



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

Facoltà di Agraria

DOTTORATO DI RICERCA IN AGRONOMIA AMBIENTALE

CICLO XIX

**ATTITUDINE DI SPECIE DIVERSE ALLA FITOESTRAZIONE  
DI METALLI PESANTI: MODIFICAZIONI A CARICO  
DELL'APPARATO RADICALE**

**Coordinatore: Ch.mo Prof. Umberto Ziliotto**

**Supervisore: Prof. Teofilo Vamerali**

**Dottorando : Dott. Lucia Coletto**

31 dicembre 2006

## RIASSUNTO

L'attività della presente tesi di dottorato di ricerca si inserisce nell'ambito di un Progetto di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) svolto in collaborazione tra le Università di Padova, Udine, Firenze, Milano e Pisa, che si prefigge come obiettivo la valutazione dell'attitudine alla fitoestrazione di metalli pesanti di diverse specie vegetali, anche attraverso lo studio della morfologia radicale. Le informazioni ottenute sono servite all'allestimento del primo impianto pilota in Italia per la fitoestrazione di metalli pesanti all'interno di un sito di interesse nazionale denominato "Laguna di Grado e Marano e corsi d'acqua limitrofi" (D.M. 468/2001), ricadente in terreni di proprietà della Caffaro s.p.a. (Torviscosa, Udine).

L'attività ha riguardato lo studio, dapprima in ambiente confinato e successivamente *in situ*, delle capacità di adattamento e fitoestrattiva di specie di interesse agrario, sia erbacee (girasole, rafano, erba medica, loiessa e orzo) che arboree (pioppo bianco, pioppo nero, pioppo tremulo e salice bianco). Le piante sono state coltivate in un substrato anomalo, costituito in prevalenza da scarti di lavorazione industriale (ceneri di pirite) inquinati da diversi metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn), al quale era stato sovrapposto uno strato di terreno di riporto (0,2-0,3 m) misto a ghiaia. Sono state valutate le modificazioni a carico della morfologia dell'apparato radicale utilizzando metodi non distruttivi in raffronto a metodi distruttivi classici. A tale riguardo sono stati valutati due metodi non distruttivi, tracce radicali su rizobox a parete trasparente e misura della capacità elettrica, utili per monitorare la risposta dell'apparato radicale a specifiche condizioni sperimentali o a trattamenti correttivi al suolo.

In tutte le specie saggiate, sia in vaso che *in situ*, come era lecito attendersi sono state osservate significative modificazioni dei parametri morfologici degli apparati radicali, con una generale contrazione della densità di lunghezza e

dell'approfondimento massimo. In riferimento alla metodologia di studio, la misura della capacità elettrica ha fornito risultati interessanti per il monitoraggio in continuo dell'accrescimento radicale.

Analogamente a quanto osservato nella sperimentazione in vaso, con un maggiore accrescimento e rimozione complessiva di metalli pesanti in presenza di un orizzonte di ricoprimento non inquinato, *in situ* è stata ottenuta una maggiore efficienza fitoestrattiva applicando una ripuntatura (mantenimento della stratigrafia) rispetto all'aratura (rimescolamento degli orizzonti) anche se questo tipo di lavorazione ha condotto tendenzialmente ad una minore concentrazione degli inquinanti nelle biomasse.

Tutte le specie saggiate rimangono lontane dalle soglie dell'iperaccumulo indicate in letteratura per i metalli riscontrati nel sito contaminato. *Raphanus sativus* è stata la specie erbacea che ha presentato il migliore adattamento alle specifiche condizioni sperimentali sia in termini di accrescimento epigeo che radicale, condizione quest'ultima necessaria all'ottenimento di elevate concentrazioni di metalli e buoni livelli di asportazione, come indicano le positive correlazioni con la densità di lunghezza radicale. Per le specie arboree i risultati di mesocosmo sono stati parzialmente disattesi *in situ*, indicando che l'elevata efficacia rilevata preliminarmente in *Salix alba*, specie spontanea molto diffusa nel sito inquinato, *in situ* è in subordine a quella di *Populus alba*.

Lo studio dell'apparato radicale è sicuramente utile alla comprensione dei meccanismi di adattamento delle specie vegetali da utilizzare nei programmi di bonifica ambientale ed è premessa indispensabile per l'individuazione di quei trattamenti che stimolano l'accrescimento di questa struttura per migliorare l'efficienza fitoestrattiva.

## ABSTRACT

This thesis deals with phytoextraction, a particular process for reclamation of polluted soils, which uses plants and their interaction with soil and microorganisms to clean up soils from heavy metals.

This work is focused on the set up of the first Italian *in-situ* phytoextraction system. The polluted site involved in this study is located in Torviscosa (Udine, Italy), within a site of National Interest called "Lagoon of Grado and Marano and close rivers". It is characterized by a deep horizon made of pyrite cinders (residuated by the extraction of sulphur) markedly polluted by various heavy metals (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn), which was covered by a top layer rich in skeleton.

Five herbaceous crops have been tested (*Helianthus annuus*, *Medicago sativa*, *Raphanus sativus*, *Hordeum vulgare* and *Lolium multiflorum*) together with four woody species (*Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus tremula*, *Salix alba*). Some preliminary pot and mesocosm experiments have been carried out to obtain information useful for setting up the pilot system. In particular, overlapping a thin layer of un-polluted soil to that polluted was observed to increase biomass production and removal of heavy metals.

Biomass production and concentration in heavy metals were measured from samples collected *in situ* from ploughing (soil mixing) and subsoiling treatments (stratigraphy maintenance), the latter attempting to mimic as far as possible the overlap of a top un-polluted layer. Root growth was also detected as an important key factor for adaptability to a particular waste material, and different methods of investigation compared (conservative and non-conservative methods).

In general, all the species showed marked changes in root morphology, with a great reduction of both root density and maximum depth. At this regard, the

electrical capacitance method revealed to be suitable to follow root dynamics in time.

All the species, both herbaceous and woody ones, had concentration of various heavy metals much lower than threshold values for hyper-accumulation, although compensation in terms of removal can be expected by greater biomass production. In particular, subsoiling led to lower concentration of heavy metals but greater biomass than ploughing and, for some species, greater removal.

From this study, *R. sativus* was the most suitable herbaceous species (greatest shoot biomass and total removal of various heavy metals). Among woody species, *P. alba* showed higher shoot biomass and removal, whereas *P. tremula* had the lowest biomass associated with higher concentrations of various heavy metals.

Both root growth and extension resulted to be fundamental parameters affecting phytoextraction efficiency, as higher root length density were generally associated with higher concentration of pollutants in the shoot biomass.

The major limit to obtain high phytoextraction efficiency was an insufficient root growth and deepening, the latter being 25-30 cm as maximum in the polluted soil. This suggests the need to find out adequate solutions to enhance root development through different ways, which deserve to be further studied.

1.	INTRODUZIONE .....	10
1.1	L'AGRICOLTURA E IL TERRITORIO.....	11
1.2	LA PROBLEMATICHE DELL'INQUINAMENTO.....	13
1.2.1	L'inquinamento del suolo.....	13
1.2.2	Inquinamento da metalli pesanti.....	16
1.2.3	Il ferro .....	19
1.3	I METALLI PESANTI E LE PIANTE .....	20
1.3.1	Fitodisponibilità dei metalli: caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo.....	20
1.3.2	Le piante in terreni inquinati: strategie di adattamento .....	22
1.3.3	Piante iperaccumulatrici .....	23
1.3.4	Piante da biomassa .....	26
1.4	LE TECNOLOGIE DI BONIFICA.....	28
1.4.1	Bonifica di suoli contaminati da metalli pesanti .....	30
1.5	LA FITOESTRAZIONE .....	33
1.5.1	Destino delle biomasse .....	35
1.5.2	Il ruolo degli apparati radicali nella fitoestrazione.....	35
1.6	METODI DI STUDIO DELL'APPARATO RADICALE.....	37
1.6.1	Metodi distruttivi .....	37
1.6.2	Metodi conservativi .....	40
1.6.3	Metodi indiretti.....	42
2.	SCOPO ED OBIETTIVI DEL LAVORO.....	46
3.	MATERIALI E METODI .....	48
3.1	CARATTERIZZAZIONE DEL SITO .....	49
3.1.1	Rilievo pedologico.....	51
3.1.2	Rilievo floristico .....	52
3.2	PREMESSA .....	54
3.3	SPECIE ERBACEE.....	55
3.4	PROVE PRELIMINARI IN SERRA - MICROCOSMO .....	55
3.4.1	Scelta delle specie.....	55
3.4.2	Trattamenti.....	56
3.4.3	Vasi.....	57
3.4.4	Semina e cure colturali .....	58
3.4.5	Rilievi effettuati .....	59
3.5	PROVE DI MESOCOSMO .....	86
3.5.1	Scelta delle specie.....	86

3.5.2	Trattamenti.....	86
3.5.3	Vasi.....	87
3.5.4	Semina e cure colturali .....	88
3.5.5	Rilievi effettuati.....	88
3.6	REALIZZAZIONE IMPIANTO “IN SITU” .....	90
3.6.1	Scelta delle specie.....	90
3.6.2	Allestimento dell’impianto pilota.....	91
3.6.3	Analisi sulla parte epigea.....	94
3.6.4	Analisi sulla parte epigea.....	95
3.7	PIANTE ARBOREE .....	99
3.8	PROVE DI MESOCOSMO .....	99
3.8.1	Scelta delle specie.....	99
3.8.2	Trattamenti.....	100
3.8.3	Vasi.....	100
3.8.4	Trapianto e cure colturali.....	100
3.8.5	Rilievi effettuati.....	101
3.9	REALIZZAZIONE IMPIANTO “IN SITU” .....	105
3.9.1	Scelta delle specie.....	105
3.9.2	Allestimento dell’impianto pilota.....	105
3.9.3	Analisi sulla parte epigea.....	106
3.9.4	Analisi sulla parte ipogea .....	107
4.	RISULTATI E DISCUSSIONI .....	112
4.1	CARATTERIZZAZIONE DEL SITO .....	112
4.1.1	Rilievo pedologico.....	112
4.1.2	Rilievo floristico .....	116
4.2	SPECIE ERBACEE.....	122
4.3	PROVE PRELIMINARI IN SERRA - MICROCOSMO .....	122
4.3.1	SPAD e fluorimetro .....	122
4.3.2	Apparati epigei .....	127
4.3.3	I metalli pesanti .....	133
4.3.4	Apparati ipogei .....	153
4.4	PROVE DI MESOCOSMO .....	186
4.4.1	Determinazione della biomassa aerea.....	186
4.4.2	I metalli pesanti .....	188
4.4.3	Gli apparati ipogei .....	196
4.5	REALIZZAZIONE IMPIANTO “IN SITU” .....	202

4.5.1	Analisi sulla parte epigea.....	202
4.5.2	Concentrazione degli elementi assorbiti.....	207
4.5.3	Asportazioni .....	220
4.5.4	Analisi sulla parte ipogea .....	224
4.6	SPECIE ARBOREE .....	233
4.7	PROVE DI MESOCOSMO .....	233
4.7.1	Biomassa epigea .....	233
4.7.2	Metalli pesanti .....	234
4.7.3	Apparati radicali .....	237
4.7.4	Apparato radicale vs. asportazioni dei metalli.....	241
4.8	REALIZZAZIONE IMPIANTO “IN SITU” .....	242
4.8.1	Analisi sulla biomassa epigea.....	242
4.8.2	Concentrazione degli elementi assorbiti.....	246
4.8.3	Asportazioni .....	259
4.8.4	Analisi sulla parte ipogea .....	265
5.	CONCLUSIONI.....	278
6.	BIBLIOGRAFIA .....	280
7.	APPENDICE FOTOGRAFICA .....	290





## 1. INTRODUZIONE

La problematica della tutela dell'ambiente e della conservazione delle risorse naturali, non più ritenute bene inesauribile ed auto-rigenerante, è di grande attualità. In seguito alla conferenza dell'USEPA (*United State Environmental Protection Agency*) di Rio del 1992 ed in particolare in seguito all'approvazione da parte dell'Unione Europea del Protocollo di Kyoto (2002/358/CE), l'attenzione per la ricerca di tecnologie produttive a basso impatto ambientale ha assunto rilevanza mondiale. È per questo, e per il diffondersi di nuova attenzione in materia di inquinamento, che assumono particolare interesse tutte quelle discipline e correnti di studio volte a tutelare e preservare l'ambiente, inteso nel senso più ampio del termine, anche perchè, si deve considerare che non è più possibile intervenire sull'ambiente settorialmente, ma l'ambiente deve essere guardato come ad un sistema complesso, in cui si colloca organicamente l'uomo con le sue esigenze e le sue attività.

Ruolo fondamentale in questo campo può svolgerlo l'agricoltura, che si pone allo stesso tempo come "utilizzatrice" della risorsa ambiente, ma anche come possibile fonte di tecnologie atte a preservare l'ambiente stesso. Si pensi in fatti alla produzione di biodisel, alla diffusione di centrali termiche ed elettriche a biocombustibili o a biogas, all'uso sempre più diffuso dell'amido di mais in vari settori, da quello degli imballaggi (sacchetti, riempitivi per imballi, etc.), fino alle tecniche più innovative di utilizzo delle piante per la depurazione, sia di acque che di terreni. In questo contesto la ricerca punta a coltivare piante di interesse agrario e non, non più a scopo alimentare, ma industriale od ambientale. In quest'ottica si colloca il mio lavoro di dottorato di ricerca.

## L'AGRICOLTURA E IL TERRITORIO

Lo sfruttamento del territorio a soli fini produttivi, che ha caratterizzato l'uso del suolo dal secondo dopoguerra ad oggi, ha di fatto condotto all'impoverimento del sistema ambiente. Un certo contributo, in questo quadro, è dato dall'agricoltura, che si è evoluta incidendo profondamente sull'assetto e sullo stato di salute del territorio, basti pensare che la superficie agricola italiana investe circa il 44% della superficie territoriale totale (Adua *et al.*, 2005). Le aree agricole e con esse quelle forestali, oltre a sostenere la produzione alimentare, tessile, industriale (legno) ed energetica, sono coinvolte in numerose funzioni ecologiche, rappresentando il legame tra aria-acqua-suolo. Le piante, infatti, fungono da filtro per le sostanze presenti nei suoli, disciolte in acqua o presenti nell'atmosfera, supportano i diversi *habitat* e, non meno importante, svolgono funzioni sociali e culturali (Adua *et al.*, 2005). La relazione esistente tra agricoltura/selvicoltura ed ambiente si regge su di un equilibrio molto labile e complesso. Se da un lato le superfici agricole e le foreste subiscono l'impatto negativo dell'ambiente e di altri ambiti produttivi, dall'altro, le attività selvicolturali e, soprattutto, quelle agricole (specialmente quando quest'ultime assumono forme di intensificazione, concentrazione e specializzazione), sono una delle principali cause dell'inquinamento delle acque, della perdita di stabilità, dell'inquinamento e dell'acidificazione dei suoli, dell'aumento dell'effetto serra, della perdita di diversità biologica e della semplificazione del paesaggio. È indubbio, tuttavia, che l'attività agricola, possa fornire servizi ambientali e diverse opzioni nelle strategie di mitigazione dei fenomeni di inquinamento ad essa imputati o imputabili, pur mantenendo una buona capacità di produzione e di competitività, complici le nuove politiche di sviluppo rurale orientate sempre più verso la sostenibilità. Le stesse linee della Politica Agricola Comunitaria (PAC) emanate negli ultimi decenni hanno indubbiamente dato un impulso essenziale nel processo di integrazione delle problematiche ambientali nelle politiche rurali. Prime fra tutte le misure di accompagnamento previste dai Regolamenti Comunitari 2078/92 e 2080/92

promulgate al fine di ridurre le produzioni agricole attraverso la contrazione delle superfici coltivate e la riconversione delle stesse a siti di attività per la difesa e valorizzazione ambientale (Commissione Comunità Europea, 1992). Ruolo, quest'ultimo, particolarmente enfatizzato da Agenda 2000 (Commissione Comunità Europea, 1999a) e dal Regolamento Comunitario 1257/99 (Commissione Comunità Europea, 1999b), che prevedono aiuti economici agli operatori di settore che applichino le norme della "buona pratica agricola" e che destinano parte del territorio a quelle attività volte al ripristino ambientale, al miglioramento paesaggistico e all'incremento della biodiversità.

In questo panorama si colloca la ricerca agronomica sempre più rivolta a rispondere alle nuove esigenze della collettività in un quadro di "agricoltura di servizio" e "agricoltura multifunzionale" finalizzata alle produzioni non-alimentari e alla salvaguardia o promozione ambientale (Borin, 1999). Le colture quindi, passano da un mero ruolo produttivistico a funzioni ambientali-paesaggistiche, fino a svolgere un ruolo di recupero ambientale quali il consolidamento di superfici, la mitigazione dell'impatto paesaggistico di infrastrutture, il ripristino e la rinaturalizzazione delle cave, delle discariche, di terreni degradati e la bonifica di territori inquinati (Borin, 2002). Le ultime esternalità elencate sono tutte finalizzate al recupero di aree altrimenti improduttive, grazie all'osservazione che talune specie vegetali sono in grado di svilupparsi anche in condizioni anomale e quindi di assoggettare alla funzione produttivistica il miglioramento ambientale. Funzione questa che diventa particolarmente interessante se si pensa che nel solo territorio nazionale italiano sono stati potenzialmente identificati 8.873 siti inquinati (EEA, 2000), di cui oltre 200 censiti e da sottoporre a procedura di bonifica. Di questi poi, 56 sono SIT (Siti di Interesse Nazionale) come dichiarato da L. 426/1998, L. 388/2000, D.M. 468/2001, L. 179/2002, L. 266/05 e D.Lgs. 152/06) e 2.990 aree minerarie abbandonate (APAT, 2006).

## LA PROBLEMATICA DELL'INQUINAMENTO

Si può definire l'inquinamento ambientale come un cambiamento delle caratteristiche fisiche, chimiche o biologiche dell'aria, dell'acqua o del suolo causato dall'immissione nell'ambiente di materia o energia, tale da provocare effetti negativi misurabili immediati o differiti; in particolare ne possono derivare: danni all'uomo e alle specie animali e vegetali, danni ai materiali, spreco o deterioramento delle risorse naturali e limitazioni alle attività economiche, culturali, ricreative, sportive, ecc. Esso rappresenta quindi una modificazione sfavorevole dell'ambiente dovuta, totalmente o parzialmente, all'attività umana. L'articolo 2 del D.M. 471/99 definisce come sito inquinato quel *“sito che presenta livelli di contaminazione o alterazioni chimiche, fisiche o biologiche del suolo o del sottosuolo o delle acque superficiali o delle acque sotterranee tali da determinare un pericolo per la salute pubblica o per l'ambiente naturale o costruito. [...] nel quale anche uno solo dei valori di concentrazione delle sostanze inquinanti [...] risulta superiore ai valori di concentrazione limite accettabili stabiliti dal presente regolamento”*. Per quantificare la presenza d'inquinanti nell'ambiente si usano, infatti, parametri diversi a seconda della tipologia di inquinante; per semplicità nel seguente lavoro di tesi si parlerà in ogni caso di concentrazione ed in particolare si farà riferimento, per i limiti di concentrazione di inquinanti nel suolo, ai valori tabellari espressi dall'allegato 1 del D.M. 471/99.

### **1.1.1 L'inquinamento del suolo**

Il suolo costituisce la parte della biosfera dove l'uomo vive e che egli trasforma attraverso le varie forme di insediamento e le sue attività. Essa rappresenta la parte più superficiale della crosta terrestre ed è il risultato della trasformazione litologica da parte di agenti chimici, fisici e biologici (Bargellini, 1998). Il terreno rappresenta quindi, per sua natura, un corpo estremamente eterogeneo, in cui l'introduzione di sostanze non facenti parte della sua struttura originaria, o già presenti, ma in concentrazioni differenti, determina

modificazioni che generalmente rappresentano un danno o un peggioramento delle condizioni di vita (Radaelli e Calamai, 2001).

Il suolo assicura una serie di funzioni chiave dal punto di vista ambientale, economico, sociale e culturale che sono indispensabili per la vita. Esso rappresenta l'habitat per diverse specie e garantisce la produzione alimentare, agricola e selvicolturale: quasi tutta la vegetazione, tra cui i pascoli, le colture arabili e gli alberi, hanno bisogno del suolo per rifornirsi di acqua e sostanze nutritive e per fissare le proprie radici. Inoltre, il suolo funge da elemento del paesaggio e del patrimonio culturale (Commissione Comunità Europea, 2002). In generale le funzioni indicate sono interdipendenti e la misura in cui sono assicurate dal suolo è molto importante per la sostenibilità. Quando il suolo diviene invece fonte di materie prime o il terreno che occupa funge da supporto per le attività umane, la capacità del suolo di assicurare le sue funzioni è ridotta o modificata, con una conseguente conflittualità tra le funzioni stesse (Commissione Comunità Europea, 2002).

La manipolazione della struttura del suolo, con l'introduzione di contaminanti può quindi diventare fonte di alterazione delle funzioni che esso normalmente ricopre, incidendo negativamente sulla catena alimentare, sulla salute umana e, più in generale, sull'equilibrio degli ecosistemi (Commissione Comunità Europea, 2002), soprattutto se si evidenzia il fatto che la sua capacità tampone e di accumulo nei confronti delle sostanze inquinanti può effettivamente impedire l'immediata contaminazione degli altri comparti ambientali (Sequi, 1989) ma, contrariamente a come si è a lungo ritenuto, può determinare un improvviso rilascio degli inquinanti stessi una volta raggiunto il limite di ritenzione (Stigliani, 1992). Per questo motivo si è recentemente riconosciuto, con la meritata importanza, il problema dell'inquinamento del suolo, argomento per il quale si dispone però di poche informazioni e di una legislazione ancora giovane e carente per molti aspetti (Zaccheo e Crippa, 2004).

Il problema della valutazione dello stato di inquinamento di un suolo è molto dibattuto, in quanto non esistono in pratica metodi di laboratorio chimici

o biologici atti a misurare la diminuzione di produttività (Zaccheo *et al.*, 2000). Attualmente la legislazione italiana identifica un suolo come “sito inquinato” qualora in esso venga rilevata la presenza di sostanze in concentrazioni superiori a quelle tabellari espresse dal D.M. 471/99, senza tener conto di eventuali valori del fondo litologico.

I rifiuti, non solo industriali, che sono all’origine di contaminazioni (scorie di fonderia, sali da rifusione dell’alluminio, fanghi, morchie oleose, oli esausti, melme acide, ceneri leggere da incenerimento, polveri dell’abbattimento dei fumi della siderurgia, pesticidi, solo per citarne alcuni -Ciafani *et al.*, 2005-) possono avere origine locale (puntiforme) o diffusa. In generale la contaminazione puntiforme è associata alla presenza di miniere, all’industria, alle discariche e ad altre strutture che, sia durante il funzionamento che dopo la chiusura, possono creare rischi per il comparto suolo e acqua. La contaminazione diffusa è invece associata alla deposizione atmosferica, a determinate pratiche agricole e ad inadeguate operazioni di riciclo dei rifiuti e trattamento delle acque reflue. La deposizione atmosferica, dovuta alle emissioni dell’industria, del traffico e dell’agricoltura, di sostanze inquinanti rilascia nel suolo contaminanti acidificanti (ad esempio SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>), metalli pesanti e diversi altri composti organici (ad esempio diossine, bifenili policlorurati, idrocarburi policiclici aromatici). I contaminanti acidificanti riducono progressivamente il potere tampone del suolo, comportando in alcuni casi, come precedentemente accennato, il superamento del carico critico con conseguente rilascio improvviso e massiccio di inquinanti. L’acidificazione favorisce inoltre, la lisciviazione di sostanze nutritive con conseguente perdita di fertilità del terreno e possibili problemi di eutrofizzazione dell’acqua (Radaelli e Calamai, 2001).

Varie pratiche agricole possono essere considerate fonte di contaminazione diffusa del suolo come la concimazione e la difesa fitosanitaria, a causa anche della presenza di metalli pesanti, come cadmio e rame, composti organici scarsamente biodegradabili e microrganismi potenzialmente patogeni (Commissione Comunità Europea, 2002).

Secondo Goldberg e Zaccheo (1998), l'inquinamento può essere determinato da sostanze organiche (scarichi urbani, reflui zootecnici, industrie di trasformazione di materiali organici naturali, fitofarmaci, numerose classi di sostanze organiche industriali, tensioattivi anionici); da sostanze minerali e inorganiche (materiali solidi in sospensione, metalli pesanti e sali disciolti); da fattori microbiologici (acque reflue di insediamenti urbani e zootecnici).

Tra tutte le classi di inquinanti citate, quelle di interesse e considerate nel presente lavoro di tesi fanno riferimento ai metalli pesanti e alle ceneri di pirite; quest'ultime rappresentano uno scarto della lavorazione industriale, come sarà descritto in modo più approfondito in seguito (v. sezione Materiali e metodi).

### ***1.1.2 Inquinamento da metalli pesanti***

Gli elementi naturalmente presenti nella biosfera sono stati classificati, in relazione alla loro importanza per i viventi, in (Casalicchio, 2000a):

- Elementi *essenziali*, a loro volta distinti in macronutrienti e micronutrienti (elementi indispensabili assimilabili rispettivamente ad alte e basse quantità);
- Elementi *microutili* (elementi che svolgono funzioni utili, per vicarianza o per specifiche caratteristiche di stimolo di alcuni processi metabolici);
- Elementi *microtossici* (elementi non indispensabili, e tossici);
- Elementi *microindifferenti* (tutti gli elementi assorbiti che non svolgono nessuna funzione specifica, che non sono né indispensabili né tossici).

Ciò premesso, i metalli pesanti sono elementi naturalmente presenti nella crosta terrestre, che rappresentano, in modo verticale, tutte le categorie sopra elencate, rientrando nell'una o nell'altra a seconda della specie considerata. Si caratterizzano per densità maggiori di  $7 \text{ g cm}^{-3}$  ( $5 \text{ g cm}^{-3}$  se si includono anche i metalloidi), comportamento cationico e diversi stadi di ossidazione in funzione



del pH (Casalicchio, 2000; Radaelli, 2001; Zerbi e Marchiol, 2004). Essi si trovano generalmente in concentrazioni inferiori 0,1% (fanno eccezione determinate formazioni e giacimenti minerali –Radaelli, 2001-), da cui la definizione di “elementi traccia” che li contrappone ai maggiori costituenti delle rocce e dei minerali, ossia silicio, alluminio, ferro, calcio, sodio, potassio e magnesio (Faure, 1992). Tra i metalli pesanti vengono inclusi argento, bario, cadmio, cobalto, cromo, manganese, mercurio, molibdeno, nickel, piombo, rame, stagno, tallio, titanio e zinco e alcuni metalloidi che presentano proprietà simili ai metalli pesanti, come l’arsenico, l’antimonio, il bismuto, il selenio e il vanadio (Adriano, 1986; Alloway, 1995; Gabbrielli e Galardi, 2004). Tra questi, in linea generale, per le piante sono micronutrienti il Cu, Mn, Mo e Zn; microutili il Co, V e Se, microtossici Ag, As, Ba, Bi, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Ti, Tl (il Cr, ad es. per gli animali e l’uomo rappresenta un micronutriente) (Casalicchio, 2000; Barazani *et al.*, 2004). Ecco perchè, in determinate situazioni ed in riferimento ad ordini differenti, i metalli pesanti possono essere elemento di disturbo, inquinante e/o di sterilità di un suolo.

Le fonti di contaminazione di metalli pesanti hanno due origini: naturale e antropica. La fonte naturale è rappresentata dal substrato geologico stesso mentre, tra le sorgenti di origine antropica le più rilevanti sono dovute alle attività civili, industriali ed alle pratiche agricole (Casalicchio, 2000b). Tra le pratiche agricole, di particolare interesse e rilevanza è il riutilizzo nell’agricoltura di fanghi e compost ricchi in sostanze organiche e minerali, prodotti dalla depurazione delle acque di scarico urbane (reflue), la cui principale limitazione d’uso dipende dai loro contenuti in metalli pesanti (Adriano, 1986): Co, Cu e Zn sono spesso contenuti nelle diete e di conseguenza nelle deiezioni animali (assimilazione molto bassa, circa il 5% del metallo somministrato). Inoltre, apporti stagionali di As, Cu, Hg, Pb, Sn e Zn sono causati dall’uso di pesticidi di varia natura (Adriano, 1986). Il contenuto totale in metalli nei suoli agrari è quindi, il risultato degli input provenienti da sorgenti diverse e può essere rappresentato da (Zaccheo e Crippa, 2004):

Metalli totali = input – output,

ossia il contenuto totale in metalli in un suolo agricolo risulta pari alla differenza tra i metalli apportati dalla roccia madre, per deposizione atmosferica, con le fertilizzazioni, con l'uso di prodotti chimici di varia natura, con le acque irrigue, con rifiuti organici e di derivazione accidentale e la quota di metalli assimilati dalle piante, persi per volatilizzazione, erosione o lisciviazione.

Le condizioni ambientali ed in particolare il pH, il potenziale di ossido-riduzione e la presenza di composti organici o inorganici, giocano un ruolo fondamentale nella speciazione degli elementi e quindi nella loro biodisponibilità (Kabata-Pendias, 1992). In particolare, le variazioni di pH e più in generale le alterazioni delle proprietà chimiche del suolo registrate nella rizosfera (Ross, 1994; Kashem e Singh, 2002) determinano per questi elementi un decorso differente da quello nella grande massa di terreno (*bulk soil*) (Zaccheo e Crippa, 2004). Le radici inoltre, stabilizzano il suolo legandone meccanicamente le particelle, producono essudati radicali, come mucigel e zuccheri, che unitamente all'azione di funghi micorizzici migliorano la struttura del suolo e la sua stabilità; ne consegue una diminuzione dell'erosione ed una minor migrazione dei contaminanti dai suoli inquinati alle aree adiacenti (Zaccheo e Crippa, 2004).

Come già accennato in precedenza, i metalli pesanti hanno destini differenti nelle piante, alcuni sono utili o addirittura indispensabili per la vita dei vegetali, altri sono tossici; il parametro più semplice per mettere in evidenza gli effetti tossici degli agenti stressanti, quindi anche dei metalli, è la valutazione della crescita della pianta intera o di un suo organo. L'alterazione del processo della crescita rappresenta molto spesso la prima e la più sensibile risposta a condizioni di stress. Nel caso specifico di metalli pesanti, l'organo che risente prima degli effetti della loro presenza nel suolo la radice che si trova a diretto contatto con le sostanze tossiche (Baker e Walker, 1989). La reazione delle piante alla presenza di metalli pesanti nel suolo, non determina solo un effetto di tipo quali-quantitativo, ma implica spesso l'attivazione di risposte fisiologiche a volte molto diverse tra loro; alcune piante, infatti, reagiscono alla

presenza di elementi tossici, attuando meccanismi di esclusione, altre di assorbimento e neutralizzazione (Gabbrielli e Galardi, 2004). Quest'ultimi consistono nel creare un legame metallo-parete cellulare, oppure nel compartimentalizzare i metalli nei vacuoli, nel potenziare il meccanismo attivo di efflusso e/o nell'induzione di maggiori livelli di sostanze chelanti quali complessi proteici (metallotioneine e fitochelatine), complessi organici (citrati) e complessi inorganici (solfuri) (Gabbrielli e Galardi, 2004).

### **1.1.3 Il ferro**

Il ferro è un elemento che si trova in grandi quantità nella crosta terrestre, approssimativamente attorno al 5% (USEPA, 2003). È presente sotto forma di silicati ferro magnesiaci, ossidi e carbonati, tra i quali l'ematite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , principale costituente delle ceneri di pirite) (Zerbi *et al.*, 2004), inoltre è presente anche in minerali argillosi ed idrossidi. Solo poche forme del ferro sono disponibili per la pianta e la disponibilità varia in funzione del pH (Marschner, 1995) e del potenziale di ossido-riduzione (Radaelli e Calamai, 2001). Tra le forme solubili del ferro, maggiormente presenti nei terreni, il  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  (forme inorganiche) e il ferro chelato (forma organica) (Marschner, 1995). Il ferro viene assorbito quasi esclusivamente come  $\text{Fe}^{+2}$ , mentre il  $\text{Fe}^{+3}$  deve essere ridotto nella membrana cellulare durante l'assorbimento (Marschner, 1995).

Le piante utilizzano due diverse strategie per assorbire il ferro; si hanno piante ferro-efficienti che utilizzano di preferenza la strategia I (come ad esempio le dicotiledoni e le specie arboree) e piante ferro-inefficienti che usano di preferenza la strategia II (come ad esempio le graminacee). Nella strategia I si verifica un flusso di protoni dalla radice verso la rizosfera, questo permette di aumentare l'acidità dell'ambiente, con una riduzione del ferro e quindi una maggiore disponibilità dello stesso. Sostanze fenoliche prodotte dalla radice chelano il  $\text{Fe}^{+3}$  che entra nello spazio libero della radice, questo viene ridotto e fatto entrare nella cellula. Nella strategia II le radici rilasciano aminoacidi non proteici chiamati siderofori, che chelano il ferro della rizosfera, questo entra nel

citoplasma ancora legato e viene ridotto a  $Fe^{+2}$  (Marschner, 1995). Da osservare inoltre che l'assorbimento del ferro è ristretto alla parte apicale giovane della radice (Marschner, 1995). Generalmente le concentrazioni che si riscontrano nella sostanza secca delle piante variano tra 10 e 1000 ppm, assimilabili alle concentrazioni di boro, manganese e zinco. Il ferro è un microelemento poco mobile nella pianta e viene generalmente trasportato come ferro-citrato ai siti di sintesi proteica per la produzione delle M-proteine (citocromossidasi e gli enzimi catalasi e perossidasi) e delle Fe-S proteine (ferridossina) (Marschner, 1995). La carenza di questo elemento si manifesta con clorosi internervale soprattutto sulle foglie più giovani, mentre gli eccessi si manifestano con bronzatura delle foglie (Marschner, 1995).

## **I METALLI PESANTI E LE PIANTE**

A determinare la disponibilità dei metalli pesanti nel suolo intervengono diversi fattori: le caratteristiche chimiche (pH, potenziale ossido-riduttivo), fisiche (granulometria, struttura, umidità, potere adsorbente), biologiche (macro- e micro-organismi, sostanza organica, tasso di umificazione) del terreno (Giardini, 1996) e la specie vegetale insediata.

### ***1.1.4 Fitodisponibilità dei metalli: caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo***

Le interazioni dei metalli nel suolo variano in funzione della natura del suolo stesso, sia per quanto concerne la speciazione degli elementi, che per il loro legame temporaneo con la superficie delle particelle terrose (processi di assorbimento—desorbimento), che per le reazioni di precipitazione e la disponibilità nella soluzione circolante (Fotovat *et al*, 1997).

Ruolo fondamentale è giocato dal pH, che determina la solubilità degli elementi nutritivi, le reazioni tra le radici e i nutrienti e l'attività dei microrganismi responsabili della decomposizione della sostanza organica e della maggior parte delle trasformazioni che avvengono nel suolo: esso regola pertanto la disponibilità di molti nutrienti per le piante (Fig. 1).

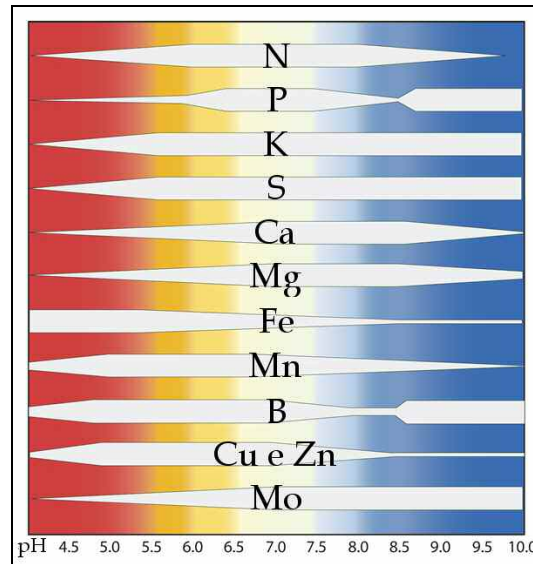


Figura 1 - Disponibilità di alcuni nutrienti al variare del pH (National Sustainable Agriculture Information Service, 2006).

Allo stesso modo, il grado di solubilità dei metalli nel suolo è controllato principalmente dal pH; le quantità di Cd e Zn, ad esempio, aumentano quando il pH scende sotto 6,5 e 5 rispettivamente, mentre Cu e Pb aumentano sensibilmente la loro disponibilità a pH inferiori rispettivamente a 4,5 e 3,5 (Navari-Izzo *et al.*, 2004).

Forte influenza sulla variazione del pH è esercitata dall'apparato radicale, che, modifica fortemente le caratteristiche della rizosfera e la biodisponibilità dei metalli in essa presenti; le radici, inoltre, creano condizioni favorevoli all'insediamento di microrganismi che intervengono a modificare la biodisponibilità dei metalli e nutrienti, più in generale, presenti nella rizosfera (Zaccheo e Crippa, 2004), ma possono anche interagire con le radici per accrescerne il potenziale di assorbimento del metallo. Alcuni microrganismi possono inoltre rilasciare componenti organici che stimolano la biodisponibilità

e facilitano l'assorbimento da parte della radice dei metalli essenziali, come il ferro (incluso il  $\text{Fe}^{2+}$ ) (Crowley *et al.*, 1991) e il manganese (Barber e Lee, 1974), e di quelli non essenziali, come il cadmio (Salt *et al.*, 1995).

Fondamentale, quindi, per la biodisponibilità dei metalli nel suolo, la specie vegetale insediata e la popolazione microbica ad essa associata.

Studi di laboratorio hanno dimostrato che la capacità delle piante di accumulare metalli e altri possibili inquinanti varia sia con la natura della specie vegetale che con quella del contaminante. Queste differenze possono venire attribuite sia alla marcata differenza nella capacità del suolo di legare questi metalli sia alle interazioni tra radice e metallo, che variano con il tipo di elemento (Naidu *et al.*, 2003). Ad esempio, nel pisello (*Pisum sativum* L.) l'accumulo di Cd nell'apparato epigeo della pianta è decisamente superiore rispetto a quello del Pb (Naidu *et al.*, 2003), mentre alcune specie *graminaceae* possono estrudere dalle radici acidi organici (siderofori) che potenziano la biodisponibilità del ferro (Kanazawa *et al.*, 1995) e dello zinco (Cakmak *et al.*, 1996); altre specie vegetali tollerano la presenza dell'alluminio grazie ad un meccanismo che coinvolge l'emissione di acido malico e citrico (Pellet *et al.*, 1995).

### ***1.1.5 Le piante in terreni inquinati: strategie di adattamento***

Diversi autori hanno rivelato l'esistenza di specifiche comunità vegetali endemiche che si sono sviluppate in terreni contaminati da metalli pesanti, alcune delle quali manifestando la capacità di assorbire elevati livelli dei metalli stessi (Baker, 1987; Baker e Brooks, 1989; Salt *et al.*, 1995, Cunningham e Ow, 1996; Raskin, *et al.*, 1997).

Diversi però, sono i meccanismi adottati dalle piante per adattarsi a substrati inquinati (Rauser, 1999; Cobbet, 2000; Clemens, 2001). La capacità di adattamento a condizioni sfavorevoli è correlata alla strategia di difesa che impedisce ai metalli pesanti di raggiungere concentrazioni tossiche a livello

cellulare (Gabbrielli e Galardi, 2004). Le piante possono essere classificate in due grandi gruppi: metallofite e pseudometallofite. Quest'ultime presentano una metallo-resistenza limitata, non indotta, che gli consente di vivere in terreni inquinati; generalmente il meccanismo di difesa è aspecifico e utilizza la parete cellulare come barriera all'ingresso dei metalli. Le vere metallofite invece, sono piante che hanno evoluto meccanismi biologici, in seguito a una pressione selettiva, che consente loro di colonizzare terreni inquinati da metalli pesanti; tali piante rappresentano spesso endemismi tipici del sito in cui si sono modificate. Le strategie di adattamento sono diverse tanto da poter suddividere le piante metallofite in tre gruppi (Baker, 1981):

- Escluditrici: il livello di contenuto epigeo dell'inquinante è mantenuto basso tramite limitazione della traslocazione dalle radici alle foglie;
- Indicatrici: la concentrazione fogliare dell'inquinante viene, tramite meccanismi fisiologici, mantenuta pari a quella del suolo;
- Accumulatrici: i metalli vengono attivamente accumulati all'interno dei tessuti della pianta in concentrazioni superiori a quelle del substrato, indicando un'alta specializzazione fisiologica.

Tra le accumulatrici vanno poi distinte le *iperaccumulatrici* che riescono ad accumulare nella parte aerea concentrazioni di metallo superiori al 2% del peso secco della pianta (Gabbrielli e Galardi, 2004). Brooks (1998) indicava quale limite dell'iperaccumulazione l'1% per Mn e Zn, e 0,1% per Co, Cu, Cr, Pb, Ni.

### ***1.1.6 Piante iperaccumulatrici***

Le piante iperaccumulatrici, sono specie che concentrano i metalli nei loro tessuti a livelli molto più elevati rispetto a quelli del terreno, accumulandoli nelle radici, nei rami e nelle foglie (Cunningham e Ow, 1996; Baker *et al.*, 1994).

Sebbene i micronutrienti come Zn, Mn, Ni e Cu siano essenziali per la crescita e lo sviluppo delle piante, un'alta concentrazione intracellulare di

questi ioni può essere tossica. Per sopravvivere a questo potenziale stress, le piante non accumulatrici hanno sviluppato vari meccanismi per controllare l'omeostasi degli ioni all'interno delle cellule. Queste tecniche includono la regolazione dell'afflusso di ioni (stimolazione dell'attività dei trasportatori a basse concentrazioni di ioni intracellulari ed inibizione ad alte concentrazioni) ed espulsione degli ioni intracellulari nella soluzione esterna (Kramer *et al.*, 1997).

Le specie iperaccumulatrici di metalli, invece, capaci di assorbire i metalli in quantità dell'ordine di migliaia di ppm, possiedono diversi meccanismi di detossificazione: alcune specie, in presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti incrementano la produzione di metallotioneine e fitochelatine, altre incrementano la produzione di acidi organici o di aminoacidi; altra strategia adottata è quella della compartimentalizzazione. Le prime tre vie si basano sull'attivazione di specifiche vie biosintetiche per produrre molecole in grado di legare e/o complessare i metalli pesanti; la compartimentalizzazione consiste invece, nella capacità di accumulare i metalli in compartimenti cellulari, come vacuolo e parete cellulare, in modo da limitarne gli effetti tossici (Gabbrielli e Galardi, 2004).

La produzione di molecole peptidiche, quali **fitochelatine** e **metallotioneine**, deriva dall'attivazione di una specifica via biosintetica e non dall'attivazione di geni coinvolti nella risposta allo stress e garantisce la capacità di legare il metallo e sequestrarlo formando un complesso stabile (Gabbrielli e Galardi, 2004). Le metallotioneine sono proteine a basso peso molecolare ricche in cisteina, la cui biosintesi viene regolata da fattori ormonali e dalla presenza di metalli come Cd, Zn, Hg, Cu, Au (Gabbrielli e Galardi, 2004). Le fitochelatine sono una famiglia di piccoli peptidi la cui produzione è stimolata dalla presenza di metalli (Cd, Hg, Ag, Au, Pb, Zn, As), caratterizzate da struttura ripetuta (acido glutammico, cisteina, glicina), che si originano per polimerizzazione del glutatione. Le fitochelatine agiscono chelando gli ioni metallici liberi per trasportarli nel vacuolo (Gabbrielli e Galardi, 2004). Il Cd, ad esempio, viene accumulato nella pianta, dove viene reso inattivo attraverso il



legame con le fitochelatine (Wagner, 1984; Steffens, 1990). Gli **acidi organici** sono coinvolti nel trasporto di ioni metallici: lo Zn sembra venire legato all'acido malico e trasferito nel vacuolo, mentre il Ni interessa l'acido citrico (Lee *et al.*, 1977, 1978). Per quanto riguarda gli **aminoacidi**, l'istidina, ad esempio, si lega ad una parte del Ni presente nella pianta in *Alyssum lesbiacum* (Candargy) (Gabbrielli e Galardi, 2004) e in *Thlaspi goesingense* (Halácsy) (Kramer *et al.*, 1997). La **compartimentalizzazione** è la capacità della pianta di allocare i metalli in compartimenti o organi specifici, (vacuolo e parete cellulare). Nel vacuolo vengono raccolte le sostanze tossiche mentre la parete cellulare lega i metalli e compete con il processo di assorbimento radicale limitando la loro presenza all'interno delle cellule (Gabbrielli e Galardi, 2004).

Questa capacità di assorbire e legare o allocare in comparti specifici della pianta i metalli pesanti, consente a talune specie, iperaccumulatrici, di assorbire concentrazioni di metalli pesanti particolarmente rilevanti tra 100 e 10.000 mg kg<sup>-1</sup> di peso secco, in relazione all'elemento considerato (Baker e Brooks, 1989) (Tab. 1).

Tabella 1 - Intervallo di concentrazione media riscontrate nei tessuti vegetali e limite inferiore per le specie iperaccumulatrici.

Elemento	Range di "normalità" (mg kg <sup>-1</sup> )	Limite inferiore per le iperaccumulatrici (mg kg <sup>-1</sup> )
Cadmio	0,03-20	100
Cobalto	0,05-50	1.000
Manganese	5-2.000	10.000
Nichel	0,2-100	1.000
Rame	1-100	1.000
Selenio	0,01-10	100
Tallio	0-0,1	1.000
Zinco	5-2.000	10.000

Il motivo per cui alcune piante hanno sviluppato questa capacità di iperaccumulare metalli pesanti non è ancora chiaro, anche se, secondo Martens e Boyd (1994), tra i meccanismi alla base di tale capacità potrebbero esserci:

- Capacità di resistenza alla carenza di altri elementi;

- Vantaggio competitivo nei riguardi di altre specie poco resistenti;
- Assimilazione involontaria di elementi affini ad altri nutrienti;
- Meccanismo di difesa contro erbivori e patogeni.

Nel 1998 Brooks aveva riscontrato la capacità di iperaccumulare metalli pesanti in oltre 400 specie, per lo più appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*.

L'osservazione poi, che tali specie si trovassero per lo più in siti metalliferi ha suggerito la possibilità di sfruttare l'iperaccumulazione al fine di decontaminare siti inquinati da metalli pesanti (Chaney, 1983). Lo scarso sviluppo della biomassa, sia radicale che aerea delle specie iperaccumulatrici ha di fatto escluso il loro utilizzo a tal fine, relegandole al ruolo di "piante modello" per studiare i meccanismi dell'accumulo e della tolleranza (Zhao *et al.*, 2000).

Un caso interessante è rappresentato da *Brassica juncea* (L.) Czern., pianta non specializzata a vivere in terreni metalliferi, ma che ha una buona capacità di assorbire metalli pesanti; essa rappresenta inoltre, un'importante specie di interesse agronomico (Gabbrielli e Galardi, 2004). Con *Brassica juncea*, si apre un nuovo capitolo nella ricerca, che ipotizza e sostiene l'uso di piante di interesse agrario nei processi di bonifica di siti inquinati da metalli pesanti.

### **1.1.7 Piante da biomassa**

Le piante da biomassa sono specie ad intenso accrescimento, che presentano capacità di assorbire in modo aspecifico diversi metalli pesanti, seppur a basse concentrazioni (Kumar *et al.*, 1995). In questo gruppo di piante è importante la famiglia delle *Brassicaceae*, tra cui la già citata *Brassica juncea* (L.) Czern. e *Raphanus sativus* L. (Mosca *et al.*, 2004), che da studi recenti hanno evidenziato un buono sviluppo e una buona tolleranza anche in condizioni di elevato inquinamento; dallo stesso studio si è dimostrato interessante anche l'impiego

di *Helianthus annuus* L. per il buon accumulo di metalli pesanti. Anche colza, tabacco, lino, menta, cotone, mais e senape indiana possono accumulare apprezzabili quantità di metalli pesanti nei loro tessuti, fornendo anche una considerevole resa in sostanza secca (Navari-Izzo *et al.*, 2004).

Il vantaggio di queste specie, sta nell'elevata produzione di biomassa, tale da garantire un'efficace gestione agronomica ed una facile raccolta (asportazione) della parte aerea e con essa dei contaminanti presenti nel suolo.

L'utilizzo di tali piante rientra nella definizione di **fitoestrazione assistita**, ossia la tecnica che prevede l'uso di piante agrarie e di pratiche colturali, in grado di innescare una fase di intensa assimilazione di metalli pesanti durante il ciclo colturale. Diversamente la **fitoestrazione continua** è tipica delle piante iperaccumulatrici, che assorbono elevate quantità di metallo durante l'intero ciclo di accrescimento (Zerbi e Marchiol, 2004).

Numerosa la bibliografia che riporta fasi di sperimentazione di specie agrarie, sia arboree che erbacee, interessate al fenomeno dell'accumulazione di metalli pesanti (Prasad e Freitas, 2003). Tra le specie arboree la ricerca è orientata verso l'utilizzo di salice (Greger e Landberg, 1999; Pulford e Watson, 2003; Kuzovkina *et al.*, 2004;) e pioppo (Laureysens *et al.*, 2005), mentre tra le erbacee, a parte la sperimentazione diffusa sulla capacità fitoestrattiva delle *Brassicaceae*, la ricerca si è orientata anche verso altre specie di interesse agrario tra cui loiessa (*Lolium multiflorum* L.) (Rizzi *et al.*, 2004), orzo (*Hordeum vulgare* L.) (Calace *et al.*, 2004; Molas e Baran, 2004), girasole (*Helianthus annuus* L.) (Davies *et al.*, 2002; Madejon *et al.*, 2003; Mosca *et al.*, 2004) ed erba medica (*Medicago sativa* L.) (Hernandez-Pinero *et al.*, 2002; Peralta-Videa *et al.*, 2002).

Le piante, quindi, stanno dimostrando potenziale positivo nel campo delle tecnologie di bonifica ambientale dei metalli, potenziale che si pone come nuovo strumento anche in un'ottica di sviluppo sostenibile (Prasad e Freitas, 2003).

## LE TECNOLOGIE DI BONIFICA

Secondo il Decreto Ministeriale n. 471/99 per bonifica si intende: *“l’insieme degli interventi atti ad eliminare le fonti di inquinamento e le sostanze inquinanti o a ridurre le concentrazioni delle sostanze inquinanti presenti nel suolo, nel sottosuolo, nelle acque superficiali o nelle acque sotterranee ad un livello uguale o inferiore ai valori di concentrazione limite accettabili stabiliti dal presente regolamento”*. Altra definizione è quella proposta dall’ USEPA (*United State Environmental Protection Agency*), secondo la quale le tecnologie di bonifica sono quei *“processi chimici, biologici o fisici applicati a matrici contaminate per cambiare le loro condizioni in modo permanente”* (1996). Allo stato attuale le tecniche che permettono di eliminare gli inquinanti dalle diverse matrici contaminate sono numerose, soprattutto in virtù del forte sviluppo registrato negli ultimi decenni (Zerbi e Marchiol, 2004).

L’opera di bonifica diventa strumentale non più esclusivamente alla tutela del territorio e della salute umana, ma assurge al ruolo di vettore dello sviluppo socio-economico, favorendo la trasformazione di intere aree, talvolta inserite nel tessuto urbano, da zone improduttive a zone di riqualificazione ambientale, urbana ed economica (Cao *et al.*, 2003).

Le tecnologie di bonifica possono agire sul contaminante secondo tre principi fondamentali (Zerbi e Marchiol, 2004), **trasformazione**: consiste nell’attacco di composti organici che passano da sostanze a struttura complessa ad intermedi più semplici, fino, eventualmente, alla completa mineralizzazione; **rimozione**: è il caso tipico dei metalli pesanti, già in forma elementare, non possono essere ulteriormente degradati ma solamente asportati dalla matrice contaminata; **immobilizzazione o contenimento**: tecniche basate su questo principio si applicano quando non è possibile ricorrere alle altre alternative ed è necessario isolare il sito contaminato per evitare la contaminazione di aree adiacenti.

I trattamenti di bonifica possono essere classificati in base al luogo in cui avviene la bonifica o in base alla natura del processo applicato (Zerbi e Marchiol, 2004).

**1. in base al luogo in cui avviene la bonifica;** si distinguono interventi:

- *ex situ*, che prevedono l'escavazione del terreno e il suo trattamento in impianti installati in loco (*on site*), o in impianti dislocati al di fuori dell'area (*off site*);
- *in situ*, quando il trattamento del suolo contaminato avviene direttamente sul posto, senza la necessità di escavazioni;

**2. in base alla natura del processo applicato:**

- trattamenti chimico-fisici attraverso i quali i contaminanti sono rimossi dal suolo mediante l'utilizzo di agenti estrattivi (lavaggi, ventilazioni o estrazioni con solvente) oppure resi meno pericolosi mediante reazioni redox o, ancora, la mobilità dei contaminanti viene ridotta mediante il confinamento in una matrice solida. Tali trattamenti sono in genere quelli che presentano la maggiore efficienza di rimozione dei contaminanti e tempi di bonifica relativamente brevi, tuttavia sono anche i più costosi e in generale determinano una modifica delle caratteristiche originali del suolo (Cao *et al.*, 2002).
- trattamenti termici, consistono in interventi di termodistruzione (incenerimento) e di desorbimento termico. Nel primo caso vi è una totale distruzione termica delle molecole delle sostanze contaminanti e viene usato di norma per contaminazioni da composti organici; nel secondo caso si tratta di provocare la vaporizzazione del contaminante allo scopo di separarlo dalla fase solida del suolo e quindi di condensarlo. Questi trattamenti garantiscano rendimenti di rimozione molto elevati, ma sono molto costosi sia economicamente che dal punto di vista ambientale (portano alla completa sterilizzazione del suolo) (Cao *et al.*, 2002).

- trattamenti biologici, si distinguono in trattamenti basati sulla capacità dei batteri e funghi di degradare composti organici e molecole di diversa natura, e trattamenti basati sull'attività estrattiva/degradativa di piante superiori. Questi metodi sono generalmente molto lenti e presentano efficienze di rimozione più basse rispetto ai trattamenti chimici e fisici ma sono molto meno costosi e il loro impatto ambientale è modesto (Cao *et al.*, 2002).

Data la natura e la complessità dei processi di bonifica diventa fondamentale operare una scelta oculata, in base ai risultati che si vogliono raggiungere, ai tempi, ai costi e soprattutto alla tipologia di inquinamento: non è raro riscontrare siti multicontaminati (contaminati da diversi inquinanti o da elementi diversi).

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per gli interventi di bonifica biologici, sia per il minor impatto ambientale, ma anche grazie ai costi concorrenziali rispetto ai metodi tradizionali.

### ***1.1.8 Bonifica di suoli contaminati da metalli pesanti***

Diversamente dai contaminanti di natura organica, i metalli non possono venire eliminati dall'ambiente per mezzo di trasformazioni chimiche o biologiche (Cunningham e Ow, 1996), sebbene si possa ridurre la tossicità modificandone la speciazione. I metalli, non possono essere degradati e pertanto persistono nell'ambiente (Wade *et al.*, 1993; Prasad e Freitas, 2003) a meno di una rimozione ed asportazione dalla matrice inquinata. Nel caso in cui non sia possibile intervenire per la rimozione dei metalli, si attua la tecnica del "contenimento", al fine di evitare contaminazioni dell'ambiente circostante (USEPA, 1994). L'intervento più comune consiste nel coprire il sito inquinato con cemento, bentonite o con membrane polimeriche così da ridurre la permeabilità ed evitare la lisciviazione degli inquinanti verso la falda (USEPA, 1994). In alternativa, si può rimuovere il suolo inquinato e trasportarlo in

discariche appositamente destinate. A parte le già citate tecniche di bonifica per mezzo di trattamenti chimico-fisici, su cui non è mio interesse soffermarmi, esistono, e si stanno sempre più diffondendo, i trattamenti “biologici”. Tra questi si distinguono i trattamenti che si basano sull’attività metabolica di microrganismi (*bioremediation*), da quelli che sfruttano le capacità di varie specie vegetali di degradare, estrarre o immobilizzare i contaminanti presenti nei suoli o nelle acque (*phytoremediation*).

La *bioremediation* si basa sulle attività metaboliche svolta da microrganismi a carico di composti frequentemente ma non esclusivamente organici, in comparti ambientali diversi (suolo, acqua ed altri). Esiste infatti, la possibilità di impiegare, in casi particolari, i batteri per modificare la valenza dei metalli e renderli disponibili nella soluzione circolante o, al contrario immobilizzarli nelle particelle del suolo (Zerbi e Marchiol, 2004). Risultati interessanti, ad esempio, si sono osservati trattando scorie minerarie con sospensioni del fungo *Aspegillus niger*, il cui metabolismo sintetizza acidi organici (citrico e gluconico) che hanno la doppia funzione di acidificare la matrice contaminata e chelare i metalli pesanti salubilizzati (Mulligan, 2001). I vantaggi dei trattamenti microbiologici sono da ricercare nei costi molto contenuti, nei bassi consumi energetici, nel ripristino della fertilità del terreno e nel rischio limitato di dispersione degli inquinanti agli altri comparti (i contaminanti vengono degradati). Gli svantaggi derivano dalla necessità di valutare preventivamente l’efficacia del trattamento microbiologico (presenza di nutrienti e tolleranza ai metaboliti prodotti), dalla necessità di continui controlli delle condizioni ambientali (devono essere favorevoli allo sviluppo microbico) e dalla scarsa conoscenza di tutte le applicazioni possibili (ed es. composti xenobiotici) (Rocco e Pin, 2000). Sebbene la *bioremediation* dimostri un impatto positivo per i proprietari delle aree inquinate, per le autorità di controllo e per la comunità locale, la sua adozione è spesso ostacolata dalla difficoltà di prevedere con precisione la durata e il risultato effettivo dell’intervento, ossia il livello di contaminazione residua (Rocco e Pin, 2000).

Con il termine *phytoremediation* si indicano una serie di tecnologie basate sull'uso di piante che, per caratteristiche proprie o geneticamente indotte, sono in grado di decontaminare l'ambiente (Cunningham *et al.*, 1997). La pianta può essere pensata come un sistema di "pompaggio" e trattamento biologico che utilizza energia solare, che si caratterizza per un sistema di captazione degli inquinanti (radici) che si accresce e che quindi permette di aumentare con il tempo l'efficienza del sistema.

La *phytoremediation* comprende diverse strategie di azione per decontaminare terreni, acqua o sedimenti (Prasad e Freitas, 2003):

- **rizofiltrazione:** sfrutta la capacità degli apparati radicali delle piante di assorbire, concentrare e precipitare gli inquinanti e quindi sottrarli sia da matrici solide (suolo) che liquide (acque di scarico, reflui) (Dushenkov *et al.*, 1995; Rocco e Pin, 2000);
- **fitostabilizzazione:** consiste nella riduzione della biodisponibilità degli inquinanti per azione chimico-fisico-meccanica dell'apparato radicale. Evita la dispersione di inquinanti mediante l'estrusione radicale di composti chimici in grado di immobilizzare gli inquinanti nell'interfaccia radice-suolo. Questa tecnologia è indicata soprattutto per suoli moderatamente inquinati (Vangronsveld *et al.*, 1995; Rocco e Pin 2000);
- **fitovolatilizzazione:** le piante volatilizzano e/o traspirano in atmosfera gli inquinanti (Burken e Schnoor, 1997); sono noti casi di fitovolatilizzazione di composti organici e del selenio;
- **fitodegradazione:** consiste nella degradazione dei contaminanti mediante l'uso di piante e dei microrganismi ad esse associate. Le piante agiscono assimilando e trasformando, attraverso le vie metaboliche, gli inquinanti in prodotti intermedi o, al limite, in anidride carbonica ed acqua (Burken e Schnoor, 1997);
- **fitoestrazione:** sfrutta la capacità delle piante di assorbire e traslocare ai comparti cellulari gli inquinanti (Kumar *et al.*, 1995). La scelta della



specie è suggerita da criteri concernenti la loro capacità di rimozione, espressi in: capacità di accumulo (concentrazione nei tessuti in ppm); fattore di accumulazione (rapporto tra la concentrazione di inquinante nel tessuto della pianta e la concentrazione dello stesso nel suolo prima del trattamento); produttività in termini energetici (alla luce di un riutilizzo della pianta come biomassa).

Nel linguaggio comune il termine *phytoremediation* viene spesso tradotto con “fitoestrazione” usando le due espressioni come sinonimi. In realtà, mentre *phytoremediation* indica un concetto, “fitoestrazione” è una specifica tecnologia di bonifica (Prasad e Freitas, 2003).

## LA FITOESTRAZIONE

Il processo di fitoestrazione è complesso, soprattutto perché subentrano elementi variamente correlati l’uno all’altro e che non sono spiegati in maniera completa; esso sfrutta le piante per la rimozione dei metalli dal comparto suolo (Kumar *et al.*, 1995). In generale si può dire che essa rappresenta una possibile soluzione per il recupero ambientale se l’inquinamento è limitato ad una profondità compatibile con la presenza dell’apparato radicale; se le caratteristiche chimico-fisiche del suolo sono compatibili alla crescita vegetale; e se sussistono le condizioni per l’istaurarsi di mutue relazioni tra apparato radicale delle piante e i microrganismi del suolo, così da aumentare l’efficienza del processo (Cunningham e Ow 1996).

In pratica, le piante vengono seminate (trapiantate) e quindi coltivate in un suolo inquinato da metalli pesanti ed il ruolo di assorbimento dell’inquinante è affidato alle radici che traslocano poi il metallo alla parte aerea. La parte epigea delle piante sarà poi asportata e con essa anche i metalli pesanti (Prasad e Freitas, 2003). Saranno esposti nel capitolo di seguito (paragrafo 4.2.1) i possibili usi della biomassa raccolta.

I tempi di bonifica sono molto variabili, da 1 a 20 anni (Kumar *et al.*, 1995) in funzione del tipo e della gravità dell'inquinamento, della durata dello sviluppo della pianta e dall'efficienza estrattiva. Quest'ultima, in generale, è funzione di (Zerbi e Marchiol, 2004):

- biomassa prodotta dalla pianta;
- fattore di bioaccumulazione  $B_f$  dove  $B_f = [Me]_{\text{pianta}} / [Me]_{\text{suolo}}$ ;
- volume di suolo esplorato dalle radici.

Si stima che la percentuale rimossa per ciascun ciclo colturale sia pari al rapporto tra la concentrazione dell'inquinante nella pianta per la biomassa prodotta dalla stessa ( $t_1$ ) e la concentrazione del metallo nel suolo per il volume di suolo esplorato ( $t_2$ ):

$$\% \text{ rimozione} = ( [Me]_{\text{pianta}} * t_1 / [Me]_{\text{suolo}} * t_2 ) * 100.$$

La pianta modello da utilizzare nel processo fitoestrattivi secondo, Blaylock *et al.* (1997) dovrebbe pertanto rispondere alle seguenti caratteristiche: tolleranza ad elevate concentrazioni dell'elemento inquinante; specificità di assimilazione; facilità di gestione colturale; proprietà geneticamente stabili; interesse economico della biomassa, ma le due proprietà principali dovrebbero essere (Kumar *et al.*, 1995; Cunningham e Ow 1996; Blaylock *et al.*, 1997) la capacità di sviluppare in tempi brevi una biomassa elevata e di assorbire e traslocare all'apparato epigeo elevate quantità di inquinanti. Le specie utilizzate nella fitoestrazione devono inoltre essere in grado di tollerare, oltre agli inquinanti, anche suoli con caratteristiche fisico-chimiche sfavorevoli (ad es: pH, salinità, struttura, contenuto idrico) (Prasad e Freitas, 2003). Ultimo, ma non meno importante, la capacità di produrre un apparato radicale denso, in grado di adattarsi e colonizzare il mezzo (Prasad e Freitas, 2003).

### **1.1.9 Destino delle biomasse**

Ancora in fase di studio è il riutilizzo delle biomasse provenienti dal processo di fitoestrazione, soprattutto perché coinvolge diverse competenze tecnico-scientifiche.

Maneggiare grandi quantità di questi rifiuti è un problema e richiede pertanto una riduzione di volume (Blaylock e Huang, 2000) soprattutto per ridurre i costi di trasporto alle discariche di materiali pericolosi. Raskin *et al.* (1997) e Kumar *et al.* (1995) hanno proposto a tal fine di sottoporre la fitomassa a compostaggio e pressatura.

Al fine di recuperare e quindi di ricavare un beneficio economico dalla biomassa fitoestrattiva, uno degli utilizzi proposti è quello dell'impiego a scopo energetico delle biomasse, per mezzo dell'incenerimento. Le ceneri prodotte, ricche in metalli, possono essere destinate a processi estrattivi (recupero del metallo, quando economicamente conveniente), o incorporate in conglomerati cementizi (Cunningham e Ow 1996), in materiali non soggetti a degradazione o, ancora, destinate alla discarica, con il vantaggio di un ridotto volume rispetto alla biomassa tal quale (Kumar *et al.*, 1995; Mosca *et al.*, 2004). Interessante risulta anche il possibile ritorno economico derivato, se la specie scelta lo consente, dall'utilizzo dei frutti, semi ed oli per produzioni *no food* (amido per la produzione di carta, colle, plastiche; olio per la produzione di biodiesel o oli industriali). Questi usi sono resi tali dal fatto che molte piante non traslocano i metalli agli organi riproduttivi (Mosca *et al.*, 2004).

### **1.1.10 Il ruolo degli apparati radicali nella fitoestrazione**

L'indagine dell'apparato radicale consente di evidenziare quali siano i meccanismi che permettono alla pianta di colonizzare la rizosfera e di adattarsi all'ambiente (Mosca, 2000); le radici infatti, sono la struttura a diretto contatto con il substrato e rappresentano il punto di ingresso degli elementi (Peterson, 1983).

La capacità, quindi, delle radici di esplorare il suolo e di interagire con esso, è un fattore chiave nell'ottica di un processo fitoestrattivo, che si basa sulla capacità della pianta, per l'appunto, di assorbire e traslocare gli inquinanti dalle radici alla parte epigea. Le radici, sviluppandosi, sono in grado di espandersi nel mezzo esplorando volumi sempre maggiori di suolo e, unitamente al processo di estrusione di essudati, rendere biodisponibili i metalli favorendo il processo di bonifica (Prasad e Freitas, 2003).

Per molte piante la morfologia del sistema radicale è funzione del rapporto geneticamente scritto tra assorbimento, traslocazione ed efficienza del sistema; anche se le radici mantengono una certa plasticità fenotipica che consente loro di adattarsi al variare delle condizioni del suolo (Keller *et al.*, 2003). Le piante possono manifestare differenti risposte alle condizioni di stress, alcune, infatti, reagiscono approfondendo e sviluppando maggiormente l'apparato radicale, altre ne limitano l'accrescimento.

La tolleranza ed il comportamento radicale, sono due fattori che vanno considerati nella scelta delle piante da utilizzare nel processo di bonifica. Da rilevare inoltre, che la capacità di accumulare metalli pesanti nell'apparato aereo è correlata al rapporto biomassa aerea e biomassa (o lunghezza) radicale (Keller *et al.*, 2003).

Lo studio delle modificazioni a carico dell'apparato radicale per monitorare l'adattamento e la modalità di colonizzazione del mezzo, è il fattore chiave per l'efficienza fitoestrattiva (Keller *et al.*, 2003). L'analisi degli apparati radicali non si deve limitare allo studio delle modalità di assorbimento ma deve approfondire anche le conoscenze sulla morfologia, per la quale le informazioni oggi disponibili sono molto scarse e riferite quasi esclusivamente a *Thlaspi caerulescens*, specie iperaccumulatrice che accresce maggiormente il suo apparato radicale proprio dove maggiore è la concentrazione di metallo (es. zinco).

Vari metodi di studio sono stati usati e altri sono ancora in fase di perfezionamento per cercare di illustrare gli aspetti che sembrano meno chiari o per i quali si dispone di poche informazioni (Mosca, 2000).

## **METODI DI STUDIO DELL'APPARATO RADICALE**

Lo studio degli apparati radicali, vede le sue origini nel XVIII secolo, ma deve la sua importanza alla diffusione dei fertilizzanti chimici (Rubino, 2000). I parametri radicali ricercati e determinabili, riguardano la lunghezza, il peso fresco e secco, la superficie, il diametro delle radici, il volume radicale, la disposizione spaziale (Foti e Tuttobene, 2000) ossia quei parametri indicatori della capacità di colonizzazione il mezzo e quindi correlato alla capacità di assorbimento dell'acqua e degli elementi nutritivi (Barraclough, 1986; De Willigen e Van Noordwijk, 1987), nonché dei metalli pesanti.

I metodi di studio degli apparati radicali vengono distinti in due grandi categorie: metodi distruttivi e metodi non distruttivi a seconda che per l'analisi l'apparato radicale debba essere parzialmente o totalmente distrutto oppure venga conservato, come si evince dal nome stesso (Rubino, 2000). Vi sono poi metodi di tipo indiretto, che si basano su rilevazioni di alcune proprietà chimico-fisiche della radice in risposta a stimoli definiti (Mosca, 2000)

### ***1.1.11 Metodi distruttivi***

Tra metodi distruttivi, quelli maggiormente diffusi sono: monolito; *pinboard*; profilo di trincea; *core-break*; carotaggio. I primi tre permettono di studiare l'apparato radicale prevalentemente in modo descrittivo, fornendo indicazioni sulla distribuzione spaziale tridimensionale delle radici (bidimensionale per il profilo di trincea). Sono metodi laboriosi, lunghi e costosi, usati soprattutto per la caratterizzazione dell'apparato radicale di specie poco note o di recente introduzione. Il *core-break* e il carotaggio sono, invece basati sulla

determinazione della densità radicale lungo il profilo del terreno ed utilizzano, a tale scopo, prelievi di campioni di terreno (carote) in punti prestabiliti, diminuendo di molto gli investimenti in termie di costi e tempi operativi (Rubino, 2000).

**Metodo del monolito.** Indicato per le colture arboree, può essere usato anche per colture erbacee (Rubino, 1984). Prevede il prelevamento del volume di terreno interessato dall'apparato radicale e la separazione delle radici tramite lavaggio *in situ* o in laboratorio (Foti e Tuttobene, 2000). L'apparato radicale isolato può essere osservato, fotografato e sezionato per la determinazione dei parametri di lunghezza, superficie, diametro, biomassa, necromassa (Foti e Tuttobene, 2000). Tale metodo, unitamente a quello del carotaggio, assicura dati attendibili riguardo la reale densità di lunghezza radicale; gli errori possono derivare dalle operazioni di lavaggio in cui si registrano perdite di radici superiori al 30% (Kucke *et al.*, 1995).

**Metodo del *pinboard*.** Rappresenta una variante del monolito (Nuzzo *et al.*, 2000). Utilizza una tavola chiodata per prelevare l'intero (o una porzione rappresentativa) apparato radicale di una pianta, mantenendo quanto più possibile inalterata la sua posizione naturale. Anche in questo caso l'apparato radicale può essere studiato, fotografato nella sua interezza o sezionato per ottenere informazioni più dettagliate (Nuzzo *et al.*, 2000). Si adopera una tavola di legno nella quale sono stati inseriti chiodi d'acciaio inossidabile (Rubino, 1984), disposti a su di una maglia quadrata di 5 cm di lato (Nuzzo *et al.*, 2000). In campo è necessario lo scavo di una trincea adiacente al volume di suolo esplorato dalle radici. La tavola viene inserita parallelamente allo scavo, con un lato a livello della superficie del terreno. I chiodi vengono fatti penetrare nel suolo quindi, utilizzando vanghe o lame di acciaio molto taglienti si circoscrive e si asporta il volume di terreno imbrigliato nel reticolo di chiodi (Nuzzo *et al.*, 2000). Si immerge in acqua in modo da disperdere le particelle terrose. La pulizia viene terminata con un getto d'acqua a bassa pressione (Nuzzo *et al.*, 2000). A questo punto è possibile osservare l'apparato radicale della pianta all'incirca nella stessa posizione occupata in campo (Nuzzo *et al.*, 2000). Il

metodo del *pinboard* viene utilizzato perché permette di studiare nello stesso tempo sia gli aspetti qualitativi che quelli quantitativi dell'apparato radicale in relazione alle caratteristiche del profilo del suolo campionato (Nuzzo *et al.*, 2000).

**Metodo del profilo di trincea.** Indicato per le colture arboree, può essere usato anche per colture erbacee (Rubino, 2000). Il metodo prevede lo scavo di una trincea perpendicolare alle file di semina o di impianto, tale da consentire il rilievo di tutte le radici visibili sulla parete verticale della trincea. La larghezza della trincea deve essere almeno di 60–70 cm per consentire agli operatori un agevole movimento durante le operazioni di conteggio e mappatura delle radici (Rubino, 2000). Sul profilo di trincea viene costruita una maglia a fili di nylon, utile a tracciare su carta la posizione della radice osservata. In questo modo si ottiene la numerosità di radici affaccianti sulla trincea. È possibile, inoltre disegnare su di un foglio di acetato disposto sulla parete della trincea, la traccia delle radici per la loro intera lunghezza visibile (Rubino, 2000). Dalle operazioni suddette si ricava la densità radicale e la lunghezza per unità di volume di terreno.

**Metodo del *core-break*.** Indicato principalmente per le specie erbacee (Rubino, 2000), può essere usato anche per quelle arboree con attenzione alla presenza di grosse radici che ostacolano la discesa della sonda (Rubino *et al.*, 1985). Si basa sul prelevamento di carote di terreno di lunghezza uguale a quella della profondità massima raggiunta dall'apparato radicale della coltura da studiare. Tali carote vengono suddivise in subcampioni di 10 cm ciascuno, che a loro volta vengono spezzati manualmente in due parti uguali; si procede quindi, al conteggio delle radici vive presenti alle due superfici di rottura (Rubino, 2000). Il prelevamento delle carote avviene con sonde cilindriche in acciaio, generalmente di diametro di 7 cm, e di lunghezza variabile tra 60 e 120 cm. L'inserimento nel terreno avviene con un martello pneumatico, mentre l'estrazione è agevolata dall'uso di un paranco (Ellis e Barnes, 1971). I campioni esaminati possono essere utilizzati per individuare la densità radicale separando le radici dal terreno (Rubino, 2000). Ciò che caratterizza

maggiormente il metodo del core-break è la rapidità e semplicità di osservazione, anche se tale metodo non è praticabile in terreni sciolti o argillosi e secchi. Nel primo caso, perché sarebbe difficile ottenere carote integre e suddividerle in subcampioni; nel secondo caso perché sarebbe difficoltoso l'inserimento della sonda nel terreno e per l'irregolarità delle superfici che si ottengono dalla rottura manuale del campione. Difficoltà, inoltre, si incontrano nel carotare terreni con scheletro (Rubino, 2000).

**Metodo del carotaggio.** Consiste nel prelevare carote di terreno di piccole dimensioni utilizzando sonde manuali o meccaniche (Foti e Tuttobene, 2000). Le carote vengono suddivise in subcampioni, corrispondenti agli intervalli di profondità desiderati. In laboratorio avviene la separazione delle radici dal terreno mediante lavaggio manuale o con sistemi automatizzati; si procede poi alla separazione manuale delle radici vive da quelle morte e da altri residui (Foti e Tuttobene, 2000). Dai campioni ottenuti si possono ottenere parametri quali il peso, la lunghezza, il diametro e l'area radicale. Anche questo è un metodo veloce e di semplice applicazione (Foti e Tuttobene, 2000). I limiti maggiori all'utilizzazione di tale tecnica sono da ricercare nella difficoltà di inserimento della sonda in terreni ricchi di scheletro, argillosi e secchi o nella difficoltà di estrarre le carote in terreni sciolti (Foti e Tuttobene, 2000). Il metodo del carotaggio, assieme al metodo del monolito, consentono di determinare correttamente la densità radicale e viene usato per calibrare altri metodi distruttivi (Vepraskas e Hoyt, 1988; Kucke *et al.*, 1995).

### ***1.1.12 Metodi conservativi***

Sono tecniche di studio che permettono di osservare la velocità di accrescimento e la dinamica di sviluppo degli apparati radicali direttamente nel terreno, in maniera continua (Bona, 2000). Tra i vari metodi applicabili si ricorda: metodo della finestra; rizotroni; minirizotroni.



**Metodo della finestra** Questo metodo si basa sull'inserimento nel suolo di pannelli trasparenti, che permettono di osservare e rilevare, in modo continuo e per lunghi periodi, l'accrescimento radicale (Bona, 2000). Con questo metodo si ha un'ampia superficie di osservazione, ma, per contro, la distribuzione spaziale delle radici viene schiacciata su di un piano verticale (Bona, 2000). Le finestre sono disposte verticalmente e perpendicolarmente tra loro in modo da poter dare una corretta interpretazione della geometria radicale nello spazio (Bona, 2000). L'acquisizione dei dati avviene, comunemente, riportando su un foglio di acetato la posizione e la lunghezza delle radici; si valuta in questo modo l'accrescimento ed il turnover radicale (Bona, 2000) cioè la dinamica di formazione-accrescimento e morte-decomposizione delle radici (Vameralli, 2000).

**Rizotroni.** Rappresentano un'evoluzione del metodo della finestra e anch'essi garantiscono uno studio continuo del sistema (Govi, 2000). Si tratta di pareti trasparenti che vengono installate sotto il livello del terreno a creare dei corridoi, oppure applicate a camere di crescita, cioè grandi contenitori a forma di parallelepipedo riempiti con terreno di riporto (Govi, 2000). Comunemente sono usati per studiare l'approfondimento ed il grado di colonizzazione delle radici nel suolo in relazione alla profondità e alle caratteristiche pedologiche (Govi, 2000). Consentono di effettuare valutazioni molto dettagliate, rilevare ad esempio i tubercoli nelle leguminose, evidenziare attacchi fungini o parassitari. Il rilievo è ripetibile sulla stessa porzione di apparato radicale o sulla sua interezza e questo consente una valutazione precisa della dinamica radicale (Govi, 2000). Un aspetto sfavorevole del sistema lo si può trovare nel costo iniziale e di manutenzione (Govi, 2000).

**Minirizotroni.** Sistema costituito da tubi di vario diametro e lunghezza realizzati in materiale trasparente, inseriti nel terreno (Govi *et al.*, 2000). Al loro interno vengono introdotti, periodicamente, degli strumenti ottici che consentono di osservare le radici presenti all'interfaccia con il terreno circostante in maniera continua (Govi *et al.*, 2000). L'affidabilità del procedimento di studio è influenzata da vari fattori, ad esempio varia in

funzione del materiale impiegato, del modo di posizionamento dei minirizotroni, delle caratteristiche dell'apparato ottico usato per le riprese, dalla coltura studiata e dai parametri che si intendono rilevare (Govi *et al.*, 2000). I minirizotroni hanno di solito forma cilindrica, le pareti hanno griglie di riferimento per facilitare il confronto con rilievi temporali successivi e per eseguire il conteggio delle radici. L'estremità inferiore è chiusa per evitare l'ingresso di terreno; l'estremità superiore viene aperta solo durante le osservazioni. Il diametro varia da 3–4 cm a 5–6 cm in funzione soprattutto del sistema di osservazione (e.g. telecamera, fibra ottica) e della precisione che si vuole ottenere: all'aumentare del diametro aumenta anche la superficie dell'interfaccia a contatto con il terreno e quindi il volume di suolo esplorato (Govi *et al.*, 2000). Generalmente vengono inseriti nel terreno inclinati, con angolazioni rispetto alla verticale di 30° o 45° che hanno permesso di ottenere risultati più che soddisfacenti (Govi *et al.*, 2000).

Le operazioni di misura avvengono attraverso elaborazioni automatiche e permettono di acquisire informazioni sulla dinamica radicale (longevità, turnover, periodicità di accrescimento e approfondimento radicale) Per questi parametri, i dati ottenibili con i minirizotroni possono risultare sensibilmente più precisi ed affidabili rispetto a quelli dei metodi distruttivi, soprattutto per comparazioni tra specie o trattamenti (Govi *et al.*, 2000).

### ***1.1.13 Metodi indiretti***

Negli ultimi anni, soprattutto per ridurre la laboriosità che alcune tecniche di analisi prevedevano, si sono introdotti metodi di misura indiretti, che si basano su alcune proprietà fisico-chimiche della radice in risposta, ad esempio, all'applicazione di campi elettrici, magnetici e raggi X (Mosca, 2000). Queste tecniche sono notevolmente più rapide rispetto alle metodiche tradizionali ma sono difficili da calibrare e da mettere a punto. Inoltre sono state sviluppate tecniche di analisi d'immagine con lo scopo di accelerare le misurazioni dei

campioni ottenuti con tecniche tradizionali e allo stesso tempo ridurre l'errore umano (Mosca, 2000).

**Analisi d'immagine.** Si basa sull'uso di software di analisi d'immagine per ottenere una misura delle radici più accurata rispetto al metodo manuale e per velocizzare il procedimento. Generalmente queste analisi d'immagine vengono applicate a metodi come il carotaggio, i rizotroni e i minirizotroni, ma ultimamente sono applicate anche a tecniche innovative come l'NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) o la tomografia assiale computerizzata (Vamerali e Mosca, 2000).

All'acquisizione delle immagini deve essere dedicata estrema attenzione, poiché il successo di queste metodiche è dipendente, per la maggior parte, dalla qualità delle immagini stesse. Nel metodo del carotaggio, e in quelli che prevedono il lavaggio radicale, l'acquisizione delle immagini si effettua su radici disposte accuratamente, evitando le sovrapposizioni, su un vassoio trasparente contenente un velo di acqua di 2–3 mm; tale procedura consente di accelerare notevolmente i tempi di lavaggio, in quanto consente di discriminare le radici dalla maggior parte del materiale indesiderato (Vamerali e Mosca, 2000).

Più difficile l'applicazione ai minirizotroni, perché parte del terreno e altri particolari, condividono la stessa intensità di grigio delle radici, analisi pertanto ancora basata prevalentemente sul conteggio manuale delle radici (Vamerali e Mosca, 2000).

Si sono riscontrate correlazioni anche superiori a 0,95 tra le misure manuali e quelle ottenute con le procedure di analisi d'immagine (Shuman *et al.*, 1993).

**Metodo elettrico.** Il metodo si basa sulla misura della capacità elettrica di un circuito costituito da un elettrodo applicato alla pianta, da un secondo elettrodo inserito nel terreno, dalla pianta stessa e dalla soluzione circolante. I valori sono espressi in Faraday (F) (Vamerali e Mosca, 2000). Questo metodo prende origine dall'osservazione che la capacità elettrica dell'apparato radicale è correlata al suo peso ( $r > 0,7$ ) (Chloupek, 1977).

Le variabili sono tra loro legate dalla relazione lineare (Vamerali e Mosca, 2000):

$$C = a + bx$$

dove **C** è la capacità elettrica, **x** la dimensione dell'apparato radicale, **a** l'intercetta sull'asse C, **b** coefficiente di regressione; relazione che non tiene conto però, del tipo di terreno (tessitura, umidità), dalla specie considerata e dei parametri di frequenza e voltaggio (Vamerali e Mosca, 2000).

In termini elettrici, le radici sono assimilate ad un insieme di condensatori in parallelo, con capacità elettrica additiva e lineare che va aumentando all'aumentare degli elementi che compongono il circuito (Fig 2). La capacità elettrica può essere considerata funzione della superficie radicale a contatto con la soluzione nutritiva e correlata alla superficie attiva della radice.

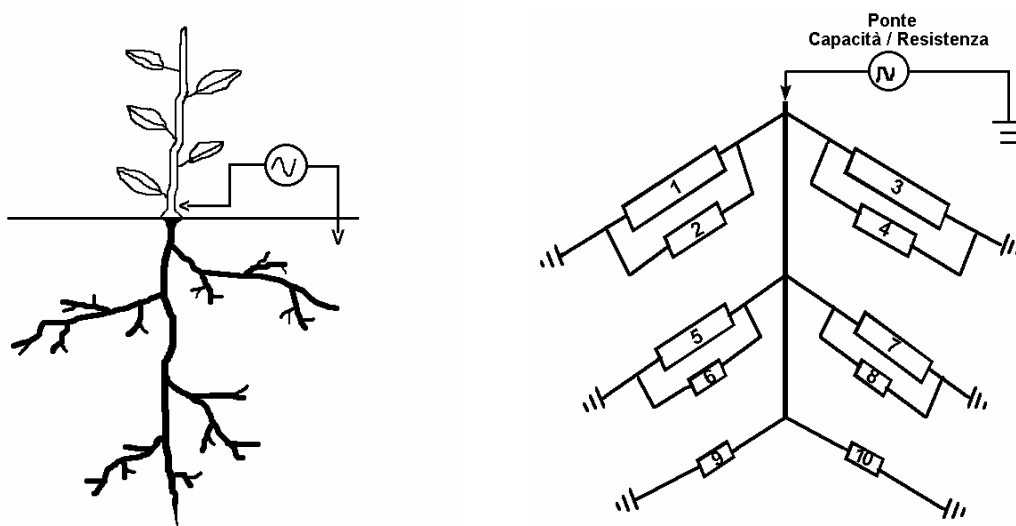


Figura 2 - Rappresentazione di un sistema a ponte "capacità/resistenza" applicato ad una pianta (sx) e relativa schematizzazione elettrica (dx) (Fonte: Dalton, 1995 modificato).

Fattore fondamentale in questo tipo di misurazione è l'umidità del terreno, perché la superficie che la radice espone al contatto con la soluzione circolante si riduce progressivamente al diminuire dell'umidità del suolo (Vamerali e Mosca, 2000); mentre l'aumento dell'umidità del terreno porta ad un incremento del valore della capacità elettrica (Chloupek, 1977). Le misurazioni effettuate eventualmente su terreno secco, possono comunque essere indicatrici

della quota di radici che, a contatto con l'acqua nel terreno, sarebbe in grado di estrarla (Herkelrath *et al.*, 1977).

Questa metodica risulta interessante per seguire, in termini qualitativi, la dinamica di sviluppo radicale, mentre non fornisce dati su parametri quantitativi poiché il processo di suberificazione modifica le caratteristiche elettriche radicali (diminuzione della capacità elettrica) (Vamerali e Mosca, 2000). Essa offre pertanto un risultato che non ha valore in termini assoluti, ma può essere utile per effettuare confronti (Vamerali e Mosca, 2000).

**Metodo gravimetrico.** Si basa sulla correlazione tra svuotamento d'acqua e la presenza di radici, tra due campionamenti successivi. Dal punto di vista operativo il sistema prevede di pesare piante in lisimetro (lisimetri a pesata) in due momenti successivi. La differenza in peso, ipotizzando nulli il fenomeno di evaporazione e il movimento di acqua nel terreno, è correlabile alla densità radicale (Vamerali e Mosca, 2000).

**Metodo a neutroni.** Partendo dall'ipotesi che un flusso di neutroni subisce un rallentamento proporzionale al contenuto volumetrico di acqua (Vamerali e Mosca, 2000), il metodo a neutroni unitamente ad una risonanza magnetica nucleare può essere utile a rilevare la distribuzione delle radici ed il trasporto dell'acqua all'interno dell'apparato radicale (Brown *et al.*, 1986; Rogers e Bottomley, 1987). Di elevata qualità sono le immagini che si ottengono e permettono di individuare la distribuzione delle radici nel terreno e quelle dell'acqua all'interno dell'apparato radicale; per contro questa tecnica presenta elevati costi della strumentazione (Vamerali e Mosca, 2000).

**Tomografia computerizzata.** Sfrutta la diversa attenuazione che subisce un fascio di raggi X attraverso un corpo costituito da materiali o tessuti diversi (Vamerali e Mosca, 2000). Questa metodica può essere usata per osservare la dinamica di accrescimento radicale, dei processi di estrazione dell'acqua da parte delle radici, della dinamica dell'acqua nella matrice solida, ma anche per lo studio della densità del terreno e della concentrazione dei soluti (Vamerali e Mosca, 2000).

## 2. SCOPO ED OBIETTIVI DEL LAVORO

L'attività di ricerca del triennio di dottorato si inserisce nell'ambito di un Progetto di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) svolto in collaborazione tra le Università di Udine, Firenze, Milano e Pisa, che si prefigge come obiettivo comune la valutazione dell'attitudine alla fitoestrazione di metalli pesanti di diverse specie vegetali.

L'attività del dottorato di ricerca ha riguardato lo studio, dapprima in ambiente confinato e successivamente *in situ*, della capacità fitoestrattiva (metalli pesanti) in specie da biomassa di interesse agrario, sia erbacee che arboree, coltivate in un substrato anomalo, costituito in prevalenza da scarti di lavorazione industriale (ceneri di pirite) inquinati da metalli pesanti. In particolare sono state valutate le modificazioni a carico della morfologia dell'apparato radicale utilizzando metodi non distruttivi in raffronto a metodi distruttivi classici.

L'obiettivo ultimo è stato quello di ottenere le informazioni necessarie all'allestimento del primo impianto pilota italiano per la fitoestrazione di metalli pesanti all'interno di un sito di interesse nazionale denominato "Laguna di Grado e Marano e corsi d'acqua limitrofi" (D.M. 468/2001), su terreni di proprietà della Caffaro s.p.a. (Torviscosa, Udine).

Lo studio mira a individuare alcune possibili specie vegetali e gli interventi agronomici più idonei all'applicazione della *phytoremediation* nelle specifiche condizioni sperimentali, anche attraverso la conoscenza dei meccanismi di adattamento delle piante. In particolare, lo studio dell'apparato radicale, struttura della pianta più a diretto contatto con gli inquinanti, sarà indispensabile per valutare le possibili interazioni con l'accumulo dei metalli e la formulazione di possibili interventi correttivi. A tale scopo sono stati saggiati due metodi non distruttivi, tracce radicali su rizobox a parete trasparente e

misura della capacità elettrica, che devono consentire di monitorare la risposta dell'apparato radicale a specifiche condizioni sperimentali o a trattamenti correttivi al suolo.

La sperimentazione è stata condotta sfruttando le informazioni ottenute dalla caratterizzazione preliminare del sito contaminato, ed in particolare dal posizionamento delle ceneri di pirite (oltre 20-30 cm di profondità) e la presenza di una variegata flora spontanea.

La scelta delle specie da saggiare si è basata su queste informazioni, su dati bibliografici e su precedenti studi condotti dal Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova, privilegiando le specie con un apparato radicale fittonante e profondo, in considerazione del posizionamento dell'orizzonte inquinato.

La presenza dell'orizzonte di riporto, ha inoltre suggerito utili indicazioni per l'allestimento delle prove preliminari. In particolare sono state confrontate tecniche di lavorazione del terreno diverse (aratura e ripuntatura) sia *in situ* che in un terreno medio-limoso non inquinato utilizzato come controllo.

Col presente lavoro di dottorato ci si attende, quindi di poter aggiungere utili informazioni sulla tecnica della fitoestrazione dei metalli pesanti, sulle metodiche da seguire nell'allestimento di un impianto *in situ*, dati a tutt'oggi non disponibili, sulle specie e sulle caratteristiche morfologiche degli apparati radicali più idonei per massimizzare l'efficienza della fitoestrazione nelle specifiche condizioni operative.

### 3. MATERIALI E METODI

L'attività di ricerca è stata svolta nell'area di proprietà Caffaro s.p.a. sita nel comune di Torviscosa (Udine) nella perimetrazione del Sito di Interesse Nazionale denominato: "Laguna di Grado e Marano e dei corsi d'acqua limitrofi" (D.M. 468/2001). All'interno dell'industria Caffaro, attiva nella chimica di base e nella sintesi di diversi composti chimici, l'area oggetto di studio è stata ricavata in una superficie un tempo destinata a deposito delle ceneri di pirite, scarto della lavorazione del disolfuro di ferro arrostito per l'estrazione dello zolfo e la produzione di acido solforico. In questa zona è stata individuata un'area di 2000 m<sup>2</sup>, ad un'altitudine di 1,4 m s.l.m., scelta per la maggiore omogeneità di deposito (Fig. 3).



Figura 3 - Sopralluogo preliminare dell'area Caffaro di deposito materiale, in primo piano lo zolfo affiorante sulla pirite.



## CARATTERIZZAZIONE DEL SITO

Le Lagune di Grado e Marano fanno parte del primario sistema di lagune e di ambienti umidi di transizione, che si estende lungo le coste dell'Adriatico settentrionale, da Ravenna alle foci dell'Isonzo. Il bacino idrografico delle Lagune di Grado e Marano è costituito dal territorio individuato fra le foci dei fiumi Tagliamento ad ovest ed Isonzo ad est, per un'estensione di 719 km<sup>2</sup>. L'intero territorio rientra nei Siti di Interesse Comunitario (SIC) e nell'elenco delle Zona di Protezione Speciale (ZPS). Nell'area è presente l'importante zona industriale dell'Aussa-Corno, che interessa soprattutto il territorio del Comune di San Giorgio di Nogaro e in minima parte i Comuni di Torviscosa, Cervignano, Terzo d'Aquileia e Carlino. Le aziende, legate al consorzio per lo sviluppo industriale della zona di Aussa-Corno, sono in totale 85 e sono raggruppate in 12 settori industriali distinti (alimentare, chimico, conciario, deposito, impianti di trattamento, lavorazione di minerali e legno, manifatturiero, metalmeccanico, nautico, siderurgico e tessile); tra questi sono prevalenti i settori chimico, manifatturiero, metalmeccanico e siderurgico (Ciafani *et al.*, 2005).

Per quanto concerne Torviscosa, l'inquinamento dell'area è attribuibile quasi interamente agli sversamenti di mercurio residuati della lavorazione della cellulosa, che hanno determinato l'iscrizione dell'area stessa nell'elenco dei Siti di Interesse Nazionale ("Laguna di Grado e Marano e dei corsi d'acqua limitrofi") secondo il D.M. 468/2001.

L'inizio della contaminazione si fa risalire al 1949, in cui si stima un apporto di inquinanti pari circa a 20 kg/d, media scesa a 6-7 kg/d nel 1970. Lo sversamento è continuato fino al 1984, anno che ha visto l'istallazione di sistemi più efficienti di recupero del mercurio, con attuali perdite dichiarate totali in aria, acqua e negli scarti di produzione di circa 0,2-0,5 g Hg/t capacità produttiva anno (dati forniti da Caffaro spa attuale proprietaria dell'area sita a Torviscosa).

Lo stabilimento responsabile dell'inquinamento fu inaugurato nel 1938 per iniziativa della società Snia. Nel 1950 viene avviato l'impianto di elettrolisi (della salamoia di cloruro di sodio) a celle di mercurio per la produzione di cloro e soda, materie ausiliarie nella produzione di cellulosa e di fibre artificiali (viscosa). Agli inizi degli anni '90 viene chiusa la produzione della cellulosa e della pasta semichimica. Nel 1996 subentra nella proprietà aziendale la ditta Caffaro e entra in servizio l'impianto per la produzione di cloroparaffine (con il cloro prodotto dalle celle a mercurio). Nel 2002 viene presentato dalla Caffaro il progetto per un nuovo impianto cloro/soda di elettrolisi a membrane (quindi senza mercurio), che a tutt'oggi non è stato ancora realizzato. All'inquinamento da mercurio dell'area, soprattutto nella laguna di Grado, ha contribuito anche il fiume Isonzo, in cui confluivano, fino alla metà del secolo scorso, reflui di lavorazione provenienti dalla miniera di cinabro (MgS) di Idria in Slovenia (Ciafani *et al.*, 2005).

In particolare, il sito dal quale sono stati prelevati i materiali inquinanti, si estende per un'area di 130 ettari, di cui 10 occupati dagli stabilimenti e dagli impianti della Caffaro e si trova a ridosso dell'abitato di Torviscosa, a breve distanza dalla S.S. n° 14 e dalla ferrovia Venezia-Trieste.

L'area oggetto di studio si presenta come deposito di scarti di lavorazione industriale. Le ceneri di pirite in essa presenti, derivano dal processo industriale di arrostitimento del solfuro di ferro usato per l'ottenimento dell'acido solforico, processo questo, che libera, durante il trattamento, solfuri metallici quali pirite ( $\text{FeS}_2$ ), blenda ( $\text{ZnS}$ ) e galena ( $\text{PbS}$ ). Le scorie risultanti dal processo ossidante sono una polvere rossa, priva di sostanza organica, che contengono elevate quantità di ferro (60 – 85%) sotto forma di ematite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), residui di zolfo (3 – 6%) e forti concentrazioni di arsenico, ferro, mercurio, rame, piombo, cadmio e zinco che sono componenti del minerale, cui si aggiunge il vanadio utilizzato come catalizzatore durante il processo di produzione dell'acido solforico (Zerbi *et al.*, 2004). Le ceneri di pirite sono classificate come “*rifiuti non pericolosi sottoposti a processi semplificati di recupero*” ai sensi degli articoli 31 e 33 del D.

L.vo del 5 febbraio 1997 n. 22, con integrazione da parte del “Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio” del 27 luglio 2004.

Nel dicembre 2003 è stato fatto un sopralluogo preliminare dell’intera area Caffaro interessata dal deposito degli scarti di lavorazione della pirite. In questa è stata individuata un’area di 2000 m<sup>2</sup>, che si colloca presso un fabbricato industriale in disuso, scelta per la maggiore omogeneità di deposito in cui è stato installato il primo impianto pilota in Italia di fitoestrazione *in situ*.

L’impianto per il controllo è stato effettuato nell’azienda agraria sperimentale “L. Toniolo” dell’Università di Padova a Legnaro, in un terreno medio-limoso. È evidente che tale controllo ha solo un valore indicativo, dal momento che i due impianti si trovano in regioni geograficamente e climaticamente diverse, ed il terreno non ha le stesse caratteristiche chimico-fisiche.

### 3.1.1 Rilievo pedologico

Il 17 dicembre 2003, è stata eseguito un rilievo per evidenziare la stratigrafia del sito; tale indagine è stata effettuata per mezzo dello scavo di trincee di indagine e carotaggi (Fig. 4).

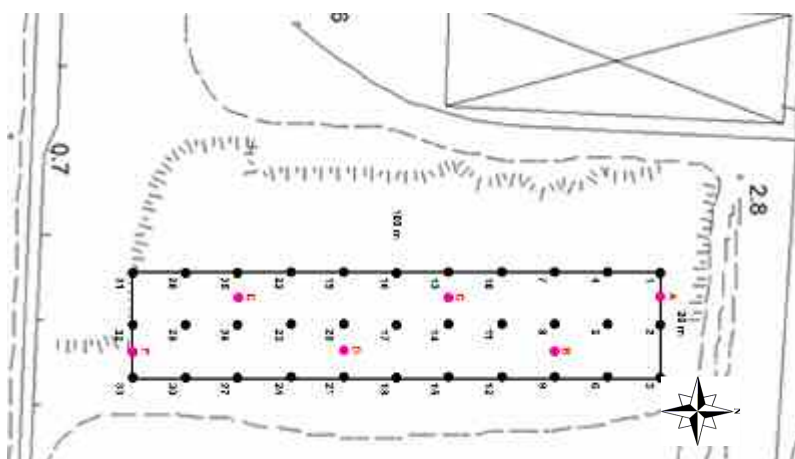


Figura 4 - Perimetro dell’area di 2000 m<sup>2</sup> destinata al campionamento. I numeri indicano i campioni prelevati dal personale Università (carotaggi); le lettere i prelievi Caffaro (trincee).

### 3.1.2 Rilievo floristico

Nonostante l'apparente inospitalità del sito rappresentata dalla tipologia del substrato e dalle sue caratteristiche chimico-fisiche, esso presenta una certa copertura vegetale spontanea, pur discontinua, che comprende sia specie erbacee che arboree ed arbustive, con una netta prevalenza di quelle erbacee, per numerosità di specie. Tramite un'indagine floristica, il 17 maggio 2005 è stata classificata la popolazione vegetale riportata in Tabella 2:

Tabella 2 - Specie spontanee, individuate nel sito inquinato. In grassetto sono evidenziate le specie più rappresentate (% di copertura).

Specie erbacee	Famiglia	Specie erbacee	Famiglia
<b>Ambrosia artemisiifolia L.</b>	<b>Asteraceae</b>	<i>Hipericum perforatum L.</i>	<i>Gutiferae</i>
<i>Artemisia profumata</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Mentha sp.</i>	<i>Labiatae</i>
<i>Bidens frondosa L.</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Salvia pratensis L.</i>	<i>Labiatae</i>
<i>Cirsium arvense (L.) Scop.</i>	<i>Asteraceae</i>	<b>Dorycnium pentaphyllum Scop.</b>	<b>Leguminosae</b>
<i>Cirsium vulgare (Savi) Ten.</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Lathyrus sylvestris L.</i>	<i>Leguminosae</i>
<i>Diplotaxis tenuifolia (L.) DC.</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Lotus corniculatus L.</i>	<i>Leguminosae</i>
<i>Erigeron annuus (L.) Desf.</i>	<i>Asteraceae</i>	<b>Medicago lupulina L.</b>	<b>Leguminosae</b>
<b>Eupatorium cannabinum L.</b>	<b>Asteraceae</b>	<i>Medicago sativa L.</i>	<i>Leguminosae</i>
<i>Leontodon hispidus L.</i>	<i>Asteraceae</i>	<b>Melilotus album Desr.</b>	<b>Leguminosae</b>
<i>Picris echioides L.</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Trifolium pratense L.</i>	<i>Leguminosae</i>
<i>Solidago gigantea Aiton</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Trifolium repens L.</i>	<i>Leguminosae</i>
<i>Sonchus oleraceus L.</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Vicia sativa L.</i>	<i>Leguminosae</i>
<b>Taraxacum officinale Weber.</b>	<b>Asteraceae</b>	<i>Plantago lanceolata L.</i>	<i>Plantaginaceae</i>
<i>Tussilago farfara L.</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Plantago major L.</i>	<i>Plantaginaceae</i>
<i>Myosotis arvensis (L.) Hill.</i>	<i>Boraginaceae</i>	<i>Polygonum aviculare L.</i>	<i>Polygonaceae</i>
<i>Cerastium glomeratum Thuill.</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Polygonum lapathifolium L.</i>	<i>Polygonaceae</i>
<i>Silene alba (Mill.) Krause</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Rumex acetosa L.</i>	<i>Polygonaceae</i>
<i>Silene vulgaris (Moench) Garcke</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Ranunculus bulbosus L.</i>	<i>Ranunculaceae</i>
<i>Cardamine hirsuta L.</i>	<i>Cruciferae</i>	<i>Potentilla reptans L.</i>	<i>Rosaceae</i>
<i>Lepidium campestre (L.) R.Br.</i>	<i>Cruciferae</i>	<i>Rubus fruticosus L.</i>	<i>Rosaceae</i>
<b>Carex hirta L.</b>	<b>Cyperaceae</b>	<b>Sanguisorba officinalis L.</b>	<b>Rosaceae</b>
<i>Dipsacus sativus L.</i>	<i>Dipsacaceae</i>	<i>Galium album L.</i>	<i>Rubiaceae</i>
<i>Geranium columbinum L.</i>	<i>Geraniaceae</i>	<i>Sherardia arvensis L.</i>	<i>Rubiaceae</i>
<i>Alopecurus pratensis L.</i>	<i>Graminaceae</i>	<i>Chaenorrinum minus</i>	<i>Scrophulariaceae</i>

<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P.Beauv.	Graminaceae	<i>Veronica persica</i> Poir.	Scrophulariaceae
<i>Bromus arvensis</i> L.	Graminaceae	<i>Daucus carota</i> L.	Umbelliferae
<i>Bromus hordeaceus</i> L.	Graminaceae	<i>Verbena officinalis</i> L.	Verbenaceae
<i>Bromus sterilis</i> L.	Graminaceae		
<i>Calamagrostis</i> sp.	Graminaceae		
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Graminaceae	<b>Specie legnose</b>	<b>Famiglia</b>
<i>Dactylis glomerata</i> L.	Graminaceae	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	Rosaceae
<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	Graminaceae	<i>Populus alba</i> L.	Salicaceae
<i>Holcus lanatus</i> L.	Graminaceae	<i>Populus canescens</i> L.	Salicaceae
<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin.	Graminaceae	<i>Pyracantha coccinea</i> M.J. Roemer	Rosaceae
<i>Poa pratensis</i> L.	Graminaceae	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Leguminosae
<i>Poa trivialis</i> L.	Graminaceae	<i>Salix alba</i> L.	Salicaceae
<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	Graminaceae	<i>Cornus sanguinea</i> L.	Cornaceae

Le specie sono state censite nell'area adiacente al perimetro del sito. Questa è stata preliminarmente suddivisa in 4 fasce che si distinguevano per la dislocazione spaziale e per la presenza di specie legnose. In particolare lungo il lato ovest del perimetro dell'impianto pilota, sono state identificate due fasce parallele una con copertura prevalentemente legnosa (fascia A) e l'altra, compresa tra la limitazione del sito e la fascia A, a copertura erbacea (fascia B). Sul lato sud la fascia C, con sola vegetazione erbacea, mentre lungo il lato est la fascia D con vegetazione erbacea e legnosa (Fig. 5).

La percentuale di copertura vegetale è stata determinata assegnando ad ogni specie censita un valore di presenza e rapportando successivamente i valori a 100.

Delle piante maggiormente presenti (percentuale superiore al 5%) sono stati raccolti campioni della biomassa aerea, mineralizzati e sottoposti a lettura ICP, per determinare il contenuto di metalli pesanti nei tessuti e valutare le strategie di adattamento di tali specie. Le analisi sono state fatte in doppio. In modo analogo si è proceduto per le specie arboree, di cui è stata prelevata una porzione di ramo di un anno di età.

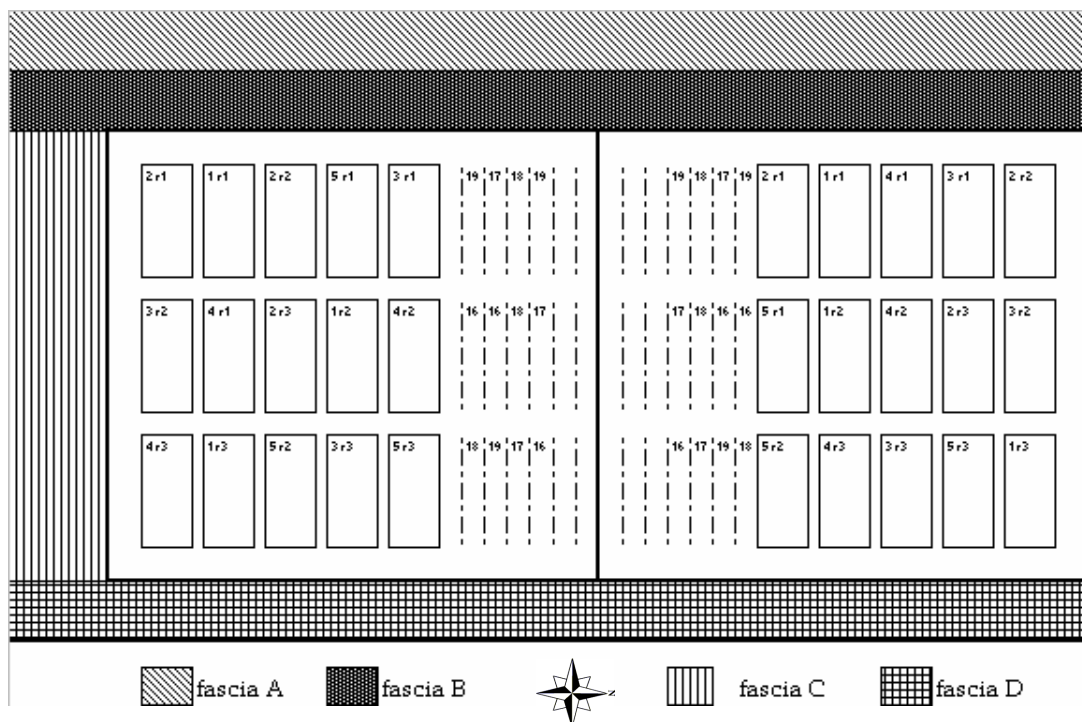


Figura 5 - Rappresentazione schematica delle fasce di rilievo della vegetazione.

## PREMESSA

Data la natura particolare del substrato (ceneri di pirite) si è resa necessaria una fase preliminare di ricerca in ambiente controllato (serra e mesocosmo) per ricavare utili informazioni tecniche ed operative da poter sfruttare poi nell'allestimento dell'impianto pilota di fitoestrazione di metalli pesanti *in situ*. La presenza di un orizzonte di riporto (ghiaia eterometrica frammista a terreno) e di vegetazione spontanea, ha fatto pensare alla possibilità di sovrapporre alle ceneri di pirite un orizzonte di terreno moderatamente inquinato o non inquinato per agevolare l'insediamento delle piante. L'attività sperimentale si è distinta, quindi, in un primo lavoro di ricerca svolto presso l'azienda agraria sperimentale di Legnaro "L. Toniolo" con prove in serra ed in vaso (2004-2005), ed un secondo di attività svolta *in situ* a Torviscosa.

Per chiarezza espositiva le prove saranno riferite distinte in due filoni principali, distinguendo le sperimentazioni effettuate in base alla tipologia di specie utilizzate: specie erbacee e specie arboree

## SPECIE ERBACEE

La selezione delle specie erbacee da utilizzare è stata fatta innanzitutto sulla base ai risultati ottenuti in precedenti sperimentazioni condotte dal medesimo gruppo di ricerca, riguardanti il miglioramento dell'efficienza agronomica della fitoestrazione di metalli pesanti (Mosca *et al.*, 2004). Le piante, tutte di interesse agronomico, sono state quindi scelte in base all'attitudine per la fitoestrazione, per la struttura dell'apparato radicale (profondo ed espanso), nell'ottica di una destinazione *no—food* della biomassa prodotta e per il ciclo colturale, allo scopo di poter mantenere una copertura costante del terreno durante tutto l'anno. In particolare si è deciso di lavorare con:

*Helianthus annuus* var. *Barolo*; *Medicago sativa* var. *Europe*; *Raphanus sativus* var. *Siletta nova*; specie a ciclo primaverile-estivo,

*Hordeum vulgare* var. *Orlando* (per le prove di mesocosmo, semina autunnale);

*Hordeum vulgare* var. *Pilastro* (per le prove *in situ*, semina primaverile).

*Lolium multiflorum* var. *Lenore*, semina autunnale.

## PROVE PRELIMINARI IN SERRA - MICROCOSMO

### 3.1.3 Scelta delle specie

Per le prove preliminari in microcosmo le specie utilizzate, delle 5 elencate precedentemente, sono state le prime 3, a semina primaverile estiva, ossia girasole, erba medica e rafano.

In particolare *Helianthus annuus* L., dall'attività di ricerca del Dipartimento di Agronomia, ha dimostrato una maggiore capacità di concentrazione e di asportazione complessiva di metalli pesanti, grazie anche all'elevata resa in

biomassa, rispetto ad altre specie oggetto di studio. Gli acheni potrebbero essere impiegati per l'estrazione dell'olio da destinare alla produzione di biodiesel ed, inoltre, presenta una radice fittonante che si approfondisce, in assenza di ostacoli, oltre i 100 cm, limite dell'inquinamento nel sito di Torviscosa.

*Medicago sativa* L. è stata scelta soprattutto per le caratteristiche morfologiche dell'apparato radicale, anch'esso fittonante e profondo, che presenta inoltre un abbondante capillizio nei primi 50 cm di terreno. È una pianta poliennale che non richiede cure particolari ed è quindi facilmente gestibile.

*Raphanus sativus* L. appartiene alla famiglia botanica delle *Brassicaceae*. Tale famiglia è nota per comprendere specie capaci di accumulare metalli pesanti in quantità significative, ed il rafano ne è un esempio. Dall'attività di ricerca del Dipartimento di Agronomia, è stata evidenziata la scarsa sensibilità alla presenza di metalli pesanti, con accrescimenti radicali nettamente superiori alle altre specie saggiate in precedenti sperimentazioni. Significativa è stata anche l'asportazione di alcuni metalli pesanti.

### **3.1.4 Trattamenti**

Data la scarsa permeabilità dimostrata dalle ceneri di pirite, le prove preliminari (micro- e meso-cosmo) sono state eseguite utilizzando come substrati di coltivazione miscugli di ceneri di pirite e sabbia di fiume al 50% in peso (*T*) in raffronto al terreno medio-limoso (dell'azienda agraria sperimentale L. Toniolo (Legnaro -PD-) anch'esso mescolato al 50% in peso a sabbia di fiume (*L*). Sono stati messi a confronto trattamenti diversificati tra loro in base alla quantità di pirite presente, in modo da ottenere 4 trattamenti di cui un controllo (Fig. 6):

1. solo miscuglio "T" (*T100*),
2. "T" cui è stato sovrapposto un orizzonte di ricoprimento "L" di 7 cm (*T37L7*),



3. "T" cui è stato sovrapposto un orizzonte di ricoprimento "L" di 15 cm (T29L15),
4. solo miscuglio "L" (L100).

Si è resa necessaria tale operazione di mescolamento perché, in un test preliminare, soprattutto per le ceneri di pirite, si è evidenziato un problema di drenaggio; infatti tali ceneri, compattandosi, non lasciavano percolare l'acqua creando un ristagno superficiale. Per avere un'omogeneità dei substrati si è dovuto quindi ricorrere alla correzione anche del terreno aziendale. Nel corso della trattazione, quando si leggerà "terreno di Legnaro" si dovrà considerare il miscuglio di terreno e sabbia nelle proporzioni suddette, quando si leggerà "ceneri di pirite" si dovrà considerare il miscuglio di ceneri di pirite inquinate da metalli pesanti e di sabbia, sempre nelle stesse proporzioni.

L'utilizzo di un orizzonte di ricoprimento con terreno "sano" è stato suggerito dalla presenza nel sito di Torviscosa di uno stato di riporto costituito in prevalenza da scheletro e terreno, come già esposto.

### **3.1.5 Vasi**

La prova è stata allestita in serra utilizzando vasi (rizobox cilindrici in plexiglas trasparente), diametro interno 50 mm, diametro esterno 57 mm, lunghezza 450 mm, le cui superfici di taglio sono state sagomate a 45° rispetto la verticalità del vaso stesso, in modo che, una volta posata la base del vaso al piano d'appoggio, lo stesso presentasse un'angolazione di 45° rispetto al piano orizzontale. Questa disposizione era funzionale ai rilievi non distruttivi (tracce colorate), sugli apparati radicali (si veda il paragrafo 3.4.5.6).

I vasi sono stati sistemati sui pianali di una serra, sorretti da una struttura metallica, appositamente realizzata, per far mantenere l'angolazione suddetta. All'estremità inferiore di ogni tubo è stata incollata una rete plastica a maglia fine in modo da evitare la fuoriuscita del substrato durante le operazioni di riempimento e movimentazione degli stessi. Ogni tubo è stato avvolto con un

foglio di acetato trasparente (foglio lucido) per permettere di registrare con pennarelli di differenti colori l'accrescimento radicale in epoche diverse. Per evitare che la radiazione luminosa raggiungesse le radici e per coibentare il più possibile il sistema radicale, i contenitori sono stati inseriti in un tubo d'acciaio flessibile; all'estremità superiore, per chiudere lo spazio tra il vaso ed il tubo di ricoprimento in acciaio ed ancora, per avere una buona coibentazione, è stato inserito un materiale sintetico spugnoso (Fig. 7)



Figura 6 - Erba medica (repliche 4) nei vasi di plexiglas al 2 luglio 2004. Si notino i diversi trattamenti saggianti visibili dalle pareti trasparenti dei (da sinistra rispettivamente T100, T37L7, T29L15, L100).



Figura 7 - Girasole (repliche 4) si possono vedere i tubi di acciaio di coibentazione ed il materiale sintetico spugnoso di copertura.

### 3.1.6 *Semina e cure colturali*

La semina è avvenuta il 18 giugno 2004. Si sono eseguite, per ciascuna specie, 6 repliche per i 4 diversi tipi di substrato, per un totale quindi di 72 vasi. La numerosità sperimentale è stata pari a 6, di cui 3 repliche campionate in itinere e 3 a fine esperimento.

Sono stati seminati per girasole e rafano, 6 semi per vaso, mentre si sono usati più di 20 semi per l'erba medica, questo per avere la garanzia di ottenere

almeno una pianta per replica nel caso del girasole e del rafano e almeno cinque piante nel caso dell'erba medica.

Ad emergenza avvenuta, un primo diradamento è stato eseguito il 24 giugno 2004, togliendo solo alcune piante per il girasole, lasciando dieci piante per l'erba medica e quattro per il rafano.

Il diradamento definitivo è stato eseguito il 2 luglio 2004, lasciando una sola pianta per vaso per girasole e rafano e cinque per l'erba medica.

Dalla data del primo diradamento, è stata fornita una soluzione nutritiva (soluzione Hogland 1:2) per sostenere la crescita e lo sviluppo delle piante.

Durante lo svolgimento dell'esperimento si sono resi necessari dei trattamenti insetticidi contro la mosca bianca delle serre l'8 luglio 2004 e contro i minatori fogliari il 12 luglio 2004.

### ***3.1.7 Rilievi effettuati***

I rilievi effettuati sono stati eseguiti per rilevare lo stato fisiologico delle piante (misure SPAD e fluorimetriche) e lo sviluppo radicale attraverso metodi sia conservativi (metodo delle tracce radicali e metodo elettrico) che tradizionale distruttivo (campionamento distruttivo). Della parte aerea è stata inoltre determinata la produzione di biomassa (peso secco) ed il contenuto in metalli pesanti ed altri elementi. Si riportano di seguito le procedure seguite, illustrando nell'ordine, i rilievi effettuati sulla parte aerea e quindi sull'apparato radicale, svincolandosi dalla *consecutio temporum*.

#### **3.1.7.1 SPAD**

Lo SPAD (Prosdocimi *et al.*, 2003) è uno strumento che permette di valutare, mediante un metodo non invasivo, il quantitativo di clorofilla, presente nelle foglie. Dal momento che la concentrazione di clorofilla è correlata positivamente con la concentrazione di N della foglia, la misura dello SPAD

può essere collegata all'azoto fogliare attraverso un'equazione di regressione, e lo SPAD usato come strumento diagnostico rapido, quale indicatore dello stato di nutrizione azotata della pianta.

Con questa metodologia viene rilevata la trasmittanza differenziale della luce (Fig. 8), eseguendo un rilievo puntiforme su una foglia rappresentativa. Il valore, espresso in unità SPAD, che si ottiene è adimensionale e sarà tanto maggiore quanto maggiore è il contenuto di clorofilla.

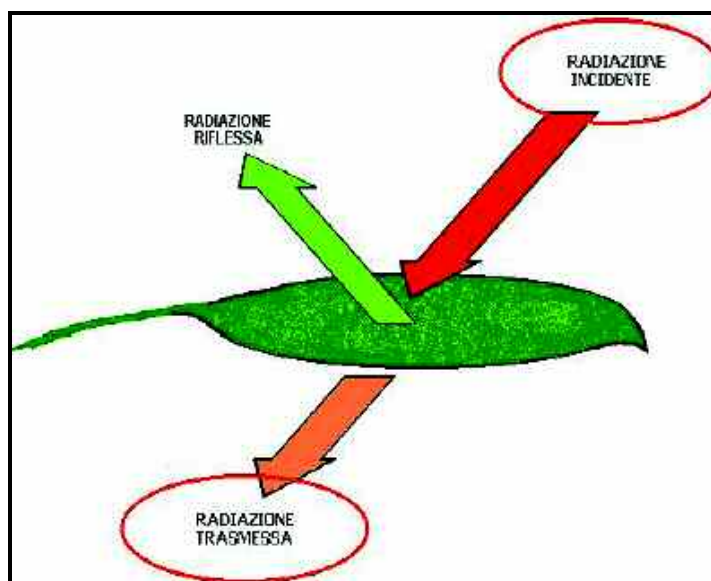


Figura 8 - Rappresentazione schematica delle componenti della radiazione attraverso una foglia. La radiazione trasmessa rappresenta il valore rilevato con lo SPAD.

La misura viene effettuata nella regione spettrale del rosso (circa 650 nm) dove si ha uno dei picchi di assorbimento della clorofilla; l'altro picco di assorbimento si trova a circa 450 nm nella regione del blu.

Nei campionamenti è stato utilizzato il modello *Minolta Chlorophyll Meter* SPAD-502 (Fig. 9), costituito da tastiera, schermo LCD e testata di misurazione (pinza) in cui sono situati i due LED della sorgente luminosa e il fotodiode recettore. Lo SPAD 502 presenta un sistema di misura a densità ottica a due differenti lunghezze; un'area di misura: 2x3 mm; la possibilità di memorizzare fino a 30 misure, un'accuratezza di misura variabile di 1,0 unità SPAD ed una scala di unità SPAD da 0 a 50.



Figura 9 - Minolta Chlorophyll Meter SPAD-502.

Per eseguire un rilievo è necessario individuare la foglia rappresentativa e pinzarla in modo da far aderire perfettamente lo strumento con la superficie vegetale. Dai due *LED* viene emessa luce in sequenza con una lunghezza d'onda corrispondente al rosso (picco a 650 nm) e all'infrarosso (picco a 940 nm). La luce che attraversa la superficie fogliare giunge al recettore, sensore luminoso, che converte la luce trasmessa in corrispondenti segnali elettrici. L'amplificatore, quindi, incrementa questi segnali analogici, i quali, mediante il convertitore A/D, vengono modificati in segnali digitali. In fine, il microprocessore calcola le unità SPAD corrispondenti (Minolta Camera Co. Ltd., 1989).

I rilievi, sono stati eseguiti a 39 GDS, prendendo come rappresentativa l'ultima foglia completamente formata per ogni singola replica (Fig. 10); nel girasole e nel rafano sono state eseguite 5 "pinzature" per foglia, tenendo come dato finale, la media dei valori. Nell'erba medica date le ridotte dimensioni delle foglie, il valore di SPAD è relativo alla media di 3 misurazioni eseguite una per ogni componente della foglia trifogliata rappresentativa. Nel caso di quest'ultima specie coltivata su sola pirite, a causa del ridotto accrescimento, si è proceduto alla registrazione di un solo dato per pianta.



Figura 10 - Rilievo su foglia di rafano con SPAD. Momento della pinzature e lettura dei dati.

### 3.1.7.2 Fluorimetro

Il fluorimetro è uno strumento che consente di valutare lo “stress” della pianta, in base alla funzionalità del fotosistema II, considerando il rapporto tra il valore di fluorescenza variabile ( $F_v = F_m - F_o$ ) e fluorescenza massima ( $F_m$ ) (Waltz, 1987; Schreiber *et al.*, 1994).

$F_o$ : *fluorimetria* a riposo, cioè al buio. Rappresenta l’emissione di fluorescenza da parte dei pigmenti antenna prima che l’eccitazione sia migrata nei centri di reazione. La resa quantica di  $F_o$  può essere calcolata mediante incubazione al buio per alcune ore oppure, in maniera più efficace, mediante una pre-illuminazione con luce *far-red*. Il livello di  $F_o$  può essere influenzato dagli stress ambientali che causano alterazione strutturali a livello dei pigmenti di PS-II (Waltz, 1987; Schreiber *et al.*, 1994).

$F_m$ : *fluorimetria* massima, dovuta all’eccitazione in seguito ad un evento luminoso degli elettroni ed il loro conseguente ritorno a riposo (Waltz, 1987; Schreiber *et al.*, 1994).

Tutti gli eventi che sono implicati nella fotosintesi compreso il trasporto di elettroni, il trasferimento di protoni attraverso la membrana tilacoidale, la fosforilazione e la riduzione della CO<sub>2</sub> possono influenzare la fluorescenza clorofilliana. Ciò permette di valutare quale sia il funzionamento dell'apparato fotosintetico e lo stato fisiologico delle piante (Schreiber *et al.*, 1994).

In seguito all'applicazione di un impulso saturante (500 ms a 4000 mole m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) l'emissione di fluorescenza risale velocemente fino al livello massimo F<sub>m</sub>, per poi ridiscendere velocemente allo stato di F<sub>0</sub>, la differenza tra F<sub>m</sub> e F<sub>0</sub> è denominata (F<sub>v</sub>)<sub>m</sub> cioè fluorescenza variabile massima. Mediante questa misura si determina la massima efficienza quantica del fotosistema II, valutata attraverso il rapporto  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ; tale valore è circa pari a 0,8 in una pianta sana indipendentemente dalla specie. Un valore più basso indica che parte dei centri di reazione del fotosistema II sono danneggiati, cioè si sta verificando un fenomeno di fotoinibizione, spesso correlato a condizioni di stress a cui è sottoposta la pianta (Waltz, 1987; Schreiber *et al.*, 1994).

Il PAM (Waltz, 1987) è un fluorimetro che si avvale di un diodo emettitore di luce pulsata e misura, una volta amplificata, la risultante emissione fluorescente, anch'essa pulsata, del campione. Questo permette di rendere il PAM un sistema estremamente selettivo e sensibile, indipendentemente dalla quantità e qualità della luce attinica. Ciò è confermato dall'emissione fluorescente misurata dallo strumento, che può essere anche d'intensità 10<sup>-6</sup> volte inferiore a quella della luce attinica.

Un fluorimetro PAM (Waltz, 1987) è costituito da una unità emettitore/ricevitore (LED emettitore di luce pulsata e fotodiodo ricevitore); un sistema a fibre ottiche che trasmette la luce dall'emettitore al campione (foglie) e la fluorescenza emessa al ricevitore; una unità di controllo, per regolare voltaggio ed intensità del fascio di luce pulsata, e un PC con installato l'apposito software (DA100). Il modello usato nella prova è il *Walz KL 1500* (Fig. 11).



Figura 11 - Fluorimetro modello Walz KL 1500. Sulla sinistra l'emettitore, al centro l'unità di controllo e sulla destra il PC per le elaborazioni.

L'eccitazione della fluorescenza avviene con frequenze variabili da 1,6 a 100 KHz con impulsi di 1  $\mu$ sec e solo l'emissione fluorescente pulsata viene amplificata in modo da eliminare tutte le interferenze dovute alla luce attinica, a eventuali radiazioni parassite e alla fluorescenza dovuta all'eccitazione della luce attinica.

Per poter effettuare le misure fluorimetriche, eseguite a 39 GDS, le piante sono state poste al buio per due ore, in modo da azzerare il sistema fotosintetico e successivamente per ciascun trattamento si è rilevata la fluorimetria sull'ultima foglia completamente formata.

I rizobox sono stati posti in prossimità dello strumento, dove, per mantenere immobile la pianta, è stato predisposto un supporto per i tubi. Quindi si è avvicinata l'estremità del sistema a fibre ottiche alla superficie fogliare e si è misurata la fluorescenza di base  $F_0$ . Nei casi in cui tale valore differisse da quelli di riferimento (0,5 e 0,6 mV), si è proceduto a settare il voltaggio e l'intensità luminosa in modo da riportare lo strumento ai valori desiderati.



Quindi, è stato acceso il lampo saturante di luce, ottenendo così la fluorescenza massima (Fm).

### **3.1.7.3 Determinazione della biomassa aerea**

Delle 6 repliche seminate, 3 sono state utilizzate per i soli rilievi relativi a confrontare i metodi (distruttivi, indiretti e non distruttivi) per la determinazione degli apparati radicali (si vedano paragrafi 3.4.5.6, 3.4.5.7 e 3.4.5.8).

Le piante delle 3 repliche rimaste (repliche 4-5-6), a 47 GDS, sono state tagliate al colletto e disposte in vaschette di alluminio (una per ogni replica); sono quindi state portate in essiccatoio a 105 °C per 24 ore, fino al raggiungimento del peso secco costante.

I campioni sono stati pesati ed omogeneizzati singolarmente mediante macinazione con mulino, il cui setaccio presentava fori di diametro 0,25 mm. Questo per predisporre i campioni alla mineralizzazione e solubilizzazione degli elementi in essi contenuti e per la successiva lettura con ICP-OES.

A fine esperimento il peso secco dei tessuti dell'erba medica coltivata su T 100 (100% ceneri di pirite), risultava essere troppo basso per la mineralizzazione, a causa della morte di molte piante. Quindi le biomasse delle tre repliche sono state unite, ricavandone un dato unico che, non è stato adeguatamente trattato in termini di analisi statistica.

### **3.1.7.4 Mineralizzazione in forno a microonde**

Per l'analisi delle matrici (vegetali e terreno) sono state utilizzate tecniche che garantivano, una elevata sensibilità per ridurre o l'eliminare le possibili fonti di interferenza nel risultato finale. Questo si è reso necessario in quanto i campioni oggetto dell'analisi presentavano basse concentrazioni degli elementi. Quindi ai tradizionali metodi, mineralizzazione su piastra e lettura in spettrofotometro ad assorbimento atomico, si sono preferite strumentazioni più sensibili. Nel processo di mineralizzazione si è utilizzato il mineralizzatore a

microonde *Milestone Ethos 1600*, in uso al Dipartimento di Scienze Zootecniche, mentre la determinazione del contenuto di elementi minerali è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro ad emissione ottica di plasma "ICP-OES" *Spectro ciros<sup>CCD</sup>* (*Spectro Italia S.r.l.*, Lainate, Milano) gestito dal Dipartimento di Biotecnologie Agrarie.

Il mineralizzatore a microonde consente di lavorare in modo veloce, riproducibile e in sicurezza per gli operatori, in quanto per ogni tipologia di campione è possibile stabilire quantità e concentrazione degli acidi, tempi di mineralizzazione, potenza in watt e quindi temperature ottimali per ottenere una soluzione perfettamente limpida e matrici il più possibili omogenee.

Sono stati pesati circa 0,3500 g di campione secco registrando fino al quarto numero decimale, a questo si sono aggiunti 5 ml di acido nitrico puro (tipo *Aristar*) 70% ultrapuro (purezza relativa pari a 0,01 ppm per Cr e Zn, 0,02 ppm per il Fe e 0,005 per Mn e Cu) in modo da ridurre al minimo le possibili contaminazioni esterne, e 1,5 ml di acqua ossigenata 130 v/v. Risulta importante il rapporto stechiometrico tra acido e quantità di campione per permettere una ossidazione completa della sostanza organica.

Dopo la pesata si è proceduto versando i campioni in appositi contenitori di teflon (*lyner*), che, posti nell'apposito supporto del mineralizzatore, sono stati chiusi e bloccati con una chiave a pressione dinamometrica.

Il programma di mineralizzazione utilizzato era così definito:

5 minuti a 250 watt, 1 minuto a 0 watt, 5 minuti a 400 watt, 2 minuti a 0 watt, 5 minuti a 650 watt, 2 minuti a 250 watt e completato con 7 minuti di ventilazione.

Successivamente i campioni sono stati estratti e raffreddati per 5 minuti in una bacinella a ricircolo d'acqua. I campioni sono quindi stati posti in matracci di vetro e portati a 25 ml con acqua ultrapura (Resistività superiore a 10 MΩ).

In conclusione della mineralizzazione, mediante dei filtri monouso da HPLC con una porosità di 45 µm (*Chemtek Analitica*, Bologna), si è eseguita una

filtrazione allo scopo di rimuovere alcune impurità (soprattutto silicati) derivanti dal processo.

### 3.1.7.5 Lettura degli elementi in ICP-OES

La determinazione del contenuto di elementi minerali è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro ad emissione ottica di plasma "ICP-OES" (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*) della *Spectro ciros<sup>CCD</sup>* (*Spectro Italia S.r.l., Lainate, Milano*).

Questo strumento consente di eseguire l'analisi quali-quantitativa di molti elementi con sensibilità al ppb (parti per bilione,  $\mu\text{g/l}$ ), di scegliere lunghezze d'onda specifiche in modo da annullare le interferenze, di leggere contemporaneamente vari elementi (migliore correzione del *background* o rumore di fondo) e di ottenere una risposta analitica veloce.

L'ICP-OES si caratterizza per il plasma (gas argon ad elevato livello di ionizzazione e temperatura  $7.000^{\circ}\div 15.000^{\circ}$  C a seconda dell'analisi) ed è costituito da 4 parti fondamentali:

1. Nebulizzatore, preleva la soluzione mineralizzata dalla provetta e la nebulizza nella camera di nebulizzazione in goccioline di diametro inferiore ai  $10\ \mu\text{m}$ , che, si mescolano con l'argon a creare un aerosol;
2. Generatore di radiofrequenza e torcia, creano un campo magnetico e corrente elettrica che trasferiti agli elettroni, ne determinano un aumento di temperatura per effetto *Joule*. Gli atomi, ritornano allo stato fondamentale, emettendo radiazioni spettrali (spettri di emissione);
3. Banco ottico, legge gli spettri di emissione atomica e determina contemporaneamente gli elementi su tutte le loro righe principali di emissione. La parte principale del sistema di lettura è costituito da rilevatori a semiconduttore CCD (in totale 22) mediante i quali è possibile misurare in continuo tutte le lunghezze d'onda comprese tra 125 e 800 nm. Il segnale in arrivo al CCD viene elaborato sul CCD stesso, inviato a delle schede

elettroniche sull'ICP e quindi una volta "pulito" inviato al PC che controlla lo strumento;

4. Software, controlla il sistema permettendo di rendere più agevole l'utilizzo dello strumento e di ridurre in molti casi l'intervento dell'operatore alla sola scelta e ottimizzazione (a volte molto complicata) del metodo.

Per eseguire l'analisi dei campioni mineralizzati è stato necessario scegliere la lunghezza d'onda più opportuna per ogni elemento. La scelta delle linee relative, fatta da personale esperto, è stata eseguita in modo tale da evitare che sul picco di emissione di ciascun elemento, interferissero picchi relativi di altri elementi che emettevano su frequenze simili.

In particolare per ciascuno degli elementi considerati sono state utilizzate le seguenti linee di emissione (Tab. 3):

Tabella 3 - Elementi analizzati e limiti di rilevabilità con lo strumento (ordinati per numero atomico crescente); il limite di rilevabilità è stato calcolato come 10 volte la DL<sup>1</sup> (*Detection Limit*) calcolata con la taratura.

Elemento	Simbolo	Linea (nm)	Limite di rilevabilità (ppm)
Litio	Li	670.784	0.001
Berillio	Be	249.473	0.003
Boro	B	249.677	0.01
Sodio	Na	330.298	0.8
Magnesio	Mg	279.806	0.03
Alluminio	Al	167.078	0.002
Silicio	Si	251.612	0.005
Fosforo	P	177.495	0.01
Zolfo	S	182.034	0.08
Cloro	Cl	134.724	2
Argon	Ar	404.442	Linea di monitor
Potassio	K	766.490	0.02
Calcio	Ca	315.887	0.05
Scandio	Sc	361.384	0.001
Titanio	Ti	334.941	0.001
Vanadio	V	292.402	0.008
Cromo	Cr	267.716	0.002
Manganese	Mn	257.610	0.001
Ferro	Fe	259.940	0.001
Cobalto	Co	228.615	0.004
Nichel	Ni	231.604	0.002
Rame	Cu	327.396	0.001
Zinco	Zn	213.856	0.003
Arsenico	As	189.042	0.01
Selenio	Se	196.090	0.01
Bromo	Br	154.065	0.4
Stronzio	Sr	407.771	0.001
Zirconio	Zr	343.823	0.002
Molibdeno	Mo	202.030	0.001
Argento	Ag	328.068	0.007
Cadmio	Cd	226.502	0.001
Stagno	Sn	189.991	0.006
Antimonio	Sb	206.833	0.006
Iodio	I	142.549	2
Bario	Ba	455.404	0.001
Tungsteno	W	207.911	0.002
Platino	Pt	203.646	0.02
Oro	Au	267.595	0.02
Mercurio	Hg	184.950	0.03
Tallio	Tl	190.864	0.02
Piombo	Pb	220.351	0.03
Bismuto	Bi	223.061	0.01

<sup>1</sup> Le DL sopra citate sono state ottenute con i seguenti parametri:

Sistema di nebulizzazione: nebulizzatore Meinhard e camera ciclonica.

Potenza: 1400 W. Flusso Ar di raffreddamento: 13,5 ml/min. Flusso Ar ausiliari: 1,2 ml/min.

Flusso di nebulizzazione 0,90 ml/min. Velocità di introduzione campione: 2,0 ml/min.

Posizione torcia: X = -2,0 mm, Y = 0,5 mm, Z = 6,0 mm. Lavaggio: 45 s. Letture: 3 x 24 s.

Il picco di emissione per tutti i precedenti elementi si è scelto con sensibilità maggiore ad eccezione degli elementi presenti in quantità massiccia come sodio e calcio. Le tappe successive per la preparazione del metodo hanno previsto la centratura del picco e l'eliminazione del rumore di fondo. Fondamentale è risultata anche la taratura del sistema in relazione alle concentrazioni previste nei campioni. Si è proceduto, alla preparazione degli standard di calibrazione con una prova in bianco, uguale per tutti ( $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$  ultrapura) e 24 standard contenenti gli elementi sopra citati in concentrazioni che variavano da 2 ppb a 500 ppm (per quelli presenti in maggiore quantità). Sia sugli standard, che su tutti i campioni analizzati è stato aggiunto 1 ppm di Oro (Au per vegetali e terreno) come standard interno. Questo consente di abbattere al massimo le interferenze relative alla matrice, perché gli effetti si sentono contemporaneamente sia sugli elementi analizzati sia sullo standard interno aggiunto.

Si sono quindi verificate le rette di taratura su ciascuna matrice utilizzata e si sono ottenuti coefficienti di correlazione tra segnale e concentrazione variabili tra 0,994 e 10000. Per gli elementi alcalini si è usata una regressione quadratica.

I campioni mineralizzati inseriti in provette da 10 ml con relativo standard intero sono stati analizzati utilizzando un autocampionatore dedicato all'ICP *Spectro Ciros<sup>CCD</sup>* (AS400), consentendo di automatizzare notevolmente tutto il procedimento analitico.

L'effettivo programma di analisi ha previsto, prima e subito dopo della lettura di ciascun campione, un lavaggio del sistema attraverso l'aspirazione e il flussaggio di acido nitrico ultrapuro all'1% per 45 secondi attraverso tutte le parti della macchina entrate in contatto con il campione. Questo per evitare possibili effetti memoria del campione precedente. L'analisi di ciascun campione ha incluso un lavaggio seguito da 3 letture consecutive; il risultato finale è stato determinato dalla media aritmetica delle 3 precedenti letture (la visualizzazione immediata della deviazione standard ha consentito una verifica tempestiva dell'affidabilità dell'analisi). Per aumentare ulteriormente

l'affidabilità del processo, ogni 24 campioni analizzati è stato inserito uno standard di riferimento.

In conclusione si è ottenuto un tabulato con tutti i valori relativi agli elementi analizzati espressi in ppm (ppb). Moltiplicando questi valori per il peso del campione usato nella mineralizzazione e per il volume del mineralizzato, si è determinata la concentrazione dell'elemento in mg/kg di sostanza secca. Per le letture inferiori al limite di rilevabilità si è tenuto il limite stesso come ultimo valore utile disponibile.

#### **3.1.7.6 Tracce radicali**

Il rilievo delle tracce radicali è un metodo conservativo che si basa sulla possibilità di ricalcare su fogli da acetato, attaccati sulla superficie esterna del vaso in plexiglas trasparente, le tracce delle radici visibili che si presentano all'interfaccia di separazione (Fig. 12). L'inclinazione a 45° dei vasi serve a sfruttare il geotropismo positivo e far crescere il maggior numero possibile di radici all'interfaccia di separazione sul lato rivolto verso il basso del vaso, così da essere visibili dall'esterno e disegnabili.



Figura 12 - Radici di erba medica nel trattamento T29L15 (replica 5) presenti all'interfaccia di separazione a fine prova (4 agosto 2004).

Il disegno delle tracce colorate è avvenuto in cinque epoche diverse a distanza di sette giorni l'una dall'altra, segnando, per ciascuna epoca, con colori differenti, le radici che erano visibili alla superficie dei vasi nel momento del rilievo (Fig. 13) , nel modo seguente:

- 07/07/2004 traccia di colore blu a 19 GDS (giorni dalla semina);
- 14/07/2004 traccia di colore fucsia a 26 GDS;
- 21/07/2004 traccia di colore verde a 33 GDS;
- 28/07/2004 traccia di colore nero a 40 GDS;
- 04/08/2004 traccia di colore arancione a 47 GDS.

I colori dei pennarelli sono stati diversificati opportunamente in modo da evitare problemi in fase di acquisizione automatica con l'analisi d'immagine.



Figura 13 - Disegno delle tracce radicali su lucido posto sopra ai vasi in plexiglas al 28 luglio 2004.

Questo sistema di rilievo ha consentito di analizzare la dinamica di accrescimento radicale per ogni periodo considerato, facendo gli eventuali raffronti fra trattamenti e riducendo notevolmente il numero delle repliche.

### **3.1.7.7 Misure con capacimetro**

Le misure degli apparati radicali con metodo indiretto elettrico, eseguite con il capacimetro della *Dual Display LCR Meter* mod. ELC\_131D (Fig. 14) sono



iniziate il 9 luglio 2004 con dei test preliminari. Tali prove sono servite a verificare quali fossero le condizioni sperimentali di misura ottimali, relativamente al posizionamento degli elettrodi, e tali da garantire un risultato il più stabile possibile (frequenza e lunghezza dei cavi).

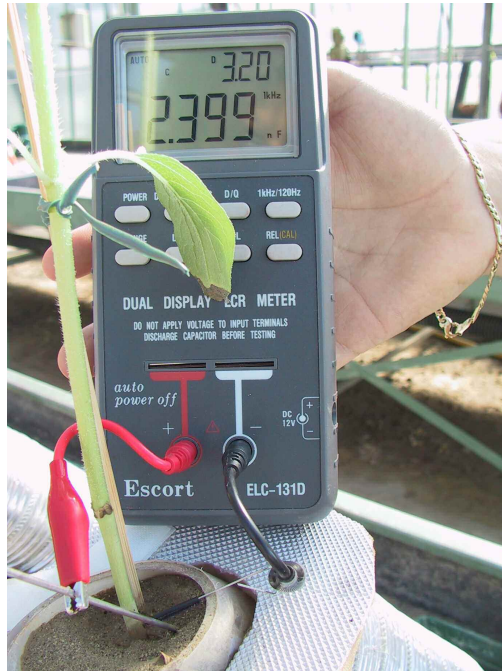


Figura 14 - Misurazione della capacità e resistenza elettrica con capacimetro in pianta di girasole. Si noti l'elettrodo positivo inserito nel terreno e l'elettrodo negativo inserito al colletto della pianta.

Il circuito, di cui sono state misurate capacità elettrica e resistenza, è costituito da un elettrodo positivo da inserire nel terreno; da un elettrodo negativo da inserire nel fusto delle piante; dalla pianta stessa e dalla soluzione circolante del terreno. Il principio di funzionamento prevede infatti di misurare la capacità elettrica del circuito sopraccitato, potendo attendersi valori crescenti all'aumentare della massa o superficie radicale a contatto con la soluzione circolante del terreno.

Considerando il carattere sperimentale della prova e non essendo presente una considerevole bibliografia sull'argomento, si è dovuto pensare a come, praticamente, eseguire le misure. In bibliografia si sono trovati riferimenti ad alcune sperimentazioni fatte per relazionare la massa radicale con le misure

della capacità elettrica in piante di mais a pieno sviluppo coltivate in pieno campo (Been *et al.*, 1998), altre fanno riferimento a vasi con piante arboree (Preston *et al.*, 2004). Tali fonti riportano l'utilizzo di un elettrodo di rame del diametro di 9,6 mm e lungo 55 cm, posto a 5 cm dal colletto della pianta ed inserito nel terreno verticalmente ad una profondità di 15 cm (la profondità dei vasi era di 21 cm ed il diametro di 22,5 cm), cui andava collegato il cavo positivo del tester ad un'altezza di 6 cm fuoriterra. Il cavo negativo veniva invece fissato ad un ago, sempre in rame, ed inserito nel fusto delle piante.

Partendo da queste precedenti esperienze, fatte le dovute proporzioni ed osservazioni, si è utilizzato come materiale per costruire gli elettrodi l'acciaio inox ad uso alimentare, che garantisce una persistenza delle caratteristiche chimico-fisiche e si presenta come conduttore elettrico. Si è deciso di non utilizzare il rame perché più soggetto, rispetto all'acciaio, a corrosioni dovute alle reazioni chimico-fisiche che si possono avere nel terreno; per tale scelta operativa, si è tenuto conto del fatto che gli elettrodi, una volta inseriti nel substrato, sarebbero stati mantenuti per tutta la durata della prova *in loco*.

Come elettrodo positivo è stata utilizzata una bacchetta in acciaio inox, del diametro di 2 mm e della lunghezza di 50 cm (Fig. 15). Al fine di limitare quanto più possibile gli errori sperimentali, sulle bacchette sono state predisposte, ad altezza fissa di 21 cm e 36 cm, piccole zone appiattite, ottenute mediante battitura, dove collegare la pinzetta del tester (polo positivo). Tali tacche appiattite risultavano sempre 6 cm sopra alla superficie del substrato rispettivamente quando i tondini venivano inseriti a 15 o 30 cm di profondità. L'elettrodo negativo era costituito da un ago anch'esso in acciaio inox (Fig. 15), un'estremità del quale è stata appositamente sagomata a forma di triangolo in modo che rappresentasse il punto esatto e ripetibile cui collegare la pinzetta del cavo del tester (polo negativo), mentre all'estremità opposta è stato creato un ispessimento con nastro isolante, per inserire l'elettrodo sul fusto sempre alla stessa profondità.



Figura 15 - Elettrodi utilizzati nel metodo indiretto “elettrico” per le piante erbacee in vaso.  
A destra l’elettrodo positivo, a sinistra quello negativo.

Per decidere la profondità cui inserire l’elettrodo positivo, la sua distanza dalla pianta, l’altezza a cui pinzarlo e l’altezza cui inserire l’ago (elettrodo negativo) nel fusticino delle piante, si sono fatte diverse prove:

1. per stabilire la profondità degli elettrodi positivi nel terreno si sono testati gli inserimenti ad 1, 15 e 30 cm; l’inserimento è avvenuto parallelamente ai bordi dei vasi, seguendo perciò un’inclinazione di 45°;
2. per stabilire la distanza cui porre lo stesso elettrodo dal colletto della pianta si sono testati gli inserimenti ad 1, 2 e 3 cm;
3. per stabilire a che altezza posizionare l’elettrodo negativo (spillo) sulla pianta si è provveduto ad inserirlo sia al colletto che ad 1 cm dallo stesso, sempre ortogonalmente al fusto;
4. si sono rilevate le misure di capacità elettrica espressa in nF e di resistenza elettrica espressa in k $\Omega$  utilizzando entrambe le frequenze cui disponeva lo strumento per le misure, cioè a 120 Hz e 1000 Hz.

Le misurazioni sono state fatte sempre con terreno avente un’umidità pari alla capacità di campo, ottenuta irrigando abbondantemente 24 ore prima della misurazione. In queste prime misurazioni di prova si sono usate solo le piante di girasole e di rafano perché la medica presentava dei fusticini molto esili che non consentivano tecnicamente l’inserimento dell’elettrodo negli stessi. Si sono analizzati i primi risultati e si è potuto riscontrare che:

- vi era una maggiore stabilità dei dati misurando la capacità e la resistenza elettrica a 1000 Hz;
- vi era una sostanziale indifferenza al posizionamento nel terreno dell'elettrodo a 2 o 3 cm di distanza dal colletto della pianta; non era possibile inserirlo in quella fase di sviluppo ad un solo cm dal colletto in quanto la presenza dell'apparato radicale ne impediva la penetrazione nel terreno;
- vi era un'indifferenza all'approfondimento tra 15 e 30 cm; ad 1 cm di profondità invece non si aveva lettura di capacità e resistenza elettrica;
- si ottenevano valori maggiori di capacità elettrica ponendo l'elettrodo negativo al colletto della pianta.

Tali considerazioni hanno portato alla decisione di proseguire le misurazioni utilizzando i seguenti parametri:

- frequenza: 1000 Hz;
- elettrodo positivo: 2 cm dal colletto; 30 cm di profondità misurato a 6 cm fuori suolo;
- elettrodo negativo: al colletto della pianta ed in posizione ortogonale al fusto.

Gli elettrodi positivi sono stati tutti posizionati in modo definitivo il 12 luglio 2004.

Le rilevazioni sono avvenute con cadenza bisettimanale il:

- 09/07/2004 a 21 GDS (prova preliminare per testare il sistema)
- 12/07/2004 a 24 GDS;
- 16/07/2004 a 28 GDS;
- 19/07/2004 a 31 GDS;
- 23/07/2004 a 35 GDS;
- 26/07/2004 a 38 GDS;
- 30/07/2004 a 42 GDS;
- 02/08/2004 a 45 GDS.

In fase progettuale è stato deciso di conservare tre repliche fino alla fine della prova e di distruggere le altre tre a cadenza settimanale, in modo da poter avere un termine di confronto tra le misure rilevate con le tracce radicali su acetato, quelle ottenute con il metodo elettrico (capacimetro) e quelle ottenute dopo il lavaggio radicale (metodo distruttivo). Nel corso della prova sono state tagliate quindi le piante al colletto, i tubi riposti in congelatore ad una temperatura di  $-18 \div -21$  °C. Il terreno è stato dapprima saturato d'acqua per facilitare, all'uscita dal congelatore, l'estrazione del terreno stesso. Tali operazioni sono state eseguite nel seguente modo:

- 12/07/2004 congelamento replica 1 a 24 GDS;
- 19/07/2004 congelamento replica 2 a 31 GDS;
- 26/07/2004 congelamento replica 3 a 38 GDS;
- 04/08/2004 congelamento delle restanti repliche 4, 5 e 6 e fine della prova a 47 GDS.

### **3.1.7.8 Campionamento distruttivo degli apparati radicali**

Ciascun vaso, ancora congelato, è stato tagliato con sega a nastro a lama diamantata (Fig. 16) in tre orizzonti di profondità: 0-7 cm; 7-15 cm e 15-44 cm, corrispondenti ai diversi strati di "terreno" sano/inquinato. I tagli avevano un'angolazione di 45°, risultando perciò paralleli al bordo superiore ed inferiore. I campioni di terreno sono stati chiusi in sacchetti di nylon e riposti in congelatore.



Figura 16 - Taglio dei vasi in tre orizzonti di profondità.

Prima della separazione delle radici dal terreno i campioni sono stati fatti scongelare, poi lavati con acqua secondo il metodo cosiddetto di "flottazione" descritta da Cahoon e Morton (1961) (Fig. 17).



Figura 17 - Macchina utilizzata per la separazione delle radici dal terreno. A destra un dettaglio sui cestelli di lavaggio.

Questa macchina sfrutta l'energia cinetica dell'acqua, che, fatta ruotare velocemente all'interno di contenitori metallici circolari, mantiene in

sospensione le particelle terrose più fini eliminandole, e fa depositare sul fondo quelle più grosse. Le radici vengono raccolte tramite un setaccio (con maglie di 500 µm) messo allo scarico dell'acqua dei contenitori. L'efficacia del metodo dipende dal diametro delle radici, dalla granulometria del terreno, dal contenuto di materia organica e dalle dimensioni delle maglie del setaccio. Il metodo prevede l'utilizzo di una soluzione di acido ossalico al 2% (Oliveira *et al.*, 2000), che, grazie alla sua azione disperdente, facilita la separazione delle radici dal terreno; tuttavia, nelle operazioni di lavaggio, non si è reso necessario l'utilizzo di tale soluzione se non in alcuni dei campioni contenenti terreno medio-limoso di Legnaro e per gli orizzonti più profondi (cioè quelli 15 – 44 cm) che presentavano una maggiore quantità di terreno rispetto agli altri.

Una prima pulizia, da impurità varie (frammenti vegetali, semi di infestanti, ecc.), è stata eseguita subito dopo il lavaggio, immergendo le radici in una vaschetta piena d'acqua, in modo che le impurità più leggere rimanessero in superficie mentre la sabbia o le piccole particelle terrose residue, più pesanti, sedimentassero sul fondo. Le radici sono state raccolte con pinzette e setacci di piccole dimensioni e conservate in contenitori chiusi (in plastica) riempiti con una soluzione conservante di etanolo al 12%, posti in cella frigorifera ad una temperatura di +3 ÷ +4 °C.

Per evitare la dispersione degli inquinanti eventualmente disciolti nell'acqua di lavaggio, in uscita della vasca è stato collocato un filtro a sabbia di 100 l, riempito con 60 kg di zelbrite, un materiale filtrante costituito dal minerale clinoptilolite con capacità filtrante di 2 micron (Zeolite Australia, 2003).

### **3.1.7.9 Analisi d'immagine: digitalizzazione delle immagini delle radici**

Consiste nell'acquisire, su supporto informatizzato, le immagini delle radici raccolte col metodo distruttivo.

Ogni campione è stato tolto dalla soluzione conservante, lavato accuratamente con acqua demineralizzata e disposto su vassoi formati da un fondo in plexiglas trasparente delle dimensioni di un foglio A4 (21x29,7 cm) e

da bordi in materiale plastico nero dello spessore di 1 cm, incollati e sigillati con silicone al fondo, in modo da evitare perdite d'acqua e di campione. I vassoi sono stati riempiti con 1-2 mm di acqua demineralizzata e quindi, vi sono state disposte le radici, in maniera da evitare il più possibile le sovrapposizioni tra loro ed ottenere una maggiore accuratezza del risultato. Il vassoio così preparato è stato posto sul piano di acquisizione di uno scanner, è stata riverificata la posizione delle radici ed eliminati eventuali menischi d'aria presenti sul fondo, che potevano interferire con la misurazione della lunghezza radicale.

Per la maggioranza dei campioni si è dovuto ricorrere alla suddivisione degli stessi in più parti da acquisire separatamente, cioè si è dovuto utilizzare più di un vassoio per la disposizione delle radici, a causa della loro elevata quantità. Se ciò non fosse stato fatto si sarebbero ottenuti vassoi con molte radici sovrapposte e di conseguenza immagini che non avrebbero permesso una misurazione precisa della lunghezza radicale. In generale si può osservare che i campioni cui sono serviti meno vassoi per la completa digitalizzazione radicale sono stati quelli coltivati su ceneri di pirite senza l'orizzonte di ricoprimento non inquinato. Si sono ottenute in totale 1114 immagini, a partire da 216 campioni iniziali (3 specie x 6 repliche x 4 trattamenti x 3 intervalli di profondità).

Lo scanner utilizzato è stato l'HP Scanjet 4C che è uno scanner bidimensionale con una risoluzione massima di 236 *pixels* per centimetro (600 DPI).

La digitalizzazione delle immagini delle radici è avvenuta definendo le impostazioni dello scanner nel seguente modo:

- le dimensioni fisiche della zona di scansione sono state regolate in modo da avere un riquadro di 26,5 × 17,4 cm;
- il tipo di immagine scelta è stata il “disegno bianco e nero nitido” di tipo “negativo”, che portava ad ottenere immagini in bianco e nero ma con il



- valore dei *pixels* invertito, perciò le radici hanno assunto valore pari a 255 (quindi bianche), al contrario invece per lo sfondo (valore 0 e colore nero);
- contrasto, regolato ad un valore pari a 199 in una scala compresa tra 0 e 250;
  - luminosità dell'immagine, regolata al valore di 162, nell'ambito di una scala variabile tra 0 e 250;
  - scalatura dell'immagine, impostata a 400% (ingrandimento 4x) corrispondente ad una risoluzione dell'immagine di 118,2 *pixels* cm<sup>-1</sup> (300 DPI).

Tali impostazioni erano già state usate in precedenti studi, nel corso dei quali si è notata l'ottima qualità delle immagini ottenute ai fini dell'utilizzazione per le operazioni di misura automatica. Si ottengono, immagini binarie, in cui il *foreground*, cioè le radici, vengono rappresentate da *pixels* di valore 255 (bianco); mentre il *background*, cioè lo sfondo, è rappresentato da *pixels* di valore 0, cioè nero (Fig. 18). Le immagini sono state archiviate e nominate con un numero crescente da 1 a 1114, in formato TIFF (*Tagged Image Format File*), che consente di salvare grandi quantità di immagini senza occupare troppo spazio *hardware*.

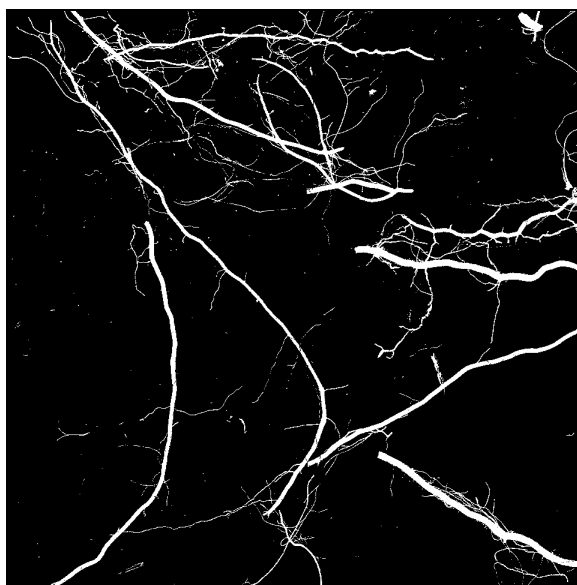


Figura 18 - Particolare di un'immagine monocromatica di radici acquisita allo scanner.

Prima di procedere alla misurazione automatica, le immagini sono state tutte ricontrollate ed eventualmente ritoccate con il programma Corel PHOTO

PAINT 6 per togliere le eventuali impurità che ancora, in qualche campione erano presenti o per togliere, lungo i lati delle stesse, le tracce lasciate dai bordi dei vassoi in plexiglas che rientravano nel riquadro di scansione.

Il programma ha impiegato circa tre ore per analizzarle tutte le immagini.

### 3.1.7.10 Esecuzione delle misure

Per eseguire le misurazioni dei parametri morfologici radicali in automatico, è stato utilizzato il *software* KS300 3.0 (Carl Zeiss Vision GmbH, München - Germany), che permette di eseguire le misurazioni impostando una funzione macro appositamente creata allo scopo.

La macro prevedeva il caricamento automatico delle immagini, secondo un ordine progressivo (questo giustifica la necessità di numerare i vassoi con numeri progressivi crescenti) e la conversione in RGB (Red Green Blue, immagine a 24 bit). Una volta completata questa fase si è impostato il valore discriminante tra “radice” ed “oggetti estranei”, che è stato individuato nella misura del reciproco della circolarità (perimetro<sup>2</sup> area<sup>-1</sup>) superiore a 203,2 e nell’area dell’oggetto superiore a 15 pixels. Gli oggetti con valori inferiori a 203,2 e 15 pixels (reciproco della circolarità e area, rispettivamente), si è ritenuto di considerarli oggetti estranei (residui vegetali, semi, piccole particelle di sabbia, ecc.).

Per calcolare la lunghezza delle radici sono stati utilizzati due algoritmi diversi, FbLm (*Fiber length algorithm*) e ASkl (*Skeletonization method*).

Il primo consiste nel calcolare la lunghezza della radice, riconoscendo innanzitutto le regioni chiuse di pixel bianchi nell'immagine (le radici), calcolando area e perimetro di questi oggetti e utilizzando l'equazione:

$$FbLm = \frac{2p + \sqrt{2p^2 - 16A}}{4}$$

dove  $p$  è il semiperimetro e  $A$  è l’area, riferiti allo stesso oggetto.

Presupposto fondamentale per questo metodo è che l'algoritmo per riconoscere le aree chiuse di pixel bianchi tenga in considerazione la presenza al loro interno di spazi vuoti (pixel neri), per non sovrastimarne l'area e sottostimarne il perimetro e di conseguenza sottostimarne la lunghezza (Vameralli *et al.*, 2003).

Il secondo algoritmo prevede la scheletronizzazione delle radici (nell'immagine), cioè l'erosione dei *pixel* esterni ma non di quelli alle due estremità e nella parte centrale, ha permesso di ottenere linee di spessore di 1 *pixel* (denominate scheletri) e di ricavarne quindi l'area. La lunghezza a questo punto si ricava dividendo il numero di pixel per la risoluzione e moltiplicando per un fattore di correzione pari a 1,12 (Smith *et al.*, 1994; Vameralli *et al.*, 2003). I due metodi (FbLm e scheletronizzazione) sono risultati entrambi affidabili, con un coefficiente di determinazione  $R^2=0.998$ .

Il diametro radicale è stato ottenuto rapportando l'area delle radici con la lunghezza.

Tutte queste operazioni sono state fatte in automatico dal software e per tutte le immagini che sono state prodotte.

#### **3.1.7.11 Misurazione delle tracce radicali su foglio di acetato**

Le immagini delle radici disegnate su fogli di acetato sono state acquisite in formato digitale utilizzando lo scanner HP Scanjet 4C avente una risoluzione massima di 236 *pixels* per cm (600 DPI). In alcuni casi, quando le tracce colorate e quindi le radici, si sono spinte fino alla fine del foglio, è stato necessario eseguire due scansioni dello stesso lucido, poiché l'area di scansione dello scanner (formato A4), non era sufficiente a contenere l'intero foglio. L'acquisizione è avvenuta con la modalità "milioni di colori nitidi", che produceva immagini a colori già equalizzate. La scalatura utilizzata è stata del 150% (ingrandimento 1,5x). L'immagine risultante possedeva una larghezza pari a 1106 *pixels* e una lunghezza variabile a seconda del campione, con una risoluzione di 59 *pixels*  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 19).



Figura 19 - Immagine ottenuta dopo acquisizione con scanner delle tracce radicali segnate sul foglio di acetato in girasole (replica 5), trattamento T100 (a sinistra) e L100 (a destra).

Si è verificata la qualità delle immagini acquisite, per vedere se la resa in colore risultava sufficiente per la loro separazione elettronica. Le immagini equalizzate presentavano una luminosità omogenea per ogni traccia-colore, così come per lo sfondo. Questa omogeneità ha permesso di separare le tracce-colore usando intervalli di *thresholding* uguali o con minime differenze, aggiustandoli manualmente, per uno stesso colore in lucidi diversi.

Il fondo chiaro delle immagini è stato modificato con uno sfondo nero per facilitare il controllo interattivo del *thresholding*.

Il *thresholding* è stato fatto scegliendo, per ogni traccia-colore, tre intervalli di luminanza diversi nelle tre bande R, G e B delle immagini a colori (Tab. 4). Queste operazioni sono state eseguite dal *software* KS300 (Zeiss) e si sono ottenute immagini binarie con tracce bianche su sfondo nero per ciascun colore separatamente.

Tabella 4 - Intervalli di luminanza nelle tre bande R, G, B per i diversi colori-traccia.

	R	G	B
BLU	0-200	0-200	200-255
FUCSIA	100-255	0-100	100-255
VERDE	0-200	150-255	0-230
NERO	0-100	0-100	0-200
ARANCIONE	200-255	0-200	0-160

Ciascuna immagine è stata ritoccata mediante il programma Corel PHOTO PAINT 6 così da definire con precisione la separazione tra le diverse tracce-colore.

Si sono create, sempre con l'ausilio di Corel PHOTO PAINT 6, delle immagini, denominate "maschere", con la funzione di far calcolare al *software* KS300 la lunghezza radicale, ricavata dalle tracce-colore, in maniera separata per i diversi orizzonti in cui si sono suddivisi i substrati di coltura, in modo da essere in grado di raffrontare i risultati con il sistema distruttivo di misura della lunghezza radicale. Su ogni immagine dei lucidi digitalizzata si è proceduto a tracciare la separazione degli orizzonti con l'aiuto di una tavola grafica provvista di penna ottica e su ciascuna immagine così ottenuta si sono colorati, con una funzione di riempimento resa disponibile dal programma, alternativamente, i vari orizzonti, con colore nero e bianco. Si sono ottenute per ciascun lucido tre nuove immagini: una con solo l'orizzonte superficiale bianco e gli altri due orizzonti neri; una seconda con solo l'orizzonte centrale bianco e gli altri neri; ed una terza che presentava l'orizzonte più profondo bianco mentre i più superficiali risultavano neri. Queste immagini sono state fatte per tutti e 72 i lucidi.

L'ultima operazione ha riguardato la misurazione automatica della lunghezza delle tracce-colore per ciascun orizzonte di ciascuna immagine. Per effettuare tale operazione si può utilizzare lo stesso metodo utilizzato per la

misura delle radici con il metodo distruttivo ovvero attraverso i cosiddetti scheletri oppure utilizzando la funzione *fibrelenght*.

## PROVE DI MESOCOSMO

I mesocosmi sono dei sistemi sperimentali a piccola scala che consentono di studiare le condizioni di adattabilità e l'attività di piante selezionate allo scopo di estendere in campo i risultati ottenuti. Le prove in mesocosmo, dato il maggiore volume dei vasi, ha consentito di mantenere le specie coltivate, in prova per periodi più lunghi.

### 3.1.8 Scelta delle specie

Le specie utilizzate nella prova in mesocosmo sono state *Medicago sativa* var. *Europe*, *Hordeum vulgare* var. *Orlando* e *Lolium multiflorum* var. *Lenore*, per le motivazioni già espresse in precedenza (paragrafo 3.4.1).

### 3.1.9 Trattamenti

Per la preparazione delle miscele di substrati e sulle caratteristiche degli stessi si veda il paragrafo 3.4.2.

I trattamenti utilizzati sono stati diversi per le 3 specie in prova, in funzione della diversa struttura morfologica degli apparati radicali. Infatti, mentre l'erba medica presenta un apparato radicale profondo e fittonante, le due graminacee si caratterizzano per apparati superficiali. Inoltre, dalle osservazioni effettuate durante la prova in microcosmo, si è rilevato che l'erba medica risente fortemente della semina diretta in ceneri di pirite.

I trattamenti adottati per l'erba medica sono stati pertanto:

1. "T" cui è stato sovrapposto un orizzonte di ricoprimento "L" di 15 cm (*T29L15*),
2. solo miscuglio "L" (*L100*).

I trattamenti utilizzati per le graminacee, sono stati, invece:

1. solo miscuglio "T" (*T100*),
2. "T" cui è stato sovrapposto un orizzonte di ricoprimento "L" di 7 cm (*T37L7*),
3. solo miscuglio "L" (*L100*).

### **3.1.10 Vasi**

I mesocosmi sono stati ricavati da tubi in PVC opachi tinta avorio. I vasi cilindrici a sezione circolare avevano un diametro di 250 mm ed una altezza di 450 mm per un volume interno di 39,7 l e uno spessore di 7 mm. I vasi sono stati chiusi sul fondo con appositi coperchi sui quali sono stati fatti dei buchi per consentire lo sgrondo dell'acqua in eccesso. Sono state applicate due maniglie laterali, per facilitare lo spostamento degli stessi (Fig. 20).



Figura 20 - Vaso utilizzato come mesocosmo.

### ***3.1.11 Semina e cure colturali***

La semina dell'erba medica è avvenuta il 5 luglio 2004, mentre orzo e loiessa sono state seminate il 20 di ottobre dello stesso anno. La numerosità sperimentale è stata pari a 3 per erba medica e per le 2 graminacee.

Sono stati seminati 20 semi/vaso di erba medica e 30 semi/vaso di orzo poi diradati, per entrambe le colture, a 15 piante/vaso. Per loiessa si è preferito, data la dimensione del seme, utilizzarne 0,25 g/vaso.

I vasi sono stati collocati all'aperto, in un'area dell'azienda agraria di Legnaro, secondo uno schema completamente randomizzato, e protetti nella stagione estiva con un telo antigrandine.

Ad una settimana dall'emergenza è stata fornita soluzione nutritiva (soluzione Hogland 1:2) per sostenere la fase di affrancamento delle plantule.

Durante lo svolgimento dell'esperimento si sono resi necessari dei trattamenti insetticidi contro i minatori fogliari il 12 luglio 2004.

### ***3.1.12 Rilievi effettuati***

I rilievi effettuati sono stati eseguiti per rilevare la biomassa aerea e radicale (metodo distruttivo) ed il contenuto in metalli pesanti ed altri elementi, in foglie e fusti. Si riportano di seguito le procedure seguite, rimandando ai capitoli relativi della prova in microcosmo, ove si è seguita una procedura analoga, evidenziando, se necessario, solo le opportune differenze metodologiche.

#### **3.1.12.1 Determinazione della biomassa aerea**

Per l'erba medica, la raccolta della biomassa aerea è stata differenziata in più sfalci. Nel corso del primo anno sono stati eseguiti 2 tagli, il primo in data 2 settembre e il secondo in data 20 ottobre. Nel corso del 2005, i campioni di apparato aereo sono stati prelevati in 3 momenti successivi, con un taglio il 6 giugno, uno il 26 agosto e l'ultimo il 17 ottobre. In concomitanza dell'ultimo



taglio, a 469 GDS, si è campionato anche l'apparato radicale. Il momento dello sfalcio, data la differenza di sviluppo tra le piante seminate nel trattamento L100 (controllo) e quelle seminate in T29L15, è stato determinato dallo stadio vegetativo di quest'ultime.

Per orzo e loiessa, è stato eseguito un unico prelievo di biomassa aerea, a 267 e 271 GDS, rispettivamente. In concomitanza, si è campionato anche l'apparato radicale.

I campioni raccolti sono stati disposti in casse metalliche forate (una per ogni campione) e quindi portati in essiccatoio a 105 °C per 24 ore, fino al raggiungimento del peso secco costante.

I campioni sono stati pesati ed omogeneizzati singolarmente mediante macinazione con mulino, il cui setaccio presentava fori di diametro 0,25 mm. Questo per predisporre i campioni alla mineralizzazione e solubilizzazione degli elementi in essi contenuti e per la successiva lettura con ICP (*Inductively Coupled Plasma Device*).

Per la procedura di mineralizzazione in forno a microonde e della lettura degli elementi con ICP-OES, si vedano i paragrafi 3.4.5.4 e 3.4.5.5 rispettivamente.

### **3.1.12.2 Campionamento distruttivo degli apparati radicali**

Al momento della raccolta della biomassa aerea, è stato campionato anche l'apparato radicale. Ciascun vaso, è stato tagliato con sega a mano a lama diamantata in tre orizzonti di profondità: 0-7 cm; 7-15 cm e 15-44 cm, corrispondenti ai diversi strati di "terreno" sano/inquinato. I tagli sono stati fatti paralleli al bordo superiore ed inferiore. I campioni di terreno sono stati chiusi in sacchetti di nylon e riposti in congelatore.

Prima della separazione delle radici dal terreno i campioni sono stati fatti scongelare, poi lavati con acqua secondo il metodo cosiddetto di "flottazione" già descritto nel paragrafo 3.5.4.8.

### 3.1.12.3 Determinazione della biomassa radicale

Data l'enorme massa radicale prodotta, non era conciliabile, con i tempi operativi, procedere con la determinazione dei parametri di lunghezza e diametro radicale rilevabili con il metodo di analisi d'immagine. Si è pertanto preferito valutare lo sviluppo radicale in termini di biomassa.

Le radici, separate dai substrati, sono state poste in casse metalliche forate (una per ogni singolo campione) e quindi portate in essiccatoio a 105 °C per 24 ore, fino al raggiungimento del peso secco costante. Sono quindi state pesate.

## REALIZZAZIONE IMPIANTO "IN SITU"

L'attività sperimentale *in situ* è stata programmata in relazione ai risultati preliminari ottenuti dalle prove di micro- e meso- cosmo.

Data l'impossibilità di avere un controllo confrontabile per caratteristiche pedologiche e climatiche, alle condizioni presenti nel sito di Torviscosa, ma tenuta presente la necessità di avere comunque dei valori di raffronto (almeno per ordine di grandezza), è stata allestita una prova speculare a Legnaro, presso l'azienda agraria sperimentale L. Toniolo. Per problemi logistici, legati alla distanza tra i due siti sperimentali, la semina e tutte le operazioni colturali, nonché i rilievi, sono avvenuti con un leggero sfasamento temporale tra i due siti.

### 3.1.13 Scelta delle specie

Le specie scelte per la prova in campo, sono le stesse utilizzate nelle prove precedenti. Fa eccezione la varietà *H. vulgare* var. *Orlando* alla quale, si è preferita la varietà *H. vulgare* var. *Pilaastro*, a semina primaverile.

Le specie seminate *in situ*, sono pertanto state:

- *Helianthus annuus* var. *Barolo*;
- *Medicago sativa* var. *Europe*;
- *Raphanus sativus* var. *Siletta nova*;
- *Hordeum vulgare* var. *Pilastro*
- *Lolium multiflorum* var. *Lenore*

### **3.1.14 Allestimento dell'impianto pilota**

#### **3.1.14.1 Lavorazioni del terreno: trattamenti**

La superficie sperimentale (Fig. 21) era di 800 m<sup>2</sup>, ed è stata suddivisa in due parcelloni, al fine di poter confrontare due diversi trattamenti, un terreno arato a 30 cm di profondità (*TA*), ed un terreno ripunato alla stessa profondità (*TR*). L'obiettivo delle due tesi era, rispettivamente, quello di rimescolare l'orizzonte di riporto superficiale con la pirite sottostante e mantenere la stratigrafia esistente. Tali operazioni colturali, date la presenza rilevante di ghiaia eterometrica, sono state precedute da uno spietamento superficiale, che ha di fatto involontariamente contribuito al rimescolamento degli orizzonti, dal momento che il prelevamento del solo strato di terreno di riporto è stato ostacolato dalla non uniforme profondità delle ceneri di pirite. Per questa operazione è stato usato un setaccio a maglie quadrate 5x5 cm. In raffronto una superficie di 400 m<sup>2</sup> a Legnaro, in un terreno medio-limoso, preparata con un'aratura a 30 cm.

All'interno di ciascun parcellone, sono state disegnate 15 parcelle di superficie pari a 10 m<sup>2</sup> (5 x 2 m), secondo uno schema a blocchi completamente randomizzato con 3 ripetizioni (Fig. 21). L'area centrale è stata destinata all'allestimento della prova con specie arboree (paragrafo 4.2.2).

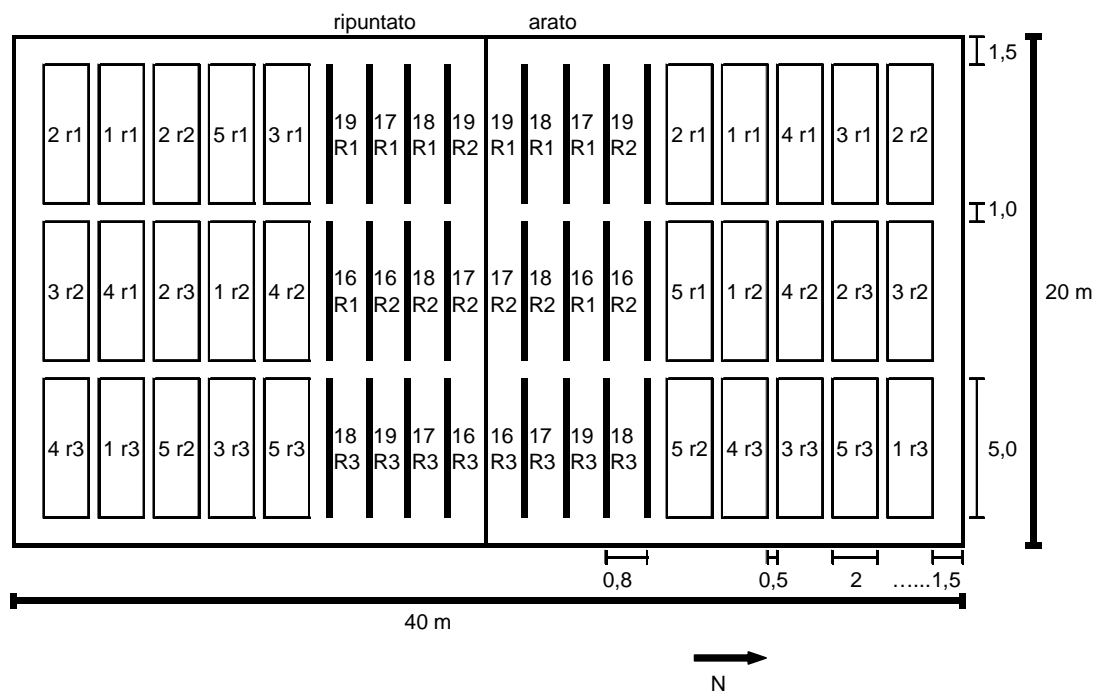


Figura 21 - Piano sperimentale *in situ*, a sinistra il trattamento TR, a destra TA. Il primo numero identifica la specie, il secondo la replica (girasole=1, erba medica=2, rafano=3, orzo=4 e loiessa=5). Nell'area centrale in evidenza i filari delle piante arboree (*P. alba*=16, *P. nigra*=17, *P. termula*=18 e *S. alba*=19).

In tutte le tesi è stata eseguita una concimazione, interrata con l'erpatura, utilizzando un concime minerale complesso con un titolo di N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O di 15-15-15, e distribuendo complessivamente 100 kg/ha di ciascun elemento. A tale operazione è seguita una rullatura del suolo.

### 3.1.14.2 Semina

La semina a Torviscosa è avvenuta manualmente a spaglio il 05/04/2005. Fa eccezione il girasole che è stato seminato a file (interfila 45 cm) il 03/05/2005. A Legnaro, la semina è stata eseguita il 30/03/2005 per *M. sativa*, *R. sativus*, *H. vulgare* e *L. multiflorum* (a spaglio), mentre *H. annuus* è stato seminato (a file, interfila 45 cm) il giorno successivo.

Le dosi di seme impiegate sono state quelle descritte in tabella 5.

Tabella 5 - Dosi e densità di semina nelle parcelle di Legnaro e Torviscosa.

Specie	Peso 1000 semi (g)	Dose Legnaro (g/m <sup>2</sup> )	Dose Torviscosa (g/m <sup>2</sup> )
<i>M. sativa</i>	9,14	4 (2131 semi/m <sup>2</sup> )	80 (4262 semi/m <sup>2</sup> )
<i>H. annuus</i>	73,9	0,5 (7 piante/m <sup>2</sup> post diradamento)	15 (18 piante/m <sup>2</sup> post diradamento)
<i>R. sativus</i>	9,14	2 (219 semi/m <sup>2</sup> )	40 (438 semi/m <sup>2</sup> )
<i>H. vulgare</i>	40	12 (300 semi/m <sup>2</sup> )	50 (600 semi/m <sup>2</sup> )
<i>L. multiflorum</i>	2,13	25 (1174 semi/m <sup>2</sup> )	240 (2348 semi/m <sup>2</sup> )

A 51 giorni dalla semina il girasole a Torviscosa è stato diradato, per ottenere un investimento di 18 piante/m<sup>2</sup>, più che doppia rispetto alle comuni coltivazioni; mentre a Legnaro, è stato diradato a 39 GDS per ottenere una densità finale di 7 piante/m<sup>2</sup> (18 piante sulla fila di 5 m di lunghezza).

Dopo la semina le parcelle sono state coperte con teli di tessuto non tessuto per favorire l'emergenza ed evitare la predazione dei semi da parte di animali granivori.

Durante l'emergenza, a causa di piogge insistenti e abbondanti, si sono riscontrati gravi problemi di ristagno e di risalita di acqua capillare, soprattutto nelle parcelle di loiessa ed orzo, con formazione di depositi salini superficiali, che hanno compromesso fortemente la produttività delle colture (Fig. 22).



Figura 22 - Ristagno superficiale subito dopo la semina (sx) e crosta di sale (dx) a seguito delle frequenti precipitazioni dell'aprile 2005.

### **3.1.15 Analisi sulla parte epigea**

I rilievi effettuati sono stati eseguiti per rilevare lo stato fisiologico delle piante (misure SPAD), lo sviluppo radicale attraverso metodi distruttivi (carotaggio). Della parte aerea è stata inoltre determinata la produzione di biomassa (peso secco) ed il contenuto in metalli pesanti ed altri elementi. Si riportano di seguito le procedure seguite, rimandando, ove possibile, ai paragrafi precedenti.

#### **3.1.15.1 SPAD**

I rilievi sono stati eseguiti il 16/06/2005 a Legnaro ed il 22/06/2005 a Torviscosa, a 78 GDS in entrambi i siti, fatta eccezione per *H. annuus* per il quale la misurazione è stata effettuata a 50 GDS. Per ogni replica si è considerata come rappresentativa l'ultima foglia completamente formata. Per tutte le specie sono state eseguite 4 misurazioni per foglia, dalla cui media aritmetica è derivato il dato finale, su 10 piante casuali della stessa parcella. Fa eccezione l'erba medica, per la quale, a causa delle ridotte dimensioni e della particolare forma delle foglie, le 4 misurazioni hanno interessato tutte e tre le componenti della foglia trifogliata rappresentativa.

#### **3.1.15.2 Raccolta della biomassa aerea**

La raccolta della biomassa epigea, è stata effettuata in date differenti, a seconda dello stadio fisiologico delle piante. A Torviscosa il rafano e l'orzo sono stati raccolti il 22 giugno (78 GDS) allo stadio di inizio formazione silique e di spigatura, rispettivamente; loiessa ed erba medica sono stati raccolti il 6 luglio (92 GDS), quest'ultima allo stadio vegetativo, mentre la graminacea allo stadio di spigatura; il girasole è stato raccolto nella stessa data a 64 GDS, allo stadio di bottone fiorale. A Legnaro il rafano è stato raccolto allo stadio di riempimento silique il 15 giugno (77 GDS); orzo, loiessa ed erba medica sono state raccolte a 85 GDS (23 giugno) allo stadio di maturazione latte, inizio riempimento

cariossidi e fioritura, rispettivamente; il girasole è stato raccolto il 7 luglio (98 GDS) in piena fioritura.

Il taglio delle parti aeree è stato fatto su di un'area 20 x 20 cm per le specie con semina a spaglio e di due piante a 10 cm di distanza l'una dall'altra per il girasole. Dopo la raccolta le parti aeree sono state poste all'interno di casse metalliche forate e poste in essiccatoio a 105°C per 24 ore, fino al raggiungimento del peso costante. I campioni sono quindi stati macinati con mulino, il cui setaccio presentava fori di diametro 0,25 mm ed omogeneizzati per predisporli alle mineralizzazione e quindi alla lettura del contenuto in metalli all'ICP-OES, per le cui procedure si rimanda ai paragrafi 3.4.5.4 e 3.4.5.5.

Del girasole, sono stati prelevati anche gli acheni, con un secondo rilievo; i fiori delle piante destinate a tale prelievo erano stati precedentemente chiusi in sacchetti retinati in modo da limitare le perdite di frutti per deiscenza. A Legnaro il prelievo è stato fatto l'08/09/2005, con la raccolta di 6 calatidi per parcella e a Torviscosa una settimana dopo, prelevando 8 calatidi per parcella. In tabella 6 viene riportato l'investimento effettivo alla raccolta per le parcella a Torviscosa dove si è registrata una diminuzione di piante/m<sup>2</sup> rispetto l'investimento iniziale di 18 piante/m<sup>2</sup>; mentre a Legnaro non si sono avute fallanze.

Tabella 6 - Investimento delle parcella di *H. annuus* a Torviscosa, il 15/09/2005.

Trattamento	Replica	Piante/ Parcella	Piante /m <sup>2</sup>	Trattamento	Replica	Piante/ Parcella	Piante /m <sup>2</sup>
TR	1	116	11,6	TA	1	91	9,1
TR	2	135	13,5	TA	2	121	12,1
TR	3	144	14,4	TA	3	85	8,5

### 3.1.16 Analisi sulla parte epigea

L'analisi dell'apparato radicale è stata svolta esclusivamente mediante il metodo distruttivo del carotaggio. Dopo il prelevamento *in situ*, le carote di

terreno sono state suddivise in campioni più piccoli, di dimensioni note, successivamente congelati.

Allo scongelamento, avvenuto in un secondo momento, è stata eseguita per ciascun campione la separazione delle radici dal terreno mediante lavaggio in laboratorio e l'analisi delle immagini digitali acquisite.

### 3.1.16.1 Raccolta e trattamento dei campioni

Le carote di terreno (Fig. 23) sono state prelevate in concomitanza al prelievo della biomassa aerea ed, in particolare, nell'area liberata dal taglio delle piante. Il carotaggio si esegue inserendo nel terreno una sonda cilindrica provvista di doppia camicia (in acciaio la parte esterna, in alluminio quella interna) con l'ausilio di un martello pneumatico portatile caratterizzato da vibrazioni ad alta frequenza che garantiscono una velocità di affondamento della sonda costante, in modo tale da prevenire il compattamento del terreno all'interno della sonda. Raggiunta la massima profondità, la sonda è stata estratta grazie ad un paranco sostenuto da un treppiede di altezza 2,3 m circa.



Figura 23 - Carota di terreno prelevata a Torviscosa. Si notano le due parti delle camicie.

Si sono incontrate difficoltà operative soprattutto nei carotaggi eseguiti nel sito di Torviscosa, dovute alla forte presenza di scheletro, nonostante lo



spietramento in fase di preparazione del letto di semina, che ostacolava l'approfondimento della sonda.

Le carote estratte, del diametro di 7 cm, sono quindi state suddivise in subcampioni corrispondenti agli intervalli di profondità descritti in tabella 7 e questi conservati in congelatore in attesa del lavaggio.

Tabella 7 - Profondità del prelievo delle carote e intervallo di spessore dei subcampioni.

Terreno	Profondità carota	Intervallo profondità	N°campioni/carota
Legnaro	100 cm	10 cm	10
Torviscosa arato	50 cm	5 cm	10
Torviscosa ripuntato	50 cm	5 cm	10

Prima della separazione delle radici dal terreno, i campioni sono stati fatti scongelare e quindi lavati con acqua secondo il metodo "di flottazione" (paragrafo 3.4.5.8) e, le radici raccolte, poste a conservare in contenitori chiusi (in plastica) riempiti con una soluzione conservante di etanolo al 12%, posti in cella frigorifera ad una temperatura di  $+3 \div +4$  °C.

### 3.1.16.2 Digitalizzazione delle immagini delle radici

Per quanto concerne la procedura di digitalizzazione si rimanda al paragrafo 3.4.5.9.

Ogni campione è stato tolto dalla soluzione conservante, lavato accuratamente con acqua demineralizzata e disposto su vassoi formati da un fondo in plexiglas trasparente e da bordi in alluminio incollati al fondo e sigillati con collante siliconico, in modo da evitare perdite d'acqua. L'area utile del vassoio, tolto 1 cm di larghezza occupato dal bordo in alluminio, misurava 20 x 34,5 cm. Le radici sono state disposte sul vassoio in modo da evitare il più possibile le loro sovrapposizioni, così da avere una maggiore accuratezza di misura.

Le immagini ottenute in totale sono 1062, a partire da 900 campioni iniziali (5 specie x 3 repliche x 2 carote/parcella x 3 trattamenti x 10 intervalli di profondità).

Il modello di scanner utilizzato è stato HP ScanJet 4C, uno scanner piano con interfaccia SCSI, con risoluzione massima di 600 dpi.

La digitalizzazione delle immagini delle radici è avvenuta definendo le impostazioni dello scanner nel seguente modo (Fig. 24):

- la modalità di riconoscimento del colore è stata “disegno bianco e nero nitido” (sharp line—art), quindi le immagini sono risultate in bianco e nero con un bit per pixel di colore;
- l’immagine è stata acquisita in negativo, in modo da contrastare le radici bianche su sfondo nero;
- il contrasto è stato regolato ad un valore pari a 250 in una scala compresa tra 0 e 250;
- la luminosità dell’immagine è stata regolata ad un valore di 183 in una scala compresa tra 0 e 250;
- lo zoom è stato impostato al 500% (ingrandimento 5x);
- la risoluzione delle immagini è stata impostata a 147,8 pixel/cm.

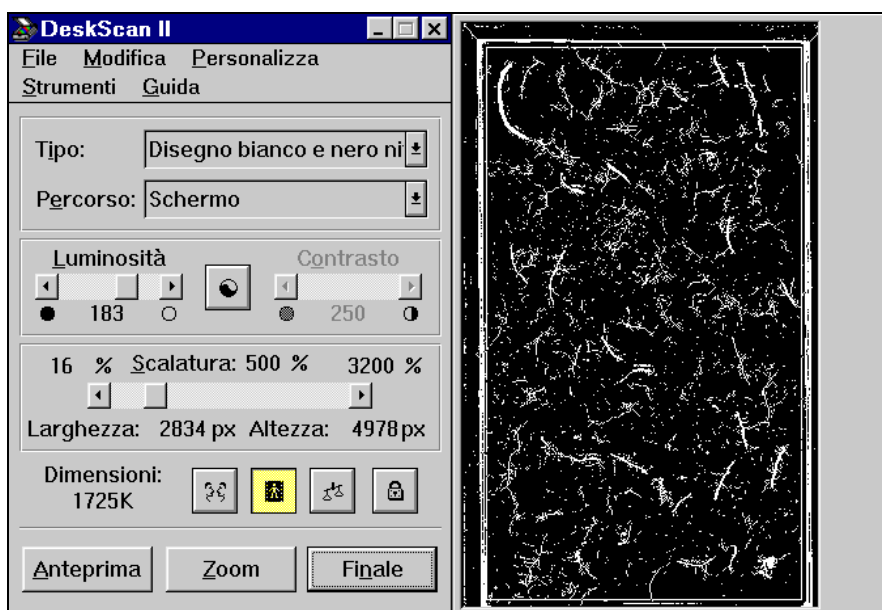


Figura 24 - Interfaccia grafica del programma utilizzato per l’acquisizione le immagini.

## PIANTE ARBOREE

La selezione delle specie arboree da utilizzare è stata fatta innanzitutto sulla base ai risultati ottenuti in precedenti sperimentazioni condotte dal medesimo gruppo di ricerca, riguardanti il miglioramento dell'efficienza agronomica della fitoestrazione di metalli pesanti (Mosca *et al.*, 2004) e per la numerosa bibliografia che si trova a testimonianza delle capacità estrattive di queste specie. Le piante, sono state quindi scelte in base all'attitudine per la fitoestrazione, nell'ottica di una destinazione *no—food* della biomassa prodotta (*Short Rotation Coppice*) e, non ultimo, per la presenza rilevata di talune specie tra le piante spontanee del sito di Torviscosa. In particolare si è deciso di lavorare con:

- *Populus alba* L.;
- *Populus nigra* L.;
- *Populus tremula* L.;
- *Salix alba* L.

## PROVE DI MESOCOSMO

### 3.1.17 Scelta delle specie

Le piante utilizzate nella prova erano tutte talee di 1 anno provenienti dal vivaio Guano di S. Giustina in Colle (Padova).

Le talee erano con pane di terra in alveolo 10x10 cm, fatta eccezione per il pioppo tremulo, che era stato fornito in vasi di 9 cm di diametro x 13 cm di altezza.

### ***3.1.18 Trattamenti***

Per la preparazione delle miscele di substrati e sulle caratteristiche degli stessi si veda il paragrafo 3.4.2.

I trattamenti adottati sono stati:

1. "T" cui è stato sovrapposto un orizzonte di ricoprimento "L" di 15 cm (*T29L15*),
2. solo miscuglio "L" (*L100*).

### ***3.1.19 Vasi***

I mesocosmi adottati sono analoghi a quelli utilizzati per le specie erbacee: sono stati ricavati da tubi in PVC opachi tinta avorio. I vasi cilindrici a sezione circolare avevano un diametro di 250 mm ed una altezza di 450 mm per un volume interno di 39,7 l e uno spessore di 7 mm. I vasi sono stati chiusi sul fondo con appositi coperchi sui quali sono stati fatti dei buchi per consentire lo sgrondo dell'acqua in eccesso. Sono state applicate due maniglie laterali, per facilitare lo spostamento degli stessi.

### ***3.1.20 Trapianto e cure colturali***

Il trapianto è avvenuto il 5 luglio 2004, ponendo una pianta per vaso. La numerosità sperimentale è stata pari a 3 per ogni specie.

I vasi sono stati collocati all'aperto, in un'area dell'azienda agraria di Legnaro, secondo uno schema completamente randomizzato, e protetti nella stagione estiva con un telo antigrandine.

Durante lo svolgimento dell'esperimento si sono resi necessari dei trattamenti insetticidi contro i minatori fogliari il 12 luglio 2004.

### ***3.1.21 Rilievi effettuati***

I rilievi effettuati sono stati eseguiti per rilevare lo sviluppo radicale attraverso metodi sia indiretti (metodo elettrico) che tradizionale (campionamento distruttivo). Della parte aerea è stata determinata la produzione di biomassa (peso secco) ed il contenuto in metalli pesanti ed altri elementi. Si riportano di seguito le procedure seguite, rimandando, ove necessario, ad altri paragrafi.

#### **3.1.21.1 Determinazione della biomassa aerea**

Nel corso del 2004, a fine stagione vegetativa, prima della filloptosi, le piante sono state chiuse in dei sacchi di rete a maglia larga, in modo da evitare che le foglie, al momento della caduta, venissero perse. La raccolta è stata fatta il 9 dicembre.

Il 17 ottobre del 2005, a 470 giorni dal trapianto, si è proceduto con il taglio delle piante al colletto, e la separazione del fusto dalle foglie.

I campioni raccolti sono stati disposti in casse metalliche forate (una per ogni campione) e quindi portati in essiccatoio a 105 °C per 24 ore, fino al raggiungimento del peso secco costante.

I campioni sono stati pesati ed omogeneizzati singolarmente mediante macinazione con mulino, il cui setaccio presentava fori di diametro 0,25 mm. Questo per predisporre i campioni alla mineralizzazione e solubilizzazione degli elementi in essi contenuti e per la successiva lettura con ICP-OES.

Per la procedura di mineralizzazione in forno a microonde e della lettura degli elementi con ICP-OES, si vedano i paragrafi 3.4.5.4 e 3.4.5.5 rispettivamente.

#### **3.1.21.2 Misure con capacimetro**

Le misure con il capacimetro, sono state eseguite con cadenza all'incirca settimanale (più ravvicinate nei periodi di accrescimento radicale, più

dilazionate nei mesi estivi) durante l'intera stagione vegetativa 2005, per un totale di 37 epoche di osservazione. I rilevamenti sono iniziati il 9 Marzo 2005 con la cadenza indicata in tabella

Tabella 8 - Calendario dei rilievi effettuati col capacimetro sulle piante arboree in mesocosmo, nel corso del 2005.

marzo	aprile	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre
9-mar	1-apr	4-mag	1-giu	8-lug	24-ago	5-set	10-ott
11-mar	6-apr	6-mag	8-giu	15-lug		13-set	17-ott
16-mar	8-apr	10-mag	15-giu			19-set	
18-mar	13-apr	13-mag	24-giu			26-set	
23-mar	15-apr	17-mag	30-giu				
25-mar	19-apr	20-mag					
30-mar	26-apr	25-mag					
	29-apr	27-mag					

Il accordo con Been *et al.* (1998) e Preston *et al.* (2004) l'elettrodo positivo utilizzato in questa prova era rappresentato da un bacchetta di acciaio inox (non di rame perché più soggetto a corrosioni) del diametro di 10 mm e lunghezza di 550 mm (Fig. 25). A 5 cm dall'estremità superiore è stata incisa una scanalatura per mantenere fisso e ripetibile il punto di attacco del coccodrillo positivo del capacimetro. La tacca risultava 15 cm fuori terra con un approfondimento dell'elettrodo del substrato di 30 cm e posto a 5 cm dal colletto della pianta.

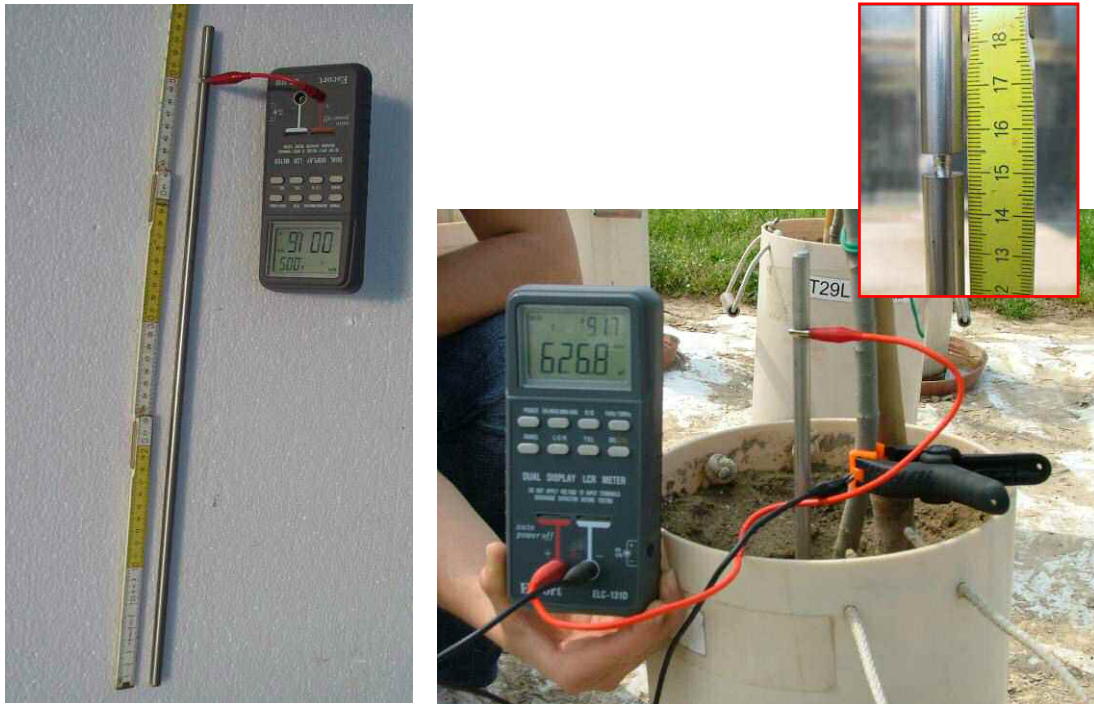


Figura 25 - Elettrodo positivo utilizzato nel metodo indiretto “elettrico” per le piante arboree.

L’elettrodo negativo era costituito da un ago anch’esso in acciaio inox, un’estremità del quale è stata appositamente sagomata a forma di triangolo in modo che rappresentasse il punto esatto e ripetibile cui collegare la pinzetta del cavo del tester (polo negativo). L’ago è stato quindi inserito su di una pinza, per facilitare il momento di inserimento nel fusto della pianta (Fig. 26).



Figura 26 - Elettrodo negativo utilizzato nel metodo indiretto “elettrico” per le piante arboree. A destra un particolare dell’ago.

Le misurazioni sono state fatte sempre con terreno avente un'umidità prossima alla capacità di campo, ottenuta irrigando abbondantemente 24 ore prima della misurazione e lasciando percolare l'acqua in eccesso.

I valori di capacità elettrica sono stati misurati ad una frequenza di 1000 Hz.

Per le altre informazioni si rimanda al paragrafo 3.4.5.7.

### **3.1.21.3 Campionamento distruttivo degli apparati radicali**

Il 17 ottobre del 2005, in concomitanza con il taglio della parte aerea è stata raccolta anche la biomassa radicale. Ciascun vaso, è stato tagliato con sega a mano a lama diamantata in 2 orizzonti di profondità: 0-15 cm e 15-44 cm, corrispondenti ai diversi strati di substrato sano/inquinato. I tagli sono stati fatti paralleli al bordo superiore ed inferiore. I campioni di terreno sono stati chiusi in sacchetti di nylon e riposti in congelatore.

Prima della separazione delle radici dal terreno i campioni sono stati fatti scongelare, poi lavati con acqua secondo il metodo cosiddetto di "flottazione" già descritto nel paragrafo 3.4.5.8.

### **3.1.21.4 Determinazione della biomassa radicale**

Data l'enorme massa radicale prodotta, non era conciliabile, con i tempi operativi, procedere con la determinazione dei parametri di lunghezza e diametro radicale rilevabili con il metodo di analisi d'immagine. Si è pertanto preferito valutare lo sviluppo radicale in termini di biomassa (peso secco).

Le radici, separate dai substrati, sono state suddivise in due gruppi:

1. radici di conduzione (diametro >2 mm);
2. radici di assorbimento o radici fini (diametro < 2 mm).

I singoli campioni sono stati posti in vaschette metalliche (una per ogni singolo campione) e quindi portate in essiccatoio a 105 °C per 24 ore, fino al raggiungimento del peso secco costante. Sono quindi state pesate.



## REALIZZAZIONE IMPIANTO “IN SITU”

L'attività sperimentale *in situ* è stata programmata in relazione ai risultati preliminari ottenuti dalle prove di mesocosmo.

Per quanto riguarda la preparazione del letto di semina, i trattamenti e le difficoltà operative incontrate, si rimanda a quanto già esposto nel capitolo relativo alle specie erbacee (capitolo 3.6). Restano invariati i commenti relativi allo sviluppo di una prova di raffronto a Legnaro.

### **3.1.22 Scelta delle specie**

Le specie trapiantate in campo, sono le medesime utilizzate nella prova di mesocosmo: pioppo bianco, pioppo nero, pioppo tremulo e salice bianco.

Gli astoni avevano numerosità, provenienza ed età diverse. Il *Populus alba*, *Populus nigra* e *Salix alba* erano 6 astoni per specie, di 2 anni di età, a radice nuda forniti dal vivaio dell'Ersaf di Curno (BS), mentre il *Populus tremula* erano 3 talee di un anno in pane di terra 9 cm × 13 cm, dei vivai Guagno a S. Giustina in Colle (PD).

### **3.1.23 Allestimento dell'impianto pilota**

#### **3.1.23.1 Lavorazioni del terreno e trattamenti**

All'interno di ciascun parcellone di 400 m<sup>2</sup> (vedi paragrafo 3.6.2.1), sono state disegnati i filari per il trapianto delle specie arboree secondo uno schema a blocchi completamente randomizzato con 3 ripetizioni (Fig. 21). Ogni ripetizione era costituita da 6 piante, eccetto per il pioppo tremulo per il quale le piante erano 3.

Il trapianto è avvenuto il 3 maggio 2005 in file singole distanti 80 cm; la stessa distanza è stata adottata anche sulla fila. Lo stesso schema è stato adottato anche a Legnaro, con trapianto il 18 aprile 2005.

Le piante sono state successivamente fissate a dei tutori in bambù e protette alla base con tubi di plastica per evitare danni da parte della fauna selvatica (Fig. 27).



Figura 27 - Sesto di impianto delle piante arboree 23 giorni dopo il trapianto. Si vedono le protezioni al colletto delle piante e i tutori. Nel mezzo il tubo per l'impianto di irrigazione di soccorso.

### ***3.1.24 Analisi sulla parte epigea***

Nel corso della sperimentazione sono stati effettuati dei rilievi al fine di verificare il contenuto di clorofilla nelle foglie. Questa infatti è stata misurata indirettamente mediante lo strumento portatile *Chlorophyll Meter SPAD 502*.

Successivamente si è proceduto alla raccolta della parte aerea per rilevare la concentrazione dei metalli pesanti attraverso mineralizzazione ed analisi con uno spettrofotometro ad emissione atomica di plasma (ICP-OES).

#### **3.1.24.1 SPAD**

I rilievi sono stati eseguiti il 16/06/2005 a Legnaro ed il 22/06/2005 a Torviscosa. Le misurazioni sono state effettuate su 10 foglie per ogni replica sulla pianta identificata col numero 2 (la seconda della fila da ovest verso est), considerando come rappresentative le ultime foglie completamente sviluppate. Il valore ottenuto da ogni foglia è stato ricavato dalla media aritmetica di 4 misure eseguite sulla foglia stessa.

#### **3.1.24.2 Raccolta della biomassa aerea**

La raccolta della biomassa epigea per l'analisi della concentrazione dei metalli pesanti è stata compiuta nel sito di Torviscosa il 14 ottobre, nell'area di controllo di Legnaro il 17 ottobre 2005. La pianta numero 2 di ogni replica per tutte le specie è stata tagliata al colletto e successivamente defogliata. In seguito il legno, dopo essere stato opportunamente sminuzzato, è stata posto all'interno di casse metalliche forate e collocata in essiccatoio a 105 °C per 24 ore, fino al raggiungimento del peso costante. Dopo aver essiccato e pesato tutti i campioni, si è proceduto ad omogeneizzarli singolarmente mediante macinazione con mulino, il cui setaccio presentava fori di diametro 0,25 mm. Questo per predisporre i campioni alla mineralizzazione e solubilizzazione degli elementi in essi contenuti e per la successiva lettura con ICP\_OES, cui si rimanda ai paragrafi 3.4.5.4 e 3.4.5.5.

#### ***3.1.25 Analisi sulla parte ipogea***

Lo studio degli apparati radicali è stato effettuato confrontando il carotaggio (metodo distruttivo) e il metodo elettrico.

### 3.1.25.1 Misure con il capacimetro

Le misurazioni sono state effettuate il 30 settembre 2005 a Torviscosa e l'11 ottobre a Legnaro.

I rilievi, effettuati sulla seconda pianta di ogni fila (partendo da ovest verso est), sono stati eseguiti utilizzando lo strumento ad una frequenza di 1000 Hz. Le rilevazioni sono state effettuate sempre con terreno avente un'umidità pari alla capacità di campo, ottenuta irrigando abbondantemente 24 ore prima della misurazione. Per le misurazioni si sono utilizzati i medesimi elettrodi impiegati nella prova di mesocosmo (cfr paragrafo 3.8.5.2). L'elettrodo è stato inserito nel terreno ad una profondità di 30 cm e a circa 10 cm di distanza dal colletto delle piante (non è stato possibile, data l'irregolarità del substrato e la presenza di scheletro, inserire gli elettrodi positivi a 5 cm). L'elettrodo negativo veniva collegato con un ago sulla pianta a 6 cm dal colletto ed in posizione ortogonale al fusto (Fig. 28).



Figura 28 - Capacimetro; sulla sinistra l'elettrodo positivo inserito nel terreno, mentre sulla pianta la pinza che consente l'inserimento dell'elettrodo negativo.

### 3.1.25.2 Raccolta e trattamento dei campioni

Con il metodo del carotaggio sono stati prelevati, in tutte e tre le tesi (TA, TR, L), due campioni per ogni replica; nello specifico, le carote sono state estratte sulla seconda pianta di ogni fila (da ovest verso est), a 10 cm e a 20 cm dal fusto.

Le carote di terreno sono state prelevate inserendo nel suolo una sonda cilindrica provvista di doppia camicia (in acciaio la parte esterna, in alluminio quella interna) con l'ausilio di un martello pneumatico portatile. Raggiunta la profondità desiderata, la sonda è stata estratta grazie ad un paranco sostenuto da un treppiede di altezza 2,3 m circa. Nell'area sperimentale di Torviscosa si sono avute difficoltà operative per la presenza di scheletro che ostacolava la penetrazione della sonda.

Le carote di terreno, di 7 cm di diametro, una volta prelevate sono state suddivise in subcampioni corrispondenti agli intervalli di profondità descritti in tabella 9 e questi conservati in congelatore in attesa del lavaggio.

Tabella 9 - Profondità del prelievo delle carote e intervallo di spessore dei subcampioni.

Terreno	Profondità carota	Intervallo profondità	N°campioni/carota
Legnaro	70 cm	10 cm	7
Torviscosa arato	25 cm	5 cm	5
Torviscosa ripuntato	25 cm	5 cm	5

Le carote estratte sono state poi conservate in congelatore in attesa del lavaggio.

Prima della separazione delle radici dal terreno, i campioni sono stati fatti scongelare e quindi lavati con acqua secondo il metodo "di flottazione" (paragrafo 3.4.5.8) e, le radici raccolte, poste a conservare in contenitori chiusi

(in plastica) riempiti con una soluzione conservante di etanolo al 12%, posti in cella frigorifera ad una temperatura di  $+3 \div +4$  °C.

### **3.1.25.3 Digitalizzazione delle immagini delle radici**

Per quanto concerne la procedura di digitalizzazione si rimanda al paragrafo 3.6.4.2.



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONI

### CARATTERIZZAZIONE DEL SITO

#### 4.1.1 Rilievo pedologico

Dall'analisi stratigrafica effettuata il 17 dicembre 2003, è emersa la presenza di 4 orizzonti che si collocano a profondità variabili a seconda del punto censito.

Nei primi 30 cm si evidenzia uno strato di riporto ricco in scheletro eterometrico frammisto a pirite, zolfo e terriccio (Fig. 29), nei 20 cm sottostanti è dominante la presenza di ceneri di colore nero-rossastre con crosta centimetrica; tra 50 cm e 140 cm di profondità un orizzonte costituito in prevalenza da ceneri di pirite compatte (Fig 29).



Figura 29 - Strato di riporto ricco in scheletro eterometrico frammisto a pirite, zolfo e terriccio (sx); stratigrafia del terreno, scavo del 17 dicembre 2003 (dx).



A 140 cm di profondità, si nota la presenza di uno strato argilloso che non permette all'acqua di percolare ed ad eventuali metalli lisciviati, di arrivare alla falda sottostante che in alcuni punti è piuttosto superficiale. Anche la presenza dello strato di ceneri di pirite, poco permeabili, riducono la percolazione dell'acqua piovana così in alcuni punti si formano ristagni idrici.

Dalle analisi chimico-fisiche effettuate sulle ceneri di pirite sono stati misurati un pH pari a 8,05 e una EC pari a circa 3 µS/cm. Esse contengono inoltre metalli pesanti che superano il limite di legge (D.M. 471/99), idrocarburi e PCB (Tab. 10).

Tabella 10 - Contenuto di metalli pesanti ed altri inquinanti, in raffronto ai limiti fissati dal D.M. 471/99 per le destinazioni "verde pubblico, privato e residenziale" (A), e "commerciale o industriale" (B) e al terreno di Legnaro. Sono evidenziati i valori che oltrepassano i limiti di legge per l'uso "privato e residenziale" \* Concentrazione non determinata per limiti strumentali.

	D.M. 471/99		TORVISCOSA		LEGNARO	
	A mg/kg	B mg/kg	0 – 100 cm mg/kg		0 – 100 cm mg/kg	
<b>METALLI</b>						
As	20	50	– *		– *	
Cd	2	15	0,5	(0,2 x)	1,7	
Co	20	250	103	(5,1 x)	11	
Cr tot.	150	800	3	(0,02 x)	34	
Cu	120	600	1787	(14,8 x)	105	(0,9 x)
Hg	1	5	0,71	(0,71 x)	–	
Ni	120	500	3	(0,02 x)	26	
Pb	100	1000	506	(5,06 x)	13	
V	90	250	10	(0,1 x)	51	
Zn	150	1500	2473	(16,5 x)	248	(1,7 x)
PCB	0,001	5	0,03	(30 x)	–	
<b>IDROCARBURI</b>						
<12 C	10	250	<1	–	–	
>12 C	50	750	483,5	(9,8 x)	–	

Per quanto concerne, invece, il contenuto in ferro e zolfo, i principali componenti delle ceneri di pirite, essi si trovano a Torviscosa in concentrazioni

97 volte superiori al contenuto nel terreno di Legnaro, per il ferro, e 12 volte per lo zolfo.

Da ulteriori analisi chimiche eseguite presso i laboratori dell'ARAV (Tab. 11) si è potuto constatare una notevole diversità tra il substrato di Torviscosa ed il terreno di controllo di Legnaro.

Tabella 11 - Analisi del terreno di controllo (Legnaro) e del sito di Torviscosa (TA arato; TR ripuntato). I valori si riferiscono alla frazione fine, priva di scheletro.

CAMPIONE	S.O. g/100 g	pH	CSC meq/100g	EC mS/cm
L	2,17±0,60	7,80±0,04	14,52±1,84	0,28±0,02
TA	2,52±0,21	7,56±0,03	17,06±1,14	3,10±0,17
TR	2,85±0,18	7,49±0,10	15,92±1,56	2,91±0,10

CAMPIONE	N TOT mg/kg	P TOT mg/kg	P ASS mg/kg	K TOT g/100g	K SCAMB mg/kg
L	5,67±2,08	593,82±91,91	33,10±18,38	1,60±0,06	62,83±9,23
TA	5,33±0,58	202,52±5,75	12,73±3,35	0,33±0,01	152,83±11,67
TR	6,67±1,53	157,98±15,90	7,90±1,71	0,34±0,07	130,97±28,48

CAMPIONE	Fe TOT mg/kg	Fe ASS mg/kg	SOLFATI mg/kg SO <sub>4</sub>
L	71708,00±3822,36	18,27±1,90	2364,00±126,01
TA	857516,00±189637,21	24,00±2,15	12992,67±2873,29
TR	717046,00±41695,10	26,30±4,16	10864,33±631,74

In considerazione dell'elevata presenza di ferro, era lecito attendersi che la frazione assimilabile di questo metallo risultasse di gran lunga superiore a Torviscosa rispetto a quella di Legnaro e che il pH fosse inferiore a causa della significativa presenza di solfati (circa 5 volte superiore). Tuttavia, le analisi hanno potuto accertare valori di ferro assimilabile solo leggermente superiori a quelli di Legnaro (circa il 30%), verosimilmente per effetto del pH neutro o sub-alcalino. Ci si attende comunque che i valori più elevati di ferro assimilabile e di solfati, ne permetteranno un maggiore assorbimento da parte delle piante.

Nel substrato inquinato è stato misurato un tenore in sostanza organica superiore al 2,5% e di azoto maggiore dello 0,5%, entrambi risultati molto simili ai valori riscontrati nel terreno di Legnaro; valori superiori a Legnaro per fosforo, sia totale che assimilabile (circa 3 volte superiori), ma modesta la presenza di potassio totale anche se la frazione assimilabile è più elevata. La CSC è risultata confrontabile al controllo, mentre l'elevata conducibilità elettrica di Torviscosa, 10 volte superiore, potrebbe influire negativamente sull'accrescimento di alcune specie.

All'analisi della tessitura, riportata in figura 30, si può osservare la presenza prevalente (circa 60%) di scheletro nel sito inquinato, in ragione della modalità di ricoprimento delle ceneri di pirite già discusse nei materiali e metodi.

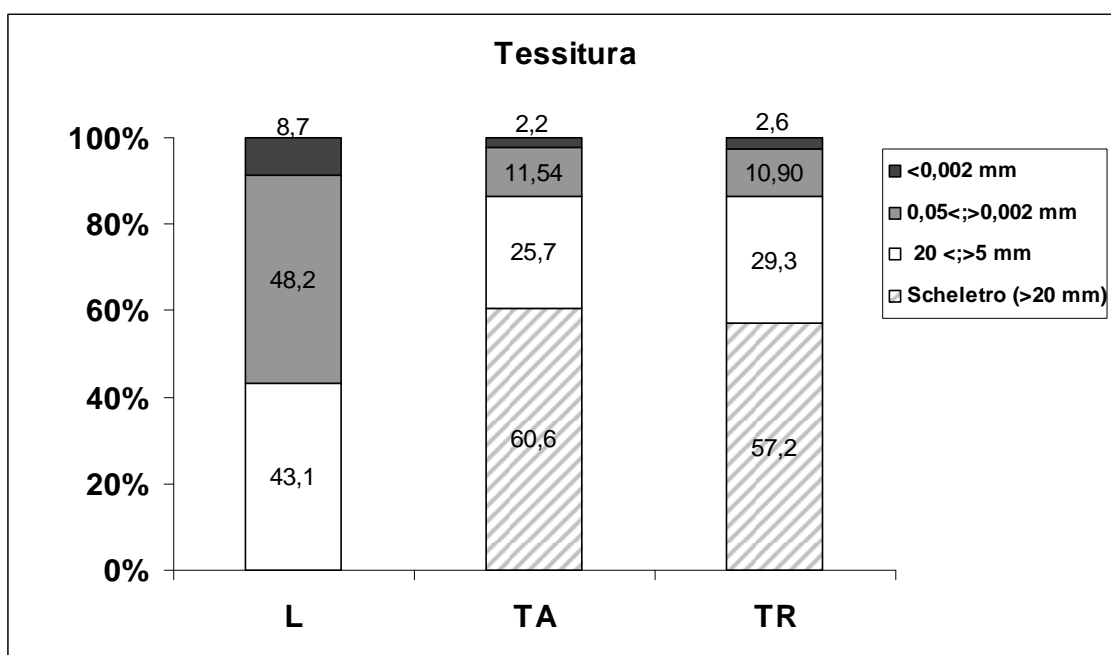


Figura 30 - Tessitura dei tre trattamenti oggetto di studio, calcolata sul peso totale del campione analizzato. Le etichette indicano la percentuale relativa di ciascuna componente.

Dall'analisi della tessitura su campioni di terreno secco del substrato di Torviscosa non è stato possibile separare le ceneri di pirite in un'unica classe diametrica. Si ritiene infatti che le ceneri siano distribuite nelle quattro

componenti della tessitura e che, per effetto del loro diametro sottile, aderiscano a scheletro, sabbia, limo e argilla.

Dall'analisi, è stato comunque possibile classificare il substrato di Torviscosa come franco—sabbioso, con scheletro abbondante, mentre quello di Legnaro risulta terreno franco o franco-limoso.

#### **4.1.2 Rilievo floristico**

I primi rilievi effettuati nel sito di Torviscosa erano volti a censire e catalogare le specie spontanee maggiormente presenti. In fascia A le specie più diffuse (indice di copertura) sono specie legnose appartenenti alla famiglia delle Salicacee (32 % circa) e delle Rosacee (30 % circa), tra le specie erbacee, le famiglie dominanti sono Composite (10 % circa) e Graminacee (6 % circa), seguono le Ciperacee (4 % circa). Nella fascia B, in cui ci sono solo specie erbacee, quelle più presenti appartengono alle famiglie delle Graminacee (35% circa), delle Composite (22 % circa), delle Poligonacee (16 % circa), delle Rosacee (7 % circa) e delle Verbenacee (3 % circa). Nella fascia C le specie erbacee più diffuse appartengono alla famiglia delle Graminacee (31 % circa), delle Composite (28 % circa), delle Poligonacee (26 % circa) e delle Rosacee (2 % circa). Nella fascia D, più a est, dominano la famiglia delle Graminacee (40 % circa), delle Composite (18 % circa), delle Salicacee (10 % circa), delle Rosacee (9 % circa), seguono Poligonacee e Ciperacee (5 % circa).

Una volta classificate le specie erbacee sono state raccolte (solo l'apparato epigeo), mineralizzate e sottoposte a lettura ICP.

Nelle tabelle 12, 13 e 14, sono riportate le concentrazioni (ppm) ottenute dalle analisi effettuate, per le specie erbacee, divise in specie a radice fittonante (Tab. 12) e radice fascicolata (Tab. 13) e per le specie arboree (Tab. 14).

Tabella 12 - Sono riportate le concentrazioni (ppm/s.s.) di metalli pesanti, riscontrati nei tessuti epigei delle specie spontanee a radice fittonante. In grigio sono indicati valori più elevati per i diversi metalli.

	<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	<i>Medicago lupulina</i> L.	<i>Melilothus album</i> Desr.	<i>Taraxacum officinale</i> Weber.	<i>Dactylis glomerata</i> L.
<b>As</b>	1,02	2,63	1,52	13,28	1,66
<b>B</b>	76,94	139,04	4,12	132,47	14,46
<b>Ca</b>	16432,81	63132,80	12331,72	62559,49	12509,46
<b>Cd</b>		0,29		0,95	0,31
<b>Co</b>	0,49	0,49	0,28	1,59	0,62
<b>Cr</b>	2,55	2,68	2,61	4,95	3,74
<b>Cu</b>	25,03	26,12	28,42	95,68	20,02
<b>Fe</b>	257,02	804,58	211,94	5454,03	1208,36
<b>K</b>	31513,38	46446,48	25692,07	129545,02	17970,38
<b>Mg</b>	7006,58	12719,94	2533,66	12195,41	3646,13
<b>Mn</b>	37,95	62,08	121,75	148,32	194,59
<b>Mo</b>	23,18	19,71	2,23	3,45	4,71
<b>Na</b>	203,76	221,47	609,12	725,54	180,44
<b>Ni</b>	4,40	2,51	2,49	3,93	3,03
<b>P</b>	4404,00	5735,77	2758,82	6926,99	1164,11
<b>Pb</b>		2,83		7,54	3,24
<b>S</b>	4955,08	8252,24	8925,86	16559,58	3165,81
<b>V</b>	0,21	0,52	0,14	1,88	0,78
<b>Zn</b>	79,72	141,87	164,79	359,56	93,15

Tabella 13 - Concentrazione (ppm/s.s.) di metalli pesanti, riscontrati nei tessuti epigei delle specie spontanee a radice fascicolata. In grigio sono indicati i valori più elevati per ciascun metallo.

	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	<i>Calamagrostis</i> <i>sp.</i>	<i>Carex</i> <i>hirta</i> L.	<i>Cynodon</i> <i>dactylon</i> (L.) Pers.	<i>Dactylis</i> <i>glomerata</i> L.	<i>Eupatorium</i> <i>cannabinum</i> L.	<i>Festuca</i> <i>arundinacea</i> Schreb.	<i>Holcus</i> <i>lanatus</i> L.	<i>Persicaria</i> <i>sp</i>	<i>Phragmites</i> <i>australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.	<i>Poa sp.</i>	<i>Sanguisorba</i> <i>officinalis</i> L.
<b>As</b>	8,61	0,71	1,00	1,53	1,66	2,17	0,74	1,16	4,48	0,94	0,81	2,02
<b>B</b>	129,69	62,41	37,79	20,20	14,46	107,59	13,01	46,23	19,65	110,66	5,42	184,08
<b>Ca</b>	20139,05	11002,66	13787,88	20490,11	12509,46	79557,25	9014,53	14510,29	22650,58	25861,28	7669,93	74683,97
<b>Cd</b>	1,42	0,25	0,51		0,31	1,94	0,28	0,21	0,22			
<b>Co</b>	0,28	0,41		0,44	0,62	0,99	0,33	0,49	0,32	0,27	0,26	0,59
<b>Cr</b>	0,50	2,73	1,21	4,55	3,74	2,83	2,52	2,69	0,38	0,98	1,75	2,54
<b>Cu</b>	26,32	13,22	26,27	18,50	20,02	26,57	8,76	11,45	26,90	24,69	9,75	22,22
<b>Fe</b>	853,39	450,00	206,27	545,71	1208,36	820,59	314,49	495,04	674,91	216,76	370,34	836,90
<b>K</b>	26824,83	19423,06	28414,92	36438,34	17970,38	41725,67	13761,51	30606,57	17326,36	38299,43	15207,17	28466,88
<b>Mg</b>	6062,90	5611,31	3997,67	7245,84	3646,13	13789,77	4108,52	5467,45	10469,64	10323,90	2049,58	15167,28
<b>Mn</b>	22,34	99,17	393,24	170,70	194,59	184,93	69,02	86,28	15,31	36,81	30,49	71,88
<b>Mo</b>	2,65	3,23	2,00	2,12	4,71	1,53	3,54	6,70	1,49	8,64	2,49	1,43
<b>Na</b>	100,88	504,08	284,85	486,17	180,44	222,34	208,58	358,93	344,00	230,67	163,59	216,80
<b>Ni</b>	0,77	2,31	2,03	3,42	3,03	2,95	1,99	3,83	0,68	2,15	1,47	2,71
<b>P</b>	1783,50	2056,87	1641,96	4837,12	1164,11	3072,78	1271,01	3807,27	1674,28	6262,60	2488,36	5614,96
<b>Pb</b>	1,53	-	-	-	3,24	3,07	-	2,32	1,03	-	-	-
<b>S</b>	3827,64	4380,90	5568,76	8909,06	3165,81	33040,69	2311,78	7484,70	2361,74	6058,73	2616,39	10353,10
<b>V</b>	0,14	0,66		0,44	0,78	0,94	0,69	0,53	0,07	0,25	0,35	0,62
<b>Zn</b>	291,26	96,58	131,75	130,45	93,15	179,27	72,82	134,25	139,92	82,44	78,03	113,37

Tabella 14 - Sono riportate le concentrazioni (ppm/s.s.) di metalli pesanti, riscontrati nei rami di un anno delle specie spontanee arboree. In grigio sono indicati i valori più elevati per ciascun metallo nel confronto tra le specie.

	<i>Cornus sanguinea</i>	<i>Populus canescens</i>	<i>Populus nigra</i>	<i>Pyracantha coccinea</i>	<i>Salix alba</i>
<b>As</b>	-	-	-	-	-
<b>B</b>	19,17	31,38	19,79	25,81	31,35
<b>Ca</b>	17469,04	18283,35	14779,74	12018,27	20637,60
<b>Cd</b>	-	1,22	0,56	0,07	0,93
<b>Co</b>	-	0,91	0,71	-	0,21
<b>Cr</b>	1,51	0,63	0,95	0,32	0,93
<b>Cu</b>	5,37	6,27	7,47	7,67	7,44
<b>Fe</b>	2011,09	4315,89	2708,89	918,80	977,55
<b>K</b>	6373,23	3755,33	6092,64	6802,80	6626,81
<b>Mg</b>	1961,49	1868,95	2146,08	1980,29	2098,79
<b>Mn</b>	19,32	33,77	25,26	17,59	25,92
<b>Mo</b>	0,48	0,28	0,21	0,25	0,34
<b>Na</b>	156,32	125,73	160,49	167,18	186,32
<b>Ni</b>	0,20	0,35	-	-	-
<b>P</b>	1473,19	894,04	898,41	986,40	1007,87
<b>Pb</b>	-	-	-	-	-
<b>S</b>	3917,78	1484,27	1400,26	1047,37	2678,35
<b>V</b>	-	-	-	-	-
<b>Zn</b>	37,63	427,61	222,59	27,20	311,48

Al fine di verificare quale specie presentasse le maggiori capacità di assorbimento dei metalli, le concentrazioni, riscontrate nei tessuti analizzati, sono state standardizzate<sup>2</sup> per i valori di iperaccumolo e quindi sommate tra loro. I metalli considerati (Cd, Cr, Co, Cu, Mn Ni, Pb Zn) sono quelli presenti in concentrazioni maggiori nel sito.

Di tutte le specie, quella che ha dimostrato la capacità di assorbire maggiormente i metalli è stato il *Taraxacum officinale* (Fig. 31). Da dati di

$$^2 [c_{ST}] = \sum_{i=1}^n \left( \frac{[MP]_i}{I_i} \right);$$

dove:  $[c_{ST}]$  è la somma standardizzata delle concentrazioni dei metalli pesanti;  $[MP]_i$  è la concentrazione dell'iesimo metallo pesante;  $I_i$  è la soglia di iperaccumulazione per il metallo stesso.

Si sono considerate come soglie di iperaccumulazione:

- Cd: 100 ppm;
- Co, Cu, Ni, Pb: 1'000 ppm;
- Cr, Mn, Zn: 10'000 ppm.

letteratura era già stata verificata la capacità di tale specie di accumulare, nella radice fittonante, metalli pesanti; questa analisi suggerisce anche una buona capacità di traslocazione alla parte aerea. L'apparato radicale fittonante particolarmente sviluppato, ha sicuramente favorito l'accumulo dei metalli anche se altre specie a radice fascicolata hanno raggiunto valori elevati, come *Ambrosia artemisifolia*, *Carex hirta* e *Eupatorium cannabinum*.

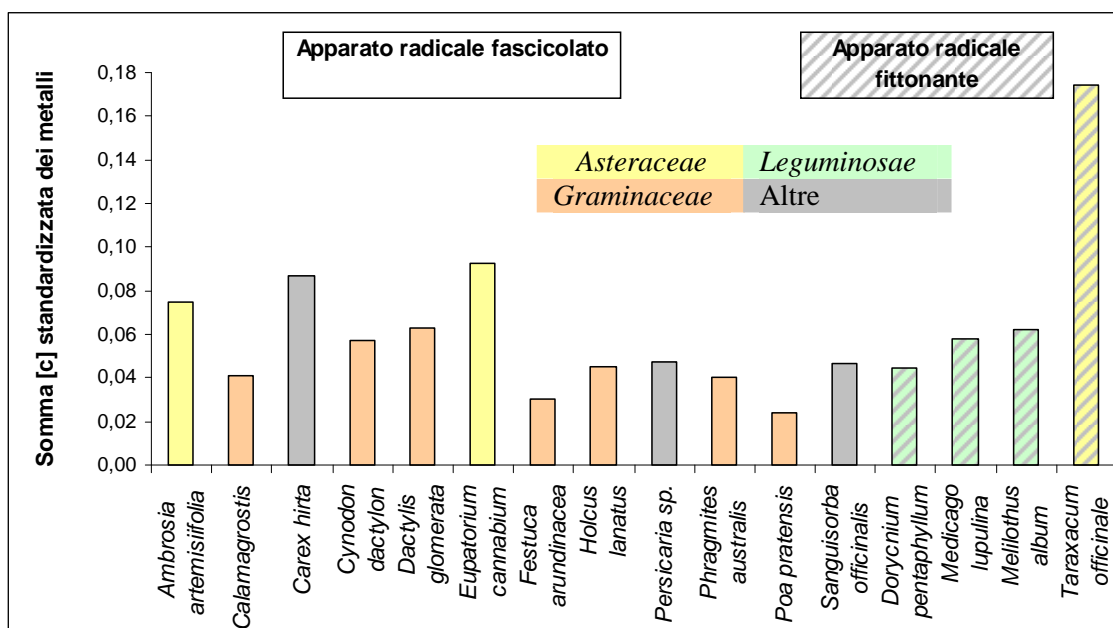


Figura 31 - Somma delle concentrazioni standardizzate dei metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn) nelle specie erbacee spontanee.

Per quanto riguarda le specie arboree che si trovavano nell'area perimetrale delle parcelle sperimentali quella che è risultata maggiore concentratrice di metalli è il *Salix alba* (Fig. 32), mentre quella meno efficiente è stata *Pyracantha coccinea*. *Populus nigra* e *Populus canescens*, hanno presentato valori intermedi.



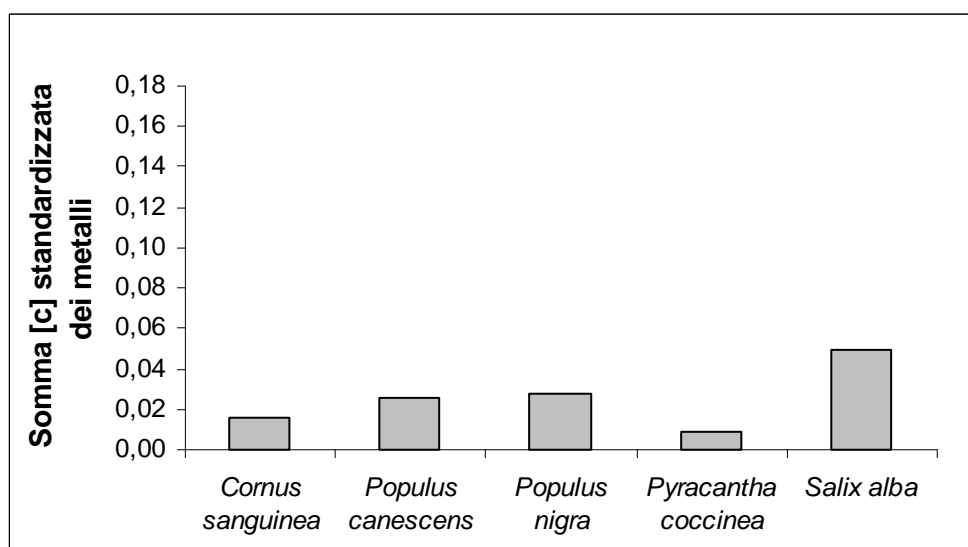


Figura 32 - Somma delle concentrazioni standardizzate dei metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn).

L'indagine preliminare del sito ha consentito di conoscere l'entità ed il tipo di inquinamento, il grado e le strategie di adattamento delle piante già presenti. Le caratteristiche pedologiche e climatiche del territorio hanno consentito anche di evidenziare i possibili limiti all'introduzione di specie agrarie potenziali accumulatrici di metalli pesanti, soprattutto in riferimento alla presenza di ceneri di pirite caratterizzate da una scarsa permeabilità all'acqua. L'analisi preliminare sulle specie spontanee presenti nel sito, ha consentito inoltre, di individuare alcune delle specie utilizzate nelle prove sperimentali; in particolare per le specie arboree ha dato utili informazioni sul possibile impianto di pioppo nero e salice bianco; per le specie erbacee ha confermato la potenzialità di specie ad apparato radicale fittonante e di specie appartenenti alla famiglia delle graminacee e composite.

## SPECIE ERBACEE

### PROVE PRELIMINARI IN SERRA - MICROCOSMO

#### 4.1.3 SPAD e fluorimetro

La determinazione del contenuto di clorofilla nella foglia più giovane completamente sviluppata e le misure di attività fotosintetica (attraverso fluorimetria) hanno messo in evidenza un marcato stato di stress delle piante coltivate nella pirite (T100), che è stato possibile mitigare nei trattamenti che prevedevano l'orizzonte di ricoprimento (Fig. 33, 34 e 35). Più in particolare, per quanto riguarda il girasole (Fig. 33) i valori di fluorescenza nei trattamenti T29L15 e T37L7 non si sono presentati statisticamente diversi rispetto a quelli del controllo, mentre si è osservata una diminuzione della fluorescenza in T100.

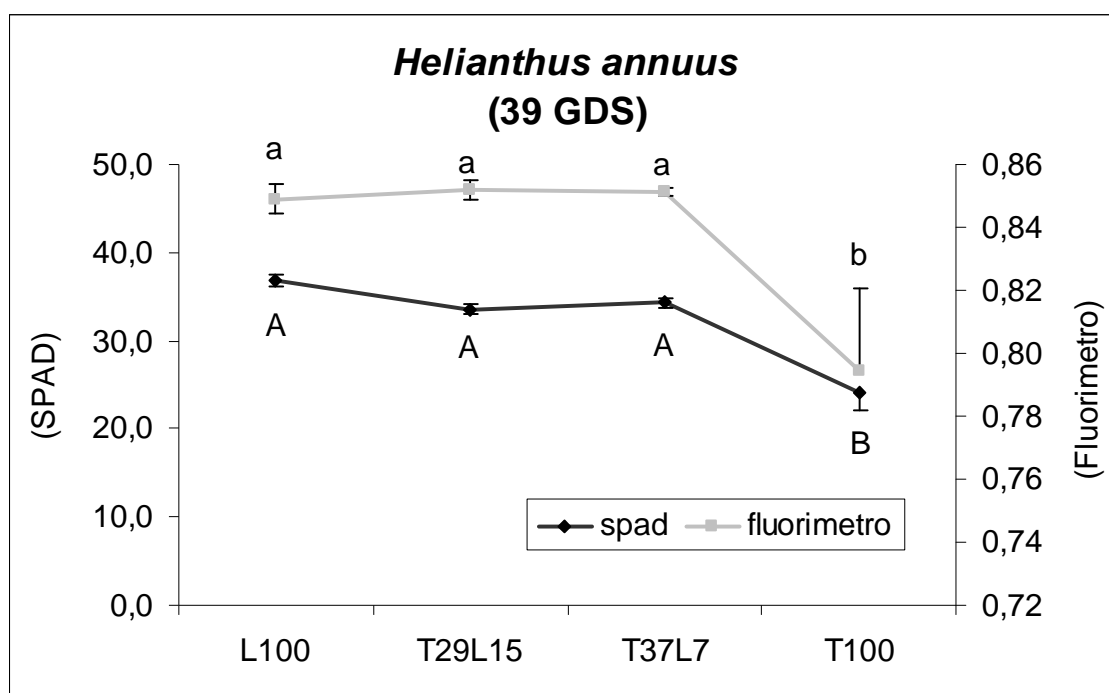


Figura 33 - SPAD e fluorimetro in *Helianthus annuus*. Le barre verticali indicano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Sia la misurazione con il fluorimetro sia quella con SPAD, ha messo in evidenza condizioni di stress per le piante di girasole coltivate in T100 a differenza degli altri trattamenti (Fig. 33).

Per l'erba medica (Fig. 34) le piante coltivate su T29L15 hanno mostrato valori di fluorescenza statisticamente non differenti dal controllo, pur attestandosi a livelli più bassi rispetto il T37L7, ma comunque maggiori dei valori misurati nelle piante cresciute sul T100. Anche per l'erba medica, come già descritto per il girasole, l'utilizzo dello SPAD, come quello del fluorimetro mettono in evidenza uno stato di stress nelle piante allevate nel substrato di sola pirite. Sembra quindi, anche in questo caso, che la sovrapposizione di uno strato di terreno non inquinato abbia consentito alla pianta di meglio adattarsi alle condizioni di inquinamento.

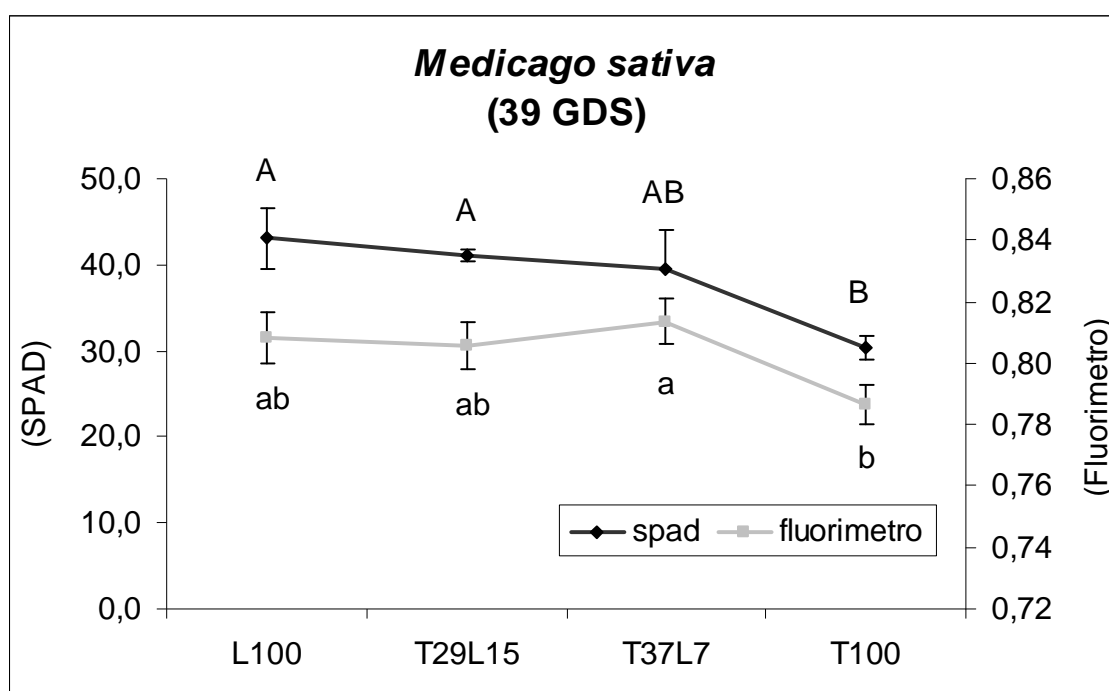


Figura 34 - SPAD e fluorimetro in *Medicago sativa*. Le barre verticali indicano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Il rafano, invece, (Fig. 35) ha presentato un decadimento di fluorescenza nel trattamento T29L15, dovuto, probabilmente, alla coincidenza del rilievo con il raggiungimento delle radici dell'orizzonte inquinato. Tranne questo, i valori registrati negli altri trattamenti con SPAD e fluorimetro hanno presentato lo

stesso andamento, confermando anche mediante la fluorescenza della clorofilla come questa specie si sia adattata, maggiormente, alla coltivazione diretta sul substrato inquinato, rispetto alle altre due specie.

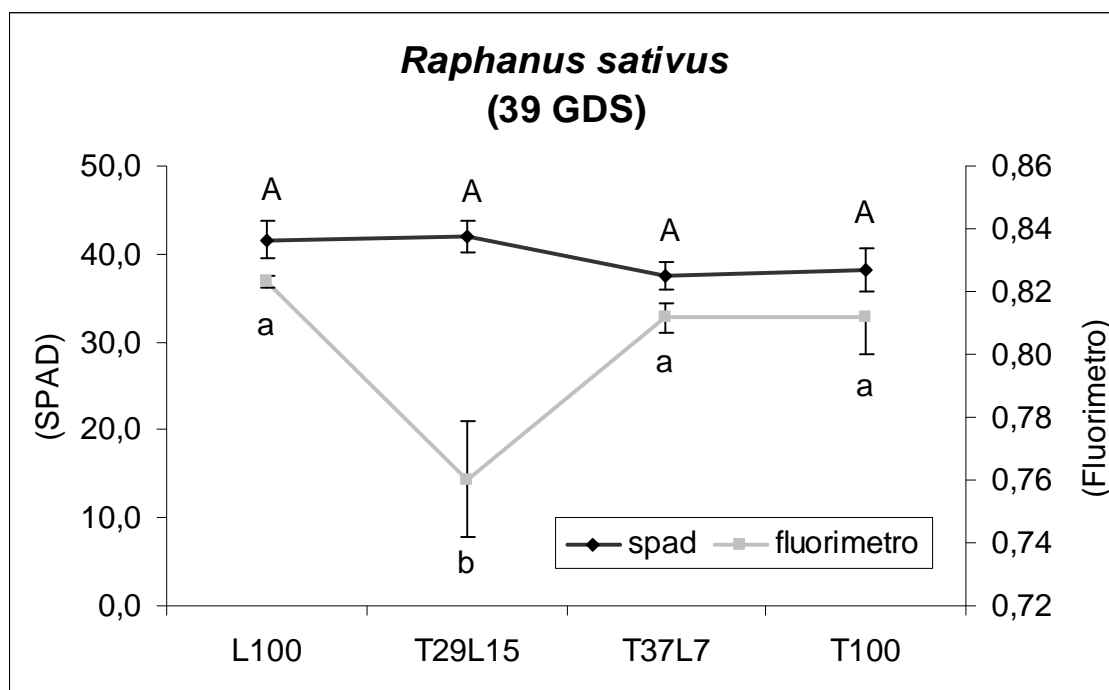


Figura 35 - SPAD e fluorimetro in *Raphanus sativus*. Le barre verticali indicano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.3.1 Effetti principali

Confrontando il comportamento delle diverse specie, mediando l'effetto trattamento, per i valori di SPAD (Fig. 36), si è potuto osservare come il girasole, abbia presentato una minore concentrazione di clorofilla (32,2), come già notato in precedenza. *Raphanus sativus* e *Medicago sativa* non hanno dimostrato differenze nello stato nutrizionale, mantenendosi su valori superiori a quelli del girasole statisticamente non differenti tra loro (38,5 per l'erba medica e 39,8 per il rafano).

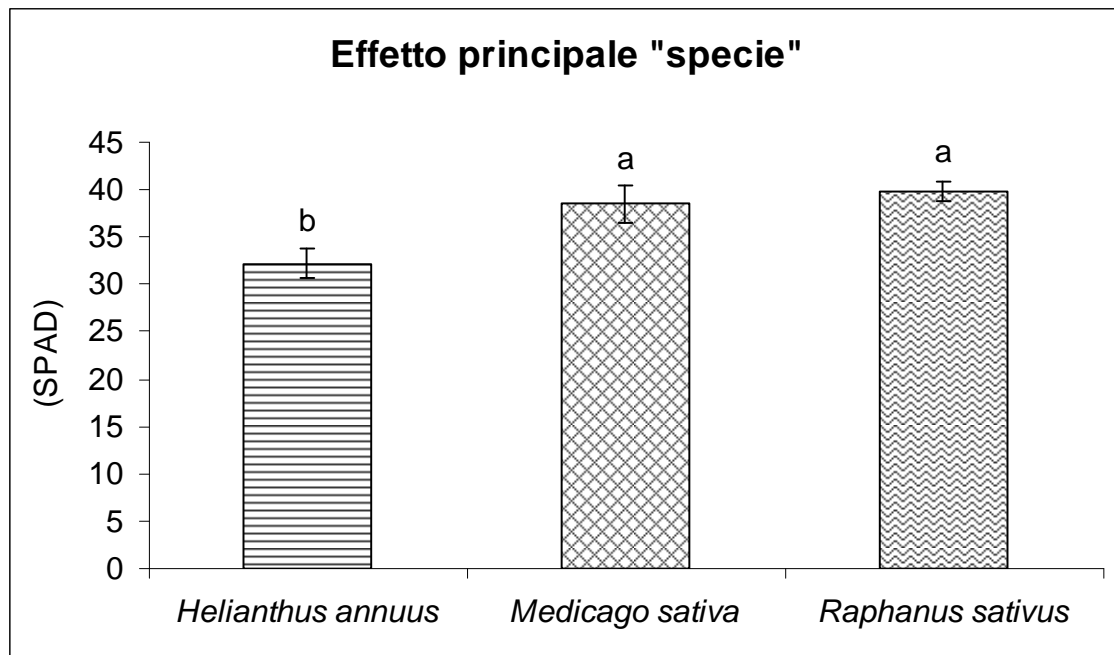


Figura 36 - Valori di SPAD effetto principale specie: gli istogrammi rappresentano il valore medio tra i trattamenti per le diverse specie in prova. Le barre verticali indicano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

L'effetto principale "trattamento" (Fig. 37) ha evidenziato che le specie coltivate in presenza di uno strato di riporto non contaminato (7 o 15 cm di terreno di Legnaro) non hanno presentano alterazioni evidenti nel contenuto di clorofilla, rispetto alle varietà coltivate sul controllo L100 (100% terreno di Legnaro).

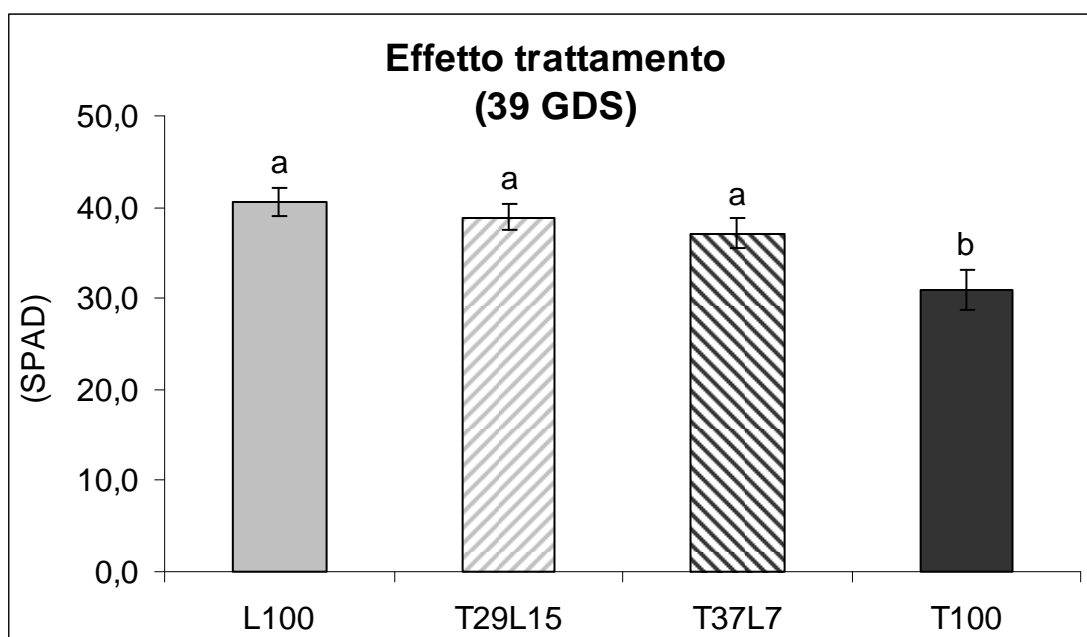


Figura 37 - Valori di SPAD effetto principale trattamento: gli istogrammi rappresentano il valore medio delle specie per i diversi trattamenti. Le barre verticali indicano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra le specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

L'analisi statistica ha permesso di valutare, anche per i valori di fluorimetria, l'effetto principale "specie" evidenziando come il girasole abbia presentato in media maggiore fluorescenza, quindi minore stress di *Raphanus sativus* e *Medicago sativa*, le quali, tra loro non hanno presentato differenze significative.

Per quanto concerne l'effetto principale "trattamento" si è potuto notare che non ci sono state differenze tra T37L7 e il testimone (L100), mentre maggiore stress si è avuto nel substrato con 15 cm di copertura e T100. Da ricordare che per il T29L15 ha sicuramente influito il decadimento di attività fotosintetica riscontrato per il rafano per i motivi sopra esposti.

## 4.1.4 *Apparati epigei*

### 4.1.4.1 **Determinazione della biomassa**

I dati relativi a questa prima prova, sono da considerarsi puramente indicativi e non rispondenti al possibile sviluppo finale della specie; le piante sono, infatti, state coltivate per soli 47 giorni, in ambiente non comparabile ad una situazione di campo. Va inoltre sottolineato che l'erba medica è una specie poliennale e che i valori ad essa attribuiti fanno riferimento a 5 piante/vaso.

Dalla raccolta eseguita dopo 47 giorni dalla semina, sono state ricavate indicazioni ulteriori sulla risposta delle specie di interesse agrario ai diversi trattamenti predisposti.

Lo sviluppo della biomassa, valutato in termini ponderali (peso secco) ha mostrato come, sia l'erba medica che il rafano, a questo stadio di sviluppo, non presentino differenze tra i trattamenti, caratterizzati dalla presenza di uno strato di riporto e paragonabili al controllo. Fa eccezione il girasole, che ha evidenziato un aumento di biomassa nelle piante coltivate in T29L15 (Fig. 38).

Evidente, quindi, il vantaggio ricavato dall'applicazione di uno strato non contaminato di terreno, che ha consentito un migliore sviluppo delle piante, riducendo gli effetti negativi dati dal substrato inquinato. Tale fatto risulta particolarmente evidente nella leguminosa, per la quale il terreno di copertura ha addirittura consentito la sopravvivenza delle piante. Nel rafano ed erba medica si è dimostrato sufficiente uno strato di 7 cm, considerando che la risposta è stata uguale a quella ottenuta in T29L15 e L100. Le biomasse prodotte, infatti, per erba medica si sono attestate su pesi pari, in media, a 20 volte quello delle piante allevate su T100 (x20 su L100, x17,6 su T29L15, x21,9 su T37L7), mentre per il girasole ed il rafano il peso è stato mediamente 2,8 e 1,8 volte, rispettivamente, maggiore a quello delle stesse specie coltivate su pirite pura (in girasole: x2,4 su L100, x3,7 su T29L15, x 2,5 su T37L7; in rafano: x1,9 su L100, x1,8 su T29L100, x1,7 su T37L7).

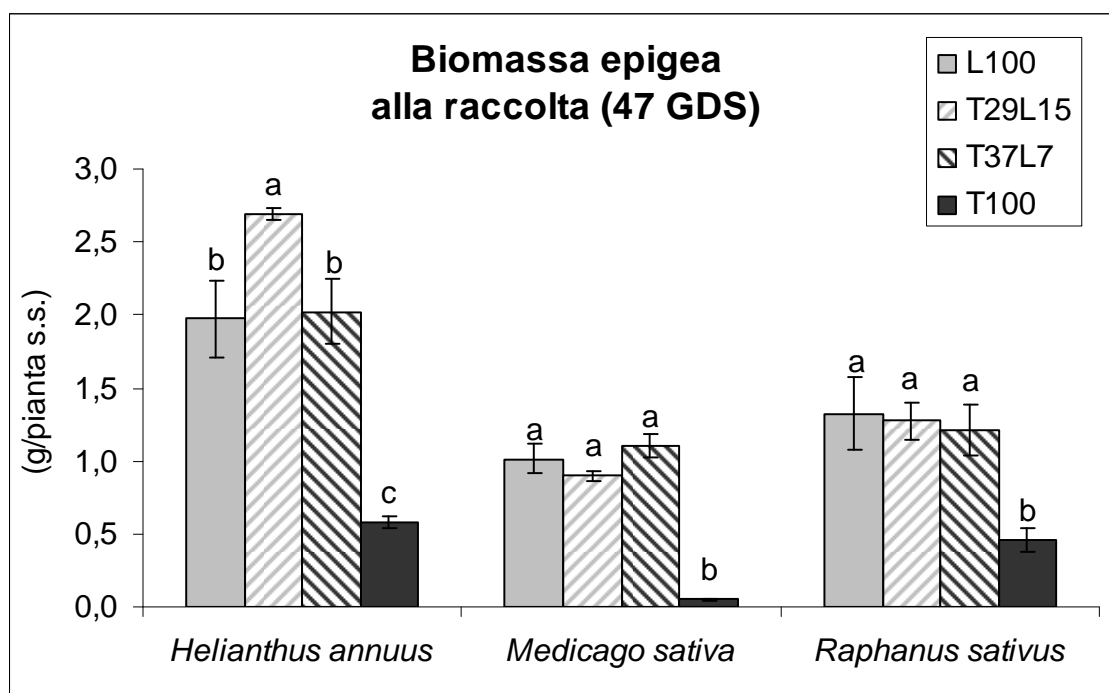


Figura 38 - Biomassa prodotta a 47 GDS, fine sperimentazione. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

L'interazione "specie per trattamento" non è significativa; comunque, andando ad analizzare la biomassa prodotta dalle singole specie nei diversi trattamenti si è notato come i valori relativi alle piante allevate su sola pирite siano stati sempre inferiori rispetto agli altri trattamenti, soprattutto per l'erba medica, dove alcune piante sono morte.

Per quanto concerne i substrati, indipendentemente dalla specie coltivata, l'analisi statistica non ha mostrato differenze significative tra L100, T29L15 e T37L7, confermando come la copertura con terreno sano, abbia aumentato la tolleranza delle specie all'orizzonte inquinato. Nel T100, si è evidenziata una riduzione di biomassa prodotta, esprimendo la generale difficoltà delle specie ad accrescersi in un substrato particolare come le ceneri di pирite.

Per quanto riguarda l'effetto trattamento, la maggiore produzione di biomassa, media dei quattro trattamenti, si è raggiunta in *Helianthus annuus*, mentre l'erba medica si è distinta per una minore produttività, influenzata



principalmente dalla scarsa biomassa ottenuta in T100, a sua volta legata anche alla morte di alcune piante.

#### 4.1.4.2 Curve di accrescimento

Seguendo il programma prestabilito si è proceduto al taglio (al colletto) (taglio della replica 1 a 24 GDS, taglio della replica 2 a 31 GDS, taglio della replica 3 a 38 GDS, taglio delle repliche 4-5-6 a 47 GDS) della porzione aerea delle specie di interesse agrario. Questo ha consentito di ottenere una traccia relativa all'andamento della produzione di biomassa per ogni specie e trattamento, come rappresentato nei grafici seguenti (Fig. 39, 40 e 41).

Applicando l'equazione di Gompertz è stato possibile interpolare le curve di accrescimento, che hanno fornito un'indicazione relativa alle variazioni in continuo (giornaliere) del quantitativo di biomassa prodotta. Di seguito sono riportati l'equazione ed i valori dei parametri utilizzati per calcolare le curve, per ciascuna specie (Tab. 15, 16 e 17).

$$\text{Equazione di Gompertz: } Y = c * e^{-e^{-b * (x - m)}}$$

dove la variabile indipendente "x" rappresenta il tempo; mentre "c", "b" e "m" indicano rispettivamente il valore massimo (Y max); la pendenza del punto di flesso (velocità di accrescimento); il valore di X a cui il valore di Y (lunghezza radicale cumulata) diviene metà del suo massimo (Y max/2).

I parametri "b" ed "m", in particolare, danno indicazioni circa la velocità di accrescimento delle piante (Tab. 15, 16 e 17).

Tabella 15 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in girasole.

<b>Girasole</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>c</b>	3,053386	0,623985	4,189211	2,256011
<b>m</b>	48,79273	18,01817	111,5456	172,0232
<b>b</b>	0,095182	0,128372	0,112705	0,15602

Tabella 16 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in erba medica.

<b>Erba medica</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>c</b>	1,183586	–	0,916019	1,11241
<b>m</b>	115,6298	–	842,7145	5818,089
<b>b</b>	0,139609	–	0,232098	0,291694

Tabella 17 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in rafano.

<b>Erba medica</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>c</b>	1,358185	0,4597806	1,482845	1,327775
<b>m</b>	60,18257	18938,188	197,3086	159,0948
<b>b</b>	0,166968	0,3181847	0,151289	0,1576632

Dalle curve di accrescimento del girasole (Fig. 39) si è evidenziato come nel T29L15 questa specie abbia presentato un notevole sviluppo della biomassa finale raggiunta in tempi minori rispetto agli altri trattamenti, superando di diverse unità la produzione ottenuta nel terreno di Legnaro, soprattutto dopo i 30 GDS. Mentre l'andamento della curva nel T37L7 è stato molto vicino a quello del controllo, con produzione finale pressoché identica.

Le piante hanno mantenuto una produzione in peso simile nei primi 20 giorni, differenziando, successivamente, sempre più la velocità di sviluppo dell'apparato epigeo nel trattamento T100 rispetto gli altri.

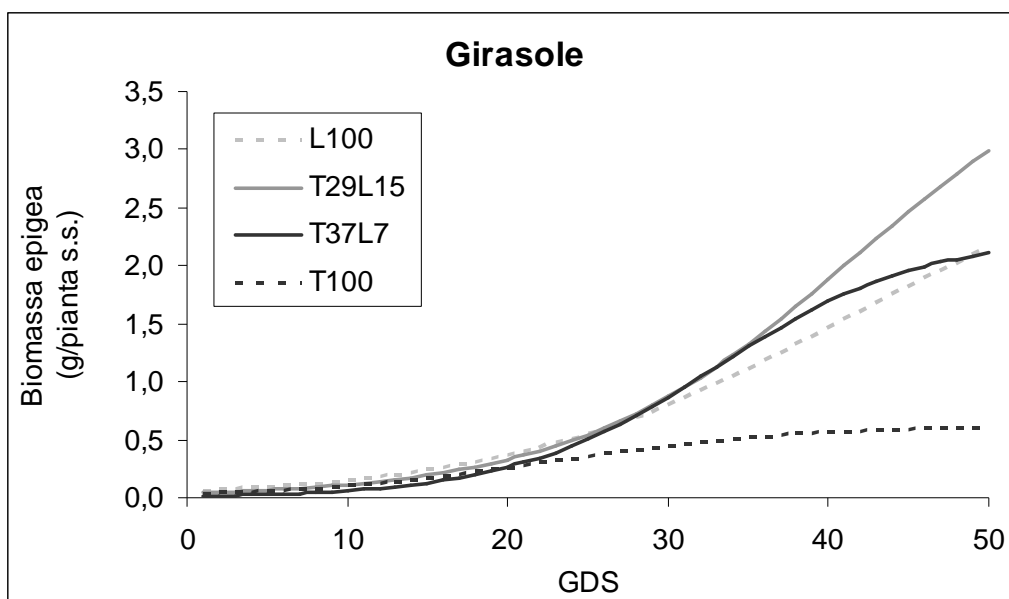


Figura 39 - Curve di accrescimento di girasole determinate con l'equazione di Gompertz.

Intollerante è risultata *Medicago sativa* nel substrato esclusivamente costituito da ceneri di pirite, in cui poche piante sono sopravvissute e per questo non è stato possibile determinare la curva di accrescimento (Fig. 40).

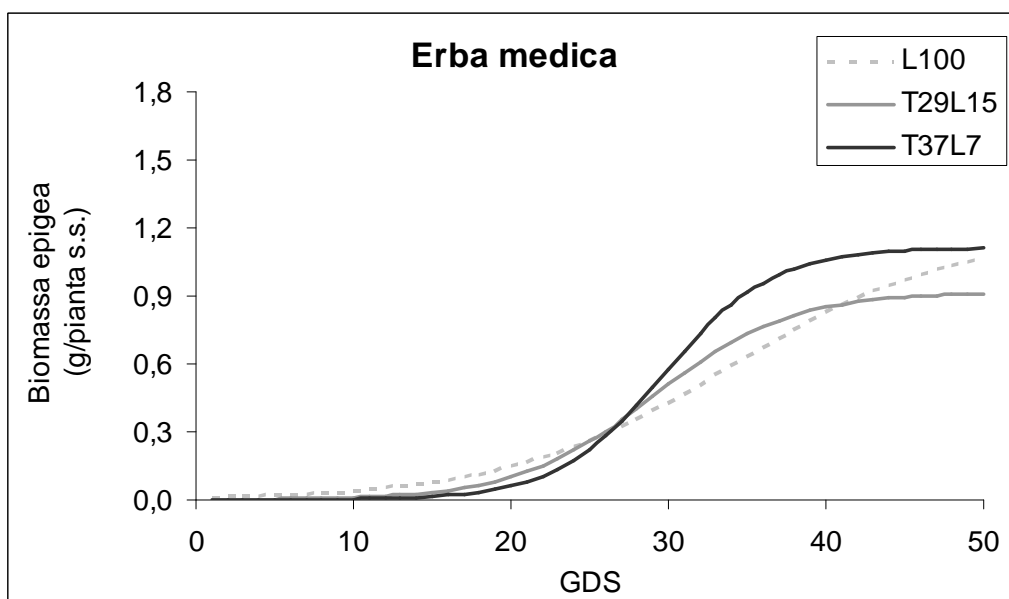


Figura 40 - Curve di accrescimento di erba medica determinate con l'equazione di Gompertz.

Le curve Gompertz per il rafano hanno evidenziato come la produzione finale, dei trattamenti con strato di riporto, siano stati equivalenti (T29L15) o di poco inferiori (T37L7) al trattamento con il terreno non inquinato, presentando

però, in entrambi i casi, una velocità di accrescimento inferiore per tutto il periodo di coltivazione (Fig. 41). Per il T100, invece l'accrescimento è stato decisamente più lento dei precedenti substrati con una ridotta produzione finale. Sembra quindi che la sovrapposizione di un orizzonte "sano", per il rafano, abbia consentito, attorno ai 50 giorni dalla semina di recuperare la diminuzione di biomassa dovuta alla presenza del substrato inquinato, fino al raggiungimento di pesi finali comparabili al controllo.

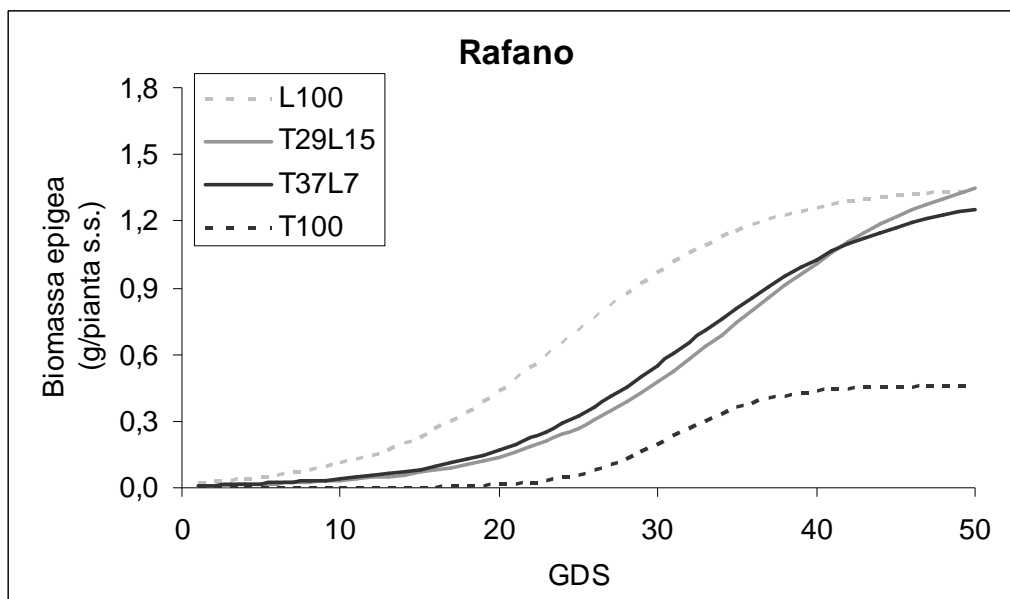


Figura 41 - Curve di accrescimento di *Raphanus sativus* determinate con l'equazione di Gompertz.

Si può perciò concludere che la presenza dello strato di riporto ha permesso di ridurre la fitotossicità delle ceneri di pirite e di garantire una velocità di accrescimento quasi sempre molto vicina a quella ottenuta nel terreno non inquinato e a volte superiore (v. *Helianthus annuus* in T29L15). Il girasole si è avvantaggiato più dei 15 cm e la medica, anche se con differenze minime, dei 7 cm. Meno evidente nel rafano, l'effetto dell'orizzonte "sano" in quanto pur presentando una biomassa finale paragonabile a L100, ha dimostrato una minore velocità di accrescimento indipendentemente dai 7 o 15 cm, in quanto i valori sono simili.

## 4.1.5 I metalli pesanti

### 4.1.5.1 Concentrazione di metalli pesanti

Dalla lettura con ICP, si sono ricavate le concentrazioni di metalli pesanti nelle porzioni epigee delle specie erbacee di interesse agrario che, raffrontate ad ogni singolo trattamento, hanno fornito interessanti indicazioni preliminari (le piante sono state coltivate solo 47 giorni), sulle condizioni migliori per ottenere soddisfacenti assorbimenti.

Gli elementi analizzati sono stati divisi in due grandi categorie: 1- i metalli pesanti, distinti a loro volta tra quelli che nel substrato superavano i limiti tabellari del D.M. 471/99 (cobalto, piombo, rame, zinco) e As, Cd, Cr tot., Mn e Ni; 2- ferro e zolfo, quali principali costituenti delle ceneri di pirite e residui di lavorazione.

Inoltre si sottolinea che nella valutazione di *Medicago sativa*, i dati relativi al trattamento T100, come già accennato, non hanno attendibilità statistica, poiché poche piante sono sopravvissute, in conseguenza ad una evidente intolleranza alla coltivazione diretta su un substrato anomalo inquinato da metalli pesanti. Pertanto, in fase di mineralizzazione le tre repliche finali sono state riunite in un unico campione, come già descritto in materiali e metodi.

Nei grafici sono state indicate le differenze significative a livello statistico all'interno di ogni specie tra ciascun trattamento, utilizzando lettere diverse (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### **Interazione trattamento per specie**

In linea generale e per tutti gli elementi considerati, fanno eccezione il cadmio (Fig. 47), il cromo tot (Fig. 48) e lo zolfo (Fig. 52), si nota la concentrazione molto elevata riscontrata nei tessuti di erba medica nel trattamento con sole ceneri di pirite (T100). Tale valore è però da ritenersi puramente indicativo, mancando di analisi statistica, come più volte già

sottolineato. Il dato viene comunque riportato per completezza, ma non sarà discusso nei risultati.

Anomali anche alcuni valori di concentrazione riscontrati nel controllo (L100), che talvolta eguagliano o superano gli assorbimenti negli altri trattamenti, questo perchè nel terreno di Legnaro vi sono metalli presenti in concentrazioni elevate (vedi Tab. 10).

L'interazione trattamento per specie per il cobalto ha presentato una significatività positiva, e, come si può osservare nel grafico in figura 42, esso è stato assorbito in quantitativi uguali in *Medicago sativa* nei trattamenti T37L7 e T29L15. Nel rafano un discreto risultato si è ottenuto dal trattamento T29L15 e T100 in cui le concentrazioni sono state dello stesso ordine di grandezza, mentre nulla è stata la concentrazione nel trattamento con 7 cm di terreno di riporto. Il girasole ha presentato accumulo esclusivamente nel T100. Ciò ha dimostrato che lo strato di copertura, in termini di concentrazione del cobalto non ha favorito le specie testate.

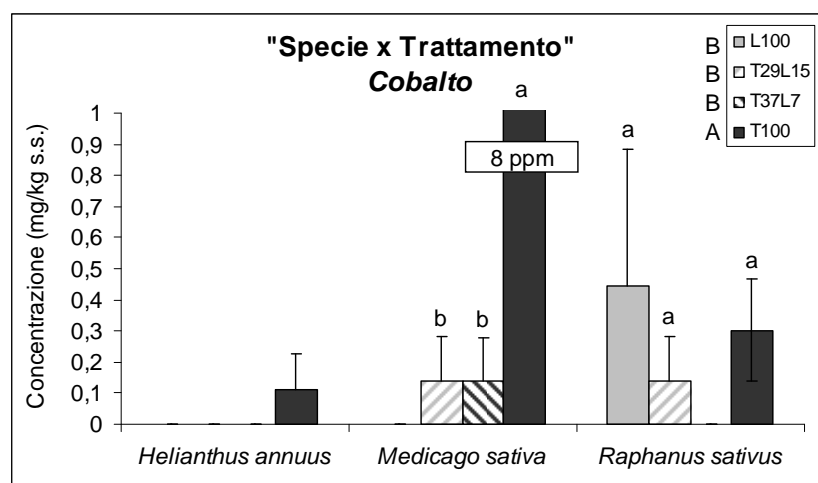


Figura 42 - Cobalto, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per quanto riguarda rame, piombo e zinco, le interazioni "trattamento x specie" sono risultate tutte positive.

In linea generale, all'interno della stessa specie, non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i diversi trattamenti.

Fanno eccezione l'assorbimento del rame in rafano (Fig. 43) e del piombo in girasole (Fig. 43) coltivati su sole ceneri di pirite: il rafano ha infatti concentrato circa 4 volte di più che negli altri trattamenti mentre il girasole ha concentrato 19 volte di più dei trattamenti con orizzonte di ricoprimento, dimostrando che uno strato di riporto non migliora l'assorbimento di questi elementi.

Pur rimanendo ben lontana la soglia di iperaccumulazione (1000 ppm) di rame, in T100 rafano e medica hanno superato i livelli medi riscontrabili nella sostanza secca di specie coltivate in assenza di contaminazione che, da dati bibliografici (Marschner, 1995) si attesta su valori compresi tra 5 e 20 ppm, come confermato dal controllo utilizzata nella sperimentazione (L100).

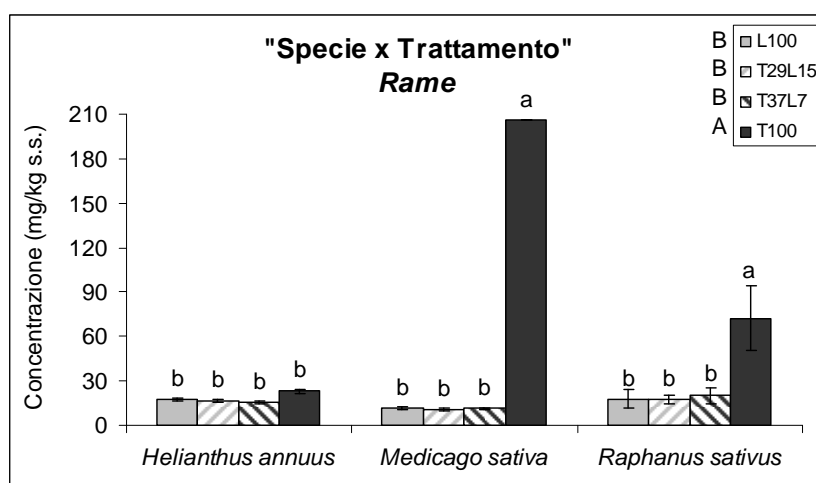


Figura 43 - Rame, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

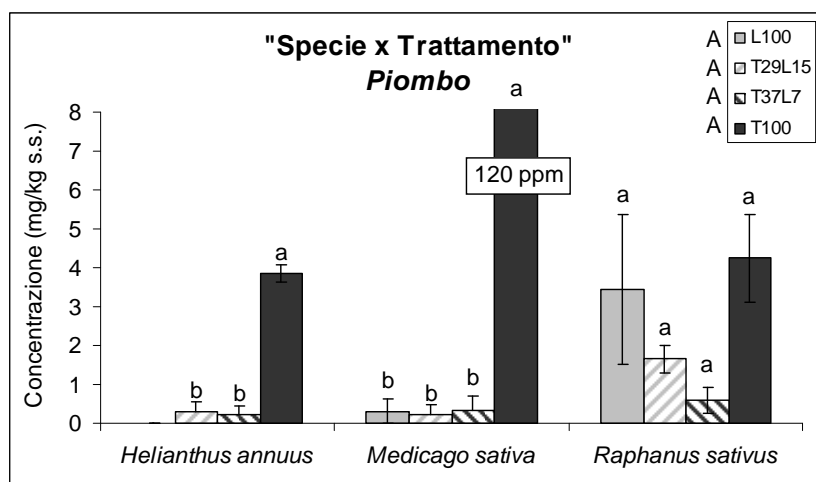


Figura 44 - Piombo, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Si è potuto inoltre notare che, in media, per tutte le specie e indipendentemente dal trattamento, si sono riscontrate concentrazioni di zinco (Fig. 45) pari a quelle normalmente osservate nella sostanza secca di piante coltivate in condizioni normali (25-150 ppm) (Marschner, 1995).

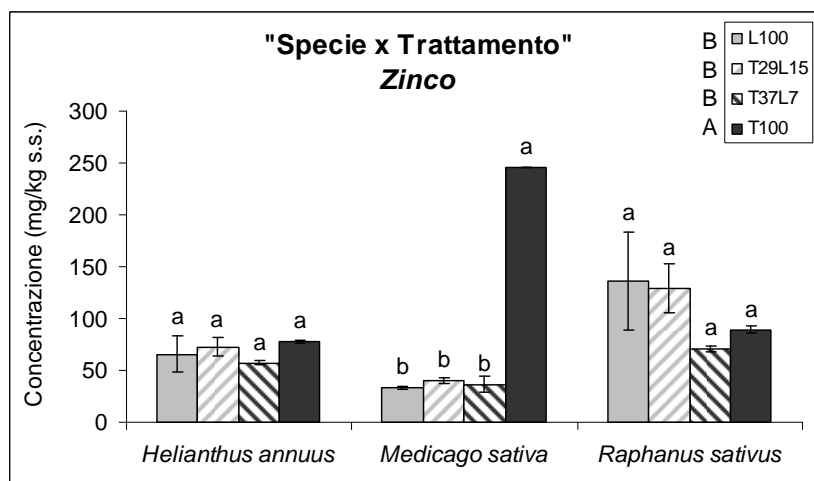


Figura 45 - Zinco, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Tra gli elementi che non superano i limiti di legge nel substrato oggetto di studio, l'interazione "trattamento per specie" è risultata non significativa solo per cromo totale e nichel.



Per quanto riguarda l'arsenico (Fig. 46) le specie testate hanno mostrato migliore concentrazione nel trattamento T100, mentre non vi sono state differenze significative all'interno delle singole specie per quanto riguarda gli assorbimenti ottenuti in presenza del terreno sano di copertura.

Solo nell'erba medica, si è potuto notare che con 15 cm di copertura non vi è stato assorbimento, mentre, pur molto basso, vi è stato assorbimento con 7 cm di copertura. Sembra quindi, anche per questo metallo, come per piombo e rame, che la sovrapposizione di un orizzonte non inquinato non ne migliori l'assorbimento.

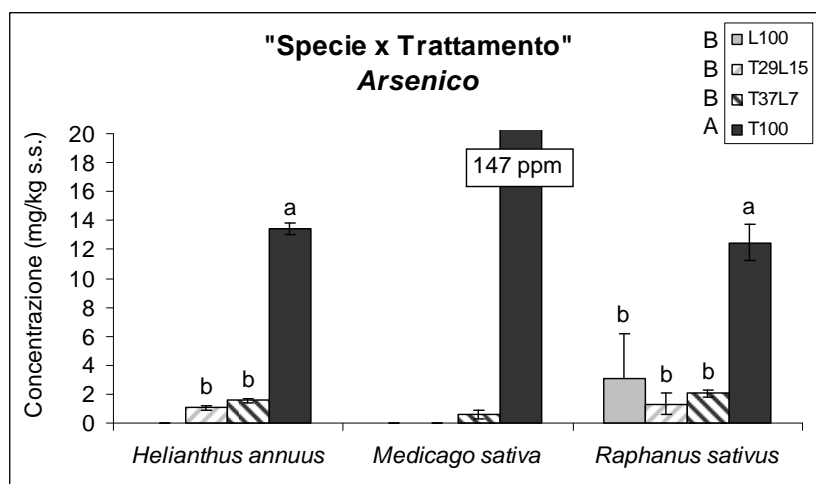


Figura 46 - Arsenico, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Diverso il ragionamento per il cadmio (Fig. 47), che è stato assorbito dal girasole in concentrazioni superiori nei trattamenti con l'orizzonte di ricoprimento, rispetto al T100. I 7 cm di copertura, hanno favorito anche il rafano che ha presentato una concentrazione leggermente superiore a quella ottenuta in T100, mentre inferiore è stata la concentrazione ottenuta in T29L15. *Medicago sativa*, ha mostrato assorbimento solo in T100, ricordando che questo dato non è attendibile a livello statistico.

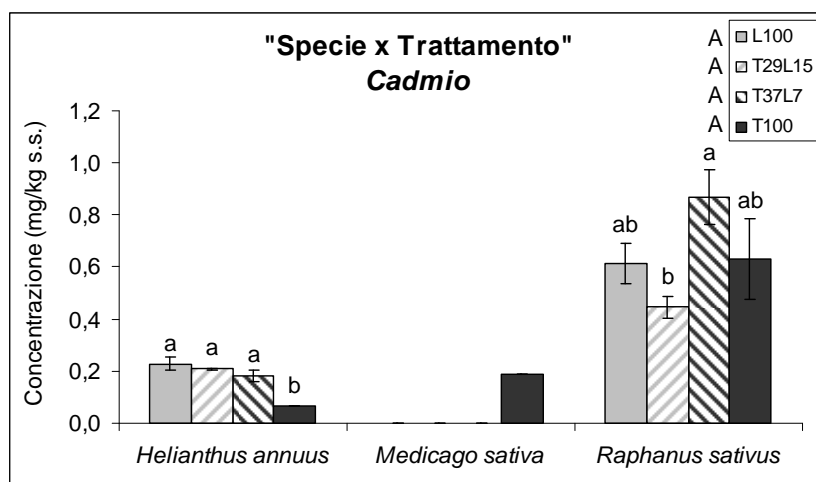


Figura 47 - Cadmio, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Ricordando che l'interazione "trattamento x specie" per il cromo totale e il nichel non è risultata significativa, la concentrazioni per questi elementi e per il manganese, per ogni specie non ha mostrato differenze significative nei tre trattamenti sperimentali (T37L7, T29L15 e T100) (Fig. 48, 49 e 50). Da evidenziare, per il cromo, l'effetto positivo della sovrapposizione degli orizzonti di ricoprimento in girasole, e, per il manganese (Fig. 49) i maggiori assorbimenti del rafano nel trattamento T100.

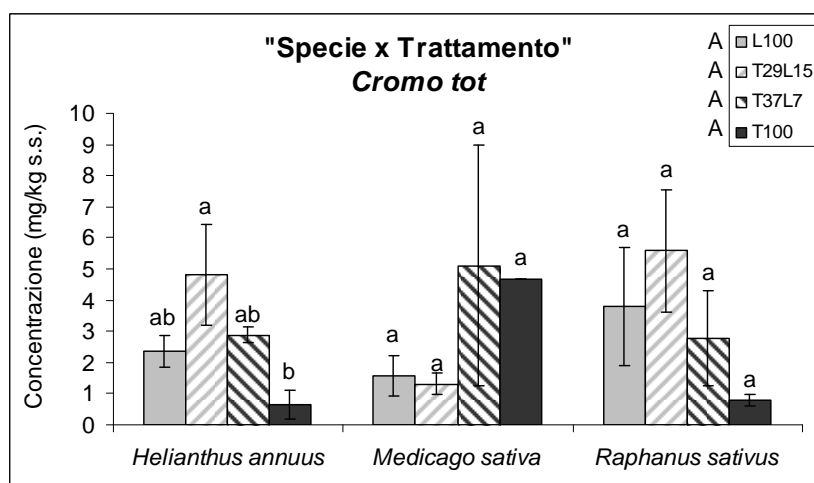


Figura 48 - Cromo tot, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per il manganese (Fig. 49), interessante notare che in tutti i trattamenti le concentrazioni si sono mantenute all'interno dei valori che in media si riscontrano in piante coltivate in condizioni normali, cioè entro i 20-200 ppm (Marschner, 1995).

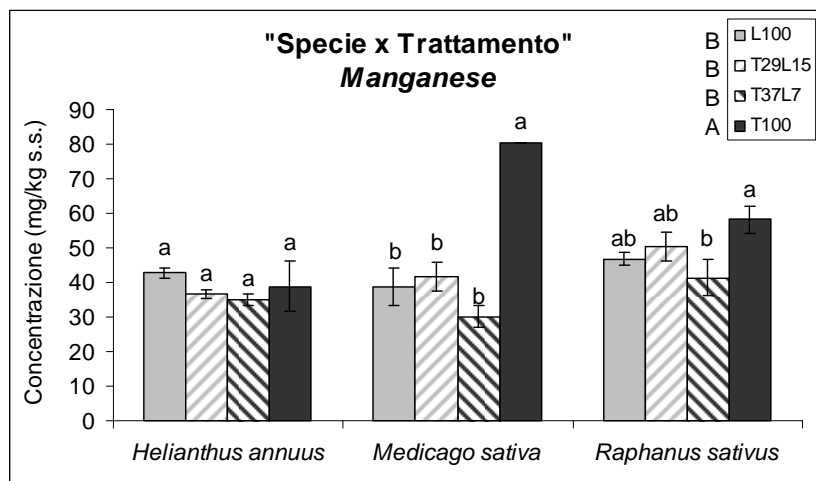


Figura 49 - Manganese, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per il nichel (Fig. 50), invece erba medica coltivata in T100 e T37L7, rafano in T29L15 e T100 e girasole in T29L15 hanno superato il livello medio di concentrazione rilevabile in piante coltivate su terreno non inquinato che varia da 0,1 a 1 ppm (Marschner, 1995), come riscontrato pure nel controllo.

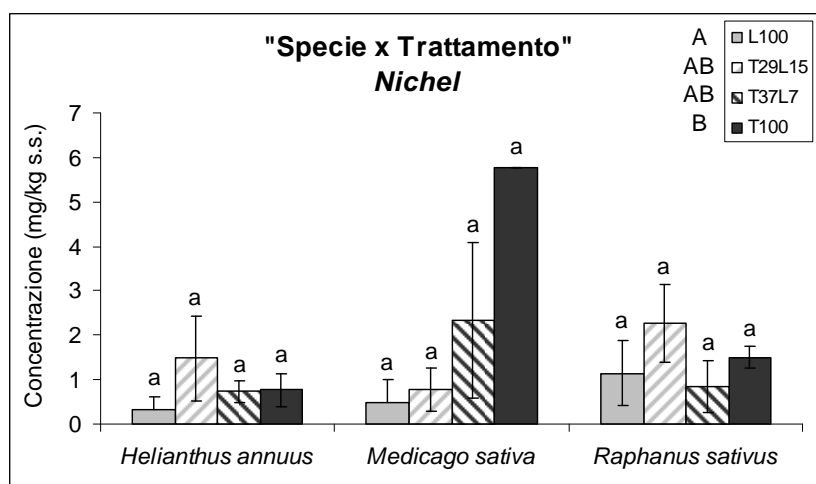


Figura 50 - Nichel, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per il ferro e per lo zolfo l'interazione "trattamento x specie" è significativa. Nelle tre specie testate si è notato che il trattamento T100 ha favorito un maggiore accumulo del ferro. Tale concentrazione si è discostata rispetto agli altri trattamenti, che non presentano differenze significative a livello statistico tra di essi, all'interno di ogni singola specie (Fig. 51). Tali concentrazioni si attestano sui valori medi rilevati in specie coltivate in terreni non inquinati (Marschner, 1995), che per il ferro variano da 1 a 1000 ppm, come confermano le concentrazioni nelle tre specie coltivate nel trattamento L100.

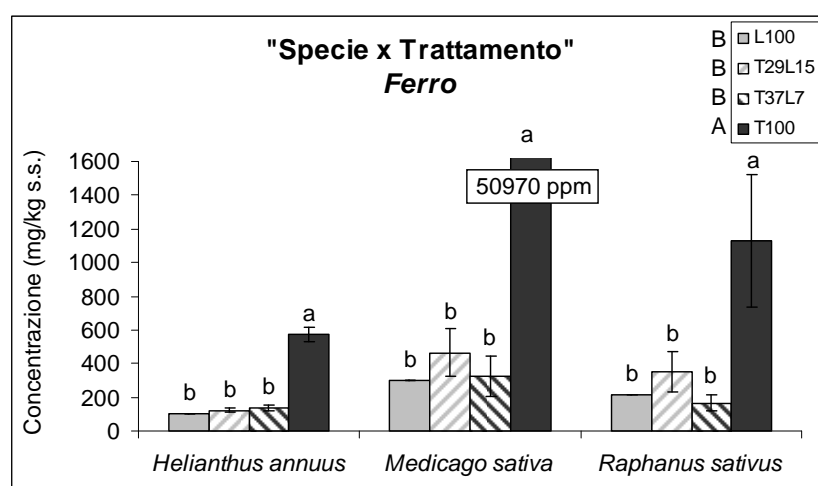


Figura 51 - Ferro, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Lo zolfo è stato assorbito da rafano in maniera non statisticamente differente in tutti e tre i trattamenti, mentre in erba medica e girasole si sono registrate differenze significative tra il trattamento costituito interamente da ceneri di pirite e i trattamenti con terreno di copertura (Fig. 52).

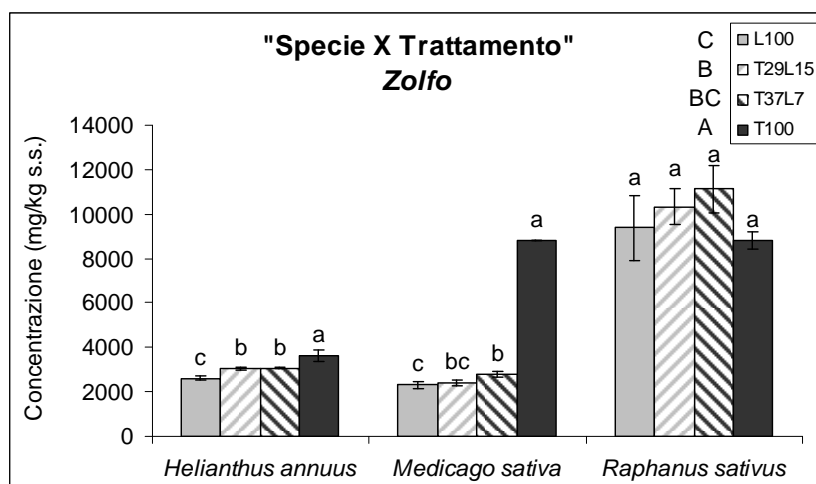


Figura 52 - Zolfo, interazione trattamento per specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Erba medica in T100 e rafano in tutti i trattamenti sperimentali superano le concentrazioni medie riportate in bibliografia per questo elemento che variano da 1000 a 4000 ppm (Marschner, 1995).

#### **Effetto principale specie.**

Di seguito è stato analizzato l'effetto principale specie, ossia è stata presa in considerazione la media delle concentrazioni ottenute nelle tre specie testate, indipendentemente dal trattamento.

Per cobalto, rame e piombo, l'effetto principale specie individua una gerarchia tra le specie, che vede l'erba medica come quella che ha mostrato un migliore assorbimento medio (Fig. 53). Non si evidenziano differenze statisticamente significative tra le altre due specie, fatta eccezione per il rame ove il rafano ha concentrato di più rispetto al girasole. Per quanto riguarda lo zinco il rafano è la specie che ne ha assorbito le maggiori concentrazioni, seguito da erba medica e quindi dal girasole.

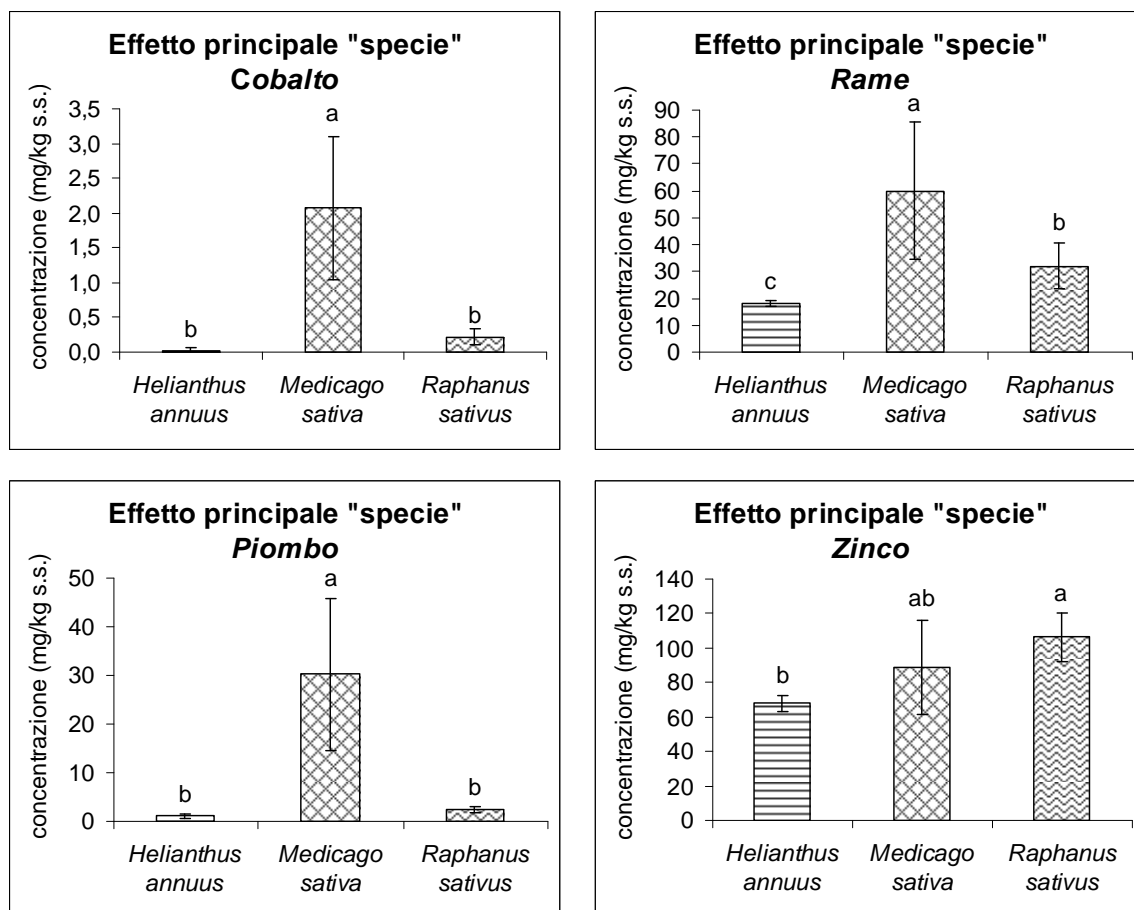


Figura 53 - Co, Cu, Pb e Zn: effetto principale specie, per specie diverse gli istogrammi rappresentano i valori medi dei trattamenti. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono differenze significative tra le specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per gli altri metalli considerati, *Medicago sativa* si è dimostrata più efficiente per l'assorbimento di arsenico (Fig. 54), mentre tra rafano e girasole non vi sono state differenze significative.

*Raphanus sativus* ha dimostrato maggiore capacità di concentrare cadmio (Fig. 54), mentre il cromo totale viene assorbito da tutte le specie in modo analogo. In manganese e nichel *Helianthus annuus* ha presentato minore concentrazione rispetto a *Medicago sativa* e *Raphanus sativus*.

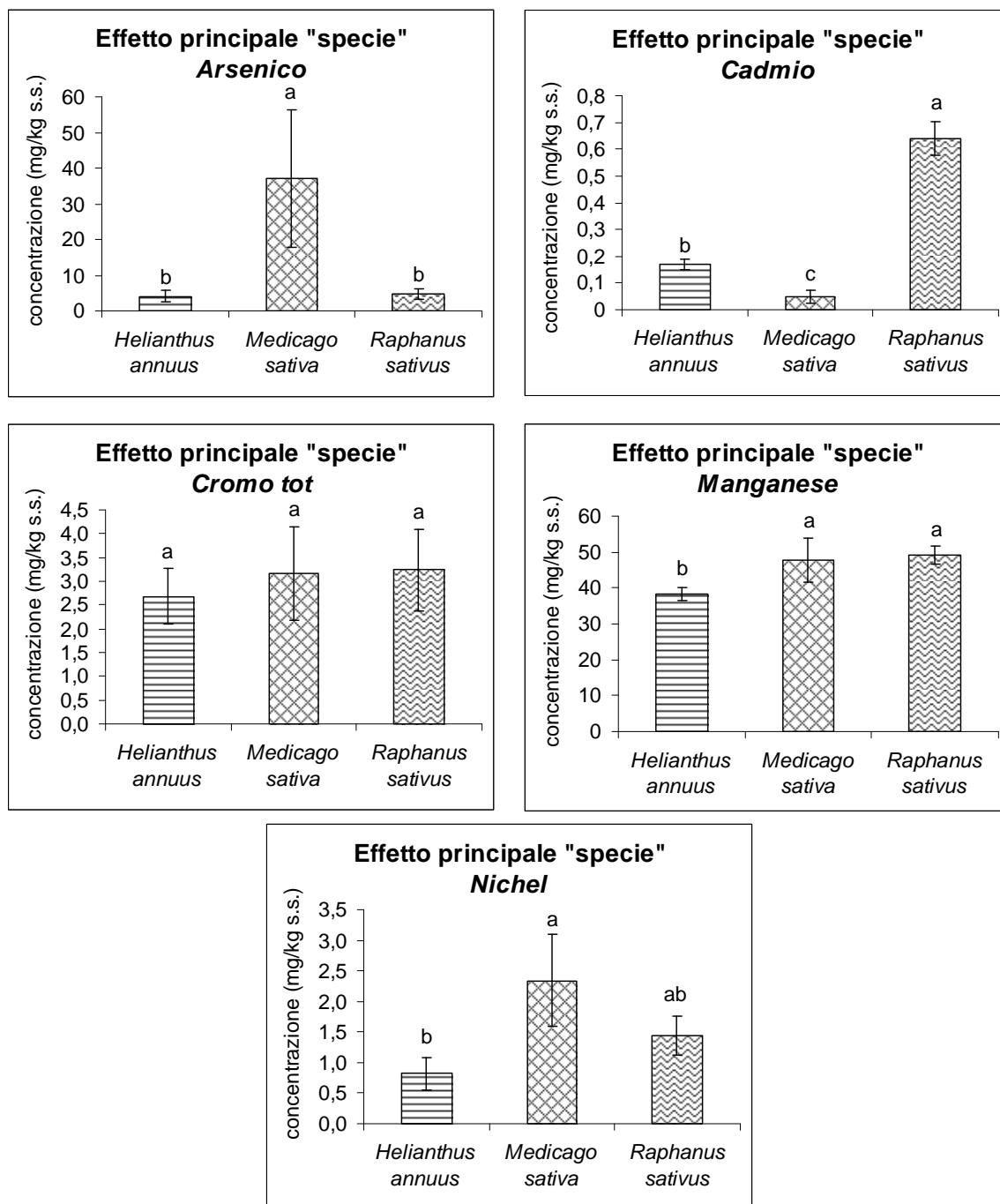


Figura 54 - As, Cd, Cr tot, Mn, Ni: effetto principale specie, per specie diverse gli istogrammi rappresentano i valori medi dei trattamenti. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono differenze significative tra le specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

L'erba medica è la specie che meglio sembra assorbire il ferro, così come il rafano per lo zolfo, ma, mentre per il ferro il girasole si è presentato ancora a

livelli inferiori rispetto alle altre due specie, nello zolfo ha concentrato in modo uguale all'erba medica (Fig. 55).

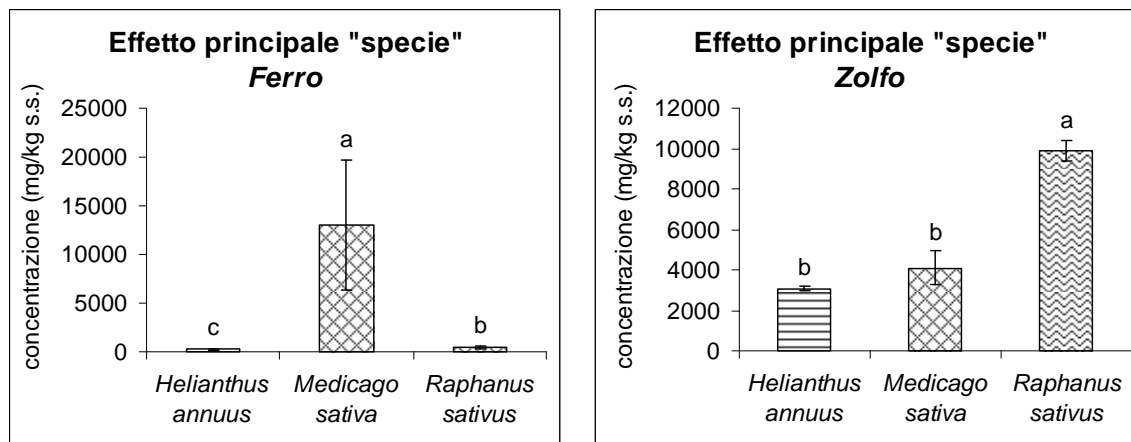


Figura 55 - Fe e S: effetto principale specie, per specie diverse gli istogrammi rappresentano i valori medi dei trattamenti. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono differenze significative tra le specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Concludendo zinco, ferro e zolfo, indipendentemente dai trattamenti considerati, sono risultati i metalli maggiormente bioconcentrati dalle tre specie. Questo può essere spiegato dall'elevata concentrazione di questi tre elementi nel substrato inquinato.

Rilevando però che per tutti i metalli pesanti rimango ben lontane le soglie di iperaccumulo.

#### **Effetto principale trattamento.**

Di seguito vengono illustrati i risultati ottenuti considerando i soli trattamenti predisposti per la sperimentazione, indipendentemente dalla specie impiegata per la fitoestrazione: "effetto principale trattamento".

Per Co, Cu, Pb e Zn, si è riscontrato un andamento identico: in T100 si sono registrate le concentrazioni maggiori, mentre non ci sono state differenze tra i trattamenti con terreno di copertura (Fig. 56).



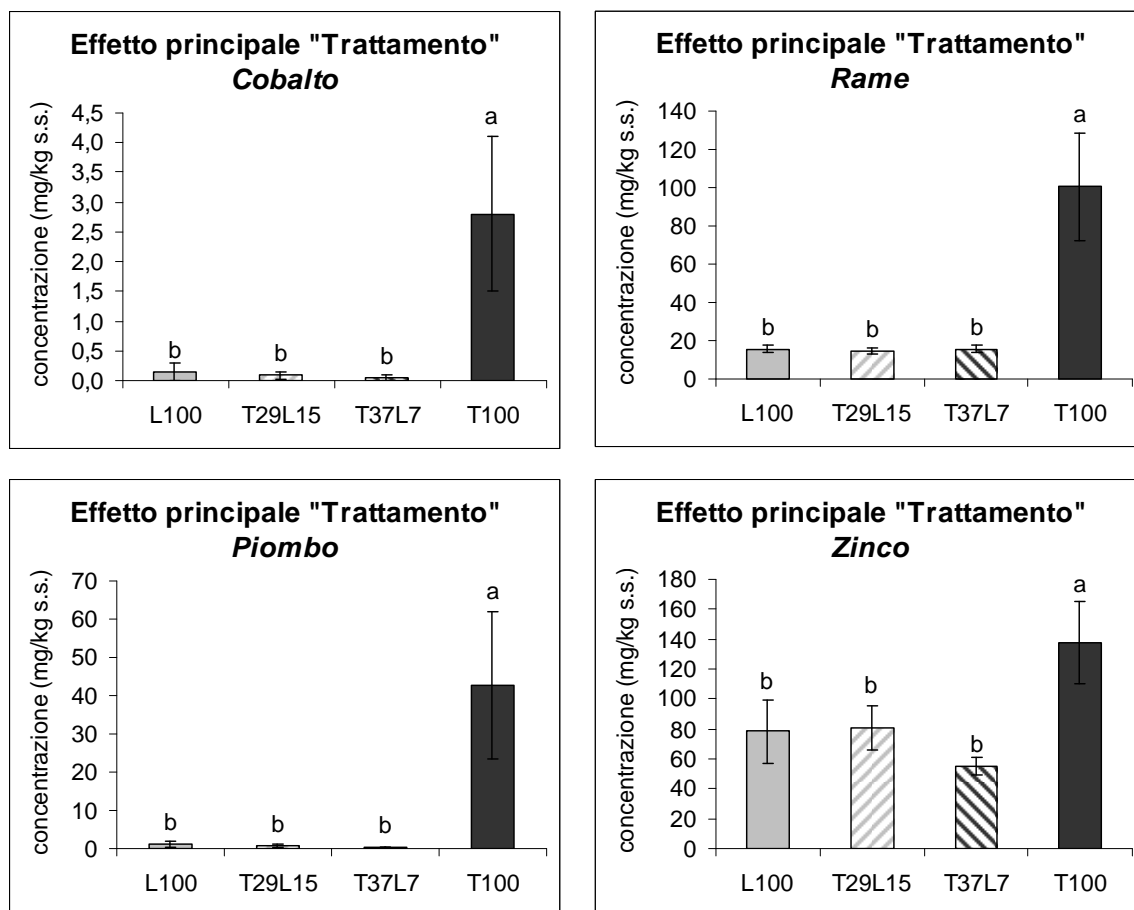


Figura 56 - Co, Cu, Pb e Zn: effetto principale trattamento, per trattamenti diversi gli istogrammi rappresentano i valori medi delle specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per gli elementi entro i limiti di legge (Fig. 57), c'è da rilevare che l'arsenico manganese e nichel hanno presentato una maggiore e netta concentrazione nei trattamenti con sola cenere di pirite. Il cromo è stato assorbito senza differenze significative tra i trattamenti sperimentali con orizzonte di riporto e controllo, in minor quantità in T100. Infine per il cadmio le concentrazioni inferiori si sono avute in T29L15, mentre le maggiori nel trattamento con 7 cm di ricoprimento e in sole ceneri di pirite che hanno presentato valori simili.

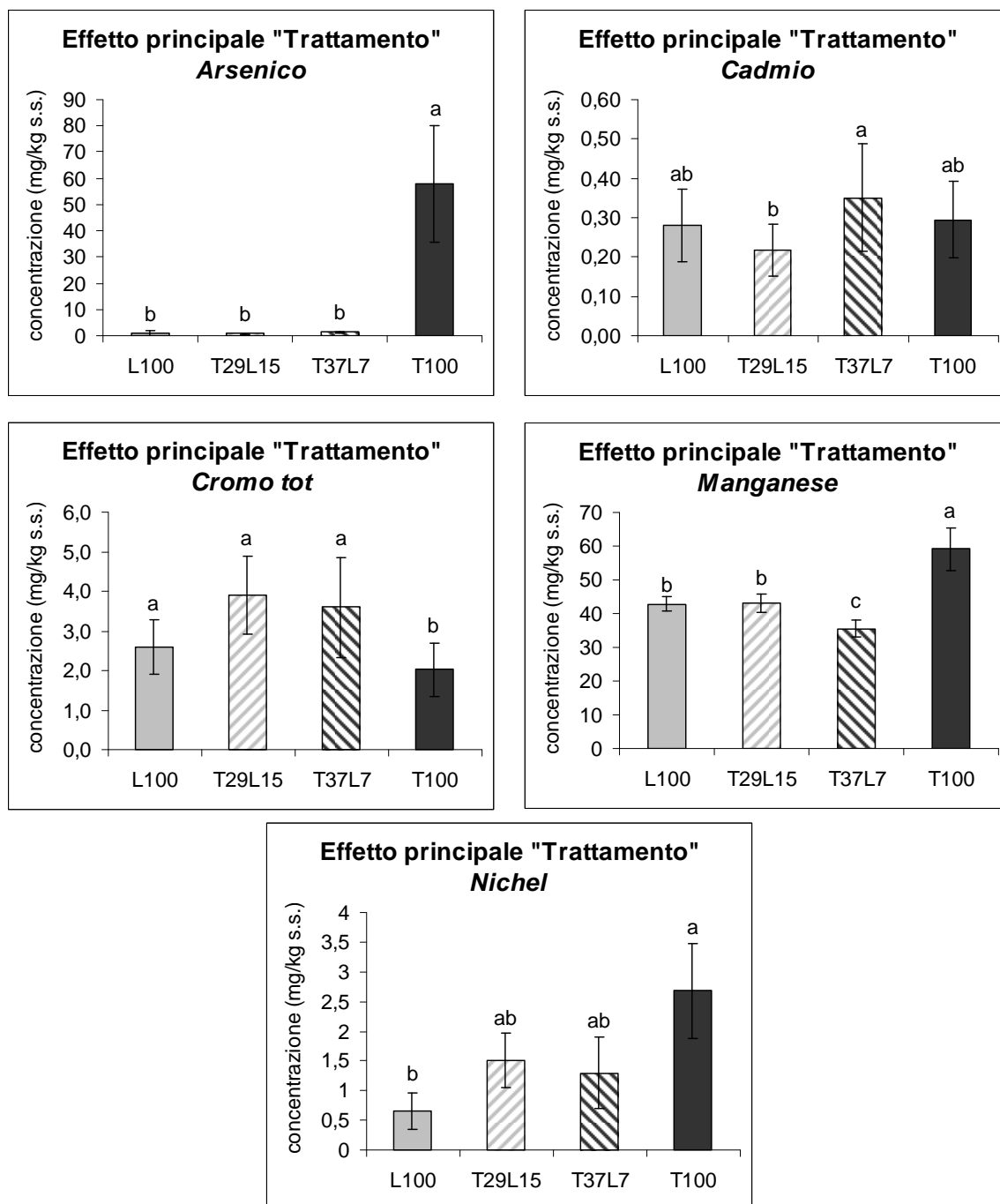


Figura 57 - As, Cd, Cr tot, Mn e Ni: effetto principale trattamento, per trattamenti diversi gli istogrammi rappresentano i valori medi delle specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per il ferro (Fig. 58) si può notare una notevole predominanza del trattamento T100, mentre per lo zolfo l'assorbimento è stato simile nei

trattamenti con doppio orizzonte, ma inferiore al trattamento con sola cenere di pirite.

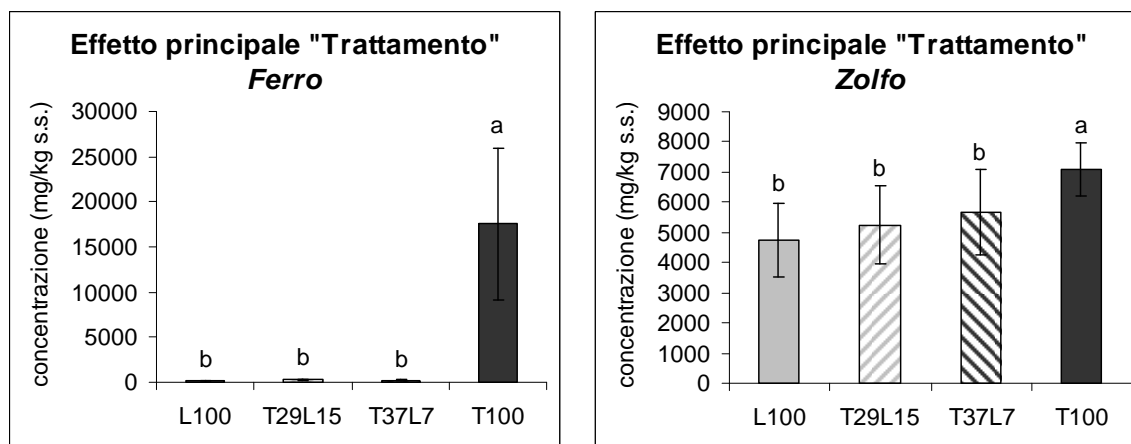


Figura 58 - Fe e S: effetto principale trattamento, per trattamenti diversi gli istogrammi rappresentano i valori medi delle specie. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Si può perciò concludere che ai fini di concentrazione di metalli pesanti, non ha avuto molta influenza, predisporre uno strato di terreno non inquinato di copertura, in quanto i risultati migliori si sono ottenuti con la semina diretta sul substrato inquinato da ceneri di pirite dove gli elementi erano presenti in maggiore quantità.

Lo dimostrano zinco e rame, questi infatti sono i metalli pesanti maggiormente presenti nel terreno inquinato e alla loro maggior concentrazione nel substrato corrisponde anche una superiore concentrazione negli organi vegetali. Ciò si è notato pure con ferro e zolfo, fortemente presenti nelle ceneri di pirite.

### Standardizzazione delle concentrazioni di metalli pesanti

Di seguito è stata analizzata la somma delle concentrazioni standardizzate dei quattro metalli pesanti presenti nel substrato inquinato oltre i limiti di legge (Co, Cu, Pb e Zn); le concentrazioni sono state standardizzate rispetto ai valori di iperaccumulo. Sono state valutate l'interazione "specie x trattamento", lo "effetto principale trattamento" e lo "effetto principale specie", risultati

significativi (Test Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ). Inoltre sono state indicate le variazioni (n° di volte) di concentrazione all'interno della stessa specie, in raffronto al T100 (Fig. 59).

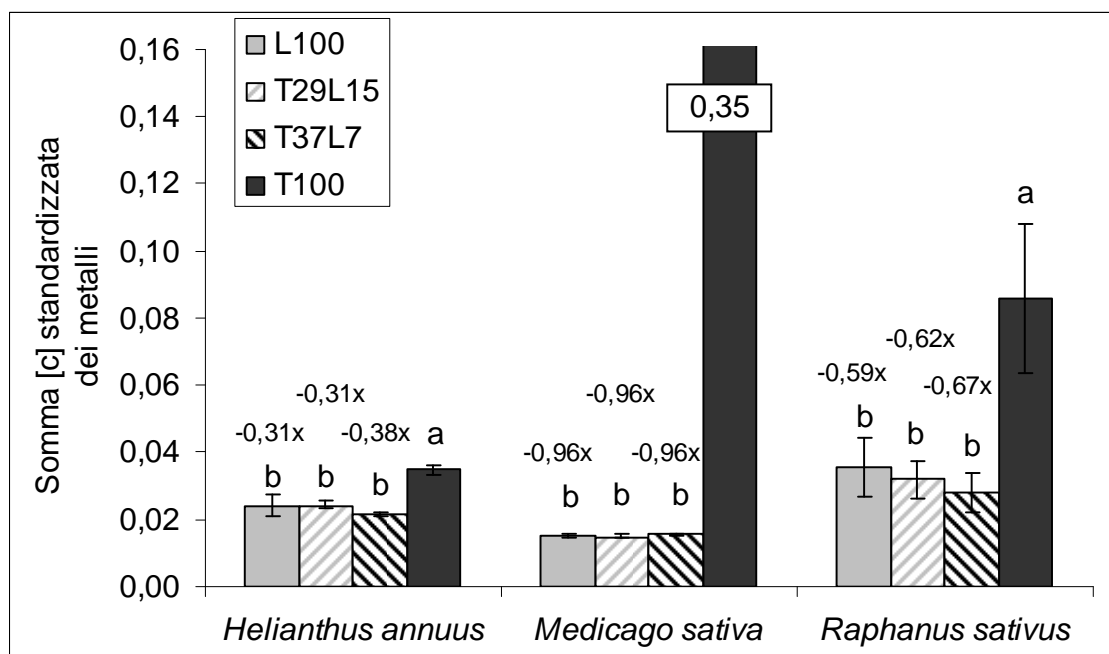


Figura 59 - Somma della concentrazione standardizzata dei metalli (Co, Cu, Pb e Zn). I valori espressi in etichetta rappresentano, per ogni specie, la diminuzione di assorbimento del trattamento rispetto al T100. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per le tre specie testate, il trattamento costituito da sole ceneri di pirite ha favorito la maggiore concentrazione di metalli pesanti, probabilmente per una maggiore disponibilità degli stessi, mentre 7 o 15 cm di copertura con terreno sano non hanno differenziato l'assorbimento.

In *Medicago sativa* non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i trattamenti con orizzonte di ricoprimento, che presentano una concentrazione dei metalli 0,96 volte inferiore rispetto al trattamento T100. Anche in *Raphanus sativus* non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i trattamenti con orizzonte di ricoprimento, che presentano una concentrazione dei metalli di 0,62 e 0,67 volte inferiore alla concentrazione in T100, rispettivamente in T29L15 e T37L7. *Helianthus annuus*, ha presentato un

minore divario tra T100 e gli altri trattamenti sperimentali; con orizzonte di 15 cm di copertura sono state inferiori di 31 volte, mentre in T37L7 di 38 volte.

Quest'ultima specie è risultata la meno efficiente da un punto di vista di concentrazione degli inquinanti (media dei 4 trattamenti), mentre migliore è risultata l'erba medica, considerando però che al termine della sperimentazione molte piante coltivate direttamente sul substrato inquinato erano morte. La sovrapposizione dell'orizzonte non inquinato ha pertanto permesso, per la leguminosa, la sopravvivenza delle piante, ma ha, di fatto, diminuito la capacità di bioaccumulo della specie.

L'effetto trattamento ha presentato differenze significative solo per il trattamento T100.

#### **4.1.5.2 Asportazioni di metalli pesanti**

Unitamente all'analisi delle concentrazioni ottenute nei diversi trattamenti per le singole specie, si è eseguita una valutazione di quali siano state le asportazioni ottenute dopo il periodo di coltivazione, 47 giorni. Questo ha permesso di avere un'indicazione preliminare sulle potenziali capacità fitoestrattive delle specie testate, tenendo in considerazione che tali osservazioni possono subire dei cambiamenti testando le piante in stadi fenologici successivi.

Di seguito è stata presa in considerazione l'asportazione totale, somma per vaso, dei quattro metalli (Fig. 60) che sono risultati essere fuori limiti di legge nel substrato di sperimentazione: cobalto, rame, piombo e zinco. Inoltre si è valutata l'asportazione di ferro e zolfo (Fig. 61 e 62), elementi costituenti le ceneri di pirite. Per l'erba medica in T100, sono state riunite le ultime tre repliche per aver un campione congruo da mineralizzare, come già visto, risultando perciò non attendibile a livello statistico.

L'analisi statistica ha permesso di indicare le differenze significative, mediante lettere diverse, tra i trattamenti all'interno della specie (interazione trattamento per specie), e per i quattro metalli pesanti anche tra i substrati

indipendentemente dalla specie (effetto principale trattamento) e tra specie indipendentemente dal trattamento (effetto principale specie). Da rilevare che la significatività dell'interazione "trattamento x specie" è risultata negativa.

*Helianthus annuus* (Fig. 60) ha presentato, maggiore asportazione dei quattro metalli pesanti in T29L15 rispetto agli altri due trattamenti, questo in conseguenza ad una maggiore produzione di biomassa che si è ottenuta nel medesimo trattamento, com'è stato evidenziato in precedenza analizzando i dati della raccolta a 47 GDS (Fig. 38). Infatti la concentrazione totale di questi elementi non è significativamente diversa nei tre trattamenti.

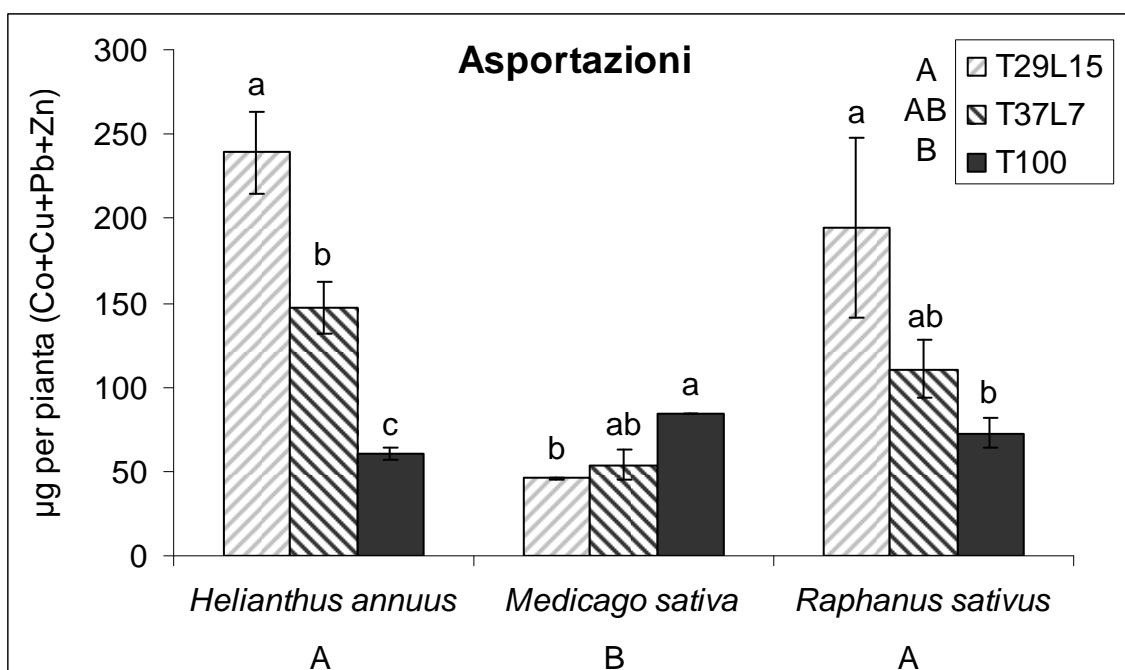


Figura 60 - Somma delle asportazioni (µg pianta) per Co, Cu, Pb e Zn. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti; a lettere maiuscole diverse corrispondono differenze significative tra gli effetti principali (specie, trattamento) (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

*Medicago sativa*, (Fig. 60) a livello statistico ha presentato differenze significative modeste nelle asportazioni dei 4 metalli, in quanto ad elevate concentrazioni in T100 è corrisposta una bassa produzione di biomassa. Di fatto si può ritenere che sia stato vantaggioso utilizzare terreno non inquinato di copertura permettendo di preservare dalla morte le piante, che pur

concentrando meno, hanno ottenuto uguali asportazioni per una maggiore produzione di biomassa.

*Raphanus sativus* (Fig. 60) per quanto concerne le asportazioni ha presentato un miglior risultato in T29L15, mentre negli altri due trattamenti si sono registrati livelli inferiori.

L'effetto principale trattamento ha messo in evidenza asportazioni inferiori in T100, in conseguenza di una minore biomassa prodotta dalle piante, alla quale non ha sopperito la maggiore concentrazione. Mentre il trattamento con 15 cm di terreno sembra aver garantito una maggiore asportazione; leggermente inferiore, è risultato essere il substrato con 7 cm di copertura.

Tra le specie, indipendentemente dal trattamento, la miglior asportazione si è registrata per il girasole con differenze non significative in raffronto al rafano, mentre livelli inferiori si sono avuti per l'erba medica.

Il ferro (Fig. 61) è stato asportato maggiormente, in tutte e tre le specie, nel trattamento con sole ceneri di pirite e, per girasole ed rafano, in T29L15.

Ciò evidenzia che il minor accrescimento ottenuto nel T100, non comporta necessariamente una minore asportazione, potendo ottenere maggiori concentrazioni. Leggermente inferiore è stata l'asportazione per girasole nel trattamento con 7 cm di terreno, rispetto al T29L15, in quanto pur avendo presentato una concentrazione simile, c'è stata una minore produzione di biomassa. In erba medica, l'asportazione nei due trattamenti con strato di copertura è stato dello stesso ordine di grandezza, ma inferiore a quella ottenuta in T100, dato comunque non significativo a livello statistico.

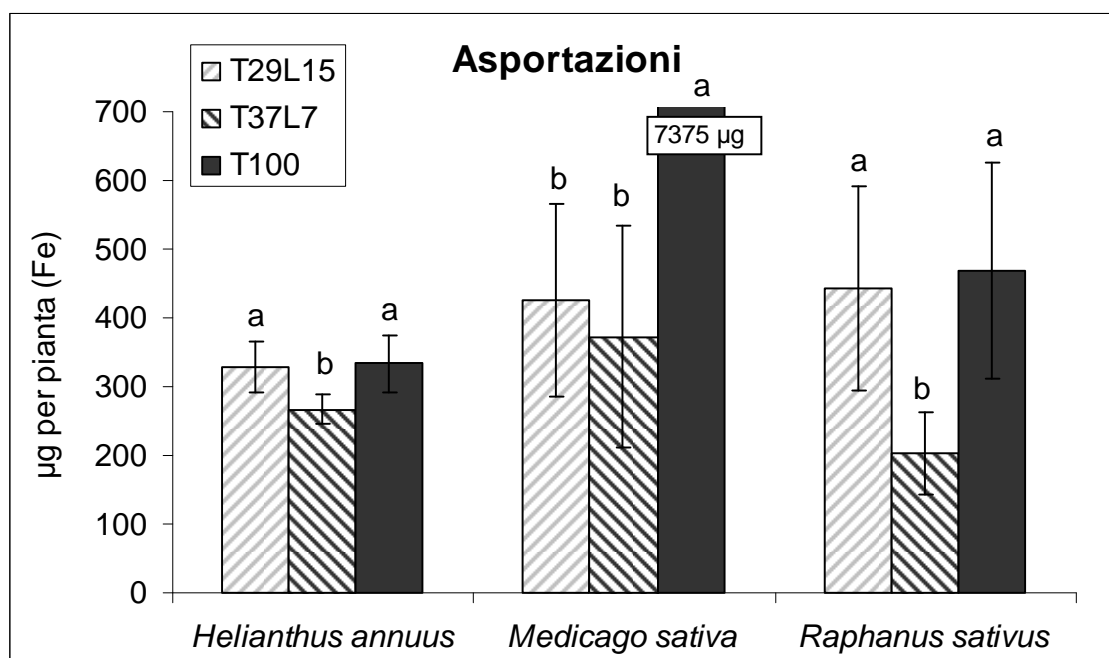


Figura 61 - Asportazione ( $\mu\text{g}$  pianta) di Fe. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

*Raphanus sativus* (Fig. 62) si è messo in evidenza per aver asportato maggiori quantitativi di zolfo, nei trattamenti con strato di copertura, in raffronto al T100, questo perché la concentrazione nei tre trattamenti è stata identica, ma nel substrato con sole ceneri di pirite il rafano ha prodotto minore biomassa. *Helianthus annuus* (Fig. 62), in T29L15 ha presentato una maggiore produzione di biomassa, che ha quindi favorito una maggiore asportazione. Mentre decisamente inferiore anche al T37L7 è stata l'asportazione in T100, dove la maggiore concentrazione non ha compensato la bassa produzione di biomassa. *Medicago sativa* (Fig. 62) ha garantito maggiore asportazione con 7 cm di terreno non inquinato, in relazione ad una biomassa leggermente superiore. Mentre scarsa è stata l'asportazione in T100 dove le piante in molti casi sono morte.



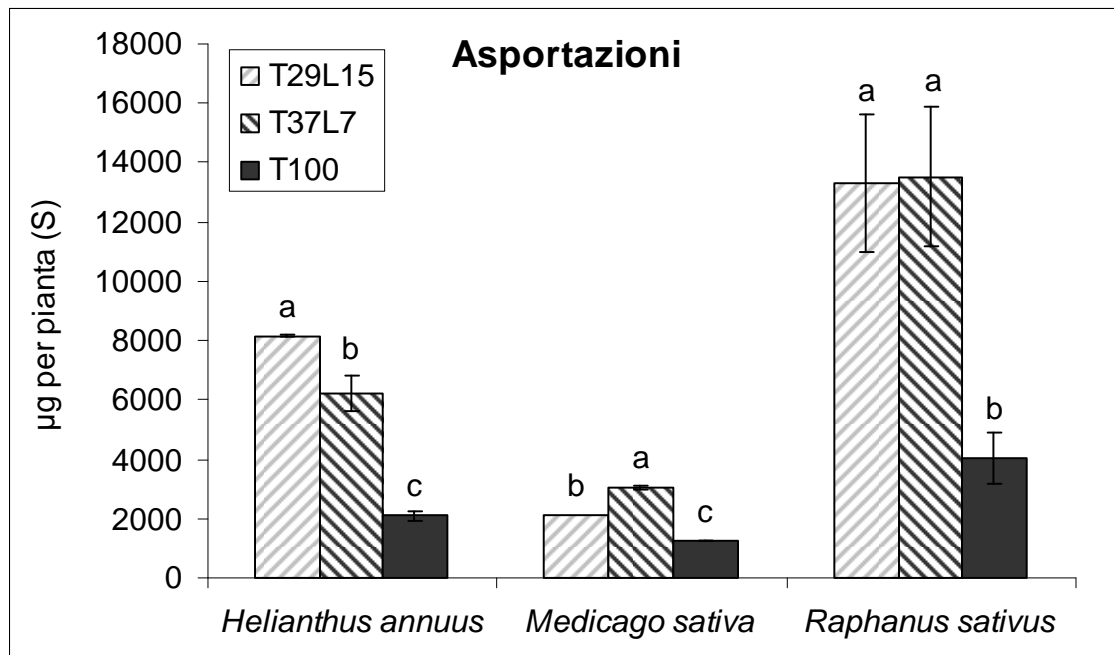


Figura 62 - Asportazione (µg pianta) di S. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ciascuna specie a lettere diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.6 Apparati ipogei

##### 4.1.6.1 Le tracce radicali

Il metodo delle tracce radicali ha permesso di ottenere valori relativi alla profondità radicale raggiunta nelle diverse epoche di osservazione. Anche in questo caso, come per gli apparati epigei, si è eseguita l'elaborazione dei dati con una funzione Gompertz che ha permesso di ottenere curve di profondità radicale continue. I valori dei coefficienti vengono riportati nelle tabelle 18, 19 e 20.

$$\text{Equazione di Gompertz: } Y = c * e^{-e^{-b * (x - m)}}$$

Tabella 18 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in girasole e coefficiente di determinazione ( $R^2$ ).

<b>Girasole</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>c</b>	42,8738	46,2014	38,8705	35,3268
<b>b</b>	0,1003	0,0676	0,1184	0,0867
<b>m</b>	12,0623	18,6304	10,9114	14,5155
<b>R<sup>2</sup></b>	99,60	99,50	99,85	99,89

Tabella 19 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in erba medica e coefficiente di determinazione ( $R^2$ ).

<b>Erba medica</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>c</b>	51,5582	13,1338	42,6694	26,4704
<b>b</b>	0,0600	0,0882	0,0360	0,0576
<b>m</b>	20,4303	13,7943	33,5681	19,6640
<b>R<sup>2</sup></b>	99,64	99,30	99,27	99,55

Tabella 20 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in rafano e coefficiente di determinazione ( $R^2$ ).

<b>Rafano</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>c</b>	41,8276	26,3011	30,4875	22,6994
<b>b</b>	0,1639	0,0934	0,0645	0,0934
<b>m</b>	10,8523	13,4202	16,9768	12,4068
<b>R<sup>2</sup></b>	99,99	99,86	99,45	99,37

Dai dati ottenuti è emerso che le tre specie considerate hanno avuto un comportamento simile, raggiungendo, come era lecito aspettarsi, la massima profondità permessa dalle dimensioni del vaso, solo quando sono state coltivate nel terreno di controllo (L100), mentre hanno evidenziato comportamenti diversi negli altri trattamenti. In *Helianthus annuus* l'approfondimento radicale è stato pressoché uguale in tutti i trattamenti, indicazione, questa, che la tipologia dei substrati non ha influito su tale parametro (Fig. 63). In *Medicago sativa*, nel trattamento con sole ceneri di pirite si sono ottenute profondità radicali particolarmente superficiali; profondità doppie, rispetto al valore del T100, sono state riscontrate negli altri due trattamenti, T37L7 e T29L15 confermando che il ricoprimento con terreno non inquinato porta ad indubbi vantaggi per l'insediamento delle piante e il loro successivo sviluppo; inoltre, non si notano differenze di approfondimento ricoprendo il substrato inquinato con 7 o con 15 cm di terreno "sano" (Fig. 63). In *Raphanus sativus*, valori simili si sono ottenuti nei tre trattamenti che contenevano le ceneri di pirite, indicando, quindi, che il ricoprimento, in questo caso, non ha agito positivamente come per *Medicago sativa* (Fig. 63).

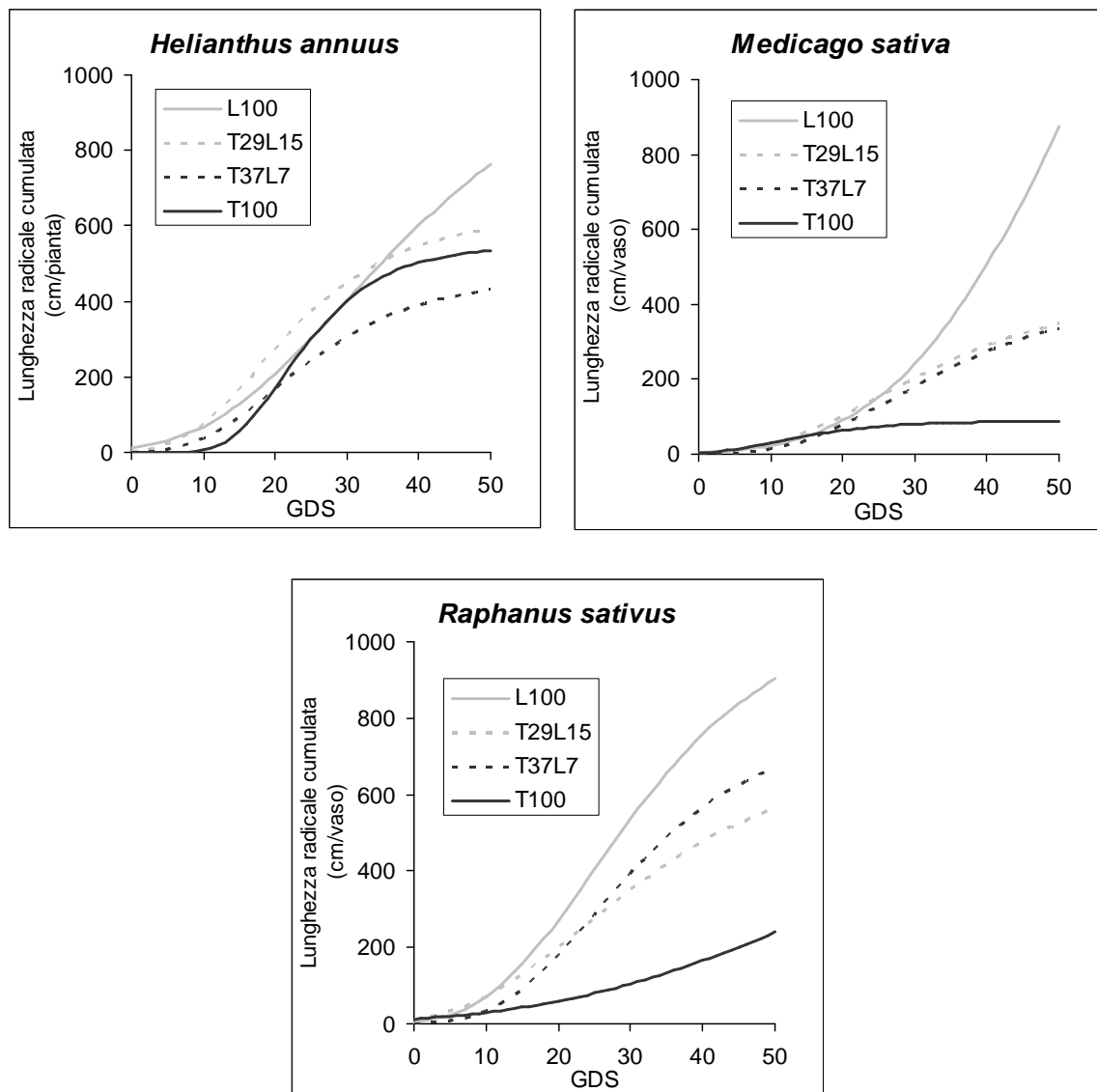


Figura 63 - Dinamica di approfondimento radicale delle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti (metodo delle tracce radicali).

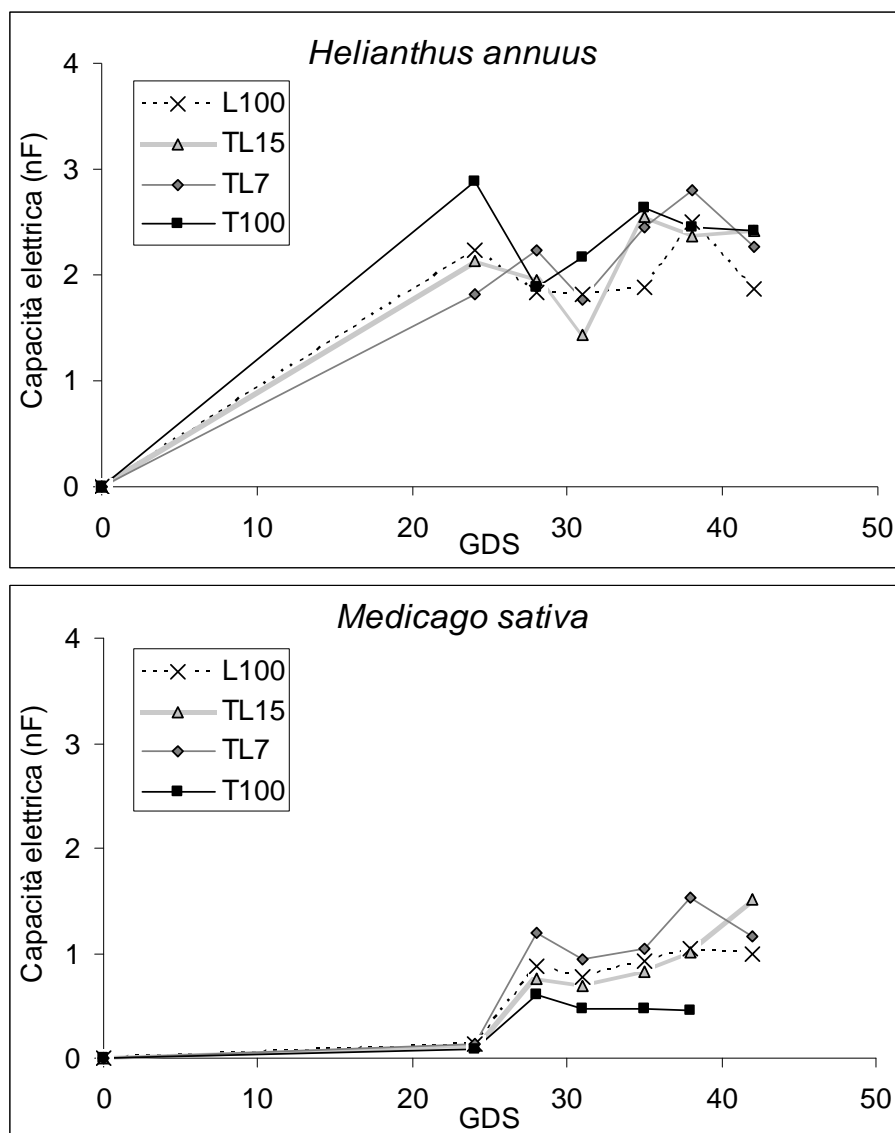
#### 4.1.6.2 Il metodo elettrico

I dati raccolti con il metodo elettrico sono stati elaborati per osservare l'andamento dello sviluppo radicale nel tempo. In erba medica i valori di capacità e resistenza elettrica sono stati rilevati, per ogni vaso, su tutte e cinque le piantine e poi mediati tra loro per ottenere un dato unico.

Per quanto riguarda la capacità elettrica è stato osservato, un andamento altalenante dei valori, soprattutto in girasole e rafano, mentre in erba medica si

nota migliore separazione dei trattamenti, con minori escursioni di capacità elettrica (Fig. 64). In generale, comunque, in tutte e tre le specie si è verificata una tendenza all'aumento del valore di capacità elettrica, meno evidente in girasole.

Per erba medica e rafano, comunque, in epoca vicina alla fine dell'esperimento è stata osservata una gerarchia tra i trattamenti abbastanza simile a quella reale.



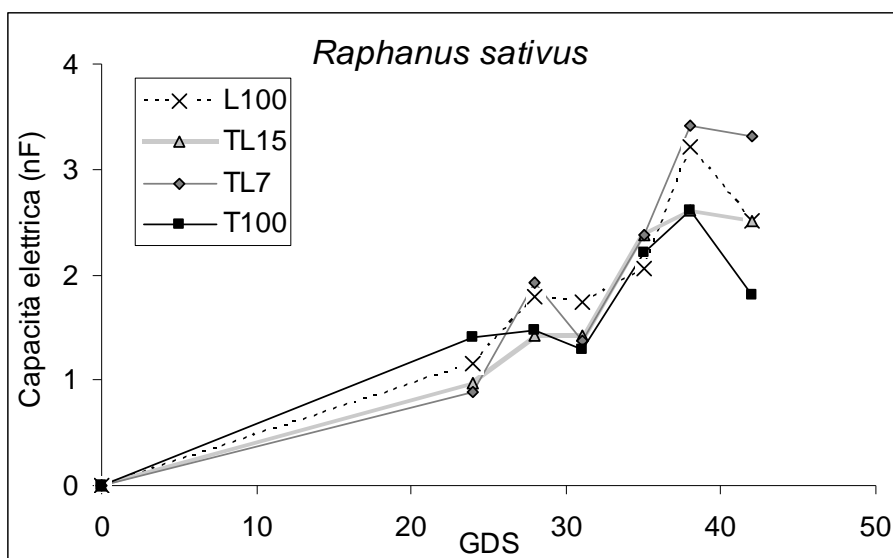
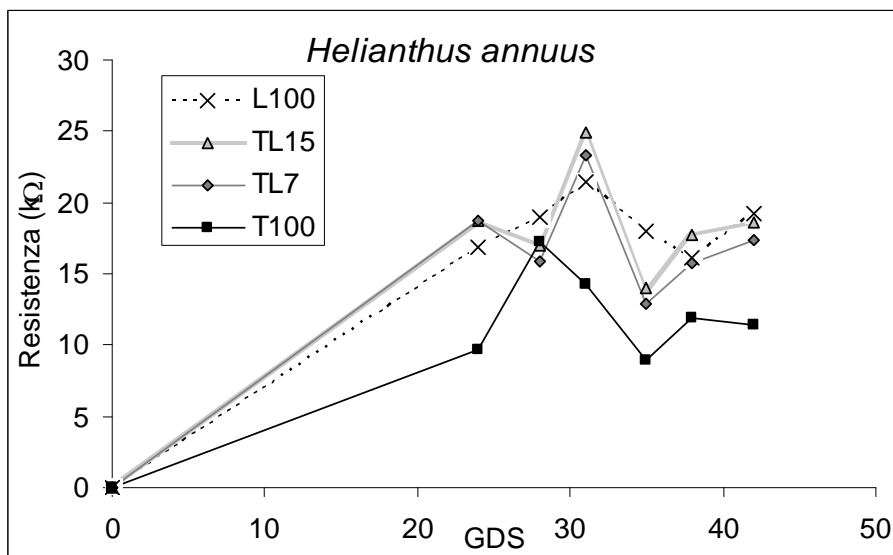


Figura 64 - Valori di capacità elettrica (nF) rilevati nelle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti, in funzione del tempo (GDS).

Per quanto riguarda i valori di resistenza elettrica, i risultati riportano valori oscillanti ma con escursioni di gran lunga maggiori rispetto a quelli di capacità elettrica. Si è verificata, inoltre, la tendenza, per tutte le specie in tutti i trattamenti, ad un decremento dei valori nel tempo (Fig. 65).



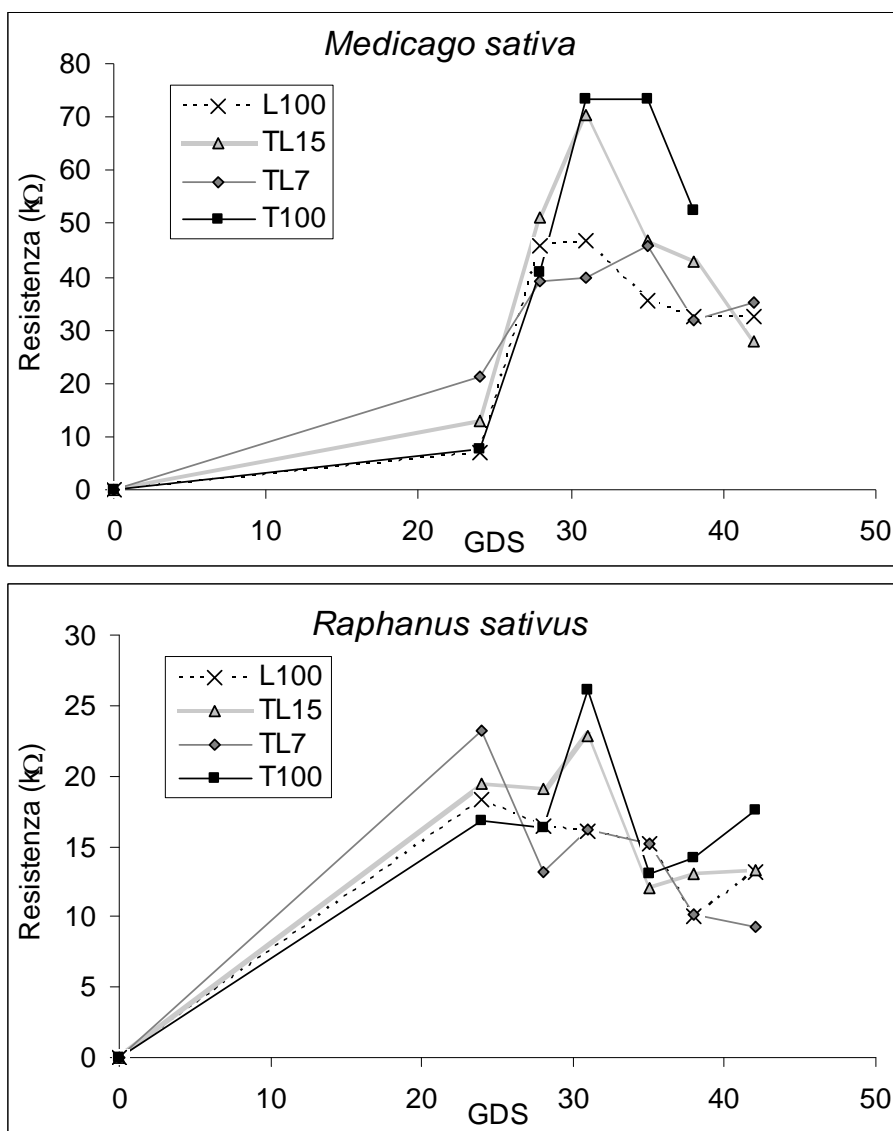


Figura 65 - Valori di resistenza elettrica (kΩ) rilevati nelle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti, in funzione del tempo (GDS).

#### 4.1.6.3 Rilievo distruttivo: diametri radicali

Dall'analisi dei diametri radicale è emerso che l'erba medica ha presentato diametri leggermente superiori rispetto al girasole, mentre il rafano è la specie che presenta diametri radicali nettamente più sottili (Fig. 66) (effetto principale specie).

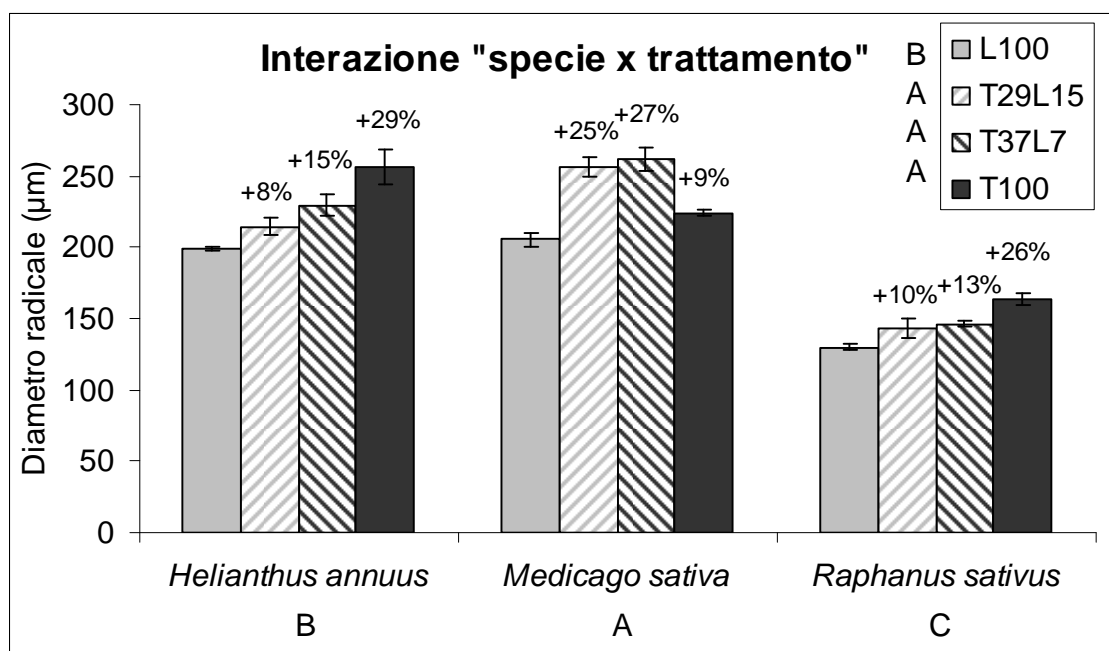


Figura 66 - Diametri radicali delle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti. Per ciascuna specie le percentuali indicano la variazione del diametro radicale nei trattamenti con ceneri di pirite rispetto al controllo. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ). Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

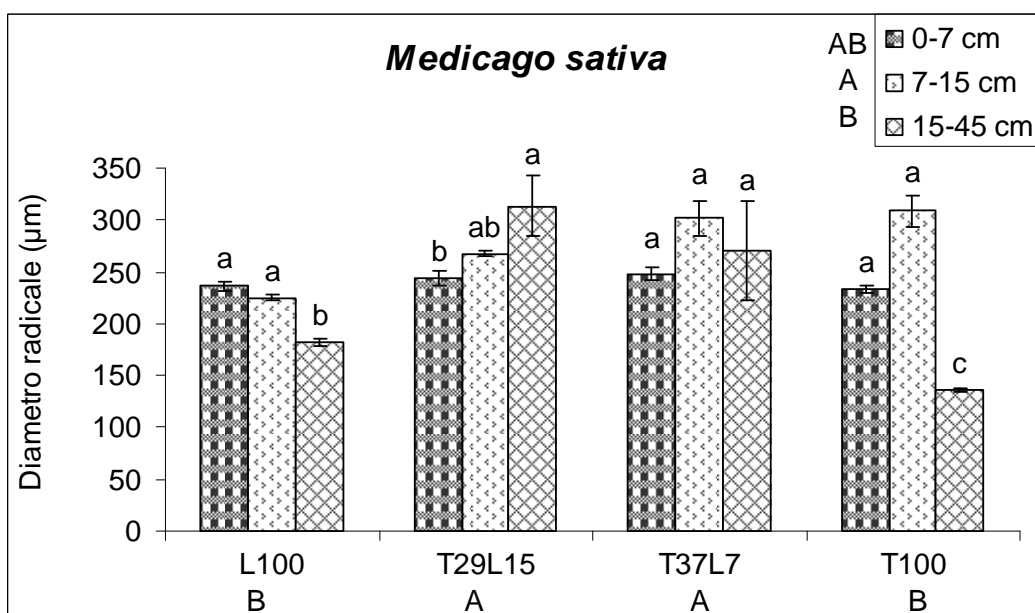
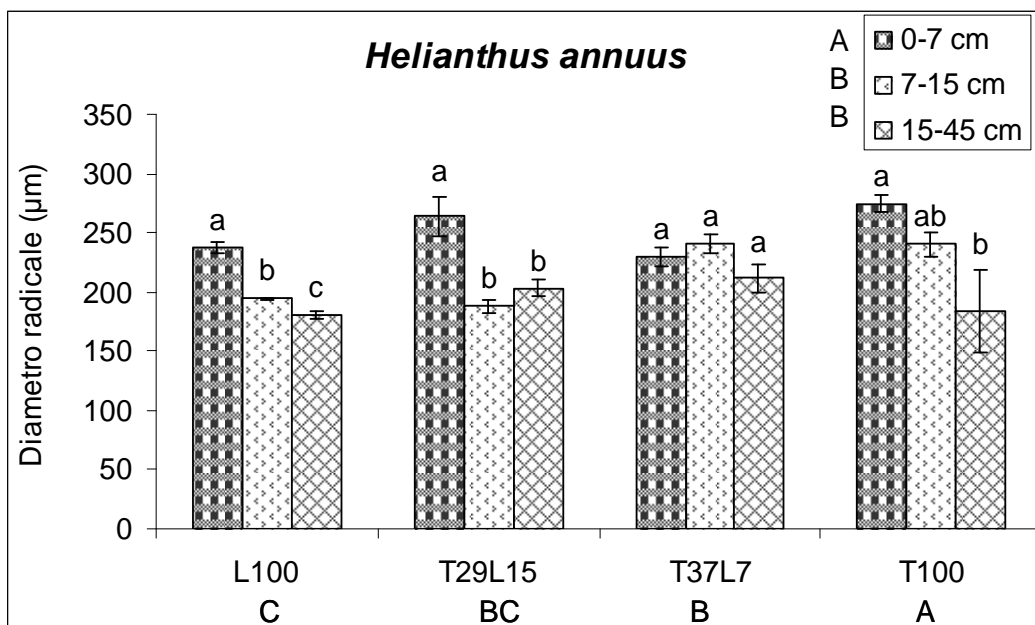
Nell'interazione "specie x trattamento" per tutte le specie è evidente un aumento del diametro radicale nei trattamenti con le ceneri di pirite (Fig. 66). In particolare girasole e rafano hanno presentato i diametri maggiori in T100 (solo pirite) con un incremento medio rispetto al controllo, rispettivamente del 29% e 26%. L'erba medica ha i diametri maggiori nei trattamenti con l'orizzonte di ricoprimento (T37L7 +27%; T29L15 +25% su L100) evidenziando comunque un aumento del diametro, seppure in misura minore rispetto le altre 2 specie, in T100 rispetto al controllo (+9%).

L'aumento del diametro radicale nei trattamenti con le ceneri di pirite, indipendentemente dalla specie considerata (Fig. 66) probabilmente è dovuto alla diversità di peso specifico che le ceneri di pirite hanno presentato, circa 1,7 kg/dm<sup>3</sup>, rispetto al terreno di controllo, che ha mostrato, invece, valori attorno a 1,2 kg/dm<sup>3</sup>; inoltre la scarsa porosità del substrato inquinato e il conseguente elevato livello di compattamento, hanno indotto come risposta del tutto



naturale l'aumento del diametro radicale apprezzabile anche ad una prima osservazione durante le operazioni di lavaggio.

In particolare nei substrati omogenei lungo tutto il profilo (L100 e T100) il diametro radicale è diminuito progressivamente con la profondità (Fig. 67), mentre in presenza di un orizzonte di ricoprimento è stato osservato un andamento tendenzialmente opposto, con un aumento del diametro al passaggio dall'orizzonte di ricoprimento alle ceneri di pirite. Tale fenomeno è stato ben visibile per medica e rafano nel trattamento T29L15 e in tutte le specie nel trattamento T37L7 (Fig. 67).



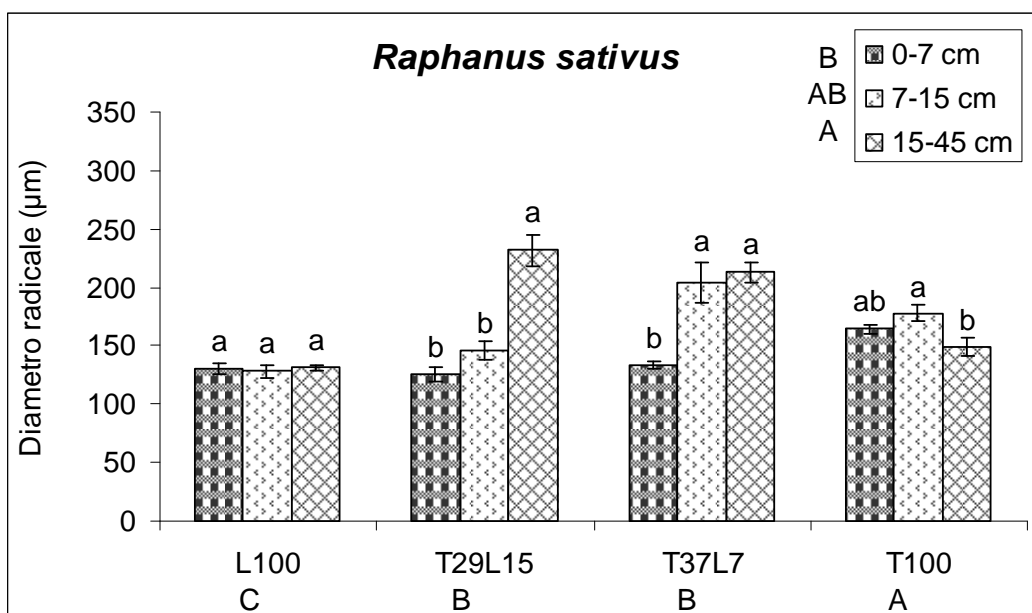


Figura 67 - Diametri radicali delle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti, a diversi orizzonti di profondità. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti nell'ambito della stessa specie, lettere maiuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ). Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

#### 4.1.6.4 Rilievo distruttivo: dinamica ed approfondimento radicale

I valori di accrescimento radicale, misurato in lunghezza cumulata per ciascuna epoca di osservazione, hanno permesso di ottenere la dinamica di accrescimento.

L'interpolazione dei dati con una funzione Gompertz ha permesso poi, di ottenere le curve di lunghezza radicale continue. La funzione Gompertz è la seguente:

$$Y = C * \exp(-\exp(-B * (X - M)))$$

dove la variabile indipendente "X" rappresenta il tempo; mentre "C", "B" e "M" indicano rispettivamente il valore massimo (Y max); la pendenza del punto di flesso (velocità di accrescimento); il valore di X a cui il valore di Y (lunghezza radicale cumulata) diviene metà del suo massimo (Y max/2).

I parametri "B" ed "M", in particolare, danno indicazioni circa la velocità di accrescimento delle piante (Tab. 21, 22 e 23).

Tabella 21 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in girasole e R<sup>2</sup>.

<b>Girasole</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>C</b>	4,133*10 <sup>4</sup>	665,1135	5,387*10 <sup>4</sup>	3,573*10 <sup>4</sup>
<b>B</b>	0,0163	0,0292	0,0162	0,0168
<b>M</b>	146,7264	69,6898	148,4483	142,3712
<b>R<sup>2</sup></b>	99,98	99,98	100	100

Tabella 22 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in erba medica e R<sup>2</sup>.

<b>Erba medica</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>C</b>	1,22*10 <sup>26</sup>	1,943*10 <sup>18</sup>	3,851*10 <sup>22</sup>	4,502*10 <sup>23</sup>
<b>B</b>	2,078*10 <sup>-3</sup>	1,969*10 <sup>-3</sup>	2,039*10 <sup>-3</sup>	2,055*10 <sup>-3</sup>
<b>M</b>	1980,6585	1903,359	1941,3601	1951,3474
<b>R<sup>2</sup></b>	99,65	99,66	99,63	99,93

Tabella 23 - Valori dei parametri utilizzati per definire l'equazione di Gompertz in rafano e R<sup>2</sup>.

<b>Rafano</b>	<b>L100</b>	<b>T100</b>	<b>T29L15</b>	<b>T37L7</b>
<b>C</b>	3,975*10 <sup>25</sup>	1,086*10 <sup>24</sup>	2,097*10 <sup>26</sup>	3992,7652
<b>B</b>	2,074*10 <sup>-3</sup>	2,068*10 <sup>-3</sup>	2,063*10 <sup>-3</sup>	0,0368
<b>M</b>	1971,38	1934,8523	1989,7595	71,2981
<b>R<sup>2</sup></b>	99,93	99,80	99,55	100

Dalle curve di dinamica di sviluppo radicale, si è notato un andamento simile per tutte le specie. Nelle fasi iniziali di sviluppo, gli apparati radicali si sono accresciuti in modo analogo, in ciascuna specie, per tutti i trattamenti. Nel

substrato T100, durante tutte le fasi di crescita, la lunghezza è sempre risultata minore di circa la metà rispetto agli altri trattamenti tra i quali si è evidenziata una sostanziale indifferenza (Fig. 68).

Infine, le curve di crescita nei trattamenti con orizzonte di ricoprimento ricalcano sostanzialmente l'andamento della curva del controllo.

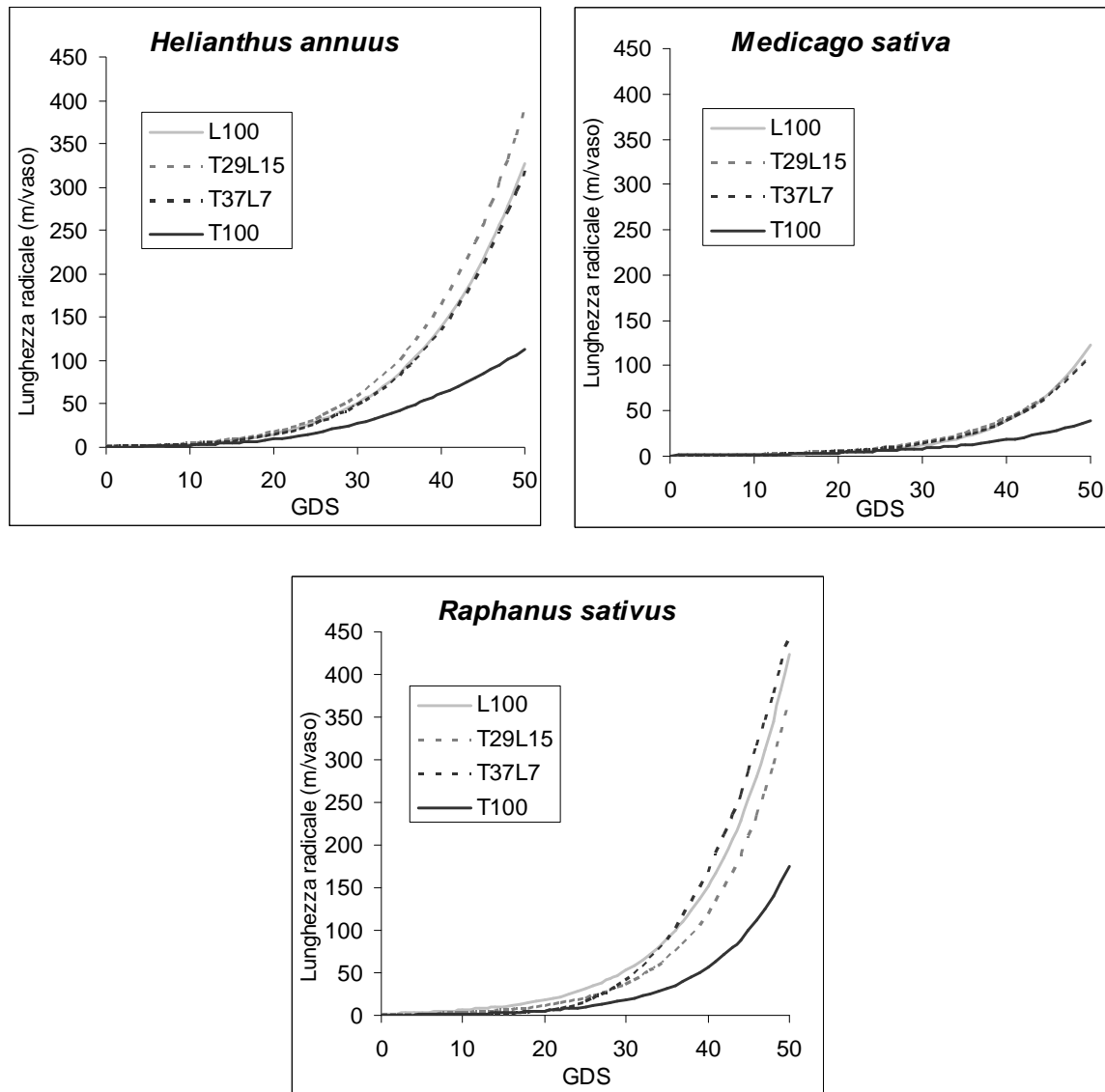


Figura 68 - Dinamica di accrescimento radicale elaborata con la funzione Gompertz) delle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti.

Confrontando la lunghezza radicale finale, misurata nei vasi a 47 GDS (Fig. 69) si può osservare che *Raphanus sativus* è stata la specie che ha prodotto la lunghezza radicale maggiore rispetto alle altre due.

Tutte le specie nel trattamento con le sole ceneri di pirite, hanno sviluppato un apparato radicale finale minore rispetto agli altri trattamenti che mostrano differenze minime. Fa eccezione il girasole in cui l'apparato radicale nel trattamento con orizzonte di ricoprimento di 15 cm, risulta più lungo rispetto T37L7 e L100.

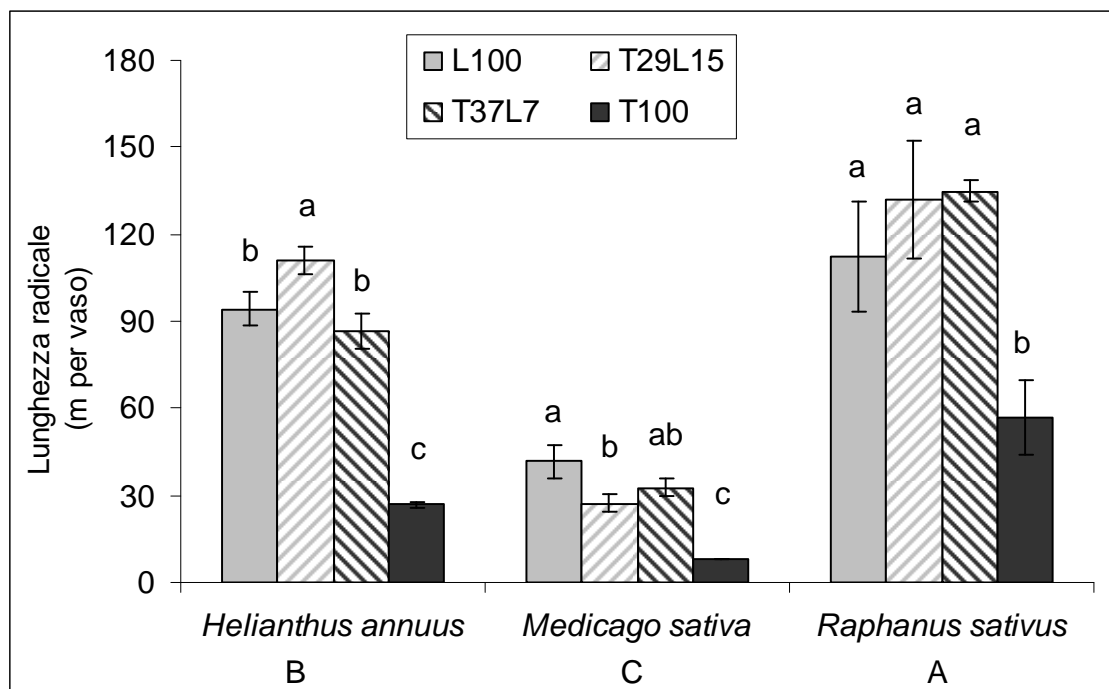


Figura 69 - Lunghezza dell'apparato radicale delle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti a fine esperimento (47 GDS). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti nell'ambito della stessa specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ). Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

Dall'analisi si evince, quindi, che il ricoprimento del substrato inquinato con terreno di Legnaro è risultato essere una buona soluzione, perché permette di ottenere dinamiche di accrescimento e lunghezze radicali del tutto simili a quelle delle specie coltivate sul terreno di controllo. Indifferente, invece, è sembrato essere lo spessore dello strato di ricoprimento, dato che non si sono evidenziate differenze nei valori registrati tra i due trattamenti nelle diverse specie.

Dall'ulteriore elaborazione delle funzioni Gompertz (derivata prima della funzione originale), si è potuto ricavare la velocità di crescita radicale. La derivata prima è la seguente:

$$Y' = (B * C * \exp(-\exp(-B * (X - M))) - B * (X - M))$$

Anche da queste curve si è potuto vedere il comportamento simile di tutte e tre le specie (Fig. 70).

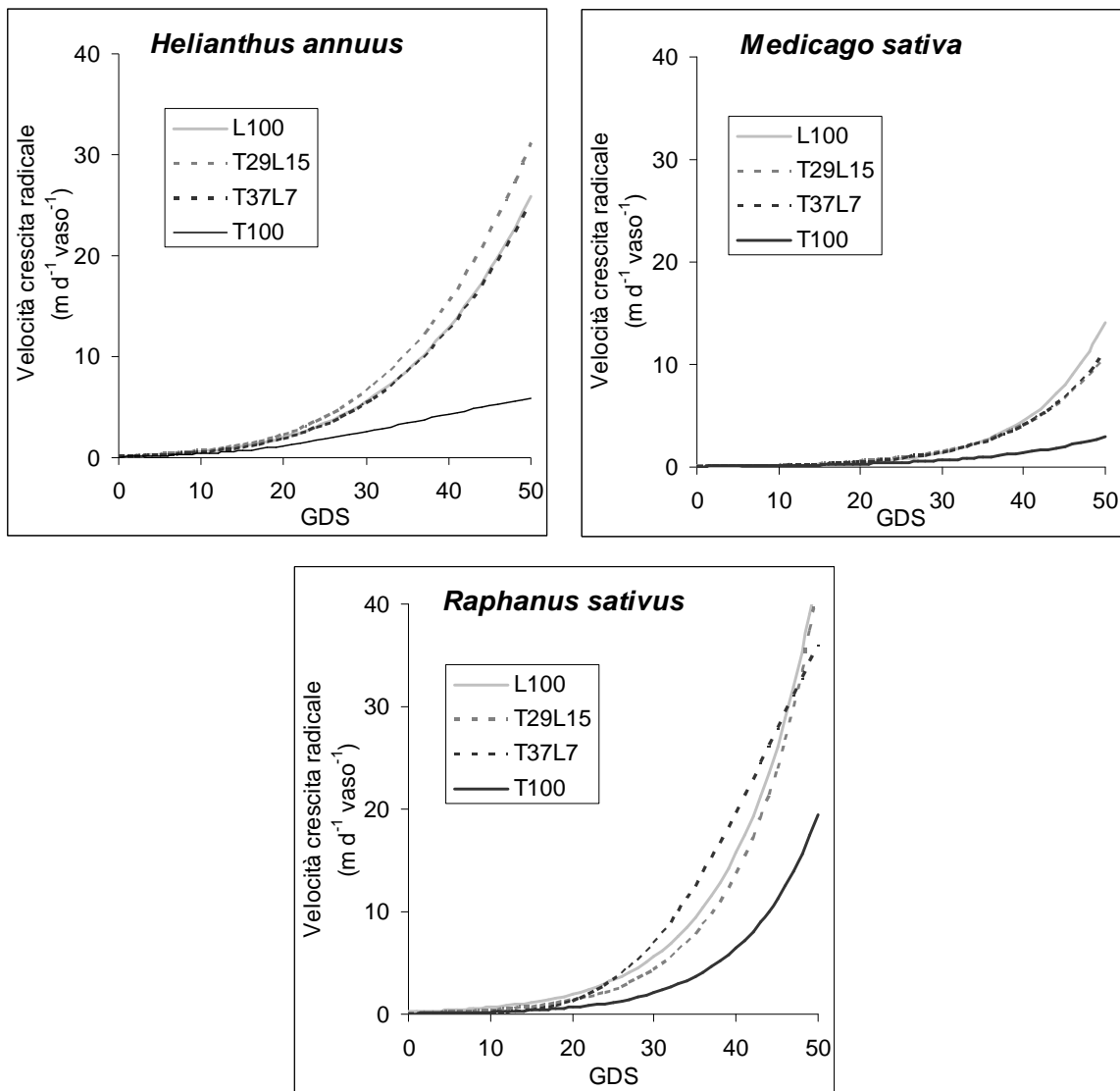


Figura 70 - Velocità di accrescimento radicale (derivata prima della funzione Gompertz di accrescimento cumulato) delle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti.

La maggiore velocità di accrescimento è stata individuata nel controllo e nei trattamenti che prevedono il ricoprimento con terreno di Legnaro, rispetto al trattamento con solo substrato inquinato (Fig. 70).

Dall'analisi della velocità di crescita relativa, ottenuta rapportando la velocità assoluta per la lunghezza complessiva dell'apparato radicale, si è evidenziato che il girasole ha raggiunto la profondità di 7 cm e 15 cm (profondità caratteristiche per la separazione dei vari orizzonti di substrato "sano"/inquinato) con velocità simili in tutti i trattamenti. L'andamento delle curve di velocità decresce con l'aumentare della profondità. L'erba medica ha presentato valori di velocità simili per i trattamenti con l'orizzonte di ricoprimento, valori leggermente più elevati per il controllo e più bassi per il trattamento T100; per questa specie la velocità è rimasta costante al variare della profondità. Rafano invece, ha presentato valori di velocità molto simili tra loro nel controllo, nel trattamento T29L15 e nel T100, anche in questo caso la velocità, al variare della profondità è rimasta costante. Molto diverso si è presentato il comportamento nel T37L7, con velocità molto elevate all'inizio della prova che poi scendono velocemente per portarsi a valori simili agli altri trattamenti (Fig. 71).

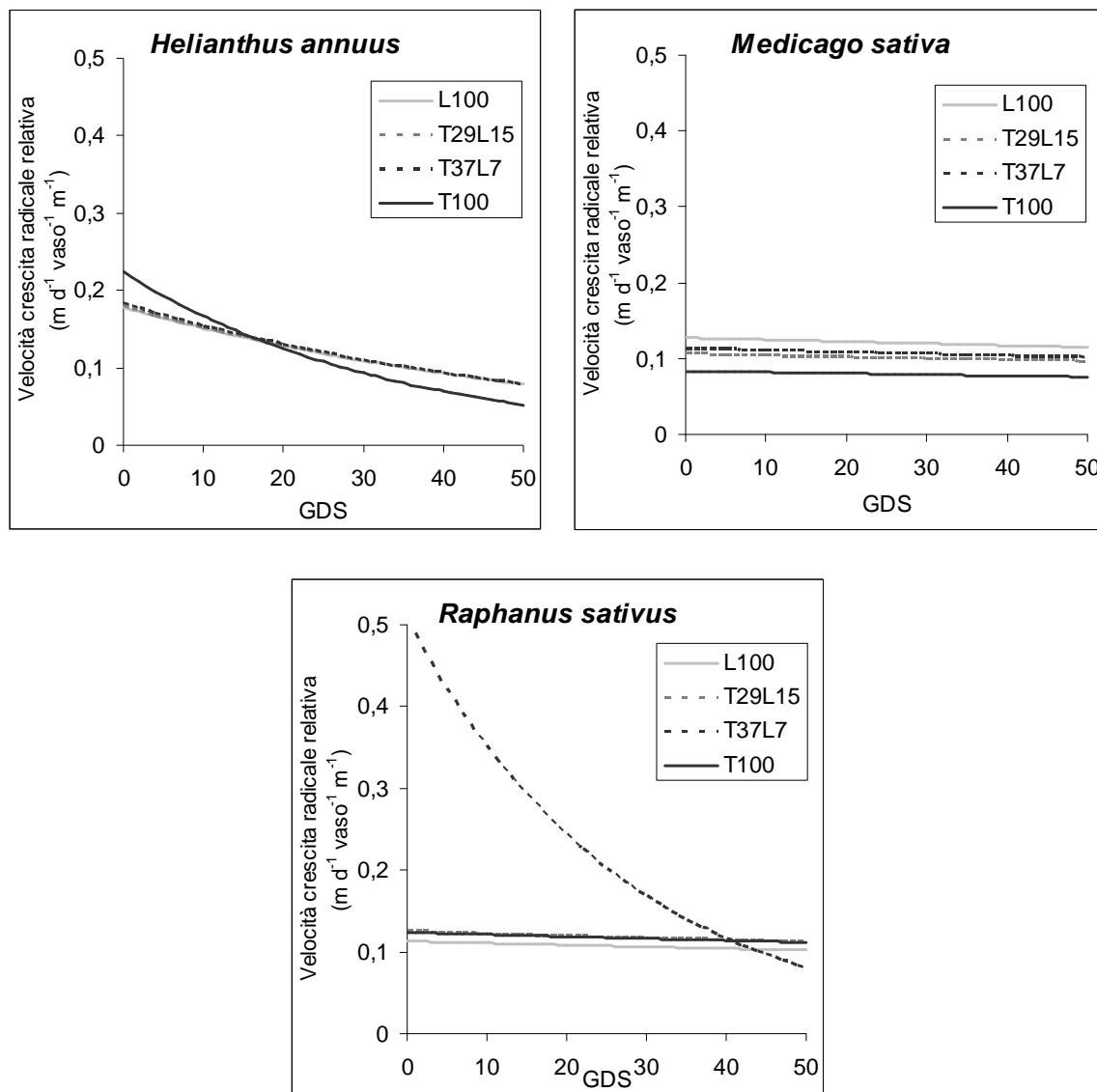


Figura 71 - Velocità di accrescimento radicale relativa delle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti, in funzione dell'accrescimento radicale massimo.

#### 4.1.6.5 Rilievo distruttivo: distribuzione della lunghezza radicale lungo il profilo

Dal campionamento distruttivo si è potuto rilevare come realmente si sono distribuite le radici nel substrato.

È risultato evidente che tutte le specie coltivate sul terreno di controllo hanno presentato una distribuzione radicale molto diversa e con una percentuale di lunghezza rispetto a quella totale nettamente inferiore in



confronto agli altri substrati; osservazione fatta considerando i primi due orizzonti superficiali (0–7 e 0–15 cm) nei diversi trattamenti.

Analizzando prima l'orizzonte 0–7 cm, confrontando i diversi trattamenti si è notato in girasole un aumento della quantità di radici del 56% rispetto al controllo, nel trattamento T37L7. L'83% delle radici in tale trattamento erano perciò presenti nel primo strato di terreno. Nel trattamento T29L15 invece i valori sono apparsi solo leggermente superiori al controllo (+6%) e statisticamente non diversi. Nel substrato formato solo da ceneri di pirite vi è stato un aumento della quantità del 38% rispetto al controllo (Fig 72).

Erba medica ha mostrato valori molto simili tra loro, nei tre trattamenti che prevedevano la presenza delle ceneri di pirite, l'aumento della percentuale di lunghezza radicale nei primi 7 cm è stata del 33% nel T100 del 40% circa nel T37L7 e T29L15 (Fig 72).

In rafano l'aumento più elevato lo si è riscontrato nel trattamento T100 (+ 50%) e valori leggermente inferiori si sono ottenuti per il trattamento T37L7, mentre solo un 8% superiore al controllo lo si è notato in T29L15 (Fig 72).

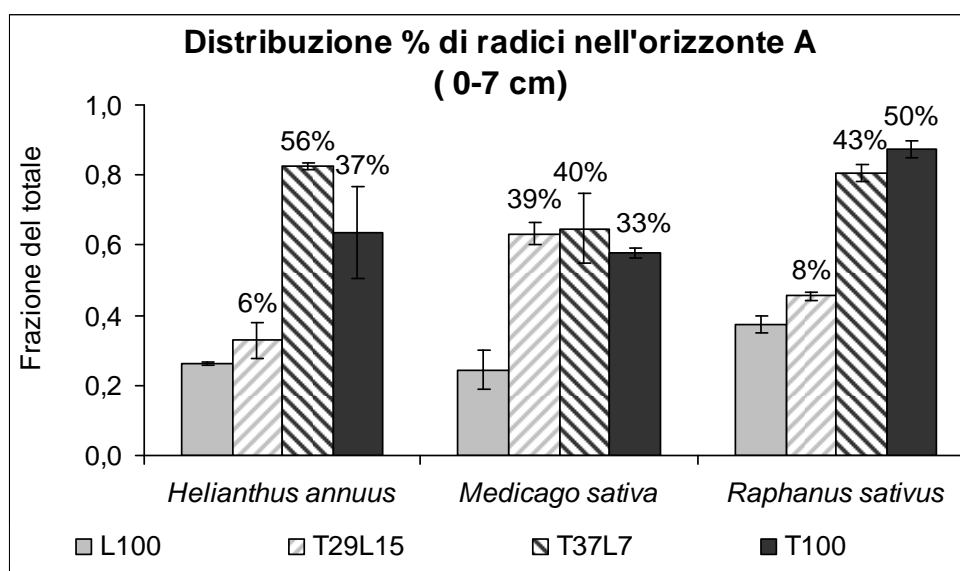


Figura 72 - Distribuzione dell'apparato radicale, delle tre specie oggetto di studio, espresso come % (del totale) di lunghezza radicale nell'orizzonte da 0 a 7 cm di profondità, nei quattro trattamenti. Le percentuali indicano l'incremento di radici presenti nei primi 7 cm rispetto al controllo. Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

Nel caso di un ricoprimento leggero (7 cm) con terreno “sano”, le modificazioni nella distribuzione della lunghezza radicale più attenuate sono state osservate in erba medica (ma è una specie che si è approfondita poco, almeno in 47 giorni di coltivazione) e soprattutto in rafano.

Osservando invece i dati ottenuti dall’analisi dell’orizzonte 0–15 cm si è notato come tutte e tre le specie hanno presentato la maggior frazione di lunghezza radicale, in tale orizzonte, nel trattamento T37L7. Si è rilevato anche che, tutte le specie coltivate sul terreno di controllo, hanno circa il 30% delle radici nei primi 15 cm di terreno (Fig. 73).

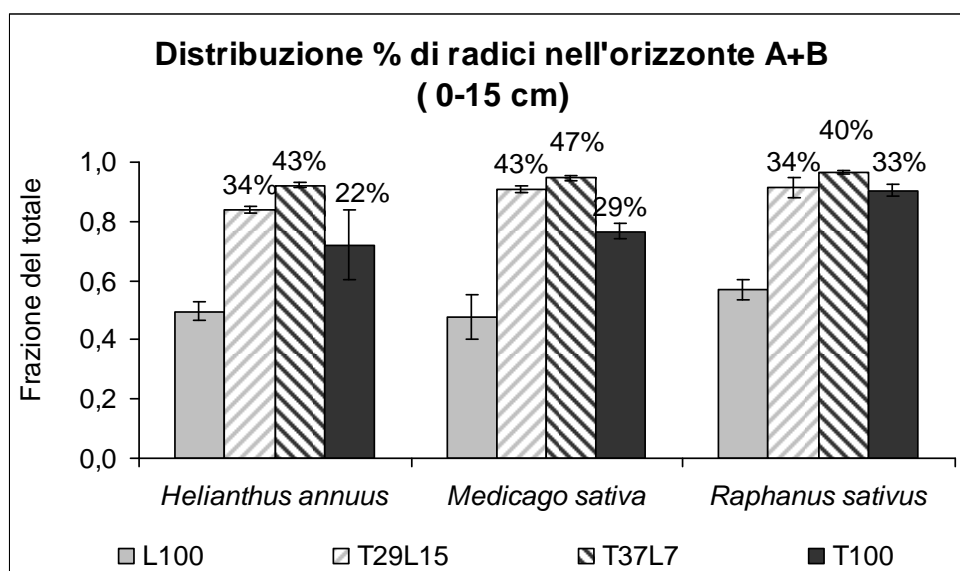


Figura 73 - Distribuzione dell’apparato radicale, delle tre specie oggetto di studio, espresso come % (del totale) di lunghezza radicale nell’orizzonte da 0 a 15 cm di profondità, nei quattro trattamenti. Le percentuali indicano l’incremento di radici presenti nei primi 7 cm rispetto al controllo. Le barre verticali rappresentano l’errore standard.

Il girasole ha mostrato un aumento del 43% del quantitativo (lunghezza) di radici nel trattamento T37L7, del 34% nel T29L15 e del 22% nel T100, rispetto al controllo (Fig. 73). In erba medica si sono notati valori simili tra loro nei trattamenti con il terreno di ricoprimento non inquinato (+ 47% per il T37L7 e + 43% per il T29L15 rispetto al controllo) e più basso è risultato essere il valore nel T100 (+ 29%) (Fig. 73). In rafano si sono avuti dati uguali per i trattamenti T29L15 e T100 (+ 34% e + 33% rispettivamente) e leggermente superiori per

T37L7 (+ 40%) (Fig. 73). Quindi, con la sovrapposizione di 15 cm, le specie che meno hanno modificato la loro geometria radicale sono state girasole e rafano, in egual misura.

Il trattamento con solo ceneri di pirite ha portato ad avere un aumento significativo, rispetto al controllo, della quantità di radici, misurata in lunghezza radicale, negli strati più superficiali. Nel caso di *Medicago sativa* e di *Raphanus sativus*, questo può essere dovuto alla minore profondità radicale raggiunta in quei substrati, che quindi ha limitato la possibilità di espansione dell'apparato radicale negli strati più profondi e di conseguenza lo svolgimento di un'adeguata azione fitoestrattiva.

La presenza degli orizzonti di ricoprimento ha facilitato le piante nell'insediamento iniziale ma allo stesso tempo ha permesso loro di localizzare la maggior parte delle radici in questi strati e questo sembra un aspetto negativo. Confrontando, infatti, i dati ottenuti dall'analisi delle radici presenti nei primi 7 cm e quelli delle radici presenti anche negli 8 sottostanti (primi 15 cm), per differenza si può osservare che: il girasole nel trattamento T37L7 ha sviluppato quasi tutte le radici nei primi 7 cm (83% vs. 92% in T29L15); nel trattamento T29L15, la presenza di un orizzonte di riporto maggiore ha consentito di approfondire maggiormente le radici che si sono sviluppate per l'84% nei primi 15 cm (vs. 33% nei primi 7 cm); la mancanza di un orizzonte di ricoprimento (T100) ha di fatto indotto il girasole ad uno sviluppo superficiale (primi 7 cm) di più del 60% del suo apparato radicale, percentuale che passa al 72% se si considerano i primi 15 cm.

In erba medica, la presenza degli orizzonti di ricoprimento ha influenzato in minor misura gli approfondimenti degli apparati radicali in quanto la percentuale di radici presenti nei primi 7 cm è pari al 63% e 65% rispettivamente nei trattamenti T29L15 e T37L7, è al 58% in sola pirite. Le percentuali aumentano di circa un 30% se si considerano anche le radici presenti negli 8 cm sottostanti, di un 20 % in T100.

In rafano nei primi 15 cm si trovano più del 90% delle radici totali per i trattamenti T29L15, T37L7 e T100. Di queste il 46% si trova nei primi 7 cm nel trattamento T29L15, percentuale che sale al 97% nel trattamento con 7 cm di ricoprimento.

Questo ha ridotto notevolmente la possibilità delle radici di colonizzare e crescere nella zona contaminata e quindi di assimilare i metalli pesanti che la inquinano. Questo comportamento può essere spiegato pensando alla sensibilità che il substrato di ceneri di pirite e il suo contenuto di inquinanti può aver dato all'apparato radicale portandolo a ridurre l'espansione e le ramificazioni in quell'ambito.

#### **4.1.6.6 Metodo distruttivo vs. metodo delle tracce colorate**

Sono stati confrontati i valori di lunghezza radicale ottenuti dal metodo distruttivo con quelli ottenuti dalla misurazione delle tracce radicali, così da dare un giudizio circa l'attendibilità e l'accuratezza di quest'ultimo metodo nella misurazione. Risulterebbe infatti molto importante poter misurare in vaso, il ritmo di accrescimento radicale con metodi non distruttivi in un substrato anomalo per conoscere l'adattabilità delle piante.

Correlando i valori delle misure di lunghezza radicale reale con quelli ricavati dalla analisi delle tracce colorate di tutti i campioni, indipendentemente dalla specie, dal trattamento e dall'epoca del rilievo, il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) risulta pari a 0,49 (Fig. 74) con una significatività elevata. La correlazione permane altamente significativa e il valore del coefficiente di determinazione aumenta ( $R^2 = 0,69$ ) se si considerano solo le prime tre repliche, raccolte durante lo svolgimento della prova in fase precoce (Fig. 75), mentre diminuisce fortemente ( $R^2 = 0,28$ ) se si correlano tra loro le misure delle lunghezze radicali a fine prova (47 GDS) pur permanendo elevata la significatività (Fig. 76).

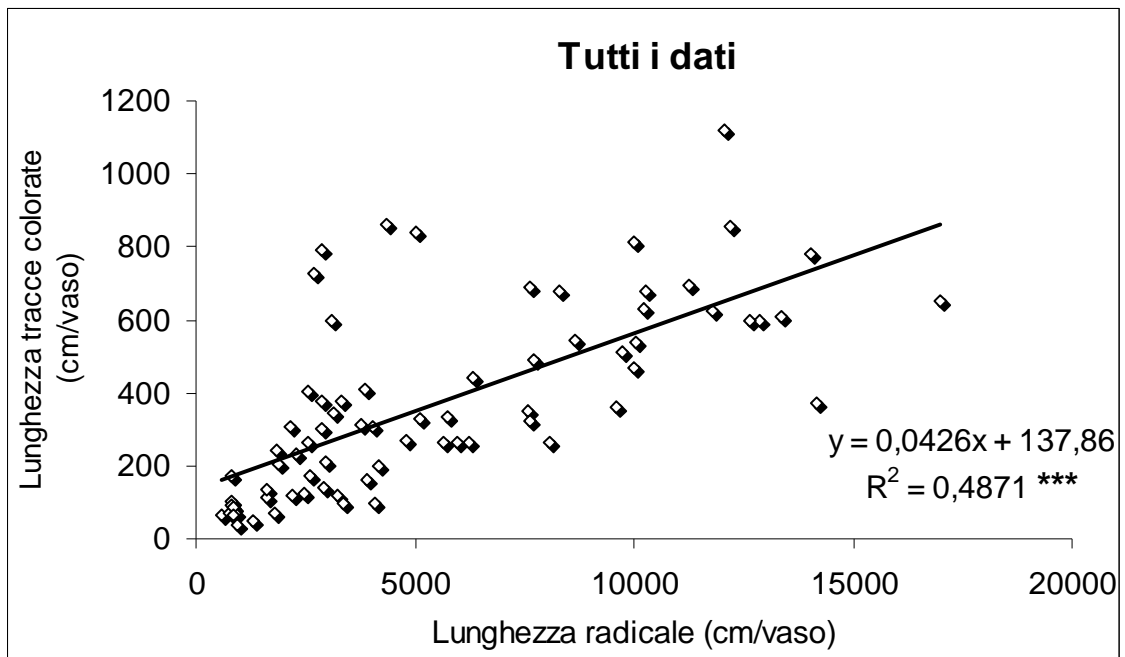


Figura 74 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli con metodo delle tracce colorate nelle tre specie oggetto di studio, utilizzando i dati di tutti i campioni, indipendentemente dalla specie, dal trattamento e dall'epoca del rilievo.

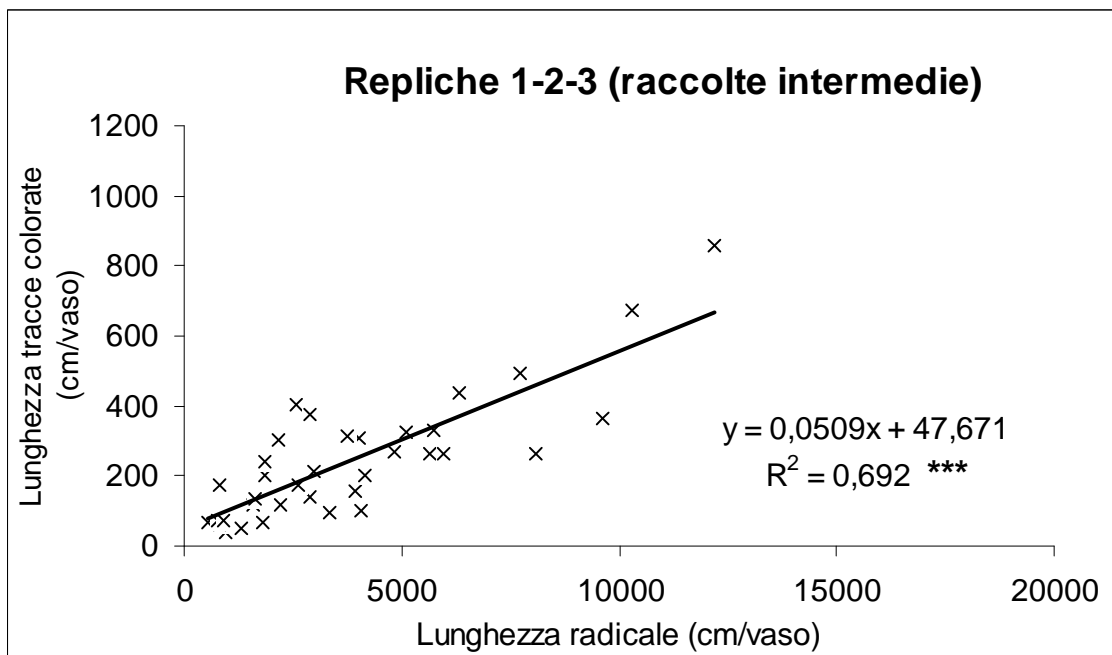


Figura 75 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli con metodo delle tracce colorate nelle tre specie oggetto di studio, utilizzando i dati dei primi 3 rilievi, indipendentemente dalla specie e dal trattamento.

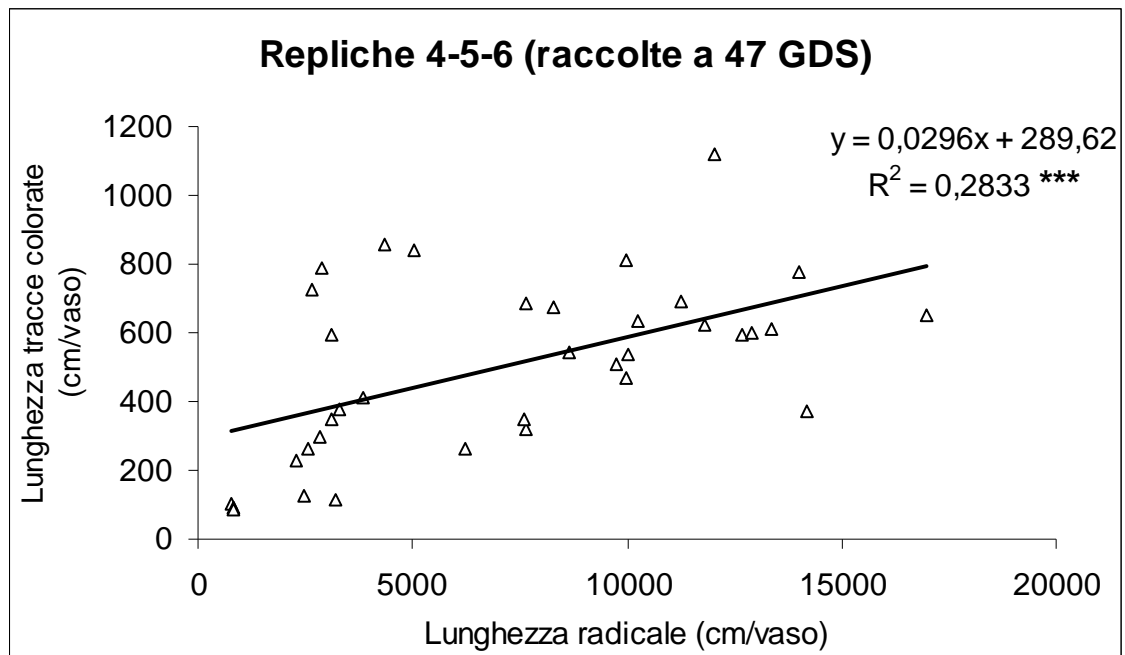


Figura 76 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli con metodo delle tracce colorate nelle tre specie oggetto di studio, utilizzando i dati dei rilievi a 47 GDS, indipendentemente dalla specie, dal trattamento.

Approfondendo l'analisi ed osservando singolarmente le prime tre epoche di raccolta si sono notati elevati coefficienti di determinazione, in particolare in epoca 1 (0,66), in epoca 2 (0,59) ed in epoca 3 (0,60).

Queste prime osservazioni portano a dire che il sistema di misura non distruttivo è adatto soprattutto nelle prime fasi di crescita delle piante, quando le radici, approfondendosi, si accrescono lungo i bordi del vaso disposto a 45° e sono quindi rintracciabili dal sistema. Quando, invece, l'apparato radicale inizia a ramificarsi e a colonizzare anche la parte interna del contenitore, il metodo perde di attendibilità.

Analizzando le singole specie si sono notate differenze marcate tra loro, la correlazione in *Helianthus annuus* evidenzia un coefficiente di determinazione molto basso quando si osservano tutte le repliche insieme ( $R^2 = 0,23$ ) e diminuisce ancora osservando solo le prime tre repliche (0,18) (Fig. 77).

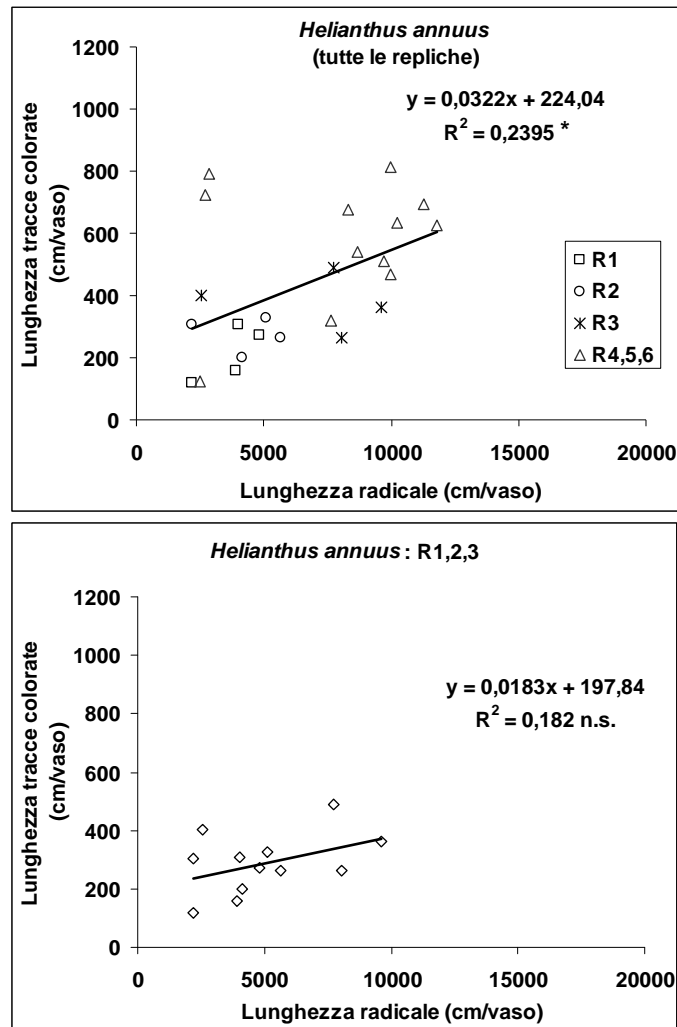


Figura 77 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli con metodo delle tracce colorate in *Helianthus annuus* L., in tutte le repliche (epoche) e considerando solo le repliche 1-2-3.

*Medicago sativa* ha presentato, invece, un  $R^2$  molto elevato (0,83) quando si sono analizzate tutte le repliche insieme, che è diminuito a 0,67, (significativo al  $P \leq 0,05$ ) considerando le prime repliche (Fig. 78).

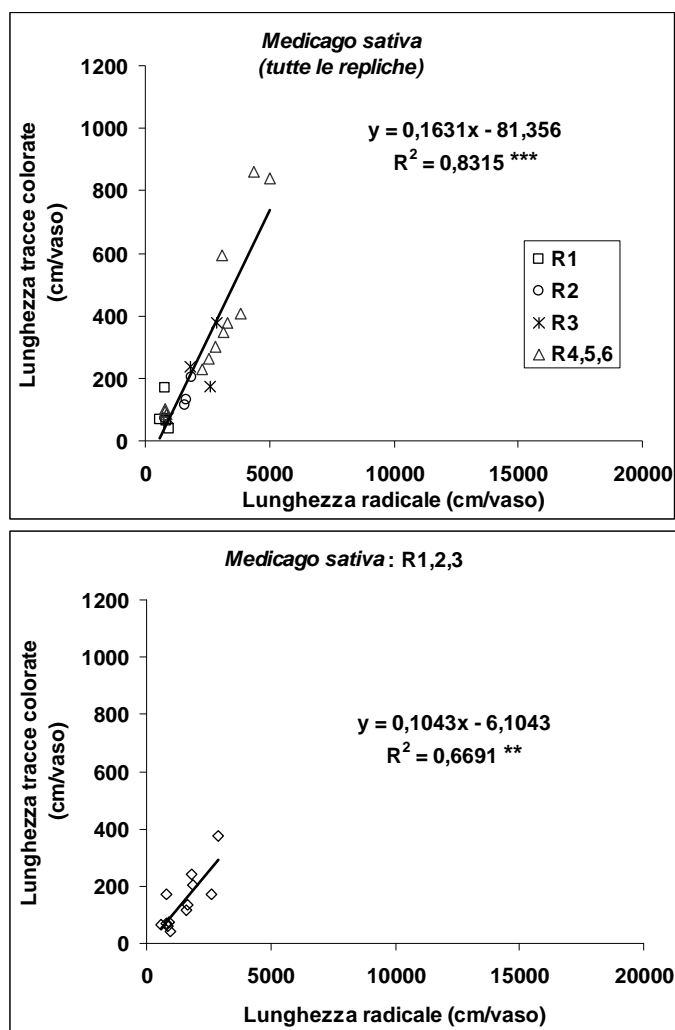


Figura 78 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli con metodo delle tracce colorate in *Medicago sativa* L., in tutte le repliche (epoche) e considerando solo le repliche 1-2-3.

In *Raphanus sativus* L. si è osservato un buon  $R^2$  (0,65) tenendo in considerazione tutte le repliche, che è aumentato fino a 0,92 considerando solo le prime tre repliche (Fig. 79).



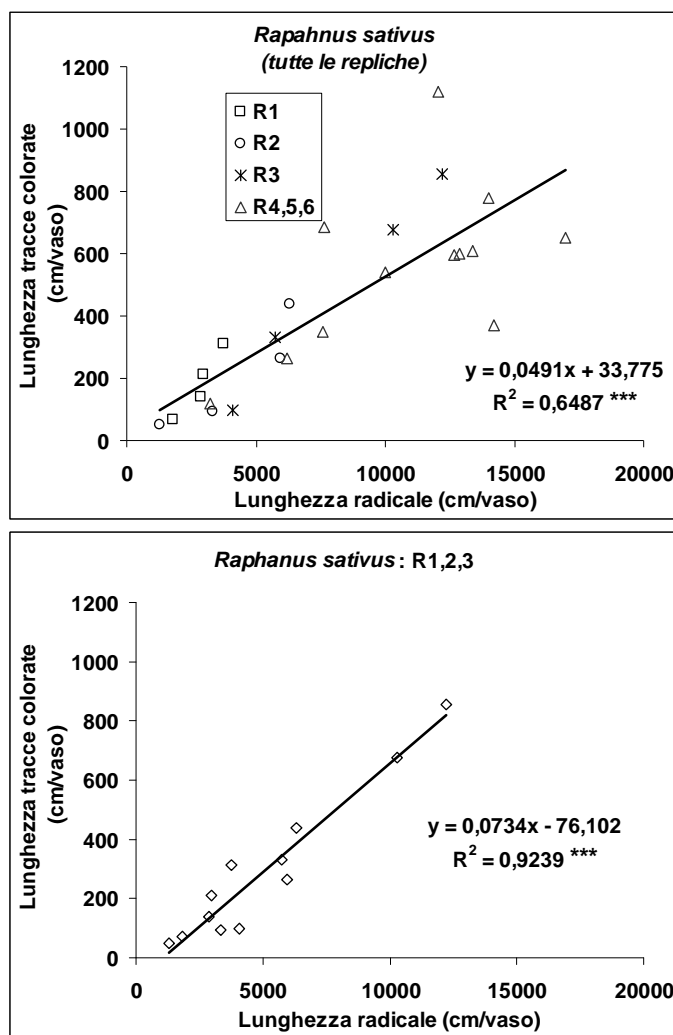


Figura 79 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli con metodo delle tracce colorate in *Raphanus sativus* L., in tutte le repliche (epoche) e considerando solo le repliche 1-2-3.

Da queste considerazioni il sistema delle tracce colorate sembra dipendere molto dalla struttura dell'apparato radicale e dal grado di approfondimento e ramificazione ma potrebbe essere validamente impiegato per *Medicago sativa* L. e per *Raphanus sativus* L., soprattutto in fase precoce.

Osservando l'attendibilità del metodo in raffronto ai substrati in cui si sono coltivate le piante, indipendentemente dalla specie, è stato notato che i coefficienti di determinazione più elevati si sono ottenuti nei trattamenti T29L15 e T37L7, rispettivamente con  $R^2$  di 0,77 e 0,63 (Fig. 80). Nel terreno di controllo si è avuto una buona correlazione ( $R^2 = 0,49$ ) (Fig. 80), mentre in T100 la correlazione non è risultata significativa (Fig. 80).

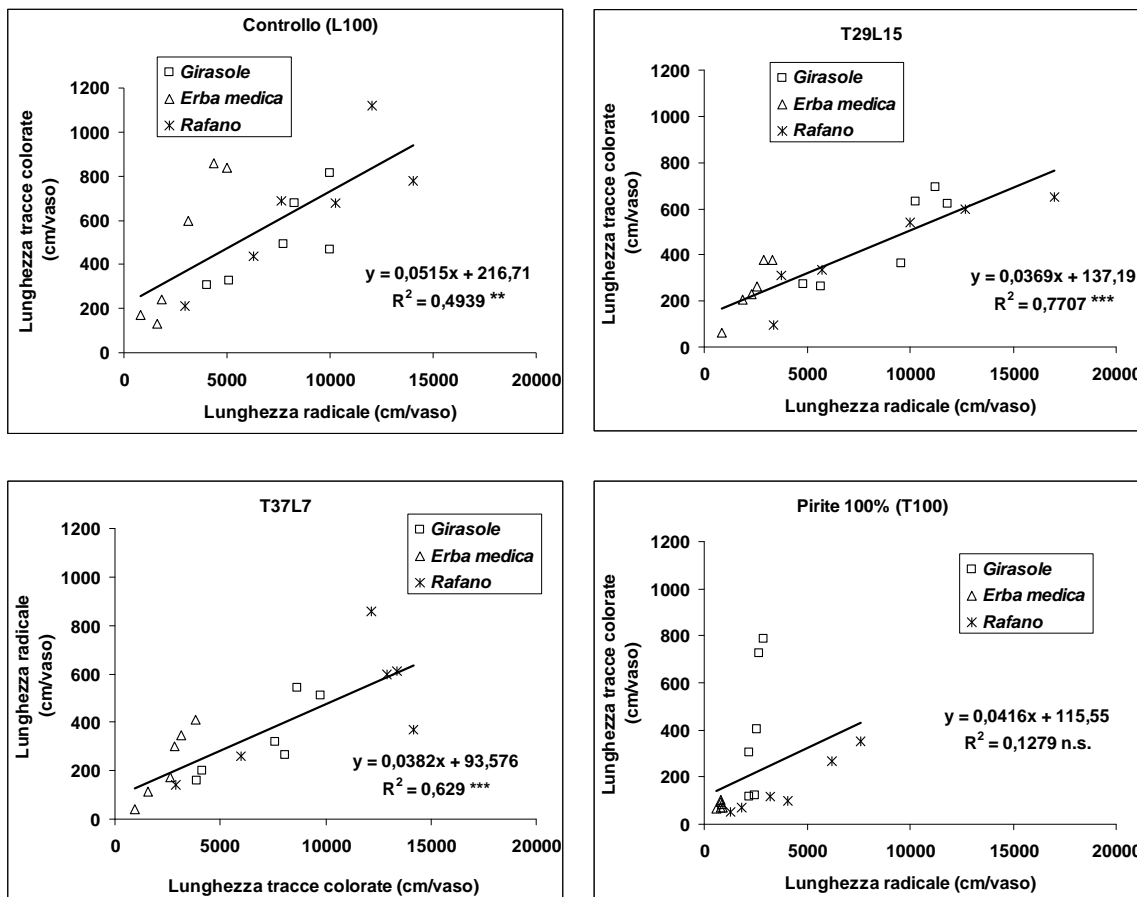


Figura 80 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli con metodo delle tracce colorate nelle tre specie oggetto di studio, nei quattro trattamenti.

Tali risultati possono essere spiegati dal fatto che nei trattamenti con l'orizzonte di ricoprimento molte radici si sono sviluppate in uno spazio superficiale ridotto, corrispondente agli orizzonti, e quindi più radici possono essere venute a contatto con i bordi del vaso. Nel caso del substrato di pirite, la ridotta quantità di radici formate, invece, ha ridotto la probabilità di contatto delle stesse con le pareti del contenitore.

#### 4.1.6.7 Metodo distruttivo vs. metodo elettrico

Per valutare la bontà del metodo di misurazione della lunghezza radicale con il metodo elettrico si sono confrontati i valori ottenuti da quest'ultimo con la lunghezza radicale effettiva.

Le rette di regressione sono state calcolate solo per i valori delle prime tre repliche, campionate nel corso della sperimentazione e non per le ultime tre distrutte alla fine, in quanto i rilevamenti con il capacimetro sono coincisi con il congelamento solo in quelle tre epoche di raccolta ed è stato quindi possibile il confronto con il metodo distruttivo.

Indipendentemente dalla specie e dal trattamento, la correlazione tra la capacità elettrica e la lunghezza radicale misurata con il metodo distruttivo classico nelle prime tre epoche di osservazione insieme, è risultata significativa ed il coefficiente di determinazione è risultato pari a 0,40 (Fig. 81a).

Al contrario, invece, quando si è andati ad analizzare la resistenza elettrica si è ottenuto una retta con coefficiente di regressione negativo, e comunque non significativa (Fig. 81b).

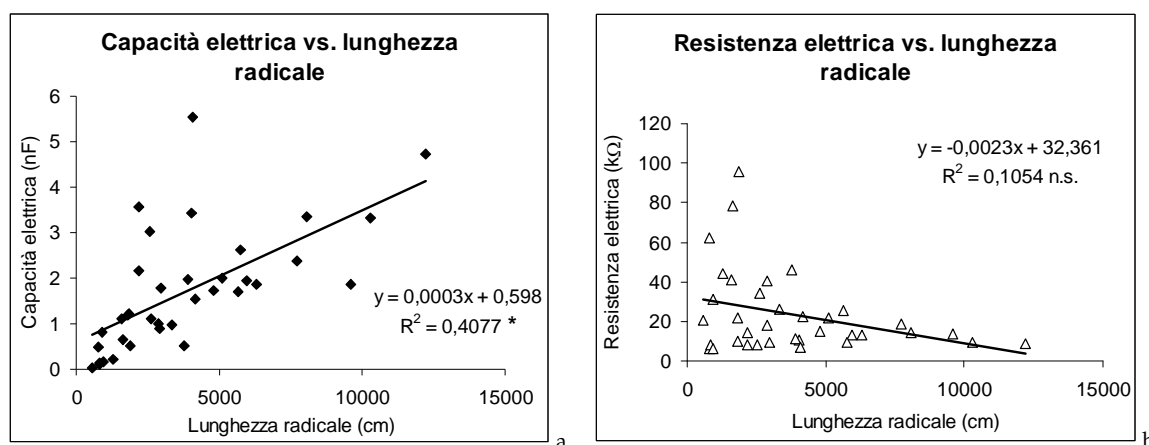


Figura 81 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale (metodo distruttivo) e quelli di capacità elettrica (nF) a sinistra; correlazione tra i valori di lunghezza radicale (metodo distruttivo) e quelli resistenza elettrica (kΩ) a destra.

Analizzando i singoli trattamenti, per i soli i valori di capacità elettrica e tralasciando quelli di resistenza che erano poco correlabili alle dimensioni dell'apparato radicale, si è potuto osservare che nel trattamento di controllo l' $R^2$  si è attestato a 0,58 (Fig. 82), un valore molto buono. Ancora maggiore è risultato essere la correlazione nel T29L15 ( $R^2 = 0,60$ ) (Fig. 82). Molto elevata per gli ultimi due trattamenti T100 e T37L7 rispettivamente con un coefficiente di determinazione di 0,90 e 0,95 (Fig. 82).

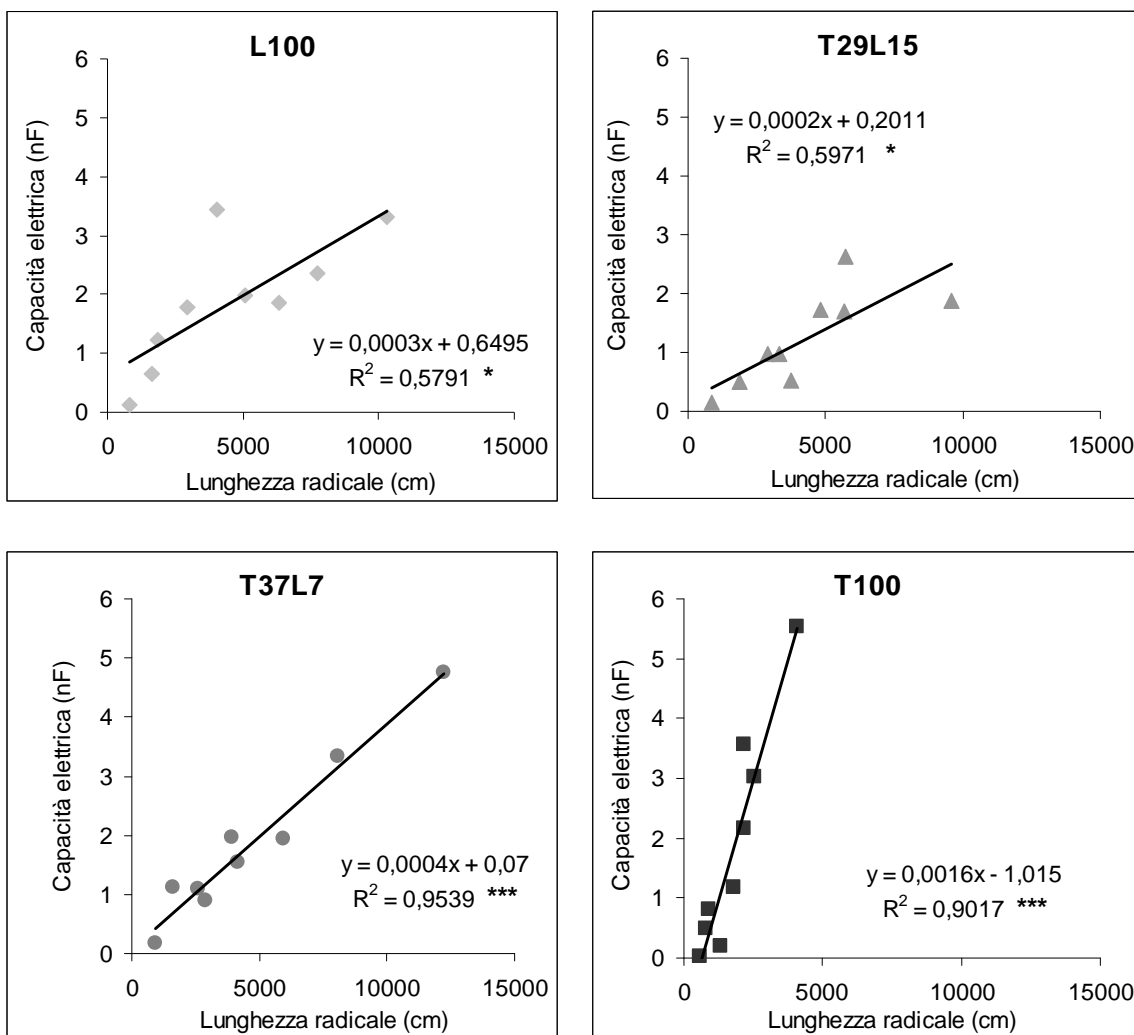


Figura 82 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli di capacità elettrica nei quattro trattamenti.

Considerando invece le specie, si è potuto osservare che la retta di regressione in girasole ha presentato un coefficiente angolare negativo e non è significativa (Fig. 83), mentre i valori della capacità elettrica registrati per l'erba medica sono correlati positivamente con il valore reale della lunghezza radicale (coefficiente di determinazione pari a 0,55) (Fig. 83), così come in rafano con  $R^2$  pari a 0,42 (Fig. 83).

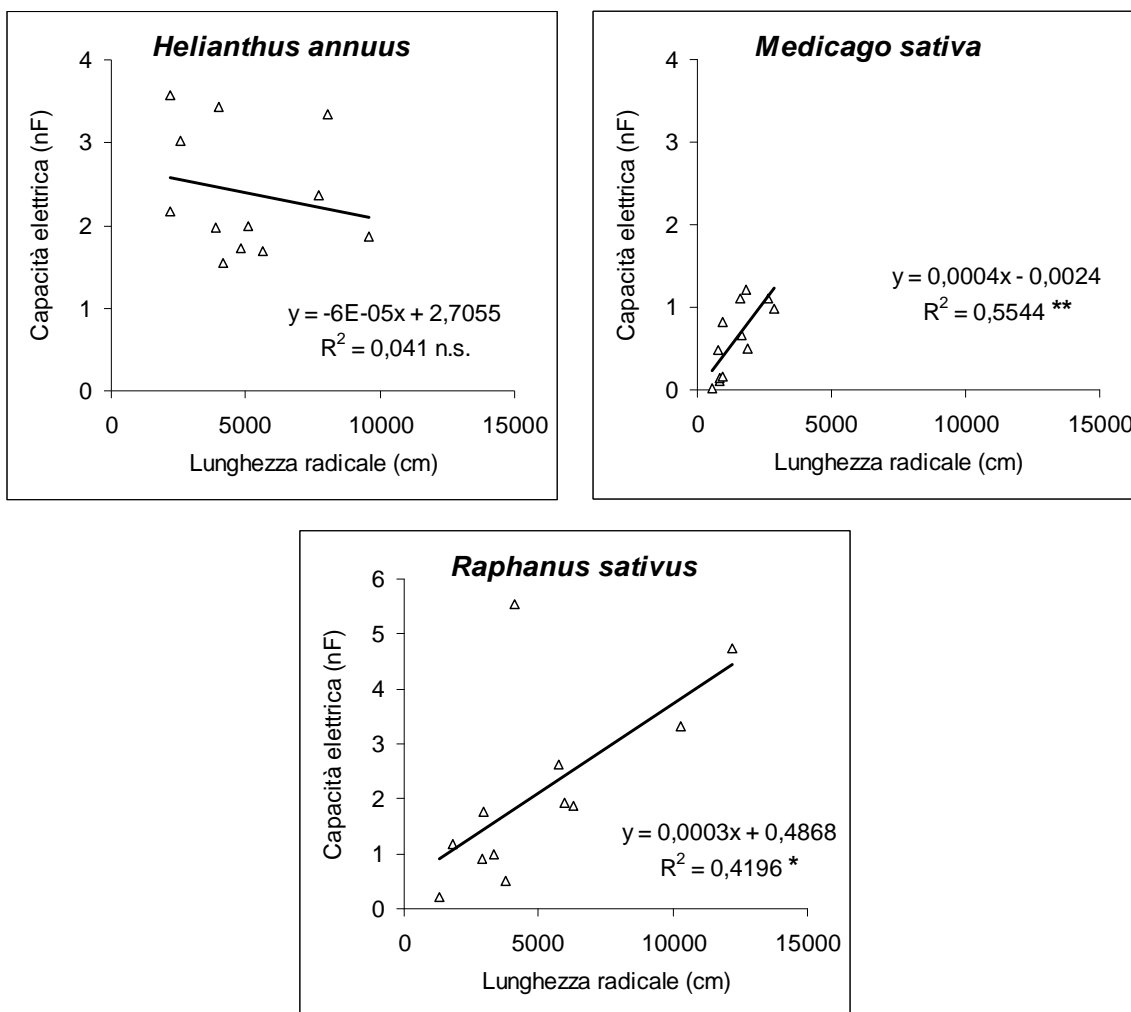


Figura 83 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale con metodo distruttivo e quelli di capacità elettrica nelle singole specie oggetto di studio.

Il metodo elettrico per la determinazione della lunghezza radicale sembra quindi dare risultati attendibili solo quando si prendono in considerazione i valori di capacità elettrica e non di resistenza.

In riferimento al trattamento, correlazioni elevate si sono ottenute nei trattamenti con maggior quantità di ceneri di pirite inquinate, probabilmente perché vi era una percentuale più elevata di radici nei primi centimetri di profondità, quindi più vicine all'elettrodo negativo inserito al colletto e a quello positivo inserito a 30 cm di profondità cioè a circa 2/3 della profondità massima del vaso, che hanno contribuito a migliorare la struttura del "circuito elettrico" di misura. Inoltre le ceneri di pirite potrebbero conduttore meglio, rispetto al terreno di controllo, la corrente elettrica applicata con lo strumento di misura. I

dati analitici indicano infatti che le ceneri di pirite, pur mescolate con una certa frazione di terreno (campionamenti *in situ* a Torviscosa) presentano una conducibilità elettrica di circa dieci volte superiore al terreno medio-limoso di controllo (3 contro 0,29  $\mu\text{S cm}^{-1}$ )

Riferendosi alle specie, sembra che il metodo sia maggiormente indicato per *Medicago sativa* L. e *Raphanus sativus* L. e non lo sia affatto per *Helianthus annuus* L. probabilmente perché quest'ultima specie, in tutti i trattamenti, ha raggiunto profondità radicali elevate, superiori alla profondità di inserimento dell'elettrodo positivo nel terreno e questo potrebbe aver portato ad una perdita di attendibilità del metodo.

#### **4.1.6.8 Metodo distruttivo vs. concentrazione di metalli pesanti**

Si è effettuata l'analisi di correlazione tra la lunghezza radicale e la concentrazione di metalli pesanti presenti nella biomassa aerea.

Nei grafici, per i metalli pesanti, è stata utilizzata la somma delle concentrazioni (presenti nei tessuti epigei) standardizzate di cobalto, rame, piombo e zinco. In generale, i dati ottenuti da tutti i trattamenti, escluso naturalmente il controllo, hanno fornito un'elevata significatività della correlazione tra la lunghezza radicale complessiva e la somma delle concentrazioni dei quattro metalli pesanti considerati; il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) della retta è risultato essere pari a 0,54 (Fig. 84).

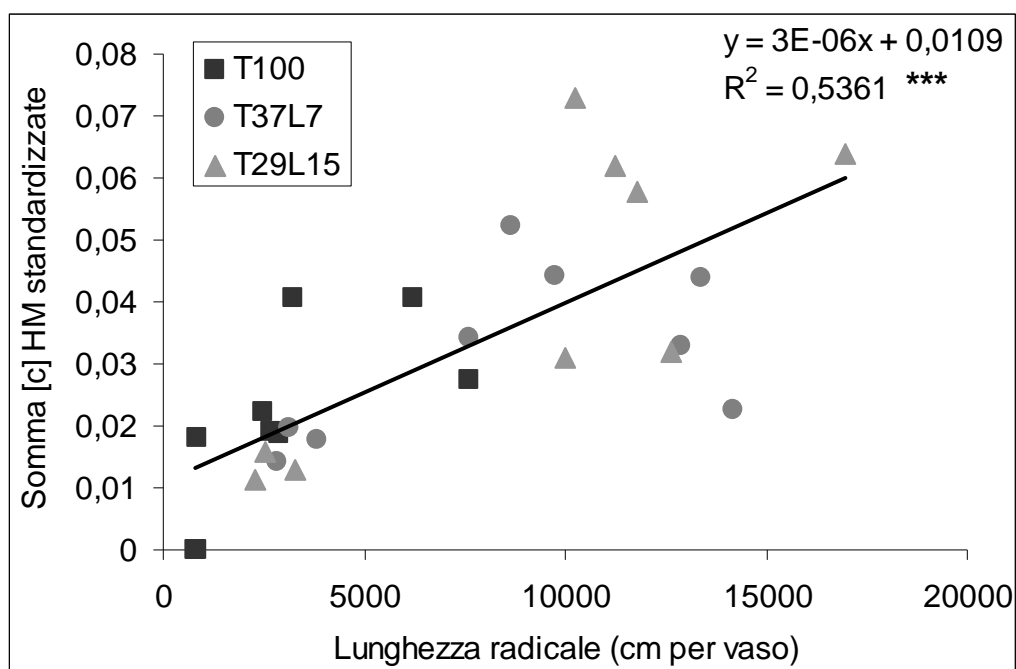


Figura 84 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale e quelli di concentrazione (standardizzati) di quattro metalli pesanti (Co, Cu, Pb, Zn) presenti nella biomassa aerea delle tre specie oggetto di studio, in tutti i trattamenti che prevedevano ceneri di pirite (T100, T37L7 e T29L15).

Nei singoli trattamenti la correlazione maggiore si è verificata nel T29L15 con  $R^2$  pari a 0,63. Elevata correlazione si è riscontrata anche nel T100 mentre una bassa percentuale di variabilità è stata spiegata dal modello lineare in T37L7  $R^2$  pari a 0,28.

Analizzando le specie si è visto che in girasole all'aumentare della lunghezza radicale aumenta anche il contenuto di metalli pesanti nei tessuti epigei (coefficiente di determinazione, 0,84); mentre per l'erba medica tale relazione è molto meno accentuata ha con una nebulosa di punti tutti molto vicini all'origine (Fig. 85). Non significativa invece la correlazione in rafano (Fig. 85).

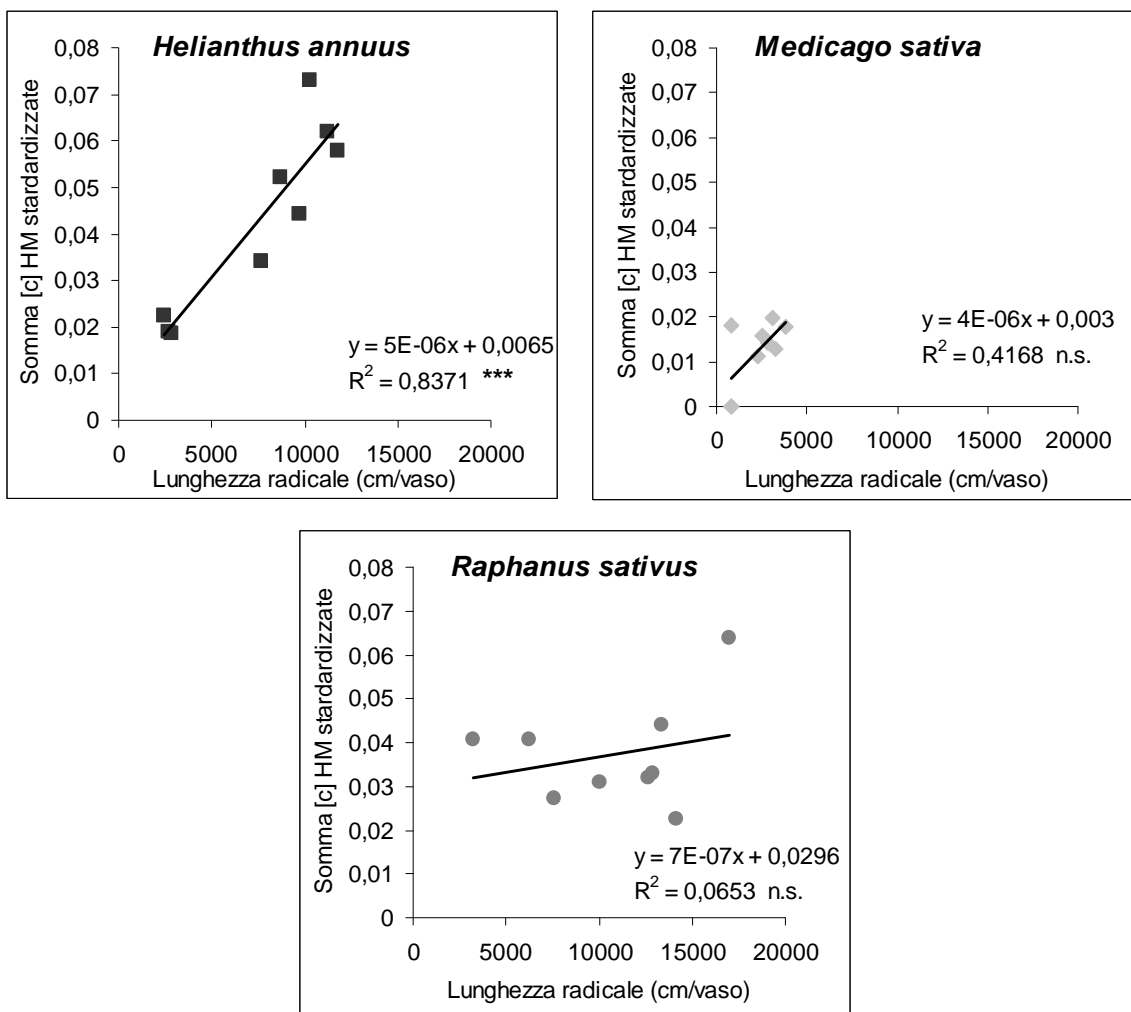


Figura 85 - Correlazione tra i valori di lunghezza radicale ed i valori di concentrazione standardizzati dei metalli pesanti presenti nella biomassa aerea (Co, Cu, Pb, Zn), nelle singole specie oggetto di studio, nei trattamenti con ceneri di pirite (T100, T37L7, T29L15).

In generale quindi, maggiore è la lunghezza radicale maggiore risulta la concentrazione dei quattro metalli pesanti nella parte epigea delle piante. In particolare tale relazione risulta molto evidente nei trattamenti T100 e T29L15 e con girasole e meno in erba medica, mentre in rafano non sembra, se non in minima parte, che all'aumento della lunghezza radicale corrisponda un incremento significativo della concentrazione dei metalli pesanti.

Osservando in specifico le relazioni tra le radici che oltrepassano l'orizzonte inquinato (percentuale del totale) e la concentrazione dei metalli pesanti si è



potuto riscontrare che solo nel trattamento T29L15 si è avuto significatività della retta con un coefficiente di determinazione pari a 0,56 (Fig. 86).

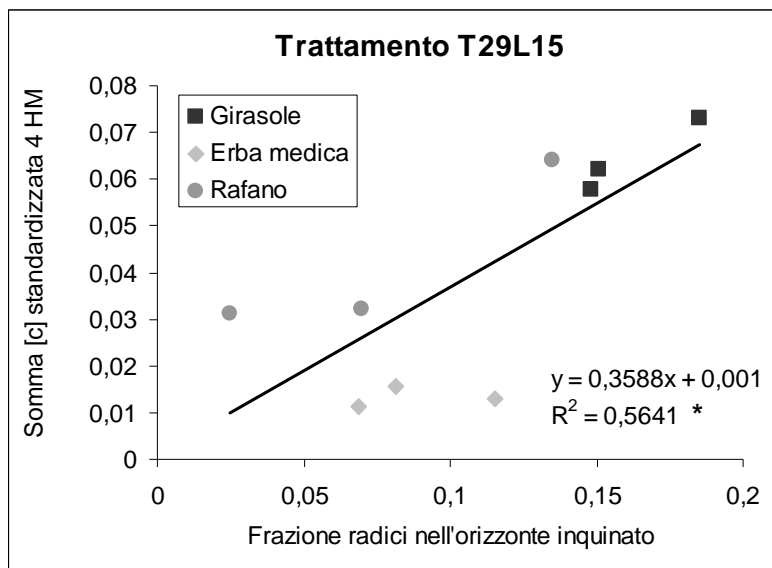


Figura 86 - Correlazione tra la frazione di radici presente nell'orizzonte inquinato (15 – 45 cm) ed i valori di concentrazione standardizzati dei metalli pesanti presenti nella biomassa aerea (Co, Cu, Pb, Zn) delle specie oggetto di studio, nel trattamento T29L15.

In T37L7 la retta ottenuta ha presentato un coefficiente angolare negativo, ed è risultata non significativa (Fig. 87).

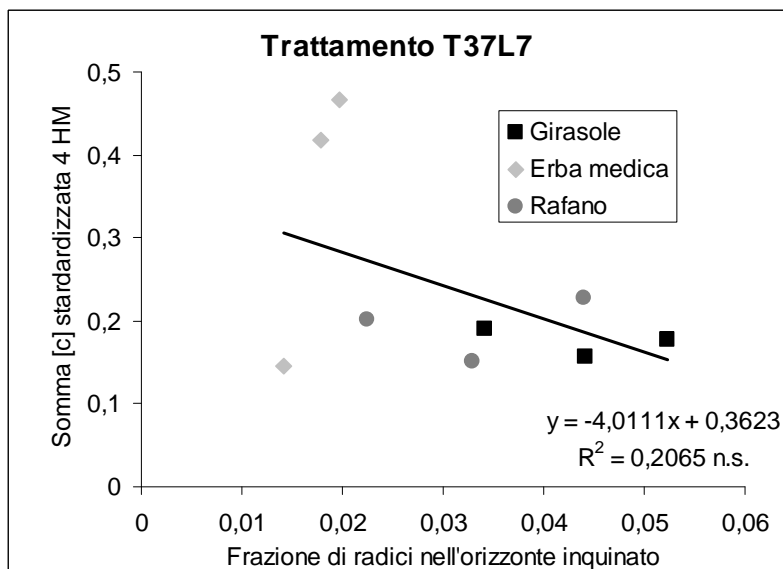


Figura 87 - Correlazione tra la frazione di radici presente nell'orizzonte inquinato (7 – 45 cm) ed i valori di concentrazione standardizzati dei metalli pesanti presenti nella biomassa aerea (Co, Cu, Pb, Zn) delle specie oggetto di studio, nel trattamento T37L7.

Una valutazione complessiva suggerisce che nel trattamento con l'orizzonte di ricoprimento di 15 cm si evidenzia maggiormente il ruolo dell'accrescimento radicale nel concentrare i metalli pesanti, portando ad una maggiore efficacia di rimediazione. Per quanto riguarda la specie, questa osservazione generale è stata particolarmente evidente in girasole, con valori di concentrazione dei quattro metalli nei casi migliori più elevate di erba medica e di rafano.

Per quanto riguarda il ruolo dell'apparato radicale nell'assorbimento del Fe e dello S, i due elementi maggiormente presenti nelle ceneri di pirite, è stata riscontrata unicamente una correlazione positiva ( $R^2= 0,84$ ) e significativa tra lunghezza radicale e la concentrazione di S nei tessuti epigei.

## **PROVE DI MESOCOSMO**

Nelle prove di mesocosmo erano a confronto orzo e loiessa, con i medesimi trattamenti ed era stata impostata una prova con erba medica per valutarne il comportamento in più anni.

### ***4.1.7 Determinazione della biomassa aerea***

Da questa sperimentazione è stata confermata l'estrema fitotossicità delle ceneri di pirite per l'erba medica, solo parzialmente attenuata dalla presenza dell'orizzonte di ricoprimento, con una marcata riduzione di biomassa aerea ed un effetto fitotossico progressivamente crescente durante la stagione vegetativa (Fig. 88).

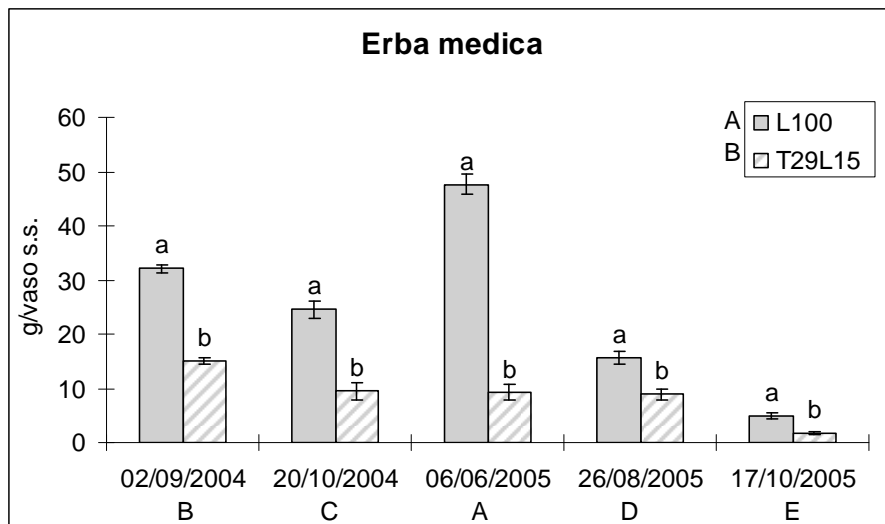


Figura 88 - Gli istogrammi rappresentano la biomassa epigea (peso secco) nei vari sfalci di erba medica. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per lo stesso sfalci. Lettere maiuscole indicano differenze statisticamente significative per gli effetti principali (trattamento e data di sfalci) (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Diminuzioni sensibili di biomassa, sia epigea che radicale, sono state rilevate sia in orzo che in loiessa (Fig. 89), suggerendo tuttavia la possibilità di applicare favorevolmente l'orizzonte di ricoprimento "sano" per il contenimento della fitotossicità.

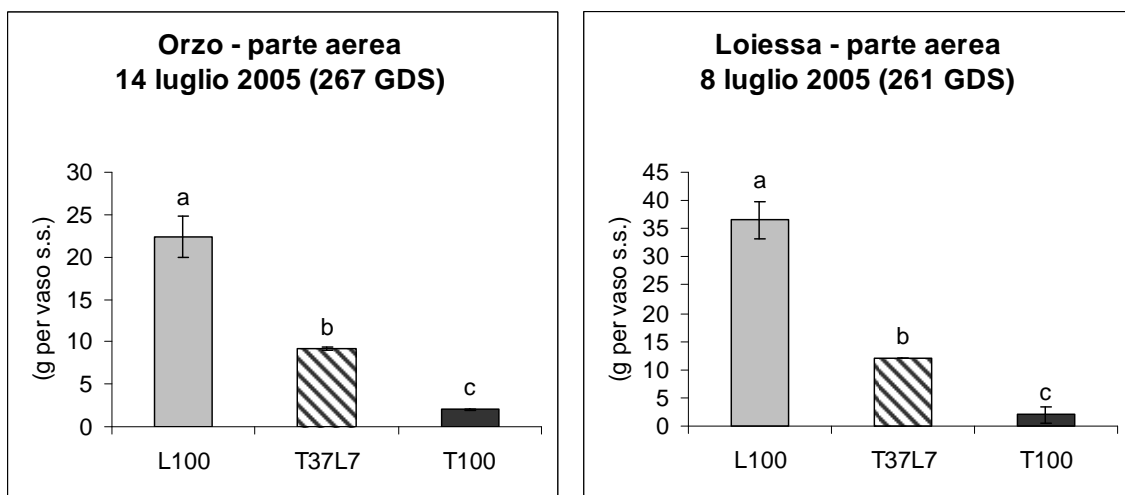


Figura 89 - Gli istogrammi rappresentano la biomassa epigea (peso secco) alla raccolta di orzo e loiessa. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti. (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

## 4.1.8 I metalli pesanti

### 4.1.8.1 Concentrazione di metalli pesanti

Per quanto riguarda Co, Cu, Pb e Zn, i 4 metalli presenti nel sito in concentrazioni superiori a quelle ammesse dal decreto ministeriale (471/99), l'erba medica coltivata per 469 giorni, ha concentrato in media (media delle concentrazioni nei singoli sfalci, Fig. 90, istogramma "media") quantitativi paragonabili, per ogni metallo, a quelli rilevati nella prova in microcosmo per lo stesso trattamento (T29L15).

In linea di massima, fa eccezione il cobalto, i metalli sono stati concentrati prevalentemente nelle fasi iniziali di sviluppo (anno 2004) (Fig. 90).

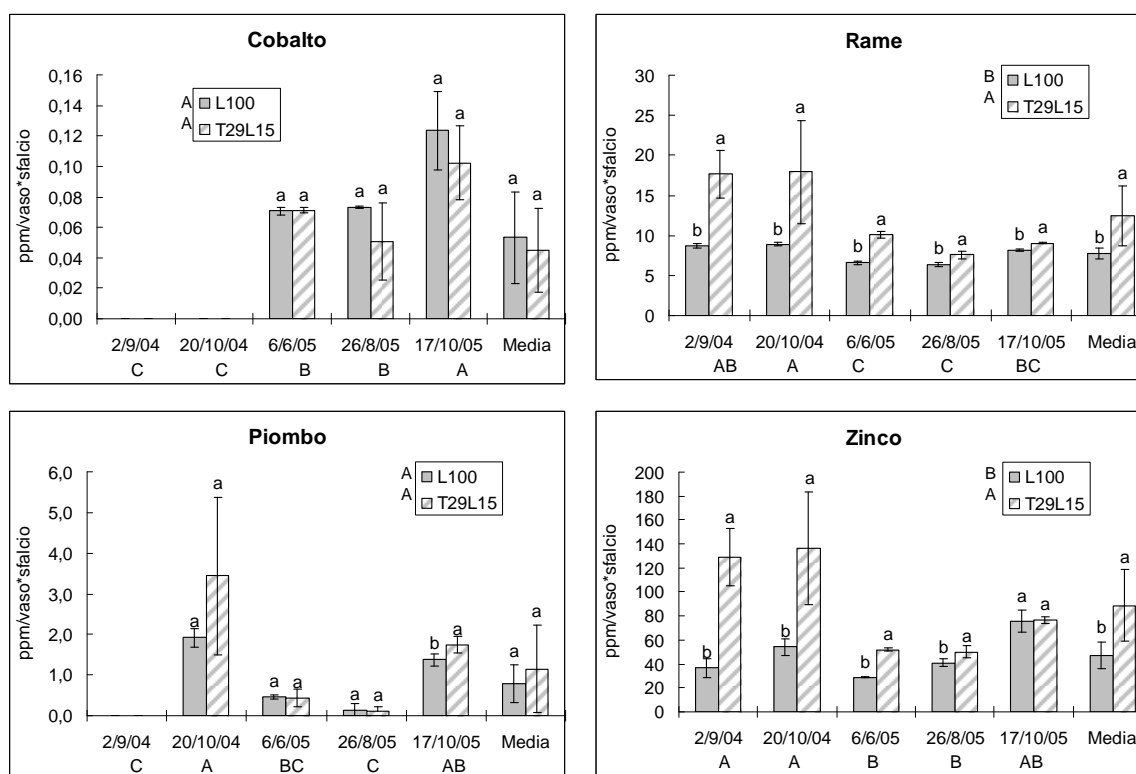


Figura 90 - Erba medica: concentrazioni nei tessuti epigei di Co, Cu, Pb e Zn. L'istogramma "media" rappresenta la concentrazione media degli sfalci. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere minuscole diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti. A lettere maiuscole corrispondono differenze significative tra gli effetti principali (trattamento, data di prelievo) (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Il cadmio, a differenza della prova in microcosmo, è stato assorbito, anche se ne sono state rilevate tracce solo in due rilievi (Fig. 91). Il cromo, come già evidenziato per rame, zinco e piombo, è stato assorbito di preferenza nel primo anno di coltivazione. Il manganese sembra mostrare un andamento stagionale con assorbimenti inferiori nei mesi estivi, mentre concentrazioni di nichel sono state trovate solo nei tagli del secondo anno. Anche le concentrazioni medie di questi elementi confermano i dati di concentrazione delle prove in microcosmo.

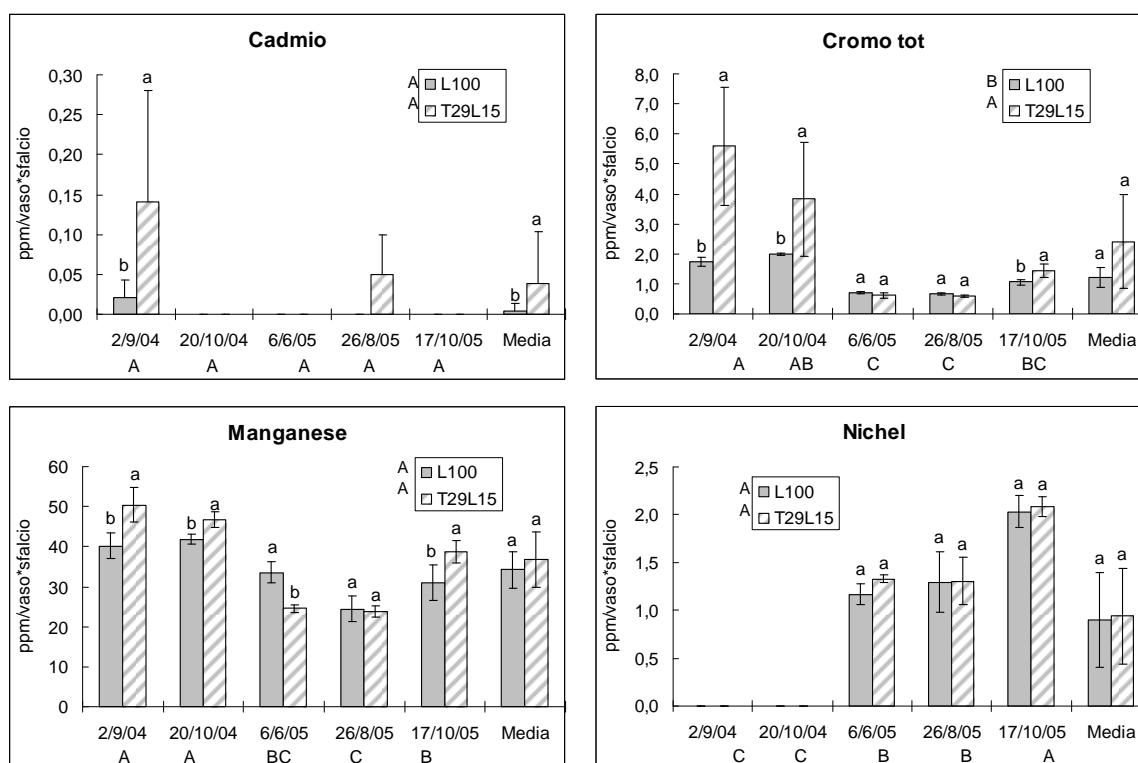


Figura 91 - Erba medica: concentrazioni nei tessuti epigei di Cd, Cr tot, Mn e Ni. L'istogramma "media" rappresenta la concentrazione media degli sfalci. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere minuscole diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti. A lettere maiuscole corrispondono differenze significative tra gli effetti principali (trattamento, data di prelievo) (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per quanto riguarda Fe e S (Fig. 92) le concentrazioni medie nei tessuti si discostano da quelle già verificate nella prova precedente. In particolare il Fe dimostra concentrazioni medie pari alla metà di quelle nello stesso trattamento (T29L15) nella prova in microcosmo, mentre lo S ha valori medi doppi (Fig. 92).

Inoltre, il ferro è stato assorbito solo nel secondo anno di coltivazione, contrariamente alla prova iniziale. Lo zolfo, invece, nel corso del 2004 nel trattamento con le ceneri di pirite, è stato concentrato in misura 3 volte superiore al 2005 (somma delle concentrazioni degli sfalci).

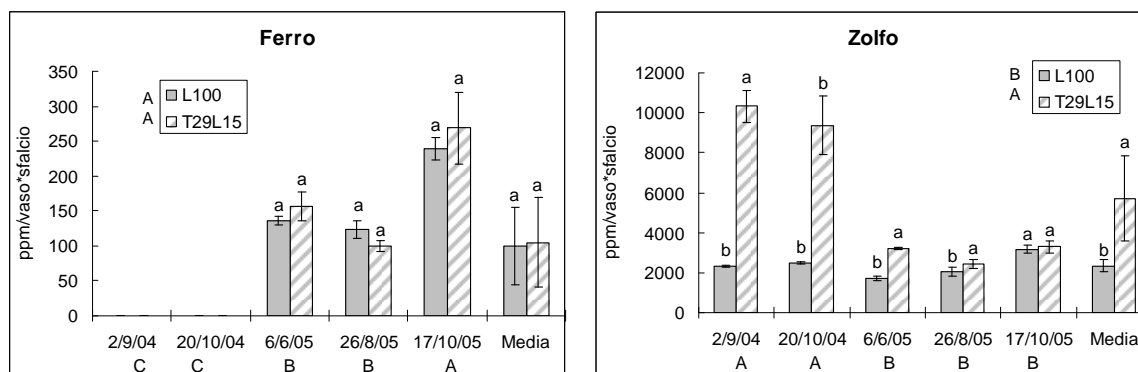


Figura 92 - Erba medica: concentrazioni nei tessuti epigei di Fe e S. L'istogramma "media" rappresenta la concentrazione media degli sfalci. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere minuscole diverse corrispondono differenze significative tra i trattamenti. A lettere maiuscole corrispondono differenze significative tra gli effetti principali (trattamento, data di prelievo) (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

L'effetto fitotossico per erba medica, evidenziato dalla diminuzione di biomassa nel secondo anno di coltivazione (Fig. 88) è stato evidente anche in termini di accumulo di metalli pesanti. A tale riguardo è stata osservata una diminuzione progressiva di efficienza nei diversi sfalci, come si può vedere nel grafico relativo alla somma delle concentrazioni standardizzate per i valori di iperaccumulo di Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn con un calo del 21% nel 2005 rispetto al 2004 (Fig. 93).

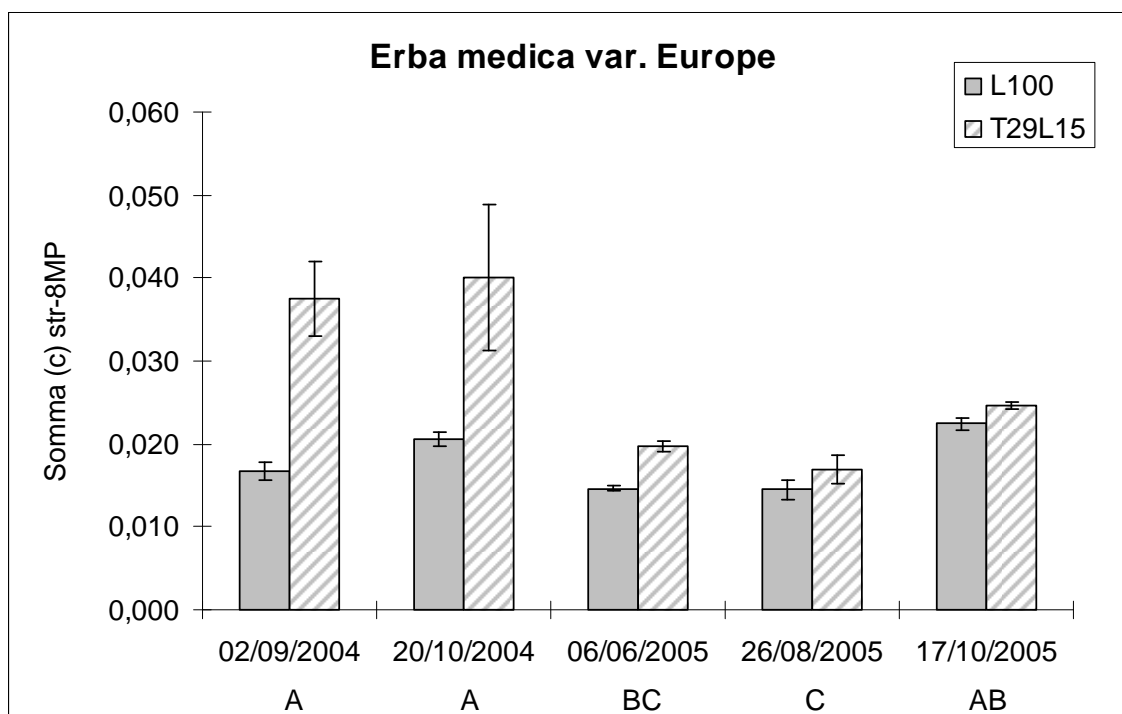


Figura 93 - Somma delle concentrazioni standardizzate di 8 metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Orzo e loiessa sono due specie ad apparato radicale superficiale fascicolato. Dall'analisi delle concentrazioni degli 8 metalli pesanti (Co, Cu, Pb, Zn, Cd, Cr tot, Mn, Ni) e di Fe e S risulta che le due specie hanno assorbito maggiori concentrazioni di metalli pesanti nel trattamento con sole ceneri di pirite (effetto principale trattamento), mentre le piante nel trattamento con orizzonte di ricoprimento (T37L7), hanno di fatto concentrato i metalli nei tessuti epigei in egual misura al controllo (Fig. 94 e 95). Questo, come sarà meglio illustrato in seguito (Fig. 101 e 102), è dovuto probabilmente al fatto che le piante cresciute nel trattamento T37L7 non hanno, di fatto, sviluppato apparato radicale, se non in minima parte, nell'orizzonte inquinato.

Di particolare interesse l'orzo, che nel trattamento con le sole ceneri di pirite ha assorbito i metalli in concentrazioni sempre superiori a loiessa, ad eccezione del cadmio (0,45 x) e del manganese (1 x) (Fig. 94). Nel trattamento T100 infatti, l'orzo ha concentrato il cobalto in misura 10 volte superiore a loiessa, rame e

piombo in misura 4 volte maggiore e zinco in quantità doppia (Fig. 94), mentre nel trattamento con orizzonte di ricoprimento ha spesso concentro in misura inferiore dell'altra graminacea (Co e Zn).

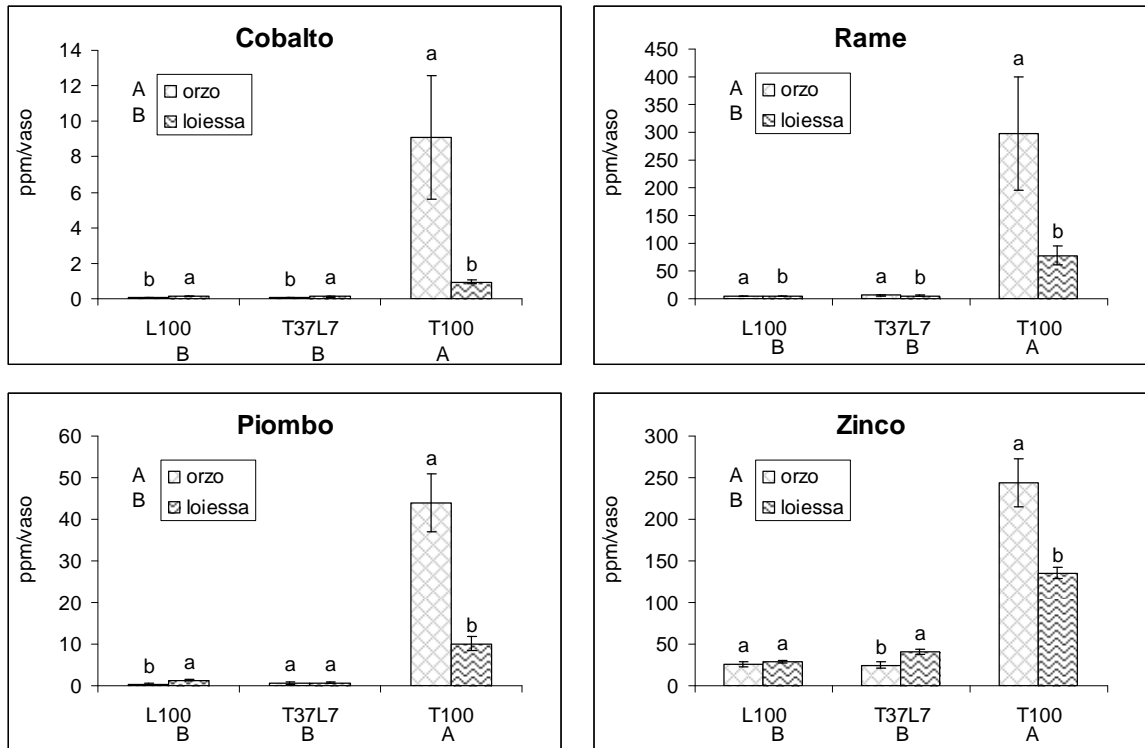
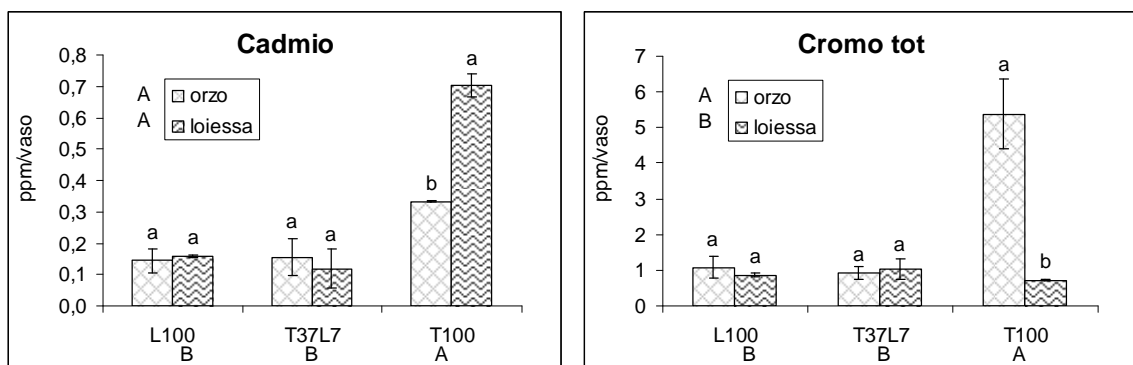


Figura 94 - Orzo e loiessa: concentrazioni nei tessuti epigei di Co, Cu, Pb e Zn. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere minuscole diverse corrispondono differenze significative tra le specie. A lettere maiuscole corrispondono differenze significative tra gli effetti principali (trattamento, specie) (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Ragionamenti analoghi se si considerano gli assorbimenti dei metalli presenti nel sito in concentrazioni non inquinanti, ove il cromo è accumulato da orzo nel trattamento T100 in concentrazioni 7 volte superiori a loiessa e 2 volte per il nichel (Fig. 95).





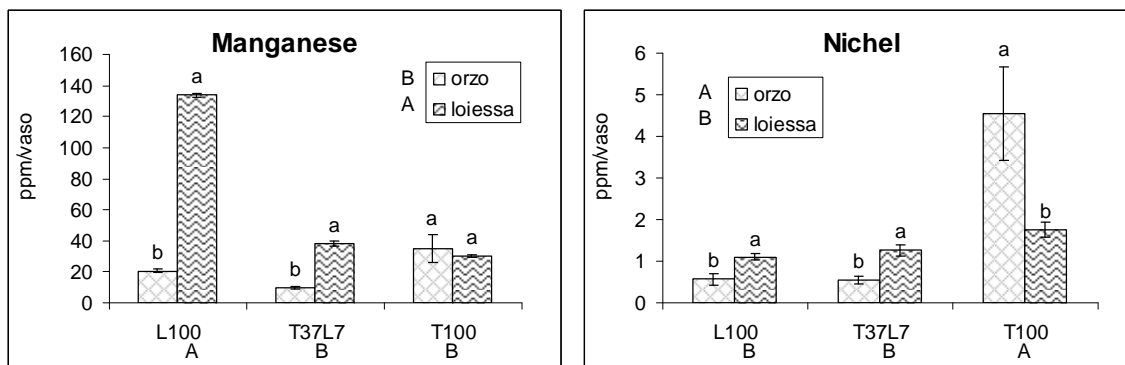


Figura 95 - Orzo e loiessa: concentrazioni nei tessuti epigei di Cd, Cr tot, Mn e Ni. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere minuscole diverse corrispondono differenze significative tra le specie. A lettere maiuscole corrispondono differenze significative tra gli effetti principali (trattamento, specie) (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Rilevante l'assorbimento di ferro da parte dell'orzo, nei cui tessuti se ne trovano concentrazioni pari a quelle riscontrate in erba medica coltivata in vaso (microcosmo) per soli 47 giorni e nel medesimo trattamento (50.000 ppm circa) (Fig. 96).

Anche per lo zolfo, concentrazioni maggiori sono state trovate nei tessuti epigei di orzo, in misura 5 volte superiore a loiessa (Fig. 96).

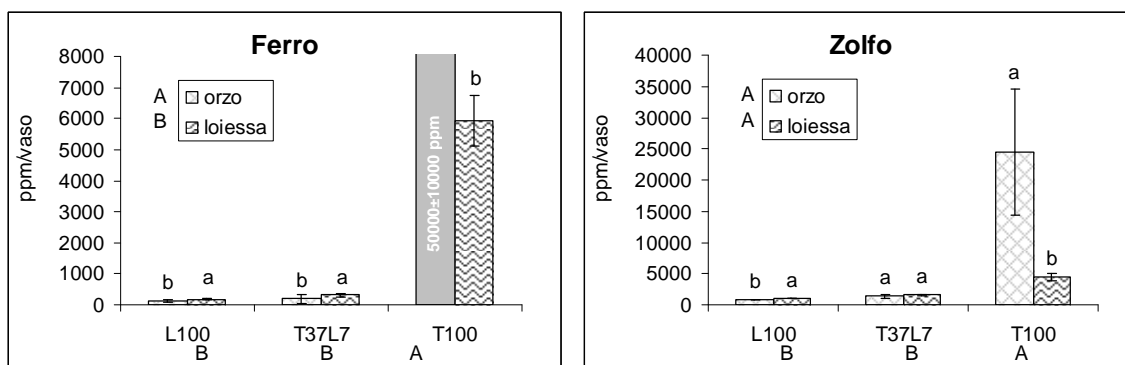


Figura 96 - Orzo e loiessa: concentrazioni nei tessuti epigei di Fe e S. Le barre verticali indicano l'errore standard. A lettere minuscole diverse corrispondono differenze significative tra le specie. A lettere maiuscole corrispondono differenze significative tra gli effetti principali (trattamento, specie) (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Anche dalla valutazione delle concentrazioni totali, espresse come somma delle concentrazioni standardizzate degli 8 metalli pesanti considerati, si può osservare come orzo abbia in generale (media dei trattamenti) assorbito più di

loiessa e che le concentrazioni maggiori si sono avute nel trattamento con le sole ceneri di pirite, mentre la sovrapposizione di un orizzonte “sano” ha di fatto abbassato i valori di assorbimento a quelli del controllo (Fig. 97).

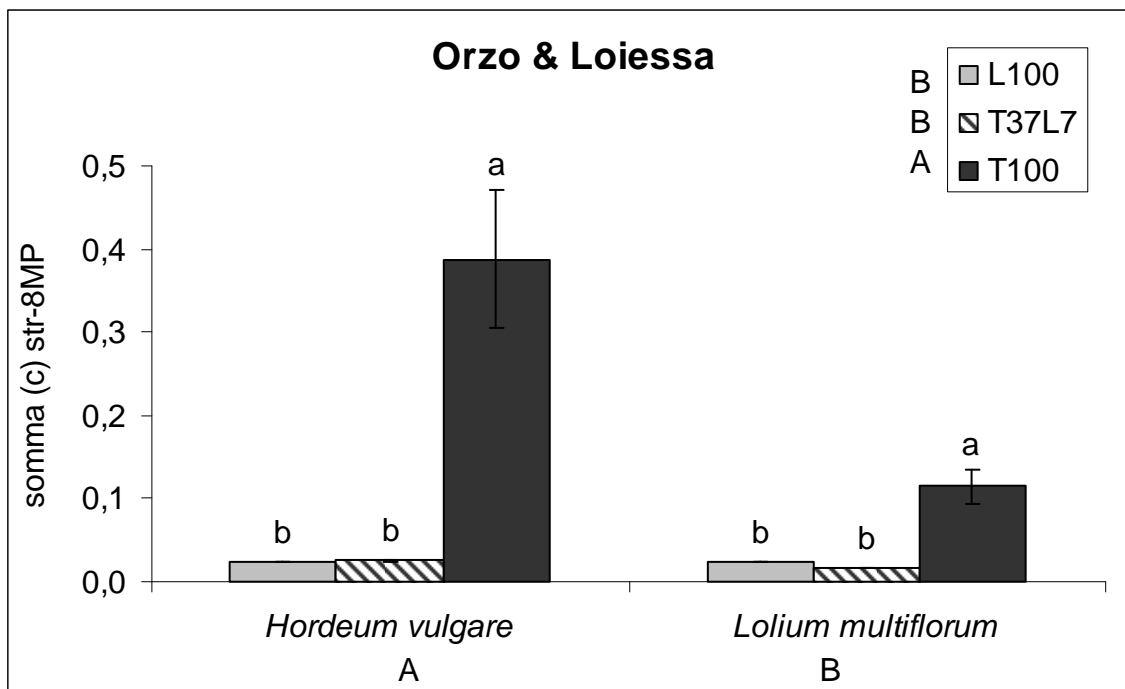


Figura 97 - Somma delle concentrazioni standardizzate di 8 metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per la stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali. (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.8.2 Asportazione di metalli pesanti

Unitamente all'analisi delle concentrazioni ottenute nei diversi trattamenti per le singole specie, si è eseguita una valutazione di quali siano state le asportazioni ottenute.

Di seguito è stata presa in considerazione l'asportazione totale, somma per vaso, degli 4 metalli (Fig. 98 e 99) presenti nel sito: cobalto, rame, piombo e zinco (i 4 metalli fuori limite tabellare) e cadmio, cromo totale, manganese e zinco.

L'effetto fitotossico per erba medica, evidenziato dalla diminuzione di biomassa nel secondo anno di coltivazione (Fig. 88) e dal minor accumulo di metalli pesanti, si conferma anche dall'analisi delle asportazioni. Confrontando infatti, le asportazioni del primo anno (somma dei 2 sfalci) con quelle del secondo anno, si nota una diminuzione pari a 2,5 volte con valori di 1,8 mg/vaso contro i 4,8 mg/vaso del primo anno (Fig. 98). Questo potrebbe suggerire la possibilità di utilizzare l'erba medica a fini fitoestrattivi, come pianta annuale.

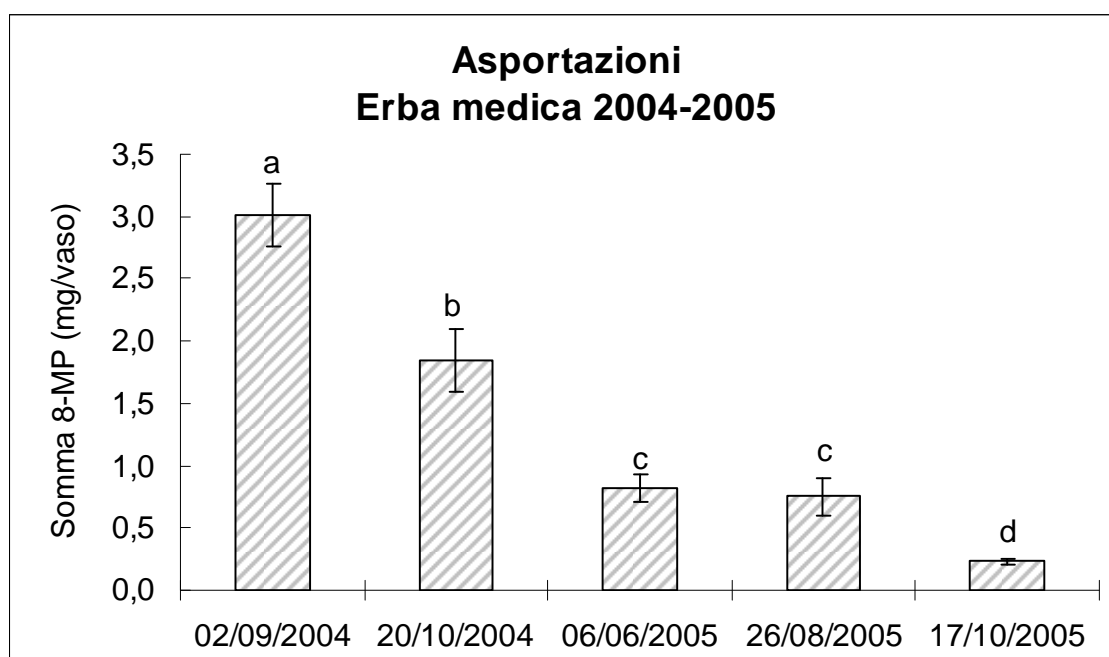


Figura 98 - Somma delle asportazioni di 8 metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra gli sfalci. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali. (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Le asportazioni di medica nel secondo anno sono confrontabili con quelle di orzo nel trattamento T100 e loiessa nel trattamento T37L7; circa la metà, invece, quelle di orzo in T37L7. Le asportazioni inferiori, soprattutto a causa della ridotta produzione di biomassa epigea, sono state osservate in loiessa nel trattamento con sole ceneri di pirite (0,4 mg/vaso) (Fig. 99).

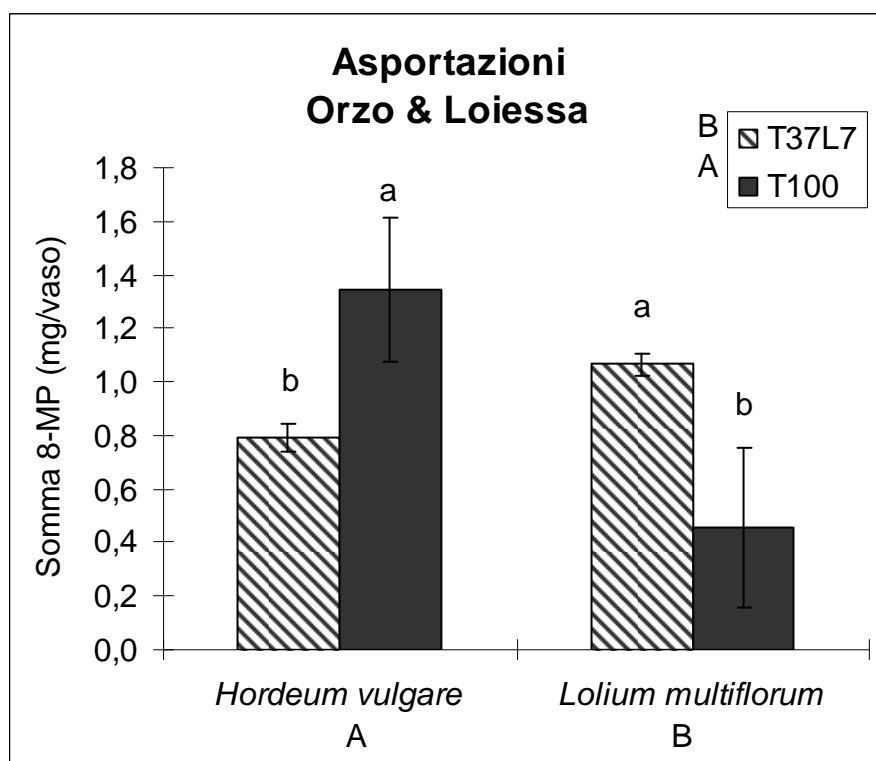


Figura 99 - Somma delle asportazioni di 8 metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per la stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali. (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.9 Gli apparati ipogei

##### 4.1.9.1 Rilievo distruttivo: biomassa radicale

Per orzo la sovrapposizione di un orizzonte di ricoprimento di 7 cm ha consentito di sviluppare un apparato radicale paragonabile al controllo (decremento del 5%) (Fig. 100), ma di tali radici solo il 9% si sono accresciute nell'orizzonte inquinato (7-44 cm) (Fig. 101), valore ben lontano (-88%) dalla quantità di radici presenti nel medesimo orizzonte nel controllo (Fig. 102). Nel trattamento con sola pirite lo sviluppo radicale si è notevolmente ridotto (-81%) (Fig. 100), come era già stato osservato per la biomassa aerea che era il 90% inferiore al quella del controllo (Fig. 89), con uno sviluppo che ha interessato

per lo più solo la parte più superficiale del vaso (93% della biomassa radicale prodotta resta nei primi 7 cm) (Fig. 101).

Più marcata la riduzione di radici nei trattamenti inquinati per loiessa, con decrementi, rispetto al controllo del 51% e del 90% rispettivamente nel trattamento T37L7 e T100 (Fig. 100). Tale diminuzione di biomassa radicale totale, è forse dovuta ad un aumento, rispetto ad orzo, della quota di radici sviluppate nella piritite nel trattamento con orizzonte di ricoprimento (26% vs. 9% dell'orzo) (Fig. 101).

Intermedio il comportamento dell'erba medica, il cui la riduzione della biomassa radicale nel trattamento con le ceneri di piritite è stata del 38% rispetto al controllo (Fig. 100).

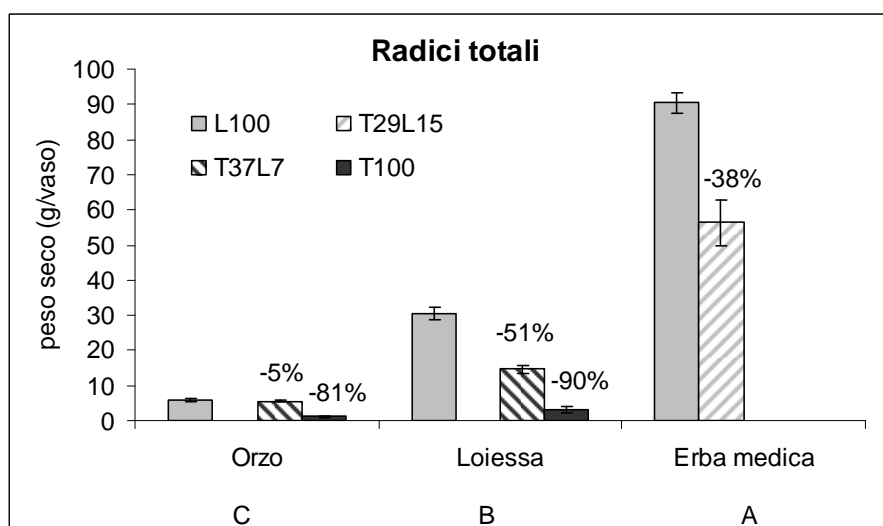


Figura 100 - Biomassa totale in peso delle radici delle 3 specie in coltivazione. Le percentuali indicano la variazione rispetto ai valori del controllo. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Sono riportate le lettere di significatività l'effetto principale specie. (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

L'erba medica è, inoltre, l'unica specie delle 3 in prova, che ha aumentato la quota di radici (91% sul totale delle radici nel vaso) presenti nell'orizzonte inquinato rispetto a quelle presenti, alla medesima profondità nel controllo (78%) (Fig. 101).

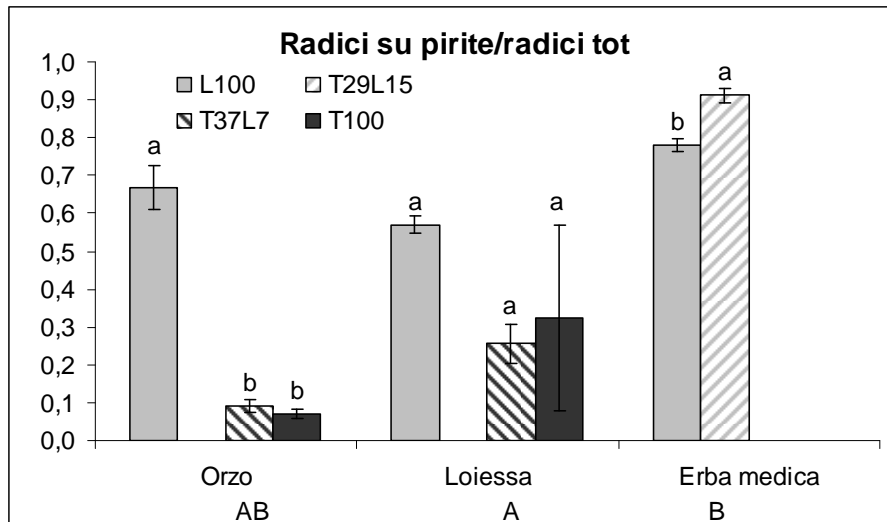


Figura 101 - Rapporto tra le radici presenti nell'orizzonte 7-44 cm (15-44cm per erba medica) e la biomassa radicale totale. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per ogni specie. Sono riportate le lettere maiuscole di significatività l'effetto principale specie. (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

In generale, per tutte le specie si osserva una diminuzione del peso dell'apparato radicale sviluppato nelle ceneri di pirite, rispetto a quello sviluppato nel controllo alle medesime profondità (Fig. 102).

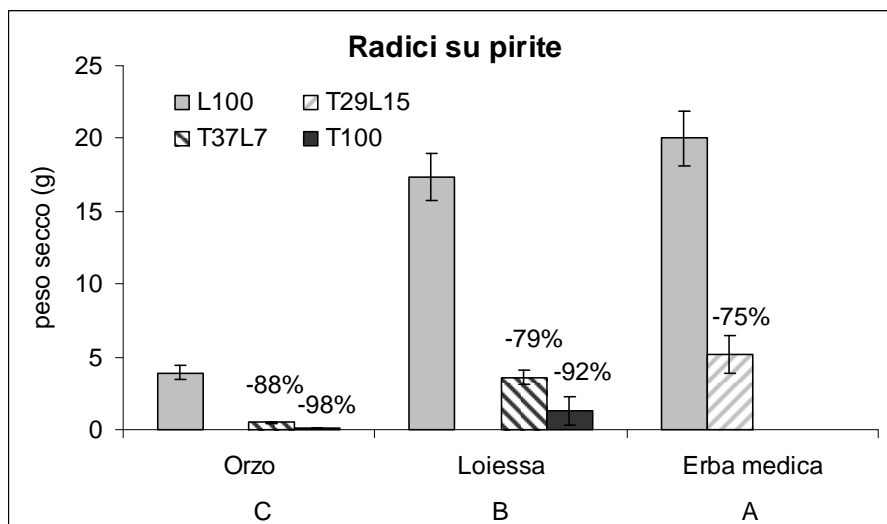


Figura 102 - Biomassa totale in peso delle radici presenti a profondità pari all'orizzonte inquinato delle 3 specie in coltivazione. Le percentuali indicano la variazione rispetto ai valori del controllo. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Sono riportate le lettere di significatività l'effetto principale specie. (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Sia nelle graminacee testate, che nella leguminosa (+76%), è stato riscontrato un aumento del rapporto root/shoot, maggiore per loiessa in T100 (+242% rispetto al controllo) e minore per la stessa specie in T37L7 (+45%); simili gli aumenti in orzo, +142% e + 104% rispettivamente in T37L7 e T100 (Fig. 103). Questo probabilmente come risposta ad uno stato di stress.

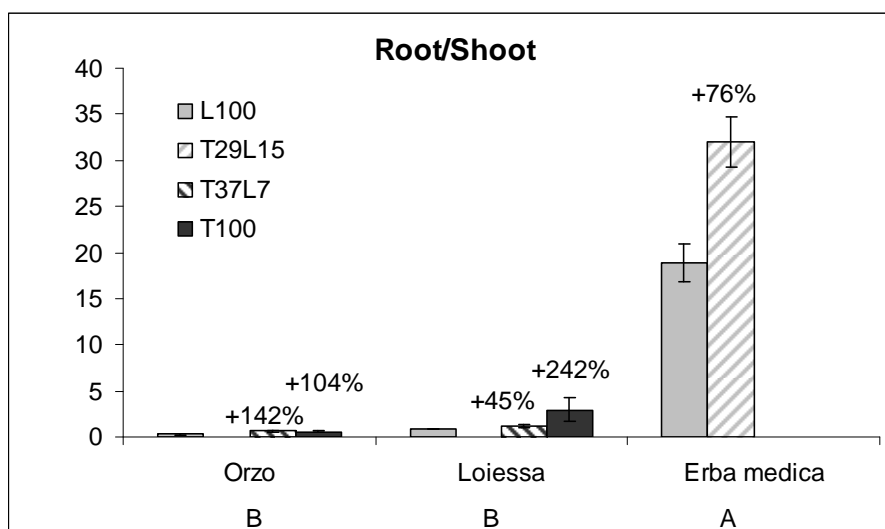


Figura 103 - Rapporto root/shoot delle 3 specie in coltivazione. Le percentuali indicano la variazione rispetto ai valori del controllo. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Sono riportate le lettere di significatività l'effetto principale specie. (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.9.2 Metodo distruttivo vs. concentrazione di metalli pesanti

Non sono risultate significative le correlazioni tra lo sviluppo degli apparati radicali (totale e quota di radici cresciute in ceneri di pirite) e le concentrazioni dei metalli pesanti nei tessuti epigei (somma standardizzata delle concentrazioni di Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn).

Molto significativa invece, la correlazione tra le radici totali e l'asportazione dei metalli pesanti sia considerando le due graminacee che per l'erba medica, con coefficienti di determinazione rispettivamente del 79% (Fig. 104) e dell'86% (Fig. 105). Percentuali che aumentano se si considera la correlazione tra le asportazioni e la biomassa di radici presenti nel solo orizzonte con ceneri di pirite (Fig. 106 e 107).

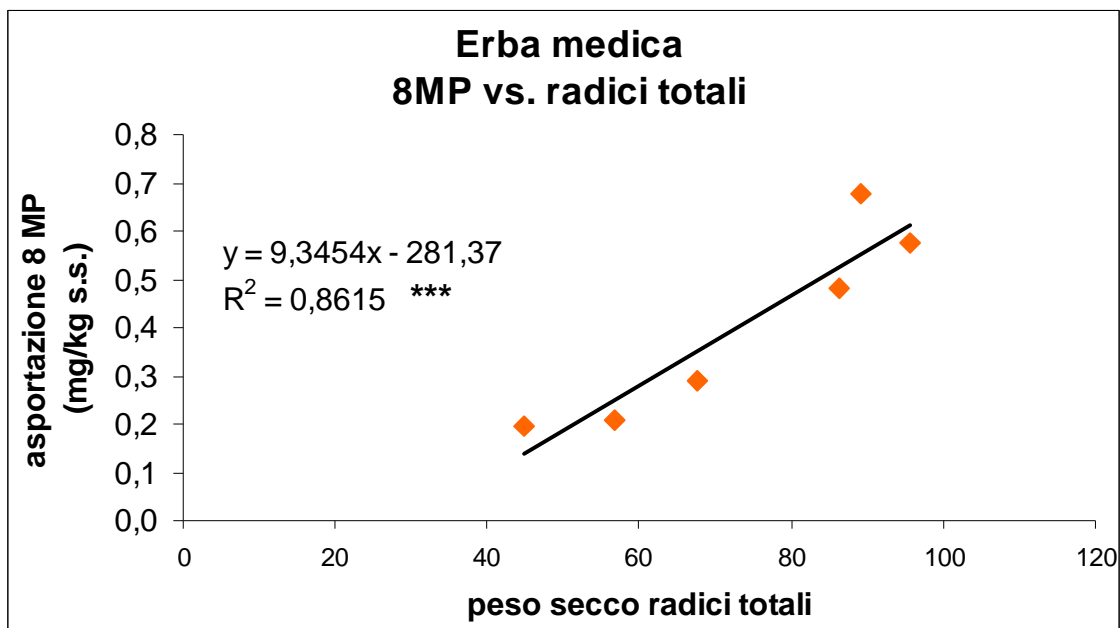


Figura 104 - Correlazione tra la somma delle asportazioni di Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn e la biomassa radicale totale (peso secco) in erba medica (raccolta del 17 ottobre 2005).

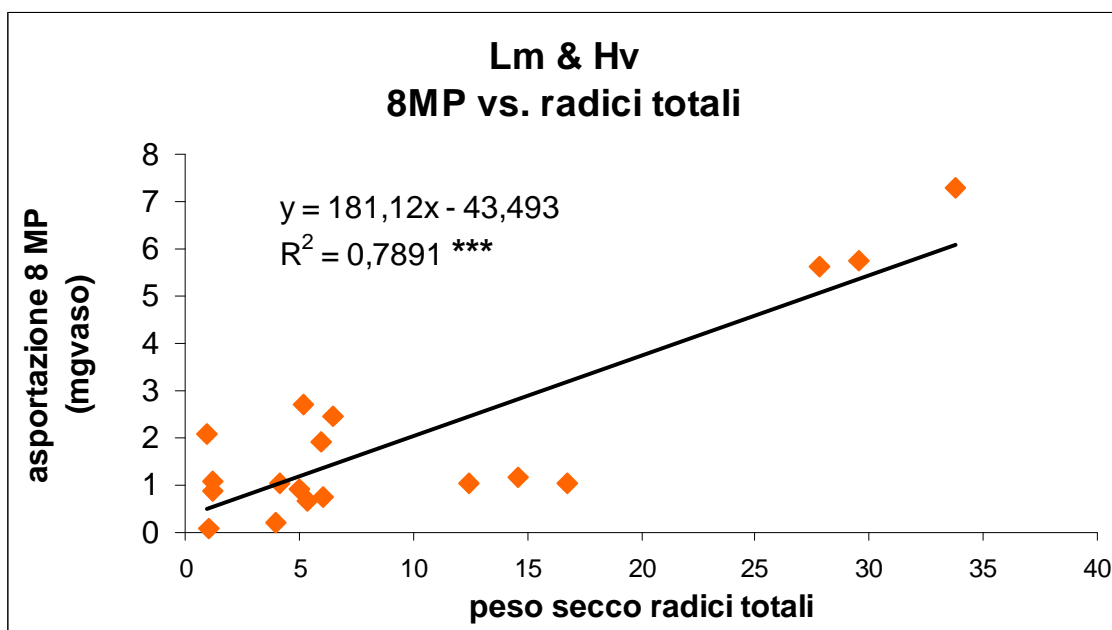


Figura 105 - Correlazione tra la somma delle asportazioni di Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn e la biomassa radicale totale (peso secco) in orzo e loiessa.

Dai grafici 106 e 107 si osserva, infatti, una significatività molto alta e coefficienti di determinazioni pari al 90%.



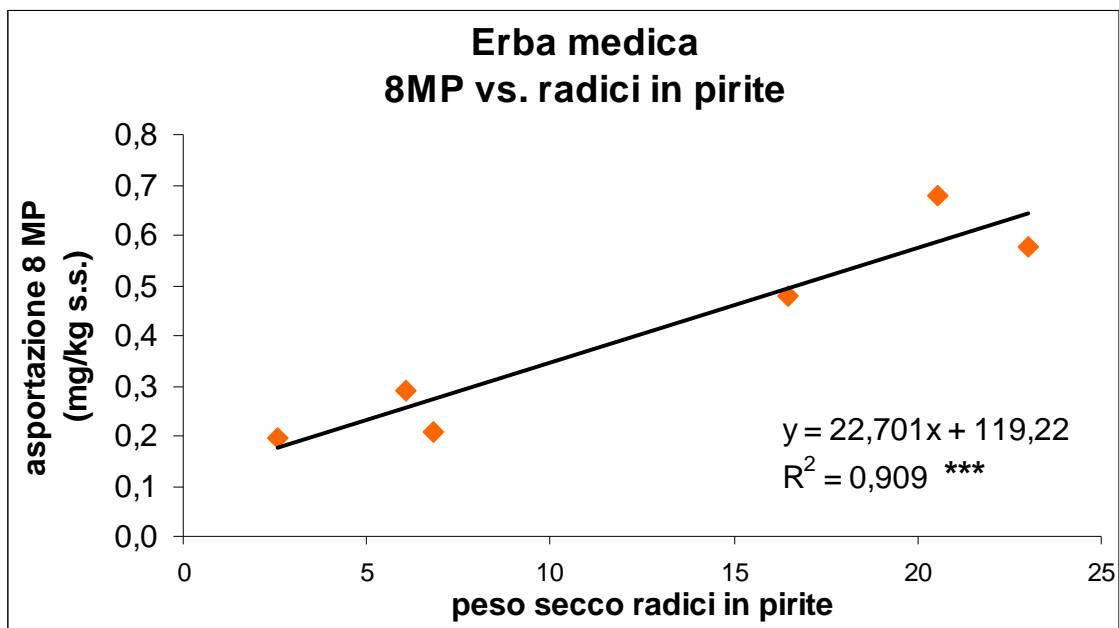


Figura 106 - Correlazione tra la somma delle asportazioni di Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn e la biomassa radicale sviluppata nell'orizzonte con sole ceneri di pirite (peso secco) in orzo e loiessa.

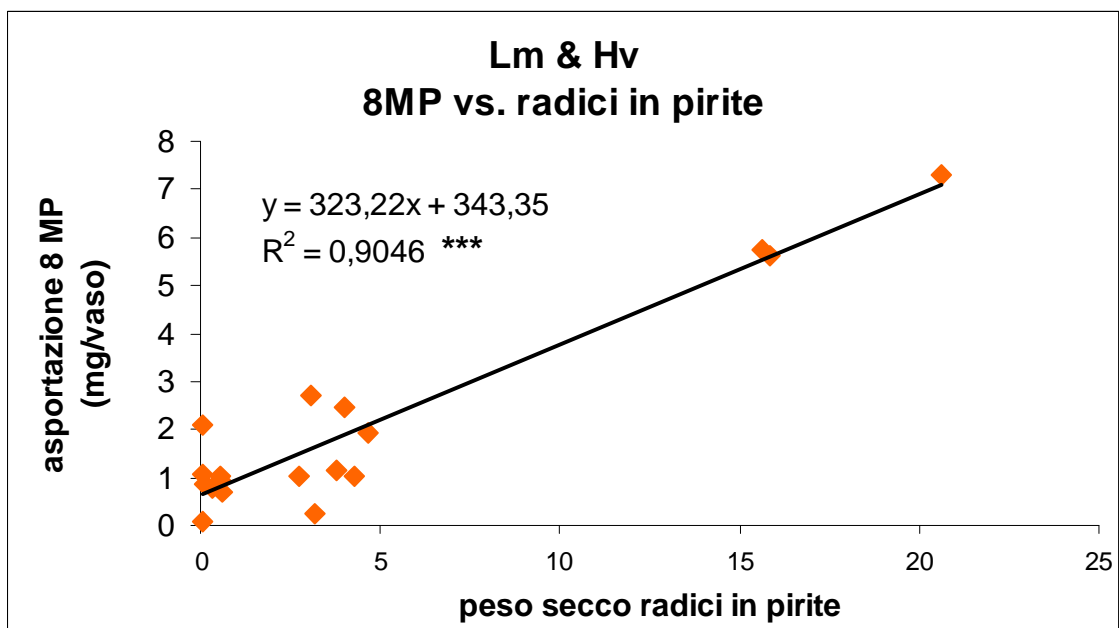


Figura 107 - Correlazione tra la somma delle asportazioni di Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn e la biomassa radicale sviluppata nell'orizzonte con sole ceneri di pirite (peso secco) in orzo e loiessa.

Diventa quindi, particolarmente interessante la possibilità di indagare e migliorare lo sviluppo radicale delle specie a fini fitoestrattivi ed in particolare la possibilità di mettere a diretto contatto le radici con il substrato inquinato.

## **REALIZZAZIONE IMPIANTO “IN SITU”**

In merito ai due diversi trattamenti realizzati a Torviscosa, la diversa presenza di ferro del terreno ripuntato (TR) rispetto a quello arato (TA) (Tab. 11), suggerisce che la ripuntatura abbia limitato il rimescolamento con la pirite inquinata dai metalli pesanti, anche se in minor misura di quanto era stato programmato, a causa del rimescolamento operato nelle fase preliminare di allestimento del sito durante la setacciatura del *top-soil* che era stata eseguita per realizzare un grossolano spietramento.

### ***4.1.10 Analisi sulla parte epigea***

A causa della grande eterogeneità del sito inquinato, le misurazioni effettuate sono state caratterizzate da una elevata variabilità, con differenze in alcuni casi solo indicative.

#### **4.1.10.1 Stato nutrizionale (SPAD)**

Le misurazioni fogliari eseguite con lo SPAD a 78 GDS (per *H. annuus* a 50 GDS) hanno fornito indicazioni utili sullo stato nutrizionale delle singole specie nei dei diversi trattamenti (interazione “trattamento X specie”) (Fig. 108).

*Helianthus annuus* e *Raphanus sativus* non hanno presentato alterazioni significative nel contenuto di clorofilla nei due trattamenti TA (Torviscosa arato) e TR (Torviscosa ripuntato), rispetto alla prova di Legnaro (L).

*Lolium multiflorum* e *Medicago sativa* hanno dimostrato invece una diminuzione del contenuto di azoto fogliare nel sito inquinato e, quindi, un

peggioramento del livello nutrizionale della pianta, ma senza osservare differenze significative tra il trattamento arato (TA) e quello ripuntato (TR).

Non sono stati invece possibili i confronti per *Hordeum vulgare* nelle diverse condizioni, dal momento che le piante coltivate su TA e TR sono state soggette a moria iniziale dovuta al ristagno superficiale e alla formazione di una crosta salina alla superficie del terreno (Fig. 108).

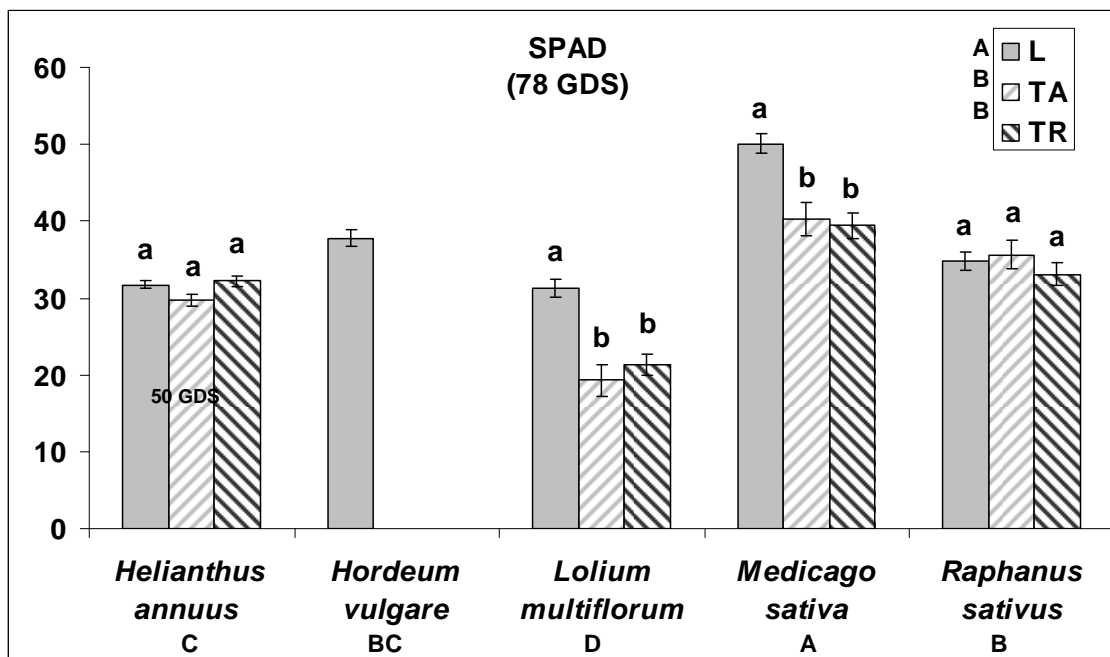


Figura 108 - Valori di SPAD delle cinque specie coltivate per i diversi trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti nell'ambito della stessa specie. Sono riportate le lettere di significatività per l'effetto principale specie e trattamento (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Mediamente (effetto principale trattamento) non si sono osservate differenze significative tra TA e TR, ma valori più bassi rispetto a Legnaro.

Considerando invece l'effetto principale specie, le colture studiate hanno dimostrato comportamenti specifici, con i valori SPAD più elevati in *M. sativa*, seguita da *R. sativus* e *H. annuus*. *L. multiflorum* ha presentato mediamente valori più bassi in conseguenza però della maggiore sofferenza nel terreno inquinato rispetto alle altre specie.

#### 4.1.10.2 Produzione di biomassa aerea

L'analisi dei dati relativi alla produzione di biomassa epigea (Fig. 109) ha fornito la reale risposta di ciascuna specie ai diversi trattamenti. La risposta generalizzata osservata per tutte le specie è stata una marcata riduzione di biomassa nel sito inquinato, rispetto al controllo, con una tendenza, non verificata statisticamente, verso un maggiore accrescimento nel terreno ripuntato rispetto a quello arato, verosimilmente per la minore concentrazione di inquinanti (ceneri e metalli). Tutte le specie, sebbene la data di raccolta non fosse coincidente tra i due siti (in generale la raccolta è stata anticipata a Legnaro), hanno presentato a Torviscosa un ritardo nello sviluppo ed un accrescimento notevolmente ridotto (Fig. 109).

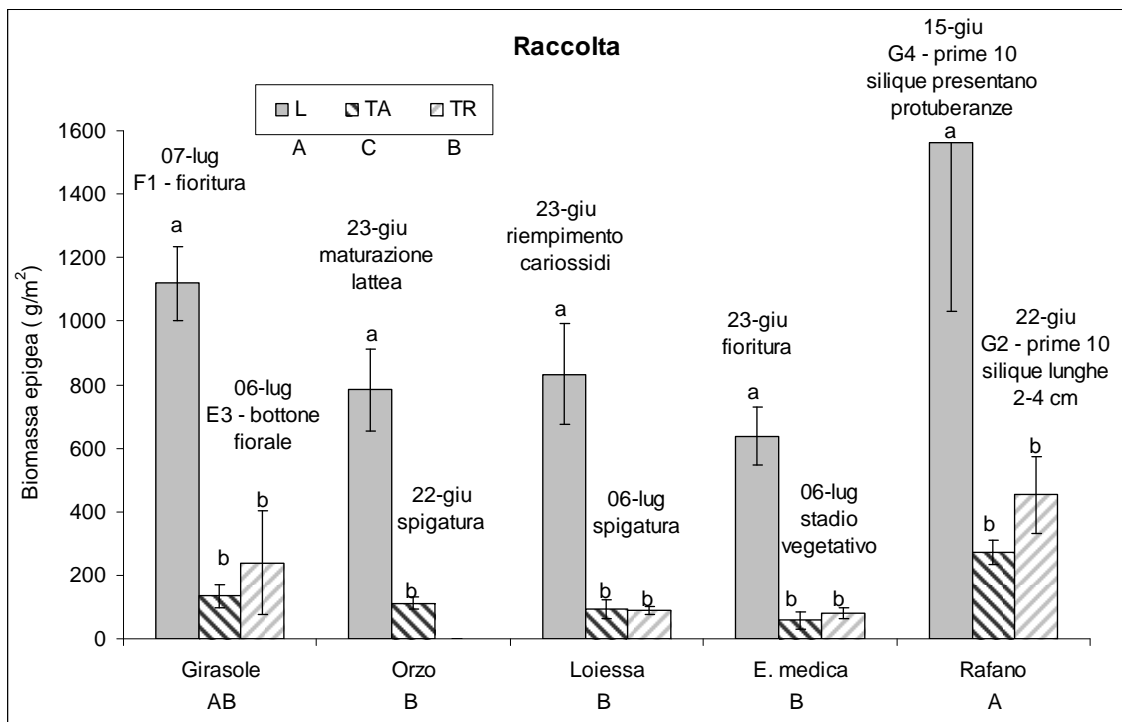


Figura 109 - Produzione di biomassa epigea. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. In etichetta è segnalato lo stadio di sviluppo al momento del campionamento. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti nell'ambito della stessa specie. Sono riportate le lettere di significatività per l'effetto principale specie e trattamento (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Il girasole è stato raccolto a Legnaro il 07 luglio 2005, quando si trovava allo stadio di fioritura (F1) con piante che erano ben sviluppate e raggiungevano

un'altezza di circa 1,2 m; a Torviscosa la raccolta è avvenuta il giorno prima, ma con piante che, pur in stadio di bottone fiorale (E3) raggiungevano a malapena i 0,3 m con una biomassa totale 6 volte inferiore a quella prodotta a Legnaro. Risultati analoghi si sono registrati per l'orzo che, raccolto a Torviscosa allo stadio di spigatura il 22 giugno, ha prodotto una biomassa 7 volte minore dell'orzo raccolto, allo stadio di maturazione lattea a Legnaro il giorno seguente.

La loiessa al momento del campionamento a Legnaro, il 23 giugno 2005, era in fase di riempimento cariossidi, mentre a Torviscosa la raccolta è stata posticipata di 2 settimane per consentire alle piante di raggiungere lo stadio di inizio spigatura. In corrispondenza di tali prelevamenti è stata campionata anche l'erba medica in piena fioritura a Legnaro, ancora allo stadio vegetativo a Torviscosa. Per entrambe le specie, non vi sono differenze statisticamente significative tra i campioni prelevati nei due trattamenti a Torviscosa che si sono in media accresciuti 8,5 e 9 volte meno che a Legnaro, loiessa ed erba medica, rispettivamente.

Infine il rafano è stato campionato il 15 giugno 2005 a Legnaro, allo stadio di riempimento delle silique, ed il 22 giugno 2005 a Torviscosa, pressoché allo stesso stadio di sviluppo e con una produzione di biomassa di solo 4 volte inferiore.

Vanno segnalate inoltre le marcate fallanze di piante a Torviscosa, in conseguenza dei ristagni idrici iniziali – fenomeno che non si è verificato a Legnaro – che hanno costretto la selezione di aree di campionamento adeguate, dotate di un investimento il più uniforme possibile.

#### **Resa in acheni in *Helianthus annuus***

Per il girasole è stata misurata anche la produzione di acheni, nonostante l'obiettivo della *phytoremediation* non sia l'ottenimento di semi o frutti, bensì la massimizzazione della biomassa e l'asportazione di metalli nel corso dell'anno, anche attraverso l'esecuzione di più cicli colturali. Si è inteso verificare i valori di indice di raccolta (*harvest index*) ed il contenuto di metalli pesanti nelle

produzioni agrarie utili in condizioni particolarmente compromesse quali erano quelle di Torviscosa.

La raccolta è avvenuta in settembre, a 161 GDS (08/09/2005) nelle parcelle di Legnaro e a 135 GDS (15/09/2005) in quelle di Torviscosa. Dalla figura 110 è facile comprendere come la resa in acheni sia risultata, rispetto a Legnaro, più che dimezzata nelle parcelle ripuntate e ancora più contenuta in quelle arate, nonostante a Torviscosa fosse stata adottata una densità di piante doppia.

Il modesto sviluppo epigeo (altezza e biomassa) del girasole a Torviscosa lascia tuttavia pensare che sia possibile aumentare ulteriormente la densità di piante, ben oltre le 18 piante/m<sup>2</sup>, riducendo potenzialmente di molto le differenze rispetto al controllo.

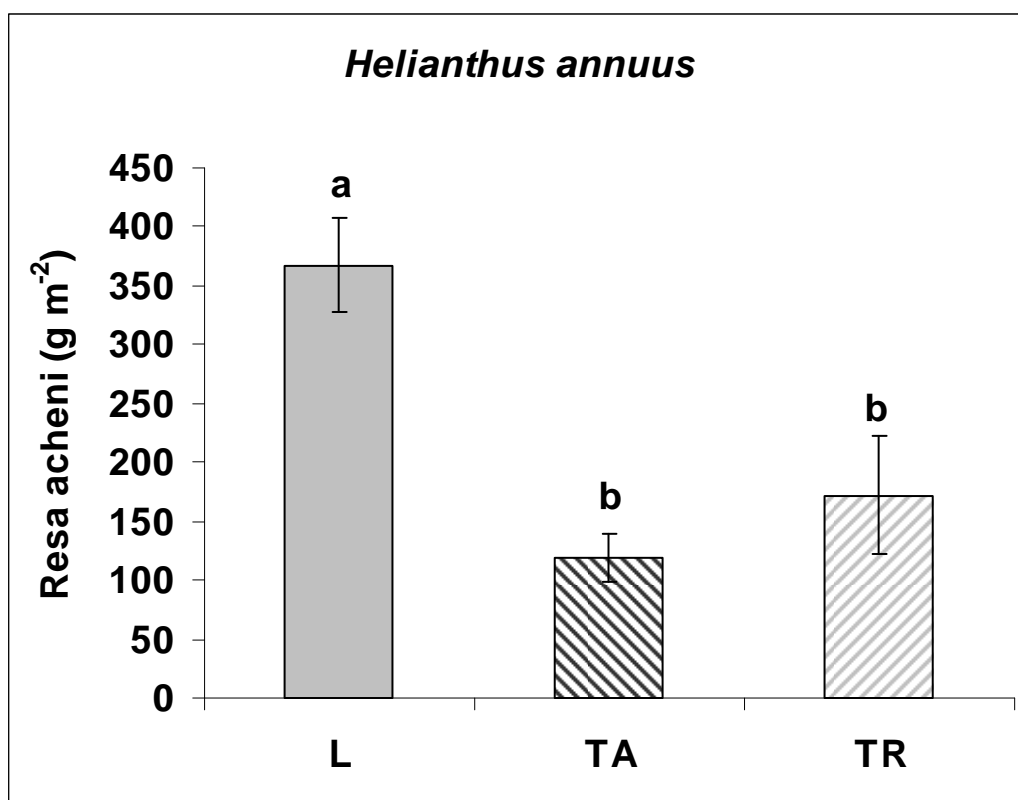


Figura 110 - Resa in acheni in *Helianthus annuus*. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti nell'ambito della stessa specie (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

L'*harvest index* è risultato del 46% per le piante coltivate su terreno arato (TA) e del 41% nel terreno ripuntato (TR), valori molti vicini a quelli medi attesi

del 50%. A Legnaro (L) l'indice di raccolta è risultato del 24% a causa dell'anticipo sulla raccolta e a causa del fatto che la biomassa degli acheni è stata ricavata da calatidi raccolte da piante diverse da quelle utilizzate a luglio per la determinazione della biomassa verde.

#### ***4.1.11 Concentrazione degli elementi assorbiti***

Dalla lettura con ICP, sono state ricavate le concentrazioni di metalli pesanti nelle porzioni epigee che, raffrontate ad ogni singolo trattamento, hanno fornito interessanti indicazioni preliminari sulle condizioni migliori per ottenere assorbimenti soddisfacenti.

Sono stati considerati gli otto metalli pesanti che più frequentemente sono responsabili dei fenomeni di inquinamento: cobalto, cromo, rame, cadmio, nichel, manganese, piombo e zinco. Degli altri elementi, sono stati analizzati i dati riguardanti arsenico, boro, calcio, potassio, sodio, magnesio, fosforo, molibdeno e vanadio. Infine, sono stati esaminati il ferro e lo zolfo, in quanto principali costituenti delle ceneri di pirite.

Per tutti gli elementi considerati è stata fatta un'analisi statistica (ANOVA con test di Newman—Keuls per la separazione delle medie,  $P \leq 0,05$ ).

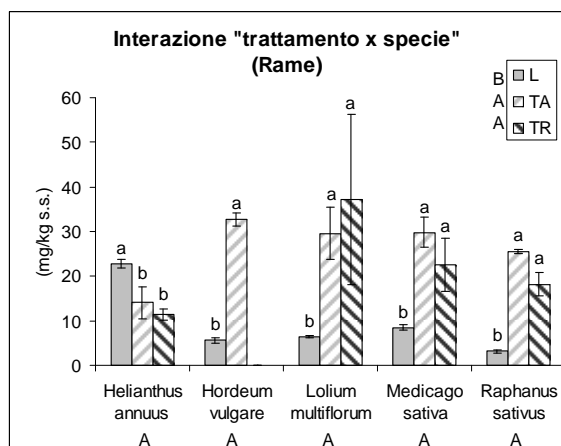
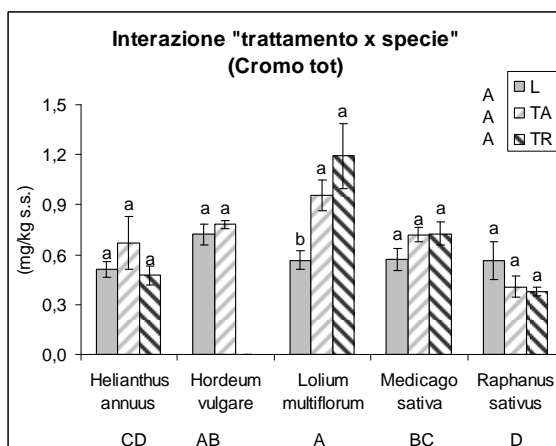
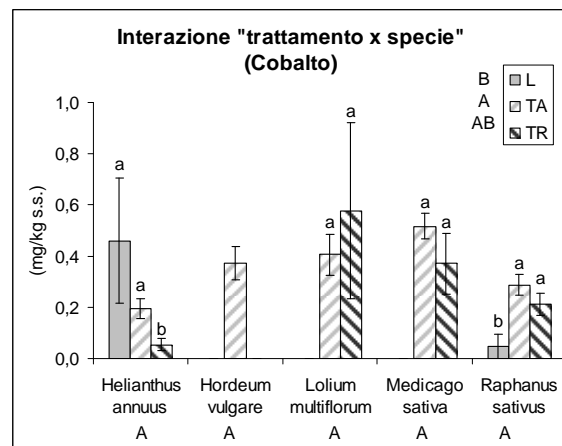
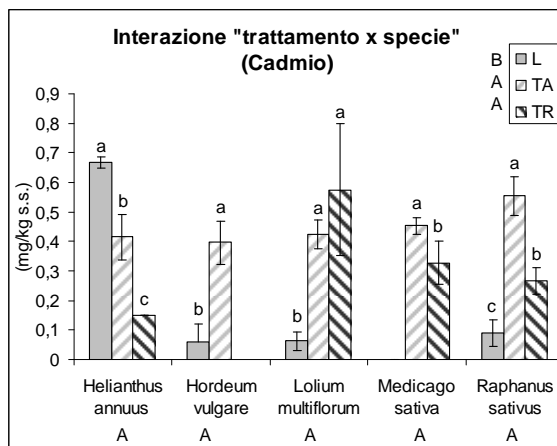
##### **4.1.11.1 Concentrazione di metalli pesanti**

Per tutti gli 8 metalli gli assorbimenti nei trattamenti a Torviscosa (TA e TR), non mostrano differenze statisticamente significative, anche se si osserva una tendenza ad un maggior assorbimento dei metalli nel trattamento TA con rimescolamento degli orizzonti, fanno eccezione cobalto e zinco (effetto principale trattamento) (Fig. 111).

Il cadmio, inoltre, è stato assorbito, per il girasole, maggiormente nel trattamento arato e in loiessa la tendenza, non significativa statisticamente, è di una concentrazione maggiore nel trattamento ripuntato. Diversificati i

comportamenti delle specie nella prova a Legnaro, che hanno assorbito, in alcuni casi concentrazioni superiori a quelle nella prova a Torviscosa tanto che per nichel e cromo non vi sono differenze statisticamente significative nell'effetto principale trattamento (Fig. 111). Si osserva inoltre, per il manganese una maggior concentrazione di questo nel trattamento L (effetto principale trattamento).

Se si osserva l'effetto principale specie non si notano gerarchie negli assorbimenti per cadmio, cobalto, rame e nichel (Fig. 111) che sono stati assorbiti in eguale misura in tutte le specie. Per gli altri 4 metalli (Cr, Mn, Pb e Zn) si osserva, in generale, un assorbimento maggiore in loiessa, intermedio per erba medica e orzo, mentre gli assorbimenti minori sono stati osservati in girasole e rafano.





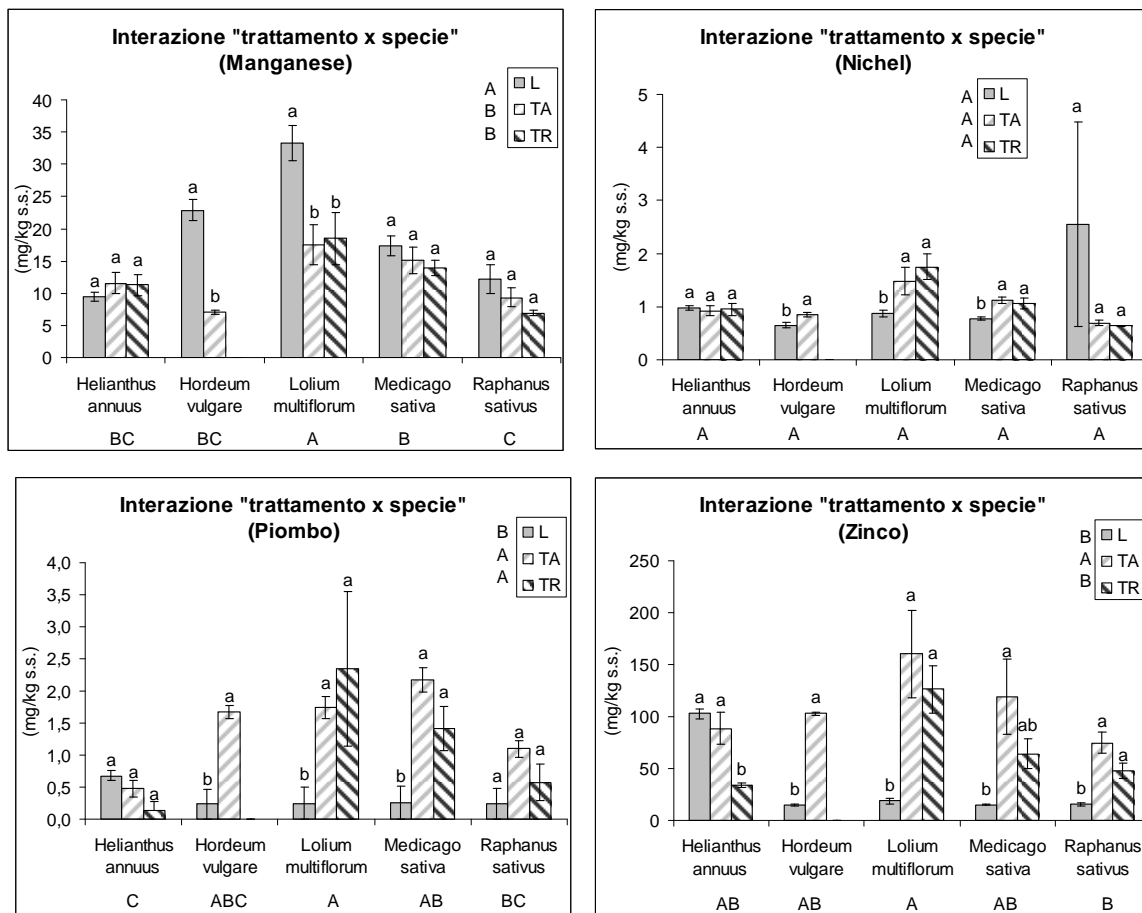


Figura 111 - Concentrazioni riscontrate per ciascuno degli 8 metalli pesanti analizzati (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb, Zn) nelle diverse specie e trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse corrispondono a differenze statisticamente significative tra le specie o tra i trattamenti (effetti principali) (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Se si comparano questi risultati con la produzione di biomassa (Fig. 109) si può osservare che a valori di concentrazione di metalli più elevati ( $TA > TR$ ) siano corrisposte produzioni di biomassa inferiori ( $TA < TR$ ), indicando che i due parametri sono, come era lecito attendersi, negativamente correlati tra di loro. In TA, la maggiore presenza di ceneri di pirite e di metalli pesanti ha garantito una maggiore disponibilità di tali inquinanti e un assorbimento superiore.

Per quanto riguarda il Cr, l'elevata quantità che si riscontra anche nei campioni del controllo (che pure non supera la concentrazione di quelli di

Torviscosa) è imputabile all'elevata presenza di questo elemento nel terreno di Legnaro.

I metalli maggiormente presenti nei tessuti vegetali sono stati Zn (ordine di alcune centinaia di ppm), Mn e Cu (ordine di grandezza di alcune decine di ppm), Ni e Pb (ordine di alcune unità ppm), mentre per Co, Cr, Cd i valori sono risultati molto bassi (frazioni di ppm).

#### Concentrazione di metalli pesanti in *Helianthus annuus*

In girasole, non si osservano differenze significative nella concentrazione di metalli negli acheni e nella parte verde (foglie, fusti e corolla) (media dei 2 trattamenti a Torviscosa).

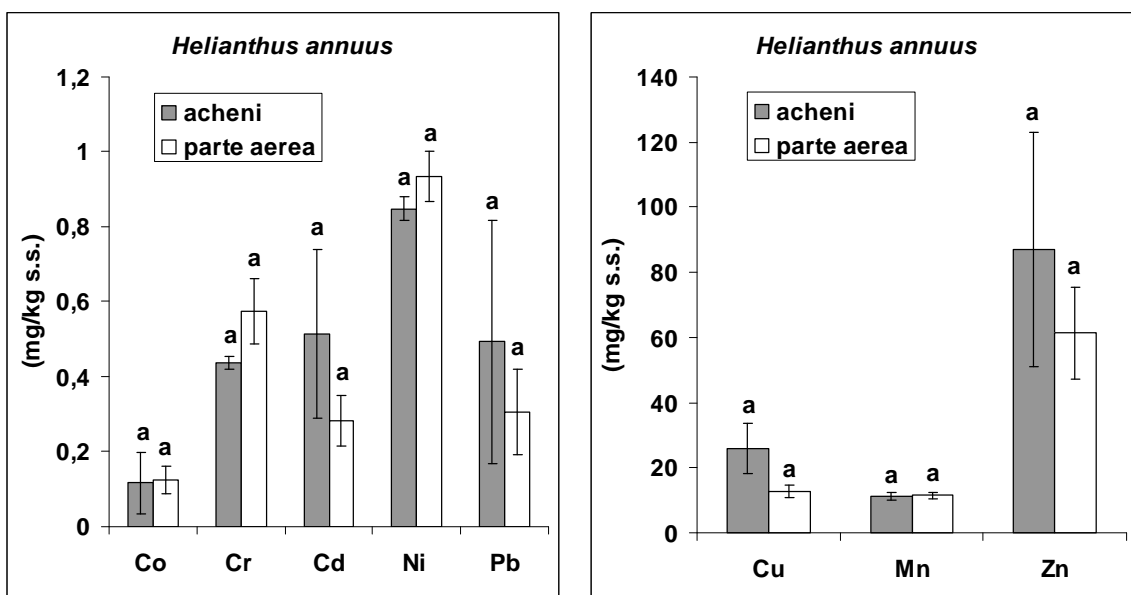


Figura 112 - *H. annuus*: concentrazione di metalli pesanti (Co, Cr, Cd, Ni, Pb, Cu, Mn, Zn) negli acheni e nella biomassa aerea (acheni esclusi), media dei trattamenti a Torviscosa. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per ogni metallo, a lettere uguali corrispondono differenze statisticamente non rilevanti (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.11.2 Concentrazione di altri elementi analizzati

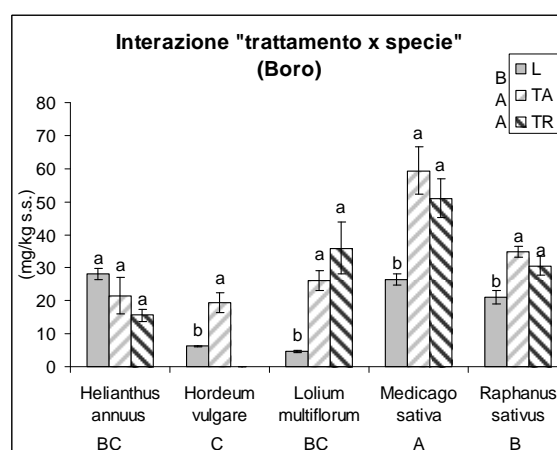
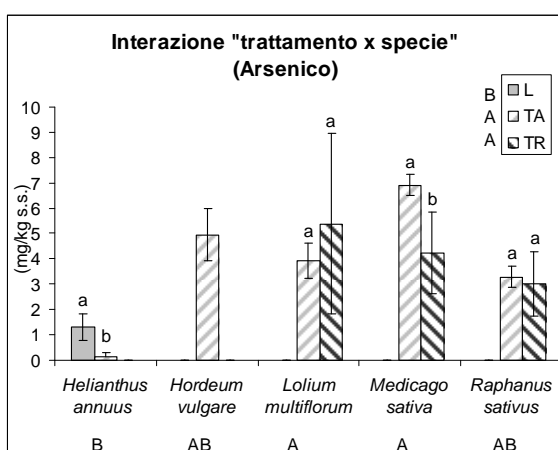
Per completezza di analisi, nella prova *in situ*, sono state analizzate anche le concentrazioni di altri elementi presenti a Torviscosa e rilevati nelle biomasse aeree.

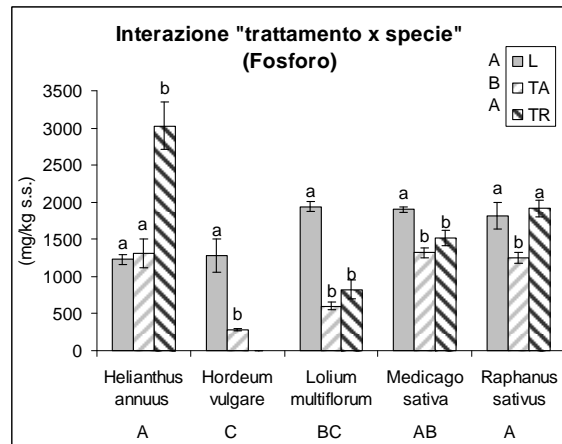
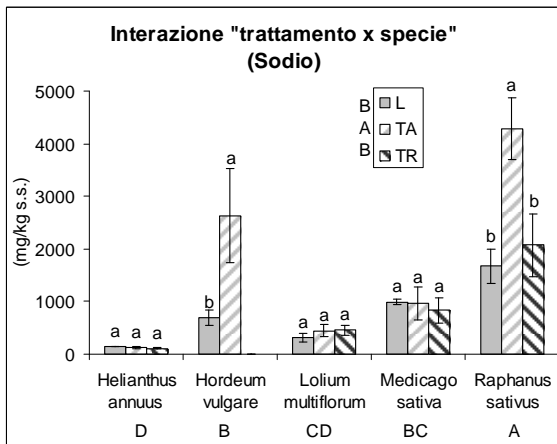
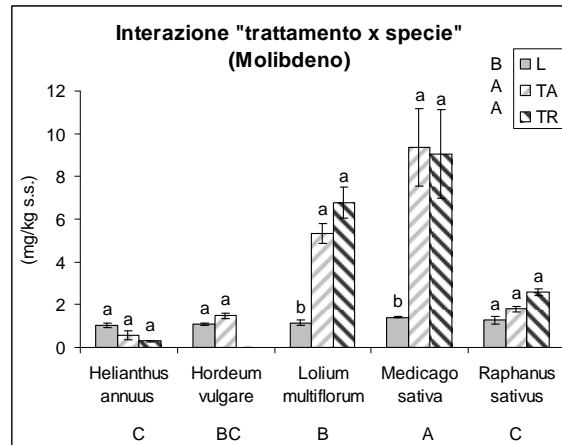
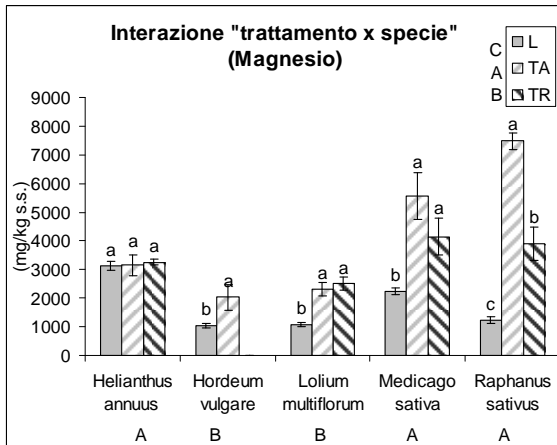
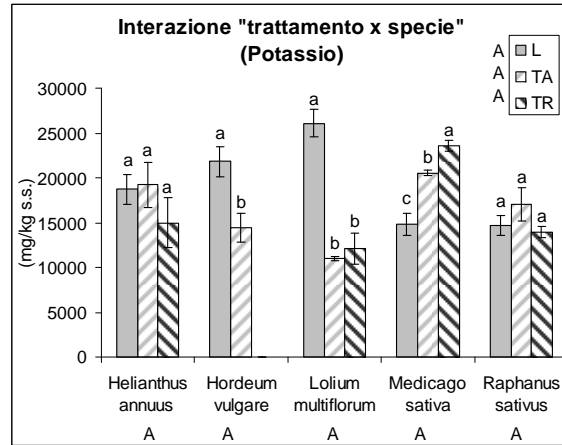
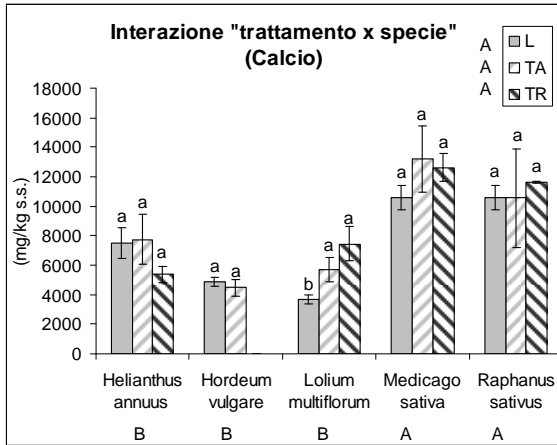
Per quanto concerne Ca, K, Mg e P, l'alta concentrazione del controllo sembra correlata all'elevata presenza di questi elementi nel terreno di Legnaro.

In ogni caso si è riscontrata quasi sempre una concentrazione maggiore nei campioni raccolti a Torviscosa, rispetto a quelli provenienti da Legnaro, con valori più elevati nel terreno arato (TA).

Fatta eccezione per P, Na e V l'erba medica ha concentrato maggiormente delle altre specie (effetto principale specie) (Fig. 113), confermando gli elevati assorbimenti già verificati nelle prove precedenti.

Per quanto concerne l'arsenico, questo non viene assorbito dal girasole, mentre sono confrontabili gli assorbimenti per questo metallo nelle altre specie (Fig. 113); per il molibdeno si presentano come buone estrattrici la loiessa e l'erba medica. Per il boro, fatta eccezione per il girasole, le specie lo hanno assorbito maggiormente nei trattamenti a Torviscosa. Il calcio è stato assorbito di preferenza da erba medica e rafano, senza differenze statisticamente significative tra i trattamenti, mentre il Mo è stato assorbito di preferenza dall'erba medica e loiessa. Nel caso di terreni ricchi in sodio, sembra che le specie che lo concentrano maggiormente siano rafano e orzo, in caso di inquinamento da vanadio sembra utile invece, la loiessa (Fig. 113).





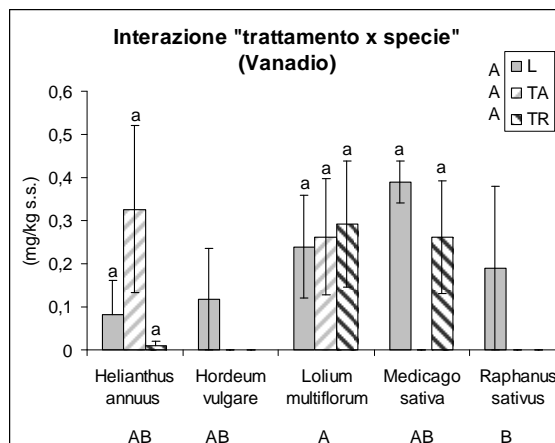


Figura 113 - Concentrazioni riscontrate per As, B, Ca, K, Mg, Mo, Na, P, e V nelle diverse specie e trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse corrispondono a differenze statisticamente significative tra le specie o tra i trattamenti (effetti principali) (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.11.3 Concentrazione di ferro e zolfo

Considerando le concentrazioni di Fe e S (Fig. 114), si ha la conferma di come l'elevata presenza nel substrato di Torviscosa abbia influenzato, innalzando di molto, la concentrazione di questi elementi nei tessuti vegetali, con una tendenza ad un maggiore accumulo in TA rispetto a TR.

Per quanto riguarda l'effetto principale "specie", *L. multiflorum* e *H. annuus* hanno assorbito, rispettivamente, le maggiori e le minori concentrazioni di ferro, mentre le altre specie hanno mostrato concentrazioni intermedie di questo elemento. Per lo zolfo la specie più efficiente in termini di fitoestrazione è il rafano che concentra molto di più nei trattamenti di Torviscosa rispetto al controllo e fra questi, TA ha dato risultati migliori. Seguono *M. sativa*, *L. multiflorum* e *H. vulgare* con concentrazioni non statisticamente differenti e, da ultimo, *H. annuus*.

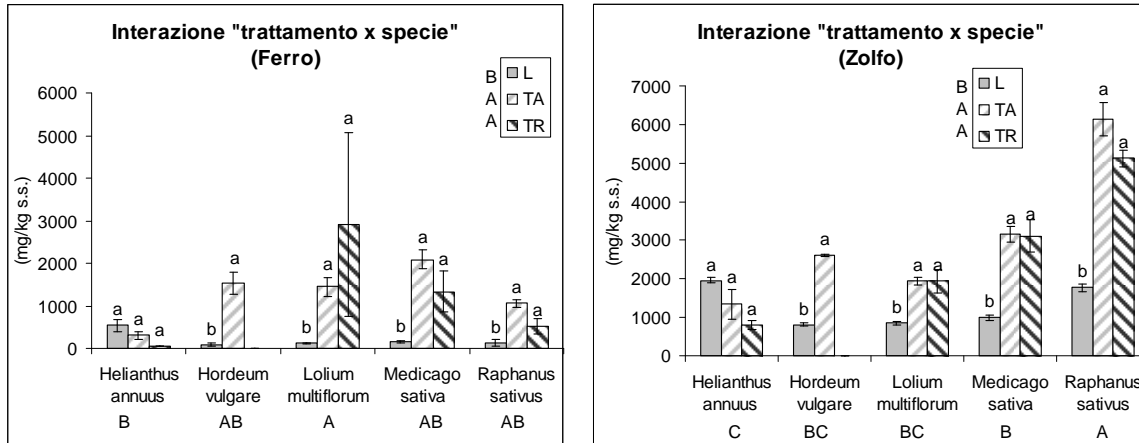


Figura 114 - Concentrazioni riscontrate per Fe e S nelle diverse specie e trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse corrispondono a differenze statisticamente significative tra le specie o tra i trattamenti (effetti principali) (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.11.4 Concentrazioni standardizzate dei metalli pesanti

Di seguito è stata analizzata la somma delle concentrazioni standardizzate degli otto metalli pesanti Co, Cr, Cd, Ni, Pb, Cu, Mn, e Zn (Fig. 115). È facilmente osservabile che i trattamenti su substrato con ceneri di pirite hanno favorito la maggiore concentrazione di metalli pesanti (tranne che in *H. annuus*).

In *H. annuus* TA e TR hanno mostrato valori simili tra loro, anche se minori rispetto a L. L'alta concentrazione di metalli riscontrata nel controllo è probabilmente imputabile all'elevato contenuto in Zn e Cu del terreno di Legnaro. *H. vulgare* ha concentrato i metalli in proporzione maggiore in TA rispetto al controllo. *L. multiflorum* e *M. sativa* hanno assorbito una minore quantità nel controllo rispetto ai trattamenti di Torviscosa, risultati fra loro statisticamente simili. Infine, in *R. sativus* si è riscontrata una concentrazione crescente passando da TA a TR e valori molto bassi in L.

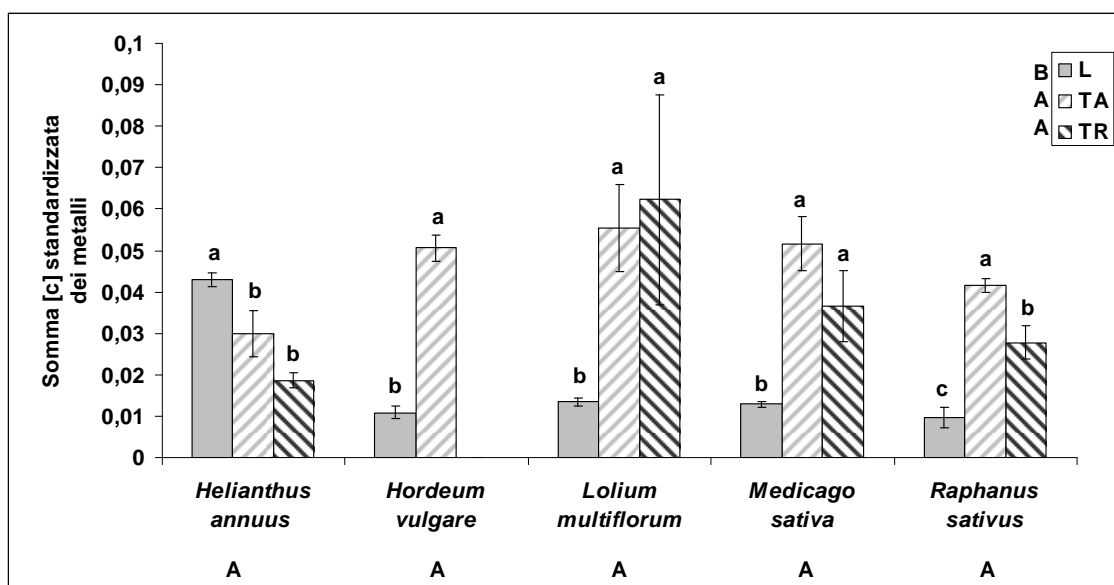


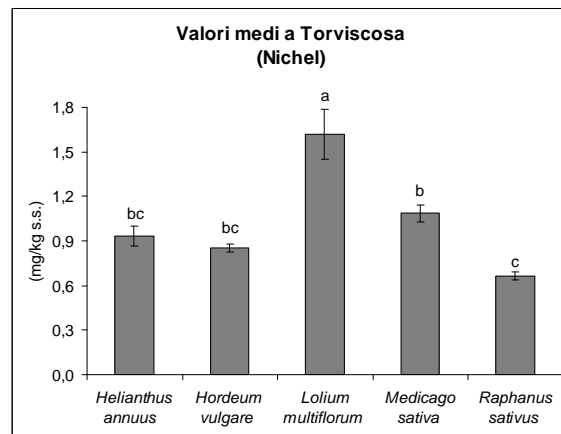
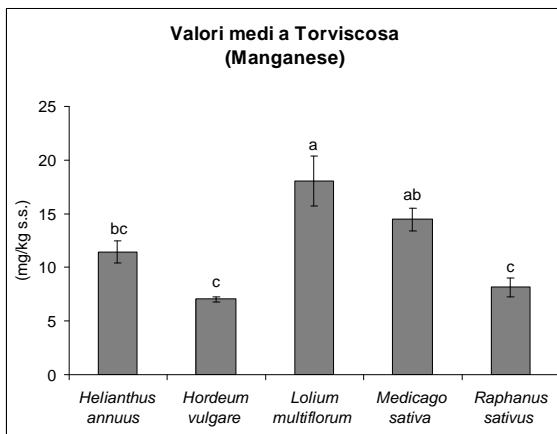
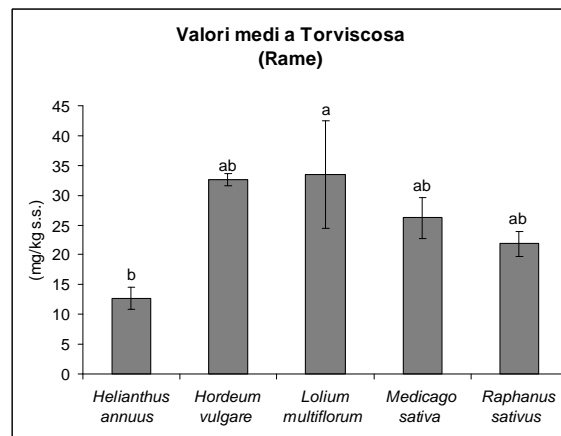
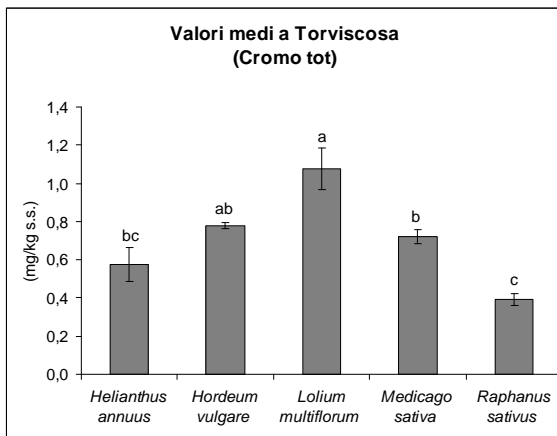
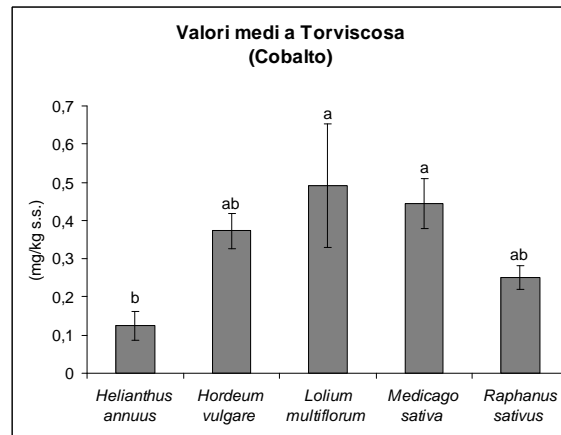
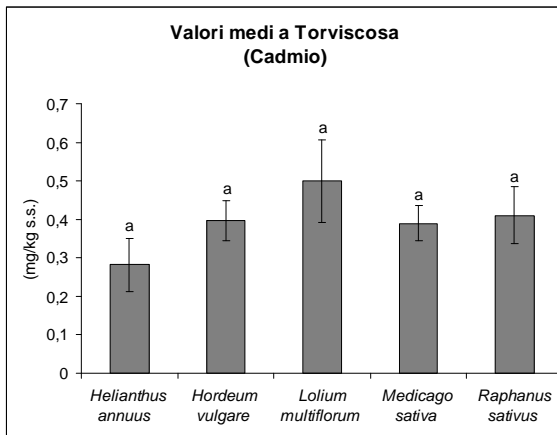
Figura 115 - Somma delle concentrazioni standardizzate di 8 metalli pesanti (Co, Cr, Cd, Ni, Pb, Cu, Mn, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra trattamenti per la stessa specie (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.11.5 Valori medi a Torviscosa

Si è analizzato anche l'effetto principale specie nei soli trattamenti di Torviscosa, ossia è stata considerata la media delle concentrazioni ottenute nelle cinque specie testate, indipendentemente dal trattamento (TA o TR). I dati ottenuti hanno mostrato un andamento contrario tra la produzione di biomassa e la concentrazione degli elementi nei tessuti aerei.

Per gli 8 metalli pesanti (Cd, Co, Cr tot, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn) (Fig. 116) si osservano i maggiori assorbimenti in loiessa. Anche *H. vulgare* e *M. sativa* hanno mostrato una buona capacità di accumulo, la prima per Co, Cr, Cu, Pb e Zn, la seconda per Co, Pb e Cu. In realtà, però, queste tre specie hanno dimostrato forti problemi di adattabilità e di sviluppo per l'elevata fitotossicità, che in questo contesto ne limiterebbero fortemente l'utilizzazione. Inoltre lo scarso sviluppo epigeo condurrebbe a significative problematiche di gestione agronomica, aspetto fondamentale nella *phytoremediation*.

Assorbimenti minori in girasole, ad eccezione del nichel e del manganese assorbiti in minor quantità dal rafano.





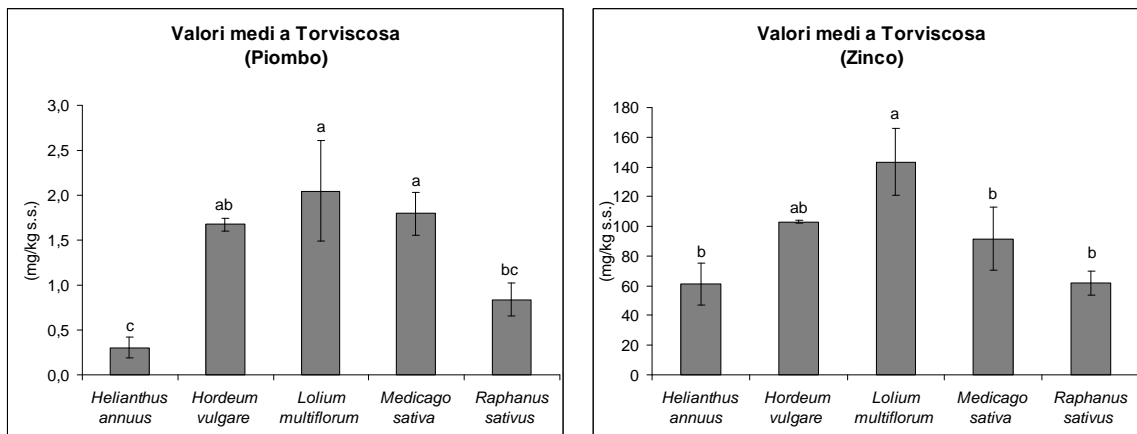
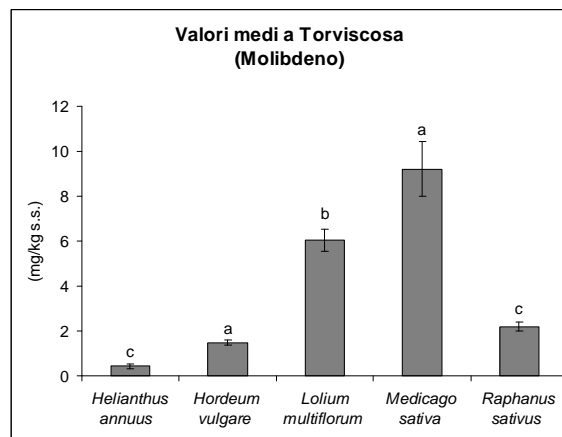
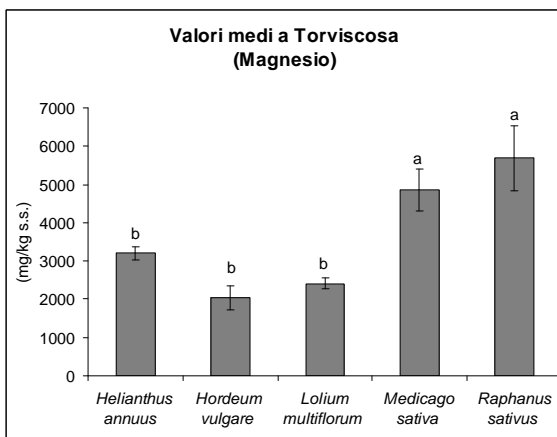
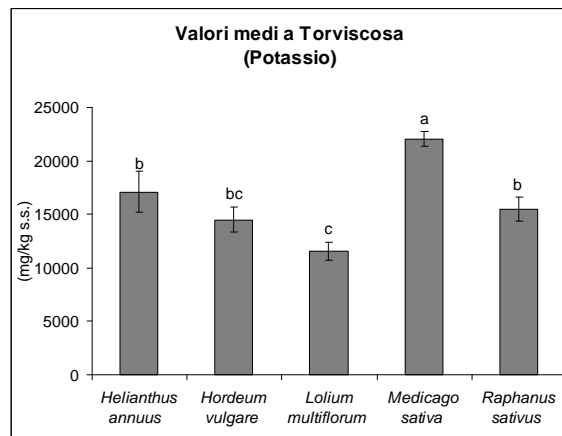
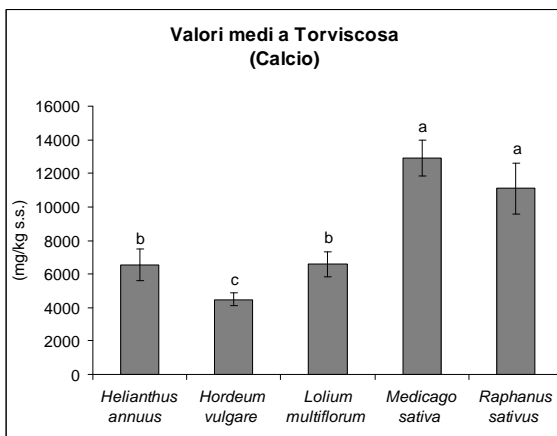
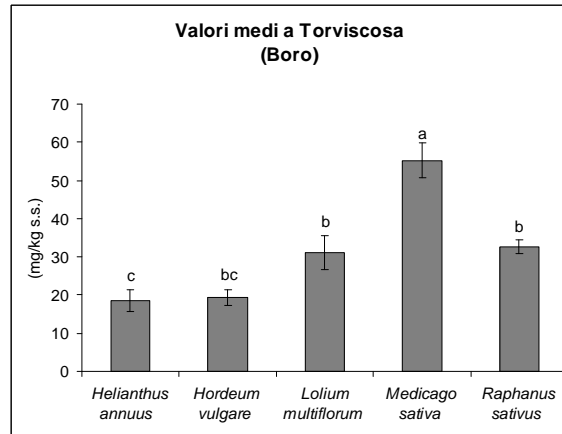
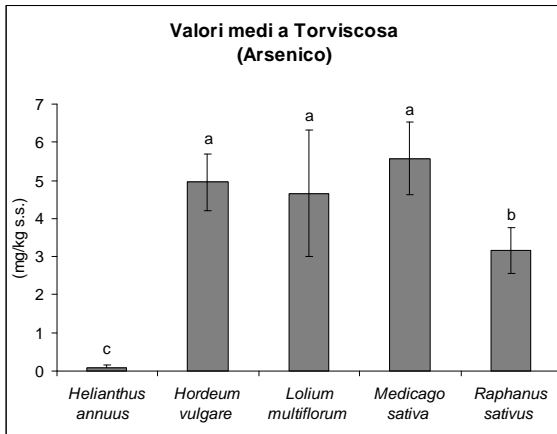


Figura 116 - Valori medi delle concentrazioni di 8 metalli pesanti analizzati (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb, Zn), ottenute nei due trattamenti di Torviscosa (TA e TR), per le 5 specie in esame. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le specie (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per gli altri elementi considerati (Fig. 117) *M. sativa* si è dimostrata la specie maggiormente capace di concentrare B, Ca, K, Mg e, a livelli abbastanza elevati, anche Mo. *R. sativus* è risultata la specie migliore nel concentrare Ca, Mg, Na e, con buoni risultati, anche fosforo. *H. vulgare* ha mostrato buoni livelli di concentrazione per Na e As. *L. multiflorum* ha concentrato abbastanza bene As e *H. annuus* è stata la specie che ha dato i risultati migliori nell'assorbimento di P. Per quanto riguarda il vanadio, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra *H. annuus*, *L. multiflorum* e *M. sativa*, le uniche tre specie ad aver assorbito questo elemento (Fig. 117).



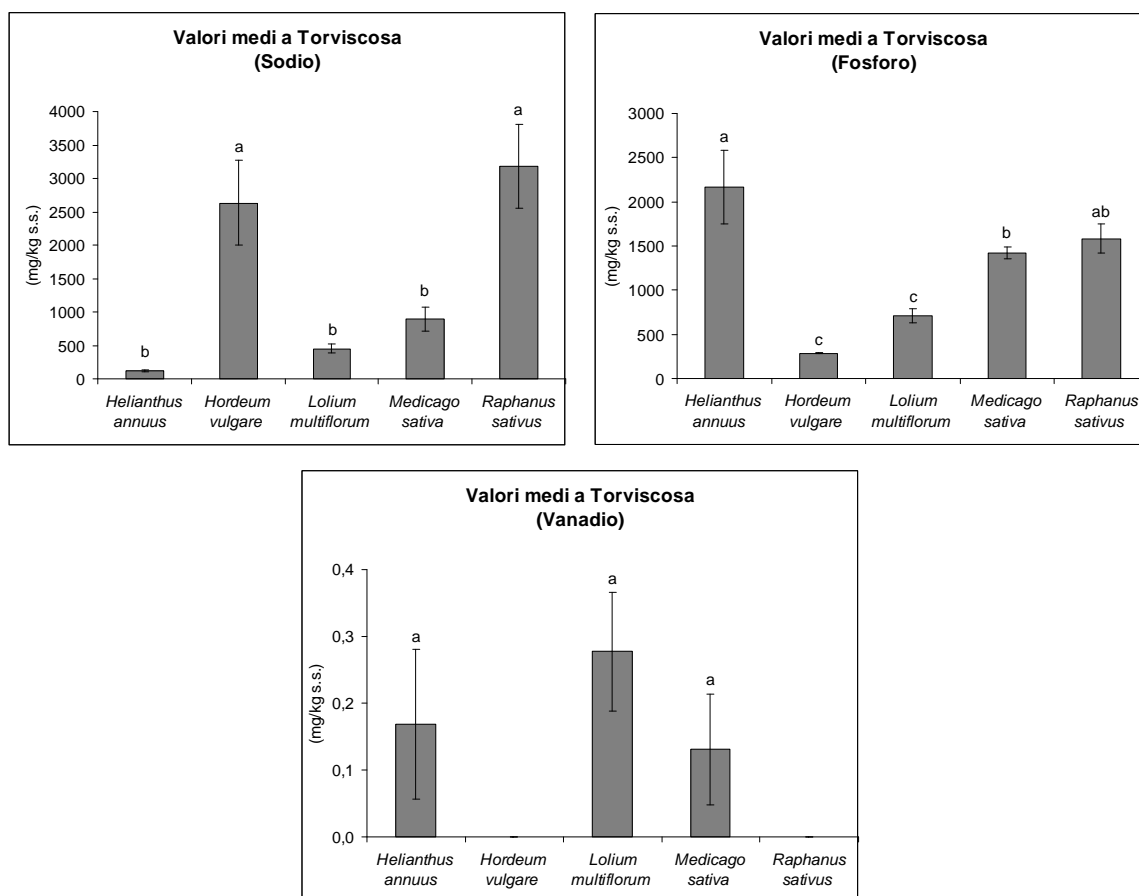


Figura 117 - Valori medi delle concentrazioni di 8 metalli pesanti analizzati (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb, Zn), ottenute nei due trattamenti di Torviscosa (TA e TR), per le 5 specie in esame. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le specie (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per quanto riguarda le concentrazioni di Fe e S nelle cinque specie considerate (Fig. 118), il Fe è stato trovato maggiormente concentrato in *L. multiflorum*, anche se l'errore standard è risultato molto elevato; *H. vulgare*, *M. sativa* e *R. sativus* hanno comunque mostrato assorbimenti abbastanza elevati tra 1000 e 2000 ppm; la concentrazione maggiore di S si è riscontrata indiscutibilmente in *R. sativus*, in relazione alle elevate capacità di accumulo generale delle *Brassicaceae*; anche *M. sativa* ha mostrato valori di concentrazione abbastanza buoni.

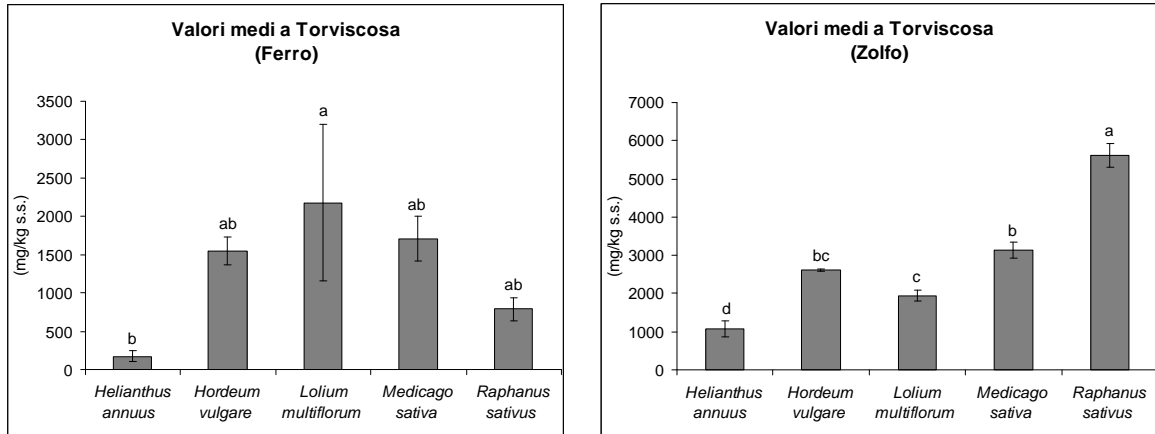
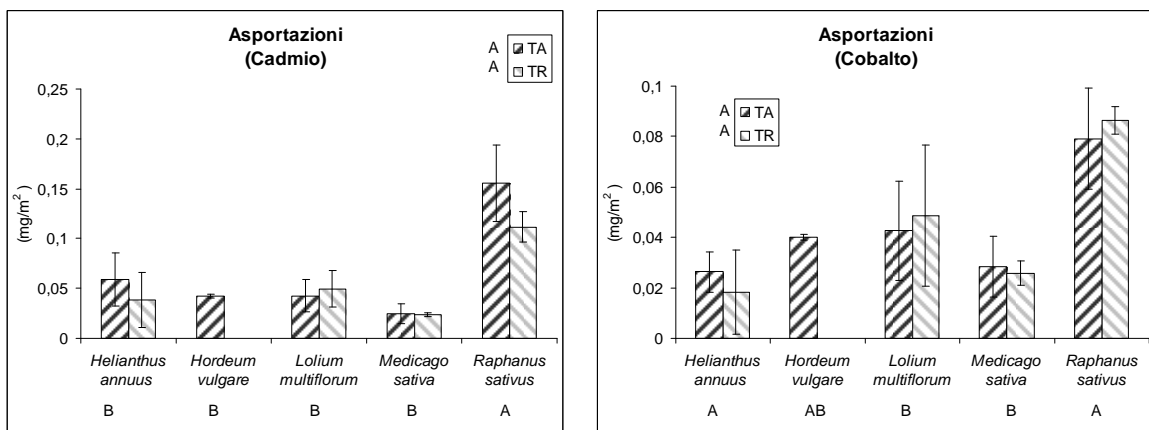


Figura 118 - Valori medi delle concentrazioni di Fe e S ottenute nei due trattamenti di Torviscosa (TA e TR), per le 5 specie in esame. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le specie (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.12 Asportazioni

##### 4.1.12.1 Asportazione di metalli pesanti

Valutando le asportazioni di metalli pesanti (Fig. 119), non si è osservata significatività per l'effetto principale trattamento per nessuno degli otto metalli analizzati.



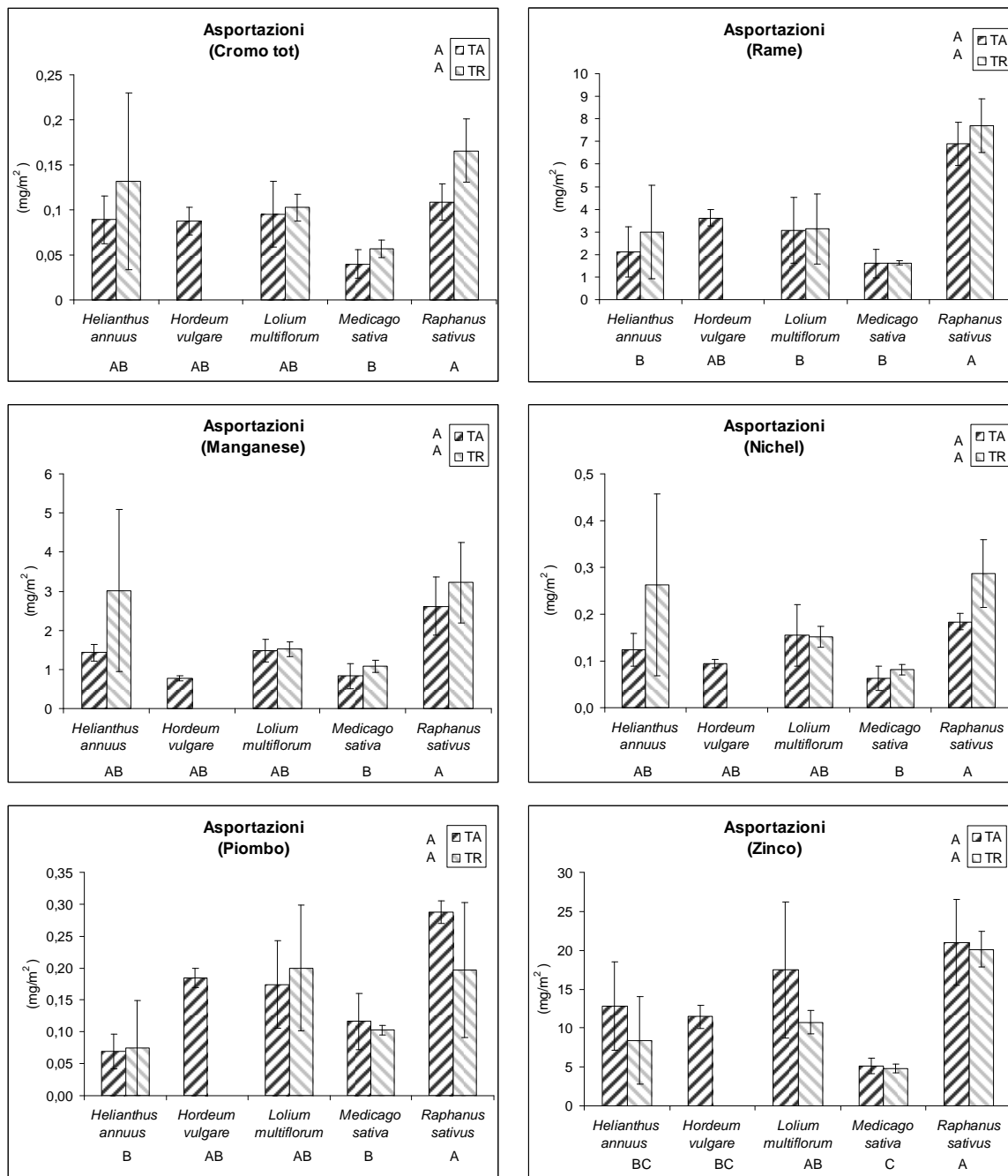


Figura 119 - Asportazioni (g/m<sup>2</sup>) di ciascuno degli 8 metalli pesanti analizzati (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra gli effetti principali (Test Newman—Keuls, P≤0,05).

*R. sativus* si è rivelata la specie che consente asportazioni maggiori per quanto riguarda gli otto metalli pesanti in esame, in ragione della buona biomassa e la relativamente buona capacità di accumulo. Anche *L. multiflorum* ha mostrato buoni assorbimenti per Cr, Mn, Ni, Pb e V.

*H. vulgare* nel trattamento TA, non ha avuto un comportamento diverso dalle altre due specie sensibili (*L. multiflorum* e *M. sativa*).

#### 4.1.12.2 Asportazioni totali

Per poter valutare quale specie sia la più efficiente nell'ottica di un processo fitoestrattivo, in un substrato inquinato da più metalli pesanti, le asportazioni degli 8 metalli sono state tra loro sommate (Fig. 120).

Osservando il grafico in figura 120, si deduce che, tra le due specie che hanno prodotto una biomassa maggiore, *R. sativus* e *H. annuus*, la prima ha asportato una quantità maggiore di metalli (35 mg/m<sup>2</sup> il rafano e 15 mg/m<sup>2</sup> il girasole) e, fra tutte le specie testate, è anche quella che ha mostrato i migliori risultati. Al secondo posto si è classificata *L. multiflorum* (20 mg/m<sup>2</sup>), specie che però risulta di difficile gestione agronomica per la biomassa relativamente modesta.

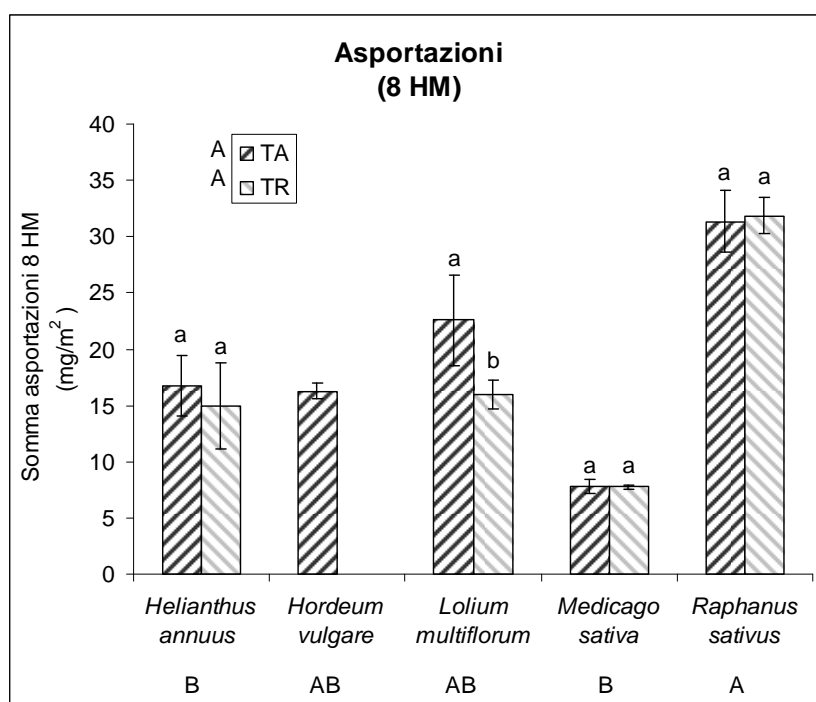


Figura 120 - Asportazioni complessiva di 8 metalli pesanti analizzati (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse corrispondono a differenze statisticamente significative tra le specie. Lettere maiuscole diverse corrispondono a differenze statisticamente significative per gli effetti principali (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.12.3 Asportazioni di ferro e zolfo

*R. sativus* e *L. multiflorum* sono risultate le specie che maggiormente hanno asportato il ferro (circa 250 mg/m<sup>2</sup>), seguite da *M. sativa* e *H. vulgare*, che hanno dato risultati intermedi tra queste e *H. annuus*. Per quanto riguarda lo zolfo il rafano risulta la specie più efficace in un'ottica di asportazioni con 2000 mg/m<sup>2</sup> rispetto i 250 mg/m<sup>2</sup> circa delle altre specie (Fig. 121).

Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra TA e TR.

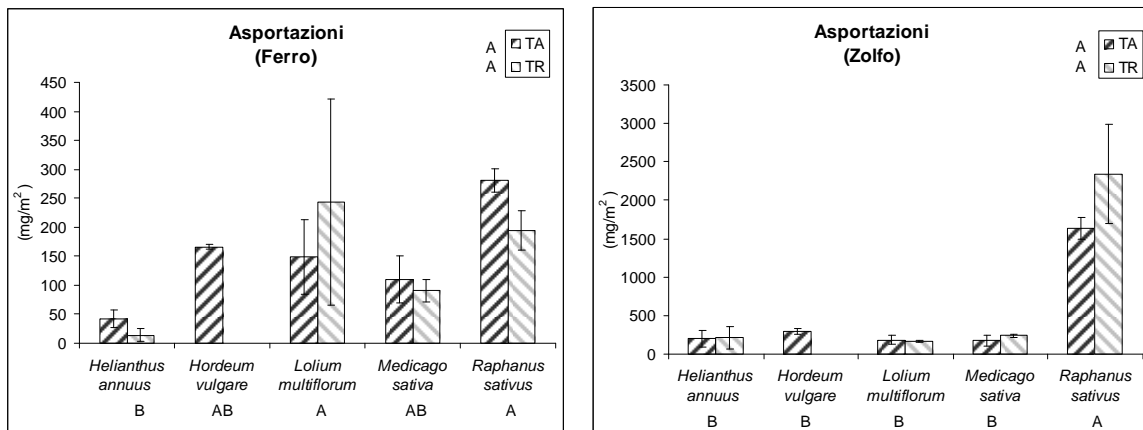


Figura 121 - Asportazioni riscontrate per Fe e S nelle specie in prova. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse corrispondono a differenze statisticamente significative tra le specie o i trattamenti (Test Newman—Keuls, P≤0,05).

#### 4.1.12.4 Asportazioni di metalli pesanti in *Helianthus annuus*

Confrontando le asportazioni, per ciascun metallo, dovute all'accumulo negli acheni e nella parte aerea (Fig. 122), non sono risultate differenze statisticamente significative. In effetti, essendo l'*Harvest index* prossimo al 50% sia in TA che in TR, era facile attendersi questo risultato, anche se c'è la tendenza, non supportata da analisi statistiche, a concentrare maggiormente nella biomassa verde. La forte variabilità è dovuta alle condizioni di sperimentazione non ottimali.

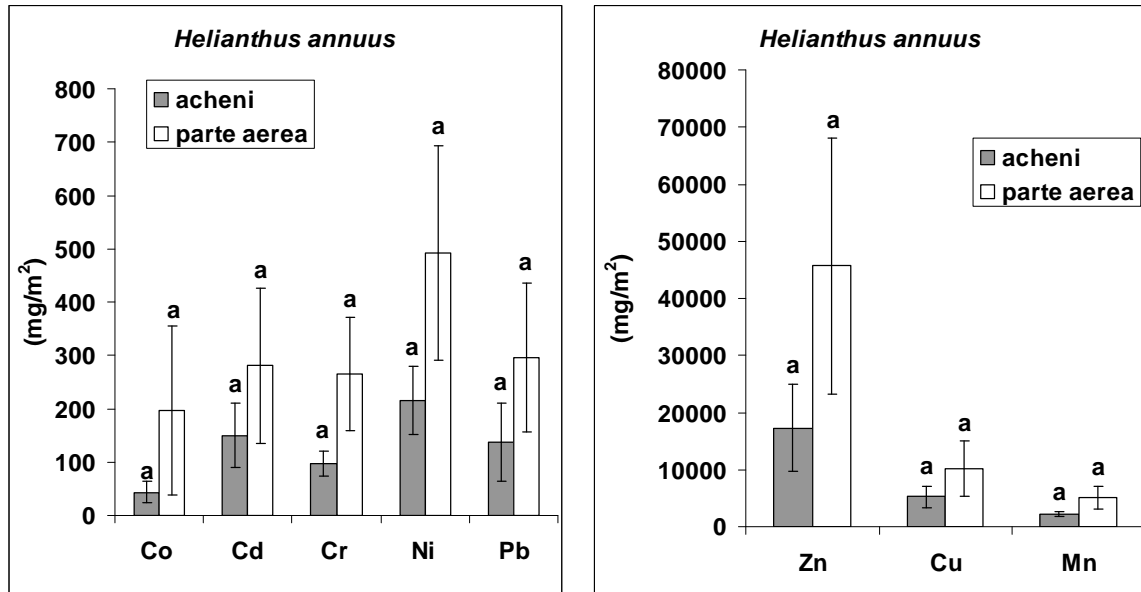


Figura 122 - *H. annuus*: asportazioni degli 8 metalli pesanti considerati (Co, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, Mn) in acheni e parte aerea. Le barre verticali indicano l'errore standard. Per lo stesso metallo, lettere uguali corrispondono a differenze non statisticamente significative.

#### 4.1.13 Analisi sulla parte ipogea

Per quanto riguarda gli apparati radicali, lo sviluppo è stato modesto, non avendo mai superato i 30 cm di profondità, rispetto ai 100 cm raggiunti agevolmente a Legnaro (Fig. 123), e costituisce sicuramente un importante fattore limitante al raggiungimento di elevate efficienze fitoestrattive.

##### 4.1.13.1 Densità di lunghezza radicale volumetrica (RLD)

Dall'analisi delle immagini delle radici acquisite tramite scanner è stato possibile calcolare la densità di lunghezza radicale, rapportando la lunghezza di radici al volume di suolo.

Si può osservare un certo beneficio in termini di accrescimento e approfondimento radicale dovuto alla ripuntatura (trattamento TR), che ha verosimilmente favorito l'accrescimento della pianta e l'asportazione di metalli pesanti.



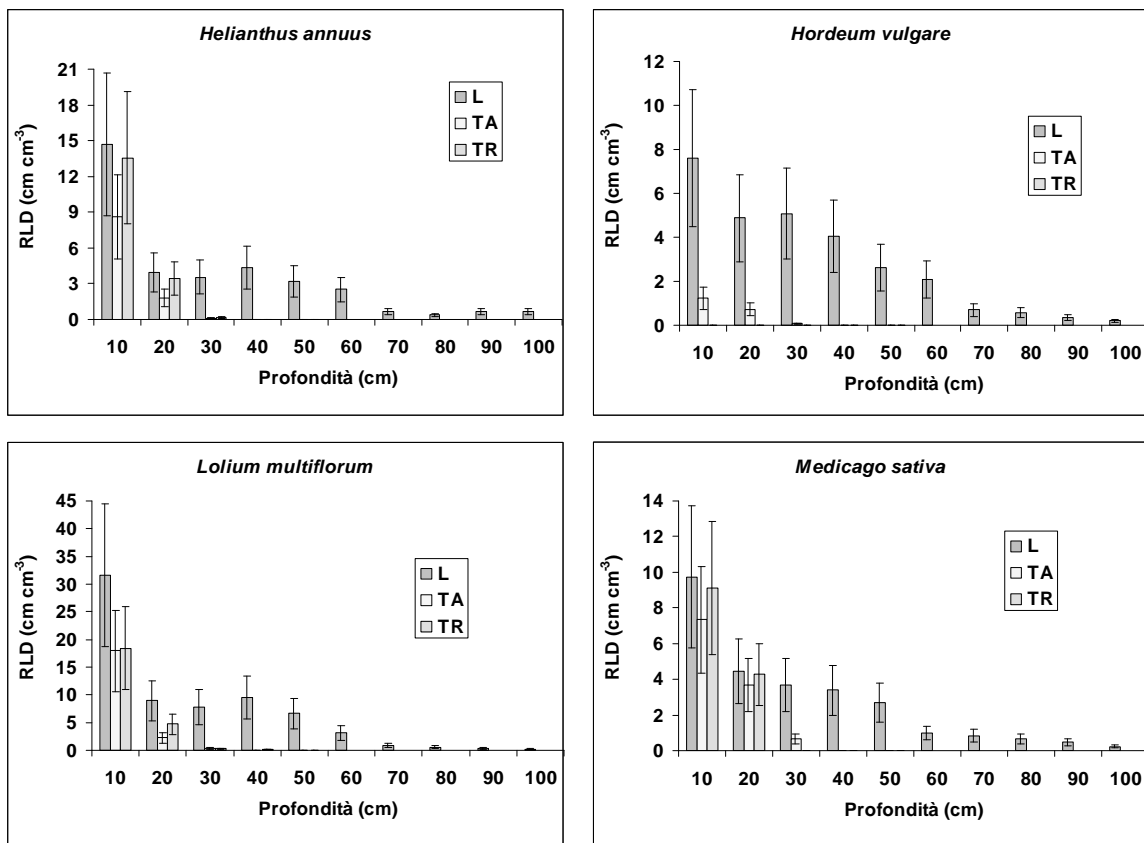
*H. annuus* a Legnaro ha raggiunto una RLD pari a 14,7 cm cm<sup>-3</sup> nei primi 10 cm di profondità, valore che scende progressivamente a 0,6 negli orizzonti più profondi, tra 90 e 100 cm. Per quanto riguarda Torviscosa, le radici sono presenti solamente nei primi 30 cm di profondità, con una densità variabile tra 8,6 cm cm<sup>-3</sup> (a 10 cm di profondità) e 0,1 cm cm<sup>-3</sup> (a 30 cm di profondità) nel caso di TA e tra 13,5 cm cm<sup>-3</sup> (a 10 cm) e 0,1 cm cm<sup>-3</sup> (a 30 cm) nel caso di TR. A 10 e a 20 cm di profondità non ci sono differenze significative rispetto a Legnaro, ma già a 30 cm del profilo in condizioni di inquinamento la densità radicale si estingue (Fig. 123).

*H. vulgare* ha raggiunto a Legnaro una RLD di 7,6 cm cm<sup>-3</sup> nei primi 10 cm di profondità, valore che è diminuito progressivamente fino a raggiungere una RLD di 0,2 tra i 90 e i 100 cm. A Torviscosa, le radici sono risultate presenti solamente nei primi 20 cm di profondità, con una densità variabile tra 1,2 e 0,7 nel caso di TA. Non sono disponibili i dati per TR, in conseguenza della moria delle piante (Fig. 123).

*L. multiflorum*, rispetto alle altre specie, ha raggiunto valori di RLD molto elevati nel "controllo" non inquinato, pari a 31,6 cm cm<sup>-3</sup> nei primi 10 cm di profondità, scendendo però rapidamente a valori di 6,6 cm cm<sup>-3</sup> a 50 cm di profondità e a valori di 0,2 cm cm<sup>-3</sup> tra i 90 e i 100 cm. Per quanto riguarda Torviscosa, la densità variava tra 17,9 (a 10 cm di profondità) e 0,3 cm cm<sup>-3</sup> (a 30 cm) nel caso di TA e tra 18,4 (a 10 cm) e 0,2 cm cm<sup>-3</sup> (a 30 cm) nel caso di TR (Fig. 123).

*M. sativa* a Legnaro ha presentato una RLD pari a 9,7 cm cm<sup>-3</sup> nei primi 10 cm di profondità, valore che scende a 0,2 tra i 90 e i 100 cm; la RLD è risultata comunque molto elevata fino a 50 cm di profondità mantenendo un valore di 2,7 cm cm<sup>-3</sup>. A Torviscosa, la densità era compresa tra 7,3 e 0,6 cm cm<sup>-3</sup> (a 10 e a 30 cm di profondità, rispettivamente) nel caso di TA, e tra 9,1 e 4,2 cm cm<sup>-3</sup> (a 10 e a 20 cm di profondità, rispettivamente), nel caso di TR; per quest'ultimo oltre i 20 cm di profondità la RLD si è ridotta a meno di 0,01 cm cm<sup>-3</sup> (Fig. 123).

*R. sativus* ha raggiunto in condizioni normali (Legnaro) una densità radicale meno elevata delle altre specie, e simile a quella dell'orzo. In L sono stati misurati valori di RLD pari a 6,3 nei primi 10 cm di profondità, valore che si è mantenuto pressoché costante fino a 50 cm di profondità, per diminuire poi drasticamente a 0,2 già a partire da 70 cm. Per quanto riguarda Torviscosa, le radici sono risultate presenti solamente nei primi 30 cm di profondità, con una densità addirittura più elevata del controllo nel primo orizzonte 0-10 cm (13,4 e 9,9 cm cm<sup>-3</sup>, in TA e TR rispettivamente), seguito da valori più bassi a 20 cm (2,0 e 4,1 cm cm<sup>-3</sup>, in TA e TR rispettivamente), fino alla quasi completa estinzione tra 20 e 30 cm (0,5 cm cm<sup>-3</sup> in entrambe le tesi TA e TR) (Fig. 123).



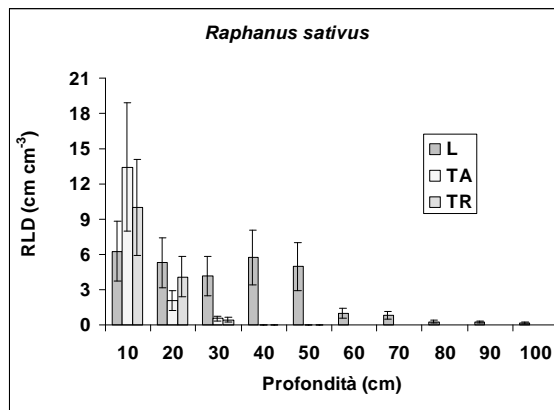


Figura 123 - Densità di lunghezza radicale volumetrica delle specie oggetto di studio, nei tre trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

Da queste osservazioni si deduce che nei trattamenti di Torviscosa le piante percepiscono marcatamente l'insospitalità e l'anomala composizione, sviluppando una densità di lunghezza radicale marcatamente inferiore rispetto al controllo, e limitando enormemente l'approfondimento.

Confrontando i risultati ottenuti in TA e TR si riscontra che sia *H. annuus* che *M. sativa*, hanno presentato densità radicali tendenzialmente maggiori in TR, *L. multiflorum* ha fornito valori simili tra i due trattamenti nei primi 10 cm, poi l'RLD in TR ha superato quello in TA, mentre *R. sativus* ha sviluppato una maggiore densità di lunghezza radicale in TA nei primi 10 cm, poi ha prevalso TR.

L'analisi della varianza (ANOVA) non ha comunque consentito di rilevare differenze statisticamente significative tra i due trattamenti di Torviscosa, ma solo valori più elevati a Legnaro. Per quanto riguarda l'effetto principale "specie", *L. multiflorum* ha presentato la massima RLD, seguito da *H. annuus*, *R. sativus* e *M. sativa*, e da ultimo *H. vulgare* (Tab. 24).

Tabella 24 - Analisi statistica (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ) della densità di lunghezza radicale volumetrica (RLD), considerando l'effetto principale "specie" e l'effetto principale "trattamento". Valori espressi in  $\text{cm cm}^{-3}$ .

Effetto principale SPECIE	
<i>L. multiflorum</i>	5,5 a
<i>H. annuus</i>	2,9 b
<i>R. sativus</i>	2,8 b
<i>M. sativa</i>	2,4 bc
<i>H.vulgare</i>	1,3 c

Effetto principale TRATTAMENTO	
L	3,8 a
TR	2,7 b
TA	2,4 b

Dal momento che durante le operazioni di setacciamento di questo orizzonte è stata portata in superficie una grande quantità di ceneri di pirite, si può ipotizzare che in condizioni ottimali di orizzonti ben definiti (TR) la differenza sarebbe stata maggiore (rispetto al rimescolamento degli strati, TA) e le piante si sarebbero verosimilmente accresciute di più sia a livello epigeo che ipogeo.

#### 4.1.13.2 Distribuzione della lunghezza radicale lungo il profilo

Si è rilevata anche la distribuzione delle radici nel substrato in funzione della profondità. Per poter confrontare i dati relativi al controllo (L) con quelli relativi ai due trattamenti di Torviscosa (TA e TR), gli intervalli di profondità considerati sono di 10 cm anche per Torviscosa (Fig. 124).

Girasole ed erba medica raggiungono il 100% della loro lunghezza radicale oltre i 90 cm di profondità a Legnaro; a 80 cm l'orzo ha già raggiunto tale valore, mentre per loiessa sono sufficienti i primi 70 cm di profondità; valori intermedi per il rafano. A Torviscosa, il 100% della lunghezza radicale è stata raggiunta, per tutte le specie, attorno ai 20 cm, fa eccezione l'erba medica che nel trattamento TA raggiunge l'approfondimento massimo a 30 cm e il rafano in TR (Fig. 124).

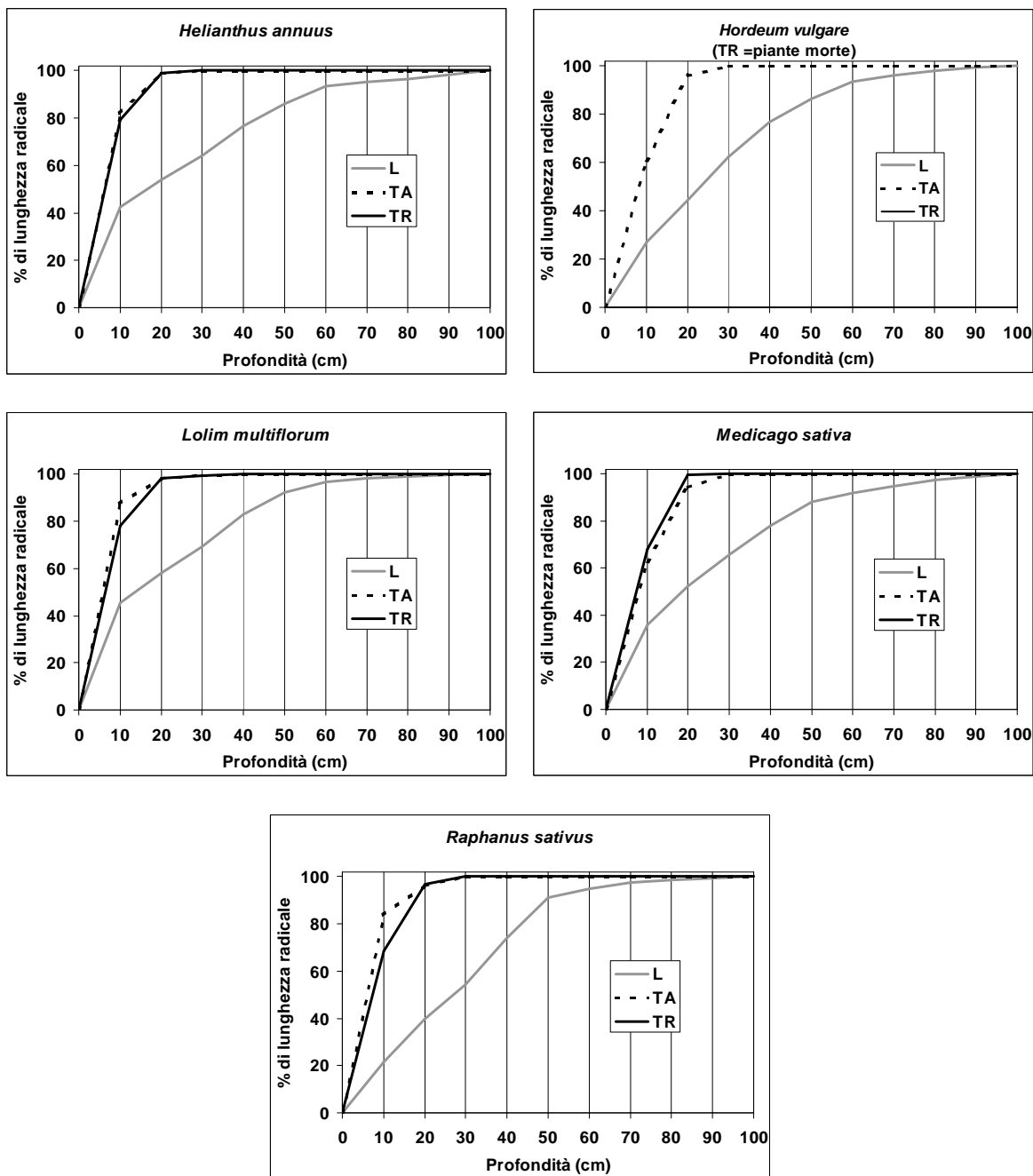


Figura 124 - Distribuzione della lunghezza radicale lungo il profilo, considerando i tre trattamenti L, TA e TR. Si considerano intervalli di profondità di 10 cm.

Le specie coltivate nel terreno di Legnaro hanno presentato una distribuzione radicale diversa e con una percentuale di lunghezza rispetto a quella totale nettamente inferiore in confronto a quella dei trattamenti di Torviscosa, considerando i primi 20 cm di profondità. In TA le piante hanno sviluppato la lunghezza radicale complessiva a profondità meno elevate rispetto a TR nella maggior parte delle specie.

Analizzando più in dettaglio i dati relativi ai soli trattamenti di Torviscosa (TA e TR), si può osservare che tutte le specie tendono a raggiungere il totale della lunghezza radicale (cumulata) più in profondità in TR rispetto a TA (Tab. 25).

Tabella 25 - Percentuali cumulate di radici presenti in diversi intervalli di profondità.

Profondità (cm)	Girasole		Orzo		Loiessa		Erba medica		Rafano	
	TA	TR	TA	TR	TA	TR	TA	TR	TA	TR
0-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10-20	81,89	79,17	61,0	0	87,40	78,23	62,91	68,04	83,72	68,58
20-30	98,89	99,11	96,3	0	98,16	98,11	94,41	99,90	96,57	96,87
30-40	100	99,97	100	0	99,89	99,30	99,99	99,96	100	99,97
40-50		100		0	100	99,99	100	99,97		100
50-60				0		100		100		

#### 4.1.13.3 Diametri radicali

Sono state osservate le variazioni dei diametri radicali al variare della profondità per verificare, se come era già stato osservato nelle prove preliminari, le radici a contatto con le ceneri di pirite presentano un diametro maggiore rispetto a quelle sviluppate a Legnaro (Fig. 125).

In linea generale (effetto principale trattamento), come si può leggere in tabella 26, i diametri misurati sulle radici cresciute a Torviscosa sono maggiori rispetto a quelli di Legnaro, confermando quanto precedentemente riportato.

In *L. multiflorum*, *M. sativa* e *R. sativus* il diametro del controllo è risultato minore rispetto a quello riscontrato nei trattamenti TA e TR, ovviamente per gli intervalli nei quali le radici erano presenti. Non si riscontrano invece sostanziali differenze tra TA e TR.

Considerando l'effetto principale "specie", *H. annuus* e *M. sativa*, hanno presentato i maggiori diametri, seguite, senza alcuna differenza statisticamente significativa, da *H. vulgare*, *L. multiflorum* e *R. sativus* (Tab. 26).

Tabella 26 - Analisi statistica (Test MDS,  $p \leq 0,05$ ) del diametro radicale, considerando l'effetto principale specie e l'effetto principale trattamento. Valori espressi in  $\mu\text{m}$ .

Effetto principale SPECIE	
<i>H. annuus</i>	211 a
<i>M. sativa</i>	205 a
<i>H. vulgare</i>	174 b
<i>L. multiflorum</i>	174 b
<i>R. sativus</i>	169 b

Effetto principale TRATTAMENTO	
TA	205 a
TR	204 a
L	151 b

Dai risultati ottenuti si può affermare che la diversità di massa volumica tra il substrato di Torviscosa e quello di Legnaro e la scarsissima porosità del substrato inquinato hanno indotto come risposta del tutto naturale l'aumento del diametro delle radici. Alla difficoltà di penetrazione, infatti, le piante hanno risposto con un aumento significativo del loro diametro radicale.

Inoltre, il maggior diametro, potrebbe essere una ulteriore causa della minor lunghezza radicale ottenuta a Torviscosa, in quanto gli assimilati potrebbero venire allocati nell'accrescimento del diametro piuttosto che della lunghezza radicale.

Per quanto riguarda il comportamento delle singole specie per il girasole non si osservano differenze nei diametri tra i diversi trattamenti, mentre nelle altre specie i diametri misurati a Torviscosa (TR e TA) sono maggiori rispetto a quelli della medesima specie a Legnaro (Fig. 125).

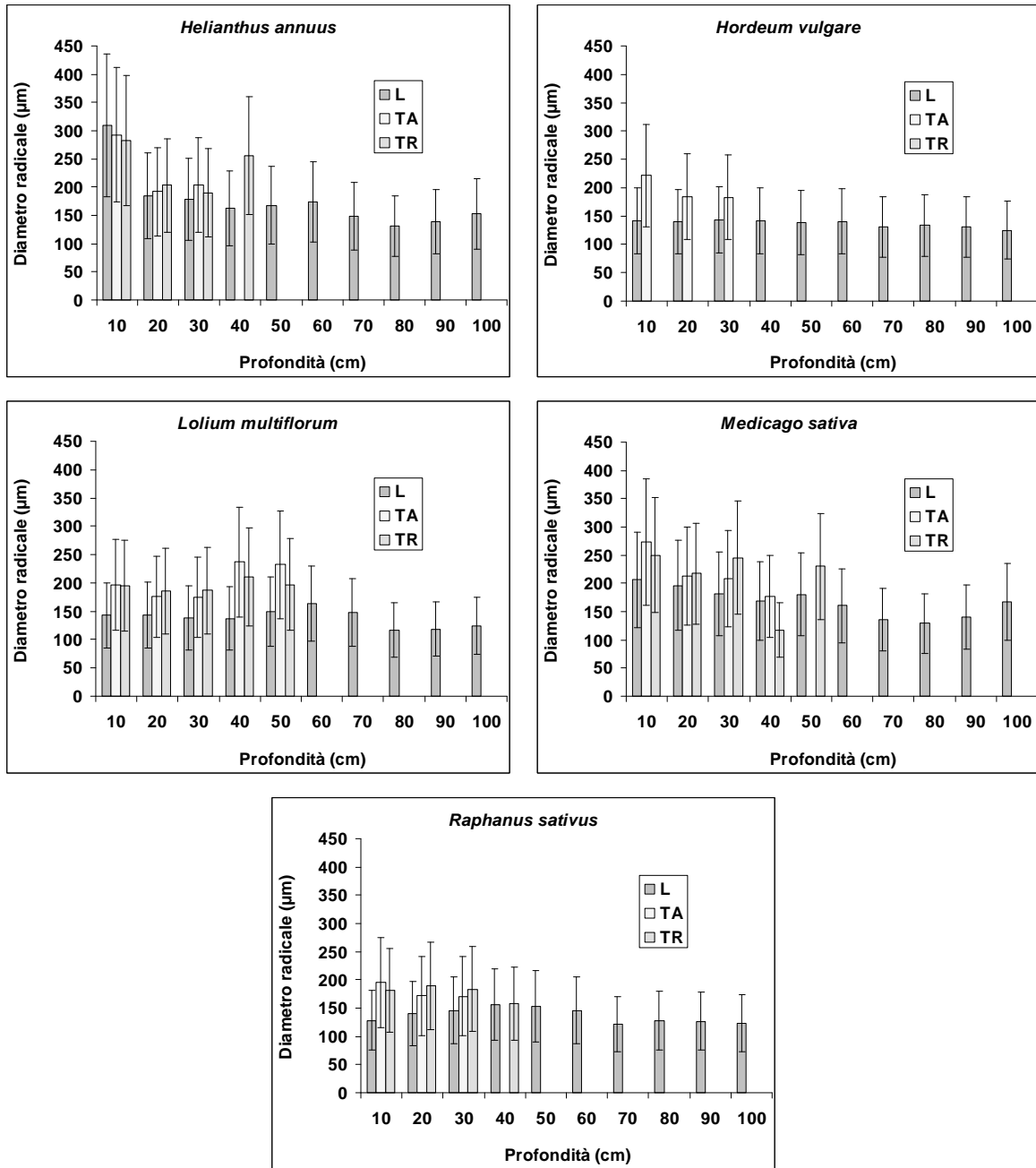


Figura 125 - Diametri radicali nei tre trattamenti, per ogni specie in oggetto. Le barre verticali indicano l'errore standard.



## SPECIE ARBOREEE

### PROVE DI MESOCOSMO

#### 4.1.14 Biomassa epigea

Nelle piante arboree coltivate in vaso per 469 giorni, la produzione di biomassa (aerea e radicale) ha risentito negativamente ed in modo significativo della presenza delle ceneri di pirite. Le specie che hanno risentito meno a livello epigeo sono state il pioppo tremulo e il pioppo bianco con diminuzioni rispetto al controllo L100, rispettivamente del 16% e del 49% per il peso dei fusti (Fig. 126) e pioppo tremulo e pioppo nero, se si valuta la produzione di biomassa fogliare (Fig. 127).

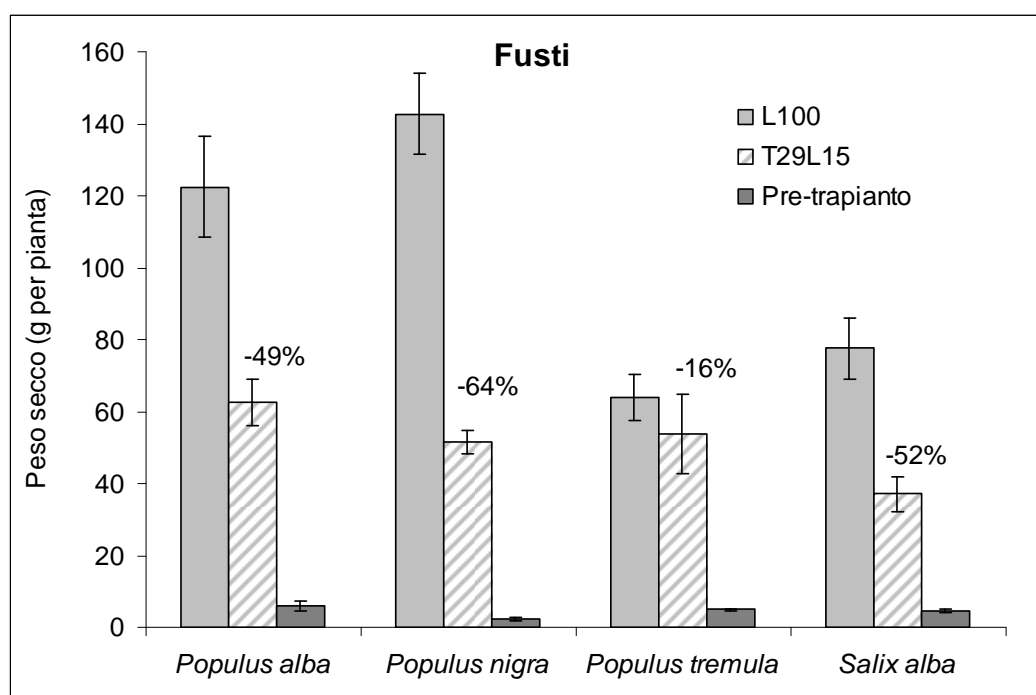


Figura 126 - Peso secco (g/pianta) dei fusti di pioppo bianco, pioppo nero, pioppo tremulo e salice bianco, alla raccolta (469 GD Trapianto). A confronto i trattamenti in prova e il peso delle piante pre-trapianto. Le percentuali indicano le variazioni rispetto al controllo. Le barre verticali indicano l'errore standard.

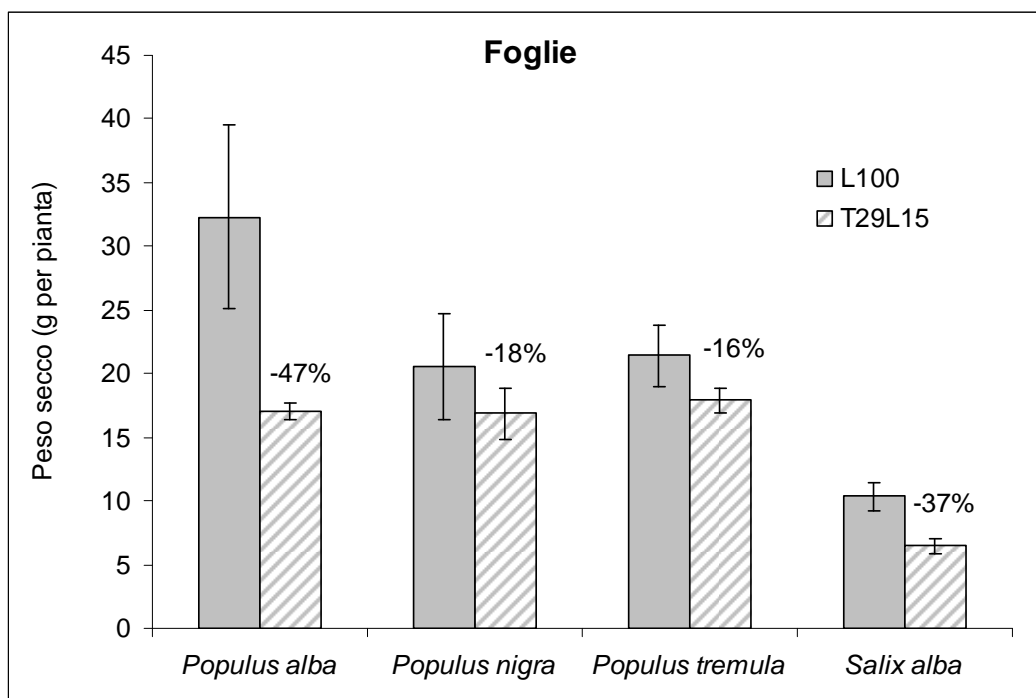


Figura 127 - Peso secco (g/pianta) delle foglie di pioppo bianco, pioppo nero, pioppo tremulo e salice bianco, alla raccolta (469 GD Trapianto). Le percentuali indicano le variazioni rispetto al controllo. Le barre verticali indicano l'errore standard.

#### 4.1.15 Metalli pesanti

##### 4.1.15.1 Concentrazione dei metalli pesanti

L'assorbimento dei metalli pesanti non presenta differenze statisticamente significative tra il trattamento con orizzonte di ricoprimento (T29L15) ed il controllo (L100); fa eccezione solo il manganese con assorbimenti medi maggiori in L100 (Fig. 126). Per quanto riguarda l'effetto principale specie, non vi sono gerarchie da segnalare, anche se il salice bianco ha assorbito quantità maggiori di Cd e Cu (Fig. 128).

Da segnalare, nell'ottica di un impianto di fitoestrazione l'importanza della raccolta delle foglie, in quanto taluni elementi, quali cobalto, cromo e nichel, sono stati concentrati solo in tali organi (Fig. 128).

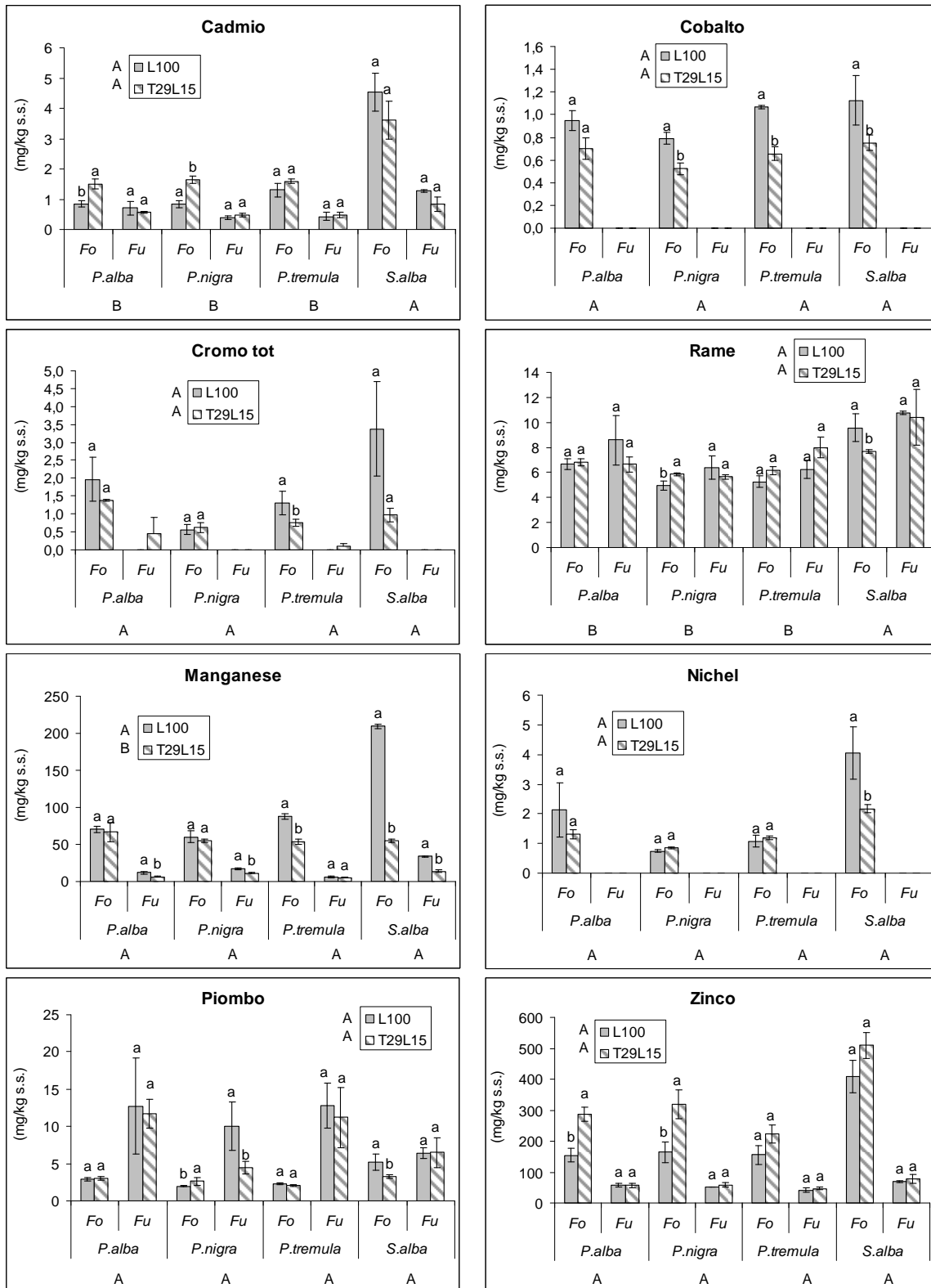


Figura 128 - Concentrazioni riscontrate per ciascuno degli 8 metalli pesanti analizzati (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb, Zn) nelle diverse specie e trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere minuscole diverse corrispondono a differenze statisticamente significative tra i trattamenti della stessa specie per foglie o fusti. Lettere maiuscole diverse indicano differenze statisticamente significative per gli effetti principali (specie e trattamento) (Test Newman—Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Analizzando la somma delle concentrazioni standardizzate degli 8 metalli pesanti, la specie, quindi che si è dimostrata tendenzialmente più efficiente in termini di concentrazione di metalli pesanti è stata *Salix alba* (Fig. 129), specie spontanea ben diffusa nel sito contaminato, confermando la correlazione negativa che esiste in natura tra accrescimento epigeo ed accumulo di inquinanti, per il loro effetto fitotossico.

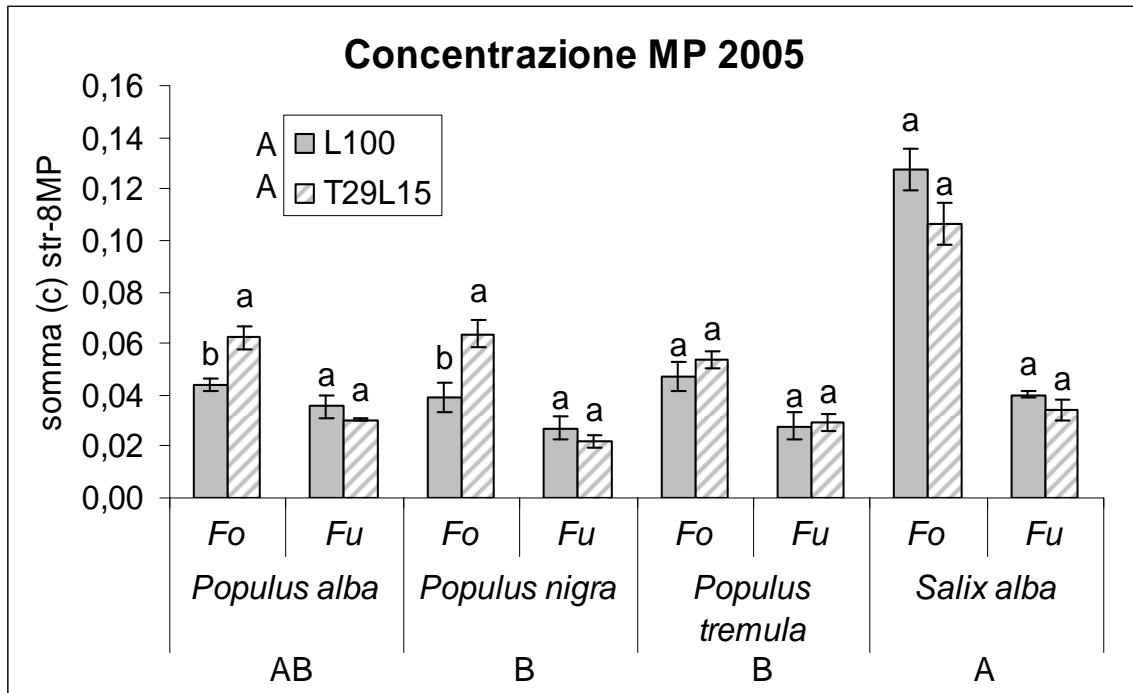


Figura 129 - Somma delle concentrazioni standardizzate di 8 metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per la stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per quanto riguarda le asportazioni, queste fanno riferimento alle piante coltivate solo su substrato inquinato. Da un primo bilancio di asportazioni rilevante l'elevata asportazione dei metalli nelle foglie, dovuta sia alle elevate concentrazioni riscontrate che alla elevata quantità di biomassa fogliare prodotta. Solo per il salice bianco (Fig. 130) la quantità di metallo asportata nelle foglie è pari a quella del fusto, considerando la somma delle asportazioni degli 8 metalli pesanti (Cd, Co, Cr tot, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn). La specie che ha asportato

la maggior quantità totale di metalli (foglie e fusto) è il pioppo bianco, soprattutto grazie all'elevata biomassa prodotta (Fig. 130).

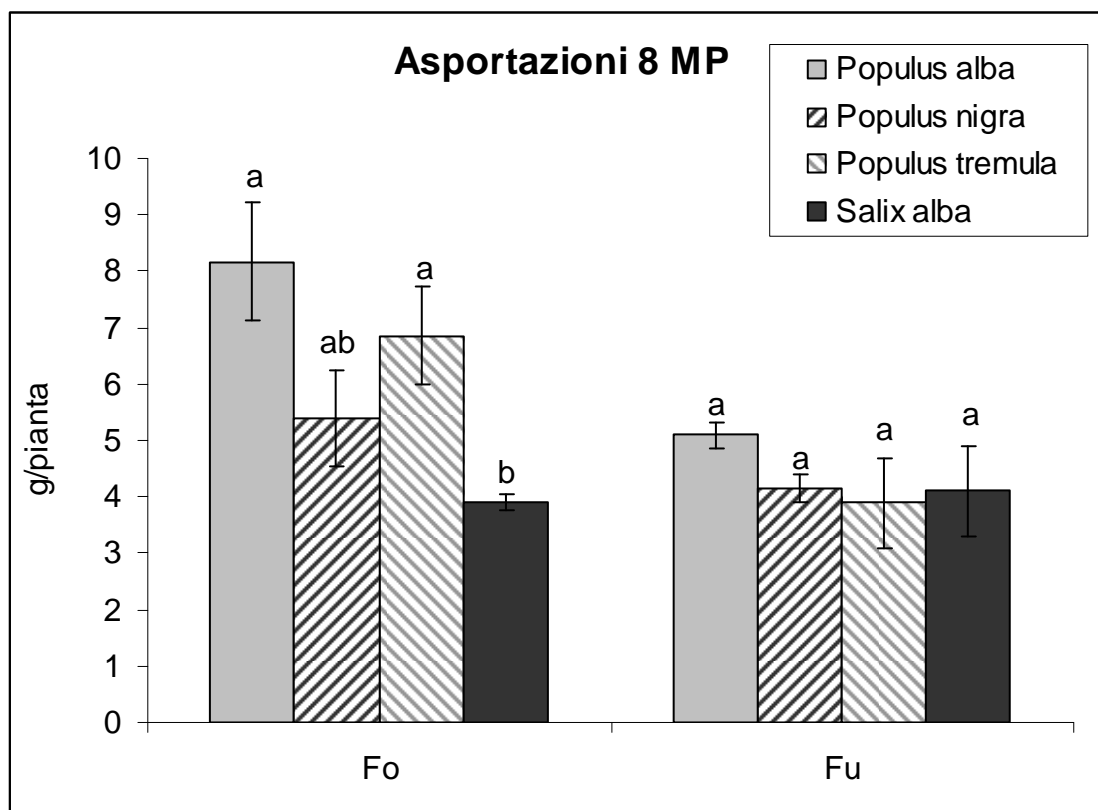


Figura 130 - Somma delle asportazioni di 8 metalli pesanti (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per lo stesso organo (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.16 Apparati radicali

##### 4.1.16.1 Biomassa ipogea

Per l'apparato radicale i cali meno marcati sono stati osservati in pioppo bianco (-25%) e pioppo nero (-28%), rispetto ad una diminuzione media di circa il 45% delle altre 2 specie (Fig. 131). Tale effetto negativo sull'apparato radicale è imputabile prevalentemente alla diminuzione delle radici di conduzione (Fig. 132), che hanno mostrato decrementi percentuali rispetto al controllo maggiori

che non quelli osservati per la frazione di radici fini nel medesimo trattamento e per la stessa specie (Fig. 132).

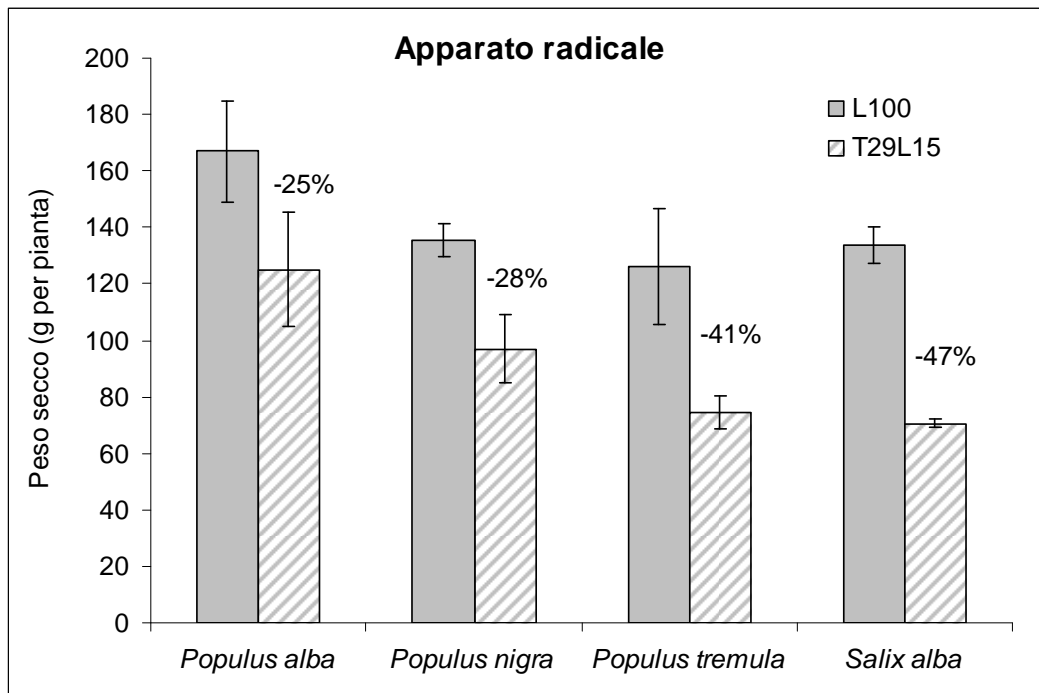


Figura 131 - Peso secco (g/pianta) delle radici di pioppo bianco, pioppo nero, pioppo tremulo e salice bianco, alla raccolta (469 GD Trapianto). Le percentuali indicano le variazioni rispetto al controllo. Le barre verticali indicano l'errore standard.

Il salice bianco, ha ridotto, in egual misura, la quantità di radici di conduzione e di quelle fini (-47%) in T29L15 rispetto a L100. Tra tutte le altre specie la diminuzione percentuale delle radici di conduzione minore, rispetto al controllo, si è registrata in pioppo bianco (-30 %) seguito da pioppo nero (-32%) e da pioppo tremulo (-46%); la medesima gerarchia è stata osservata anche per le radici fini, ma con valori di decremento compresi tra il 18% (pioppo bianco) e il 36 % (pioppo tremulo) (Fig. 132).

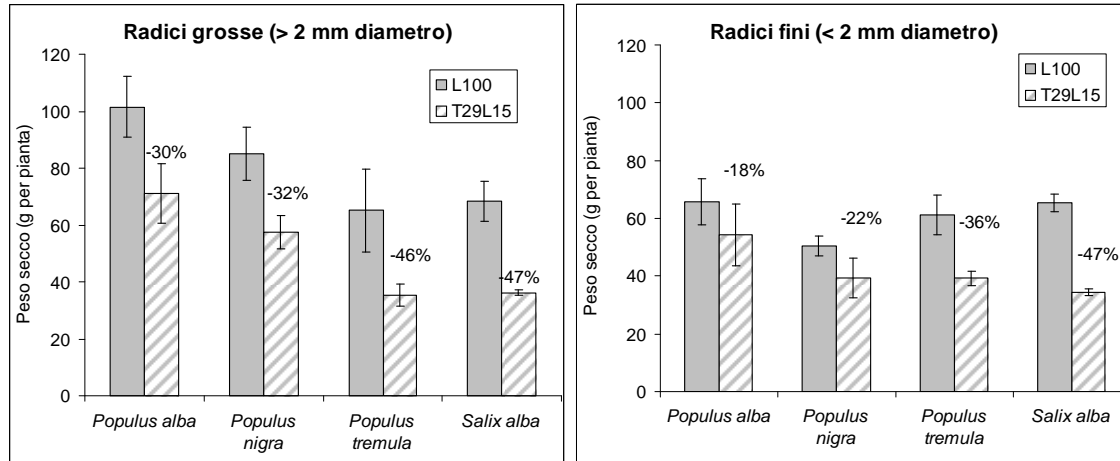


Figura 132 - Peso secco (g/pianta) delle radici di pioppo bianco, pioppo nero, pioppo tremulo e salice bianco, alla raccolta (469 GD Trapianto) distinte in radici di conduzione (diametro >2 mm) e radici fini (diametro <2 mm). Le percentuali indicano le variazioni rispetto al controllo. Le barre verticali indicano l'errore standard.

#### 4.1.16.2 Metodo distruttivo vs. metodo elettrico

Dall'osservazione dei dati relativi alle misurazioni col metodo elettrico si può osservare come, alla data del rilievo distruttivo (17 ottobre 2005), la misura di capacità elettrica risulti maggiore per il pioppo bianco (Fig. 133), come rilevato anche dai rilievi distruttivi (Fig. 131). Per tutte le specie si rileva un andamento stagionale con un picco di capacità elettrica nella tarda primavera-inizio estate.

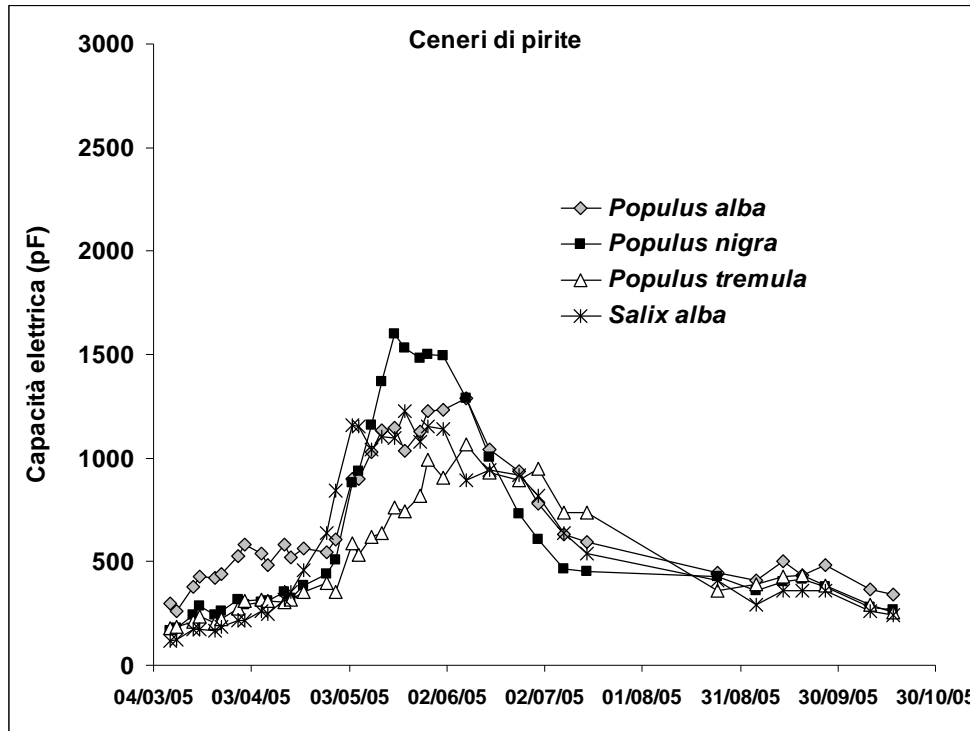


Figura 133 - Misura della capacità elettrica delle specie arboree in vaso nel solo trattamento con ceneri di pirite.

La diversa gerarchia nello sviluppo radicale delle diverse specie è mantenuta anche nel controllo (Fig. 134), ma con una variabilità maggiore (coefficiente di variabilità 31% in L100 rispetto 16% in T29L15).

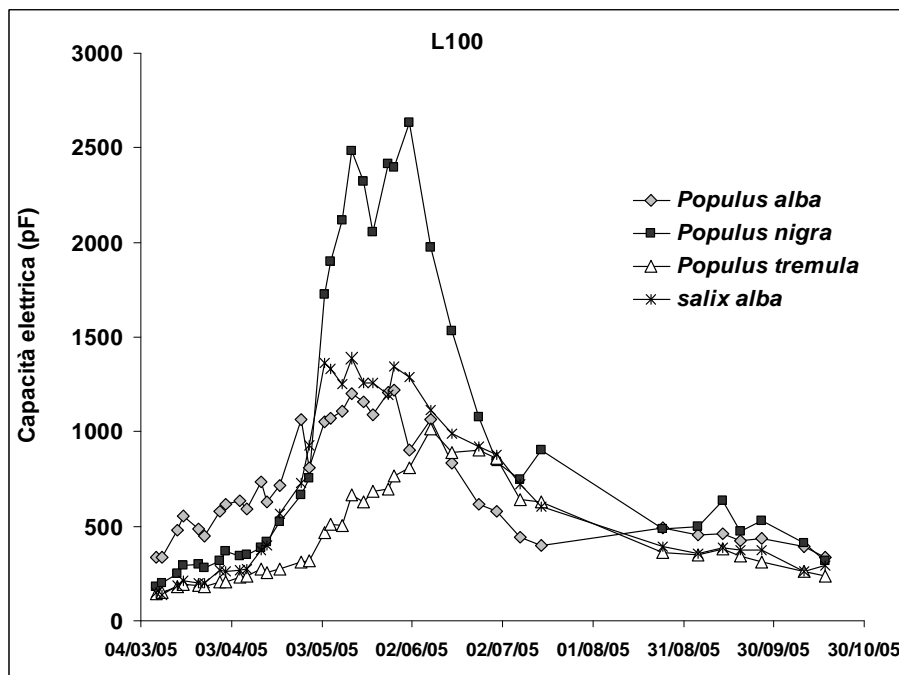


Figura 134 - Misura della capacità elettrica delle specie arboree in vaso nel solo controllo.



Meno incoraggianti i risultati relativi all'affidabilità del metodo non distruttivo del capacimetro per la misurazione dell'accrescimento radicale: la correlazione tra biomassa radicale e capacità elettrica non è risultata significativa, con coefficienti di determinazione inferiori al 30%.

Unico dato incoraggiante, la correlazione nel solo trattamento con le ceneri di pirite e i relativi campionamenti distruttivi, che risulta significativa, ma il cui  $R^2 = 50\%$  circa (Fig. 135).

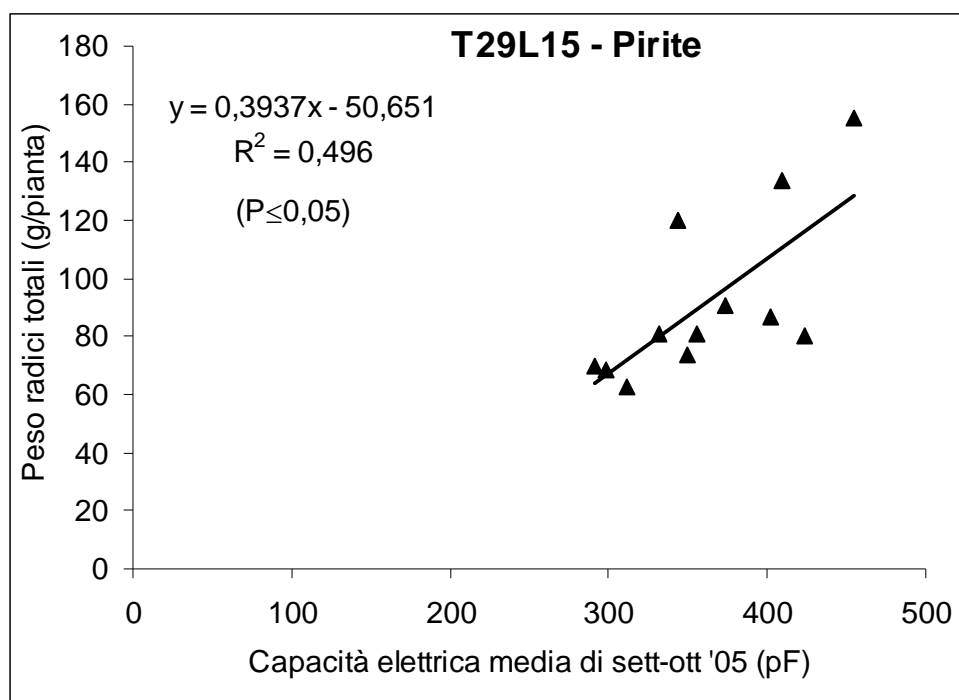


Figura 135 - Correlazione tra la misura della capacità elettrica delle specie arboree in vaso in T29L15 e i valori reali di peso secco.

Non si esclude tuttavia che la correlazione possa diventare significativa se si considera la lunghezza radicale come parametro di accrescimento, al posto del peso secco.

#### 4.1.17 Apparato radicale vs. asportazioni dei metalli

Significativa la correlazione tra la quantità di radici di conduzione e le asportazioni dei metalli pesanti (Fig. 136), con coefficiente di determinazione

pari al 58%. Perde di significatività se si correlano le asportazioni al peso secco delle radici fini.

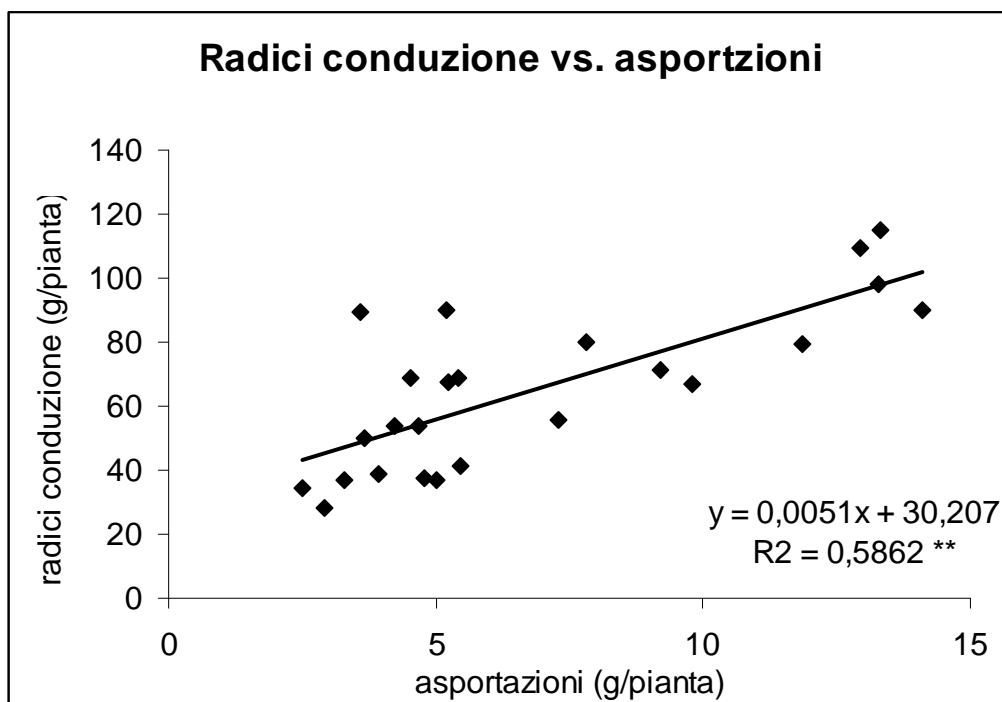


Figura 136 - Correlazione tra la misura degli apparati radicali (peso secco radici di conduzione) delle specie arboree in vaso in T29L15 e i valori di asportazione (somma 8 metalli pesanti).

## REALIZZAZIONE IMPIANTO "IN SITU"

### 4.1.18 Analisi sulla biomassa epigea

Nel corso della sperimentazione si è proceduto ad effettuare dei rilievi con lo SPAD; a 164 giorni dal trapianto, dopo aver prelevato nei tre trattamenti la seconda pianta (a partire da ovest verso est) di ogni replica per le 4 specie, si è rilevato il peso secco della biomassa epigea, foglie escluse. Dei campioni, attraverso lettura ICP, sono state ottenute le concentrazioni di metalli pesanti.

Occorre ricordare che *Populus alba*, *Populus nigra* e *Salix alba*, all'epoca del trapianto, erano talee di 2 anni a radice nuda, mentre le piante di *Populus tremula* erano talee di 1 anno, con pane di terra.

#### 4.1.18.1 Stato nutrizionale (SPAD)

I rilievi con il misuratore di clorofilla SPAD hanno permesso di ottenere indicazioni relative allo *status* nutrizionale delle singole specie nei diversi trattamenti (interazione specie × trattamento) (Fig. 137).

*Populus nigra* e *Populus tremula* non hanno presentato alterazioni significative nel contenuto di clorofilla nei due trattamenti TA e TR rispetto a Legnaro, mentre in *Populus alba* e *Salix alba* si è riscontrata una alterazione dello stato nutrizionale in presenza di inquinanti, senza però presentare differenze significative tra il trattamento arato e il ripuntato.

Considerando l'effetto principale "specie", si sono registrati i valori più elevati in *P. alba*, seguita da *S. alba*. I valori minimi si sono evidenziati in *P. nigra* e *P. tremula*.

Per quanto riguarda l'effetto "trattamento" il controllo ha presentato, come era lecito attendersi, valori maggiori rispetto a Torviscosa, in cui TA e TR non hanno presentato differenze statisticamente significative.

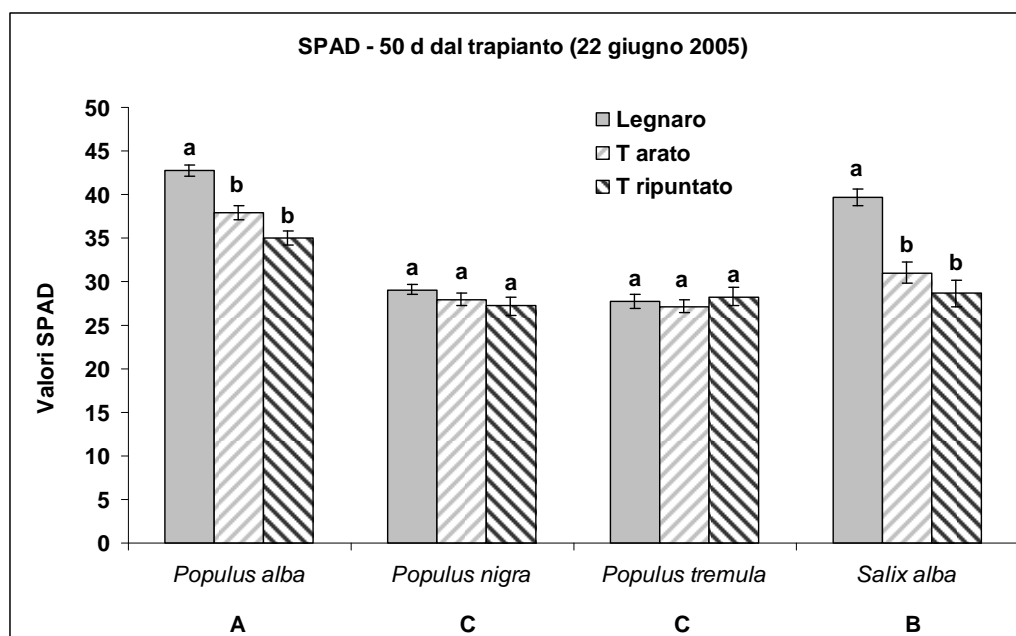


Figura 137 - Valori SPAD delle 4 specie nei diversi trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per la stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per l'effetto principale "specie" (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.18.2 Produzione di biomassa aerea

Dall'analisi del peso secco si è potuto osservare la risposta di ogni specie ai diversi trattamenti, confrontando sia la biomassa rispetto alle piante di partenza (vivaio) (Fig. 138) sia in relazione al trattamento di controllo (L) di Legnaro (Fig. 139).

Mediamente, considerando l'effetto principale "trattamento" (Fig. 138), non si sono evidenziate differenze significative tra i pesi delle piante provenienti dal vivaio (pre-trapianto) e quelli ottenuti dopo un anno di coltivazione in TA e TR, in cui si sono avuti valori nettamente più bassi rispetto alle biomasse prodotte a Legnaro.

In relazione all'effetto principale "specie", i valori di peso secco più elevati sono stati raggiunti da *P. nigra*, seguito da *Salix alba*. Produzioni intermedie tra i due sono state ottenute da *P. alba*, ma questa specie si è accresciuta più delle altre nel sito inquinato. Gli accrescimenti più bassi sono stati raggiunti da *P. tremula*, penalizzata dal bassissimo accrescimento registrato a Torviscosa (Fig. 139).

Osservando la produzione di biomassa rispetto al vivaio, per tutte e quattro le specie si sono rilevati, a fine stagione, gli incrementi più alti in peso secco nel controllo (Fig. 138). In particolare il *P. nigra*, nel trattamento di Legnaro, ha incrementato la sua biomassa di ben 17 volte rispetto al peso pre-trapianto, raggiungendo un peso secco di 1059 g/pianta.

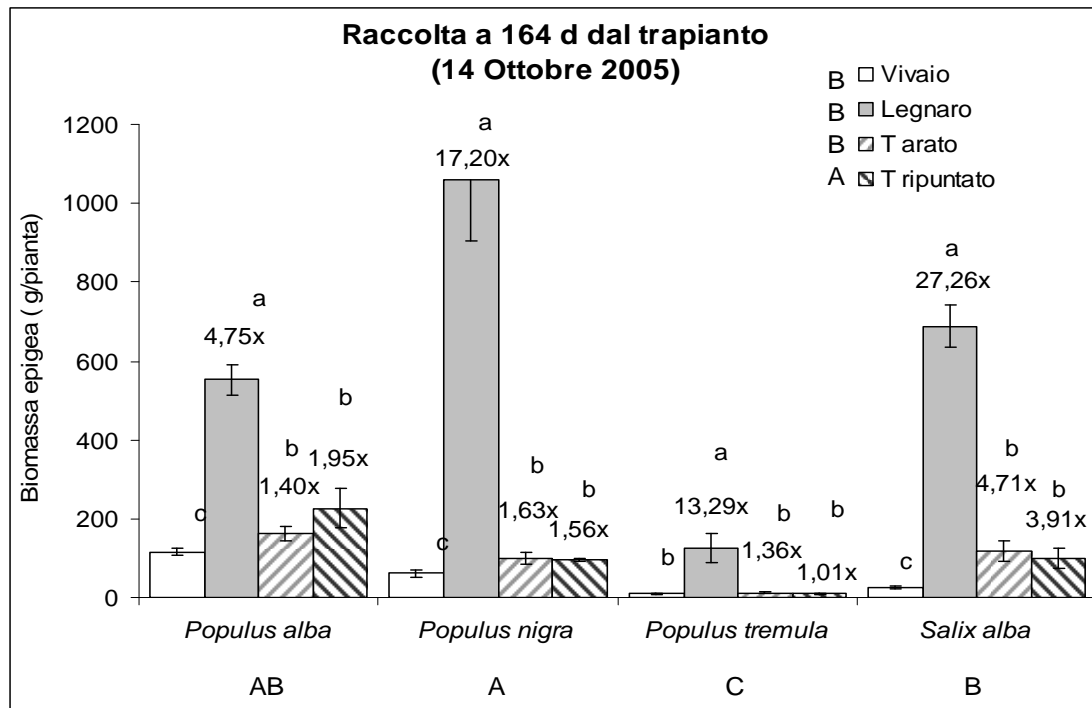


Figura 138 - Biomassa epigea dopo un anno di coltivazione (viene indicato l'incremento rispetto al peso pre-trapianto). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per la stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per ogni singola specie, nei due trattamenti di Torviscosa, arato (TA) e ripuntato (TR), si sono ottenute produzioni di biomassa simili e sempre inferiori al controllo (Fig. 139), a testimonianza delle difficoltà di insediamento delle piante nel sito inquinato; tali valori sono stati comunque superiori rispetto al vivaio, ad eccezione di *P. tremula* che, sia in TA che TR, si è accresciuto di ben poco (Fig. 138). Quest'ultima specie si è dimostrata, nel sito inquinato, la meno produttiva, con valori di biomassa pari a 12,69 g/pianta in TA e 9,45 g/pianta in TR, evidenziando valori rispettivamente del 89,7% e del 92,3% inferiori rispetto al controllo (Fig. 139); questo fatto può essere solo in parte imputabile al lento accrescimento di *P. tremula* e al fatto di avere utilizzato talee di 1 anno anziché di 2 anni. Marcati decrementi rispetto al controllo sono stati rilevati anche in *P. nigra*, nonostante tale specie sia risultata, come già visto, la più produttiva (Fig. 139).

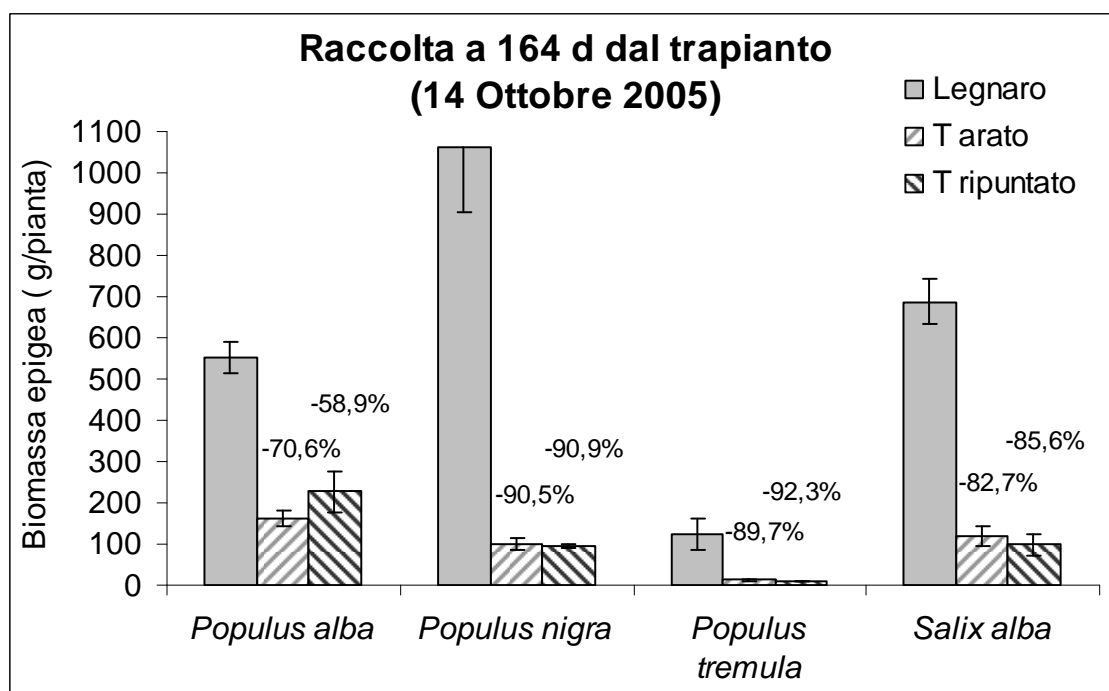


Figura 139 - Produzione di biomassa epigea (g/pianta). Viene riportata la riduzione % rispetto al controllo. Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

#### 4.1.19 Concentrazione degli elementi assorbiti

##### 4.1.19.1 Concentrazione di metalli pesanti

Della biomassa delle quattro specie arboree considerate nella sperimentazione, in relazione ai diversi trattamenti, si è analizzata la concentrazione di metalli pesanti al fine di poter ricavare indicazioni sulle loro potenziali capacità fitoestrattive.

Si sono presi in considerazione gli otto metalli pesanti che più frequentemente sono stati individuati come responsabili dei fenomeni di inquinamento nel sito: cadmio, cobalto, cromo tot, rame, manganese, nichel, piombo e zinco.

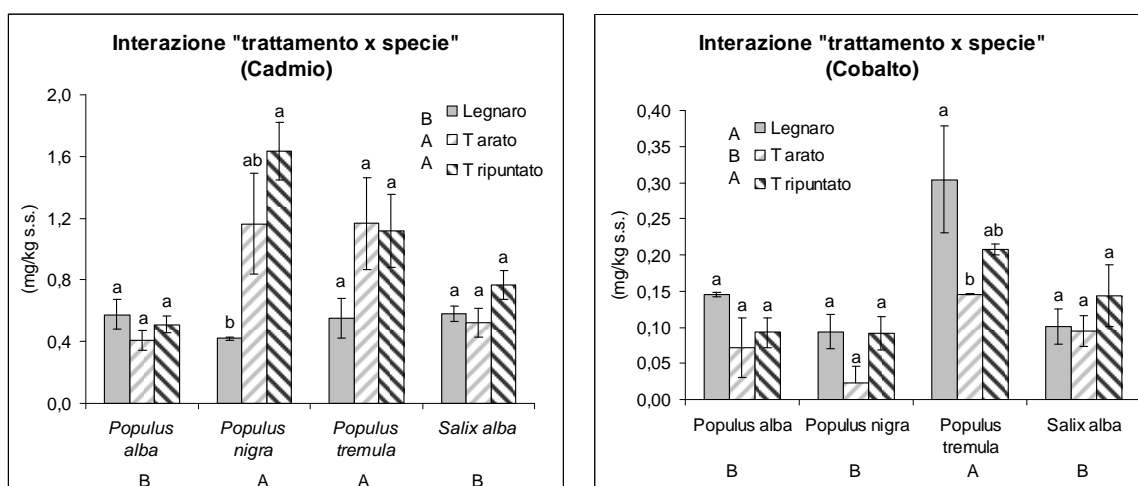
I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando l'ANOVA, con test di Newman-Keuls per la separazione delle medie, al  $P \leq 0,05$ .

In figura 140 vengono confrontate le concentrazioni degli otto metalli in relazione all'interazione "trattamento x specie", all'effetto principale "specie" e all'effetto principale "trattamento".

In linea generale, per tutti gli 8 metalli pesanti considerati, il pioppo tremulo è la specie che ha maggiormente assorbito i metalli. Paragonabili gli assorbimenti del pioppo nero per il cadmio e del salice bianco per rame e zinco. Caso a se il piombo, che è stato concentrato maggiormente a Legnaro da salice bianco e pioppo bianco, mentre a Torviscosa è stato assorbito solo dal pioppo tremulo nel trattamento con ripuntatura (Fig. 140).

Per quanto riguarda l'effetto principale "trattamento" questo ha evidenziato elevate concentrazioni di cobalto e rame nel terreno di Legnaro. Tra i due trattamenti a Torviscosa non vi sono differenze statisticamente significative, ad eccezione di Co, Zn e Cr tot che sono stati assorbiti dalle specie in misura maggiore nel terreno ripuntato (Fig. 140).

Per cadmio, cobalto, cromo e rame non si osservano differenze statisticamente significative tra i trattamenti per una medesima specie. Fanno eccezione il pioppo nero che ha assorbito il cadmio nel trattamento ripuntato di Torviscosa in quantità maggiori che negli altri trattamenti (TR>TA>L); il pioppo tremulo in cui gli assorbimenti di Co e Cr tot sono rispettivamente maggiori nel trattamento TR e TA (Fig. 140).



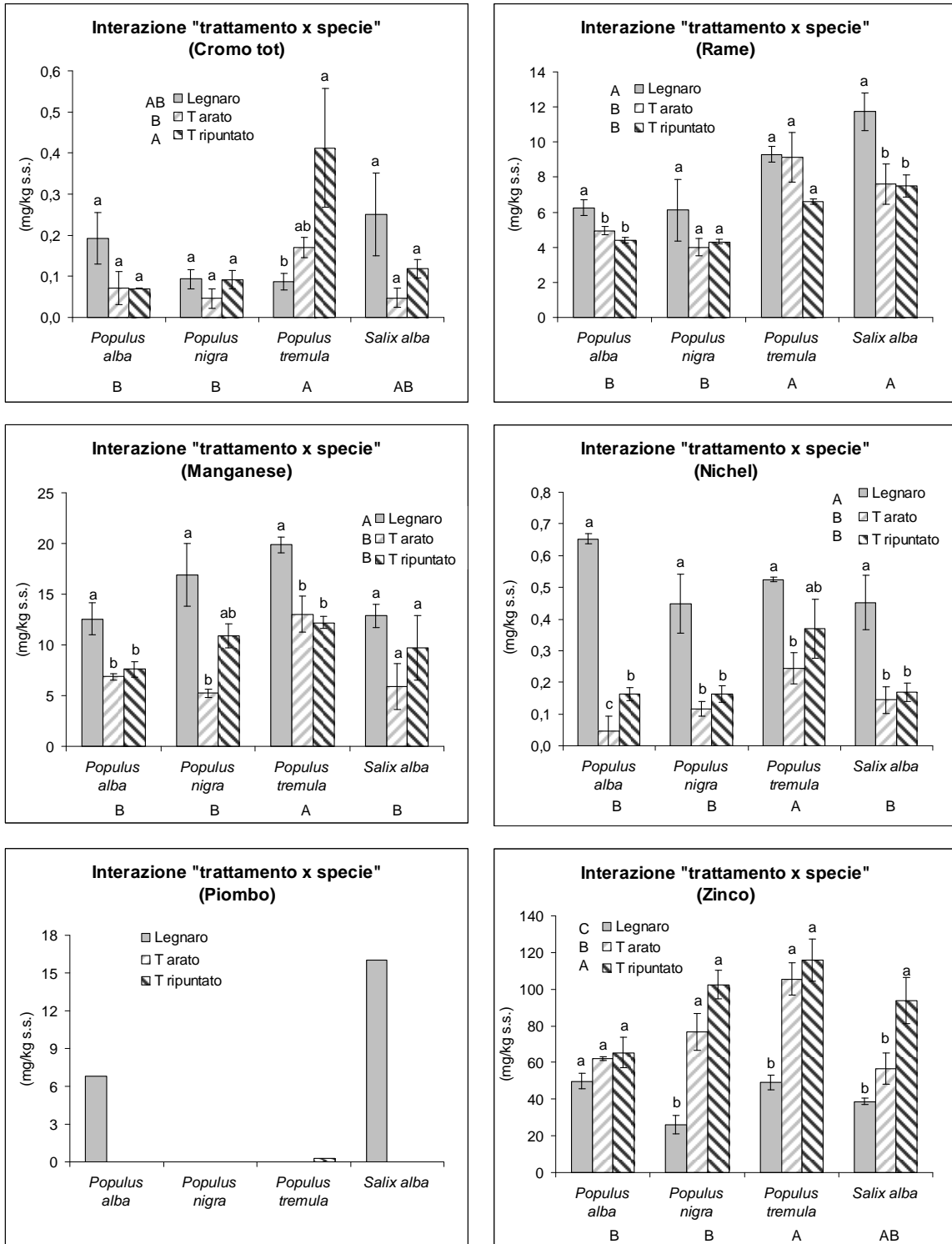


Figura 140 - Concentrazioni rilevate per 8 metalli pesanti (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn) nei tessuti legnosi delle diverse specie e trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative i trattamenti all'interno della stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).



Manganese e nichel si ritrovano in concentrazioni maggiori, per tutte le specie nel terreno di Legnaro, non presentando differenze statisticamente significative tra i trattamenti di Torviscosa, se non per il manganese nel pioppo nero e il nichel nel pioppo bianco e pioppo tremulo assorbiti di preferenza nel trattamento ripuntato (TR).

#### 4.1.19.2 Concentrazione di altri elementi

Dalla biomassa aerea delle specie arboree analizzate con ICP, si sono ricavate anche le concentrazioni relative ad altri elementi quali arsenico, boro, calcio, potassio, sodio, magnesio, fosforo, molibdeno, vanadio, ferro e zolfo.

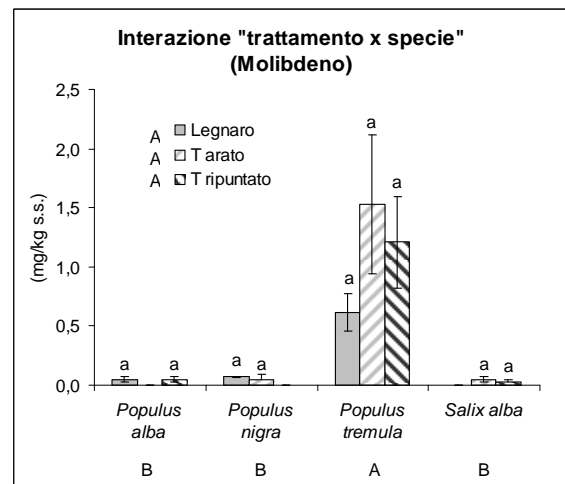
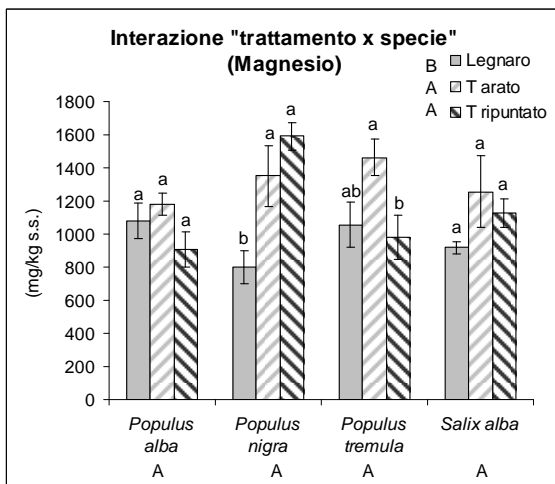
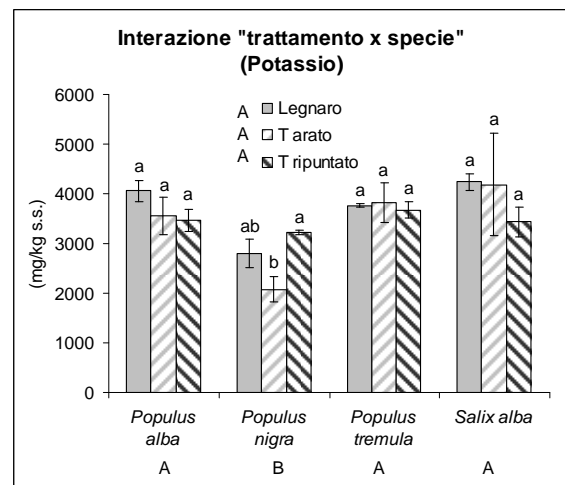
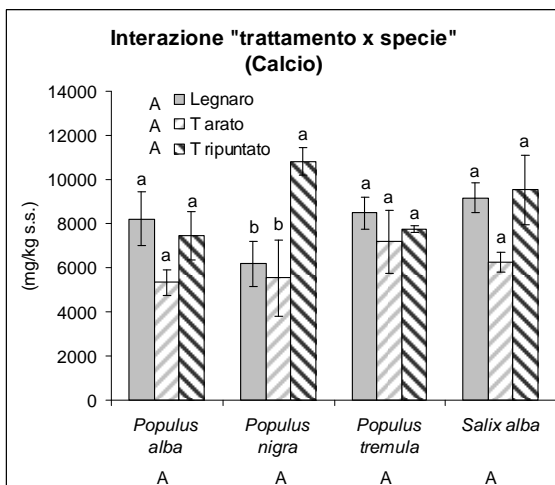
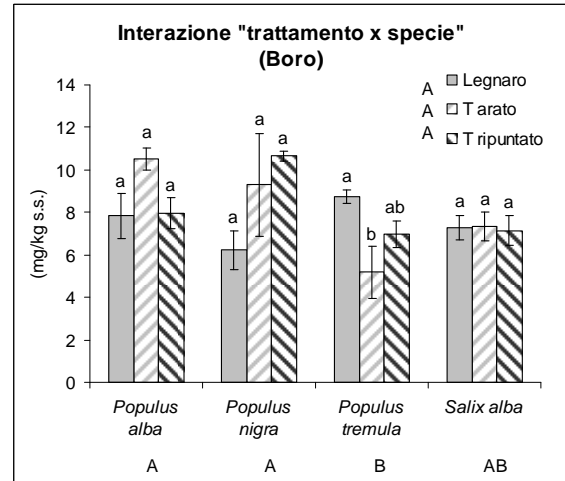
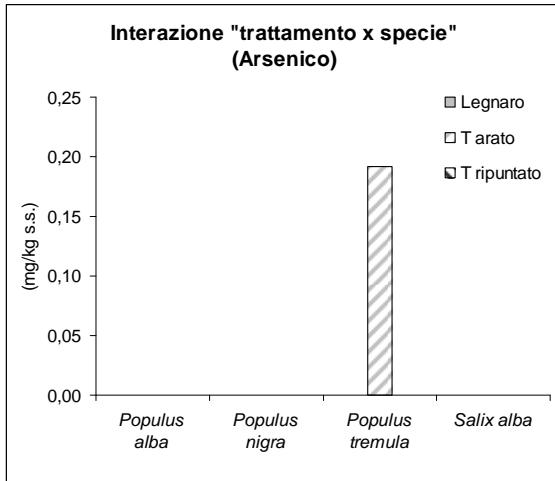
Come per i metalli pesanti precedenti, anche per questi elementi si sono confrontate le loro concentrazioni considerando l'interazione "specie x trattamento" e gli effetti principali "specie" e "trattamento" (Fig. 141).

L'arsenico è stato trovato solo nei tessuti del pioppo tremulo coltivato su terreno arato a Torviscosa in concentrazioni di 0,2 ppm (Fig. 141).

Ca, Mg e Na non presentano differenze statisticamente significative in relazione all'effetto principale specie e all'interazione "specie x trattamento". Si evidenzia solo per il pioppo nero un maggiore assorbimento di Ca in TR e di Mg e Na a Torviscosa; per il pioppo tremulo assorbimenti maggiori di Mg nel TA (Fig. 141).

V e Mo sono stati assorbiti maggiormente dal pioppo tremulo, nel trattamento TA (Fig. 141), mentre il potassio viene assorbito in concentrazioni minori dal pioppo nero coltivato a Torviscosa.

Il boro viene concentrato principalmente dal pioppo bianco e dal pioppo nero, senza differenze nei diversi trattamenti.



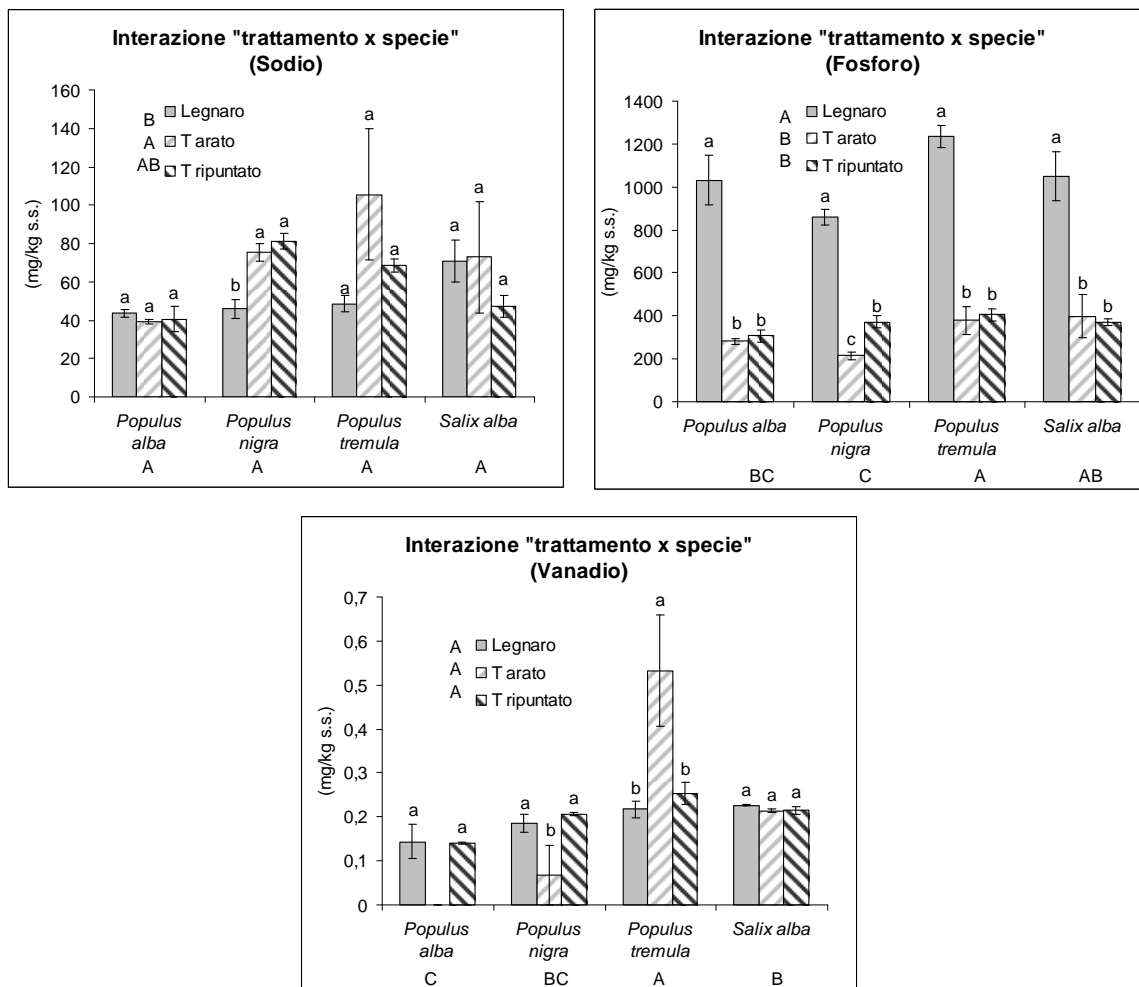


Figura 141 - Concentrazioni di As, B, Ca, K, Na, Mg, P, Mo e V nei tessuti legnosi delle diverse specie e trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti all'interno della stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.19.3 Concentrazione di ferro e zolfo

Si sono infine analizzate le concentrazioni relative al ferro e allo zolfo (Fig. 142), per poter osservare l'assorbimento delle piante in seguito all'elevata presenza di tali elementi nel sito inquinato di Torviscosa.

Considerando i due elementi si sono ottenute maggiori concentrazioni nel sito inquinato, rispetto al controllo, soltanto per il ferro, mentre per l'altro elemento non sono state ottenute rilevanti differenze tra i trattamenti (Fig. 142).

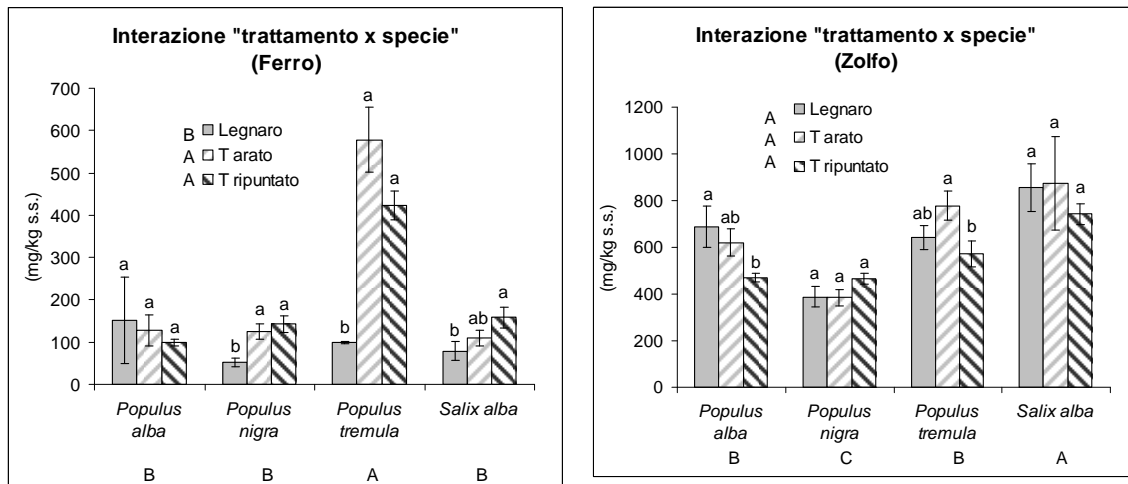


Figura 142 - Concentrazioni di Fe e S nel legno delle specie a confronto per i diversi trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le specie tra i trattamenti all'interno della stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Il ferro è stato assorbito in maggiori concentrazioni nel sito inquinato, rispetto al controllo, per tutte le specie ad eccezione di *P. alba* che non ha riportato alterazioni evidenti nell'assorbimento tra i tre trattamenti. In riferimento al sito inquinato, differenze significative tra TA e TR sono state ottenute solamente in *S. alba*. Considerando l'effetto principale "specie", *P. tremula* si è dimostrata la specie più attiva nell'assorbimento del ferro.

*P. alba* ha mostrato, quando coltivato nel controllo, assorbimenti maggiori di zolfo in raffronto al sito inquinato dove, in TA vi sono state concentrazioni superiori a TR. In *P. tremula* si è notato un andamento decrescente dell'assorbimento passando da TA a L e a TR. *P. nigra* e *S. alba* non hanno invece presentato differenze statisticamente significative tra i tre trattamenti. In relazione all'effetto principale "specie", in *S. alba* sono state riscontrate le concentrazioni più elevate di zolfo mentre i minori assorbimenti si sono avuti per *P. nigra*; le altre due specie hanno raggiunto valori intermedi (Fig. 142).

#### 4.1.19.4 Concentrazioni standardizzate dei metalli pesanti

Degli otto metalli pesanti Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn si è eseguita un'analisi della somma delle concentrazioni standardizzate (Fig. 143).

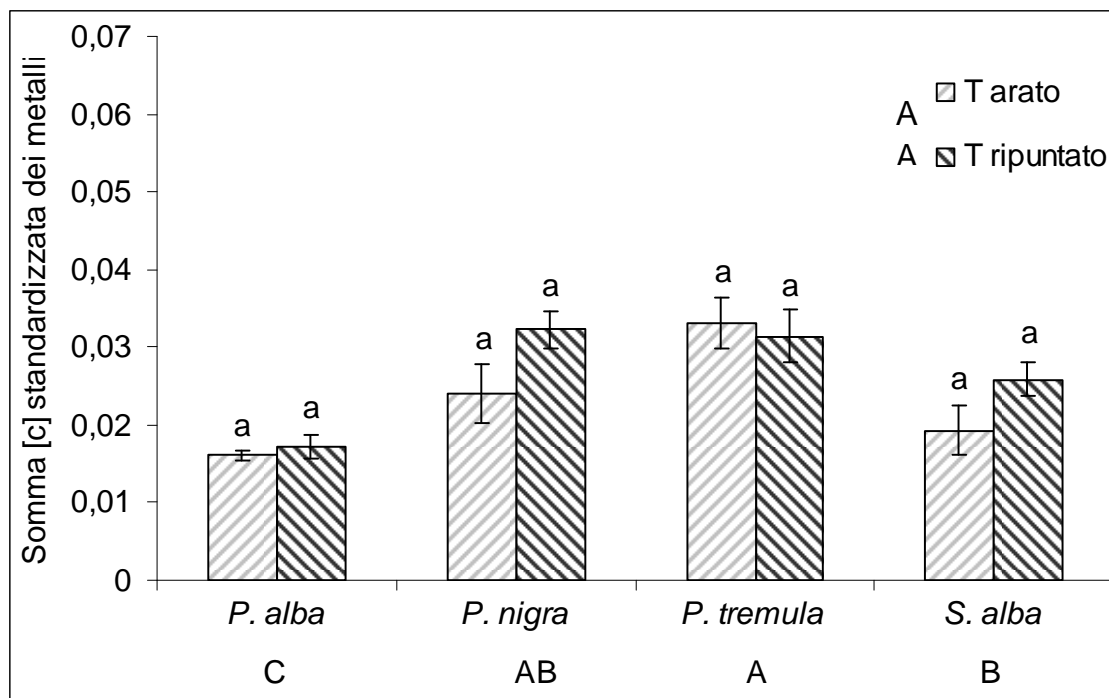


Figura 143 - Somma delle concentrazioni standardizzate di 8 metalli pesanti (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn) rilevate nelle quattro specie. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti nell'ambito della stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per ogni specie, tra i trattamenti TA e TR, non sono state evidenziate variazioni statisticamente significative.

*P. tremula* si è dimostrata la specie che ha assorbito le maggiori concentrazioni degli otto metalli pesanti considerati cumulativamente. Ciononostante, tale specie, come già discusso in precedenza, ha presentato una produzione di biomassa molto scarsa.

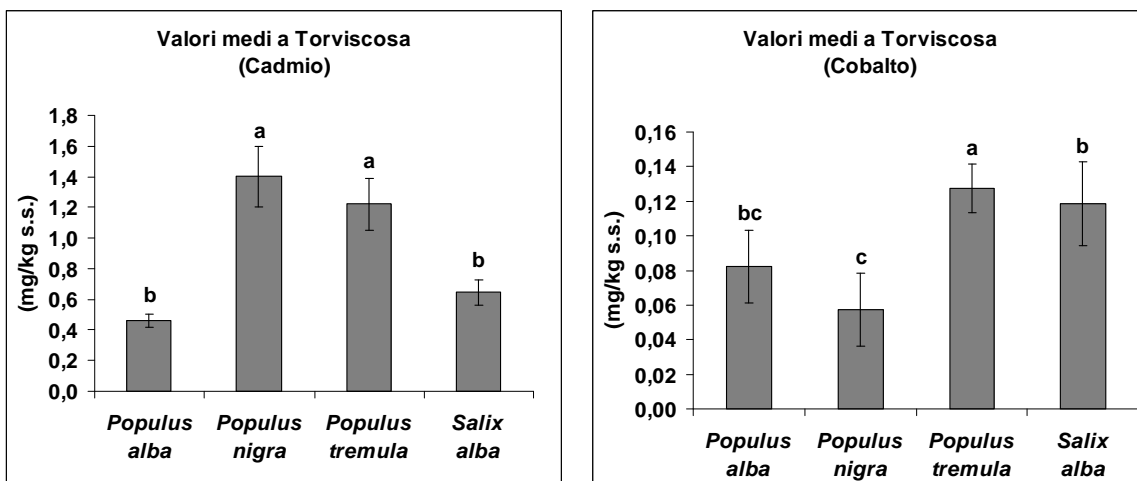
*P. nigra*, seguita da *S. alba*, ha riportato una tendenza all'accumulo dei metalli maggiore in TR in raffronto a TA. *P. alba* è risultata la specie meno efficiente per le basse concentrazioni riscontrate nella biomassa epigea.

Tuttavia, quest'ultima ha raggiunto nel sito inquinato produzioni di biomassa molto più elevate rispetto alle altre specie.

#### 4.1.19.5 Valori medi a Torviscosa

Nel sito di Torviscosa si sono confrontate le medie delle concentrazioni rilevate nelle quattro specie indipendentemente dai trattamenti TA e TR, ossia è stato considerato il solo effetto principale "specie" (Fig. 144).

La specie che si è distinta nell'assorbimento degli otto metalli è risultata *P. tremula*; questa è stata l'unica specie ad assorbire il piombo, seppur in concentrazioni molto scarse. Maggiori concentrazioni nel *P. tremula*, in raffronto alle altre piante, sono state rilevate per il cobalto, il cromo, il nichel, il manganese e lo zinco. Il *S. alba* ha mostrato buone capacità di accumulo per cobalto e rame mentre il *P. nigra* ha concentrato a buoni livelli il cadmio e lo zinco. Nel *P. alba*, rispetto alle altre specie, si sono invece ottenute le più basse concentrazioni di tutti gli 8 elementi analizzati.



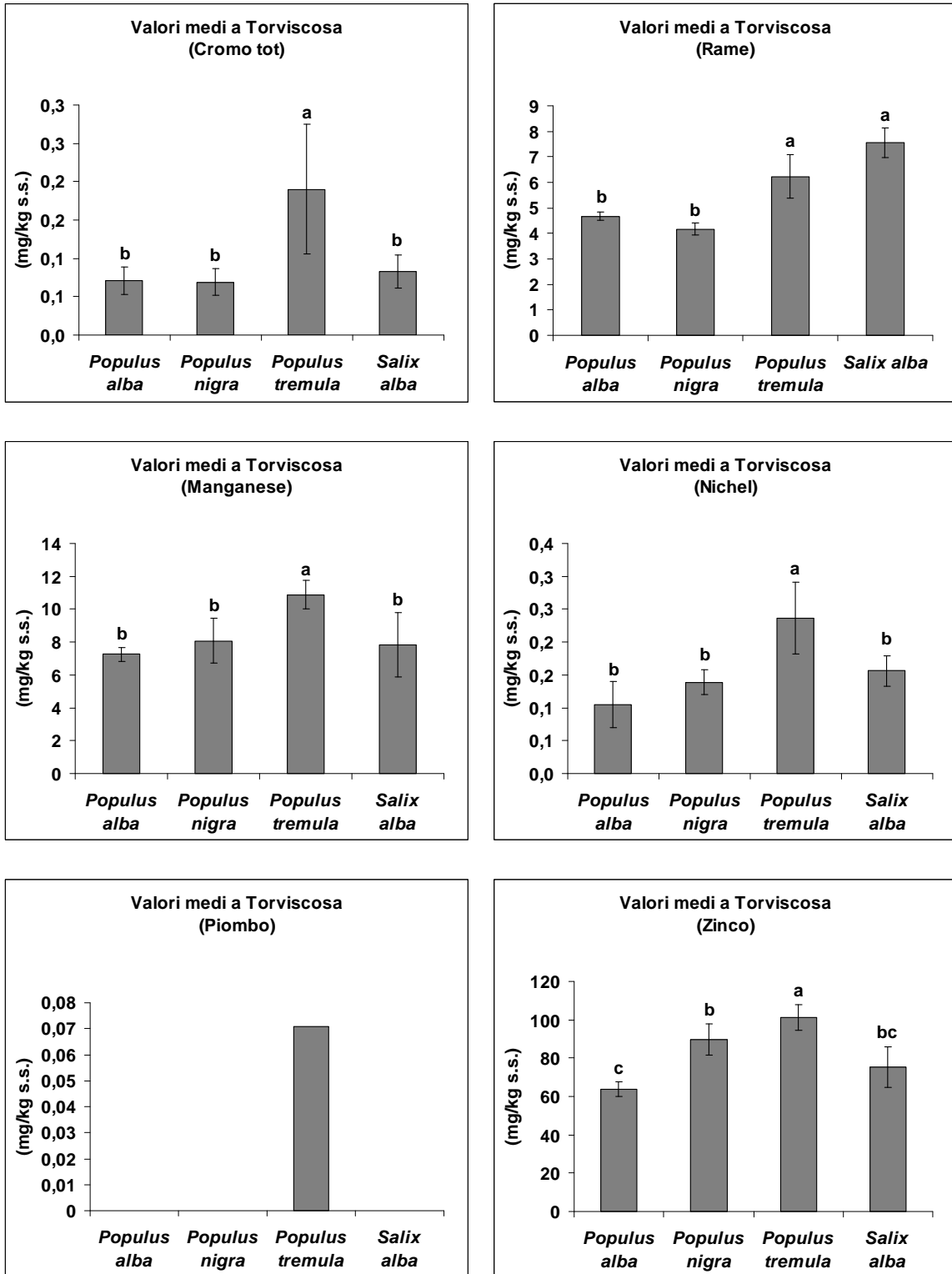
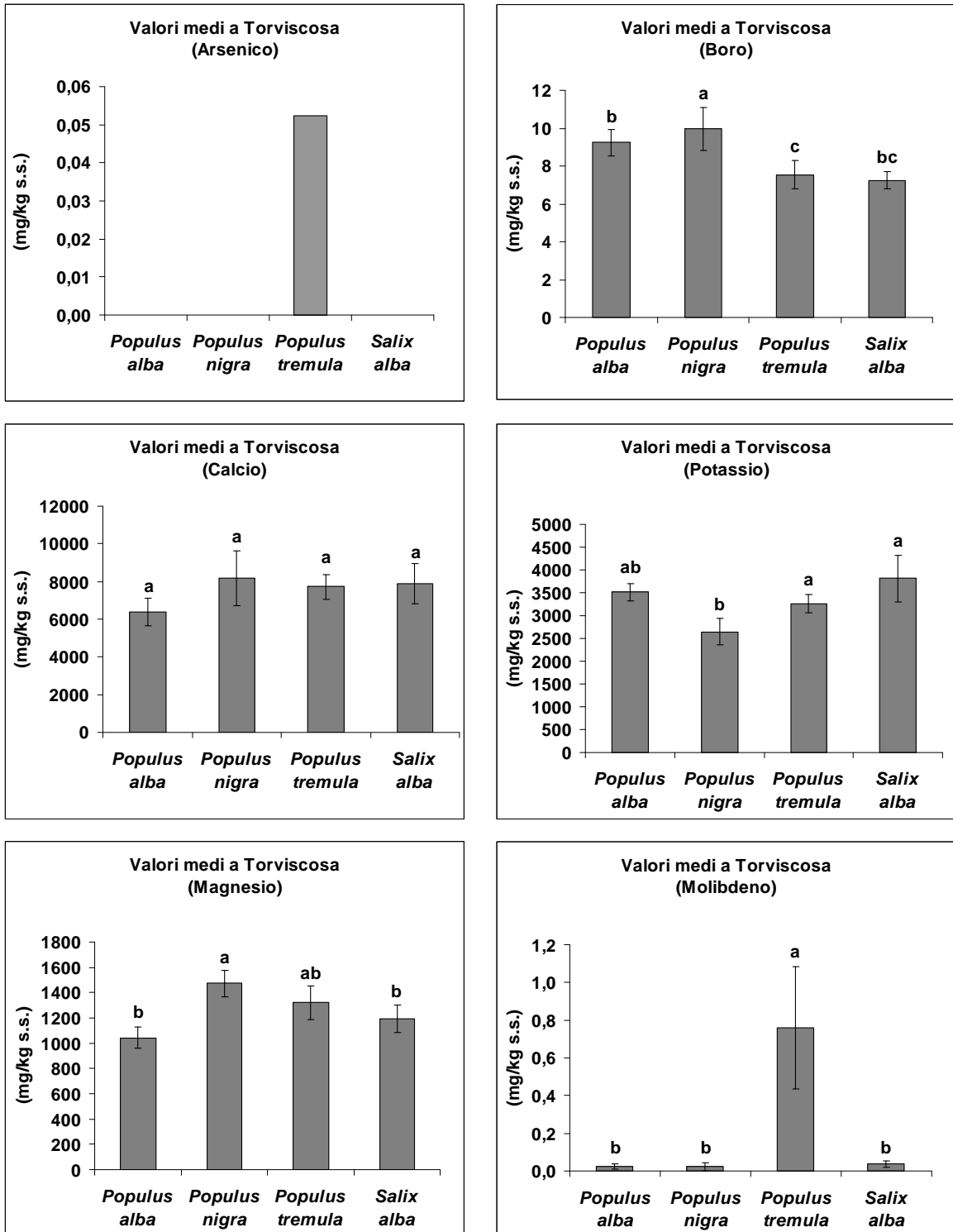


Figura 144 - Valori medi delle concentrazioni di 8 metalli pesanti (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb, Zn) ottenute nei due trattamenti di Torviscosa (TA e TR), per le 4 specie considerate. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Si sono confrontati i valori medi delle concentrazioni rilevate nel sito inquinato, nelle quattro specie testate, per gli altri elementi quali As, B, Ca, K, Na, Mg, P, Mo e V (Fig. 145).





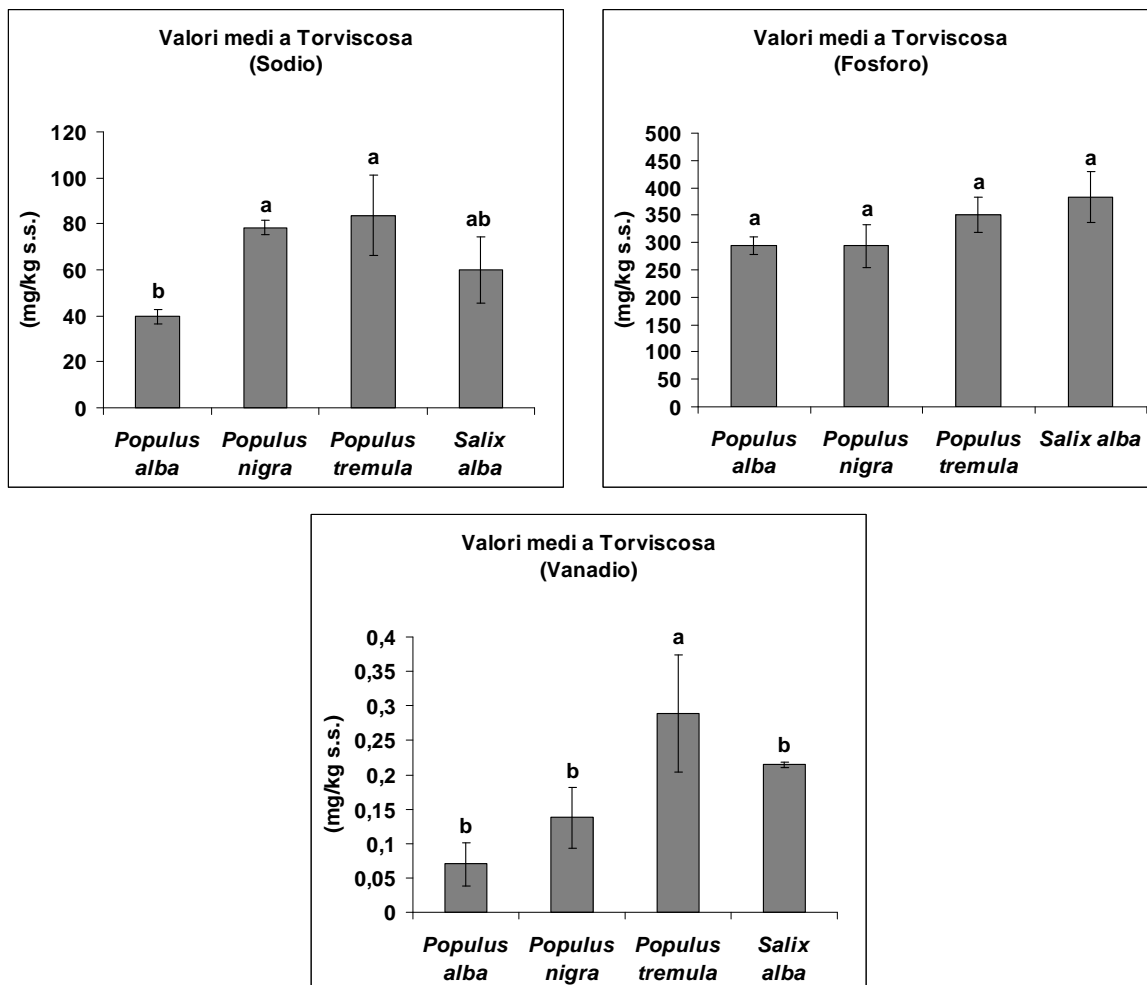


Figura 145 - Valori medi delle concentrazioni di alcuni elementi ottenute a Torviscosa, per le 4 specie considerate. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Anche in questo caso, *P. tremula*, per i tre metalli pesanti As, Mo e V, si è rivelata la specie migliore rispetto alle altre. Evidenti differenze si sono notate soprattutto per As e Mo. Per quanto riguarda gli altri elementi, *P. tremula* si è dimostrata la specie meno efficiente solo nel caso del boro, per il quale si sono avute differenze statisticamente significative rispetto alle altre specie. Per il P e il Ca non si sono ottenute variazioni significative tra le specie, mantenendosi tutte sugli stessi livelli di assorbimento, dell'ordine di alcune centinaia di ppm per il primo elemento e di alcune migliaia di ppm per il secondo. In *P. nigra* sono state misurate concentrazioni superiori, a quelle rinvenute in altre specie,

per elementi come il B e il Mg, ma assorbimenti inferiori per K. *P. alba* ha mostrato valori di assorbimento minori per Na e Mg.

Si sono analizzati anche i valori medi delle concentrazioni di Fe e S nelle quattro specie considerate, mediando i due trattamenti nel sito inquinato (Fig. 146).

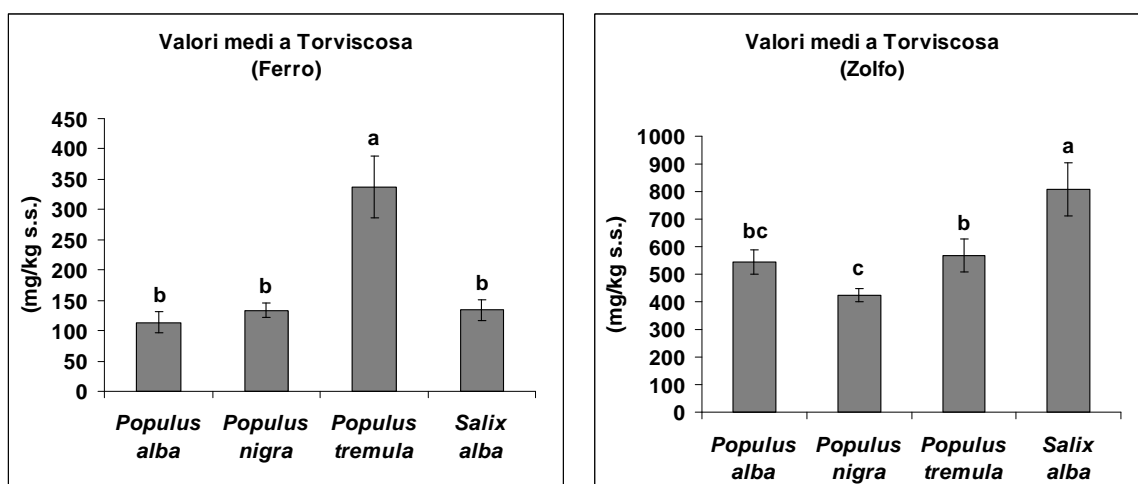


Figura 146 - Valori medi delle concentrazioni di Fe e S ottenute nei due trattamenti di Torviscosa (TA e TR), per le 4 specie considerate. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per il Fe, concentrazioni elevate sono state misurate in *P. tremula* che si è dimostrata ancora una volta la specie più efficiente; le altre specie hanno mostrato valori molto più bassi e simili tra loro. Nel caso dello zolfo, la specie che ha dato i migliori risultati nell'assorbimento è stata *S. alba*, raggiungendo valori di 809 mg/kg di sostanza secca; sono seguiti, in ordine decrescente di accumulo, *P. tremula*, *P. alba* e *P. nigra*, con concentrazioni, riscontrate in quest'ultima specie, che sono state di circa la metà rispetto a quelle rinvenute in *S. alba*.

#### 4.1.20 Asportazioni

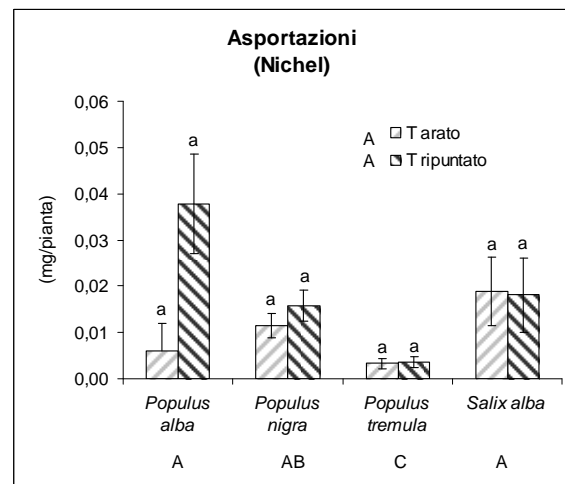
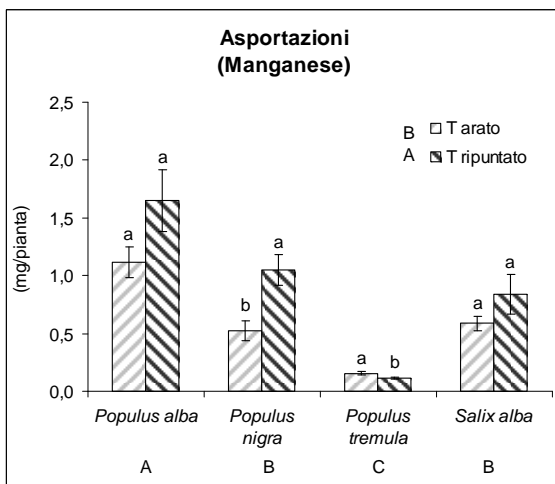
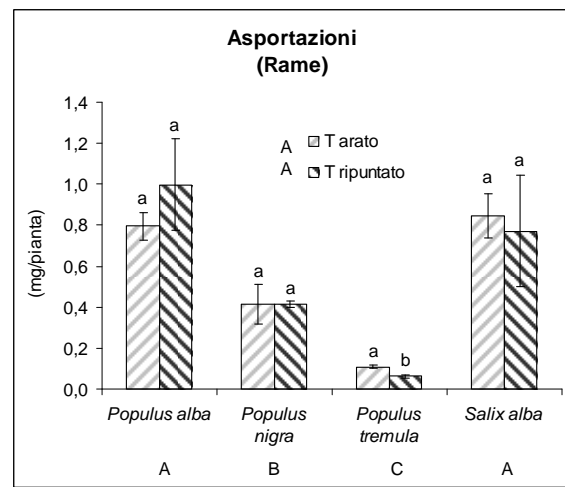
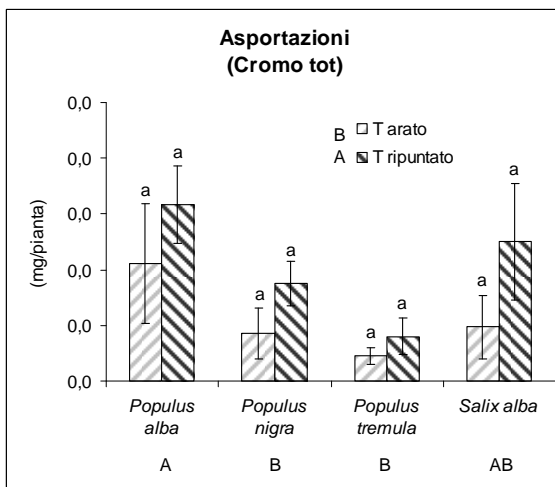
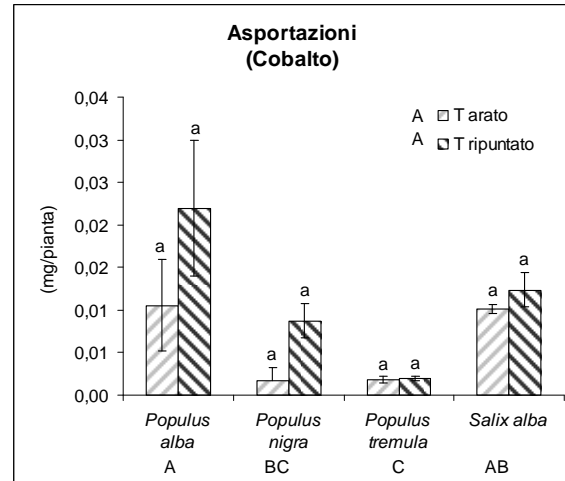
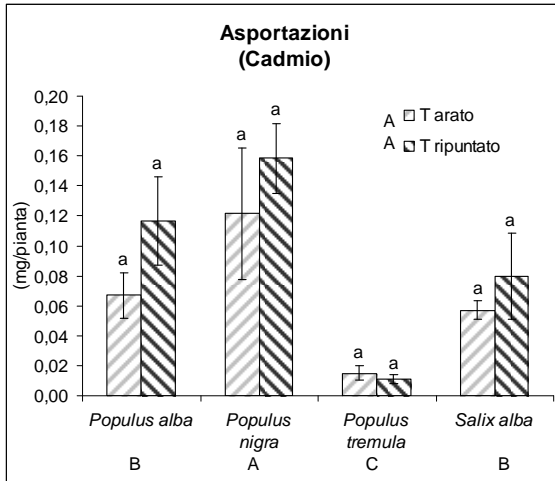
Si sono calcolate le asportazioni (peso secco × concentrazione) degli elementi analizzati per le specie considerate, separatamente tra i due trattamenti di Torviscosa, TA e TR.

##### 4.1.20.1 Asportazioni di metalli pesanti

Considerando l'interazione "specie × trattamento", dal grafico in Fig. 147, si può notare che per tutte le specie, in riferimento ad ogni metallo considerato, non vi sono state differenze statisticamente significative tra TA e TR, probabilmente a causa delle forte variabilità dei dati, ad eccezione di *P. tremula* per l'asportazione di rame e manganese, per i quali questa pianta ha presentato valori maggiori in TA rispetto a TR, e *P. nigra* che ha asportato invece una maggiore quantità di Mn in TR. In generale, tuttavia, è prevalsa la tendenza verso una maggiore asportazione di metalli in condizioni di mantenimento della stratigrafia esistente (TR, ripuntatura), rispetto ad una situazione di rimescolamento degli strati.

In riferimento all'effetto principale "trattamento" sono state rilevate variazioni significative tra TA e TR soltanto per cromo e manganese, per i quali si sono avute asportazioni superiori in TR in raffronto a TA.

Tra le specie saggiate, *P. tremula* si è rivelata la meno efficace per le bassissime asportazioni, fatto dovuto essenzialmente alla sua scarsa produzione di biomassa. Ciononostante è stata l'unica specie ad accumulare valori rilevabili di piombo, seppur in minime quantità. *P. alba* si è distinta dalle altre specie per le superiori asportazioni di Co, Cr, Cu, Ni, Mn e Zn. *P. nigra* e *S. alba* hanno mostrato generalmente, rispetto alle altre due specie, valori intermedi di asportazioni.



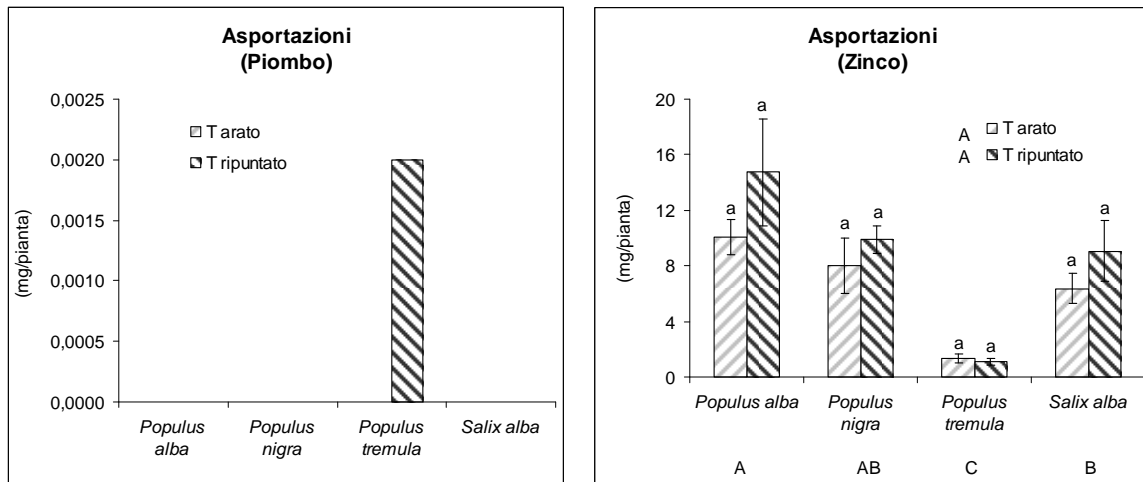


Figura 147 - Asportazioni di 8 metalli pesanti (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn) nelle diverse specie e trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti all'interno della stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Nel grafico in figura 147 si può notare come *P. tremula* sia risultata la specie meno efficiente rispetto alle altre e si sia diversificata per avere asportato quantità degli otto metalli leggermente superiori in TA piuttosto che in TR ( $P \geq 0,05$ ). Le modeste asportazioni si possono imputare alla scarsissima produzione di biomassa, dato che le concentrazioni riscontrate in tale specie sono state le più elevate. Non occorre dimenticare tuttavia, che *P. tremula* è una specie a lento accrescimento e che al momento del trapianto, sono state utilizzate talee di un anno e non di 2 anni come per le altre specie. Non è pertanto da escludere che *P. tremula* possa offrire negli anni successivi risultati interessanti.

*P. alba* ha presentato le migliori asportazioni degli otto metalli pesanti, risultato in gran parte imputabile all'elevato ritmo di accrescimento, poiché le concentrazioni dei metalli sono risultate essere le più basse.

*P. nigra* e *S. alba* hanno presentato un comportamento intermedio rispetto alle altre due specie. In questo caso però, il risultato è dipeso più dalle elevate concentrazioni piuttosto che della quantità di biomassa. La maggiore concentrazione di metalli rilevata in TR, unitamente alla maggiore densità

radicale, come è già stato evidenziato in precedenza in figura 148, hanno contribuito ad un migliore risultato operativo rispetto al terreno arato (TA).

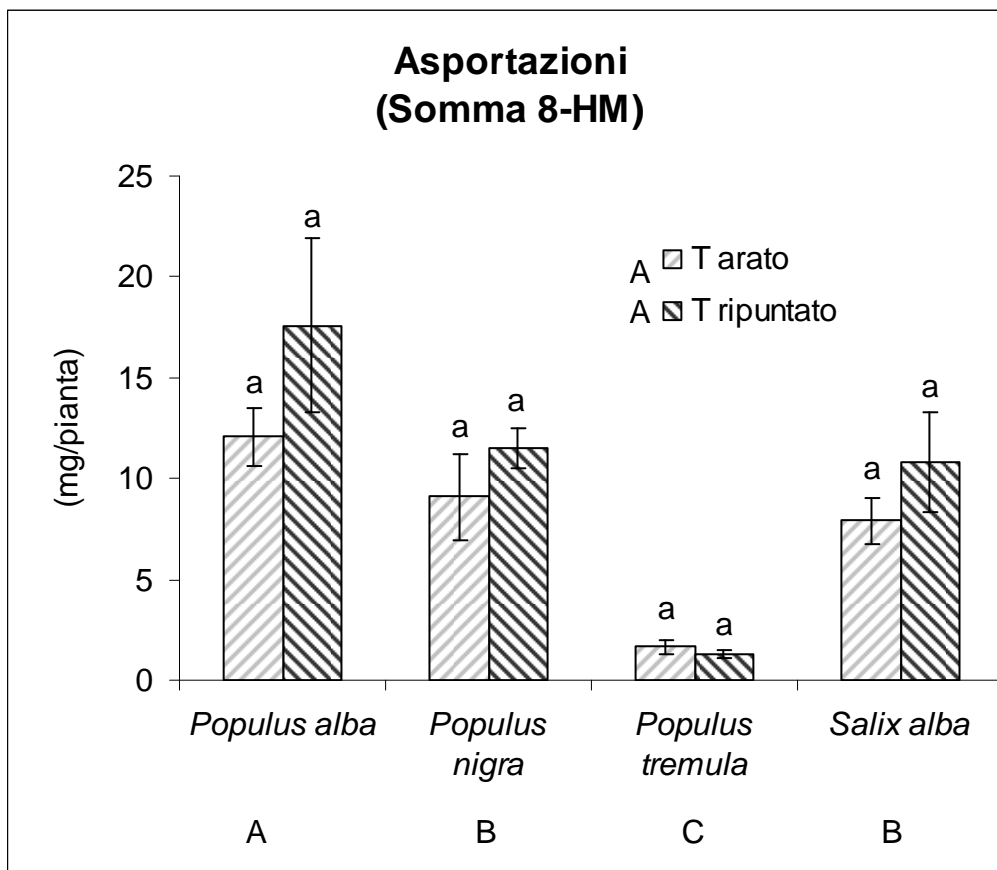


Figura 148 - Asportazioni cumulate (peso) di 8 metalli pesanti (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti all'interno delle stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Nel grafico in figura 149 sono rappresentate, espresse in g/ha, le asportazioni stimate di otto metalli pesanti considerati complessivamente, per le 4 specie saggiate, ipotizzando un impianto fitto di tipo *short-rotation-coppice* con un sesto d'impianto di 2,8 m × 0,4 m, ottenendo quindi 8928 piante/ha.

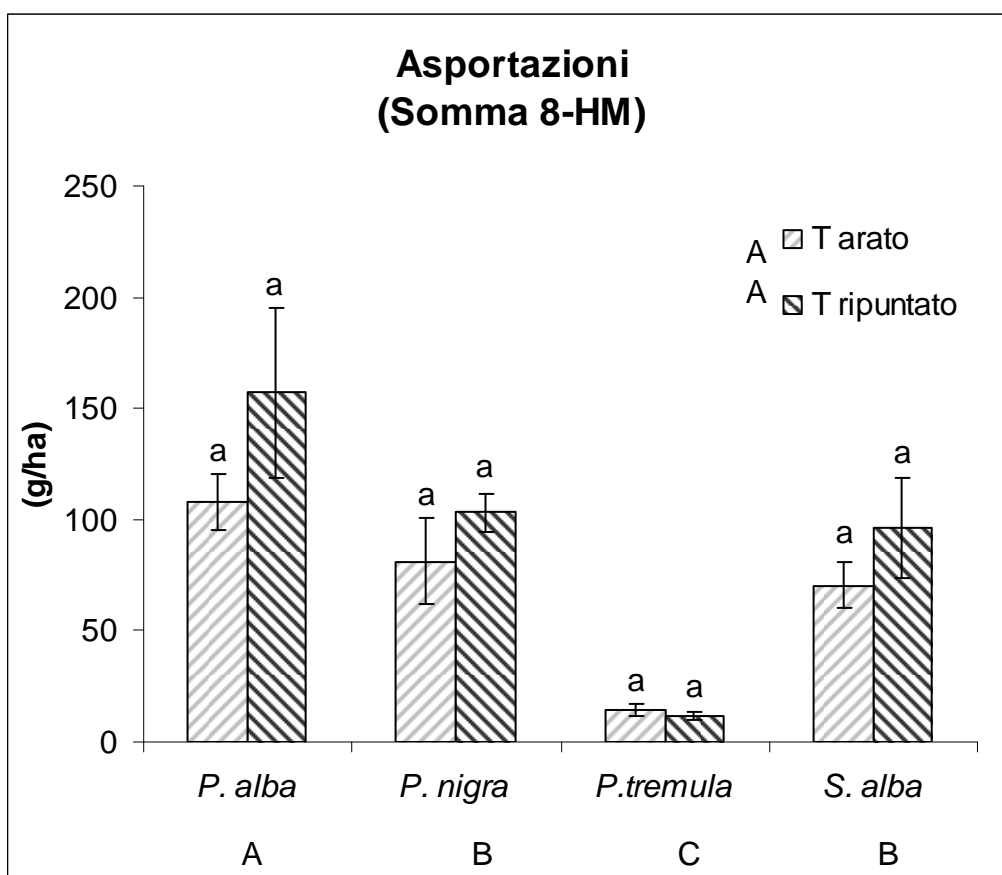


Figura 149 - Stima delle asportazioni complessive (g/ha) di otto metalli pesanti (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn), ottenute da un impianto fitto di tipo short-rotation-coppice con sesto d'impianto di 2,8 m x 0,4 m (8928 piante per ettaro). Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i due trattamenti per la stessa specie (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Sono state confrontate le percentuali di presenza degli otto metalli sul totale delle asportazioni per ciascuna specie, nei due diversi trattamenti di Torviscosa (TA e TR) (Fig. 150).

Gli elementi maggiormente asportati sono risultati, in ordine decrescente, zinco, manganese, rame e cadmio.

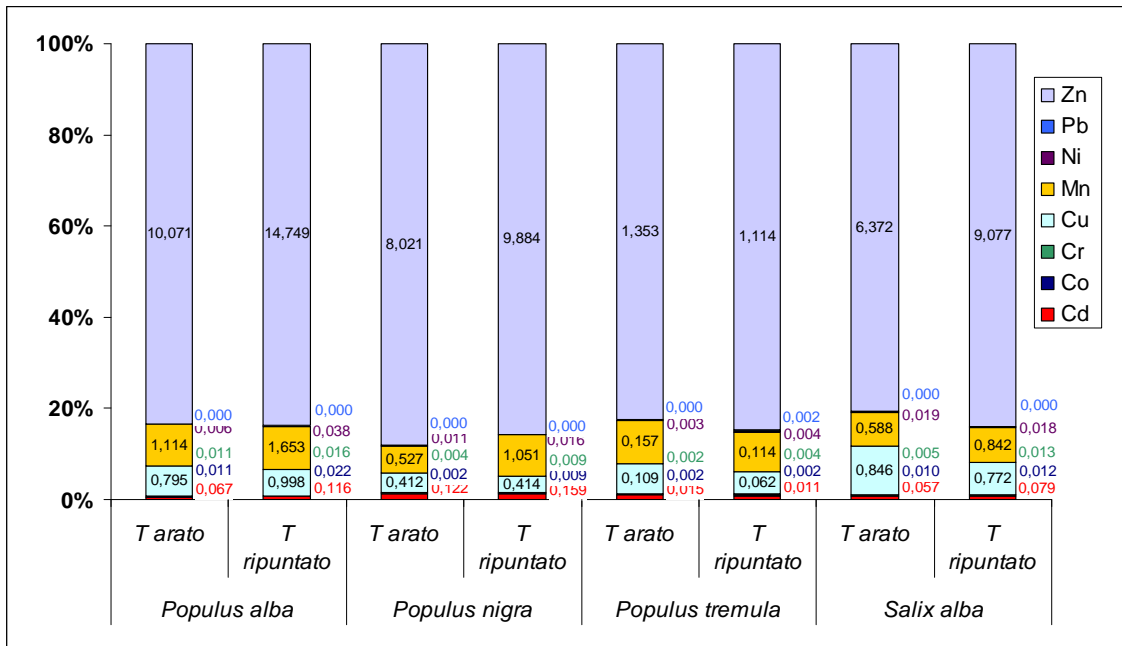


Figura 150 - Percentuali di presenza di metalli, sul totale delle asportazioni, per ciascuna specie e trattamento. In etichetta sono riportati i valori delle concentrazioni (ppm) dei singoli metalli.

#### 4.1.20.2 Asportazioni di ferro e zolfo

Sono state analizzate separatamente le asportazioni di Fe e S, elementi molto presenti nelle ceneri di pirite (Fig. 151).

Il Fe è stato asportato in quantità significativamente superiori in TA rispetto a TR solamente in *P. tremula*.

Le altre tre specie non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i due trattamenti TA e TR, nonostante vi sia stata una tendenza generale ad asportare quantità più elevate in TR piuttosto che in TA. Per quanto riguarda l'effetto "trattamento", non vi sono state differenze significative, mentre considerando l'effetto principale "specie" *P. alba* ha ottenuto, ancora una volta, i migliori risultati differenziandosi nettamente da *P. tremula*, rivelatasi invece la specie meno efficace. Valori di asportazioni intermedi sono stati rinvenuti nelle altre due specie.

Per lo zolfo le specie più efficienti nelle asportazioni sono state *P. alba* e *S. alba*, seguite da *P. nigra* e *P. tremula*.



Per quanto riguarda gli effetti principali “trattamento” non sono state riscontrate differenze statisticamente significative.

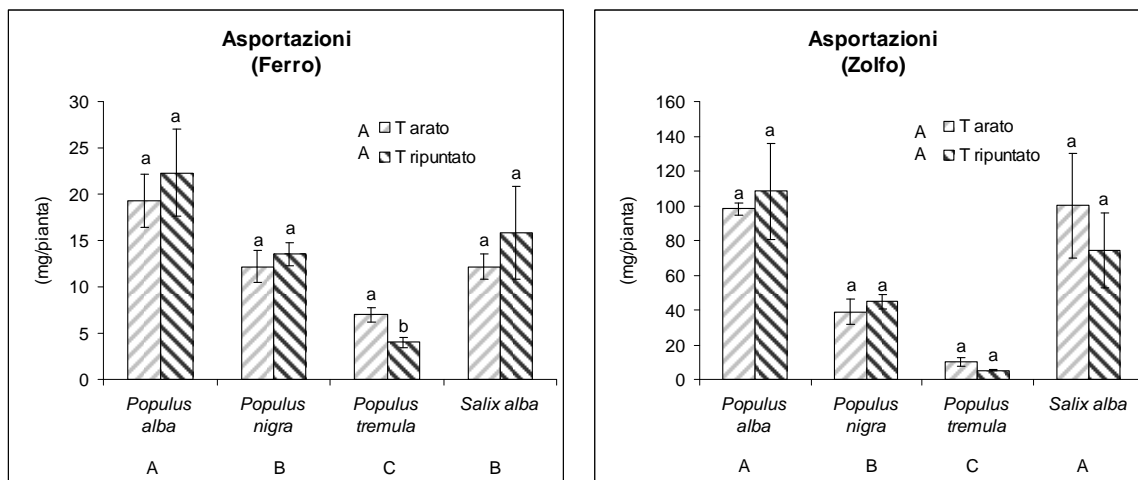


Figura 151 - Asportazioni di Fe e S nelle specie a confronto per i due trattamenti TA e TR. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti nell'ambito della stessa specie. Sono riportate anche le lettere di significatività degli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.21 Analisi sulla parte ipogea

##### 4.1.21.1 Diametri radicali

Sono state confrontate le variazioni dei diametri radicali delle quattro specie, nei tre trattamenti, al variare della profondità (Fig. 152). Sono stati ricavati i valori medi dei diametri relativi alle due posizioni di carotaggio. Al di sotto dei 30 cm i diametri dei tre trattamenti non sono più confrontabili, per la mancanza di radici nel terreno inquinato.

In *P. alba*, nei primi 20 cm, si sono ottenute variazioni significative tra i diametri nel terreno inquinato rispetto a quelli del controllo, questi ultimi risultando notevolmente inferiori. Tra i 20 e i 30 cm non si sono riscontrate differenze sostanziali tra TA e L, i cui valori sono stati nettamente inferiori a quelli rilevati in TR, anche se per quest'ultimo trattamento la variabilità è risultata molto elevata.

*P. nigra* e *P. tremula* hanno presentato un comportamento simile. Nei primi 20 cm si è registrata una tendenza ad assumere diametri maggiori a Torviscosa rispetto a Legnaro. A profondità di 20-30 cm i diametri sono risultati simili in L e TR, ma inferiori a quelli di TA.

In *S. alba*, nei primi 30 cm, non si sono notate differenze statisticamente significative tra i valori di diametri in TA e TR, ma leggermente superiori a quelli relativi a Legnaro.

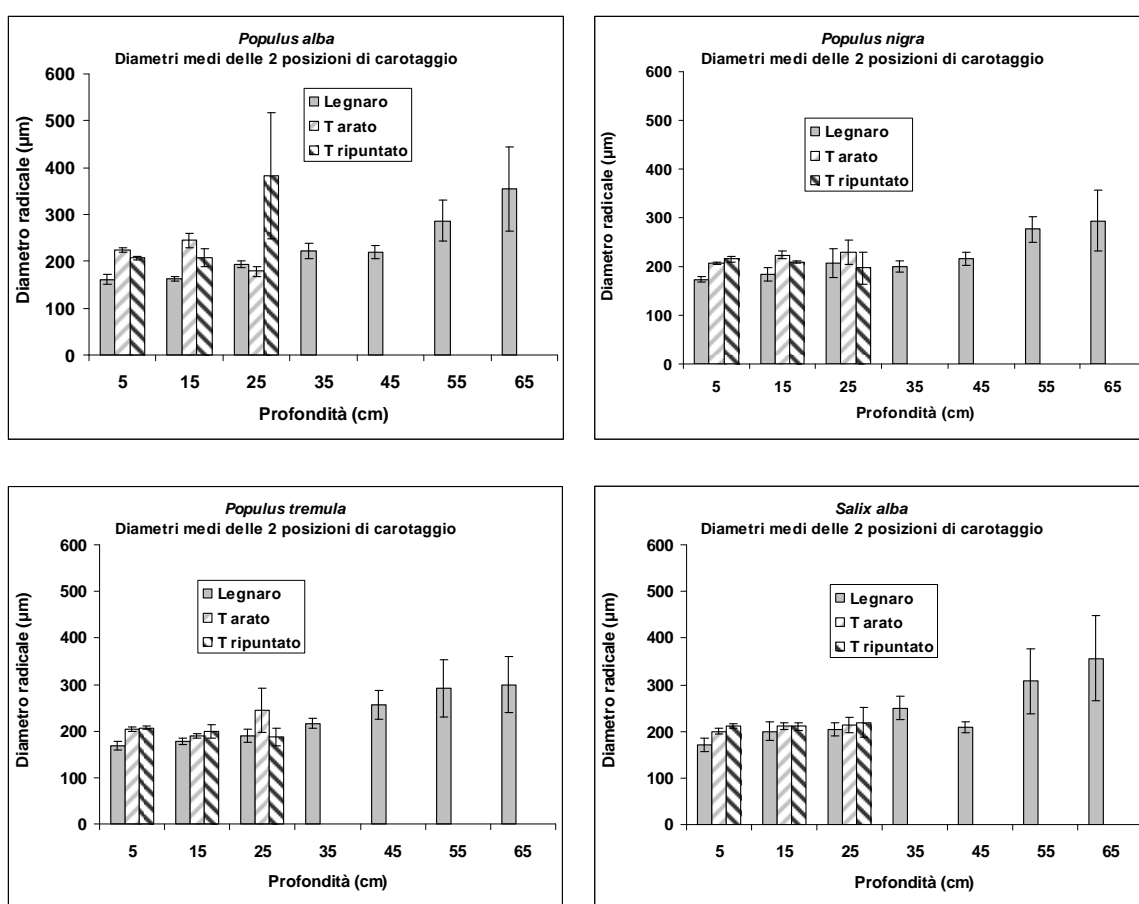


Figura 152 - Diametri radicali per ogni specie studiata, nei tre trattamenti: valori medi di due posizioni di carotaggio (10 e 20 cm di distanza dal fusto). Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

Poiché dall'analisi statistica non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le misure di diametro effettuate ad una distanza di 10 cm e quelle a 20 cm dal fusto, è stato ragionevole mediare i dati delle due posizioni.

Dalla tabella 27, considerando l'effetto principale "specie", non si è notata alcuna differenza significativa.

In relazione all'effetto principale "trattamento", i diametri maggiori, rispetto a Legnaro, si sono ottenuti nel terreno inquinato, con valori più elevati in TR, seguiti da TA.

La differenza tra i diametri di L e quelli del sito inquinato, è probabilmente imputabile alla diversa massa volumica tra il substrato di Torviscosa e quello di Legnaro, risultata molto più elevata nelle ceneri di pirite, e alla scarsa porosità del substrato inquinato che hanno indotto un aumento del diametro radicale.

Tabella 27 - Analisi statistica del diametro radicale, per agli effetti principali "specie" e "trattamento" (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ). I valori sono espressi in  $\mu\text{m}$ .

Effetto principale SPECIE	
<i>P. alba</i>	260,7 a
<i>P. nigra</i>	252,6 a
<i>P. tremula</i>	264,1 a
<i>S. alba</i>	267,5 a

Effetto principale TRATTAMENTO	
L	237,9 b
TA	269,4 ab
TR	276,3 a

#### 4.1.21.2 Densità di lunghezza radicale volumetrica (RLD)

Degli apparati radicali delle specie testate si è calcolata la densità di lunghezza radicale, ricavata attraverso l'analisi delle immagini delle radici. La RLD esprime la lunghezza di radici (cm) contenuta nel volume di suolo ( $\text{cm}^3$ ). La lunghezza radicale volumetrica è stata ricavata da carote di terreno prelevate ad una distanza di 10 cm e 20 cm dal fusto per tutte le specie. In questa prima analisi, i valori delle due posizioni di carotaggio sono stati mediati e si sono confrontati, per ogni specie, i tre trattamenti (Fig. 153).

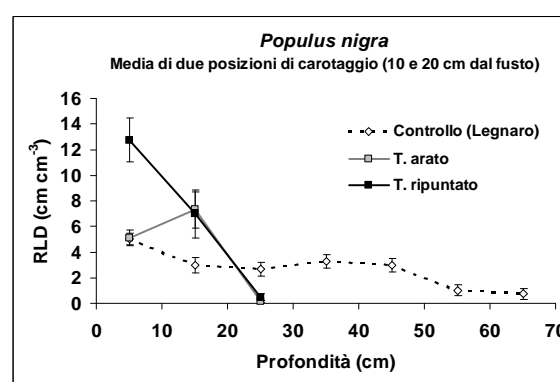
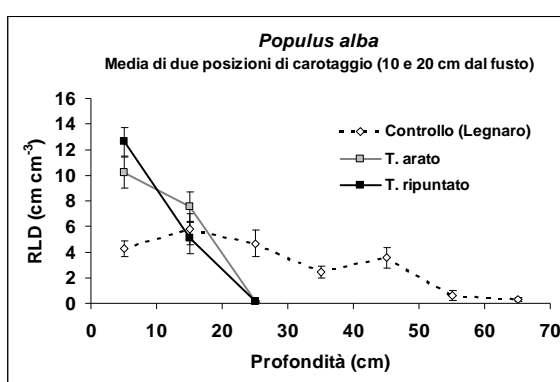
*P. alba* ha raggiunto i valori più elevati di RLD nel trattamento ripuntato, con valori di  $12,6 \text{ cm cm}^{-3}$  nei primi 10 cm di profondità, seguiti da valori minori nel TA ( $10,2 \text{ cm cm}^{-3}$ ), scendendo però rapidamente a valori di  $0,12 \text{ cm cm}^{-3}$  a 25 cm di profondità. A Legnaro le radici hanno raggiunto una profondità

di 65 cm, con una densità variabile tra 4,3 cm cm<sup>-3</sup> (a 5 cm di profondità) e 0,3 cm cm<sup>-3</sup> (a 65 cm).

Anche in *P. nigra* la densità radicale più elevata è stata misurata nel terreno ripuntato; a Legnaro e nel TA la RLD era di 5,1 cm cm<sup>-3</sup> nei primi 10 cm di profondità, distinguendosi in seguito tra i due trattamenti; a Legnaro i valori di densità radicale hanno subito un decremento fino a raggiungere i 0,7 cm cm<sup>-3</sup> tra i 60 e 70 cm di profondità. Nell'arato, come nel ripuntato, i valori minimi si sono ottenuti tra i 20 e i 30 cm di profondità.

In *P. tremula* i valori di RLD hanno seguito, in TA e TR, una rapida discesa fino a raggiungere i valori minimi tra i 20 e 30 cm di profondità. Un trend simile a quello della specie precedente è stato riscontrato nel controllo, dove però si sono rilevati, nei primi 10 cm di profondità, valori di lunghezza radicale superiori a quelli delle altre specie.

*S. alba* ha mostrato una densità di lunghezza radicale volumetrica molto elevata in TR, dove ha subito, come nelle altre specie, una diminuzione drastica fino a toccare i valori minimi tra i 20 e i 30 cm, pari a 0,7 cm cm<sup>-3</sup>. Nel TA si è registrato un leggero incremento di RLD nei primi 15 cm, seguito poi da una rapida discesa fino a fermarsi a valori di 2,6 cm cm<sup>-3</sup> a 25 cm di profondità, al di sotto dei quali non si sono rilevate radici. In L si è avuta una RLD di 4,5 cm cm<sup>-3</sup> nei primi 10 cm di profondità, che è diminuita progressivamente a 0,3 cm cm<sup>-3</sup> tra i 60 e i 70 cm.



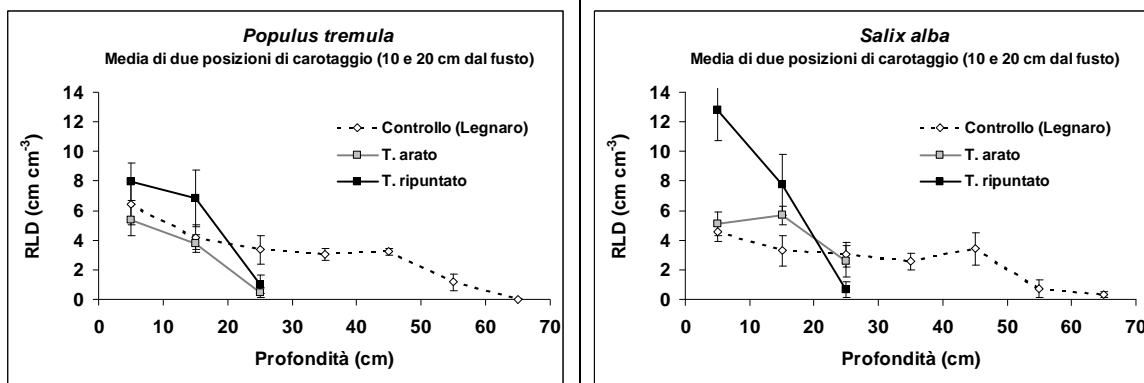


Figura 153 - Densità di lunghezza radicale volumetrica delle specie saggiate, nei tre trattamenti. Le barre verticali indicano l'errore standard.

Quindi, in generale si può notare che nei due trattamenti presenti nel sito inquinato le radici si approfondiscono soltanto fino a 25 cm di profondità, a differenza di Legnaro in cui tutte le specie hanno raggiunto i 65 cm di profondità, assumendo un andamento di RLD abbastanza uniforme fino ai 45 cm. Queste differenze nell'approfondimento di TR e TA rispetto al controllo sono verosimilmente dovute all'insospitalità e all'anomala composizione del sito inquinato di Torviscosa.

*P. nigra* e *S. alba* hanno presentato, nel trattamento ripuntato, i valori maggiori di lunghezza radicale volumetrica. Questo aspetto assume particolare significato se comparato con la figura 4.7, relativa alla somma delle concentrazioni standardizzate dei metalli nelle specie. Infatti, le maggiori concentrazioni rilevate in *P. nigra* e *S. alba* nel trattamento TR potrebbero essere spiegate dai valori elevati di RLD riscontrati in TR per queste due specie.

#### 4.1.21.3 RLD vs. biomassa epigea

Si è analizzata la correlazione tra i valori di densità radicale ottenuti mediamente tra le due posizioni di carotaggio e la produzione di biomassa aerea nel sito inquinato.

Osservando il grafico in figura 154 si nota una correlazione positiva, non significativa con un coefficiente di determinazione pari a 9,7%. Sembra quindi che, in un substrato inquinato all'aumentare della lunghezza dell'apparato

radicale, non corrisponda un aumento della produzione di biomassa aerea. Tale incremento può invece essere motivato da una risposta ad un fattore di stress.

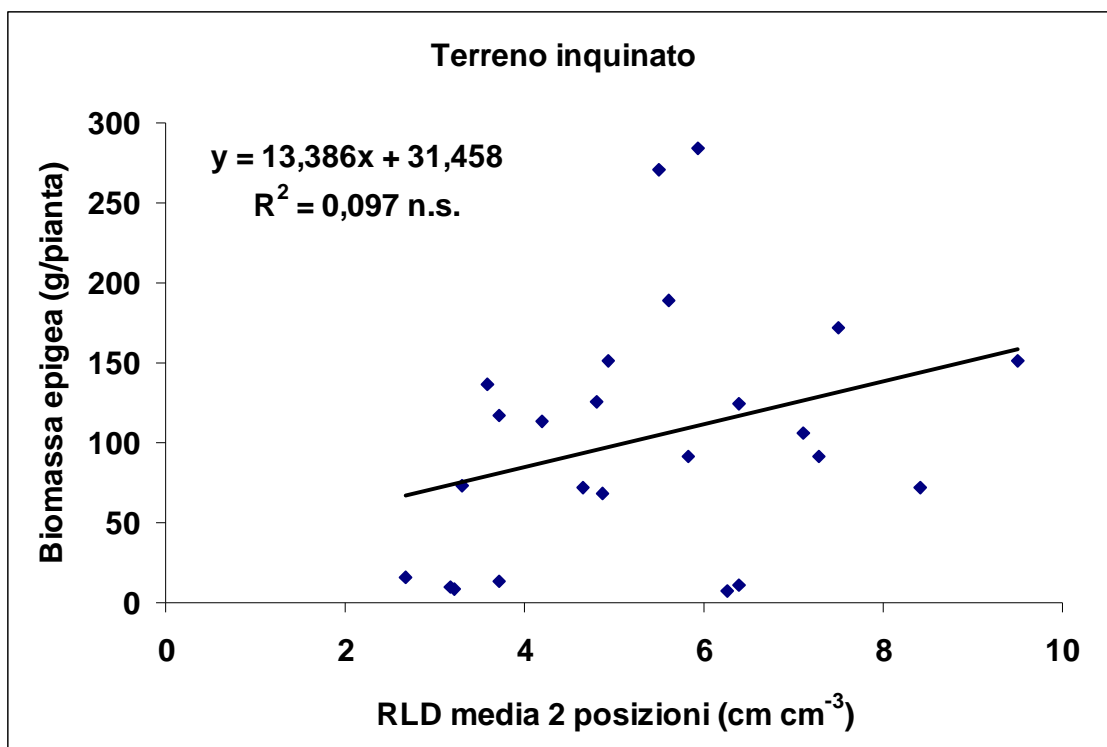


Figura 154 - Correlazione tra lunghezza radicale volumetrica (RLD) e biomassa epigea nel sito inquinato (dati dei trattamenti TA e TR).

#### 4.1.21.4 RLD vs. concentrazione di metalli pesanti

Si è effettuata l'analisi di correlazione tra la densità radicale (valori di RLD mediati tra le due posizioni di carotaggio) e la somma delle concentrazioni standardizzate degli otto metalli pesanti (Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn) rilevati nei tessuti legnosi (epigei) delle specie testate nel sito inquinato (Fig. 155). La retta ottenuta ha presentato un coefficiente di regressione negativo, ed è risultata non significativa; non è stato quindi possibile dimostrare un ruolo diretto dello sviluppo radicale nella concentrazione di metalli pesanti come sembravano indicare prove precedenti.

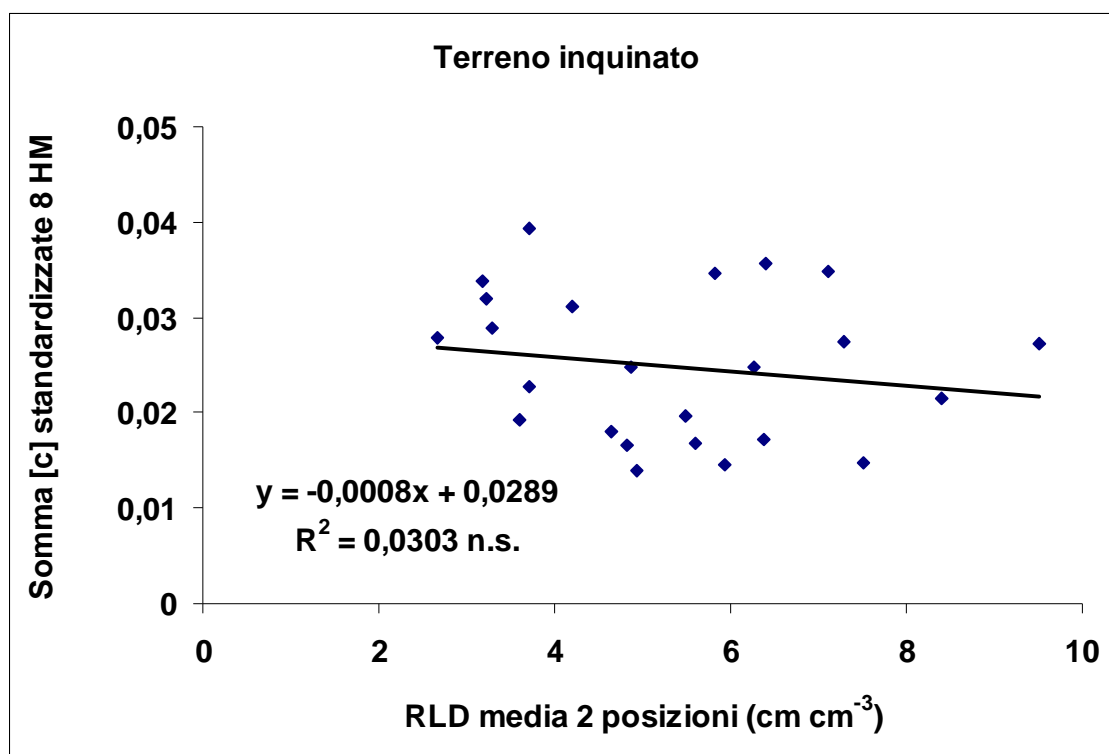


Figura 155 - Figura 4.13. Correlazione tra lunghezza radicale volumetrica (RLD) e somma delle concentrazioni standardizzate di Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn rilevate nelle specie coltivate nel sito inquinato.

#### 4.1.21.5 RLD vs. asportazioni di metalli pesanti

Si è voluto confrontare i valori di RLD con quelli relativi alle asportazioni dei metalli Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn riscontrati nelle specie oggetto di studio nel sito contaminato di Torviscosa (Fig. 156). La correlazione tra i valori analizzati è risultata anche in questo caso non significativa, con un coefficiente di determinazione della retta ( $R^2$ ) pari a 13,46%. Per le specie arboree, non sembra quindi, determinante lo sviluppo di apparati radicali profondi nella dinamica di assorbimento dei metalli pesanti. Resta da sottolineare che, tali apparati hanno comunque avuto uno sviluppo molto ridotto, rispetto allo sviluppo registrato a Legnaro.

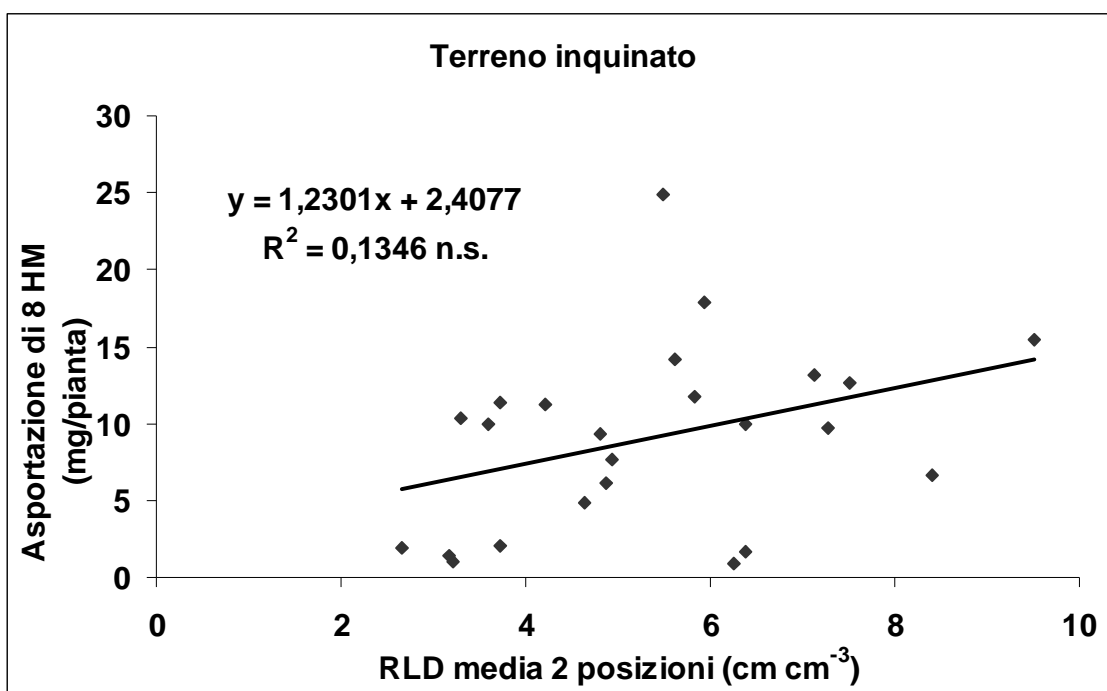


Figura 156 - Correlazione tra lunghezza radicale volumetrica (RLD) e asportazioni di Co, Cr, Cu, Cd, Ni, Mn, Pb e Zn da parte delle specie coltivate nel terreno inquinato.

#### 4.1.21.6 Capacità elettrica

Con il capacimetro si sono rilevati i valori di capacità elettrica relativi agli apparati radicali delle quattro specie considerate nei tre trattamenti. I valori più elevati di capacità elettrica sono stati riscontrati a Legnaro (Fig. 157), differenziandosi significativamente dal sito inquinato, per tutte le specie, ad eccezione di *P. tremula*. In quest'ultima non sono stati misurati valori di capacità elettrica statisticamente diversi tra i tre trattamenti. Nelle altre tre specie i due trattamenti TR e TA hanno presentato valori molto simili tra loro.

In relazione all'effetto principale "specie", *S. alba* ha mostrato i valori di capacità elettrica più elevati, in conseguenza probabilmente ad un apparato radicale più sviluppato mentre i valori più bassi sono invece stati misurati in *P. tremula*. Un comportamento intermedio è stato registrato nelle altre due specie.



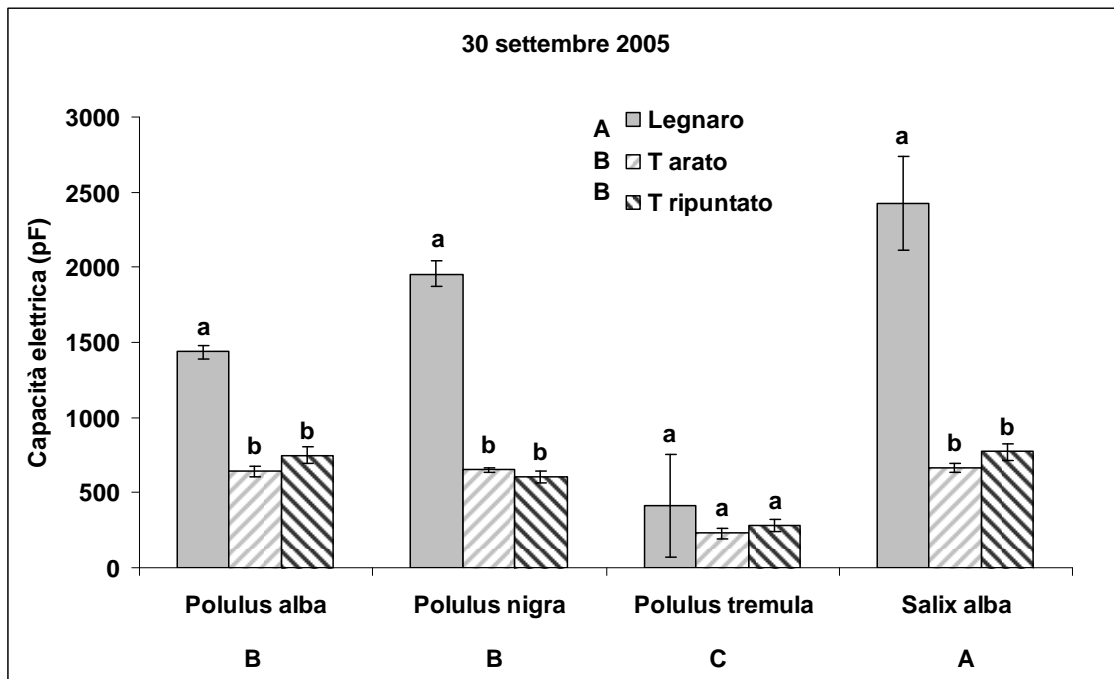


Figura 157 - Valori di capacità elettrica per le specie a confronto nei tre trattamenti. Le barre verticali rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti all'interno di ogni specie. Sono riportate le lettere di significatività per gli effetti principali (Test Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.21.7 Capacità elettrica vs. RLD

Si sono confrontati i valori rilevati con il capacimetro e quelli ottenuti con il carotaggio espressi come RLD al fine di valutare la bontà del metodo non distruttivo.

Dal confronto tra i valori medi ottenuti dal metodo distruttivo e dal metodo elettrico, indipendentemente dalle specie e dai trattamenti considerati, raffrontando dapprima i valori relativi alla RLD ricavati dalla carota estratta a 10 cm dal fusto, poi a 20 cm ed infine i valori medi ottenuti dalle due posizioni di carotaggio, si può osservare che in tutti e tre i casi, le correlazioni con il metodo elettrico sono non significative, con coefficienti di determinazione molto bassi, con una nebulosa di punti dispersa tra 0 e 1000 pF. In particolare, dalla correlazione tra la capacità elettrica e la RLD ricavata dai campioni delle carote posizionate a 10 cm dalle piante, si è avuto un coefficiente di determinazione pari a 6,5%. Molto basso ( $R^2$  pari a 9,6%) è risultato pure il

coefficiente di determinazione ricavato dai dati relativi alle posizioni di carotaggio a 20 cm. Di conseguenza la retta rappresentante la correlazione tra i due metodi, relativa alle medie dei dati delle due posizioni delle carote, ha presentato un  $R^2$  che si è attestato su valori di 8,7% (Fig. 158).

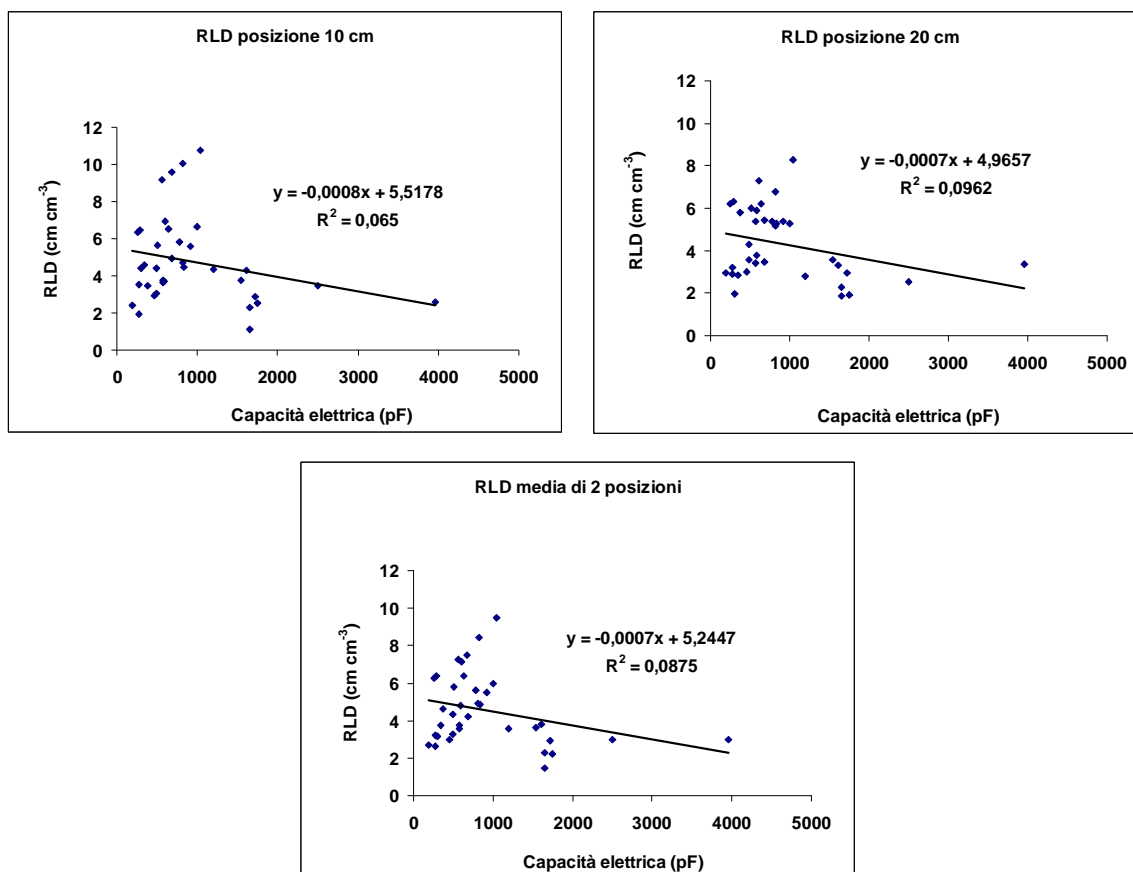


Figura 158 - Correlazione tra i valori di capacità elettrica e quelli di densità di lunghezza radicale volumetrica rilevati in tutte le specie e trattamenti.

Analizzando solamente i valori ricavati nel sito inquinato, con i due metodi, distruttivo ed elettrico, si sono rilevate delle correlazioni positive, incoraggianti per l'uso di questa metodica non distruttiva (Fig. 159). Anche nel sito di Torviscosa si sono distinti i dati relativi alle due posizioni di carotaggio, da cui poi si è ottenuto il grafico rappresentante i valori medi delle due posizioni. In riferimento alle posizioni di carotaggio a 10 e a 20 cm si sono ottenute correlazioni positive con valori di  $R^2$  molto simili, rispettivamente di 25% e 23%. Dai dati mediati delle due posizioni è emersa una correlazione positiva con

coefficiente di determinazione leggermente più alto rispetto ai precedenti, pari a 29%.

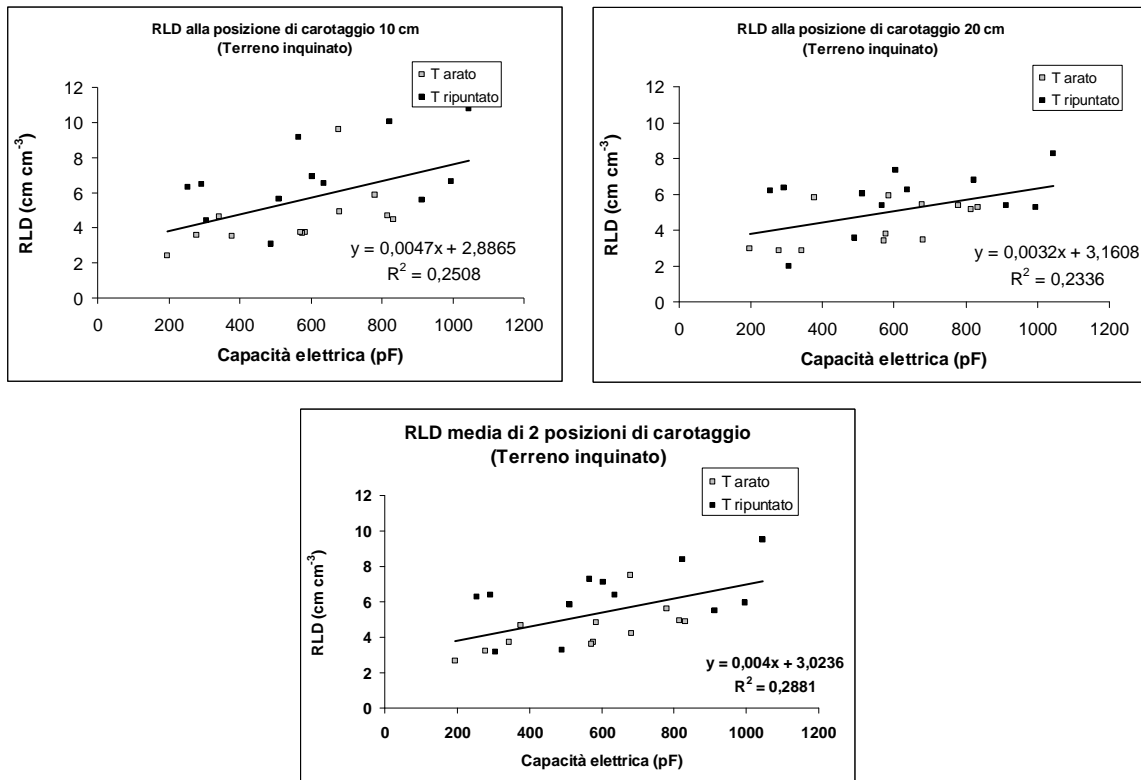


Figura 159 - Correlazione tra i valori di capacità elettrica e quelli di densità di lunghezza radicale volumetrica rilevati nel solo sito inquinato di Torviscosa.

In seguito si è studiata la correlazione tra i due metodi di studio degli apparati radicali, considerando i singoli trattamenti. I dati sono stati ricavati dalle medie delle due posizioni di carotaggio (Fig. 160). Nel solo trattamento di controllo è risultata una retta di regressione non significativa, con coefficiente angolare negativo, con coefficiente di determinazione di 0,032. nel Legnaro la correlazione tra RLD e capacità elettrica non è risultata significativa neppure considerando la densità radicale nei primi 30 cm, profondità al quale era inserito l'elettrodo positivo.

Facendo riferimento al trattamento arato nel terreno inquinato si è trovata una correlazione significativa e positiva, con un  $R^2$  pari a 41%. Minore è stato il coefficiente di determinazione rilevato nel TR, pari a 25%.

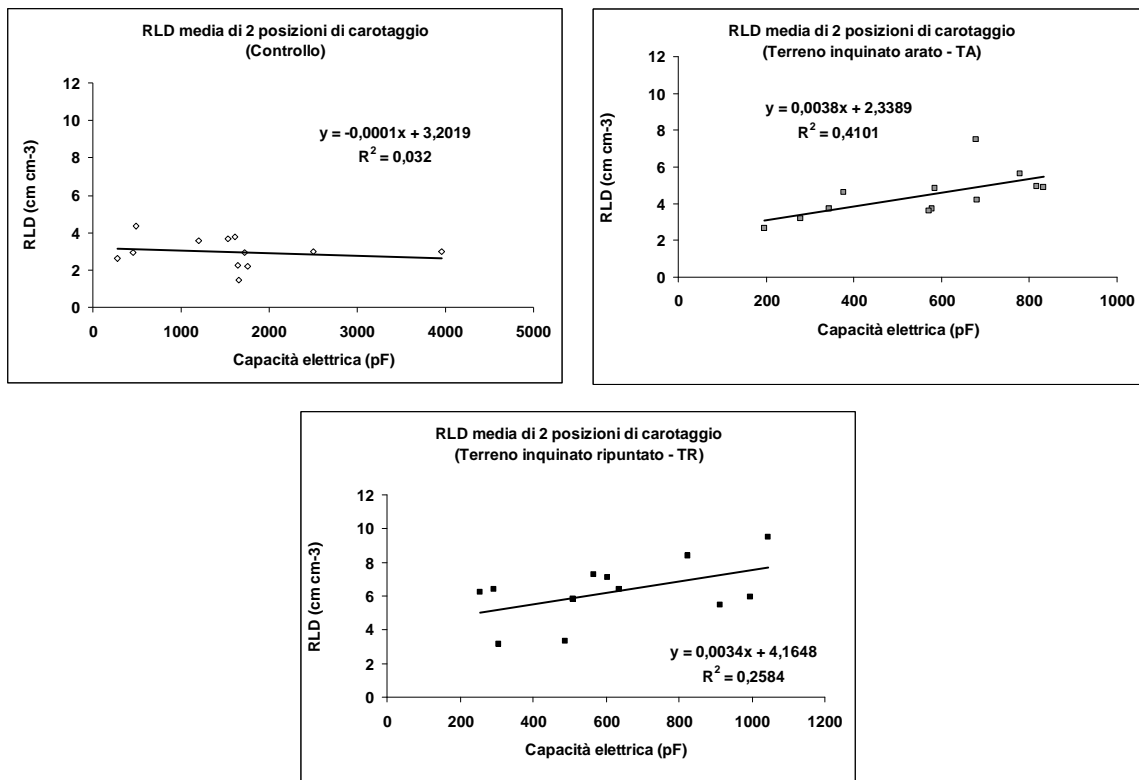


Figura 160 - Correlazione tra i valori di capacità elettrica e quelli di densità di lunghezza radicale volumetrica rilevati nei tre trattamenti.

In generale, per quanto riguarda i tre trattamenti, si può notare una sostanziale differenza tra quelli del sito inquinato e il controllo. Le correlazioni più elevate sono state riscontrate a Torviscosa, con  $R^2$  maggiore in TA rispetto a TR. Questo probabilmente è dovuto ad una percentuale più elevata di radici nei primi cm di profondità, quindi più vicine all'elettrodo negativo (inserito al colletto) e a quello positivo inserito nel terreno a 30 cm di profondità, che hanno permesso di ottenere dati con il capacimetro più rappresentativi di quelli reali. Inoltre le ceneri di pirite potrebbero condurre meglio, rispetto al controllo, la corrente elettrica. Dati analitici indicano infatti che le ceneri di pirite, nonostante siano mescolate con una certa frazione di suolo di riporto, presentano una conducibilità elettrica di circa dieci volte superiore al terreno limoso del trattamento di Legnaro (3 contro 0,29 mS cm<sup>-1</sup>). Quindi, in relazione ai due trattamenti nel terreno contaminato, le maggiori quantità di ceneri di pirite presenti nel TA hanno permesso di avere una maggiore precisione della

stima degli apparati radicali con capacimetro, e quindi maggiore correlazione con il metodo del carotaggio, rispetto ai dati ottenuti in TR.

## 5. CONCLUSIONI

Le prove preliminari svolte in ambiente controllato (vasi e mesocosmo) possono contribuire significativamente alla progettazione di un impianto di fitoestrazione di metalli pesanti, anche se solo la sperimentazione *in situ* può in ultima analisi fornire un risultato realmente attendibile.

Le specie di interesse agrario saggiate, sia erbacee che arboree, rimangono lontane dalla soglia dell'iperaccumulo indicata in letteratura per i diversi metalli pesanti riscontrati nel sito contaminato. Ciò, tuttavia, non sembra rappresentare un limite al loro impiego per progetti di fitoestrazione, essendo in grado di produrre una biomassa, seppur non comparabile al controllo, tale da garantire dei bilanci di asportazione interessanti.

La semina diretta sulle ceneri di pirite (trattamento T100 e TA), substrato per nulla ospitale, pur conducendo ad una maggiore concentrazione di inquinanti nella biomassa epigea di tutte le specie coltivate, come era lecito attendersi, ha comportato in generale un peggioramento dello stato nutrizionale della pianta e della capacità fotosintetica, con conseguente diminuzione della velocità di accrescimento e dei valori di biomassa producibili, che non è stato possibile contenere neppure con un normale apporto di nutrienti.

Dallo studio degli apparati radicali è emerso il loro ruolo fondamentale nella fitoestrazione e l'elevata sensibilità alla contaminazione da metalli pesanti, anche nelle specie più promettenti. Dalle prime valutazioni del metodo elettrico (non distruttivo) si può pensare di adottarlo per il monitoraggio continuo di questa struttura della pianta potendo evidenziare l'effetto di trattamenti correttivi al suolo o alle piante anche durante la loro coltivazione. Tutte le specie saggiate, sia erbacee (rafano, girasole, erba medica, loiessa, orzo) che arboree (pioppo bianco, pioppo nero, pioppo tremulo, salice bianco) coltivate nelle ceneri di pirite inquinate da metalli pesanti hanno subito significative modificazioni delle caratteristiche morfologiche degli apparati radicali, in

termini di densità di lunghezza, approfondimento e diametro radicale. Gli effetti sono stati più o meno evidenti in funzione dalla specie e del tipo di trattamento al suolo. In generale è stato osservato un aumento del diametro radicale, per effetto dell'elevata massa volumica delle ceneri, e una diminuzione dell'approfondimento delle radici, fattore questo che può limitare, l'efficienza di fitoestrazione.

*Raphanus sativus* è stata la specie erbacea che ha presentato il migliore adattamento alle specifiche condizioni sperimentali sia in termini di accrescimento epigeo che radicale, con buone asportazioni di metalli, risultato questo già rilevato in precedenti sperimentazioni condotte dal Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali presso un sito inquinato nell'*hinterland* milanese in una ex-marcita irrigata per numerosi anni con acque reflue inquinate. Per le specie arboree i risultati di mesocosmo sono stati parzialmente disattesi *in situ*, indicando che l'efficacia di *Salix alba*, la più diffusa tra le specie arboree spontanee, è inferiore a quella di *Populus alba*. A tal riguardo è prevedibile che la flora spontanea del sito possa offrire degli spunti interessanti per l'individuazione di specie adatte alla fitoestrazione, anche se in molti casi questo si potrebbe scontrare con la necessità poi di dover disporre di sufficienti quantità di seme.

Va rilevato che per tutte le specie considerate in questo studio, le migliori asportazioni di metalli pesanti si sono riscontrate nei casi in cui è stato possibile ridurre la concentrazione di metalli pesanti nel suolo da bonificare, attraverso ad esempio un rimescolamento degli strati, che ha condotto ad un maggiore accumulo di biomassa ed una più modesta diminuzione della concentrazione di metalli.

Resta da valutare con maggiore approfondimento l'efficacia delle specie arboree nell'arco di un poliennio, e verificare la possibilità di migliorare l'accrescimento radicale attraverso l'impiego di sostanze promotrici la rizogenesi (e.g., acidi umici, IAA, micorrizzazione) quale strumento per aumentare l'interfaccia di scambio pianta-matrice da disinquinare.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Adriano D.C. (1986). *Trace elements in the terrestrial environment*. Berlin, Springer-Verlag: 867 pp.
- Adua M., Barberis R., Campana L., Carlini E., Ciccarese L., Fabietti G., Francaviglia R., Giardina F., Giovannelli V., Giunta M., Innocenzi G., Pallotti A., Piccini C., Pettenella D., Raineri V., Rastelli V., Savi A. e Staiano G. (2005). Agricoltura e selvicoltura” a cura di Galosi A. In APAT, “Annuario dei dati ambientali” ed. I.G.E.R. srl: 59 – 68.
- APAT (2006). I siti minerari italiani (1870-2006): 1-95. [http://www.apat.gov.it/site/\\_Files/SitiMinerariItaliani1870\\_2006.pdf](http://www.apat.gov.it/site/_Files/SitiMinerariItaliani1870_2006.pdf). (consultato il 6-XII-06).
- Alloway B.J. (1995). *Heavy metals in soils*. Blackie Academic and Professional, London: 252 pp.
- Baker A.J.M. (1981). *Accumulators and escluders-strategies in the response of plants to heavy metals*. Journal Plant Nutrition, 3: 643-654.
- Baker A.J.M. (1987). *Metal tolerance*. New Phytologist, 106: 93-111.
- Baker A.J.M. e Brooks R.R. (1989). *Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – A review of their distribution, ecology and phytochemistry*. Biorecovery, 1: 81-126.
- Baker A.J.M. e Walker P.L. (1989). *Physiological response of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity*. Chemical Speciation Bioavailability, 1: 7-17.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Sidoli C.M.D. e Reeves R.D. (1994). *The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal—accumulating plants*. Resources, Conservation & Recycling, 11: 41-49.
- Barazani O., Sathiyamoorthy P., Manandhar U., Vulkan R e Golan-Goldhirsh A. (2004). *Heavy metal accumulation by Nicotiana glauca Graham in a solid waste disposal site*. Chemosphere, 54: 867-872.
- Barber S.A. e Lee R.B. (1974). *The effect of microorganisms on the absorption of manganese by plants*. New Phytologist, 73: 97-106.
- Bargellini A. (1998). Chimica, Società e Ambiente. Signorelli Editore., Milano. 730 pp.
- Barraclough P.B. (1986). *The growth and activity of winter wheat roots in the field: nutrient inflows of the high yielding crops*. Journal of Agricultural Science, 106: 53-59.



- Been J. van, Smith M.E. e Zobel R.W. (1998). *Estimating root mass in maize using a portable capacitance meter*. *Agronomy Journal*, 90: 566-570.
- Blaylock M.J., Salt D.E., Dushenkov S., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Ensley B.D. e Raskin I. (1997). *Enhanced accumulation of Pb in Indian Mustard by soil-applied chelating agents*. *Environmental Science and Technology*, 31: 860-865.
- Blaylock M.J., Huang J.W. (2000). *Phytoextraction of metals*. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Raskin I. e Ensley B. D. (eds.). John Wiley and Sons, New York: 53-70.
- Bona S. (2000). *Metodi conservativi*. In Mosca G. e Vameralli T. (eds.), *Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 113-116.
- Borin M. (1999). *Introduzione all'ecologia del sistema agricoltura*. Ed. Cleup, Padova: 447.
- Borin M. (2002). *Colture a fini ambientali e paesaggistici*. *Rivista di Agronomia*, 36: 33-47.
- Brooks R.R. (1998). *Geobotany and hyperaccumulators*. In *Plants that hyperaccumulate heavy metals, their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining*. Ed. R.R. Brooks. New York: 55-94.
- Brown P.D., Jhonson G.A. e Kramer P.J. (1986). *In vivo magnetic resonance microscope of changing water content Pelargonium hotorum roots*. *Plant Physiology*, 82: 1158-1160.
- Burken J.G. e Schnoor J.L. (1997). *Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees*. *Environmental Science and Technology*, 31: 1399-1406.
- Cahoon G.A. e Morton E.S. (1961). *An apparatus for the quantitative separation of plant roots from soil*. *American Society Horticultural Science*, 78: 593-596.
- Cakmak I., Ozturk L., Karanlik S., Marschner H. e Ekiz H. (1996). *Zinc efficient wild grasses enhance release of phytosiderophores under Zn deficiency*. *Journal of Plant Nutrition*, 19: 551-563.
- Calace N., Petronio B.M., Pietroletti M., Deriu D. e Pompili L. (2004). *Treatment of heavy metal contaminated soli to reduce metal uptake by cultivation*. *Recent Research Developments in Agronomy and Horticulture Vol 1*: 29-46.
- Cao G., Concas A., Muntoni A. e Grosso B. (2002). *Nuove tecnologie per la bonifica e il ripristino ambientale di siti contaminati*. *Chimica news ambiente*, 7:16-17
- Casalicchio G. (2000a). *Il sistema periodico degli elementi: importanza dei "microelementi" per i viventi e la loro classificazione*. In *I microelementi nell'ecosistema terrestre (vol. 1) a cura di Casalicchio G.; Pitagora Editrice, Bologna: 13-24*.

- Casalicchio G. (2000b). Il sistema suolo. In I microelementi nell'ecosistema terrestre (vol. 1) a cura di Casalicchio G. Pitagora Editrice, Bologna: 232-265.
- Chaney R.L (1983). *Plant uptake of inorganic waste constitute*. In Parr J.F., Marsh P.B. e Kla J.M. *Land treatment of hazardous wastes*. Park Ridge, NJ, Noyes Data Corporation: 50-76.
- Chloupek O. (1977). *Evaluation of the size of a plant's root system using its electrical capacitance*. Plant and Soil, 48: 525-532.
- Ciafani S., Zampetti G., Eroe K., Giovangrossi P., Le Donne K., Tunesi S. e Venturi L. (2005). La chimera delle bonifiche. <http://www.legambiente.it> (consultato il 20-VI-2005).
- Clemens S. (2001). *Molecular mechanism of plant tolerance and homeostasis: a review*. Planta, 212: 457-486.
- Cobbett C. S., 2000: *Phytochelatin and their role in heavy metal detoxification*. Plant Physiology, 123: 825-832.
- Commissione della Comunità Europea (1992). Regolamento (CEE) n. 2078/92 del Consiglio del 30 giugno 1992. G.U.C.E. n. 215.
- Commissione della Comunità Europea (1992). Regolamento (CEE) n. 2080/92 del Consiglio del 30 giugno 1992. G.U.C.E. n. 215.
- Commissione della Comunità Europea (1999a). Agenda 2000, rafforzare e ampliare l'Unione europea. Programma prioritario di pubblicazioni 1999, X/D/5. [http://ec.europa.eu/agenda2000/public\\_it.pdf](http://ec.europa.eu/agenda2000/public_it.pdf). (consultato il 6-XII-06)
- Commissione della Comunità Europea (1999b). Regolamento (CE) n. 1257/99 del Consiglio del 17 maggio 1999. G.U.C.E. n. 160/80.
- Commissione della Comunità Europea (2002). Comunicazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento europeo, al Comitato Economico e Sociale e al Comitato delle Regioni: verso una strategia tematica per la protezione del suolo. COM (2002) 179 definitivo, del Consiglio 16 aprile 2002.
- [http://eusoiils.jrc.it/ESDB\\_Archive/pesera/pesera\\_cd/pdf/053AdoptedSoilCommIT.pdf](http://eusoiils.jrc.it/ESDB_Archive/pesera/pesera_cd/pdf/053AdoptedSoilCommIT.pdf). (consultato il 6-XII-06).
- Crowley D. E., Wang Y. C., Reid C. P. P. e Szansiszlo P. I. (1991). *Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants*. Plant and Soil, 130: 179-198.
- Cunningham S.D. e Ow D.W. (1996). *Promises and prospects of phytoremediation*. Plant Physiology, 110: 715-719.
- Cunningham S.D., Shann J.R., Crowley D., Anderson T.A. (1997). *Phytoremediation of contaminated water and soil*. In Krueger E.L., Anderson T.A. e Coats J.P (eds.) *Phytoremediation of soil and water contaminants*. American Chemical Society, Washington D.C: 2-19.

- Dalton F.N. (1995). *In situ root extent measurement by electrical capacitance methods*. Plant and Soil, 173: 157-165.
- Davies F.T. Jr., Puryear J.D., Newton R.J., Egilla J.N. e Grossi J.A.S. (2002). *Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissueminerale concentration, growth and gas exchange*. Journal of Plant Nutrition, 25(11): 2389-2407.
- De Willigen P. e Van Noordwijk M. (1987). *Uptake potential of non-regularly distributed roots*. Journal of Plant Nutrition, 10: 1273-1280.
- Decreto Legislativo 5 febbraio 1997, n. 22. attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio. Supplemento ordinario Gazzetta Ufficiale n. 38: 51pp.
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Testo unico ambientale. Supplemento ordinario Gazzetta Ufficiale n. 88: Articolo 252 comma 9.
- Decreto Ministeriale 25 ottobre 1999, n. 471. Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica ed il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del Decreto Legislativo del 5 febbraio 1997, n°22 e successive modificazioni ed integrazioni. Supplemento ordinario Gazzetta Ufficiale n. 293: 3-67.
- Decreto Ministeriale 18 settembre 2001, n. 468. Regolamento recante programma nazionale di bonifica e ripristino ambientale dei siti inquinati. Supplemento ordinario Gazzetta Ufficiale n. 13: 63pp.
- Dushenkov V., Kumar P.B.A.N., Motto H. e Raskin I., 1995. *Rhyzofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams*. Environmental Science and Technology, 29: 1239-1245.
- EEA (2000). *Management of contaminated sites in western Europe*. Copenhagen.
- Ellis B.B. e Barnes B.T. (1971). *Mechanical method for obtaining soil cores*. Plant and Soil, 35: 209-212.
- Faure G. (1992). *Principles and application of inorganic geochemistry*. New York, Maxwell McMillan International Editions: 626 pp.
- Foti S. e Tuttobene R. (2000). Metodo del monolito e metodo del carotaggio. In Mosca G. e Vameralli T. (eds.), *Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 84-86; 98-104.
- Fotovat A., Naidu R. e Sumner M. E. (1997). *Water :soil ratio influences aqueous phase chemistry of indigenous copper and zinc in soils*. Australian Journal of Soil Research, 35: 687-710.
- Gabrielli R. e Galardi F. (2004). I metalli pesanti negli organismi vegetali. In Zerbi G. e Marchiol L. eds. *Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta*. Ed. Forum, Udine: 37-48.

- Giardini L. (1996). *Agronomia generale, ambientale e aziendale*. Patron editore, Bologna: 175-203.
- Goldberg L. F. e Zaccheo P. (1998). Inquinamento del suolo. *In Ecologia applicata*, Ed. UTET, Milano: 461-486.
- Govi G. (2000). Rizotroni. *In Mosca G. e Vamerali T. (eds.), Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 116-119.
- Govi G., Minotta G., De Giorgio D. e Bona S. (2000). Minirizotroni. *In Mosca G. e Vamerali T. (eds.), Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 119-125.
- Greger M e Landberg T. (1999). *Use of willow in phytoextraction*. Phytoremediation: how plants can help in cleaning the environment. A workshop held during INTECOL 98, the international conference of ecology, Florence, Italy. *International Journal of Phytoremediation*, 1: 2, 115-123.
- Herkelrath W.N., Miller E.E. e Gardner W.R. (1977). *Water uptake by plants. II. The root contact model*. *Soil Science Society of America Journal*, 41: 1039-1043.
- Hernandez-Pinero J.L., Maiti R.K., Verde-Star M.J., Garcia-Diaz G., Nunez-Gonzalez A., Cardenas-Avila M.L. e Foroughbakhch R. (2002). *Potential use of Phaseolus vulgaris L., Avena sativa L. and Medicago sativa L. in the removal of lead and cadmium from soil*. *Crop Research Hisar*, 24: 3, 449-452.
- Kabata-Pendias A. (1992). *Trace metals in soil in Poland – Occurrence and behaviour*. *Trace Subst. Environmental Health*, 25: 53 – 70.
- Kanazawa K., Higuchi K., Nishizawa N. K., Fushiya S., Chino M. e Mori S. (1994). *Nicotianamine aminotransferase activities are correlated to the phytosiderophore secretion under Fe—deficient conditions, in Gramineae*. *Journal of Experimental Botany*, 45: 1903-1906.
- Kashem M. A. e Singh B. R. (2002). *The effect of fertilizer additions on the solubility and plant-availability of Cd, Ni and Zn in soil*. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 62: 287-296.
- Krämer U., Smith R.D., Wenzel W., Raskin I. e Salt D.E. (1997). *The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by Thlaspi goesingense Halacsy*. *Plant Physiology*, 115: 1641-1650.
- Keller C., Hammer D., Kayser A., Richner W., Brodbeck M. E Sennhauser M. (2003). *Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field*. *Plant and Soli*: 67-81.
- Kumar P.B.N.A., Dushenkov V., Motto H. e Raskin I. (1995). *Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils*. *Environmental Science and Technology*, 29: 1232-1238.

- Kucke M., Schmid H. e Spiess A. (1995). *A comparison of four methods for measuring roots of field crops in three contrasting soil*. Plant and Soil, 172: 63-71.
- Kuzovkina Y.A., Knee M. e Quigley M.F. (2004). *Cadmium and copper uptake and traslocation in five willow (Salix L.) species*. International Journal of Phytoremediation, 6(3): 269-287.
- Legge 9 dicembre 1999, n. 426. Nuovi interventi in campo ambientale. Gazzetta Ufficiale n. 291: Articolo 1 comma 4.
- Legge 23 dicembre 2000, n. 388. Disposizioni per la formazione del bilancio annuale e pluriennale dello Stato (legge finanziaria 2001). Gazzetta Ufficiale n. 302: Articolo 114 commi 24 e 25.
- Legge 31 luglio 2002, n. 179. Disposizioni i materia ambientale. Gazzetta Ufficiale n. 189: Articolo 14.
- Legge 23 dicembre 2005, n. 266. Disposizioni per la formazione del bilancio annuale e pluriennale dello Stato (legge finanziaria 2006). Supplemento ordinario n. 211 della Gazzetta Ufficiale n. 302: Articolo 1 comma 561.
- Laureysens I., De Temmerman L., Hastir T., Van Gysel M. e Ceulemans R. (2005). *Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II Vertical distribution and phytoextraction potential*. Environmental pollution, 133(3): 541-551.
- Lee J., Reeves R.D., Brooks R.R. e Jaffré T. (1977). *Isolation and identification of a citrate-complex of nickel ion from nickel ion-accumulating plants*. Phytochemistry, 16: 1503-1505.
- Lee J., Reeves R.D., Brooks R.R. e Jafik T. (1978). *The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants*. Phytochemistry, 17: 1033-1035.
- Madejon P., Murillo J.M., MarAnon T., Cabrera F. e Soriano M.A. (2003) *Trace element and nutrient accumulation in sunflowers plants two years after the Aznalcollar mine spill*. Science of the Total Environment, 307: 1-3, 239-257.
- Marschner H. (1995). *Mineral nutrition in higher plants*. Academic Press: 889 pp.
- Martens S.N. e Boyd R.S. (1994). *The ecological significance on nickel hyperaccumulation: a plant chemical defence*. Oecologia, 98: 379-384.
- Ministero dell'Ambiente (2006). Prosegue la marcia del "fattore ambiente" Presentata la Relazione sullo Stato dell'Ambiente 2005. a cura di Michienzi G. e Mascellari S.  
[http://www2.minambiente.it/sito/comunicati/2006/23\\_03\\_06.asp](http://www2.minambiente.it/sito/comunicati/2006/23_03_06.asp).  
 (consultato il 6-XII-06).
- Minolta Camera Co. Ltd. (1989).
- Molas J. e Baran S. (2004). *Relationship between the chemical form of nickel applied to the soil and it's uptake and toxicity to barley plants (Hordeum vulgare L.)*. Geoderma, 122(2/4): 247-255.

- Mosca G. (2000). Altri metodi. In Mosca G. e Vamerali T. (eds.), *Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 127.
- Mosca G., Vamerali T., Ganis A., Coletto L. e Bona S. (2004). Miglioramento dell'efficienza agronomica della fitodecontaminazione di metalli pesanti. In Zerbi G. e Marchiol L. eds. *Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta*. Ed. Forum, Udine: 105-135.
- Mulligan C.N., Young R.N. e Gibbs B.F. (2001). *Remediation technologies for metal-contaminated soil and groundwater: an evaluation*. *Engineering Geology*, 60: 193-207.
- Naidu R., Oliver D. e McConnell S. (2003). *Heavy metal phytotoxicity in soils*. *National Environmental Protection Council*, Adelaide South Australia: 235-241.
- National Sustainable Agriculture Information Service (2006). [http://attra.ncat.org/images/organic\\_soil/chart.jpg](http://attra.ncat.org/images/organic_soil/chart.jpg). (consultato il 10/12/2006).
- Navari-Izzo F., Quartacci M. F. e Sgherri C. (2004). Fitoestrazione assistita e meccanismi di tolleranza ai metalli. In Zerbi G. e Marchiol L. eds. *Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta*. Ed. Forum, Udine: 49-76.
- Nuzzo V., Palese A.M., Celano G. e Romano M. (2000). Metodo del *pinboard*. In Mosca G. e Vamerali T. (eds.), *Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 87-91.
- Oliveira M.R.G., van Noordwijk M., Gaze S.R., Brower G., Bona S., Mosca G. e Hairiah K. (2000). *Auger sampling, in-growth cores and pinboard methods*. In A.L. Smit, C. Engels, G. Bengough, M. van Noordwijk, S. Pellerin e S. van de Geijn (eds.) *Root growth and function: a handbook of methods*. Springer-Verlag, Heidelberg, 175-210.
- Pellet, M. D., Grunes D. L. e Kochian L. V. (1995). *Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (Zea mays L.)*. *Planta*, 196: 788-795.
- Peterson P.J. (1983): *Adaptation to toxic metals*. In Robb D.A. e Pierpoint W.S. (eds.), *Metals and micronutrients: uptake and utilization by plants*. Academic Press, London: 51-69.
- Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L., Gomez E., Tiemann K.J., Parsons J.G. e Carrillo G. (2002). *Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake*. *Environmental Pollution*, 119(3): 291-301.
- Prasad M.N.V. e Freitas H.M.O. (2003). *Metals hyperaccumulation in plants – biodiversity prospecting phytoremediation technology*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3): 285-321.

- Preston G.M., McBride R.A., Bryan J. e Candido M. (2004). *Estimating root mass in young hybrid poplar trees using the electrical capacitance method*. *Agroforestry Systems*, 60: 305-309.
- Prosdocimi G., Sambo P. e Pimpini F. (2003). *The use of SPAD 502 chlorophyll meter for dynamically optimising the nitrogen supply in potato crop: first results*. *Acta Horticulturae*, 607:191-196.
- Radaelli L. e Calamai L. (2001). *Chimica del terreno*. Ed. Piccin Nuova Libraia s.p.a., Padova: 287 pp.
- Raskin I., Smith R.D. e Salt D.E. (1997). *Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8 (2): 221-226.
- Rausser W.E. (1999). *Structure and functions of metal chelators produced by plants: the case of organic acid, aminoacids, phytin and metallothioneins*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31: 19-48.
- Rizzi L., Petruzzelli G., Poggio G. e Guidi G.V. (2004). *Soli physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytoextraction*. *Chemosphere*, 57(9): 1039-1046.
- Rocco F. e Pin M. (2000). *Nuove tecnologie di bioremediation e di phytoremediation per la decontaminazione dei suoli: esperienze e prospettive*. In *Atti "workshop Gestione integrata dell'ambiente urbano: rifiuti, acque, suolo"*. Trieste, 30 maggio 2000, 1 – 5.
- Rogers H.H. e Bottomley P.A. (1987). *In situ nuclear magnetic resonance imaging in roots: influence of soil type, ferromagnetic particle content, and soil water*. *Agronomy Journal*, 79: 957-965.
- Ross S. M. (1994). *Toxic metals in soil-plant system*. John Wiley & Sons, Inc: 469 pp.
- Rubino P. (1984). *Stima degli apparati radicali: descrizione di alcuni metodi*. *Rivista di Agronomia*, 2: 139-146.
- Rubino P., Giorgio V. e Reina A. (1985). *Impiego del metodo del core-break nello studio dell'apparato radicale dell'actinidia*. *Frutticoltura*, 47 (5): 65-68.
- Rubino P. (2000). *Metodi distruttivi*. In Mosca G. e Vamerali T. (eds.), *Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 83-84; 91-98.
- Salt D. E., Blaylock M., Kumar P. B. A. N., Dushenkov V., Ensley B. D., Chet I. e Raskin I. (1995). *Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants*. *Biotechnology*, 13: 468-475.
- Schreiber U., Bilger W. E Neubauer C. (1994). *Chlorophyll fluorescence as a non intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis*. *Ecol. Stud.*, 100: 49-70.
- Sequi P. (1989). *Chimica del suolo*. Patron Editore, Bologna: 627 pp.

- Shuman L.M., Ramseur E.L. e Wilson D.O. (1993). *Video image method compared to a hand method for determining root lengths*. *Journal of Plant Nutrition*, 16: 563-571.
- Smith A.L., Sprangers J.F.C.M., Sablik P.W. e Groenwold J. (1994). *Automated measurement of root length with a three—dimensional high resolution scanner and image analysis*. *Plant and Soil*, 158: 145-149.
- Steffens J.C. (1990). *The heavy metal—binding peptides of plants*. *Annual Revision Plant Physiology Mol. Biol*, 41: 553-575.
- Stigliani W. M. (1992). *Overview of the chemical time bomb problem in Europe*. In *Proceedings “The European state of theart conference of the delayed effects of the chemicals in soil and sediments”*. Veldhoven, Netherland, 2-5 september 1992: 13-29.
- USEPA (1994). *Selection of control technologies for remediation of soil contaminated with arsenic, cadmium, chromium, lead or mercury*. Revised Draft Engineering Bulletin.
- USEPA (1996). *Soil Screenig Guidance: Technical Background Document*. EPA/540/R-95/128 PB96-963502, U.S. EPA, Office of Emergency Response: Washington, DC.
- USEPA (2003). *Ecological Soil Screening Level for Iron*. U.S. EPA, Office of Emergency Response: Washington, DC. In Vangronsveld J., Van Assche F. e Clijsters H. *Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation*. *Environmental Pollution*, 87: 51-59.
- Vamerali T. (2000). *Il turnover radicale*. In Mosca G. e Vamerali T. (eds.), *Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 165-170.
- Vamerali T. e Mosca G. (2000). *Metodi elettrice ed altre metodiche indirette*. In Mosca G. e Vamerali T. (eds.), *Obiettivo radice, metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*. C.L.E.U.P., Padova: 134-140.
- Vamerali T., Guarise M., Ganis A., Bona S. e Mosca G. (2003). *Analysis of root images from auger sampling with a fast procedure: a case of application to sugar beet*. *Plant and Soil*, 255: 387-397.
- Vepraskas M.J. e Hoyt G.D. (1988). *Comparison of the trench-profile and core methods for evaluating root distributions in tillage studies*. *Journal of Agronomy*, 80: 166-172.
- Wagner G.J. (1984). *Characterization of a cadmium—binding complex of cabbage leaves*. *Plant Physiology*, 76: 797-805.
- Wade M.J., Davis B.K., Carlisle J.S., Klein A.K. e Valoppi L.M. (1993). *Environmental trasformation of toxic metals*. *Occup. Med.*, 8: 575-601.
- Waltz (1987). *Chlorophyll fluorescence measuring system PAM*. Effeltrich: 1-10.



- Zaccheo P. e Crippa L. (2004). Fitoestrazione dei metalli: aspetti relativi alla biodisponibilità dei metalli nei suoli agrari. In Zerbi G. e Marchiol L. eds. Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta. Ed. Forum, Udine: 77 – 104.
- Zaccheo P., Crippa L. e Gigliotti C. (2000). Studio dell'efficienza del mais nella *phytoremediation* in un suolo contaminato da metalli pesanti, In Atti del convegno "La *bioremediation* in Italia: dalla teoria alla pratica". Roma 14 – 15 dicembre 2000: 685-692.
- Zhao F.J., Hamon R.E., Lombi E. e McLaughlin M. (2002). *Characteristic of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of hyperaccumulator Thalaspia caerulescens*. Journal of Experimental Botany, 53: 535-543.
- Zelbrite Australia (2003). <http://www.zelbrite.com/it/index.html> (consultato il 12/12/2006).
- Zerbi G. e Marchiol L. (2004). Inrtoduzione. In Zerbi G. e Marchiol L. eds. Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta. Ed. Forum, Udine: 9-36.
- Zerbi G., Marchiol L., Assolati S., Fellet G. e Chiabà D. (2004). Applicazioni estensive della fitoestrazione di metalli pesanti. In Zerbi G. e Marchiol L. eds. Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta. Ed. Forum, Udine: 137-157.

## **7. APPENDICE FOTOGRAFICA**

# FOTO

## Prove di microcosmo



Erba medica, girasole e rafano a 47 GDS, coltivati in rizobox (prova di microcosmo).  
Da sinistra verso destra, in ciascuna foto, il trattamento L100, T29L15, T37L7, T100.

## Prove di mesocosmo



Prove di mesocosmo: disposizione dei vasi. Sotto un telo plastico per evitare contaminazioni dell'ambiente circostante. In primo piano le piante erbacee, sullo sfondo le arboree.

## Prove di mesocosmo – piante erbacee



Erba medica, orzo e loiessa a 400 GDS, coltivati in vaso (prova di mesocosmo).  
Da sinistra verso destra, in ciascuna foto, ove presenti, il trattamento T100, T29L15,  
T37L7, L100.

## Prove di mesocosmo – piante arboree



Piante arboree in vaso al momento del trapianto (5 luglio 2004), nel trattamento con ceneri di pirite (T29L15). Da in alto a sinistra *P. alba*, *P. nigra*, *P. tremula*, *S. alba*.



Piante arboree in vaso al momento del trapianto (5 luglio 2004), nel trattamento di controllo (L100). Da in alto a sinistra *P. alba*, *P. nigra*, *P. tremula*, *S. alba*.

## Prove *in situ* – Sopralluogo ed allestimento della prova



Veduta dell'area di allestimento della prova. In alto è visibile la copertura erbacea spontanea (18 dicembre 2003); in basso è ben visibile lo zolfo affiorante.





Veduta dell'area di allestimento della prova. Ristagno idrico superficiale in seguito ad eventi piovosi.  
In basso il ristagno sulle parcelle già seminate e coperte con tessuto non tessuto.

## Prove *in situ* – Piante erbacee



Dettagli parcelle: emergenza a 20 GDS. In alto da sinistra: girasole, erba medica, rafano, orzo e loiessa. Evidenti le fallanze di emergenza.

## Prove *in situ* – Piante erbacee



Dettagli parcelle a 50 GDS (20 giugno 2005). In alto da sinistra: girasole, erba medica, rafano, orzo e loiessa e la risalita di sale in loiessa. Evidenti le fallanze.

## Prove *in situ* – Piante arboree



Piante arboree a 50 GD Trapianto (20 giugno 2005). Sesto 80x80 cm. Alla base delle piante del tubo corrugato per proteggere il colletto dalla fauna selvatica.

## **Ringraziamenti**

Un ringraziamento particolare e sincero va al mio supervisore, Prof. Vamerali, che mi ha guidata in questo lavoro di tesi e mi ha supportata ed aiutata fino alla fine. Grazie anche perchè, nonostante le divergenze di opinioni e caratteriali, mi ha sopportata. Un ringraziamento va anche al Prof. Mosca, che si è sempre reso disponibile al confronto ed alla collaborazione, al collegio dei professori ed al Prof. Ziliotto.

Un grazie a tutte le persone dell'azienda agraria L. Toniolo che hanno contribuito con il loro lavoro alla realizzazione delle prove, in particolare Rodolfo, Adriano e Graziella; al personale tecnico che ha contribuito alle analisi di laboratorio nelle persone di Viva, Luciano e Massimo.

Ringrazio anche tutti quelli che non ho incluso, ma che hanno comunque contribuito.

Non posso non ricordare i tesisti che ho seguito durante il lavoro di dottorato e che hanno arricchito la mia persona.

Una dedica particolare a Fabio e Matteo, con i quali ho condiviso l'ufficio e molti pensieri e cui mi lega una profonda amicizia. Un ringraziamento a tutti gli amici che ho stressato durante questi 3 anni e ad Elena e Anna.

Infine, come in tutti in migliori ringraziamenti, come non citare mamma, papà, Lisa, Jacopo e Massimiliano, e la persona che ho conosciuto grazie al dottorato e che ha condiviso con me gli ultimi due anni di vita, Stefano.