di quelli osservati nel campionamento di giugno/luglio 2014.

Tabella 6: Contenuto idrico (espresso in %) dei 4 campioni di suolo prelevati in fase di caratterizzazione

| Campione | U (%) |
|----------------|-------|
| S1_CAR_12 = P1 | 3,88 |
| S1_CAR_13 = P2 | 4,99 |
| S1_CAR_14 = P3 | 5,54 |
| S1_CAR_15 = P4 | 4,66 |

Tabella 7: Contenuto idrico (espresso in %) dei campioni di terreno prelevati nel campionamento di giugno/luglio 2014

| Campione | h(%) |
|----------|-------|
| P1A | 7,75 |
| P1B | 7,64 |
| P1C | 7,62 |
| P1D | 6,98 |
| P1R | 11,41 |
| P2A | 10,55 |
| P2B | 10,1 |
| P2C | 10,31 |
| P2D | 9,45 |
| P2R | 13,31 |
| P3A | 7,82 |
| P3B | 7,74 |
| P3C | 7,61 |
| P3D | 6,99 |
| P3R | 11,61 |
| P4A | 5,56 |
| P4B | 4,23 |
| P4C | 7,42 |
| P4D | 7,37 |
| P4R | 7,74 |



Contenuto di carbonio organico

I risultati delle analisi del carbonio organico nel terreno sia in fase di caratterizzazione che dopo 14 mesi dall'impianto sono riportate in Figura 22. In particolare viene evidenziato che il contenuto di Carbonio (C) organico (espresso in g/kg) è più alto nei campioni di terreno della pianta P4, mentre valori nettamente inferiori sono stati registrati nei campioni di terreno della P1 (3,94 g/kg nel terreno rizosferico). Un confronto con i dati di C organico rilevati nei suoli campionati negli stessi punti di prelievo in fase iniziale di caratterizzazione (riquadri in blu di Figura 22) consente di evidenziare che, fatta eccezione per i suoli della P1, è possibile osservare un incremento del contenuto di C organico a seguito dell'impianto di pioppi.

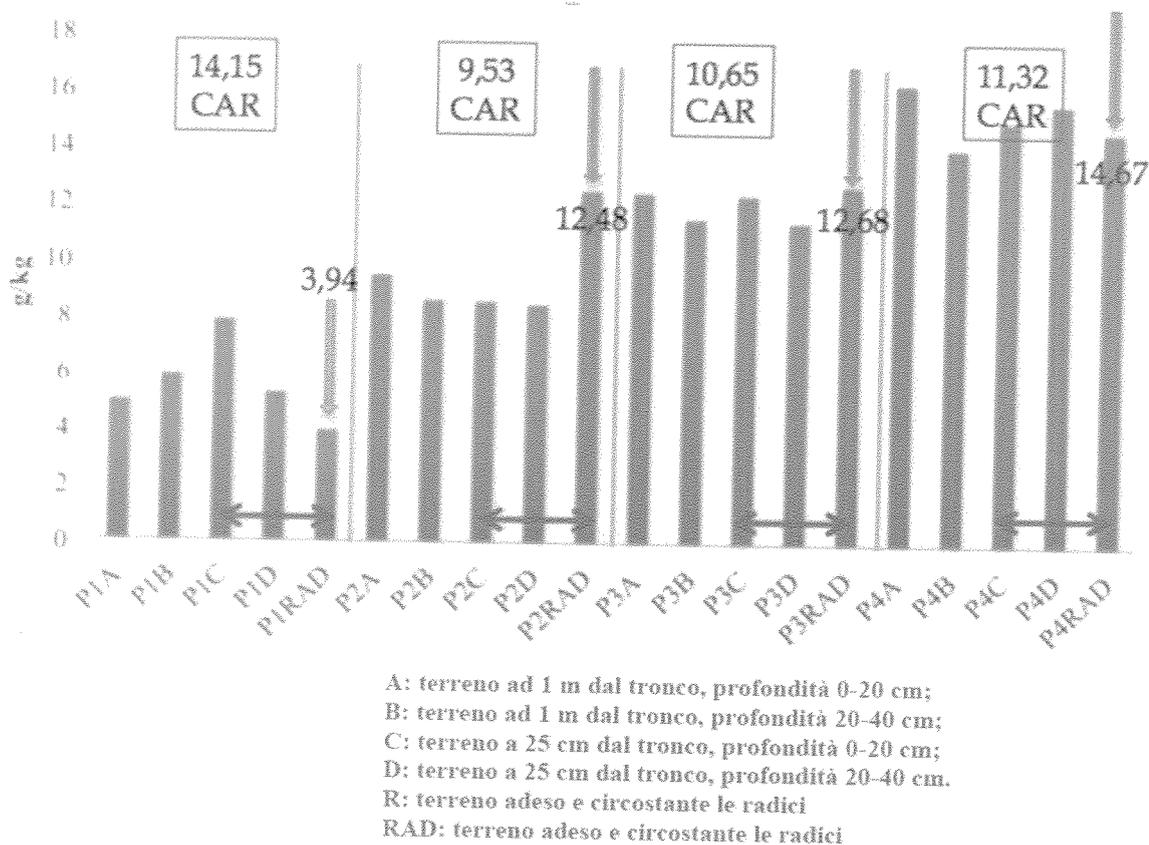


Figura 22: Contenuto del C organico (espresso in mg/kg) nei campioni di terreno prelevati nel campionamento di giugno/luglio 2014. Nei riquadri in blu in alto corrispondenti a ciascun punto di prelievo P1-P4 sono riportati i dati di C organico (espresso in mg/kg) rilevati nei suoli in fase di caratterizzazione.



Analisi degli inquinanti del terreno

Contaminanti organici (PCB)

In Tabella 8 sono riportati i risultati delle determinazioni analitiche dei policlorobifenili (PCB), espressi come ppb, effettuate mediante strumentazione GC/MS (valori medi di due repliche) relative ai campioni di terreno prelevati per la pianta P1 in corrispondenza del punto di prelievo "CAR_12" in fase di caratterizzazione iniziale. In tabella sono riportati i congeneri che in fase di caratterizzazione mostravano i valori più elevati (es. 118, 153, 138, 180). Si può notare come la sola sommatoria di questi pochi congeneri supera nella caratterizzazione (12 CAR in Tabella 8) i valori soglia del D.Lgs. 152/06.

Tabella 8: Concentrazione dei singoli congeneri di PCB (esprese in ppb) rilevate nei campioni di terreno prelevati in fase di monitoraggio

| Sample | 28 | 52 | 101 | 118 | 153 | 105 | 138 | 180 | TOT |
|----------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|-------|
| 12 CAR | 7,2 | 11,9 | 10,3 | 25,7 | 59,7 | 15,5 | 73,2 | 42,1 | 245,6 |
| 12 (P1A) | 0,96 | 1,08 | 1,53 | 1,98 | 5,73 | 1,61 | 4,11 | 7,44 | 24,44 |
| 12 (P1B) | 0,58 | 0,88 | 3,48 | 1,52 | 14,11 | 1,43 | 7,09 | 20,90 | 49,99 |
| 12 (P1C) | 0,58 | 0,73 | 1,08 | 1,60 | 3,88 | 1,45 | 3,24 | 5,44 | 18,00 |
| 12 (P1D) | <0,5 | 0,84 | 1,14 | 1,49 | 2,90 | 1,35 | 2,51 | 4,07 | 14,3 |
| 12(P1R) | <0,5 | 0,87 | 1,6 | 1,55 | 4,04 | 1,65 | 3,74 | 5,84 | 19,29 |

A: terreno ad 1 m dal tronco, profondità 0-20 cm;
 B: terreno ad 1 m dal tronco, profondità 20-40 cm;
 C: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 0-20 cm;
 D: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 20-40 cm.
 R: terreno adeso e circostante le radici

I congeneri maggiormente presenti nel campione CAR_12 in fase di caratterizzazione sono quelli contraddistinti da un numero più alto di atomi di cloro (105, 118, 138, 153, 180); è possibile osservare che il congenero 138 superava da solo il limite indicato dalla normativa nazionale (60 ppb, D.Lgs. 152/06).





L'analisi dei campioni di terreno dopo più di un anno dall'impianto (Tab. 10, P1A, P1V, P1C, P1D, P1R) mostra come tutti i campioni analizzati stiano abbondantemente al di sotto dei limiti legislativi e che alcuni congeneri non sono più ritrovati (vedi PCB28 vicino alle radici).



Contaminanti inorganici (metalli pesanti)

I risultati delle analisi effettuate con lo strumento ICP-MS sono riportati come valori medi (3 repliche) nelle Figure 23-26 (espressi in mg/kg o ppm) relative alla fase iniziale di caratterizzazione (C) e di monitoraggio (M) dopo 14-mesi dall'impianto delle talee di pioppo. In rosso vengono evidenziate le concentrazioni che superano i valori soglia imposti dal D.lgs. 152/06.

In particolare in Figura 23 sono riportati i dati relativi ai metalli Be, Cd, Sb e Tl. I dati mostrati in Fig. 23 rivelano che né in fase di caratterizzazione, né dopo un anno di sperimentazione i terreni nell'area delle piante P1 e P2 Be, Cd, Sb e Tl superano i valori soglia indicati dalla normativa e che la loro concentrazione diminuisce anche nel tempo.

Nei terreni della pianta P3, il Be, che in fase di caratterizzazione superava i limiti di legge, dopo un anno di sperimentazione è al di sotto degli stessi; per il Cd si osserva un valore ancora leggermente superiore al limite normativo (3,53 ppm vs 3 ppm), sebbene comunque inferiore rispetto a quanto riscontrato in fase di caratterizzazione iniziale.

In P4 si osserva una netta diminuzione di Be, Cd, Sb e Tl tra la fase di caratterizzazione iniziale e il campionamento dopo 1 anno dall'impianto; si può notare come i valori dei metalli sia al di sotto dei limiti normativi (fa eccezione il Be che è solo leggermente al di sopra del valore limite di 2 ppm, riportando un valore di 2,02 ppm)



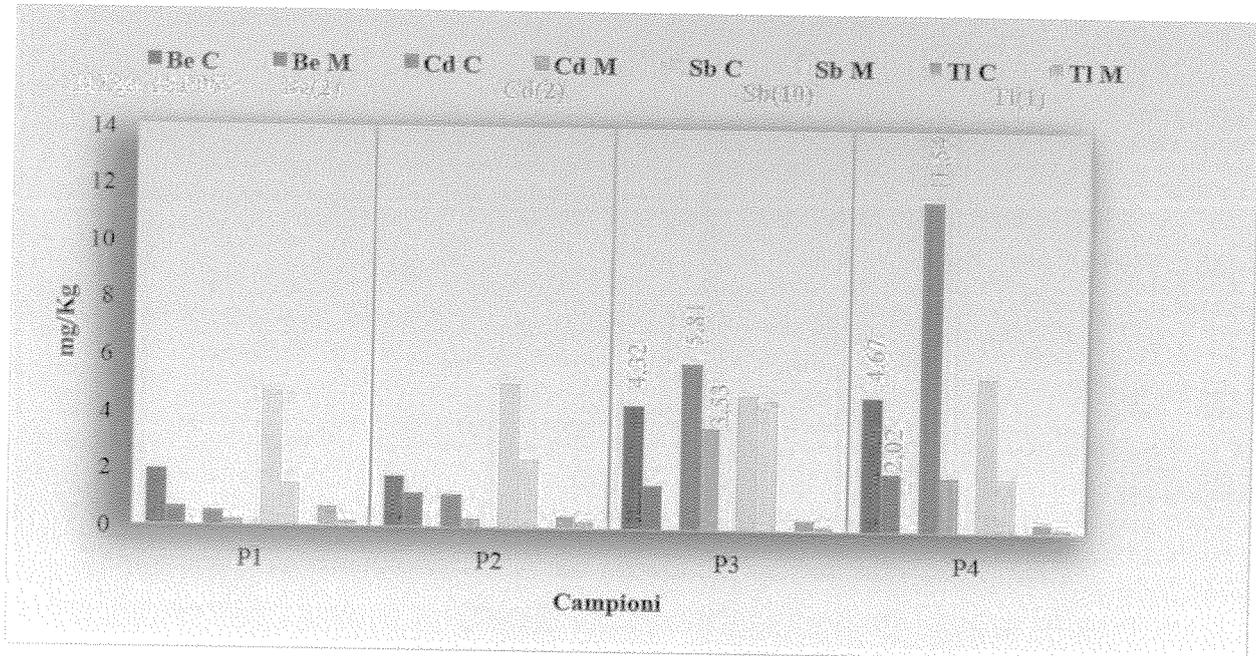


Figura 23: Confronto tra le concentrazioni (esprese in mg/kg) di Be, Cd, Sb e Tl rilevate nei campioni di terreno P1, P2, P3, P4 prelevati durante la campagna di caratterizzazione (C) e di monitoraggio (M) eseguita ad un anno dall'impianto dei pioppi; in rosso sulle colonne sono evidenziate le concentrazioni che superano i valori soglia imposti dal D lgs. 152/06, riportati in alto nella figura.

In Figura 24 sono riportate le concentrazioni di V, Cr, Ni e Cu (esprese in ppm=mg/kg) rilevate nei suoli sia in fase di caratterizzazione che nel monitoraggio dopo 14 mesi dall'impianto delle talee di pioppo. Anche per questi metalli si osserva che dopo un anno di sperimentazione i valori sono tutti al di sotto dei limiti normativi. In particolare, i punti P1, P3 e P4, che in caratterizzazione registravano valori di concentrazione di V, Cr e Ni nettamente superiori ai relativi limiti normativi (V=90, Cr=150; Ni=120 ppm), non risultano essere più contaminati dai suddetti metalli dopo 14 mesi di sperimentazione.



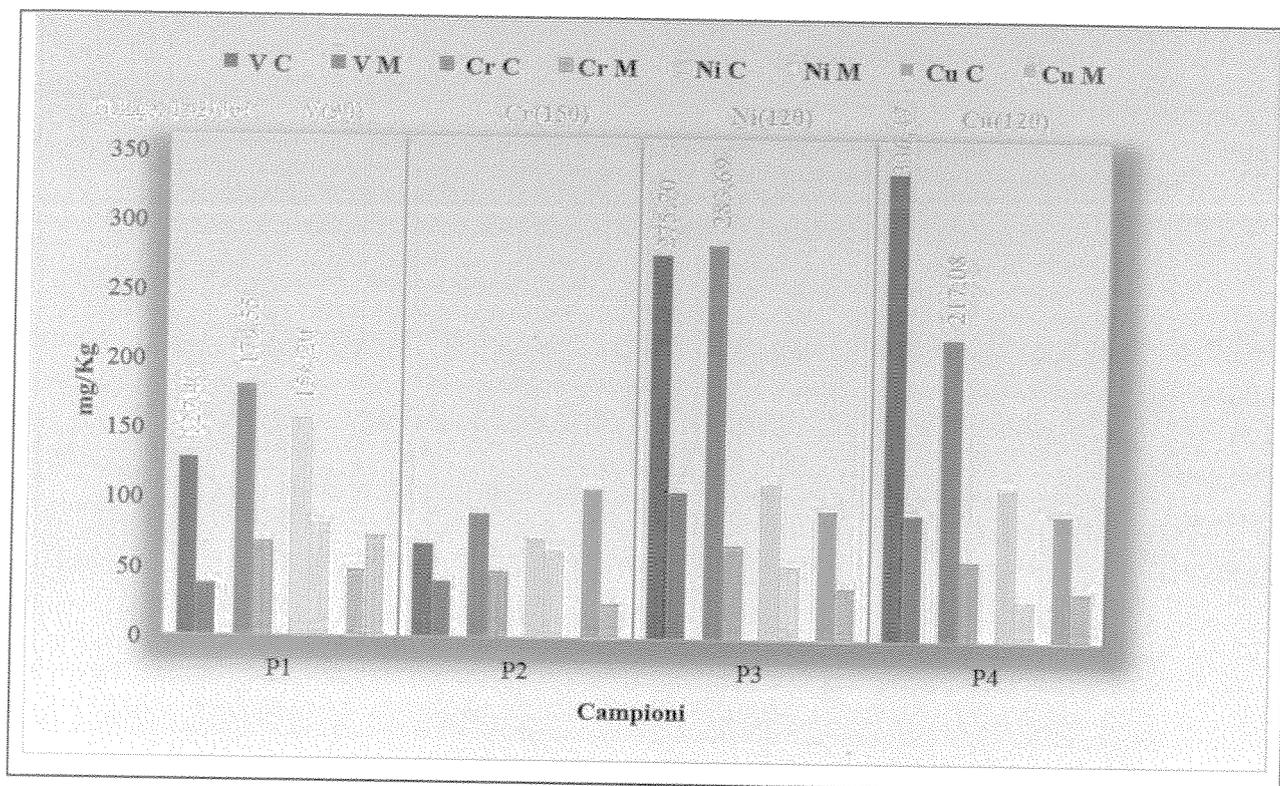
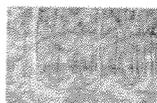


Figura 24: Confronto tra le concentrazioni (in mg/kg o ppm) di V, Cr, Ni e Cu trovate nei campioni di terreno P1, P2, P3, P4 prelevati durante la campagna di caratterizzazione (C) e di monitoraggio (M) eseguita ad un anno dall'impianto dei pioppi; in rosso sulle colonne sono evidenziate le concentrazioni che superano i valori soglia imposti dal D lgs. 152/06, riportati in alto nella figura.

In Figura 25 sono riportate le concentrazioni di Zn e Pb (esprese in ppm=mg/kg) rilevate nei campioni del terreno prelevato in fase di caratterizzazione (C) e di monitoraggio (M). Le analisi ICP-MS hanno rilevato che i campioni di terreno caratterizzati inizialmente (CAR_13, CAR_14 e CAR_15) presentavano valori di Pb superiori al limite normativo (100 ppm). Le analisi dei suoli prelevati dopo 14 mesi dall'impianto delle talee di pioppo in corrispondenza dei punti contaminati di caratterizzazione, hanno evidenziato valori di concentrazione di Pb al di sotto del limite normativo.



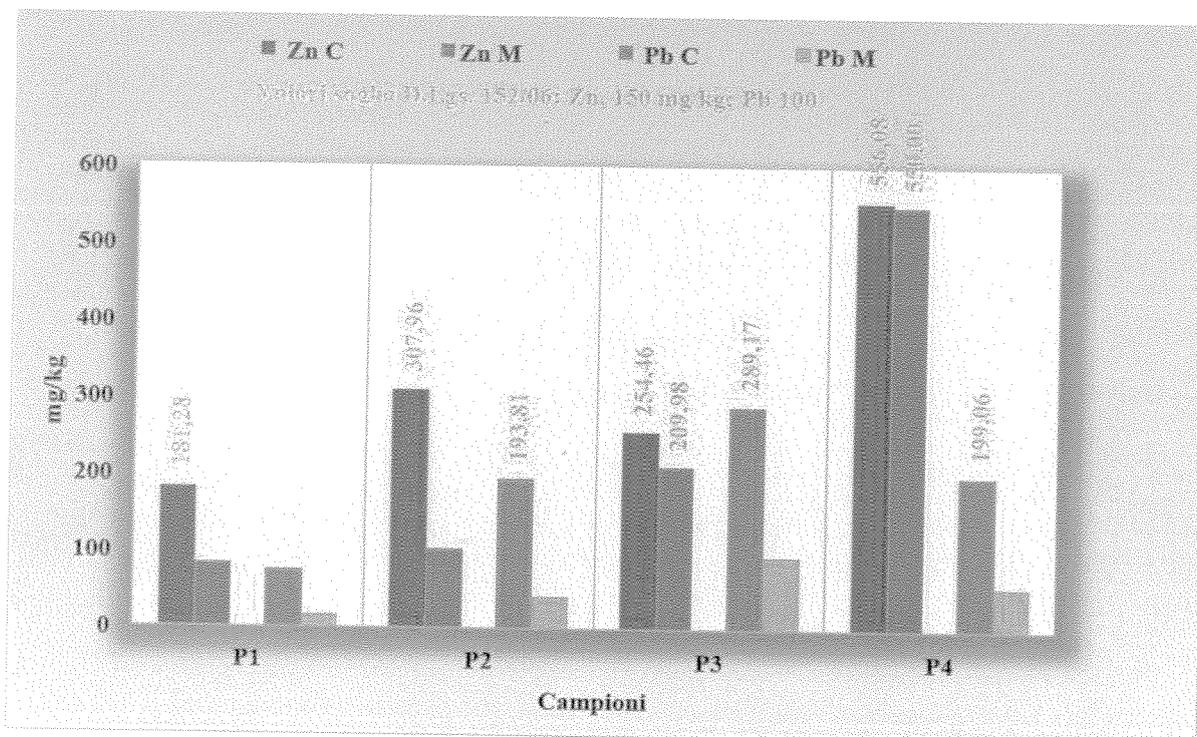


Figura 25: Confronto tra le concentrazioni (esprese in mg/kg o ppm) di Zn e Pb rilevate nei campioni di terreno P1, P2, P3, P4 prelevati durante la campagna di caratterizzazione (C) e di monitoraggio (M) eseguita ad un anno dall'impianto dei pioppi; in rosso sulle colonne sono evidenziate le concentrazioni che superano i valori soglia imposti dal D lgs. 152/06, riportati in alto nella figura.

Relativamente allo Zn si può osservare una rilevante diminuzione della concentrazione di tale metallo nei campioni di terreno vicino alle piante P1 e P2. Valori superiori al limite normativo (150 ppm) sono stati registrati nei campioni di terreno delle piante P3 e P4, sebbene comunque molto al di sotto dei limiti normativi.

In Figura 26 sono riportate le concentrazioni di As, Se e Sn (esprese in ppm=mg/kg) rilevate nei suoli di caratterizzazione (C) e nel monitoraggio (M) dopo 14-mesi dall'impianto delle talee di pioppo. I terreni prelevati in corrispondenza dei punti P2, P3 e P4, che in caratterizzazione registravano valori di concentrazione di As superiori al limite normativo (20 ppm), presentano valori significativamente inferiori ad un anno dall'impianto e al di sotto del limite indicato dalla normativa.



Relativamente al Se i valori rilevati nei terreni prelevati in fase di monitoraggio ad un anno dall'impianto sono sempre inferiori a quelli registrati nei relativi campioni di terreno prima dell'impianto stesso (dati di caratterizzazione). I terreni delle piante P3 e P4 ad un anno di sperimentazione, benché siano inferiori a quelli iniziali di caratterizzazione, presentano valori di Se superiori al limite normativo (3 ppm) pari rispettivamente a 8,8 ppm e 7,6 ppm; al contrario, in P1 e P2 i valori ad un anno di sperimentazione risultano inferiori ai limiti di legge.

I valori di Sn osservati nei campioni di terreno prelevati dopo 14 mesi dall'impianto delle talee di pioppo, e in corrispondenza di ciascuna pianta target, sono nettamente inferiori a quelli registrati nei rispettivi terreni nella fase di caratterizzazione iniziale, sebbene superino lievemente il limite normativo (1 ppm).

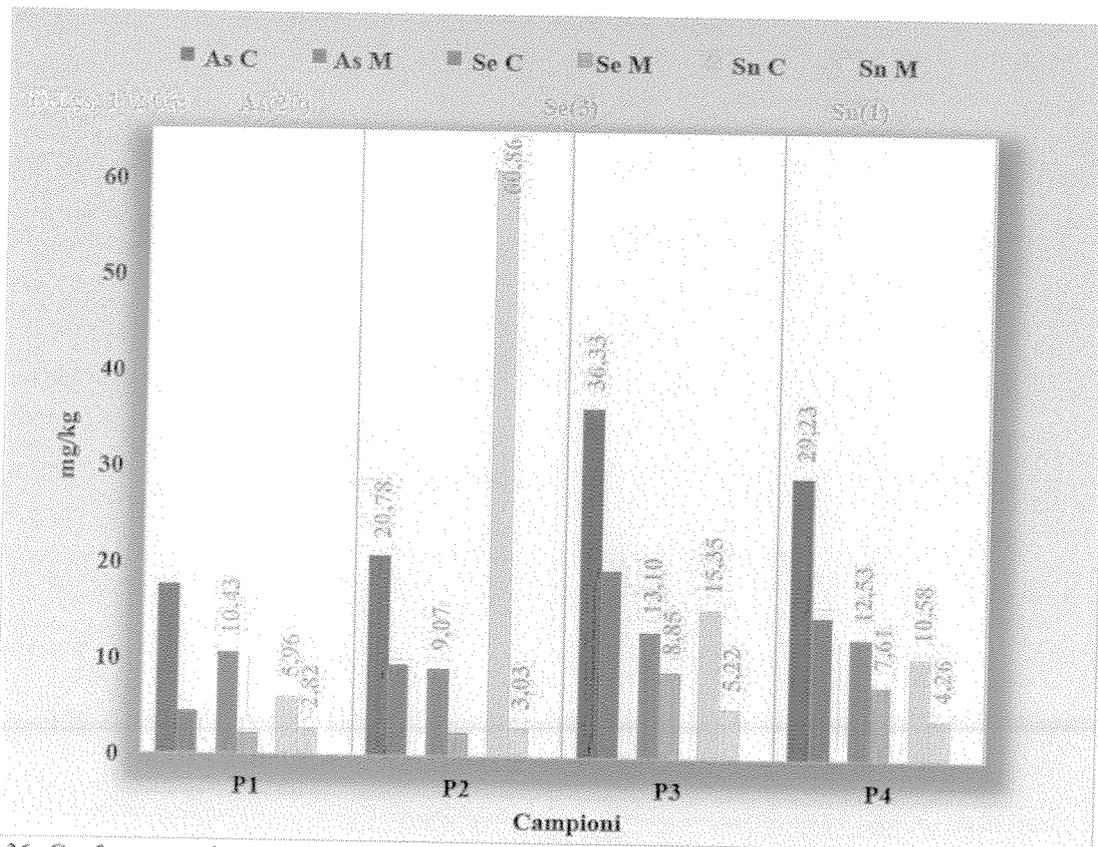


Figura 26: Confronto tra le concentrazioni (esprese come mg/kg o ppm) di As, Se e Sn trovate nei campioni di terreno P1, P2, P3, P4 prelevati durante la campagna di caratterizzazione (C) e di monitoraggio (M) eseguita ad un anno dall'impianto dei pioppi; in rosso sulle colonne sono evidenziate le concentrazioni che superano i valori soglia imposti dal D lgs. 152/06, riportati in alto nella figura.





In linea generale viene così evidenziato che valori di concentrazione dei metalli indagati dopo un anno di sperimentazione, risultano tutti inferiori rispetto a quelli osservati in fase di caratterizzazione.

In particolare, molti dei valori dei metalli (As, Zn in alcuni casi, Pb, V, Cr e Ni) che in fase di caratterizzazione risultavano al di sopra dei limiti di legge, ad un anno dall'impianto e nei suoli analizzati risultano in concentrazioni inferiori ai limiti di legge stessi.



Analisi microbiologiche del terreno e della rizosfera

Lo stato di qualità di un terreno è fortemente dipendente dalla presenza di una comunità microbica varia, abbondante e soprattutto attiva. La presenza dei microrganismi assicura che gli elementi inorganici che sono naturalmente presenti nei suoli vengano riciclati e che la sostanza organica venga decomposta. I microrganismi sono anche in grado di trasformare e degradare i contaminanti e per questo motivo il loro studio ci permette di valutare la qualità di un suolo e valutare i suoi cambiamenti un seguito ad interventi di recupero. Le analisi microbiologiche pertanto sono uno strumento utile a supportare i risultati di quelle chimiche dandoci un valore aggiunto per la loro interpretazione.

Le analisi effettuate su campioni di terreno prelevati a diverse distanza e profondità rispetto alla pianta (incluso la rizosfera) sono riportate di seguito nella Tabella 11.

In generale si osserva un miglioramento della qualità del terreno in tutti i campioni analizzati.

Sebbene i valori di abbondanza microbica e di vitalità per i campioni prelevati nei punti P1, P2, P3 e P4, rimangono simili a quelli iniziali, si riscontra dopo 1 anno dall'impianto dei pioppi un forte incremento dell'attività microbica deidrogenasica.

L'attività enzimatica dei microrganismi è un parametro che riflette la qualità dei suoli e che risulta influenzato negativamente sia dalla presenza di basso contenuto di sostanza organica (Kumar et al., 2013), che di contaminanti. Ad esempio i metalli pesanti possono ridurre l'attività microbica perché interagiscono con dei complessi enzima-substrato e possono influenzare la sintesi degli enzimi cellulari microbici, (Wolińska and Stepniewska, 2012). Per esempio, alcuni studi riportano che in presenza di cadmio e piombo, la deidrogenasi diminuisce sensibilmente, e che la loro co-presenza ha un effetto inibitore anche maggiore; anche il cromo è stato evidenziato influenzare negativamente tale attività (Wolińska e Stepniewska, 2012). Inoltre, anche l'areazione del suolo può influenzare tale attività, essendo la deidrogenasi un processo ossidativo. Pertanto, nel terreno oggetto di studio esistono molteplici fattori iniziali quali la presenza di metalli, di PCB, mancanza di uno strato di suolo evoluto e granulometricamente omogeneo, ecc. (poiché si tratta di terreno di riporto, ecc.) per i quali la sua "qualità" è sicuramente bassa.

Come si può vedere in tabella (Tabella 9), in tutti i campioni analizzati i valori misurati sono significativamente maggiori rispetto ai valori riscontrati in fase di caratterizzazione (tali valori erano 8,96 e 94,60 $\mu\text{g TPF/g}$ rispettivamente nei punti corrispondenti a P1 ed alla media dei punti P2, P3 e P4).



In particolare, in corrispondenza del punto di campionamento P1, caratterizzato da contaminazione iniziale da PCB sopra i limiti normativi si può notare che, dopo 1 anno dall'impianto dei pioppi e dal trattamento del terreno con il compost, non solo si osserva un decremento significativo dei PCB, ma anche un aumento di oltre tre volte del valore di attività microbica deidrogenasica, dimostrando l'azione sinergica dei microrganismi e della pianta nel recupero della qualità del terreno.

I valori di attività deidrogenasica aumentano anche in corrispondenza dei punti P2, P3, P4 e tale risultato è associato al decremento nel terreno di tutti i metalli presenti analizzati (tabella 9).

Tab. 9: risultati microbiologici: campionamento dopo 14 mesi dall'impianto dei pioppi. Rizosfera: terreno adeso e circostante le radici; A: terreno ad 1 m dal tronco, profondità 0-20 cm; B: terreno ad 1 m dal tronco, profondità 20-40 cm; C: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 0-20 cm; D: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 20-40 cm

| | | Abbondanza microbica (N. cellule/g) | Vitalità cellulare (%) | Attività Deidrogenasica ($\mu\text{g TPF/g}$) |
|----|--------------|--|---------------------------|--|
| P1 | P1 rizosfera | $4,66 \cdot 10^6$ | 36,6 | 31,88 |
| | P1 A | $1,17 \cdot 10^7$ | 20,2 | 32,90 |
| | P1 B | $1,74 \cdot 10^7$ | 46,1 | 27,92 |
| | P1 C | $1,38 \cdot 10^7$ | 20,2 | 37,33 |
| | P1 D | $2,17 \cdot 10^7$ | 17,9 | 28,90 |
| P2 | P2 rizosfera | $1,33 \cdot 10^7$ | 19,7 | 82,41 |
| | P2 A | $9,84 \cdot 10^6$ | 15,7 | 37,52 |
| | P2 B | $1,03 \cdot 10^7$ | 38,6 | 35,06 |
| | P2 C | $1,57 \cdot 10^7$ | 20,0 | 47,27 |
| | P2 D | $1,52 \cdot 10^7$ | 67,3 | 44,84 |
| P3 | P3 rizosfera | $3,89 \cdot 10^6$ | 9,5 | 212,98 |
| | P3 A | $1,19 \cdot 10^7$ | 52,1 | 197,92 |
| | P3 B | $7,85 \cdot 10^6$ | 20,2 | 143,03 |
| | P3 C | $7,47 \cdot 10^6$ | 27,3 | 143,46 |
| | P3 D | $2,31 \cdot 10^7$ | 20,2 | 140,51 |
| P4 | P4 rizosfera | $9,12 \cdot 10^6$ | 53,5 | 192,88 |
| | P4 A | $7,71 \cdot 10^6$ | 20,2 | 168,61 |
| | P4 B | $4,74 \cdot 10^6$ | 29,8 | 113,10 |
| | P4 C | $1,63 \cdot 10^7$ | 20,2 | 131,15 |
| | P4 D | $1,17 \cdot 10^7$ | 20,2 | 132,64 |



Le numerose funzioni che i microrganismi svolgono nel mantenimento della qualità e fertilità del suolo vengono esaltate nella rizosfera. La rizosfera è quel volume di suolo dove si sono sviluppate le radici dei pioppi e costituisce un'intensa zona di scambio tra le radici e i microrganismi del suolo grazie al rilascio di sostanze di varia natura (es. zuccheri, amminoacidi, fenoli, ecc.). Le piante agiscono da "pompe" di carbonio fissando quello disponibile in atmosfera negli essudati radicali che vengono rapidamente utilizzati dai batteri. La rizosfera è un'intensa zona di interazioni biologiche tra le radici delle piante e microrganismi grazie all'assorbimento di acqua per capillarità dal suolo e al fenomeno della rizodeposizione, cioè il rilascio di essudati radicali, quali zuccheri, amminoacidi, fenoli, ectoenzimi (fosfatasi, polifenoli ossidasi), mucillagini e lisati. A loro volta, i microrganismi presenti nella rizosfera regolano la disponibilità degli elementi nutritivi per le piante e possono ostacolare la colonizzazione radicale ad opera di specie parassite, attraverso la produzione di sostanze antibiotiche. Come si può notare nella tabella 9, i valori di deidrogenasi mostrano i valori più alti proprio nella zona rizosferica (P1, P2, P3 e P4 rizosfera).



Analisi chimiche dei substrati vegetali

Contenuto di umidità (%)

I risultati delle analisi dell'umidità (espressa in %) dei substrati vegetali campionati dopo 14 mesi dall'impianto delle talee di pioppo sono riportati in Tabella 10.

Il valore di umidità osservato nei campioni fogliari delle quattro piante indagate è simile. I campioni di radice prelevati dalle differenti piante rivelano valori di umidità differenti, in particolare i campioni radicali della pianta P2 presentano un valore nettamente più elevato (58,18) rispetto alle radici prelevate in corrispondenza delle restanti piante indagate (P1, P3 e P4).

Tabella 10: Valori di umidità (%) nei campioni di foglie e radici

| Campione | U (%) foglie | U (%) radici |
|----------|-----------------|-----------------|
| P1 | 34,25 | 22,56 |
| P2 | 29,04 | 58,18 |
| P3 | 36,03 | 17,2 |
| P4 | 37,64 | 11,45 |



Analisi degli inquinanti nei substrati vegetali

Contaminanti organici (PCB)

I risultati delle determinazioni analitiche delle concentrazioni dei congeneri di PCB nei campioni dei substrati vegetali, condotte in laboratorio mediante strumentazione GC/MS, sono riportati in Tabella 11. In particolare in tabella sono riportati solo i congeneri che sono stati rilevati.

Tab.11: Concentrazioni di PCB espresse in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) nei campioni di foglie e radici della pianta P1

| Campione | PCB | PCB | PCB | PCB | PCB | PCB | PCB | PCB | PCB |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| | 28 | 52 | 101 | 118 | 153 | 105 | 138 | 180 | TOT |
| Foglie | 2,445 | 1,665 | 1,785 | 3,58 | 6,585 | 3,96 | 5,575 | 6,585 | 32,14 |
| Radici | <0,5 | 3,09 | 3,755 | 10,76 | 11,98 | <1 | 10,24 | 9,175 | 49 |

La sommatoria delle concentrazioni dei singoli congeneri che sono stati rilevati non evidenzia il superamento del limite normativo (60 ppb) sia nelle foglie (32,14 ppb) che nelle radici (49 ppb).

I congeneri maggiormente presenti sono quelli caratterizzati da un numero più alto di atomi di cloro (118, 138, 153, 180). Tali congeneri sono infatti rispettivamente: 118 penta, 138, 153 esa e 180 epta-clorurati.

I risultati ottenuti dalle analisi del contenuto di PCB nelle foglie e radici indicano che il massimo trasferimento del contaminante nella parte aerea della pianta avviene in quantità trascurabili. Comunque, per una valutazione della possibile trasformazione energetica della biomassa prodotta sono necessari studi ad hoc per testare la tecnologia di trasformazione della biomassa (combustione, pirolisi, gassificazione, biodigestione) che sia più vantaggiosa economicamente e che soprattutto produca meno impatto sull'ambiente.



Contaminanti inorganici (metalli pesanti)

Le analisi all'ICP-MS per i soli metalli rilevati nei campioni di radici e foglie (espressi in mg/kg) prelevate da ciascuna pianta target sono riportati in Tabella 12 e 13.

In particolare tali analisi hanno rivelato concentrazioni significative per alcuni metalli (Zn, Se, in Tabella 14 e Cd e Sn in Tabella 15). In esse in rosso sono evidenziati i superamenti dei limiti normativi.

Tabella 12: Concentrazioni (esprese in ppm) dei metalli Zinco (Zn) e Selenio (Se).

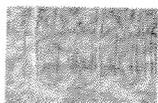
C: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 0-20 cm; D: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 20-40 cm; Terreno Riz: terreno adeso e circostante le radici. Radici: risultato delle analisi radici.

| Campione | Zn (D.Lgs 152/06 art. 100.0) | | | | | Se (D.Lgs 152/06 art. 100.0) | | | | |
|----------|---------------------------------|-----------|-------------|--------|--------|---------------------------------|-----------|-------------|--------|--------|
| | Terreno C | Terreno D | Terreno Riz | Radici | Foglie | Terreno C | Terreno D | Terreno Riz | Radici | Foglie |
| P1 | 83,1 | 100,5 | 67,3 | 95,83 | 140,08 | 2,1 | 2,3 | 2,7 | 2,16 | 5,1 |
| P2 | 101,7 | 130,5 | 135,5 | 238,07 | 277,08 | 0,81 | 2,2 | 3,0 | 4,80 | 2,462 |
| P3 | 110 | 276,7 | 182,0 | 85 | 127,08 | 8,8 | 5,4 | 10,3 | 5,48 | 1 |
| P4 | 109,16 | 260,9 | 192,10 | 209,61 | 248,24 | 7,6 | 7,6 | 10,7 | 7,92 | 6,79 |

Tabella 13: Concentrazioni (esprese in ppm) dei metalli Cadmio (Cd) e Stagno (Sn).

C: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 0-20 cm; D: terreno a 25 cm dal tronco, profondità 20-40 cm; Terreno Riz: terreno adeso e circostante le radici. Radici e Foglie: risultato delle analisi radici o foglie.

| campione | Cd (D.Lgs 152/06 art. 100 ppm) | | | | | Sn (D.Lgs 152/06 art. 100 ppm) | | | | |
|----------|-----------------------------------|-----------|-------------|--------|--------|-----------------------------------|-----------|-------------|--------|--------|
| | Terreno C | Terreno D | Terreno Riz | Radici | Foglie | Terreno C | Terreno D | Terreno Riz | Radici | Foglie |
| P1 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,26 | 0,36 | 2,8 | 2,1 | 2,4 | 0,54 | 1,1 |
| P2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,26 | 0,38 | 3,0 | 4,1 | 3,5 | 1,04 | 0,5 |
| P3 | 2,5 | 9,9 | 7,1 | 2,44 | 2 | 5,2 | 4,9 | 4,2 | 3,06 | 0,75 |
| P4 | 2,0 | 2,3 | 2,1 | 0,84 | 0,71 | 3,6 | 4,6 | 3,2 | 2,05 | 1,11 |



Fattore di Bioaccumulo (BAF) negli organi vegetali

La capacità di bioaccumulo dei metalli nei tessuti vegetali dei pioppi è stata valutata tramite il calcolo del fattore di bioaccumulo (BAF), definito come "concentrazione di metallo nella pianta (mg/Kg)/concentrazione di metallo nel substrato (mg/Kg)"; tale coefficiente è stato calcolato sia per le foglie che per le radici (Youn-Joo An, 2003).

Nelle figure 27-30 si riportano i grafici che mettono a confronto i fattori di bioaccumulo di foglie e radici delle piante indagate per i seguenti metalli: Zn, Se, Cd e Sn.

I dati riportati sono i rapporti tra la concentrazione di metallo nella pianta e la concentrazione di metallo nel substrato, considerando come substrato il terreno superficiale a 25 cm dal fusto (C), il terreno tra 20-40 cm di profondità e a 25cm dal fusto (D) e il terreno rizosferico (R).

Per lo Zn, troviamo fattori di bioaccumulo più elevati (>1) nelle piante P1 e P2, con valori maggiori nelle foglie. Il Se, come lo Zn, mostra fattori di bioaccumulo superiori ad 1 nelle piante P1 e P2 con un accumulo prevalente nelle foglie, per quanto riguarda la pianta P1, nelle radici per la P2 (Fig. 28).

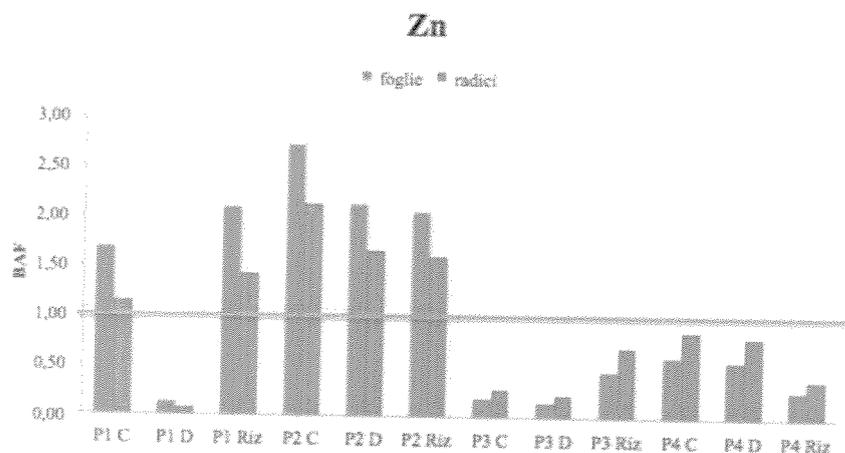


Figura 27: Fattori di bioaccumulo (BAF) di Zinco (Zn), calcolato nelle foglie e nelle radici delle piante P1, P2, P3 e P4. C: terreno superficiale a 25 cm dal fusto, D: terreno tra 20-40 cm di profondità e a 25 cm dal fusto; Riz: terreno rizosferico (R).



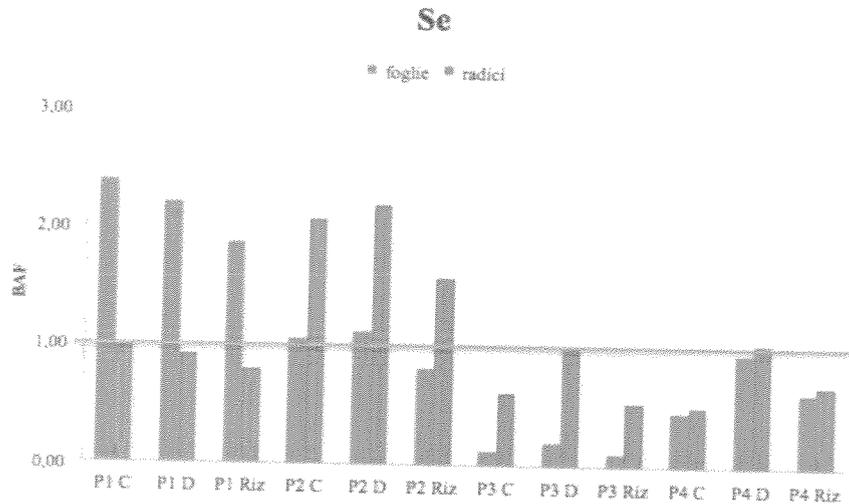


Figura 28: Fattori di bioaccumulo (BAF) di Se, calcolato nelle foglie e nelle radici delle piante P1, P2, P3 e P4. C: terreno superficiale a 25 cm dal fusto, D: terreno tra 20-40 cm di profondità e a 25 cm dal fusto; Riz: terreno rizosferico (R).

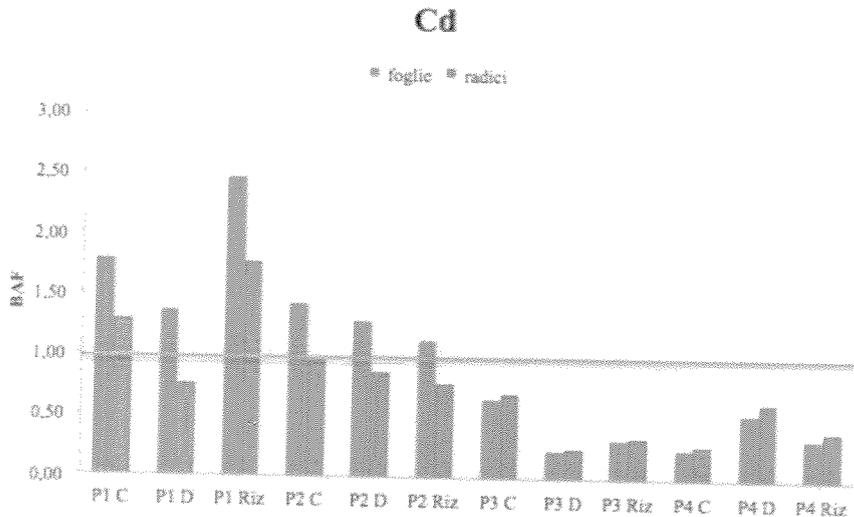


Figura 29: Fattori di bioaccumulo (BAF) di Cd, calcolato nelle foglie e nelle radici delle piante P1, P2, P3 e P4. C: terreno superficiale a 25 cm dal fusto, D: terreno tra 20-40 cm di profondità e a 25 cm dal fusto; Riz: terreno rizosferico (R).



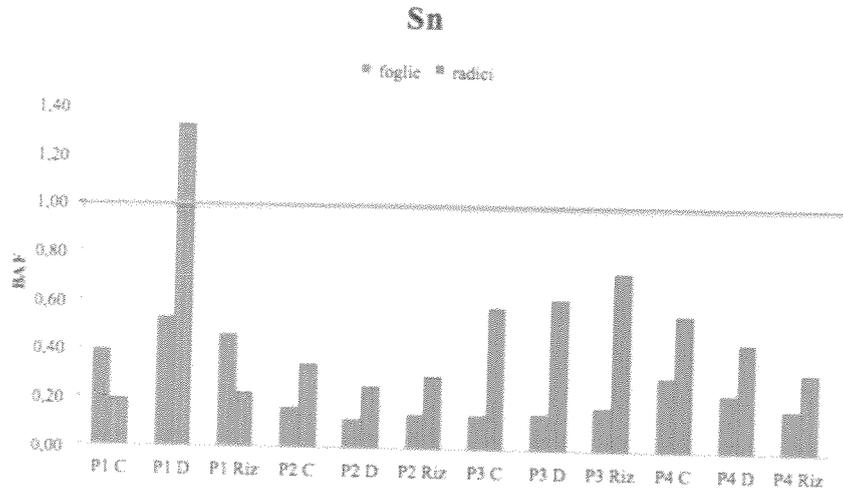


Figura 30: Fattori di bioaccumulo (BAF) di Sn, calcolato nelle foglie e nelle radici delle piante P1, P2, P3 e P4. C: terreno superficiale a 25 cm dal fusto, D: terreno tra 20-40 cm di profondità e a 25 cm dal fusto; Riz: terreno rizosferico (R).



Fattore di traslocazione (TF) negli organi vegetali

La capacità di traslocare i metalli verso le porzioni aeree, TF, è invece definita come "concentrazione di metallo nelle foglie (mg/Kg) / concentrazione di metallo nelle radici (mg/Kg)", (Rizzi *et al.*, 2004).

In linea generale una specie si può considerare traslocatrice quando ha $TF > 1$, mentre più basso è il fattore di traslocazione, più la specie può essere considerata una candidata per le tecniche di fito-stabilizzazione (Fitz and Wenzel, 2002; Rizzi *et al.*, 2004).

L'analisi dei dati mostrati in Tabella 14 evidenzia che la pianta P1 presenta $TF > 1$ per Zn, Pb, Se, Sn e Cd, la pianta P2 mostra $TF > 1$ per Zn, Pb, Cd, Cu e Ni mentre le piante P3 e P4 non rivelano per nessuno dei suddetti metalli fattori di traslocazione > 1 .

Tab.14: Fattori di traslocazione di metalli pesanti calcolati nei campioni di foglie delle quattro piante target

| Piante | TF | | | | | | |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Zn | Pb | Se | Sn | Cd | Cu | Ni |
| P1 | 1,16 | 2,00 | 2,36 | 2,07 | 1,40 | 0,50 | 0,70 |
| P2 | 1,28 | 2,49 | 0,50 | 0,48 | 1,47 | 1,58 | 1,17 |
| P3 | 0,66 | 0,04 | 0,18 | 0,41 | 0,94 | 0,46 | 0,96 |
| P4 | 0,70 | 0,78 | 0,90 | 0,69 | 0,85 | 0,63 | 0,60 |



Discussione e considerazioni generali

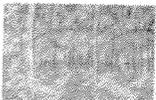
Il fitorimediazione bio-assistito può fornire una soluzione economica ed estetica, ma soprattutto in linea con la sostenibilità ambientale poiché utilizza la *green remediation*. La *green remediation* è un termine che riferisce ad una tecnica di bonifica che abbia un basso impatto sui cambiamenti climatici e sull'ambiente.

L'utilizzo di pioppo quale coltura arborea come tecnica di biorimediazione fitoassistito di siti contaminati da policlorobifenili (PCB) e da metalli pesanti è stato testato con successo in altre sperimentazioni scientifiche (Ma *et al.*, 2001; Madejon *et al.*, 2004; Massacci *et al.*, 2014; Bianconi *et al.*, 2011; Meggo *et al.*, 2013), ma questa è la prima sperimentazione che si sta svolgendo con il clone monviso in un'area del sud Italia.

I risultati ottenuti con la sperimentazione al CEM di Taranto hanno evidenziato che, a distanza di un anno dall'impianto delle talee di pioppo, clone Monviso, nell'area contaminata, è riscontrabile una riduzione della concentrazione totale dei PCB nei campioni di terreno analizzati; si passa da una concentrazione di PCB totali 308 ppb nei campioni di *topsoil* (0-20 cm di profondità) prelevati in caratterizzazione a 20 ppb nei campioni di *topsoil* rizosferico (prelevati intorno alle radici vicine al tronco del pioppo P1) in fase di monitoraggio, a circa 50 ppb a distanza di un metro dal tronco a profondità tra 20-40, laddove non si è osservato presenza di un apparato radicale sviluppato.

In definitiva, le concentrazioni riscontrate nei terreni sono tutte inferiori al limite soglia normativo di 60 ppb (D.Lgs. 152/06). In tal senso, la specie utilizzata nell'impianto sperimentale, in particolare il clone testato (*Monviso*) può aver promosso un processo di rizodegradazione, attraverso cui una serie di processi a carico delle comunità microbiche sono stati attivati per effetto della disponibilità di metaboliti/essudati radicali secreti dalle radici di tale specie vegetale. In precedenti studi sperimentali il clone Monviso ha, infatti, mostrato una capacità migliore rispetto ad altri cloni di pioppo di sostenere la proliferazione e l'attività dei ceppi batterici della rizosfera, favorendo conseguentemente una maggiore degradazione dei contaminanti organici presenti come nel caso del sito nella Valle del Sacco inquinato da esaclorocicloesano (Bianconi *et al.*, 2011; Massacci *et al.*, 2012).

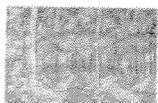
Nel corso della sperimentazione condotta nell'area del CEM di Taranto, le analisi della popolazioni microbiche del terreno e della rizosfera hanno evidenziato un notevole incremento dell'attività deidrogenasica che riflette un generale un miglioramento in qualità del terreno evidenziato anche



dall'aumento del contenuto carbonio organico (Barra Caracciolo *et al.*, 2013, 2014; Grenni *et al.*, 2014). Al contempo la presenza dei PCB riscontrata nei substrati vegetali, in particolare nelle radici supporta l'ipotesi che la produzione di essudati radicali possa favorire la mobilizzazione dei PCB verso le radici rendendoli più disponibili per la biodegradazione proprio nell'ambiente rizosferico, ma al tempo stesso la loro mobilizzazione ne favorirebbe anche il legame con la superficie delle radici e un accumulo negli organismi della rizosfera, non escludendo che in minima parte possano essere traslocati anche alle foglie.

L'azione delle piante nei confronti dei metalli pesanti può essere la fitoestrazione (traslocazione ed accumulo dei metalli nei fusti della pianta, che successivamente possono essere potati e rimossi dal sito) o la fitostabilizzazione, in cui le piante sono utilizzate per minimizzare la mobilità dei metalli nei suoli inquinati (Yoon *et al.*, 2006).

I fattori di bio-accumulo (BAF nelle foglie e/o nelle radici) e di traslocazione (TF) possono essere impiegati per stimare la capacità di una pianta di *accumulare* metalli dal terreno. Il BAF è il rapporto tra la concentrazione di metalli nella pianta (radici o foglie) e quella nel terreno ed il TF è la capacità di una pianta di *traslocare* metalli dalle radici ai germogli ed è definito come il rapporto tra la concentrazione di metallo nei germogli e quella nelle radici. Il processo di *fitoestrazione* generalmente richiede che si verifichi traslocazione dei metalli pesanti verso le foglie/germogli. Confrontando i fattori BAF e TF per una specie vegetale coltivata su di un terreno contaminato è possibile comparare l'abilità di tale specie nell'acquisire i metalli dal terreno e traslocarli nei germogli. In riferimento alla sperimentazione in oggetto, le piante P1 e P2 presentano per i metalli quali Zn e Cd valori di BAF nelle foglie superiori ad uno, al contempo, la P2 presenta BAF nelle radici superiore ad uno per il Se. I TF calcolati per alcuni metalli selezionati (Tab. 16) evidenziano la presenza di traslocazione ai germogli degli stessi metalli. I valori di TF >1 per Zn e Cu, sono in accordo con quanto osservato in letteratura scientifica (Baker and Brooks, 1989) secondo cui tali metalli sono nutrienti essenziali per le piante, una più elevata traslocazione dalle radici ai germogli è comprensibile. In merito al Pb, il pioppo mostra nel caso della P2 un processo di traslocazione di tale metallo nelle foglie (TF >1) evidenziando una capacità di fitoestrazione che raramente è stata riscontrata per il Pb; Kim *et al.*, (2003) sostengono che ridotte traslocazioni di Pb indicano che le piante impiegate nel fitorimediazione non sono adatte al trasferimento di Pb dalle loro radici ai germogli a causa della tossicità di tale metallo. Il Pb, infatti, può essere tossico per l'attività fotosintetica, la sintesi clorofilliana e gli enzimi antiossidanti.



Sebbene non siano state evidenziate, attraverso la presente sperimentazione, piante di pioppo iperaccumulatrici, ovvero piante che accumulano >1000 mg/kg di Cu, Co, Cr, Ni o Pb, oppure $>10,000$ mg/kg di Mn or Zn (Baker and Brooks, 1989), alcune delle piante saggiate risultano essere tolleranti ai metalli pesanti (Zn, Se, Cd, Sn) con elevati BAF nelle radici e bassi TF pertanto possono essere utilizzate per la fitostabilizzazione del sito attraverso cui ridurre la migrazione di contaminanti nel terreno (Susarla *et al.*, 2002). Questo processo utilizza la capacità delle radici delle piante di modificare le condizioni ambientali tramite gli essudati radicali. Le piante possono immobilizzare metalli pesanti attraverso l'assorbimento e l'accumulo nelle radici, l'adsorbimento sulle radici o la precipitazione all'interno della rizosfera. Questo processo riduce la mobilità del metallo e la relativa lisciviazione nelle falde acquifere e riduce anche la biodisponibilità di metallo per l'ingresso nella catena alimentare. L'utilizzo di specie vegetali metallo-tolleranti, quale il pioppo indagato (clone *Monviso*) per la stabilizzazione di contaminanti nel terreno, in particolare i metalli, consentirebbe anche di creare le condizioni migliori per l'attenuazione naturale o la stabilizzazione dei contaminanti nel terreno. Ulteriori successivi approfondimenti sono necessari al fine di comprendere il turnover dei nutrienti radicali ed il potenziale rilascio dei metalli per effetto della decomposizione delle radici come anche gli effetti imputabili alle interazioni pianta-batteri o piante-micorrize che possono interessare l'*uptake* dei metalli e la loro traslocazione.

Il clone *monviso* è stato utilizzato in questa attività sperimentale al fine di favorire la degradazione dei PCB diffusamente presenti ad opera dei microrganismi naturalmente presenti nel terreno (fotodegradazione bioassistita), il fatto che comunque la concentrazione dei metalli presenti sia generalmente diminuita ci conferma la grande versatilità di questa pianta che risulta resistente a molti tossici e che può anche favorire la riduzione ed il contenimento dei metalli presenti nei terreni caratterizzati da contaminazione multipla senza mostrare sintomatologie indicative di sofferenza.



Considerazioni conclusive e prospettive future

L'impianto dei pioppi è stato progettato e realizzato per promuovere la biodegradazione dei PCB ed il contenimento, attraverso l'esteso apparato radicale dei pioppi sviluppatosi, della contaminazione diffusa presente nell'area di studio. Ad 1 anno dall'impianto i risultati delle analisi chimiche dei campioni di terreno analizzati, sia dei contaminanti organici che dei metalli, ci confermano l'efficacia di tale trattamento.

Visto l'elevata persistenza intrinseca dei PCB (definiti notoriamente dalla Convenzione di Stoccolma POP, cioè composti organici persistenti), la presenza di una contaminazione multipla ed il fatto che l'area di studio è costituita da terreno di riporto, è necessario che l'intervento di recupero ambientale prosegua. L'azione sinergica delle piante e dei microrganismi naturalmente presenti nel terreno ha innescato in soli 14 mesi un processo di biorecupero dalla contaminazione e un generale miglioramento qualitativo delle porzioni dell'area di studio in cui sono cresciuti i pioppi. Una valutazione a scadenza annuale della presenza dei contaminanti, dell'attività microbica e della produzione di biomassa vegetale è auspicabile per almeno i prossimi 3-4 anni.

L'area sperimentale oggetto di studio costituisce "un laboratorio a cielo aperto" unico nel suo genere poiché permette di seguire nel tempo la degradazione e trasformazione dei contaminanti persistenti presenti (biodegradazione fitoassistita) e verificare l'azione di fitoestrazione e fitocontenimento delle piante di pioppo. Inoltre, attraverso ulteriori analisi microbiche si potrebbero isolare ed identificare le popolazioni microbiche che sono direttamente coinvolte nei processi di biorimediazione. Tali popolazioni una volta isolate e conosciute le loro caratteristiche e dinamiche di crescita potrebbero essere aiutate (*biostimulation*) a lavorare più efficientemente nel recupero del terreno contaminato.

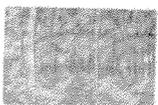


Riferimenti bibliografici

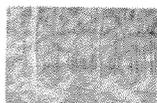
- Barra Caracciolo A., Grenni P., 2002. Misure in Fluorescenza della carica batterica nel suolo. *Acqua e Aria* 6: 76-79.
- Barra Caracciolo A., Bottoni P., Grenni P., 2013. Microcosm studies to evaluate microbial potential to degrade pollutants in soil and water ecosystems. *Microchem. J.* 107:126–130.
- Barra Caracciolo A., Di Lenola M., Garbini G.L., Grenni P., Ancona V., 2014. Effetti sinergici dei microrganismi e della specie foraggera *Medicago sativa* sulla degradazione dei PCB in un terreno contaminato. *Micron* Luglio 2014, 113-123.
- Barillot, C. D., C.-O. Sarde, V. Bert, E. Tarnaud and N. Cochet, 2013. "A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system." *Annals of Microbiology* 63(2): 471-476.
- Bianconi D., De Paolis M.R., Agnello A.C., Lippi D., Pietrini F., Zacchini M., Polcaro C., Donati E., Paris P., Spina S. and Massacci A., 2011. Field – Scale Rhizoremediation of a Contaminated Soil with Hexachlorocyclohexane (HCH) Isomers: The Potential of Poplars for Environmental Restoration and Economical Sustainability. *In: Ivan A. Golubev (ed) Handbook of Phytoremediation*, Chapter 31, Ed. 2011, Nova Science Publishers, Inc., ISBN: 978-1-61728-753-4.
- Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R, 1999. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods.* 37 (1): 77-86.
- Denti A.B., Cocucci S.M., Sartori F., 1998. "Monitoraggio delle foreste sotto stress ambientale. Fondazione Lombardia per l'Ambiente". Milano
- D.M. 13/09/1999. "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo". Ministro per le Politiche Agricole. Gazz. Uff. Suppl. Ordin. n° 248 del 21/10/1999.
- Dougherty J.M., Lanza G.R., 1989. Anaerobic subsurface soil microcosms: Methods to monitor effects of organic pollutants on indigenous microbial activity. *Toxicity Assessment* 4 (1): 85–104.



- Fitz W.J., Wenzel W.W., 2002. Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*, 99, 259-278.
- Grenni P., Barra Caracciolo A, Rodríguez-Cruz MS, Sánchez-Martin MJ, 2009. Changes in the microbial activity in a soil amended with oak and pine residues and treated with linuron herbicide. *Appl Soil Ecol* 41:2-7.
- Grenni P, Rodriguez-Cruz MS, Herrero-Hernandez E, Marin-Benito JM, Sanchez-Martin MJ, Barra Caracciolo A, 2012. Effects of wood amendments on the degradation of teruthylazine and on soil microbial community activity in a clay loam soil. *Water Soil & Air Pollution*. 223: 5401-5412.
- Grenni P., Barra caracciolo A., Massacci A., 2014. Biorimedia fitoassistito come strategia innovativa per il recupero di suoli contaminati da PCB, *Micron* Luglio 2014, 9-19.
- Kim IS, Kang HK, Johnson-Green P, Lee EJ., 2003. Investigation of heavy metal accumulation in *Polygonum thunbergii* for phytoextraction. *Environ Pollut* 126:235–243.
- Kumar S., Chaudhuri S., Maiti S. K., 2013. Soil Dehydrogenase Enzyme Activity in Natural and Mine Soil - A Review. *Middle East Journal of Scientific Research* 13 (7): 898-906.
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W., 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409:579.
- Madejon, P., J.M. Murillo, T. Maranon, F. Cabrera and R. Lopez. 2002. Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcollar mine spill (SW Spain). *The Science of the Total Environment*, 290: 105-120.
- Mascolo G., Bagnuolo G., De Tommaso B., Uricchio V.F., 2013. Direct analysis of polychlorinated biphenyls in heavily contaminated soils by thermal desorption/gas chromatography/mass spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 93 (9):1030–1042.
- Massacci A., Passatore L., 2011. Il rimedio dei suoli e acque contaminati con metalli pesanti, organici ed eccesso di nutrienti: processi biologici utili nella rizosfera. In: *Bonifica, Recupero Ambientale e Sviluppo Del Territorio*. Supplemento alla rivista *Micron* (n. 22 ott



- 2012), Atti Convegno Terni, 20-21 ottobre 2011: 31-43 www.arpa.umbria.it/articoli/bonifica-recupero-ambientale-e-sviluppo-del-territorio.
- Massacci A., Bianconi D., Paris P., 2012. Pioppicoltura a turno di taglio breve per bioenergia e fitorimediazione. *SILVAE* – Anno VII n.15/18, 125-144.
- Meggio R.E., Schnoor J.L., Hu D., 2013. Dechlorination of PCBs in the rhizosphere of switchgrass and poplar, *Environ. Pollut.* 178:312–321.
- Nannipieri P., Ceccanti B., Grego S., 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. In: *Soil biochemistry*. Ed Bollag JM, Stotzky G., Volume 6. Casa editrice Martin Dekker, New York: 293-366.
- Passatore L., Rossetti S., Juwarkard A. A., Massacci A., 2014. Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research perspectives. *J of Haz Mater* 278:189-202.
- Rizzi L., Petruzzelli G., Poggio G., Vigna Guidi G., 2004. Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere* 57:1039-1046.
- Youn-Joo An., 2003. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environmental pollution* 127:21-26.
- Visoottiviseth P., Francesconi K., Sridokchan W., 2002. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. *Environmental Pollution* 118:453-461.
- Wolinska A., Stepniewska Z., 2012. Dehydrogenase activity in the soil environment. In: Canuto R.A. (ed.): *Dehydrogenases*. Intech, Rijeka. Available at <http://www.ebook3000.com/>



Ringraziamenti

Il gruppo di lavoro del CNR-IRSA e del CNR-IBAF desidera ringraziare Don Nicola Prezioso e l'associazione CEM di Taranto per il notevole supporto tecnico generosamente e accuratamente fornito durante le operazioni di pianificazione e realizzazione delle attività progettuali sul sito sperimentale. Si ringrazia, inoltre, il Dott. Michele Arcangelo D'Alessandro per avere coordinato in modo speditivo e puntuale le operazioni di allestimento del sito (bonifica dei rifiuti presenti, lavorazioni del terreno, ammendamento con compost, impianti di irrigazione, ecc.) secondo le procedure condivise con il gruppo di ricerca.

Si ringrazia tutto lo staff scientifico del CNR-IRSA che ha contribuito alla realizzazione degli impianti colturali nel periodo di attività progettuale (Dott. Angelo Calabrese, Dott. Guido Del Moro, Dott. Andrea Decembrino) ed ha garantito la supervisione scientifica delle determinazioni analitiche degli inquinanti indagati (Dott. Giuseppe Mascolo ed Assistente tecnico Sig. Giuseppe Bagnuolo). Si ringrazia inoltre, il dott. Daniele Bianconi dell'IBAF per i preziosi consigli in fase di progettazione dell'impianto di fitorimediazione.

Si ringrazia ALASIA FRANCO VIVAI di Savigliano (CN) per avere fornito le talee di clone monviso.

Si intende ringraziare l'Ing. Lorenzo Ferrara presidente del DIPAR (*Distretto Produttivo Regionale dell'Ambiente e del Riutilizzo*) per l'estrema collaborazione nel garantire la fornitura idrica necessaria ad effettuare l'irrigazione ai pioppi, particolarmente cospicua nei mesi estivi.





Appendice



Metodi applicati

Analisi chimiche del terreno

Contenuto di umidità (%)

Per valutare il contenuto di umidità dei suoli, sono stati utilizzati 10 g di terreno. Dopo aver pesato il campione fresco, questo è stato seccato in stufa a 60°C per 3 giorni e immediatamente ripesato a intervalli di 3 ore fino a che il peso risultasse costante. La percentuale di umidità sul peso umido è stata calcolata come segue, ove M_w e M_d sono rispettivamente peso secco e peso umido:

$$h(\%) = \frac{(M_w - M_d)}{M_w} * 100$$

Grado di reazione del terreno

Per l'analisi del pH e del C organico le metodiche utilizzate sono quelle riportate nei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo" D.M. 13/09/1999. Nello specifico il pH del terreno è stato determinato per via potenziometrica seguendo il Metodo III.1 del D.M. utilizzando sospensioni di terreno-acqua e terreno-soluzione di sali neutri (KCl).

Contenuto del carbonio organico

Per la determinazione del Carbonio organico è stato utilizzato il Metodo VII.3 (Metodo Walkley Black) che prevede l'ossidazione del carbonio organico ad anidride carbonica, in condizioni standardizzate, con soluzione di potassio bicromato in presenza di acido solforico e successiva titolazione del bicromato in eccesso con soluzione di ferro (II) solfato eptaidrato.



Analisi chimiche degli inquinanti del terreno

Analisi dei contaminati organici del terreno (PCB)

L'analisi dei PCB è stata effettuata solamente sui campioni di terreno raccolti in corrispondenza della pianta I, (ex campione CAR_12 di caratterizzazione), che presentavano, durante la fase di caratterizzazione, (prima dell'impianto dei pioppi) valori di PCB superiori ai limite di legge imposti dalla normativa (D.lgs 152/99). Ciascun campione di terreno è stato sottoposto ad estrazione preliminare per la determinazione analitica di una selezione di congeneri di PCB (28-52-101-77-81-123-118-114-153-105-138-126-167-156-157-180-169-189).

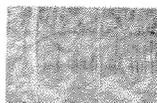
In particolare sono stati analizzati i tutti i congeneri indicatori (28-52-101-153-138-180) e tutti i diossina-simili (77-81-126-169-105-114-118-123-156-157-167-189).

I campioni di terreno sono stati estratti e purificati con ASE (*Accelerated Solvent Extraction*), secondo la metodica descritta nella nota tecnica della Thermo Scientific n. 210. La cella è stata impaccata dal basso verso l'alto con 2 filtri di cellulosa, 5g di silice attivata, 10g di silice acida, 1 filtro di cellulosa, uno strato di 3 g di terreno+ 3g di hydromatrix+ 15g di NaSO₄ miscelati insieme; lo spazio restante è stato riempito con Hydromatrix. Il gel di silice utilizzato per la purificazione dell'estratto è stato attivato per una notte in stufa alla temperatura di 200 °C, così trattata 600g di gel di silice sono stati mescolati per 4 ore con 400g di acido solforico concentrato.

L'estrazione è avvenuta con esano, secondo le condizioni descritte nella tabella seguente.

Tab. 1: ASE settings

| Accelerated Solvent Extraction - Conditions | |
|---|----------|
| Extraction Solvent: | n-Hexane |
| Pressure: | 1500 psi |
| Temperature: | 100°C |
| Static Time: | 5 min |
| Static Cycles: | 2 |
| Flush: | 6 0% |
| Purge: | 90s |
| Cell Size: | 66 mL |



L'eluato ottenuto è stato ridotto a 1 ml con evaporatore Turbo Vap Evaporation System.

La quantificazione di tutti i PCB considerati è stata effettuata mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) con apparecchiatura Thermo Scientific Finnigan TRACE GC ultra secondo la metodica analitica pubblicata dall'IRSA-CNR (Mascolo et al., 2013).

Analisi dei contaminati inorganici del terreno (metalli pesanti)

L'analisi dei metalli (Be, Al, V, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Tl, Pb) è stata effettuata sui campioni di terreno compositi, raccolti in corrispondenza delle piante 1, 2, 3 e 4 (ex campioni CAR_12, CAR_13, CAR_14, CAR_15 di caratterizzazione).

Per l'estrazione del contenuto degli elementi minerali del terreno è stata utilizzata una mineralizzazione con acqua regia (HCl:HNO₃ 3:1) come indicato nel metodo ISO 11466 (1995) con le modifiche di seguito specificate.

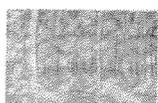
Circa 0.5g di campione sono stati pesati direttamente all'interno del vessel in PTFE utilizzato per la successiva digestione e lentamente aggiunti 9 ml di HCl e 3 ml di HNO₃ suprapuri.

Per ogni serie analitica, parallelamente ai campioni, è stato allestito anche un “bianco” campione.

I campioni sono stati mineralizzati utilizzando un mineralizzatore a microonde provvisto di un carosello con 10 tubi da 100 ml in PTFE (*ethos touch control advanced microwave labstation*). Nella tabella seguente sono specificate le sequenze delle potenze, dei tempi, e delle temperature di mineralizzazione adottate.

Tab. 2: Programma di mineralizzazione

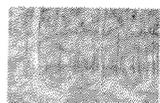
| Primo ciclo | Secondo ciclo | Raffreddamento |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| Rampa: 10 minuti | Rampa: 15 minuti | Rampa: 10 minuti |
| Potenza: 1000 watt | Potenza: 1000 watt | Potenza: 100 watt |
| Temperatura: 200°C | Temperatura: 200°C | Temperatura: 80°C |





Dopo raffreddamento, i campioni mineralizzati sono stati trasferiti in *vials*, portati ad un volume di 50 ml con acqua MilliQ e diluiti 25 volte prima dell'analisi ICP-MS in modo da avere un contenuto max del 5% di acidi e un contenuto max di solidi disciolti pari allo 0,2% come previsto dalle specifiche strumentali.

La quantificazione di tutti gli elementi minerali considerati è stata effettuata mediante spettrometria di massa con sorgente al plasma accoppiata induttivamente (ICP-MS) con apparecchiatura Agilent 7700X (Agilent Technologies, Giappone).



Analisi microbiologiche del terreno

Stima dell'Abbondanza microbica totale: conta diretta in epifluorescenza

La determinazione della concentrazione microbica viene effettuata attraverso la conta diretta in epifluorescenza. Tale metodo si basa sulla conta al microscopio ottico delle cellule microbiche dopo colorazione con un marcatore fluorescente specifico per il DNA: il DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). La specificità di tale marcatore permette di distinguere chiaramente nella lettura al microscopio le cellule microbiche, che appaiono di una colorazione luminescente azzurra, dalle particelle non viventi di eguale dimensione, che emettono una luminescenza gialla. Campioni di terreno ($\times 3$ repliche) vengono trattati in una soluzione fissativa contenente PBS, formalina e il tensioattivo Tween 20 (concentrazioni finali: 2% e 0.5%, rispettivamente). Le provette contenenti 1 g di campione fissato in 9 ml di soluzione fissativa vengono agitate su un agitatore orizzontale a 400 rpm per 15' e poi lasciate sedimentare per 24 ore. Da ogni campione viene prelevata un'aliquota di surnatante chiarificato (100 μ l) che viene trattato con il marcatore fluorescente DAPI (al buio e per circa 30 minuti). Successivamente la soluzione viene filtrata mediante torretta di filtrazione su di una membrana nera in policarbonato (0,2 μ m di porosità, 25 mm diametro) e montata su di un vetrino con olio ad immersione per la lettura al microscopio ad epifluorescenza (Barra Caracciolo e Grenni, 2002). Al microscopio vengono letti 10-20 campi per ottenere una lettura di almeno 300-500 cellule. Il numero di cellule microbiche per grammo di sedimento si ottiene applicando la seguente formula:

$$N^{\circ} \text{ cell/g} = \frac{X_m}{A_c} \cdot \frac{A_b}{V_e \cdot g}$$

Dove:

X_m = numero medio cellule microbiche nei campi ottici letti; A_c = area campo quadrettato visualizzabile al microscopio (mm^2); A_b = area della torretta di filtrazione (mm^2); V_e = volume di surnatante chiarificato (ml) utilizzato per preparare il vetrino effettivo, cioè considerando anche la diluizione del campione; g = peso campione in g (peso secco)

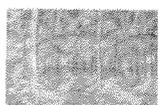


Vitalità cellulare microbica: metodo Live/Dead

Il metodo di colorazione *Live/Dead* permette di distinguere le cellule vive da quelle morte grazie alla capacità di molecole fluorescenti di diversa grandezza di entrare selettivamente nelle cellule a seconda della loro integrità di membrana (Boulos *et al.*, 1999; Grenni *et al.*, 2012). Per l'applicazione di questo metodo di colorazione, si utilizzano due coloranti nucleici fluorescenti: il fluorocromo verde SYBR Green II, specifico per le cellule vitali in quanto è costituito da una piccola molecola che può penetrare attraverso le membrane cellulari integre e lo ioduro di propidio (di colore rosso), molecola più grande che penetra solo nelle cellule con membrana danneggiata, ritenute quindi cellule morte. Le cellule microbiche appariranno al microscopio ad epifluorescenza fluorescenti in verde (vivi) o rosso (morte), a seconda del loro stato di vitalità e della loro integrità di membrana. Sono stati prelevati da 100 μL a 300 μL (a seconda dell'abbondanza microbica) di surnatante chiarificato da ogni campione di terreno (1 g) in 9 mL di una soluzione non fissativa composta da: una soluzione salina fosfato-tamponata (PBS: 130 mM NaCl, 7 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 , pH 7), Tween 20, un tensioattivo allo 0,5% e 100 mM sodio pirofosfato (PPi). Le aliquote di campione (x 3 repliche) sono state messe in una Eppendorf sterili da 2 mL portando a volume di 2 mL con acqua sterile MilliQ, a cui sono stati aggiunti 1 μL di ioduro di propidio e 1 μL di SYBR Green II. Il campione è stato agitato e tenuto al buio per circa 15 minuti. Si è proceduto poi alla filtrazione su una membrana nera in policarbonato Nucleopore (0,2 μm di porosità, 25 mm diametro) e successivamente alla preparazione del vetrino seguendo le modalità già descritte per la misura dell'abbondanza microbica.

Attività microbica totale: Attività deidrogenasica

L'attività deidrogenasica (DHA) è una misura dell'attività microbica totale legata alla fertilità del suolo e al contenuto di sostanza organica ed è considerata un indicatore utile per testare gli effetti secondari di vari composti sui microrganismi del suolo. L'attività deidrogenasica è generalmente positivamente correlata con altri parametri del suolo, quali l'abbondanza microbica, l'attività di respirazione del suolo, la concentrazione di ATP e attività enzimatiche legate ai cicli del carbonio e dell'azoto (Nannipieri *et al.*, 1990; Dougherty e Lanza, 1986; Grenni *et al.*, 2009; Grenni *et al.*, 2012). Il metodo utilizzato per la determinazione delle deidrogenasi è di tipo colorimetrico, mediante l'uso di cloruro di 2,3,5-trifenil tetrazolio che, ridotto dalle deidrogenasi dei microrganismi del suolo, assume un colore rossastro che può essere analizzato allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 485 nm. Per ogni campione sono stati prelevati 6 g di terreno (x



2 repliche) messi poi in un tubo da centrifuga da 50 ml. Ad ogni campione vengono aggiunti 0,06 g di CaCO₃, 2,5 ml di acqua MilliQ e 1 ml di soluzione di TTC (cloruro di 2,3,5 trifeniltetrazolio) al 3% in acqua. La miscela viene agitata e i campioni vengono incubati a 37°C per 24 ore. Successivamente, l'estrazione del TPF formato viene effettuato con 3 estrazioni successive con etanolo (21 ml in totale) e l'estratto viene poi portato ad un volume finale di 25 ml con etanolo puro. Le assorbanze delle soluzioni provenienti dai diversi campioni vengono misurate mediante spettrofotometro a 485 nm di lunghezza d'onda, utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm. La lettura allo spettrofotometro dei campioni viene comparata ad una curva di taratura e convertite in µg TPF/ml secondo la seguente formula:

$$\mu\text{g TPF/ml} = (\text{Assorbanza} - \text{Intercetta})/\text{Coefficiente angolare}$$

I valori di DHA, espressi come µg TPF/g, per ciascun campione vengono quindi ottenuti secondo la seguente formula:

$$\mu\text{g TPF/g} = \mu\text{g TPF/ml} * 25 \text{ ml/g terreno}$$

in cui il valore 25 ml fa riferimento al volume dei palloncini tarati utilizzati



Analisi chimiche dei substrati vegetali

Contenuto di umidità (%)

Sui campioni compositi ottenuti dagli organi vegetali (radici e foglie) sono state condotte analisi per valutare il peso secco dei substrati vegetali. Nello specifico, per valutare il contenuto di umidità delle matrici vegetali, sono stati utilizzati 10 g circa di foglie e 1g circa di radici. Dopo aver pesato il campione fresco, questo è stato seccato in stufa a 60°C per 3 giorni e immediatamente ripeso a intervalli di 3 ore fino a che il peso risultasse stabile. La percentuale di umidità sul peso umido è stata calcolata come segue, ove M_w e M_d sono rispettivamente peso secco e peso umido:

$$h(\%) = \frac{(M_w - M_d)}{M_w} * 100$$

Analisi chimiche degli inquinanti nei substrati vegetali

Analisi dei contaminati organici (PCB)

L'analisi dei PCB è stata condotta sui campioni di foglie, radici e terreno rizosferico (terreno adeso e circostante le radici) prelevati dalla pianta1 (ex campione CAR_12 di caratterizzazione). In particolare sono stati analizzati gli stessi congeneri analizzati nel terreno (congeneri 28-52-101-77-81-123-118-114-153-105-138-126-167-156-157-180-169-189) quindi i tutti i congeneri indicatori (28-52-101-153-138-180) e tutti i diossina-simili (77-81-126-169-105-114-118-123-156-157-167-189).

Le modalità di estrazione e analisi dei campioni sono state le medesime di quelle condotte sui campioni di terreno.

Analisi dei contaminati inorganici (metalli pesanti)

L'analisi dei metalli (Be, V, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Tl, Pb) è stata effettuata sui campioni di foglie, radici e terreno rizosferico (terreno adeso e circostante le radici) prelevati dalle piante 1, 2, 3 e 4 (ex campioni CAR_12, CAR_13, CAR_14, CAR_15 di caratterizzazione). Le modalità di mineralizzazione e analisi dei campioni sono state le medesime di quelle condotte sui campioni di terreno.





Allegati



Allegato I: Scheda di campionamento P1

| CAMPIONAMENTO TERRENO | |
|--|--|
| Sigla identificazione | Campione N. PI_AI,2,3,4 (Ex campione CAR12) PI_BI,2,3,4 PI_CI,2,3,4 PI_DI,2,3,4 |
| Data raccolta campione | 24-06-2014 |
| Località | Cimino-Manganecchia (Taranto) |
| Ora legale | Inizio campionamento 09.40 |
| Temperatura aria | 35°C |
| Temperatura terreno 0-20cm | 26-27°C |
| Temperatura terreno 20-40cm | 25°C |
| Coordinate geografiche | UTM-Est 40° 28' 03.6" UTM-Nord 17° 18' 12.8" |
| Profondità terreno | Da 0 cm a 20 cm e da 20 a 40 cm |
| CAMPIONAMENTO PIOPPO (P1) | |
| A 145 cm il fusto si biforca in 2 rami più piccoli (A e B) di 65 cm di lunghezza ciascuno. | |
| Ramo A | Lunghezza: 77 cm N. Foglie: 18 (9 grandi e 9 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Ramo B | Lunghezza: 70 cm N. Foglie: 17 (8 grandi e 9 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Altezza campionamento foglie | Terzo superiore (da 140 cm in su) |
| Altezza pioppo | 2,10 m |
| Stato delle foglie | Presenza di un parassita allo stadio larvale sulle foglie del ramo A |



Allegato 2: Scheda di campionamento P2

| CAMPIONAMENTO TERRENO | |
|--|--|
| Sigla identificazione | Campione N. P2_AI,2,3,4 (Ex campione CARI3) P2_BI,2,3,4 P2_CI,2,3,4 P2_DI,2,3,4 |
| Data raccolta campione | 24-06-2014 |
| Località | Cimino-Manganecchia (Taranto) |
| Ora legale | Inizio campionamento 11.30 |
| Temperatura aria | 37°C |
| Temperatura terreno 0-20cm | 27°C |
| Temperatura terreno 20-40cm | 25°C |
| Coordinate geografiche | UTM-Est UTM-Nord |
| Profondità terreno | Da 0 cm a 20 cm e da 20 a 40 cm |
| CAMPIONAMENTO PIOPPO (P2) | |
| Il fusto si biforca in 3 rami più piccoli (A, B, C). | |
| Ramo A | Lunghezza: 100 cm N. Foglie: 25 (12 grandi, 6 medie, 7 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Ramo B | Lunghezza: 80 cm N. Foglie: 18 (10 grandi, 6 medie, 4 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Ramo C | Lunghezza: 60 cm N. Foglie: 16 (5 medie, 11 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Altezza campionamento foglie | Terzo superiore (da 170 cm in su) |
| Altezza pioppo | 2,55 m |



Allegato 3: Scheda di campionamento P3

| CAMPIONAMENTO TERRENO | |
|--|---|
| Sigla identificazione | Campione N. P3_AI,2,3,4 (Ex campione CAR14) P3_BI,2,3,4 P3_CI,2,3,4 P3_DI,2,3,4 |
| Data raccolta campione | 02-07-2014 |
| Località | Cimino-Manganeccchia (Taranto) |
| Ora legale | Inizio campionamento 09.40 |
| Temperatura aria | 29°C 09.40 31°C 10.45 |
| Temperatura terreno 0-20cm | 24°C |
| Temperatura terreno 20-40cm | 25°C |
| Coordinate geografiche | UTM-Est UTM-Nord |
| Profondità terreno | Da 0 cm a 20 cm e da 20 a 40 cm |
| CAMPIONAMENTO PIOPPO (P3) | |
| Il fusto si biforca in 3 rami più piccoli (A, B, C). | |
| Ramo A | Lunghezza: 115 cm N. Foglie: 23 (17 grandi, 6 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Ramo B | Lunghezza: 85 cm N. Foglie: 20 (5 grandi, 8 medie, 7 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Ramo C | Lunghezza: 93 cm N. Foglie: 17 (11 grandi, 5 medie, 1 piccola) Dm max foglia: 14-15cm |
| Altezza campionamento foglie | Terzo superiore (da 194 cm in su) |
| Altezza pioppo | 2,9 m Circonferenza fusto: 12 cm Dm fusto: 4 cm |



Allegato 4: Scheda di campionamento P4

| CAMPIONAMENTO TERRENO | |
|--|--|
| Sigla identificazione | Campione N. P4_AI,2,3,4 (Ex campione CAR15) P4_BI,2,3,4 P4_CI,2,3,4 P4_DI,2,3,4 |
| Data raccolta campione | 02-07-2014 |
| Località | Cimino-Manganecchia (Taranto) |
| Ora legale | Inizio campionamento 12.00 |
| Temperatura aria | 37°C (12.25) |
| Temperatura terreno 0-20cm | 27°C |
| Temperatura terreno 20-40cm | 25°C |
| Coordinate geografiche | UTM-Est UTM-Nord |
| Profondità terreno | Da 0 cm a 20 cm e da 20 a 40 cm |
| CAMPIONAMENTO PIOPPO (P4) | |
| Il fusto si biforca in 3 rami più piccoli (A, B, C). | |
| Ramo A | Lunghezza: 112 cm N. Foglie: 28 (17 grandi, 6 medie, 4 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Ramo B | Lunghezza: 100 cm N. Foglie: 24 (16 grandi, 5 medie, 3 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Ramo C | Lunghezza: 75 cm N. Foglie: 19 (8 grandi, 5 medie, 6 piccole) Dm max foglia: 14-15cm |
| Altezza campionamento foglie | Terzo superiore (da 207 cm in su) |
| Altezza pioppo | 3,1 m Circonferenza fusto: 12 cm Dm fusto: 4 cm |

