

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



FACOLTA' DI AGRARIA

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E
TECNOLOGIE AGRARIE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA AGRARIA ED AGRONOMIA DEL TERRITORIO

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

**L'ARUNDO DONAX PER LA BONIFICA DEI
SUOLI CONTAMINATI DA METALLI PESANTI**

RELATORE:

CH.MO PROF. MASSIMO FAGNANO

CORRELATORE:

CH.MA PROF.SSA PAOLA ADAMO

CANDIDATO:

ANTONIO CHIERCHIA

MATR. N09/050

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

ABSTRACT

PREMESSA

1. INTRODUZIONE

- 1.1 La contaminazione dei suoli
- 1.2 Tecniche di bonifica dei suoli contaminati: la *phytoremediation*
- 1.3 La fitoestrazione: limiti e prospettive per ottimizzare il processo di bioaccumulo
- 1.4 *Arundo donax* : caratteristiche botaniche, adattabilità, resistenza e utilizzi
- 1.5 Utilizzazione delle biomasse
- 1.6 Scopo della tesi

2. MATERIALI E METODI

- 2.1 Sito ed impianto sperimentale
- 2.3 Campionamento ed analisi chimiche
- 2.4 Elaborazioni statistiche

3. RISULTATI

- 3.1 Produzione di biomassa
- 3.2 Azoto nei tessuti
- 3.3 Biodisponibilità di Cd, Zn e Cu nel suolo
- 3.4 Contenuto di Cd, Zn e Cu nei tessuti di *Arundo donax* e asportazioni totali

4. DISCUSSIONE

- 4.1 Accrescimento e nutrizione azotata di *Arundo donax*
- 4.2 Biodisponibilità di PTEs nel suolo
- 4.3 Accumulo di PTEs nei tessuti di *Arundo donax*

5. CONCLUSIONI

6. BIBLIOGRAFIA

PREMESSA

Lo sviluppo industriale, lo smaltimento dei rifiuti, l'impiego eccessivo di fertilizzanti, l'uso di acque irrigue di pessima qualità e tante altre fonti di inquinamento hanno determinato la dispersione e l'accumulo nell'ambiente, soprattutto nel suolo, di metalli pesanti e di altri contaminanti determinando un serio problema per la vita delle piante e dell'uomo. Alle ormai ben note tecniche di bonifica chimico-fisiche dei siti contaminati ultimamente si fa sempre più riferimento a tecniche di bonifica su base biologica che, da un lato risultano essere economicamente convenienti, e dall'altro riducono la movimentazione del suolo. Inoltre queste nuove metodiche sono mirate al recupero agricolo dei suoli contaminati in maniera tale da restituirli all'agricoltura.

La *phytoremediation* è un metodo di depurazione *in-situ* (senza rimozione del terreno inquinato) a bassissimo impatto ambientale, a basso costo e basata su elementi biologici quali le piante; tra le varie tecniche di *phytoremediation*, la fitoestrazione sembra essere la più vantaggiosa dal punto di vista economico.

In questo lavoro si è voluto testare la capacità fitoestrattiva di una specie vegetale quale l'*Arundo donax* in un terreno mediamente inquinato da metalli pesanti sito ad Acerra (NA). Le motivazioni che hanno spinto ad analizzare questo tema sono state le seguenti: in primo luogo la necessità di bonificare i suoli contaminati e di eliminare la possibilità che gli inquinanti entrino nella catena alimentare. In secondo luogo, la possibilità di utilizzare terreni non idonei per le colture alimentari per la coltivazione dell'*Arundo donax*, sfruttandone le sue alte capacità di adattabilità, resistenza, e produttività. In terzo luogo la possibilità concreta di impiegare la biomassa prodotta come fonte di energia alternativa o come materia prima per la produzione di plastiche biodegradabili nell'ottica di sviluppare iniziative industriali della Green Economy integrate con l'ambiente che possano fornire lavoro, sia nella fase agricola che in quella industriale in un contesto, quale quello campano, dove i tassi di disoccupazione sono tra i più alti a livello nazionale e soprattutto senza sottrarre superfici alle tradizionali colture alimentari.

1. INTRODUZIONE

1.1 La contaminazione dei suoli

Il XX secolo è stato caratterizzato da un netto sviluppo economico e aumento dei consumi che hanno portato benessere e ricchezze a buona parte della popolazione occidentale. In realtà, se da una parte il tenore di vita è nettamente migliorato, dall'altro problemi quali produzione di rifiuti, perdita della biodiversità, inquinamento prodotto dall'uso dei combustibili fossili hanno generato delle forti pressioni sull'ambiente. Ad oggi la situazione ambientale è divenuta di dimensioni planetarie e non si può più non intervenire in merito.

La nascita dell'industria moderna ha avviato attività produttive radicalmente nuove ma spesso troppo invasive e il processo di trasformazione del pianeta Terra ha subito una accelerata troppo repentina. Inoltre se si considera che si è avuto un incremento della popolazione globale (proprio in questi giorni si è giunti a quota sette miliardi) associata inevitabilmente ad un maggiore consumo delle risorse, risulta facile pensare che ciò ha determinato profondi squilibri all'interno degli ecosistemi, e, quello dell'inquinamento, è la conseguenza più lampante. Espresso in parole più scientifiche, tutto ciò significa che tra la terra, le sue specie viventi e la sua atmosfera sussiste un delicato equilibrio dinamico.

La contaminazione ambientale può essere definita come *“la conseguenza di un'azione umana capace di modificare le proprietà delle condizioni o la disponibilità o qualità delle risorse in un determinato intervallo di spazio e di tempo”* (Vighi e Bacci, 1998). La contaminazione diviene inquinamento *“quando raggiunge un livello tale da provocare effetti negativi sugli organismi, le popolazioni, gli ecosistemi”* (Vighi e Bacci, 1998).

Dalla figura 1 (Gianoni, 2000) relativa alle emissioni di diossido di carbonio “climatico” provocate dai diversi settori dell'economia, si vede nettamente il continuo e costante aumento di emissioni a partire dal 1940 con una riduzione solo dopo la prima crisi petrolifera del Kippur degli anni settanta. Dal grafico si evince che nei prossimi anni si è destinati a raggiungere la quota di 50 milioni di tonnellate di CO₂ emesse e come le attività agricole e forestali contribuiscano in misura nettamente inferiore rispetto alle altre fonti di inquinamento.

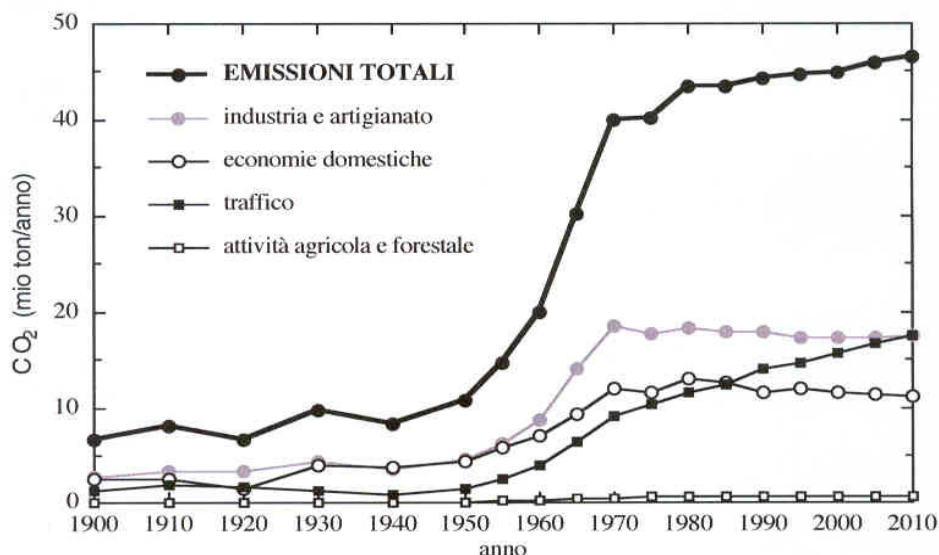


Figura 1 – Emissioni di diossido di carbonio “climatico”.

A partire dagli anni settanta che si iniziò a parlare del conflitto tra crescita economica, demografica e ambiente; per molto tempo la contrapposizione sembrò non avere possibili soluzioni. Ma negli anni ottanta cominciò a farsi strada un’idea, quella dello *sviluppo sostenibile*, che individua una sintesi del conflitto suddetto. Nel 1987 tale concetto trovò un’adeguata espressione e diffusione con il “Rapporto Brundtland” della Commissione Mondiale per l’Ambiente e lo Sviluppo, che lo definì come “*lo sviluppo che consente alla generazione presente di soddisfare i propri bisogni senza compromettere la capacità delle future generazioni di soddisfare i loro propri bisogni*”. I combustibili fossili, quali petrolio, carbone e gas, rappresentano la primaria fonte di energia nel mondo contribuendo per circa il 90% ai consumi totali (Tab. 1).

Tabella 1 – Le fonti energetiche nel mondo (ENEA, 2008).

Petrolio	38%
Carbone	24%
Gas	20%
Nucleare	6%
Idraulica	2%
Biomassa (legno, ecc)	8%
Nuove rinnovabili (eolico, solare, ecc)	2%

Se però si considera che la domanda mondiale di energia sta aumentando ad un ritmo di circa il 2% l’anno, si pone il grande problema di far fronte ad una futura e inevitabile

scarsità di tali fonti. Inoltre è ormai accertato che proprio le attività che utilizzano combustibili fossili sono le principali cause che danneggiano l'ambiente generando gas e sostanze altamente inquinanti. Dal grafico precedente si vede come l'industria e l'artigianato, le economie domestiche e il traffico veicolare contribuiscono seriamente al fenomeno dell'effetto serra la cui conseguenza più preoccupante è la possibilità che si verifichino cambiamenti globali di clima: la temperatura media della Terra potrebbe aumentare di almeno 2°C entro il 2100 ed è destinata ad aumentare sempre più qualora non si prendano seri provvedimenti, ovviamente con ripercussioni gravissime sulla vita dell'uomo.

Se nelle nazioni occidentali continueranno a prelevare le fonti fossili al ritmo attuale, e le nazioni emergenti (es. India, Cina) tenderanno ad imitarle come già sta accadendo, il pericolo maggiore nel breve e nel medio termine, non sarà tanto quello dell'esaurimento di tali fonti, quanto quello di provocare danni irreversibili all'ambiente raggiungendo un punto di non ritorno (ENEA, 2008).

La conferenza di Kyoto (1997) ha segnato il primo momento dell'acquisizione della coscienza collettiva planetaria della non sostenibilità dell'attuale modello di sviluppo. Il trattato pone l'obbligo in capo ai paesi industrializzati di operare una riduzione delle emissioni di elementi inquinanti (su tutti biossido di carbonio ed altri cinque gas serra, ovvero metano, ossido di diazoto, idrofluorocarburi, perfluorocarburi ed esafluoruro di zolfo) in una misura almeno pari al 5% rispetto alle emissioni registrate nel 1990, considerato come anno base, nel periodo 2008-2012.

In questo contesto dove finalmente si è percepita la gravità della situazione e capito che si stava per entrare in un tunnel senza via di uscita tutte le biomasse diventano, insieme ad altre fonti energetiche rinnovabili, una risorsa indispensabile e di eccezionale importanza (Fiala, 2008). Nel Decreto Legislativo del 29 Dicembre 2003 n° 387, le biomasse vengono definite come *la parte biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali) dalla selvicoltura e dalle industrie connesse, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali ed urbani* (Mosca, 2008). La biomassa, infatti, a differenza dei combustibili fossili citati precedentemente, non contribuisce all'innalzamento dell'effetto serra, perchè la CO₂ emessa durante la combustione è quella che le piante hanno assorbito con la fotosintesi in tempi recenti dall'atmosfera, con conseguente bilancio neutro per le emissioni di carbonio e quindi per l'effetto serra stesso.

Tra tutte le fonti energetiche alternative, le biomasse di origine vegetale (e animale) attirano maggiori attenzioni per la loro flessibilità applicativa che consente di ottenere, con filiere produttive e tecnologiche consolidate, energia elettrica, meccanica e termica anche a livello diffuso sul territorio (Riva *et al.*, 2008).

Tali biomasse possono subire diversi processi di trasformazione energetica e tra le diverse opzioni suscitano un particolare interesse i cosiddetti biocarburanti (biofuels), che vengono proposti come prodotti sostitutivi e/o integrativi dei classici carburanti come gasolio e benzina usati per l'autotrazione in generale. Per biocarburanti si intendono una vasta serie di combustibili liquidi utilizzabili nei motori a scoppio. In particolare:

- Esteri metilici di oli vegetali o grassi animali (biodiesel)
- Etanolo (detto anche bioetanolo)
- Idrocarburi

Anche la questione dell'inquinamento del suolo, nella fattispecie, costituisce un serio problema ancora accompagnato da diversi dubbi e perplessità. Il suolo costituisce la parte della biosfera dove l'uomo vive e che egli trasforma a suo piacimento attraverso le varie forme di insediamento e le sue attività. Esso 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 sussiste un equilibrio tra le specie micro e macroscopiche che lo abitano. Con l'introduzione nel suolo di sostanze sconosciute o comunque presenti ma con concentrazioni differenti, si può rompere questa sottile armonia determinando condizioni di vita diverse (Radaelli e Calamai, 2001).

Oltre ad assolvere a funzioni vitali dal punto di vista ambientale, economico, sociale e culturale il suolo garantisce le produzioni alimentari, agricole e selvicolturali. Inoltre, funge da elemento del paesaggio e del patrimonio culturale (Commissione Comunità Europea, 2002).

Quando del suolo se ne fa un uso del tutto estraneo alle sue normali attitudini è allora che iniziano i veri problemi. Infatti se esso diviene principalmente fonte di materie prime o usato esclusivamente come supporto per le attività umane, la capacità del suolo di assicurare le sue naturali funzioni è estremamente ridotta o modificata, incidendo negativamente sulle catene alimentari provocando squilibri agli ecosistemi (Commissione Comunità Europea, 2002). Poi si evidenzia il fatto che la sua capacità

tampone e di accumulo nei confronti delle sostanze inquinanti cambia e ciò può determinare un improvviso rilascio degli inquinanti stessi una volta raggiunto il limite di ritenzione (Stigliani, 1992). Per questo motivo si è recentemente riconosciuta al problema dell'inquinamento del suolo l'importanza che merita, 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).

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) possono avere origine locale (puntiforme) o diffusa (Ciafani *et al.*, 2005). Sono soprattutto le deposizioni atmosferiche, dovute alle emissioni dell'industria, del traffico e dell'agricoltura, a rilasciare nel suolo contaminanti acidificanti (ad esempio SO₂, NO_x), metalli pesanti e diversi altri composti organici (ad esempio diossine, bifenili policlorurati, idrocarburi policiclici aromatici) i quali riducono progressivamente il potere tampone del suolo determinando i problemi di cui prima. Inoltre l'acidificazione favorisce la lisciviazione di sostanze nutritive con conseguente perdita di fertilità del terreno e possibili problemi di eutrofizzazione delle acque (Radaelli e Calamai, 2001).

Anche diverse pratiche agricole se svolte con approssimazione e senza cognizione di causa possono essere considerate fonte di contaminazione diffusa del suolo come la concimazione e la difesa fitosanitaria, a causa anche della presenza di metalli pesanti, su tutti cadmio e rame, composti organici scarsamente biodegradabili e microrganismi potenzialmente patogeni (Commissione Comunità Europea, 2002).

Anche in Campania, nella fattispecie, la situazione appare complessa e variegata. Nella nostra regione sono presenti ben 6 dei 55 Siti contaminati di Interesse Nazionale (SIN) censiti in Italia (Fig. 2), ma a questi si sommano numerose aree di interesse locale che, seppur meno estese e inquinate, concorrono a determinare nel complesso una situazione di diffuso degrado territoriale, con potenziale compromissione dei suoli e dei corpi idrici superficiali e sotterranei. A ciò poi si aggiunge l'esistenza di una notevole quantità di zone interessate dalla presenza di rifiuti urbani e non, discariche abusive e sversamenti illegali di rifiuti talvolta anche molto pericolosi e nocivi per la salute dell'uomo.

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". I Siti di Interesse Nazionale sono aree, generalmente di vaste dimensioni, nelle quali la quantità e/o la tipologia degli inquinanti presenti, oltre a costituire un rischio per l'ambiente e per la salute umana, possono altresì compromettere lo sviluppo di aree di importanza strategica per le loro prerogative storico-paesaggistiche, ovvero per le opportunità di sviluppo del territorio che conseguirebbero al loro risanamento (ARPAC, 2005).

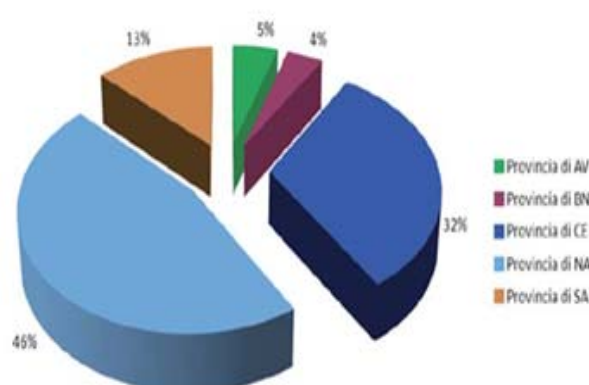


Figura 2 – Censimento dei Siti potenzialmente Inquinati nella Regione Campania (ARPAC 2005).

In Campania, a partire dal 1998, con diversi provvedimenti normativi, sono stati individuati sei siti di interesse nazionale (Vito, 2008):

- Napoli Orientale – Legge n. 426 del 1998
- Litorale Domitio Flegreo ed Agro Aversano - Legge n. 426 del 1998
- Napoli-Bagnoli Coroglio – Legge n. 426 del 1998
- Aree del Litorale Vesuviano – Legge n. 179 del 2002
- Bacino idrografico del fiume Sarno – Legge n. 266 del 2005
- Pianura – D.M. 11 Aprile 2008

Molte tecniche di bonifica sono state studiate e messe a punto per il risanamento dei siti inquinati. E' necessario, però, sottolineare la differenza tra messa in sicurezza permanente e bonifica, concetti spesso confusi l'un per l'altro ma totalmente diversi. Nel caso della messa in sicurezza permanente, i contaminanti non vengono eliminati bensì si cerca di isolarli in determinati spazi impedendone la diffusione nelle matrici

ambientali circostanti, minimizzando quindi le possibilità di contaminazione dei recettori adiacenti. Pertanto, con la messa in sicurezza, il sito resta contaminato e non può essere riconvertito a nessun uso. Questa tipologia di intervento è preferita per tutti quei casi (ad es. discariche) in cui qualsiasi tecnica di bonifica può risultare inutile o troppo costosa.

Per bonifica, invece, si intende l'eliminazione delle fonti d'inquinamento o la riduzione delle concentrazioni delle sostanze inquinanti al di sotto dei valori limite previsti per la destinazione d'uso a cui si intende riconvertire quel sito. Questa tipologia di intervento può essere adottata per il trattamento del suolo, del sottosuolo e degli acquiferi sotterranei.

La “*phytoremediation*”, tra le svariate tecniche di bonifica dei siti inquinati, appare quella a minore impatto ambientale, molto economica soprattutto se confrontata con le altre e riduce le dimensioni dei centri di smaltimento dei residui (Glass, 1999).

1.2 Tecniche di bonifica dei suoli contaminati: la *phytoremediation*

L'uomo e gli animali in generale si trovano alla fine di molte catene alimentari. Cibandosi anche di vegetali, si è pensato che l'assorbimento alimentare di metalli pesanti e altre sostanze dannose fosse dovuto alla capacità di alcune piante di accumulare tali prodotti nocivi nei loro tessuti. Per molti anni quindi, la capacità delle piante di bioaccumulare metalli nella porzione epigea ed edibile è stata considerata una caratteristica dannosa (Kabata-Pendias e Pendias, 1989). Solo recentemente, l'utilità delle piante accumulatrici di metalli per la bonifica ambientale di siti inquinati è stata pienamente realizzata (Kumar *et al.*, 1995).

La scelta di una tecnica di bonifica piuttosto che di un'altra è strettamente legata alla conoscenza di diversi fattori: caratteristiche geologiche e idrologiche del sito da bonificare, l'estensione dell'area inquinata, i volumi di suolo contaminato, il grado di inquinamento e la distribuzione spaziale delle sostanze tossiche nel sito, nonché le vie di esposizione e le caratteristiche della popolazione su cui possono manifestarsi gli effetti dell'inquinamento. La scelta della tecnica ottimale varia anche in base alla natura intrinseca della stessa (si varia da tecniche chimico-fisiche classiche a tecniche microbiologiche), ai tempi di realizzazione, agli effetti secondari di impatto ambientale, ai costi e alle normative relative a quella particolare area.

Le tecniche convenzionali per bonificare un terreno inquinato si limitavano, fino a qualche tempo fa, all'escavazione ed al suo trasferimento in discariche apposite, oppure

alla sua copertura ed isolamento. Dai dati presentati dalla relazione sullo stato dell'ambiente della Regione Piemonte pubblicata nel 2000, si ricava che lo scavo e la rimozione del terreno inquinato è ancora l'intervento maggiormente diffuso (69%). Sicuramente lo smaltimento in discarica è molto dispendioso, in termini di uso del territorio, e non sostenibile, tenendo conto anche della difficoltà di installare discariche idonee sul territorio. Questo però non esclude il fatto che anche tutte le altre tecniche di bonifica esigono discariche per accantonare i residui che, comunque, risultano essere inferiori di diversi ordini di grandezza ai volumi di suolo tal quali.

Altre tecniche più complesse e più efficienti di ultima generazione per la bonifica dei suoli dai metalli pesanti si dividono inizialmente in “*in-situ*” e “*ex-situ*”. Gli interventi *in-situ* permettono di decontaminare le aree di interesse senza rimuovere il suolo o le acque da bonificare. Da un punto di vista ambientale ed agronomico si preferiscono di gran lunga quelli *in-situ* a quelli *ex-situ*. Si ricorre agli interventi *ex-situ* solo quando i primi non sono in grado di garantire livelli di degradazione sufficienti oppure quando, a causa delle particolari caratteristiche della matrice contaminata o dell'elevata concentrazione degli inquinanti si rendono, per forza di cose, necessari l'escavazione e il successivo trattamento del terreno contaminato o l'estrazione in superficie delle acque di falda inquinate.

I trattamenti di bonifica si possono ulteriormente dividere in:

- Trattamenti chimico-fisici: *soil flushing (in-situ)*, *soil washing (ex-situ)*, *soil venting (in-situ)*, immobilizzazione con leganti (*in-situ /ex-situ*), barriere reattive permeabili (*in-situ*), *air sparging (in-situ)*
- Trattamenti termici: vetrificazione, desorbimento termico, incenerimento, pirolisi
- Trattamenti biologici o biorisanamento: *bioaugmentation (in-situ)*, *biostimulation (in-situ)*, *bioventing (in-situ)*, utilizzo di ceppi fungini (*in-situ*), *phytoremediation (in-situ)*

È solo negli ultimi anni che si è cominciato a riflettere seriamente sulla possibilità di utilizzare elementi biologici quali le piante per assorbire gli inquinanti dal suolo e si sono moltiplicati i lavori e gli studi che indicavano l'esistenza di piante in grado di accumulare elevate quantità di metalli pesanti. A queste piante è stato dato il nome di “iperaccumulatrici” proprio per questa loro capacità intrinseca e si è pensato che

avrebbero potuto svolgere un ruolo centrale nel processo di bonifica di siti inquinati con quella tecnica che verrà denominata “*phytoremediation*”.

Il termine anglosassone “*phytoremediation*” deriva dall’associazione dal greco “*phytos*” (pianta) e dalla radice latina “*remedium*” (curare, risanare). È un insieme di tecniche per la bonifica di suoli inquinati da sostanze organiche o inorganiche, tramite, appunto, l’utilizzo di specie vegetali. L’uso delle piante è auspicabile innanzitutto perché più economico e meno invasivo per il suolo non alterando negativamente la sua matrice (Glass, 1999). Inoltre la permanenza di una pianta sul sito contaminato permette di migliorarne la fertilità agronomica e quindi di avviare un processo di ripristino della fertilità del sito che potrà essere poi usato per scopi agricoli. È una tecnica utilizzabile per inquinanti sia organici che inorganici: i primi comprendono soprattutto idrocarburi, solventi clorati, idrocarburi alogenati come tricloroetilene (TCE) ed esplosivi come il trinitrotoluene (TNT). Gli inquinanti inorganici includono i composti non-metallici (arsenico), i radionuclidi (uranio) ed i metalli pesanti (mercurio, piombo, cadmio e rame per es.).

All’interno della *phytoremediation* si distinguono le seguenti “categorie” (Fig. 3 da Salt *et al.*, 1998):

- ✓ Fitodegradazione (tramite l’azione delle piante ed i microorganismi ad esse associati vengono biodegradati gli inquinanti e trasformati in altri composti non tossici)
- ✓ Rizofiltrazione (si decontamina il substrato attraverso processi di adsorbimento ed assorbimento da parte delle radici delle piante)
- ✓ Fitostabilizzazione (la pericolosità di alcune sostanze viene ridotta diminuendone la biodisponibilità)
- ✓ Fitovolatilizzazione (volatilizzazione nell’atmosfera di alcune sostanze ad opera della pianta)
- ✓ Fitoestrazione (rimozione degli inquinanti dal suolo attraverso l’accumulo nella biomassa delle piante)

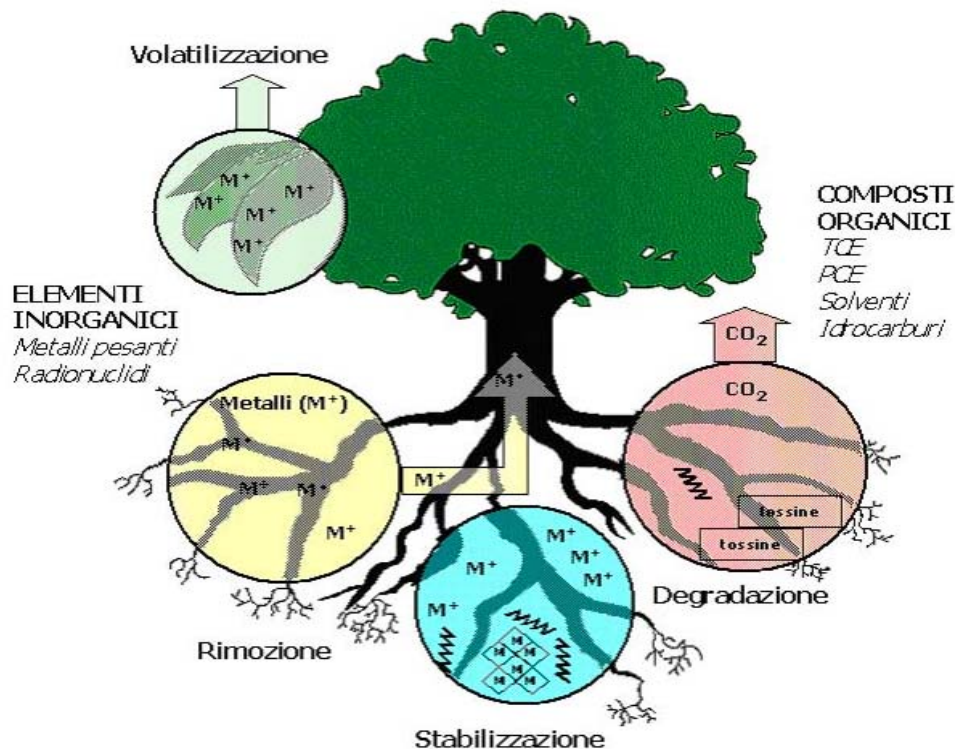


Figura 3 – Schema dei meccanismi coinvolti nella phytoremediation.

Fitodegradazione

Con questo processo la pianta viene utilizzata per la biodegradazione di inquinanti organici, come ad esempio TNT, TCE, che vengono mineralizzati in composti inorganici quali CO_2 , Cl_2 .

In alcuni casi sono coinvolti organismi endofitici (Cherian *et al.*, 2005) mentre dal punto di vista enzimatico le piante utilizzano enzimi come perossidasi, fosfatasi, nitrato-reduttasi, dealogenasi, perossigenasi.

Rizofiltrazione

Nel caso della rizofiltrazione gioca un ruolo fondamentale l'apparato radicale della pianta. Infatti grazie a quest'ultimo vengono rimossi gli inquinanti da una fase acquosa e concentrati negli organi ipogei, così proteggendo le falde dalla lisciviazione degli inquinanti. Il bioassorbimento dei metalli è favorito da fenomeni quali complessazione, scambio ionico, condensazione in idrossidi sulla bio-superficie e precipitazione. Quanto a quest'ultima, si ritiene che è fortemente favorita dall'abbassamento del pH e dall'azione degli essudati radicali. Si preferisce utilizzare piante terrestri anziché acquatiche per due motivi: le prime presentano un apparato radicale più esteso e più

fibroso; inoltre le piante acquatiche, data l'elevata quantità di acqua in esse contenuta, comportano ulteriori problemi per l'essiccamento e l'incenerimento.

Una volta accumulati i metalli si può procedere alla raccolta. Si può prelevare o solo l'apparato radicale o direttamente l'intera pianta. Attualmente le piante ritenute più adatte alla rizofiltrazione sono *Brassica juncea* ed *Heliantus annuus*: si è visto che la prima esprime le migliori performance soprattutto nell'accumulo di metalli come Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn nelle radici (Dushenkov *et al.*, 1995) mentre è stato osservato che il girasole è più adatto a rimuovere Pb (Dushenkov *et al.*, 1995).

Fitostabilizzazione

Già dal nome si capisce che il fine della fitostabilizzazione è quello di ridurre la biodisponibilità e la movimentazione delle sostanze pericolose immagazzinandole nell'apparato radicale e riducendo nel contempo il possibile percolamento di tali sostanze nella falda o lo spostamento per correnti d'aria. È stato dimostrato che la fitostabilizzazione è più efficace su suoli con tessitura fine e con una buona concentrazione di sostanza organica, ma si adatta bene anche a tutte le altre tipologie di suoli con contaminazione prevalentemente superficiale (Cunningham *et al.*, 1997; Berti e Cunningham, 2000).

Questa tecnica è consigliabile per ridurre i rischi di spostamento del contaminante, in attesa di trovare una soluzione adeguata (Berti e Cunningham, 2000) o quando le altre strategie di bonifica sono impraticabili a causa dell'estensione del sito. Per bloccare i contaminanti nel suolo si possono utilizzare ammendanti facilmente reperibili in commercio e anche piuttosto economici derivanti da minerali naturali (zeolite o apatite) o scarti di lavorazione contenenti ferro (Chlopeka e Adriano, 1996,1997). Inoltre per un ottimale processo di fitostabilizzazione è necessario, oltre ad una oculata scelta della specie vegetale, anche apportare al suolo fosforo e sostanza organica. Il primo migliora l'assorbimento dei metalli; la sostanza organica favorisce il ritorno alla vegetazione (Padmavathiamma *et al.*, 2007).

Fitovolatilizzazione

Sebbene gli studi si sono concentrati soprattutto su piante che disinquinano il terreno dal selenio come *Astragalus racemus*, *Typha latifolia* ed alcuni membri delle Brassicaceae (Padmavathiamma *et al.*, 2007) esistono altri contaminanti come As, Hg che possono esistere nell'ambiente anche come specie gassose. La fitovolatilizzazione utilizza delle piante in grado di assorbire questi elementi dal suolo e di emetterli nell'atmosfera in

forma gassosa attraverso il flusso traspirativo. A questo punto nasce il problema se, il rilascio di questi elementi nell'atmosfera, sia o meno dannoso. Secondo alcuni autori la liberazione di tali sostanze nell'ambiente non dovrebbe dare significativi apporti all'inquinamento atmosferico perché gli elementi in questione andrebbero rapidamente incontro a processi di fotodegradazione (Azaizeh *et al.*, 1997). È comunque consigliabile non utilizzare una simile tecnica in prossimità di zone popolate.

1.3 La fitoestrazione: limiti e prospettive per ottimizzare il processo di bioaccumulo

La “fitoestrazione” è una specifica tecnologia di bonifica, facente parte del più ampio concetto di *phytoremediation*, sebbene i due termini spesso vengano erroneamente usati come sinonimi (Prasad e Freitas, 2003). La fitoestrazione è solitamente definita come “l'utilizzazione di piante per il trasporto e la concentrazione di metalli a partire dal suolo fino alle parti raccogliabili delle radici e parti vegetali fuori dal suolo” (Kumar *et al.*, 1995).

Questa tecnica ha origini antiche e numerosi studi si sono succeduti nel tempo come testimonia l'annotazione di Agricola che nel 1556 documentava, nel *De Re Metallica*, cambiamenti di taglia, aspetto e distribuzione delle piante cresciute in prossimità di vene minerarie (Zerbi e Marchiol, 2004). Un altro esempio è fornito nel 1588 da Thalius che indicava *Minuartia verna* come un buon indicatore delle vene di piombo e zinco in un'area mineraria di Harz (Germania). Questi fenomeni, nei secoli successivi, hanno alimentato l'interesse degli studiosi tanto da condurre alla nascita di una nuova disciplina quale la fitogeografia (Zerbi e Marchiol, 2004).

Studi più accurati sulle concentrazioni di metalli presenti nei tessuti di queste piante misero in luce la straordinaria capacità di bioaccumulo verso uno o più metalli pesanti (Chaney *et al.*, 1995).

Un metallo pesante è definito, in base alla densità, come un elemento chimico la cui densità è maggiore di 7 g/cm^3 o, in base al peso atomico, come un elemento il cui peso atomico è maggiore di 20. Nel suolo i metalli pesanti sono normalmente presenti e la maggioranza di essi, anche quelli più tossici, ad esempio Pb, As, Cd ed Hg, hanno concentrazioni molto variabili comprese tra pochi mg/kg a 1000 mg/kg (Adriano, 1986; Alloway, 1995). In suoli fortemente “antropizzati” si rilevano concentrazioni tra le più elevate, ad esempio in suoli in prossimità di miniere o di aree industriali ed è stato stimato che dalla fine del XIX secolo ad oggi le concentrazioni di Pb, Zn, Cd e Cu siano aumentate anche del 10% negli strati superficiali del suolo (Renella *et al.*, 2004). Questi

elementi, assieme ad As, Cr, Hg, Ni e Mn possono essere ritenuti i più diffusi come inquinanti (Radaelli e Calamai, 2001). La grande pericolosità dei metalli pesanti risiede, come per altri xenobiotici, nella capacità di accumularsi in modo seriale attraverso la catena alimentare, andando incontro ad un aumento di concentrazione passando da specie preda a specie predatrice: tale fenomeno è noto come biomagnificazione. Inoltre, siccome sono presenti già in forma elementare, non possono essere degradati naturalmente cosa che invece avviene per i contaminanti organici dopo un lungo periodo di persistenza nell'ambiente (Wade *et al.*, 1993).

Gli effetti nocivi sulla salute dell'uomo sono strettamente legati alla natura chimica del contaminante, la modalità di esposizione, la quantità di contaminante presente, la durata dell'esposizione e fattori genetici individuali. L'esposizione a molti dei contaminanti menzionati può essere causa, nell'individuo che ne viene a contatto, di disfunzioni a livello riproduttivo e metabolico, di un aumento dell'incidenza di tumori, danni a reni, fegato e sistema nervoso centrale (Tab. 2).

Tabella 2 – Importanza ed effetti degli elementi pesanti in traccia (presenti nei suoli e nelle rocce a concentrazioni inferiori allo 0.1 %) sulla nutrizione di piante e animali (elaborato da Adriano, 1986 e Alloway, 1995).

ELEMENTO	Essenziale o benefico		Tossico		Note
	Piante	Animali	Piante	Animali	
Ag	No	No	***	Si	Interagisce con il Cu ed il Se
As	No	Si	***	Si	Importare la speciazione
B	Si	No	Si	***	Stretto margine di tolleranza
Ba	No	Possibile	***	***	Insolubile, poco tossico
Be	No	No	Si	Si	Importare la speciazione
Bi	No	No	Si	Si	Relativamente poco tossico
Cd	No	No	Si	Si	Stretto margine di tolleranza, bioaccumulato, cancerogeno
Co	Si	Si	Si	Si	Poco tossico, bioaccumulato
Cr	No	Si	Si	Si	Importante la speciazione, cancerogeno
Cu	Si	Si	Si	Si	Stretto margine di tolleranza
F	No	Si	Si	***	Tossicità cumulativa per piante e animali
Hg	No	No	***	Si	Stretto margine di tolleranza, bioaccumulato, volatile
Mn	Si	Si	ph<5	***	Ampio margine di tolleranza, tossico nei suoli acidi
Mo	Si	Si	***	Si	Bioaccumulato, fortemente tossico per gli animali
Ni	No	Si	Si	Si	Relativamente poco tossico, cancerogeno
Pb	No	No	Si	Si	Bioaccumulato, fortemente tossico per gli animali
Sb	No	No	***	Si	Insolubile, poco tossico
Se	No	No	***	Si	Bioaccumulato, fortemente tossico per gli animali
Sn	No	Si	***	Si	Poco tossico, non è bioaccumulato
Ti	No	Possibile	***	***	Poco tossico, insolubile
Tl	No	No	***	Si	Traslocato nelle porzioni epigee dei vegetali
V	Si	Si	***	Si	Stretto margine di tolleranza, bioaccumulato, cancerogeno
W	No	No	***	***	Insolubile, molto mobile nei vegetali
Zn	Si	Si	***	***	Ampio margine di tolleranza, fortemente complessato nel suolo

**** dati non pervenuti

Preferibilmente, le piante per la fitoestrazione di tali metalli dovrebbero avere, rispetto alle altre, le seguenti caratteristiche: 1-tolleranza ad alte concentrazioni di metalli, 2-accumulare ragionevolmente grosse quantità di metallo nei loro tessuti fuori dal suolo,

3–rapido tasso di crescita, 4–produzioni ragionevoli di elevate biomasse in campo, 5–abbondante apparato radicale, 6–facilità di gestione culturale, 7– proprietà geneticamente stabili, 8–eventuale interesse economico della biomassa (Alkorta *et al.*, 2004).

Quelle piante che riescono ad accumulare grosse quantità di metalli nei tessuti della parte aerea sono dette iperaccumulatrici (Reeves and Baker, 2000) la cui definizione risale al 1989 ed è ancora valida: consideriamo una pianta tale quando è in grado di accumulare metalli nei tessuti in concentrazioni di almeno 1% (Zn, Mn), 0,1% (Ni, Cr, Co, Cu, Pb e Al), 0,01% (Cd e Se) o 0,001% (Hg) su peso secco (Baker e Brooks, 1989). Le iperaccumulatrici sono caratterizzate dal fatto che l'incremento di concentrazione di un determinato elemento non aumenta linearmente all'aumentare della sua concentrazione nel substrato come invece accade in una specie indicatrice (Fig. 4). In ogni caso, la capacità di assorbimento da parte delle colture rallenta man mano che le concentrazioni di metalli nel suolo diminuiscono (Fagnano e Quaglietta, 2004).

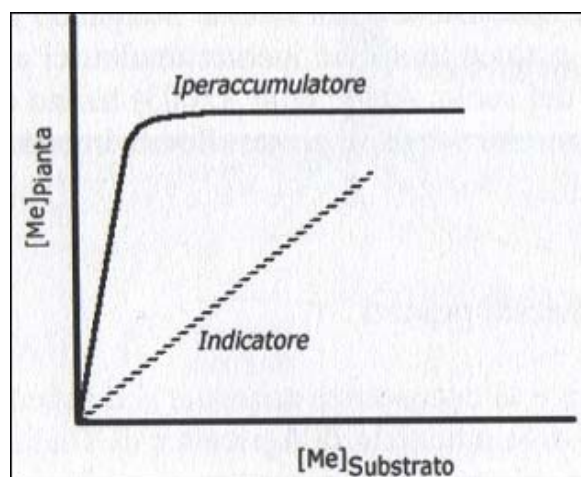


Figura 4 – Comportamento di una specie iperaccumulatrice ed una indicatrice in presenza di metalli pesanti.

La iperaccumulazione di metallo è un adattamento ecofisiologico, da parte di queste piante, ai terreni metalliferi (Maywald e Weigel, 1997) e sebbene questo comportamento non sia stato ancora pienamente chiarito, si ipotizza che agisca come un mezzo di difesa contro gli agenti patogeni delle piante (Boyd *et al.*, 1994) e ne prevenga anche la predazione (Sagner *et al.*, 1998).

In relazione a questi requisiti tutte le specie iperaccumulatrici soffrono, però, di uno o più dei seguenti difetti: lento e ridotto sviluppo di biomassa, derivante dalla spesa energetica necessaria per sostenere i meccanismi fisiologici che le proteggono dai metalli in eccesso presenti nel suolo (Boyd, 1998); apparato radicale poco esteso;

necessità di determinate condizioni climatiche per il loro sviluppo ottimale; necessità di pratiche agronomiche per ottimizzare il processo di bioaccumulo e selettività di assorbimento (Kayser *et al.*, 1999, 2000; Ensley *et al.*, 1999; Mathis e Kayser, 2001).

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 tre fattori principali (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 ($[Me]_{\text{pianta}}$) per la biomassa prodotta dalla stessa (t_1) e la concentrazione del metallo nel suolo ($[Me]_{\text{suolo}}$) per il volume di suolo esplorato (t_2):

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

Nonostante ciò, è importante sottolineare che l'efficienza fitoestrattiva non dipende solo da fattori legati alla pianta (come evidenziato sopra) ma soprattutto dai fattori legati al suolo come la mobilità dei metalli e, principalmente, dalla loro biodisponibilità nel suolo. È proprio quest'ultimo, anziché le concentrazioni totali, il fattore principale che ne determina la citotossicità (Alkorta *et al.*, 2006).

La biodisponibilità di un metallo nel suolo, e quindi la sua tossicità, è dovuta a fattori abiotici e biotici (Tab. 3 e 4): nel primo gruppo riportiamo il pH del suolo, la concentrazione delle soluzioni circolanti e la diminuzione del potenziale redox; nel secondo gruppo riportiamo per esempio l'acidificazione del suolo e l'escrezione di chelanti da parte della pianta, per citare i più importanti.

Tabella 3 – Fattori abiotici che influenzano la biodisponibilità dei metalli pesanti nella rizosfera.

Stimolanti	Limitanti
Diminuzione del pH	Aumento del pH e del contenuto di Ca^{2+}
Concentrazione delle soluzioni circolanti	Dilavamento del terreno
Processi di diffusione nelle soluzioni	Adsorbimento
Diminuzione del potenziale redox	Aumento del potenziale redox
Composizione minerale del suolo	

Tabella 4 – Fattori biotici che influenzano la biodisponibilità dei metalli pesanti nella rizosfera.

Stimolanti	Limitanti
Acidificazione del suolo	Selettività delle membrane biologiche
Attività dei traslocatori	Danneggiamento delle membrane radicali
Rilascio dei riduttori	Strategie per evitare l'ingresso dei metalli
Escrezione di molecole chelanti	Rilascio di ossidanti

L'assorbimento dei metalli e l'accumulo degli stessi nei tessuti della pianta sono controllati da due processi: la suzione radicale e la traspirazione fogliare. Questi rappresentano i motori che forniscono l'energia ai metalli per muoversi a partire dalle radici attraverso la pianta e a concentrarsi nei tessuti aerei della pianta stessa. Questo processo parte nel momento in cui una frazione di metallo viene adsorbita sulla superficie radicale. La frazione di metallo biodisponibile attraversa le membrane cellulari e arriva all'interno delle cellule radicali per poi essere immobilizzata nel vacuolo cellulare. La frazione mobile intracellulare, invece, attraverso il tessuto vascolare radicale (xilema) viene traslocata ai tessuti aerei della pianta (foglie e steli) dove sarà bioaccumulata. Le piante riescono a tollerare la presenza dei metalli senza subirne gli effetti tossici grazie alla capacità di compartimentalizzazione, ovvero la tendenza ad isolarli soprattutto nella parete cellulare e nel vacuolo. Il loro sequestro è permesso dalla presenza di particolari molecole con elevata affinità per i metalli, come

ad esempio le fitochelatine (piccoli peptidi), metallotioneine (proteine a basso peso molecolare, 6-7 kDa), acidi organici (es. acido malico) e aminoacidi (es. istidina).

A più riprese si è detto che la fitoestrazione, rispetto alle altre tecniche di bonifica convenzionali, è la più economica. Nella tabella 5 si riportano i prezzi delle principali tecniche di bonifica (Glass, 1999):

Tabella 5 – Costi delle tecniche per il trattamento del suolo.

Trattamento	Fattori aggiuntivi	Costo (\$/ton)
Vetrificazione	Monitoraggio a lungo termine	75-425
Smaltimento in discariche	Trasporto/scavo/monitoraggio	100-500
Trattamenti chimici	Riciclaggio dei contaminanti	100-500
Elettrocinesi	Monitoraggio	20-200
<i>Fitoestrazione</i>	<i>Monitoraggio</i>	<i>5-40</i>

I limiti della fitoestrazione

Qualsiasi tecnologia, prima di diventare operativa al 100%, deve necessariamente superare uno step fondamentale per la sua consacrazione. Tale passaggio è rappresentato dalla verifica della sua efficacia nonché dal suo impatto sul mercato. Anche la fitoestrazione, nella fattispecie, non manca a questo esame. I limiti e le incertezze che aleggiano intorno a questa tecnologia di bonifica sono i seguenti:

- *Fattori legati alla pianta.* Si è detto a più riprese che l'efficienza fitoestrattiva di una coltura è estremamente legata alla produzione di biomassa: a parità di accumulazione, maggiore è la quantità di biomassa prodotta, maggiore sarà la quantità di inquinanti asportati. In merito bisogna sottolineare che la maggior parte delle specie iperaccumulatrici hanno un habitus vegetativo abbastanza limitato e quindi offrono una produzione di biomassa molto contenuta. Inoltre queste specie possono essere caratterizzate da una bassa tolleranza ai metalli o da una insufficiente traslocazione degli stessi dalla porzione ipogea a quella epigea. Anche la gestione della biomassa stessa può rappresentare un problema in quanto i costi relativi al trasporto e trasformazione di questo materiale pericoloso delineano uno dei limiti applicativi più complessi.
- *Biodisponibilità dei metalli.* Si sa che la frazione biodisponibile è solo una parte di quella totale ed è a quella biodisponibile che la fitoestrazione fa riferimento.

Se la frazione non disponibile di un determinato sito è maggiore della soglia fissata per legge (in tutti i Paesi UE la legislazione ambientale fissa i limiti di accettabilità dei metalli pesanti nel suolo facendo riferimento al contenuto totale degli elementi) la fitoestrazione non può essere presa in considerazione come valido strumento utilizzabile per la bonifica di quel sito.

- *Contaminazione multipla.* Non sempre accade che un suolo sia contaminato da un unico metallo pesante, anzi è molto frequente avere siti che presentino contaminazioni di più metalli. Siccome la maggior parte degli studi riguardanti la fitoestrazione sono stati eseguiti con piante in matrici inquinate da un unico metallo, non si sa come reagirebbe la stessa pianta qualora la matrice fosse contaminata da un altro o più metalli pesanti. Ciò significa che su un suolo multicontaminato, per una corretta fitoestrazione, bisognerà ricorrere ai cosiddetti *treatment trains* cioè trattamenti integrati nei quali vengono coltivate specie diverse individuate in base alla loro specializzazione.
- *Localizzazione della fonte d'inquinamento.* Le radici esplorano il suolo nelle tre dimensioni e il quantitativo di contaminante asportato varia anche in base al volume di suolo esplorato dalle radici stesse. Paradossalmente è più facile e veloce bonificare aree estese dove persiste una contaminazione superficiale piuttosto che aree contenute ma con una contaminazione profonda.
- *Tempi di bonifica.* Un sito inquinato rappresenta un pericolo per l'uomo e l'ambiente e quindi è necessario che l'intervento di bonifica venga eseguito al più presto possibile. Nel caso della fitoestrazione non è ancora possibile effettuare stime circa i tempi di bonifica anche se questi sicuramente sono da considerarsi molto più lunghi rispetto agli interventi di tipo chimico-fisici. Ad oggi, siccome si fa riferimento a dati teorici ottenuti in laboratorio che poi si estendono su scala reale, è difficile valutare con esattezza la durata di un intervento di fitoestrazione in quanto le condizioni di campo sono enormemente diverse rispetto a quelle di laboratorio.

Pratiche agronomiche per ottimizzare il processo di bioaccumulo

Al di là dell'aspetto puramente tecnico e scientifico esistono una serie di pratiche agronomiche atte a migliorare il processo di bioaccumulo delle colture.

– Selezione della coltura

La scelta delle specie fitoestrattrici è, probabilmente, il fattore più importante che influenza il grado di rimozione e bioaccumulo dei metalli. In primo luogo, le specie autoctone sono da preferire alle specie aliene, in quanto queste ultime potrebbero risultare invasive e disturbare l'equilibrio dell'ecosistema. Inoltre è importante valutare il grado di contaminazione e la locazione dei contaminanti per un'appropriata scelta della specie vegetale. Ad esempio, per la bonifica di suoli contaminati superficialmente sarebbe più indicato scegliere una specie con un apparato radicale superficiale (es. erbacee) mentre specie con apparati radicali profondi (es. arboree) dovrebbero essere scelte per contaminazioni più spinte verso il basso.

Molto probabilmente la specie vegetale “perfetta” non esiste ma un impulso decisivo potrebbe derivare dall'ingegneria genetica. Le biotecnologie, infatti, potrebbero consentire la creazione di una “super-pianta” specializzata nella bonifica di suoli contaminati, utilizzando come fonte di materiale genetico le specie iperaccumulatrici: il prototipo ideale sarebbe, ad esempio, una specie ad elevato potenziale produttivo con un fattore di bioaccumulazione $B_f \geq 10$ (tanto maggiore è il B_f tanto più rapido sarà il raggiungimento degli obiettivi della bonifica).

– Fertilizzazione

Il pH del suolo è un fattore determinante sia per lo sviluppo fisiologico delle colture sia per la mobilità di alcuni metalli pesanti. Chaney *et al.*, (2000) ha indicato che, dopo il processo di fitoestrazione, è possibile riprendere gli utilizzi agricoli e il normale sviluppo dell'ecosistema riportando il pH ad un valore vicino alla neutralità. Questo effetto può essere ottenuto trattando il terreno con calce. Tuttavia, una prematura calcitazione può aumentare la capacità del suolo di legare i metalli e restringere il potenziale di fitoestrazione.

D'altro canto, è stato dimostrato che l'acidificazione del suolo, derivante dall'impiego di solfato ammonico usato come fertilizzante, è in grado di favorire la mobilità e l'assimilazione di zinco e cadmio. Tuttavia l'aumentata mobilità dei metalli potrebbe rappresentare un'arma a doppio taglio, creando il pericolo di contaminazione delle acque di falda.

Il fosforo è un nutriente importante e le piante rispondono positivamente alle aggiunte di concime a base di fosforo aumentando la biomassa prodotta. L'aggiunta di concimi fosfatici, tuttavia, può anche inibire l'assorbimento di alcuni importanti metalli contaminanti, come il piombo, a causa di precipitazioni metalliche come piromorfite e

cloropiromorfite (Chaney *et al.*, 2000). Una possibile soluzione a ciò è l'apporto di fosforo mediante applicazioni fogliari. Infatti in questo modo si garantisce il nutriente alle piante senza interferire sulla mobilità dei metalli (Lasat, 2000).

– Semina

Il grado di estrazione dei metalli dipende dalla quantità di biomassa vegetale prodotta che è influenzata dalla densità di impianto (piante/m²). Tale densità influenza sia la resa/pianta sia la resa/ha. In generale, una maggiore densità tende a minimizzare la resa per pianta e a massimizzare la resa per ettaro. Essa influenza anche i flussi di crescita e di sviluppo delle piante. Infatti, ad un aumento della densità corrisponde inevitabilmente una maggiore competizione, da parte delle piante, per acqua e nutrienti, oltre ad un'influenza negativa sull'architettura degli apparati radicali, con ovvie conseguenze sull'assorbimento dei metalli.

– Rotazione colturale

La rotazione colturale è un altro principio agronomico in grado di potenziare la fitoestrazione. Infatti tutte le colture, comprese quelle utilizzate per la bonifica dei suoli, dovrebbero essere ruotate per combattere la proliferazione di erbe infestanti, predatori e malattie che incidono negativamente sulla resa. Quando i tempi di azione previsti per la bonifica sono brevi (2-3 anni), la monocoltura può dare risultati significativi. Ma essendo la maggior parte dei progetti di fitoestrazione a lungo termine (>10 anni), è molto improbabile che si possa ottenere una pulizia del sito accettabile con una sola coltura fitorimediatrice.

L'obiettivo che ci si propone di raggiungere nel prossimo futuro è quello di identificare rotazioni colturali specializzate messe a punto per bonificare efficacemente suoli contaminati da specifici metalli.

– Diserbo e irrigazione

Anche diserbo e irrigazione sono due pratiche agronomiche estremamente importanti. Le erbe infestanti, che ostacolano l'affrancamento delle giovani piante, possono essere controllate meccanicamente o chimicamente agendo in pre-emergenza o in post-emergenza.

E' necessario garantire un adeguato tasso di umidità all'interno del suolo in quanto l'assorbimento dei metalli da parte delle radici dipende dal movimento degli stessi nella soluzione circolante del suolo. Inoltre, la traslocazione dei metalli verso la parte epigea

della piante avviene mediante un flusso di massa in risposta a gradienti di potenziale idrico. Il volume di acqua da erogare deve compensare le perdite per evaporazione e traspirazione della coltura.

– Epoca di raccolta

L'epoca di raccolta più opportuna può essere dedotta dall'analisi di dati riferiti alla crescita delle colture per la fitoestrazione e quindi dalla produzione di biomassa andando analizzare indici come ad esempio LAI (*Leaf Area Index*), NAR (*Net Assimilation Rate*), CGR (*Crop Growth Rate*). Tali parametri dovranno essere poi incrociati con l'analisi del tasso di assimilazione dei metalli pesanti nel corso del ciclo colturale per poter decidere il miglior momento per la raccolta. Quest'ultimo deve, inoltre, coincidere con il periodo che precede la caduta delle foglie. Infatti, se ciò avvenisse, i metalli assimilati nella porzione epigea tornerebbero al suolo vanificando il processo intero.

Fitoestrazione assistita

Si può suddividere la fitoestrazione in due categorie (Fig. 5): quella continua e quella assistita (Salt *et al.*, 1998).

Con la prima le specie iperaccumulatrici assimilano e accumulano i metalli pesanti ad un ritmo costante durante l'intero ciclo di accrescimento fino alla raccolta (Zerbi e Marchiol, 2004). La fitoestrazione assistita (o indotta), invece, consiste nell'utilizzo di specie iperaccumulatrici ad alta produzione di biomassa coadiuvate da una serie di pratiche atte a stimolare, in una determinata fase del ciclo colturale, un intenso accumulo di metalli pesanti nei tessuti; tra queste pratiche si annota quella che, tramite l'uso di sostanze chelanti da distribuire sul/nel terreno, è in grado di aumentare la solubilità dei metalli ed il loro assorbimento da parte delle piante (Zerbi e Marchiol, 2004).

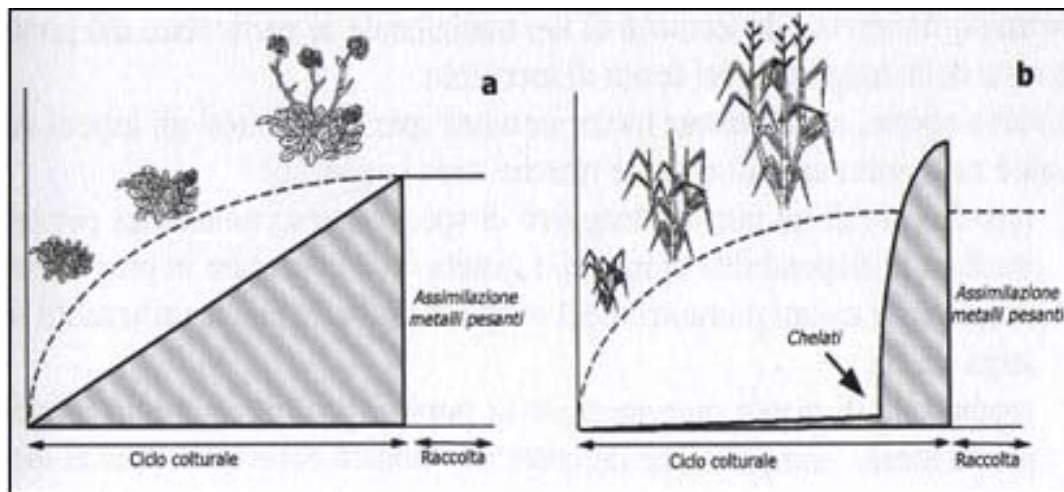


Figura 5 – a) fitoestrazione continua b) fitoestrazione indotta.

Il vantaggio della fitoestrazione continua è che non immettendo chelanti nel terreno, non ci sono rischi di una lisciviazione dei metalli verso le falde. Però siccome la fitoestrazione continua richiede tempi di bonifica spesso troppo lunghi, la prolungata permanenza nell'ambiente di specie vegetali con alte concentrazioni di metalli nei loro tessuti, aumenta il rischio che queste diventino fonte di cibo per la fauna locale immettendo così i metalli pesanti nella catena alimentare. Si preferisce quindi lavorare sulla fitoestrazione assistita per i suoi tempi di estrazione più ragionevoli. Il tempo richiesto per la bonifica di un sito con questo approccio dipende da vari fattori: tipo di metallo contaminante e grado di contaminazione, estensione dell'area, durata stagionale del periodo utile per la crescita della pianta e l'efficienza fitoestrattiva della pianta stessa. Secondo alcuni studi si aggira sui 20 anni ma i tempi si possono anche allungare (Kumar *et al.*, 1995; Blaylock e Huang, 2000).

Nel nostro esperimento di campo la fitoestrazione assistita è stata eseguita mediante l'aggiunta al suolo di sostanze in grado da un lato di aumentare la biodisponibilità dei metalli pesanti e dall'altro di migliorare la capacità fitoestrattiva delle piante: ovvero compost e *Trichoderma spp.*

Compost

Il compostaggio è un “*processo aerobico di decomposizione biologica della sostanza organica che avviene in condizioni controllate e permette di ottenere un prodotto biologicamente stabile in cui la componente organica presenta un elevato grado di evoluzione*”.

Il processo è caratterizzato da fasi ben distinte durante le quali l'attività microbica in condizioni di meso e termofilia ed in presenza di ossigeno, garantisce la

mineralizzazione delle frazioni biodegradabili con stabilizzazione della sostanza organica e sua successiva trasformazione in residuo umificato. Al fine di ottenere un prodotto valido cioè ricco di sostanze umosimili, dotato di elementi nutritivi, privo di semi di erbe infestanti nonché di sostanze inquinanti, compatibile con lo sviluppo fisiologico vegetale e igienicamente sicuro è necessario oltre ad un' oculata scelta delle matrici, anche il monitoraggio dei parametri chimico-fisici più importanti come pH, umidità, temperatura e ossigeno.

Un compost valido dal punto di vista agronomico è in grado di espletare le funzioni di un normale ammendante organico agendo positivamente sulle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo (Favoino e Centemero, 1993).

Nel caso in esame la fertilizzazione con compost non è in grado ovviamente di ridurre la quantità totale di metalli, ma è in grado di diminuirne la biodisponibilità grazie all'instaurarsi di reazioni di precipitazione, complessazione e adsorbimento. Al fine di ottimizzare il processo di fitoestrazione l'aggiunta di ammendanti, come il compost, può rivelarsi molto proficua. Infatti la sostanza organica derivante dall'aggiunta di compost immobilizza i metalli pesanti che poi la mineralizzazione rende biodisponibili successivamente (Mc Grath *et al.*, 2000). In altri termini le sostanze umiche riducono la mobilità passiva (diffusione, trasporto di massa) la quale determina flussi verticali o laterali con il rischio di contaminare i corpi idrici adiacenti ma aumenta la mobilità attiva (assorbimento radicale) che è mediata dagli acidi organici essudati dalle radici (Conte *et al.*, 2003). Infatti, l'aggiunta di sostanze umiche immobilizzano i metalli in complessi organo-metallici stabili proteggendoli dalla solubilizzazione, e riducendo così il rischio di lisciviazione e quindi di inquinamento delle falde. In presenza degli acidi organici degli essudati radicali, però, si consente il rilascio e quindi l'assorbimento da parte delle piante fitoestrattrici (Piccolo, 1989; Fiorentino *et al.*, 2010; Fiorentino *et al.*, 2012).

Inoltre, il compost si è rilevato essere molto adatto nei processi di *phytoremediation* in quanto è dotato di microrganismi con elevate capacità metaboliche e di biodegradazione nei confronti di molti composti organici tossici come idrocarburi policiclici aromatici, solventi clorurati e pesticidi (Vallini *et al.*, 2002).

Trichoderma spp.

Il *Trichoderma* è un fungo comune della rizosfera. E' dimostrato che riesce ad instaurare una simbiosi di tipo mutualistico con la porzione ipogea delle piante e, mediante iperparassitismo, limitare fortemente la crescita di funghi patogeni. Infatti, grazie alla

produzione di metaboliti tossici e alla forte azione micoparassitaria si è rivelato essere un ottimo antagonista di numerosi funghi patogeni di importanza economica come *F. oxysporum*, *R. solani*, *Phytophthora spp*, *Verticillium spp* e altri. Inoltre i funghi del genere *Trichoderma* esplicano una attività di antibiosi attraverso la produzione di un vasto numero di metaboliti secondari ad attività antibiotica (Ghisalberti e Sivasithamparam, 1991; Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998; Harman *et al.*, 2004). Alcuni ceppi stabiliscono forti e durature colonizzazioni delle superfici delle radici penetrando addirittura fino al di sotto dell'epidermide (Woo and Lorito, 2007). Grazie alla produzione di una grossa varietà di enzimi depolimerizzanti, *Trichoderma spp.* sono capaci di utilizzare come fonte di carbonio e azoto un ampio gruppo di composti e ciò, insieme all'abbondante produzione di conidi e all'adattabilità a diverse condizioni ambientali, conferiscono a queste specie un'elevata competitività rispetto alla restante microflora del terreno. Altri ceppi di *Trichoderma* interagiscono attivamente con la pianta promuovendone la crescita delle radici e del fusto (Harman *et al.*, 2004).

Negli ultimi anni è stata dimostrata anche la capacità di alcuni ceppi di *Trichoderma* di biodegradare o comunque tollerare una vasta gamma di inquinanti ambientali tanto è vero che in letteratura è riportato l'impiego di *Trichoderma spp.* nella *phytoremediation* di suoli inquinati da idrocarburi (Harman *et al.*, 2004). Tali ceppi, in virtù delle loro peculiarità, sono stati inseriti anche in programmi di recupero di suoli; essendo microrganismi rizosfera-competenti, contribuiscono alla stabilità delle comunità microbiche nella rizosfera, controllano la microflora patogena e competitiva; insomma migliorano la salute delle piante e aumentano lo sviluppo e la densità delle radici. Nella fattispecie si è visto che il ceppo T22 di *T. harzianum* aumenta notevolmente l'efficacia delle piante utilizzate per il fitorisanamento e recenti studi hanno dimostrato che il trattamento delle radici di felci con questo fungo determina una drastica riduzione dei livelli di arsenico nei suoli contaminati ed un significativo incremento della biomassa radicale, rispetto alle piante controllo (Harman *et al.*, 2004).

1.4 *Arundo donax* : caratteristiche botaniche, adattabilità, resistenza e utilizzi

La Canna comune (*Arundo donax* L.) o canna domestica trova nel bacino del Mediterraneo al Medio Oriente fino all'India la sua area geografica di origine sebbene attualmente si può rinvenire sia piantata che naturalizzata nelle regioni temperate e subtropicali di entrambi gli emisferi. È una pianta perenne che cresce in acque dolci o moderatamente salmastre formando dense macchie in terreni umidi di ambiente ripariale, lungo gli argini di fiumi e stagni ma anche sui margini di campi coltivati e

eventualmente anche sulle dune sabbiose. Ha una inusuale alta capacità fotosintetica che le conferisce importanti vantaggi ecologici e presenta un ciclo C_3 : analizzando, infatti, alcuni parametri come scambio di gas, fluorescenza e conduttanza stomatica in condizioni di crescita naturali, si è registrato un massimo tasso fotosintetico pari a $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un valore molto superiore ad altre piante dotate di ciclo C_4 (Rossa *et al.*, 1998).

È la più grande tra le canne d'Europa potendo facilmente raggiungere 6 m di altezza ma, nelle condizioni pedo-climatiche ideali, può anche superare i 10 m, con fusti, detti culmi, cavi del diametro di 2-3 cm. Le foglie con forma lanceolata e con alla base un ciuffo di peli lanosi sono alternate, di colore grigio-verde, lunghe 30-60 cm e larghe 2-6 cm. Questa specie fiorisce in settembre-ottobre producendo pannocchie piumose fusiformi lunghe 40-60 cm erette, di un colore che va dal verde pallido al violaceo. I fiori sono monoici, i semi raramente sono fertili, l'impollinazione è di tipo anemogama e la riproduzione avviene per lo più per via vegetativa attraverso i rizomi sotterranei. Le canne contengono silice e forse questa è la principale ragione per la loro resistenza e durabilità.

Rispetto alle specie annuali, le colture erbacee perenni, come l'*Arundo*, presentano vantaggi energetici significativi, permettendo di ammortizzare i costi d'impianto (pari al 50% della energia totale spesa per la coltura) lungo l'intera durata della coltivazione. Il limitato bisogno di lavorazioni del terreno e quindi i ridotti rischi di erosione in ambiente collinare, fanno dell'*Arundo*, ma in generale di tutte le specie perenni, piante con importanti vantaggi ecologici; a ciò si aggiunge anche la capacità di incrementare la biodiversità tellurica ed il sequestro del carbonio nel suolo. È una specie che si distingue per la sua spiccata rusticità avendo una bassa domanda di elementi nutritivi, alta resistenza ad agenti patogeni e parassiti fitofagi, resistenza a stress idrici e termici e presenta una capacità di crescita in substrati a forte concentrazione salina: questo rende l'*Arundo* una coltura che si adatta ad ambienti molto poco ospitali quindi la sua coltivazione può avvenire anche in terreni marginali. Offre numerosi vantaggi anche dal punto di vista ambientale tra cui effetto antierosivo, protezione delle falde dalla lisciviazione dei nitrati e di inquinanti, bilancio del carbonio e poi anche il fatto che accumula una enorme quantità di carbonio che può essere usato a fini energetici o industriali.

Alcuni studi hanno recentemente messo in evidenza le capacità di *A. donax* per il risanamento o decontaminazione ambientale di siti fortemente inquinati da sostanze

organiche o metalli pesanti mediante il loro assorbimento, degradazione e stabilizzazione come soluzione efficace e sostenibile da un punto di vista economico e ambientale. La canna comune presenta, inoltre, il vantaggio ecologico di non essere appetita dagli animali, e quindi evita la diffusione di sostanze tossiche e persistenti nella catena alimentare.

Gou e Miao (2010) hanno osservato come la canna comune possieda una forte tolleranza ai metalli pesanti ed in presenza di forti concentrazioni di taluni metalli, come cadmio e nichel, non sono stati osservati effetti depressivi a carico del tasso fotosintetico e della crescita della pianta (Papazoglou *et al.*, 2005) così come di altri importanti parametri fisiologici, quali conduttanza stomatica, concentrazione intercellulare di CO₂, resistenza stomatica, contenuto e fluorescenza della clorofilla (Papazoglou *et al.*, 2007).

L'*Arundo donax* si presenta quindi come la specie più adatta al nostro scopo, soddisfacendo tutti i requisiti necessari:

- ✓ E' una specie a rapidissima crescita (tra le migliori al mondo, quasi 10 cm al giorno)
- ✓ Non necessita di particolari cure colturali
- ✓ Si adatta a quasi tutti i tipi di suoli
- ✓ Produce, in condizioni ottimali, una notevole quantità di biomassa (fino a 40-50 t ha⁻¹) (Fig. 6)
- ✓ Apparato radicale profondo (200 cm)
- ✓ Non consente il pascolamento essendo una specie non pabulare garantendo una copertura fitta
- ✓ Consente reddito: media di 20 t ha⁻¹ x 50€ t⁻¹ = 1000 € t⁻¹ come biomassa da energia
- ✓ E' un'ottima specie per quanto riguarda la *phytoremediation*



Figura 6 – Differenze di habitus vegetativo tra specie iperaccumulatrici, *Alyssum wulfenianum* (A) e specie ad alta produttività, *Arundo donax* (B).

1.5 Utilizzazione delle biomasse

Ancora in fase di studio è il destino e quindi l'eventuale riutilizzo delle biomasse provenienti dal processo di fitoestrazione, soprattutto perché questo aspetto coinvolge diverse competenze tecnico-scientifiche.

Maneggiare questi “scarti” significa affrontare problemi logistici ed economici. In primo luogo essendo le quantità spesso molto elevate si richiede una riduzione di volume (Blaylock e Huang, 2000); infatti Raskin *et al.*, (1997) e Kumar *et al.*, (1995) hanno proposto a tal fine di sottoporre la fitomassa a compostaggio e pressatura.

La biomassa usata per estrarre gli inquinanti, in realtà, può fungere da vera e propria fonte di guadagno allorquando essa venga impiegata per produrre energia per combustione o gassificazione seguita da cogenerazione. Le ceneri prodotte, ovviamente ricche in metalli, possono essere destinate, qualora economicamente conveniente, a processi estrattivi quindi andando a recuperare i metalli stessi. Tra le tecniche idrometallurgiche usate per estrarre i metalli dalle ceneri il metodo *carrier in pulp* potrebbe fornire una soluzione ai problemi connessi al trattamento e recupero dei metalli dalle ceneri prodotte dopo l'incenerimento dei residui vegetali (Alloro *et al.*, 2008). Nel caso in cui ciò non sia possibile tali ceneri possono essere 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).

Anche diverse produzioni *no food* (amido per la produzione di carta, colle, plastiche, olio per la produzione di biodiesel o oli industriali) possono portare ad un possibile

ritorno economico, in quanto molte specie sono utilizzate per i semi (es. brassicacee) dai quali si estrae l'olio e molte piante non traslocano i metalli agli organi riproduttivi (Mosca *et al.*, 2004).

Numerose ricerche hanno anche prospettato la possibilità di produrre etanolo dalla biomassa dell'*Arundo donax*, previa separazione della cellulosa, idrolisi, fermentazione alcolica e distillazione. I residui ligninici (20-30% della biomassa iniziale) contenente i metalli, potrebbero poi essere utilizzati per la produzione energetica, con combustione o meglio pirogassificazione. Quest'ultima tecnologia appare più interessante perché la combustione determina bassissime emissioni di CO₂ in quanto il gas ricco di idrogeno (syngas) in fase di combustione viene ossidato ad H₂O, ed anche perché determina una produzione di ceneri (ricche di metalli) molto più contenuta (5-10%) rispetto alla normale combustione dei termovalorizzatori (20-30%), con evidenti vantaggi sui costi di smaltimento in discarica.

Recenti ricerche ancora in corso (Pirozzi *et al.*, 2010) hanno evidenziato la possibilità di utilizzare la biomassa di *A. donax* come substrato per la coltivazione di lieviti oleaginosi dai quali è possibile estrarre lipidi per la produzione di biodiesel.

1.6 Scopo della tesi

Lo scopo della seguente tesi è stato quello di testare la capacità fitodepuratrice di una specie vegetale quale l'*Arundo donax* che sta suscitando l'interesse delle industrie chimiche per la produzione di biomassa da utilizzare come materia prima per la produzione di polimeri biodegradabili ed energia rinnovabile.

Un altro obiettivo è stato quello di verificare l'efficacia di tecniche di "fitoestrazione assistita", quali inoculazione con *Trichoderma* e fertilizzazione con compost, per aumentare la crescita e le capacità fitodepuratrice della pianta.

Sono stati utilizzati materiali facilmente reperibili in commercio ed economici come il compost e un bioregolatore commerciale a base di *Trichoderma* (*Bioplantguard*) e non si è ritenuto opportuno intervenire con concimazioni minerali ed irrigazioni con l'obiettivo di valutare un protocollo di fitoestrazione assistita a basso costo.

Si è scelto un sito moderatamente inquinato perché rappresenta, in maniera chiara, quella che è la situazione della maggior parte dei siti contaminati in Campania caratterizzati da un inquinamento di tipo diffuso.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Sito ed impianto sperimentale

Il campo sperimentale è stato allestito in un'azienda privata e si trova ad Acerra, in provincia di Napoli, località inclusa nel Sito di Interesse Nazionale (SIN) Litorale Domitio Flegreo ed Agro Aversano. Le applicazioni di compost di bassa qualità e la combustione di rifiuti sono state riconosciute come le principali fonti di inquinamento da cadmio (ARPAC, 2005).

Il terreno è classificato come Vitrandic Haplusepts (tassonomia del suolo USDA), sviluppato su ceneri e pomici piroclastiche, localmente ridistribuite da acque di superficie. La tessitura del terreno è sabbiosa-limosa (USDA), con un alto contenuto di carbonati (50% in media), un pH sub-alcalino (7.7) e un alto tenore di carbonio organico e azoto (1,73 e 0,18% rispettivamente).

Le principali caratteristiche fisiche e chimiche del suolo insieme e le soglie di riferimento della concentrazione di metalli stabilite dalla normativa italiana (D. Lgs 152/06) per i terreni agricoli sono riportati nelle tabelle 6 e 7.

Tabella 6 – Principali caratteristiche chimico fisiche del suolo.

Strato	CaCO ₃	N org	C org	S.O.	NO ₃ -N	NH ₄ -N	pH	Ec	Composizione tessiturale (%)		
(cm)	(%)	(%)	(%)	(%)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)		(μS cm ⁻¹)	Sabbia	Limo	Argilla
0-20	48.3	0.18	1.73	2.99	9.7	7.7	7.7	193.3	59.2	25.0	15.8
20-40	50.6	0.18	1.72	2.97	15.0	9.7	7.7	215.3	57.8	25.3	16.8
40-60	23.7	0.12	1.13	1.95	8.0	8.7	7.8	211.3	50.2	32.3	17.5

Tabella 7 – Soglie di riferimento della concentrazione di metalli fissati dalla normativa italiana (D. Lgs 152/06) per i terreni agricoli.

Strato	Zn	Cu	Cd	Pb	Cr
(cm)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)
0-20	114.6	62.9	3.4	86.9	13.9
20-40	101.2	64.6	3.5	83.2	14.0
40-60	68.5	35.8	2.3	50.9	16.6
media	94.7	54.4	3.1	73.7	14.8
limite	150.0	100.0	2.0	150.0	150.0

La fertilizzazione con il compost e l'inoculazione dei rizomi di *Arundo donax* con *Trichoderma* sono state combinate in modo fattoriale ottenendo i seguenti trattamenti:

rizomi non inoculati e non fertilizzati (NT-NC); rizomi inoculati e non fertilizzati (T-NC); rizomi non inoculati e fertilizzati (NT-C) e rizomi inoculati e fertilizzati (TC).

I trattamenti con compost e *Trichoderma* sono stati disposti in parcelle di 132 m² (6 x 22 m) ed arrangiati in uno schema a blocchi randomizzati con tre repliche.

Il compost utilizzato, ottenuto da scarti verdi e frazione organica dei rifiuti solidi urbani (RSU), presentava un bassissimo contenuto in elementi potenzialmente tossici (PTE) e le sue caratteristiche rientravano nei parametri di legge italiana in materia di fertilizzanti organici (L 784/94, DL 99/92) consentendone l'impiego in agricoltura senza nessuna restrizione. La potenziale fitotossicità del compost è stata esclusa (dati non riportati) utilizzando *Lactuca sativa* come pianta indicatrice e valutandone la produzione di biomassa in relazione a dosi crescenti di compost (Hulzebos *et al.*, 1993). La distribuzione del fertilizzante organico alla dose di 20 Mg ha⁻¹ (FW), corrispondenti a 130 kg N ha⁻¹ è stata effettuata manualmente il 14/04/2009 e l'interramento è stato effettuato due giorni dopo a 20 cm con una fresatrice. I rizomi da trapiantare nelle parcelle T-NC e TC sono stati inoculati con *T. harzianum* A6 immergendoli per 24 h in una sospensione di acqua 100ml/100L e di un bioregolatore commerciale (BioplantGuard®, Saipan Srl, Cava de 'Tirreni, Italia, *T. harzianum* 107 CFU g⁻¹).

Il trapianto è stato effettuato il 17/04/2009 ad una profondità di 0,20 m con una distanza di 0,60 m tra le file con una densità di 2,7 piante m⁻².

Le piante sono state irrigate solo dopo il trapianto, con l'obiettivo di assicurare un buon contatto tra radici e suolo, mentre durante l'intera stagione di crescita la coltura si è avvantaggiata unicamente dell'acqua meteorica.

E' stato pianificato l'utilizzo di materiali economici e facilmente reperibili (compost, bioregolatore commerciale), insieme con l'esclusione della fertilizzazione minerale e dell'irrigazione, con l'obiettivo di valutare l'efficacia di un protocollo di fitoestrazione costo assistita a basso costo.

I trattamenti sono stati effettuati ad inizio sperimentazione con lo scopo di valutarne gli effetti immediati (prima stagione di crescita) e quelli di medio termine (cicli successivi) legati ad un'unica applicazione.

2.2 Campionamento ed analisi chimiche

Raccolta dei campioni

L' *Arundo donax* e i campioni di suolo sono stati raccolti a Febbraio 2011 al termine del secondo ciclo colturale. Il rilievo di produzione è stato effettuato manualmente su un'area di saggio di 42 m² corrispondente a tre file suddividendo il materiale vegetale in

rizomi, culmi e foglie. I campioni sono stati pesati ed essiccati a 65°C in stufa ventilata fino a peso costante; successivamente sono stati trinciati ad 1 mm per le successive determinazioni analitiche (cellulosa, emicellulosa, lignina, azoto, metalli pesanti). Per ogni parcella, campioni di suolo nell'interfila (bulk-soil) sono stati prelevati negli strati 0-20, 20-40 e 40-60 cm utilizzando una trivella manuale, mentre campioni di rizosfera sono stati ottenuti rimuovendo il suolo immediatamente vicino alle radici. Prima delle determinazioni analitiche i campioni sono stati essiccati in stufa a 65°C fino a peso costante, setacciati a 2 mm e macinati con il polverizzatore Retsch PM 2000.

Azoto totale dei tessuti vegetali

La determinazione del contenuto in azoto dei campioni vegetali è stata effettuata con il metodo Kjeldhal. Questo metodo consiste nella mineralizzazione della sostanza organica con acido solforico al 98 % in presenza di solfato di potassio, selenio, ossido di rame ed acqua ossigenata in vol. 32%, in piastra alla temperatura di 410°C per 40 minuti. Successivamente, i campioni vengono inseriti in una unità di distillazione con acido borico al 4%, idrossido di sodio (soda) al 32% ed acqua distillata. Al termine della distillazione si effettua una titolazione con acido solforico 0.1N in presenza di verde bromocresolo e rosso di metile.

Metalli pesanti nei campioni di suolo e vegetali

Le metodologie per la determinazione dei metalli pesanti nel suolo e nei vegetali si dividono in “non-distruttive” e “distruttive”. Le tecniche non-distruttive, come si può già apprendere dal nome, determinano il contenuto totale di metalli pesanti nel campione senza che l'analisi comporti modifiche nelle proprietà e nella sua composizione chimica consegnando il campione praticamente intatto. Al contrario le tecniche distruttive implicano la totale distruzione delle componenti inorganiche fino ad ottenere tutti gli elementi in soluzione. Le metodologie non-distruttive presentano molti vantaggi: utilizzano quantità estremamente piccole di campione, generalmente non richiedono un pretrattamento del campione e questo, essendo integro, può essere utilizzato per altre indagini successive. Rispetto però alle distruttive hanno il grande svantaggio di una minore capacità di rilevazione e della necessità di utilizzare strumentazioni spesso molto complesse e costose (Amonette e Sanders, 1994).

Le tecniche distruttive sono piuttosto laboriose per l'operatore e richiedono tempi lunghi. Infatti l'analisi quantitativa dei metalli richiede una prima fase di pretrattamento del campione, ovvero la sua solubilizzazione totale o parziale attraverso un processo

chimico di mineralizzazione (solubilizzazione con acidi), ed una seconda fase di determinazione quantitativa degli elementi presenti in soluzione per spettrofotometria in assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma (FAAS).

L'analisi dei metalli pesanti con tecniche distruttive offre un'elevata capacità di rivelazione e quindi precisione ma il processo di solubilizzazione, necessario per le analisi, presenta un limite. Infatti i reagenti utilizzati costituiscono un pericolo per l'operatore, in quanto tossici, e l'intero procedimento risulta lento e impegnativo (Sawhney e Stilwell, 1994; Hossner, 1996; Soil Survey Staff, 1996).

Solubilizzazione con attacco acido

La mineralizzazione è una tecnica di solubilizzazione del campione con acidi forti. Nel caso in esame si è operata una mineralizzazione a sistema chiuso mediante l'utilizzo del digestore a microonde Microwave Lobstation ETHOS 900. Sono stati mineralizzati con questa tecnica sia i campioni vegetali che i campioni di suolo (sei campioni ad ogni ciclo).

Per i vegetali, con bilancia di precisione, sono stati pesati 500 mg di ogni campione precedentemente polverizzato. Ciascun campione è stato sistemato in contenitori speciali di Teflon (costituiti da polytetrafluoroetilene) e sono stati aggiunti rispettivamente 6 ml di acido nitrico, 2 ml di acqua ossigenata, 0.5 ml di acido fluoridrico e 1 ml di acqua. Dopo di che si è avviata la mineralizzazione con durata di 25 minuti seguita dal raffreddamento dei campioni per non meno di un'ora e mezza. Ogni campione, dopo l'aggiunta di acido fluoridrico, è stato portato a secco ad una temperatura di 110°C. Il residuo è stato portato a secco in più riprese e poi è stato messo in soluzione con 20 ml di acido cloridrico 3 molare. Sono state preparate anche delle prove in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione vegetale. Come ultimo step, ogni campione è stato portato a volume a 25 ml con acqua deionizzata e conservato a 4°C.

Per il suolo, con bilancia di precisione, sono stati pesati 1 g di ogni campione precedentemente polverizzato. Ciascun campione è stato sistemato nei contenitori di Teflon e sono stati aggiunti rispettivamente 16 ml di acqua regia (12 ml di acido cloridrico + 4 ml di acido nitrico) e 4 ml di acido fluoridrico. Dopo di che si è avviata la mineralizzazione con durata di 24 minuti, 10 minuti di ventilazione e un'ora e mezza per il raffreddamento. Ogni campione, dopo l'aggiunta di acido fluoridrico, è portato a secco ad una temperatura di 110°C per permettere la decomposizione chimica dei

silicati e la volatilizzazione del silicio in forma gassosa. Il residuo è portato a secco in più riprese e poi messo in soluzione con 25 ml di acido cloridrico 3 molare fino alla completa solubilizzazione dei fluoruri. I campioni sono stati filtrati con filtri di carta Whatman al fine di trattenere le eventuali impurità presenti. Sono state preparate anche delle prove in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione di suolo. Come ultimo step ogni campione è stato portato a volume a 50 ml con acqua deionizzata e conservato a 4°C.

Il metodo con il forno a microonde, come quello utilizzato per le nostre analisi, presenta vantaggi importanti: in primis riduce i tempi di attacco dei reagenti verso il campione; inoltre limita i rischi di inalazione o di manipolazione di acidi per l'operatore e permette di programmare varie possibilità di tempi di solubilizzazione con acidi forti. Questi stessi acidi aggiunti nel contenitore a chiusura stagna non evaporano e quindi restano nelle stesse proporzioni alla fine di ogni ciclo di mineralizzazione. Per questi motivi e in aggiunta al fatto che riduce eventuali contaminazioni dovute al pulviscolo atmosferico, la digestione con il forno a microonde è una tecnica che si sta diffondendo molto rapidamente. Presenta però anche un limite dato dalla bassa riproducibilità della solubilizzazione degli elementi contenuti nel suolo, che è associata generalmente ad una certa variabilità dei risultati ottenuti. Le ragioni sono dovute al fatto che si raggiungono alte temperature in pochi secondi senza un controllo sistematico (le energie cambiano anche quando il forno a microonde è programmato per 2 minuti esatti, per due campioni identici, in due diversi momenti) ed inoltre si possono verificare delle reazioni fra gli elementi che non sono controllabili (ossidazioni, precipitazioni, etc.).

Stima della biodisponibilità dei metalli pesanti in suoli non acidi

Il metodo prevede l'estrazione dei metalli con una soluzione di acido dietilentriamminopentacetico (DTPA)/calcio cloruro/trietanolammina a pH 7.3 (Lindsay and Norvell, 1978). Si preferisce usare il DTPA perché ha una buona azione in terreni con pH alcalini, come nel caso in esame, rispetto all'EDTA che è più indicato per terreni con pH acidi. Il calcio cloruro biidrato serve a mantenere alta l'attività del calcio e la trietanolammina ha un'azione tampone verso il pH.

Con bilancia di precisione sono stati pesati 10 g di ogni campione di terra fine (setacciato a 2 mm) e sono stati trasferiti in matraccio conico di Erlenmeyer da 250 ml. Sono stati aggiunti 20 ml della soluzione di acido dietilentriamminopentacetico (DTPA)/calcio cloruro biidrato/trietanolammina precedentemente preparata. I campioni

sono stati fatti agitare per 2 ore a 60 cicli/minuto e poi centrifugati a 5000 giri/minuto per 5 minuti. La soluzione limpida è stata trasferita in matraccio tarato da 100 ml previa filtrazione con filtri di carta Whatman per trattenere le eventuali impurità presenti. Il residuo è stato lavato per altre due volte con 25 ml di acqua, centrifugato e il surnatante derivante è stato trasferito nello stesso matraccio tarato da 100 ml. I campioni sono stati portati a volume con acqua deionizzata. È stata preparata anche una prova in bianco seguendo le stesse modalità operative, omettendo il campione di suolo. I campioni sono stati conservati a 4° C.

Determinazione analitica dei metalli pesanti

La determinazione analitica dei metalli pesanti di tutti i campioni è stata effettuata mediante spettrometria in assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma (FAAS). Le letture sono state effettuate con Atomic Absorption Spectrometer Analyst 700.

Questa tecnica in 30 anni si è rapidamente evoluta con notevoli miglioramenti nei limiti di rivelazione dei metalli pesanti. Il principio di questo metodo è che la soluzione proveniente dalla mineralizzazione del campione viene aspirata e nebulizzata direttamente in un sistema con una fiamma ad elevata temperatura. Tutti gli elementi contenuti nella soluzione sono vaporizzati in forma di atomi (atomizzati). Alcuni elementi sono parzialmente eccitati dalla temperatura della fiamma, 2300° C per la fiamma aria-acetilene ma la maggior parte resta allo stato fondamentale. Gli atomi allo stato fondamentale assorbono energia radiante emessa da una sorgente (lampada) a precise lunghezze d'onda. La percentuale di energia radiante assorbita dall'elemento (assorbanza) segue la legge di Lambert-Beer, cioè è direttamente proporzionale alla lunghezza del cammino ottico (determinato dall'ampiezza della fiamma) ed alla concentrazione dell'elemento vaporizzato. La determinazione quantitativa di un dato elemento si basa sulla misura dell'intensità del segnale emesso dall'elemento (analita) sia in assorbimento che in emissione. Lo svantaggio strumentale della tecnica di assorbimento atomico è che per ogni elemento è necessaria una diversa sorgente luminosa e ciò rende necessario l'acquisto di un corredo di lampade particolarmente oneroso.

I moderni apparecchi FAAS hanno il sistema ottico completamente automatizzato con possibilità di cambiare la lampada e le condizioni operative a secondo degli elementi che devono essere analizzati. Un altro problema che spesso si incontra nell'analisi dei metalli pesanti è che la concentrazione dell'elemento da analizzare è molto bassa ed è spesso vicina al limite di rilevazione dello strumento. Infatti perché sia valida la legge di

Lambert-Beer è necessario che la concentrazione dell'analita sia al disopra del limite di rilevazione strumentale. Gli errori più frequenti sono la presenza di impurezze o contaminazioni provenienti da reagenti o da acidi casualmente contaminati o di bassa purezza, utilizzazione di vetreria non perfettamente pulita, solubilizzazione di elementi dai contenitori di vetro o speciali durante l'attacco acido. Altre fonti di errore possono essere causate dalla metodologia utilizzata per la digestione del campione: incompleta dissoluzione del campione, perdite di alcuni elementi per volatilizzazione, formazione di complessi refrattari (monossidi).

Per la determinazione di tre metalli pesanti quali cadmio, rame e zinco, inizialmente sono state preparate le soluzioni standard diluite con una serie di diluizioni. Ciò è stato fatto per ciascun metallo usufruendo di soluzioni standard del commercio a titolo garantito (1000 mg/l) di cadmio rame e zinco. In seguito è stata preparata la curva di taratura per ciascun metallo allo spettrofotometro in assorbimento atomico utilizzando fiamma aria-acetilene (FAAS). Sono state rispettate le proporzionalità tra assorbanza e concentrazione delle soluzioni standard di lavoro. Sono state impiegate lampade specifiche per ogni metallo e selezionate le lunghezze d'onda corrispondenti. I valori riportati dallo strumento sono stati registrati.

2.3 Elaborazioni statistiche

Tutti i dati sono stati elaborati statisticamente utilizzando il software MSTAT-C (Crop and Soil Science Department, Michigan State University). I dati di produzione e di asportazione di N e PTEs sono stati analizzati tramite ANOVA utilizzando un disegno a blocchi randomizzati a due fattori (*Trichoderma* e Compost). Un ANOVA a 2 vie è stata effettuata per il contenuto di PTEs nei tessuti in rizomi, culmi e foglie impostando *Trichoderma* e compost come fattori principali e gli organi della pianta come sub fattori. Un disegno simile è stato adottato per saggiare l'effetto rizosfera sul contenuto di PTEs biodisponibili, impostando *Trichoderma* e compost come fattori principali ed il tipo di campionamento (bulk vs rhizo-soil) come sub-fattore.

Tutte le medie sono state separate utilizzando il test delle DMS per un p-value ≤ 0.05 . Nonostante i dati descritti siano stati raccolti in due annate successive, si è optato per disegni statistici che non includessero gli anni come fattore. Tale scelta è giustificata dal fatto che i trattamenti non sono stati effettuati in entrambi gli anni e che l'accrescimento nelle prime fasi di crescita dell'*Arundo donax* è caratterizzato da incrementi molto marcati.

3. RISULTATI

3.1 Produzione di biomassa

Nel primo anno di accrescimento (Tab. 8) la coltura ha mostrato una produzione di biomassa epigea pari a 13 t ha⁻¹ in media, costituita per il 73% da culmi, mentre nel secondo anno i valori di biomassa aerea prodotta sono quasi duplicati (+84%). Tuttavia, la biomassa prodotta nel secondo anno era costituita quasi interamente da culmi (99%) corrispondenti a 23 t ha⁻¹ di SS contro i 9.3 t ha⁻¹ del primo anno. Non sono state riscontrate differenze tra i due cicli in termini di sostanza secca dei culmi (42% in media) sebbene le raccolte siano state effettuate in due momenti dell'anno differenti (novembre e febbraio rispettivamente per il primo ed il secondo ciclo).

Tabella 8 – Effetto medio di compost e Trichoderma sui parametri produttivi di Arundo donax nei due anni di sperimentazione.

Trattamenti	1° ciclo di crescita			2° ciclo di crescita		
	Parte Aerea	Culmi	Culmi: Parte Aerea	Parte Aerea	Culmi	Culmi: Parte Aerea
	PS Mg ha ⁻¹		%	PS Mg ha ⁻¹		%
NT	12.0	8.7	72.7	21.6	21.3	98.9
T	13.6	9.9	72.4	25.6	25.3	99.0
NC	11.8	8.6	72.7	21.8	21.6	99.0
C	13.8	10.0	72.4	25.3	25.0	98.8
<i>Significatività</i>						
Trichoderma	0.064	0.117	n.s.	0.092	0.087	n.s.
Compost	0.033	0.065	n.s.	0.125	0.127	n.s.
Trich x Comp	0.336	0.215	0.260	0.050	0.050	n.s.

Nel primo anno di sperimentazione l'effetto medio dei trattamenti è risultato significativo per il compost con incrementi di produzione pari al 17% sulle parcelle fertilizzate, mentre il *Trichoderma* ha fatto registrare incrementi produttivi dello stesso ordine di grandezza ma al limite della significatività (p=0.064).

L'interazione *Trichoderma* x compost ha mostrato un incremento di produzione del 26% (pari a +2 Mg ha⁻¹) (Fig. 7 a), ma tale risultato, sebbene evidente, non ha raggiunto la significatività statistica (p=0.215).

Nel secondo anno di crescita, non è risultato significativo l'effetto medio dei trattamenti, mentre è risultata significativa l'interazione *Trichoderma* x compost (Fig. 7 b). Il valore di biomassa prodotta sulle parcelle T-C è risultato del 38% più elevato rispetto agli altri trattamenti.

Dall'effetto medio dei trattamenti si evince che, nel secondo anno la percentuale di sostanza secca dei culmi incrementa in modo significativo per le piante trattate con

Trichoderma (40.5 vs 43.5% rispettivamente per NT e T), mentre si riduce sulle parcelle trattate con compost (43.0 vs 41.0% rispettivamente per NC e C); gli stessi trattamenti non hanno fatto riscontrare un effetto simile nel primo anno di accrescimento della coltura.

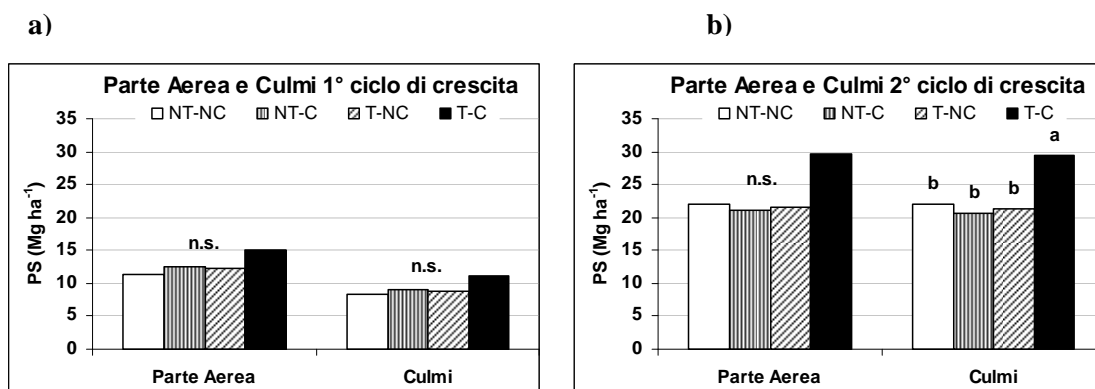


Figura 7 – *Trichoderma* x Compost: effetto sulla produzione di biomassa della parte epigea e dei culmi. Lettere differenti indicano valori diversi per $p < 0.05$.

3.2 Azoto nei tessuti

Il contenuto di N non è stato differente tra i due anni con valori mediamente pari a 0.6 e 2.1% rispettivamente in culmi e foglie; nel secondo anno è stato registrato un incremento medio delle asportazioni epigee del 36% associato alle maggiori produzioni di biomassa (Tab. 9).

Tabella 9 – Contenuto ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) ed asportazioni (kg ha^{-1}) di N nella parte epigea di *Arundo donax* nei due cicli di crescita.

Trattamenti	1° ciclo di crescita			2° ciclo di crescita		
	Culmi N g 100 g ⁻¹	Foglie N g 100 g ⁻¹	Parte Epigea kg N ha ⁻¹	Culmi N g 100 g ⁻¹	Foglie N g 100 g ⁻¹	Parte Epigea kg N ha ⁻¹
NT	0.53	2.13	118	0.62	2.06	163
T	0.58	2.12	136	0.59	1.99	184
NC	0.52	2.03	110	0.5	1.99	153
C	0.60	2.22	144	0.7	2.06	194
<i>Significatività</i>						
Trichoderma	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0.070	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Compost	0.040	0.062	0.007	0.039	<i>n.s.</i>	0.298

Il trattamento del suolo con *Trichoderma* ha influenzato le asportazioni di N epigee del primo ciclo con un incremento del 16% ($p=0.07$), mentre la fertilizzazione con compost ha avuto un effetto significativo in ambo i cicli. In termini assoluti l'apporto di compost ha incrementato il contenuto di N nei culmi di 0.1 e 0.2 g 100 g⁻¹ rispettivamente nel primo e nel secondo anno. Le asportazioni totali sono incrementate significativamente

con la fertilizzazione organica nel primo anno (+30%), mentre nel secondo anno pur fornendo incrementi analoghi (+26%) non è stata raggiunta la significatività statistica.

3.3 Biodisponibilità di Cd, Zn e Cu nel suolo

Nei due anni di sperimentazione la percentuale media di Cd, Zn e Cu biodisponibili rispetto al contenuto totale, è stata del 10%, 8% e 51% nel bulk-soil e del 12%, 8% e 47% nel suolo rizosferico.

I valori misurati (mg kg^{-1}) alla fine del secondo ciclo colturale sono risultati significativamente più elevati rispetto al primo anno per lo zinco, mentre non sono state registrate variazioni significative tra gli anni per cadmio e rame.

Dal confronto tra bulk e rhizo soil (Tab. 10), risulta evidente un effetto rizosfera sulla quantità di metalli biodisponibili. Il contenuto di Cd biodisponibile nel suolo rizosferico è sempre significativamente più elevato in confronto al bulk soil (+ 19% nel primo anno e +16% nel secondo anno). Zinco e rame mostrano un andamento opposto, con contenuti biodisponibili nella rizosfera ridotti rispetto al bulk soil, ma tali riduzioni risultano significative solo nel secondo anno (-4% e -7% rispettivamente).

Tabella 10 – Quantità di Cd, Zn e Cu estratte in DTPA da bulk e rhizo soil nei due cicli colturali di *Arundo donax*.

	1° ciclo colturale			2° ciclo colturale		
	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu
	mg kg^{-1}			mg kg^{-1}		
bulk soil	0.33	8.55	31.48	0.34	9.23	32.25
rhizo soil	0.39	8.35	29.54	0.40	8.87	29.87
<i>Significatività</i>	0.000	n.s.	0.0902	0.001	0.053	0.0125

Gli effetti dell'inoculo con *Trichoderma* e della fertilizzazione con compost sulla biodisponibilità dei metalli nei due anni di coltivazione sono riportati nelle tabelle 11 e 12. Nel primo anno si osservano effetti significativi solo nel bulk soil, dove l'aggiunta di compost incrementa del 9.0% il cadmio biodisponibile, e il trattamento con *Trichoderma* riduce del 7.4% il Rame biodisponibile.

Tabella 11 – Effetto medio di compost e Trichoderma sul contenuto di Cd, Zn e Cu biodisponibile (estratto in DTPA) nel primo ciclo di crescita.

Trattamento	Bulk Soil			Rhizo Soil		
	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu
	mg kg ⁻¹			mg kg ⁻¹		
NT	0.33	8.55	32.68	0.39	8.41	29.59
T	0.33	8.55	30.27	0.40	8.28	29.48
NC	0.32	8.59	31.88	0.38	8.24	29.23
C	0.34	8.51	31.07	0.41	8.45	29.84
<i>Significatività</i>						
Trichoderma	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0.035	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Compost	0.002	<i>n.s.</i>	0.83	0.14	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Nel secondo anno gli effetti dei trattamenti appaiono meno marcati: si osservano solo un effetto significativo del *Trichoderma* che riduce il contenuto di cadmio biodisponibile nel bulk soil (-10.6%) e una tendenza del compost a ridurre lo Zn biodisponibile (p=0.076) nel rhizo soil.

Tabella 12 – Effetto medio di Compost e Trichoderma sul contenuto di Cd, Zn e Cu biodisponibile (estratto in DTPA) nel secondo ciclo di crescita.

Trattamento	Bulk Soil			Rhizo Soil		
	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu
	mg kg ⁻¹			mg kg ⁻¹		
NT	0.36	9.22	32.09	0.40	8.93	30.40
T	0.32	9.23	32.40	0.40	8.81	29.35
NC	0.34	9.38	33.05	0.40	9.12	30.73
C	0.35	9.07	31.44	0.40	8.62	29.01
<i>Significatività</i>						
Trichoderma	0.034	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Compost	<i>n.s.</i>	0.33	0.16	<i>n.s.</i>	0.076	0.27

3.4 Contenuto di Cd, Zn e Cu nei tessuti di *Arundo donax* e asportazioni totali

Il contenuto di Cd e Zn nei tessuti vegetali è stato significativamente differente (elaborazione statistica non mostrata) tra i due cicli di crescita con valori nel secondo anno più bassi per il cadmio (4.0 vs 0.4 mg kg⁻¹ in media per il primo ed il secondo ciclo) e più elevati per lo zinco che è aumentato del 39, 89 e 251% rispettivamente in rizomi, culmi e foglie. Il rame non ha mostrato valori significativamente differenti tra i due anni (10 mg kg⁻¹ in media), sebbene sia stata osservata una lieve riduzione nel secondo anno di crescita (-15% in media).

Le quantità di Cd, Zn e Cu assorbite da *Arundo donax* nei due anni di crescita oltre che nei valori assoluti sono state differenti anche in termini di stoccaggio relativo nei vari organi della pianta (Fig. 8). Il cadmio nel primo ciclo di crescita ha avuto come sito di allocazione preferenziale le foglie, mentre non sono state registrate differenze tra gli organi nel secondo ciclo; lo zinco nel primo anno si è distribuito preferenzialmente in rizomi e foglie; nel secondo ciclo le foglie hanno stoccato quantità di metallo più che doppie rispetto a rizomi e culmi che non si sono differenziati. Le foglie sono risultate il *sink* preferenziale di rame nel primo anno di crescita, mentre nel secondo oltre alle foglie anche i rizomi hanno mostrato concentrazioni più elevate.

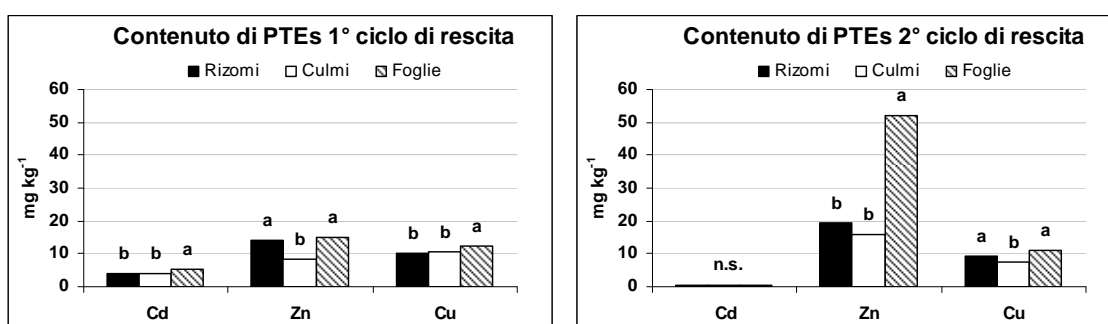


Figura 8 – Distribuzione del contenuto di Cd, Zn e Cu in rizomi, culmi e foglie di *Arundo donax*. Lettere differenti indicano valori diversi per $p < 0.05$.

Come mostrato in figura 9, nel primo ciclo colturale è stata registrata anche un'interazione significativa *Trichoderma* x compost x organi di accumulo sulla concentrazione di Cd nei tessuti. In particolare sia il *Trichoderma*, sia il compost hanno incrementato in modo significativo il contenuto di Cd nei tessuti del rizoma (48% e 36% rispettivamente per NT-C e T-NC) mentre T-C ha incrementato il contenuto di Cd delle foglie del 21% rispetto agli altri trattamenti, mentre il contenuto nei culmi non è stato differente in relazione ai diversi trattamenti. Tale interazione non è risultata significativa nel secondo anno in cui il contenuto medio di Cd in rizomi, culmi e foglie è stato rispettivamente di 0.37, 0.41 e 0.43 mg kg⁻¹.

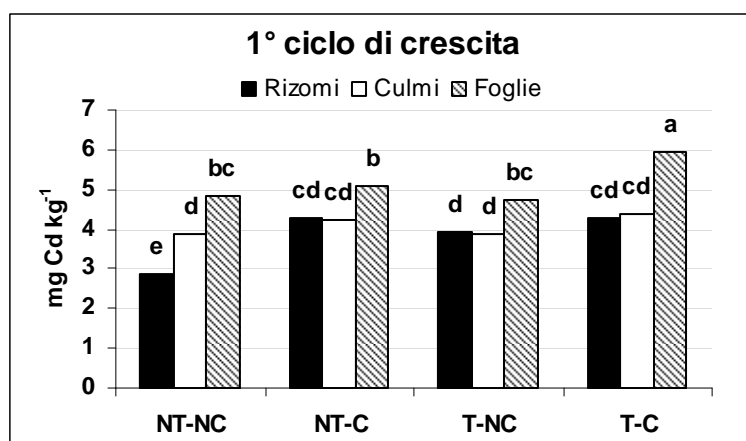


Figura 9 – Interazione Trichoderma x compost x organi di accumulo sul contenuto di Cd nel primo ciclo di crescita dell'Arundo donax. Lettere differenti indicano valori diversi per $p < 0.05$.

Dal rapporto tra il contenuto di metalli nei tessuti di *Arundo donax* e le quantità biodisponibili risultano valori per il cadmio di un ordine di grandezza più elevati nel primo anno rispetto al secondo (11.3 vs 1.01). Per lo zinco lo stesso rapporto sale nel secondo anno passando da 1.16 ad 1.98, mentre per il rame i valori non sono differenti pari a 0.31 (media dei due anni).

Le asportazioni totali di tutti i metalli hanno mostrato differenze molto marcate tra i due anni di coltivazione riconducibili presumibilmente, sia al diverso comportamento produttivo della coltura, sia a fattori ambientali e fisiologici che hanno influenzato l'assorbimento dei metalli. Mediamente dalla prima alla seconda raccolta le asportazioni di Cd, elevate nel primo anno, si sono drasticamente ridotte nel secondo (-83.1%), in cui, al contrario, quelle dello Zn sono aumentate (+ 196%). Le asportazioni di rame sono risultate più elevate rispetto al primo anno (+20%), in controtendenza con il contenuto del metallo nei tessuti.

Tabella 13 – Effetto medio di Trichoderma e compost sulle asportazioni totali (parte aerea) di Cd, Zn e Cu nei due cicli colturali.

Trattamenti	1° ciclo colturale			2° ciclo colturale		
	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu
	g ha⁻¹			g ha⁻¹		
NT	52.0	123.3	129.5	11.5	340.1	165.8
T	61.1	139.3	152.1	7.5	437.4	190.4
NC	48.9	124.2	129.8	10.3	385.4	179.7
C	64.2	138.4	151.8	8.8	392.1	176.5
<i>Significatività</i>						
Trichoderma	0.0239	0.3010	0.0771	0.140	0.281	0.149
Compost	0.0024	0.3520	0.0828	n.s.	n.s.	n.s.

Nel primo anno (Tab. 13), l'inoculo con *Trichoderma* e la fertilizzazione con compost hanno incrementato in modo significativo le asportazioni di cadmio con valori del 13% più elevati per T rispetto a NT e del 37% più elevati per C rispetto a NC. In modo simile, ma meno significativo ($p < 0.083$) sono state influenzate le asportazioni di Cu aumentate del 17% in piante sia inoculate sia fertilizzate con compost.

Nel secondo anno l'effetto medio dei trattamenti non è risultato significativo (probabilità sempre superiore a 0.15).

4. DISCUSSIONE

4.1. Accrescimento e nutrizione azotata di *Arundo donax*

L'*Arundo donax* è una coltura pluriennale il cui accrescimento epigeo è strettamente legato all'accumulo di sostanze di riserva nei rizomi. Per questo i fotosintetati prodotti durante la prima stagione colturale sono allocati soprattutto negli organi ipogei, mentre negli anni successivi vengono sempre di più stoccati nella parte epigea con incrementi produttivi molto marcati nel secondo e terzo anno e decrescenti nei successivi fino ad una stabilizzazione della produzione dal 5-6° anno in poi (Angelini *et al.*, 2009).

I risultati produttivi del nostro esperimento mostrano un trend di accrescimento che è in accordo con altre prove condotte in ambienti simili, con un raddoppio della produzione aerea nell'arco dei primi due anni (Cosentino *et al.*, 2006). Tale risultato è probabilmente riconducibile all'elevata fertilità intrinseca del suolo su cui è stato condotto l'esperimento e dimostra che l'accrescimento di *Arundo donax* è assolutamente compatibile con il basso livello di inquinamento da Cd del suolo.

Il pattern di accrescimento descritto suggerisce che un accumulo maggiore di sostanze di riserva nei rizomi derivante dall'effetto di trattamenti nella prima stagione di crescita può riflettersi in modo molto marcato sulla produzione di biomassa verde negli anni successivi (effetto memoria). A ciò va aggiunto che trattamenti come la fertilizzazione organica possono avere un effetto residuale sulla fertilità del suolo.

Nel caso del compost, l'effetto più marcato è legato alla nutrizione azotata delle colture che possono intercettare l'N minerale derivante dalla mineralizzazione della sostanza organica interrata, come dimostrano i risultati produttivi nel primo anno. Le più elevate asportazioni di N sia nel primo sia nel secondo anno dimostrano inoltre che, in un suolo sciolto come quello della nostra prova, il compost incrementa le disponibilità di N nel suolo non solo nell'anno di applicazione, ma anche in quello successivo (effetto residuale) comportandosi come un fertilizzante a lento rilascio (Fagnano *et al.*, 2011).

L'effetto *Trichoderma* è riconducibile essenzialmente ad un potenziamento dell'attività radicale attraverso la simbiosi micorrizica che incrementa la superficie radicale assorbente e quindi il volume di suolo esplorato dalle radici, con conseguente stimolo dell'accrescimento della pianta. Nel nostro caso il *Trichoderma* ha incrementato significativamente la produzione epigea e le asportazioni di N nel primo anno, ma il suo meccanismo di azione viene messo in luce soprattutto dall'interazione con il compost. Il

trattamento T-C fornisce produzioni sempre più elevate degli altri trattamenti raggiungendo una significatività statistica nel secondo anno; sembrerebbe che la maggiore efficienza radicale indotta dalla micorrizzazione abbia favorito l'assorbimento dell'N derivante dal compost anche nel secondo anno di coltivazione. I dati disponibili non consentono di stabilire se tale effetto sia dovuto al perdurare della micorrizzazione oppure al maggiore accrescimento dei rizomi nel primo anno. I dati disponibili in letteratura sostengono la seconda ipotesi. Infatti, in esperimenti simili l'effetto dell'inoculo con funghi micorrizici ha avuto una durata sempre inferiore ai 7 mesi. Non è tuttavia da escludere che la predilezione del *Trichoderma* per suoli moderatamente alcalini, come quello da noi utilizzato, ed una particolare affinità per colture poliennali come l'*Arundo donax* possano giustificare una maggiore persistenza nel tempo della simbiosi pianta-fungo.

L'epoca di raccolta è indicata come un fattore chiave per la produzione di biomassa utile alla conversione energetica che è costituita dalla frazione lignocellulosica dei culmi. Ipotizzando l'impiego di tali biomasse nella termovalorizzazione, le foglie sono da ritenersi meno pregiate per problemi di vetrificazione nelle celle di combustione dovute all'elevata presenza di silicio e potassio. Al termine della stagione di crescita le foglie costituiscono ancora una frazione importante della biomassa aerea che con il procedere dell'inverno tende a ridursi per la caduta delle foglie.

Dai risultati del nostro esperimento è emersa una notevole differenza in termini di indice di raccolto dei culmi tra le due annate con valori prossimi al 100% nel secondo anno in cui la raccolta è stata effettuata a febbraio mentre la percentuale di foglie è stata del 30% nel primo. Inoltre non è stata registrata alcuna differenza in termini di percentuale sostanza secca. Tali risultati confermano la raccolta invernale come una soluzione tecnica particolarmente efficace nel garantire una biomassa di qualità ai centri di trasformazione riducendo i costi per la defogliazione.

4.2 Biodisponibilità di PTEs nel suolo

La biodisponibilità dei metalli è stata accertata mediante estrazione chimica con DTPA (Lindsay and Norvell, 1978). Tale estraente è particolarmente adatto ad accertare le quantità biodisponibili di metalli in suoli neutri e calcarei in cui previene la dissoluzione dei carbonati e conseguentemente il rilascio dei metalli in essi occlusi (Feng *et al.*, 2005). L'estrazione con DTPA rappresenta un metodo indiretto ed operativo di

accertamento della biodisponibilità. Questa, infatti, è definita univocamente solo dalle quantità assorbite dalle piante.

Nel nostro studio l'estrazione con DTPA è stata condotta sul suolo prelevato a fine ciclo colturale. Essa, pertanto, va considerata come biodisponibilità residuale risultante dall'effetto combinato dei trattamenti e delle asportazioni vegetali.

Le quantità di Cd estratte con DTPA alla fine dei due anni di crescita sono risultate simili e pari al 10% del contenuto (pseudo) totale del metallo nel suolo. Tali valori sono molto più bassi di quelli riportati in altri lavori sempre basati sull'impiego del DTPA (Meers *et al.*, 2007; Shaheen *et al.*, 2009). Il Cd, infatti, tende a formare sulle superfici dei colloidi del suolo complessi *outer-sphere* e come tale tende ad essere più mobile nel suolo rispetto ad altri metalli (Alloway, 1995). Tuttavia, la presenza di elevate quantità di carbonati ne riducono la mobilità ed estraibilità con DTPA. A tale proposito, Shaheen *et al.* (2009) hanno evidenziato una correlazione negativa tra la 'labilità' del Cd e il contenuto di CaCO₃ del suolo. I carbonati possono infatti adsorbire il Cd riducendone la biodisponibilità (Alloway, 1995). La frazione biodisponibile di Cd mostrata da Shaheen *et al.* (2009) è stata pari al 50-60% ed è in accordo con quella trovata da Meers *et al.* (2007) su suoli sub-alcalini. Un discorso analogo può essere fatto per lo Zn biodisponibile misurato nel nostro suolo che è risultato in media 5 volte più basso di quello riportato in letteratura (Yiang *et al.*, 2011).

E' ipotizzabile che, dato l'elevato contenuto di CaCO₃ nel nostro suolo (59% nello strato 0-20 cm), quantità significative di Cd e Zn siano associate ai carbonati e quindi non estraibili con DTPA.

La differenza osservata tra le quantità biodisponibili accertate nel bulk e rhizo-soil costituisce indicazione dell'effetto pianta sulla mobilizzazione dei metalli. Nel nostro esperimento tale effetto vede incrementare la propria significatività statistica nel secondo ciclo colturale estendendosi a tutti i metalli considerati e mostrando una relazione con la dinamica di crescita della coltura. Zn e Cu si riducono nella rizosfera come conseguenza delle elevate asportazioni da parte della coltura essendo oligoelementi essenziali per la nutrizione vegetale, mentre i valori del Cadmio aumentano probabilmente perché l'essudazione radicale (rilascio di acidi organici e protoni) ne accresce la biodisponibilità a fronte di asportazioni limitate trattandosi di un elemento non essenziale.

L'effetto del compost sulla biodisponibilità di Cd è significativo nel bulk soil nel primo ciclo colturale: è ipotizzabile che l'elemento sia coinvolto in reazioni di chelazione/complessazione da parte di gruppi funzionali acidi delle sostanze umiche che lo manterrebbero in una forma disponibile riducendone la precipitazione sotto forma di idrossido/carbonato attesa in un ambiente-suolo caratterizzato da elevata alcalinità e contenuto di carbonati.

Nel secondo anno il compost non ha avuto lo stesso effetto probabilmente perché le quantità di acidi umici rilasciate nella soluzione circolante sono state più ridotte rispetto al primo anno.

L'ANOVA ha rintracciato anche un effetto significativo del *Trichoderma* nel bulk soil sulla biodisponibilità di Cu nel primo anno e Cd nel secondo, probabilmente perché l'accrescimento radicale, e quindi anche l'effetto della micorrizzazione, nel secondo anno si è esteso anche nell'interfila, dove è stato raccolto il bulk soil.

4.3 Accumulo di PTEs nei tessuti di *Arundo donax*

Il contenuto di PTEs nei tessuti vegetali è funzione da un lato della biodisponibilità dei PTEs e dall'altro della capacità delle colture di estrarre tali elementi dal suolo e di accumularli nei propri tessuti. L'*Arundo donax*, come dimostrano Guo e Miao (2010), grazie alla sua ipertolleranza è in grado di assorbire nei tessuti radicali ed epigei quantità di metalli crescenti in funzione della loro concentrazione nella soluzione circolante.

Inoltre, i fattori di bioconcentrazione diventano molto più bassi per specie caratterizzate da elevata biomassa come l'*Arundo donax*, mentre il ridotto habitus rappresenta una "condicio sine qua non" associata alle specie iperaccumulatrici come *Thlaspi caerulescens* e *Brassica juncea*. Tale fenomeno è legato all'effetto diluizione dei metalli nei tessuti da parte dell'accumulo di fotosintetati e dipende anche dalla natura delle specie metalliche considerate. È, infatti, lecito aspettarsi diluizioni più marcate per elementi come il Cd che non risultano essenziali per il metabolismo dei vegetali, mentre non dovrebbero esserci variazioni sostanziali per metalli come Zn e Cu che sono importanti micronutrienti.

Le concentrazioni di Cd nei rizomi misurate nel primo anno sono comparabili con quelle ottenute da Guo e Miao (2010) utilizzando una soluzione contenente 7 ppm di Cd, mentre i valori nei culmi sono risultati quasi il triplo di quelli riportati dagli stessi autori (4.0 vs 1.4 mg Cd kg⁻¹). Tale differenza potrebbe essere legata all'impianto sperimentale (pieno campo vs fuori suolo) ed al tipo di inquinamento che è esclusivamente da Cd nel nostro caso, mentre è multiplo nell'altro.

Nel nostro esperimento la concentrazione di Cd nei tessuti è diminuita di dieci volte a seguito di un raddoppio della biomassa avutosi nel secondo anno di crescita. Tale riduzione era sicuramente ipotizzabile in virtù dell'incremento di resa atteso, ma la sua ampiezza ha come probabile concausa una riduzione della biodisponibilità del Cd nel suolo. I valori di biodisponibilità misurati nei due anni sono risultati costanti, ma come già detto trattasi di biodisponibilità residua e non indicativa della dinamica che ha caratterizzato il metallo durante la stagione vegetativa della coltura.

E' ipotizzabile che nelle fasi di colonizzazione del suolo successive al trapianto, la pianta abbia rilasciato una elevata quantità di essudati radicali, in particolare di acidi organici a basso peso molecolare e protoni a fronte di un elevato assorbimento di nutrienti in forma cationica. Nel nostro esperimento è stata registrata una riduzione del pH di circa 0.55 punti al termine del primo anno di coltivazione di *Arundo donax*. L'abbassamento del pH dovuto alla crescita della coltura, potrebbe aver reso biodisponibile il Cd legato ai carbonati favorendone l'asportazione e l'accumulo nei tessuti.

Tale ipotesi può essere ulteriormente supportata se si considera che l'*Arundo donax*, coltura tipica delle zone palustri e ripariali, è in grado di assimilare l'N anche in forma ridotta (NH_4^+) in modo da avere una adeguata nutrizione anche in ambienti anaerobici. L'assorbimento di ioni ammonio può avvenire anche in suoli areati ed, essendo associato ad un rilascio di idrogenioni nella soluzione circolante, potrebbe ridurre significativamente il pH come dimostrato da Kirk *et al.* (1999) che hanno misurato una riduzione di pH di 0.6 punti nella rizosfera del riso (*Oryza sativa*) fertilizzato con una soluzione contenente N ammoniacale. La forte influenza del pH su disponibilità ed estraibilità del Cd dal suolo è stata messa in evidenza da Kim e McBride (2006) in relazione alla assenza di specificità degli estraenti impiegati in successione nel protocollo proposto dal EU-BCR. Sempre in uno studio di speciazione mediante estrazioni sequenziali Krishnamurti e Naidu (2000) hanno evidenziato elevate quantità dell'elemento (40% del Cd totale nel suolo) sotto forma di complessi organo-minerali, in particolare Cd-umati e Cd-fulvati.

Nel secondo anno, nonostante il pH si mantenga ancora più basso rispetto al tempo zero, la pianta potrebbe non aver avuto a disposizione il Cd liberato dalla dissoluzione dei carbonati, perchè in parte asportato l'anno precedente ed in parte allontanato durante l'inverno con le piogge.

Nel primo anno, le piante trattate con *Trichoderma* oppure fertilizzate con compost hanno incrementato in modo significativo il contenuto di Cadmio nei rizomi e la

combinazione dei due trattamenti ha anche favorito l'incremento del metallo nelle foglie. Questo effetto è legato al meccanismo di assorbimento del Cd che in prima istanza coinvolge i tessuti radicali attraverso la compartimentalizzazione vacuolare e successivamente anche il trasporto xilematico verso le foglie grazie all'attivazione di specifici trasportatori di membrana (Clemens, 2006). E' possibile che l'incremento di Cd assorbito per T-NC e NT-C si sia accumulato prevalentemente nei rizomi, mentre le quantità assorbite con T-C siano state tali da richiedere anche una traslocazione verso le foglie.

Nel secondo anno si assiste invece ad un incremento della concentrazione dello Zinco ed una leggera riduzione del Cu. Gli incrementi molto marcati del contenuto di Zn nelle foglie risultano troppo elevati rispetto ai valori estrapolabili da dati di letteratura, ma potrebbero essere giustificati da fenomeni di deposizione atmosferica conseguenti al traffico veicolare ed a roghi illegali di rifiuti nelle adiacenze del sito sperimentale. Per il rame è invece possibile che le concentrazioni si riducano per semplice effetto diluizione una volta raggiunta il livello di asportazione utile alla coltura.

5. CONCLUSIONI

- 1) L'elevata produzione di biomassa, non condizionata dal contenuto di Cd, apre buone prospettive per l'accoppiamento della fitoestrazione assistita con la produzione di energia o di materie prime per lo sviluppo di chimica verde. Questo consentirebbe di recuperare reddito per gli agricoltori sui suoli non destinabili alle produzioni alimentari e, in tempi medi, di restituire i suoli alle produzioni ordinarie.
- 2) Tecnica di fitoestrazione: le asportazioni del primo anno sono elevate e fanno supporre che la tecnica di fitoestrazione possa essere utile a bonificare il nostro suolo. Le asportazioni molto più basse del secondo anno ci fanno capire che la tecnica è applicabile in suoli dove la biodisponibilità del Cd non è limitata da fattori pedologici (come il contenuto di carbonati).
- 3) Un ideale protocollo di bonifica con *Arundo donax* prevede la raccolta annuale della biomassa aerea destinata alla filiera energetica e la raccolta dei rizomi a fine ciclo produttivo (circa 10 anni). Culmi a basso contenuto di metalli possono essere utilizzati in processi ad alto livello tecnologico per la conversione in bioetanolo e biodiesel senza creare problemi all'attività della microflora coinvolta, ma non va scartata l'ipotesi di un utilizzo nella termovalorizzazione. La raccolta invernale potrebbe incrementare l'efficienza di questi processi grazie alla minore presenza di foglie nella biomassa aerea, ma va considerato che sarebbe associata ad un ritorno al suolo di notevoli quantità di metalli (circa 18 g Cd ha⁻¹ sono stati asportati con le foglie nel primo anno di sperimentazione).
- 4) L'effetto positivo dell'interramento di compost sulla biodisponibilità dei metalli suggerisce la sua utilizzazione estensiva in protocolli di bonifica pianificati a livello regionale. Questo consentirebbe di recuperare la frazione organica dei rifiuti, riducendone le quantità trasportate in discarica, introducendola in un ciclo virtuoso di recupero della fertilità dei suoli.
- 5) Gli effetti del *Trichoderma* sono tangibili in entrambi gli anni di sperimentazione. La sua attitudine a stimolare l'accrescimento della biomassa aerea e quindi ad incrementare i quantitativi di metalli asportabili suggeriscono un suo utilizzo soprattutto se in combinazione con il compost.

Ringraziamenti

Prova

6. BIBLIOGRAFIA

- Adriano, D.C., (1986). Trace elements in the terrestrial environment. Springer Verlag. New York.
- Alkorta, I., Hernandez-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C., (2004). Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. *Reviews on Environmental Health* 3, 71-90.
- Alkorta, I., Epelde, L., Mijangos, I., Amezaga, I., Garbisu, C., (2006). Bioluminescent bacterial biosensors for the assessment of metal toxicity and bioavailability in soils. *Reviews on Environmental Health* 21, 139-152.
- Alloway, B.J., (1995). Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway B.J., (Ed.) *Heavy metals in soils*. London Chapman & Hill, 11-37.
- Alorro, R.D., Mitani, S., Hiroyoshi, N., Ito, M., Tsunekawa, M., (2008). Recovery of heavy metals from MSW molten fly ash by carrier-in-pulp method: Fe powder as carrier. *Minerals Engineering* 21, 1094-1101.
- Amonette, J.E., and Sanders, R.W. (1994). Non destructive techniques for bulk elemental analysis. In: Amonette J.E. and Zelazny L.W. (Ed.) *Quantitative Methods in Soil Mineralogy*. SSSA, Madison, WI.
- Angelini, L.G., Ceccarini, L., Nasso, N., Bonari, E., (2009): Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass and Bioenergy*, 33, 635-643.
- ARPAC, (2005). Piano Regionale di Bonifica dei siti inquinati della regione Campania.
- Azaizeh, H.A., Gowthaman S., Terry, N. (1997). Microbial selenium volatilization in rhizosphere and bulk soils from a constructed wetland. *Journal of Environmental Quality* 26, 666-672.
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R., (1989). Terrestrial higher plants which hyper accumulate metallic elements – Review of their distribution, ecology, and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126.

- Bargellini, A., (1998). Chimica, Società e Ambiente. Signorelli Editore, Milano.
- Berti, W. R., Cunningham, S.D., (2000). Phytostabilization of metals. In: Raskin & B. D. Ensley (Ed.) Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean-up the environment. Wiley, New York, 71-88.
- Blaylock, J.M., Huang, J.W., (2000). Phytoextraction of metals. In: Raskin I, Ensley BD, (Ed.) Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. New York, John Wiley and Sons.
- Boyd, R.S., Shaw, J.J., Martens, S.N., (1994). Nickel hyperaccumulation defends *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae) against pathogens. *Am. J. Bot* 81, 294-300.
- Boyd, R.S., (1998). Hyperaccumulation as a plant defensive strategy. In: Brooks R.R. (Ed.) Plants that hyperaccumulate metals, CAB International, Wallingford, UK 181-201.
- Chaney, R.L., Li, Y.M., Brown, S.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M., (1995). Hyperaccumulator based phytoremediation of metal-rich soils. In: Will plants have a role in bioremediation ? Proceeding of the Fourteenth Annual Symposium, Current Topics in plant biochemistry, physiology and molecular biology. Aprile 19-22, Columbia MI: 33-34.
- Chaney, R.L., Brown, S.L., Li, Y.M., Angle, J.S., Stuczynski T.I., Daniels, W.L., Henry, C.L., Siebelec, G., Malik, M., Ryan, J.A., and Compton, H., (2000). Progress in risk assessment for soil metals, and *in-situ* remediation and phytoextraction of metals from hazardous contaminated soils. U.S-EPA Phytoremediation: State of Science, May 1-2, 2000, Boston, MA.
- Cherian, S., Oliveira, M., (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Env. Science & Techn* 39(24), 9377-9390.
- Chopleka, A., Adriano, D.D., (1996), Mimicked in-situ stabilization of metals in a cropped soil: bioavailability and chemical form of zinc *Environ. Sci. Technol* 30 (11), 3294-3303.
- Chopleka, A., Adriano, D.D., (1997), Influence of zeolite, apatite e Fe-oxide on Cd and Pb uptake by crops, *Sci. Total Environ* 207 (2), 195-206.

- 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>
- Clemens, S., (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719.
- Commissione 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 179 del Consiglio, 16 aprile 2002.
- Cosentino, S.L., Copani, V., D'Agosta, G.M., Sanzone, E., Mantineo, M., (2006): First results on evaluation of *Arundo donax* L. clones collected in Southern Italy. *Industrial Crops and Products*, 23, 212-222.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W., (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110 (3), 715-719.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., (1997). Remediation of contaminated soil with green plants: an overview. *In vitro Cell Dev Biol* 29, 207-212.
- Dushenkov, V., Kumar, P. B. A. N., Motto, H., Raskin, I., (1995). Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science and Technology* 29 (5), 1239-1245.
- ENEA, (2008) Fonti rinnovabili di energia.
- Ensley, B.D., Blaylock, M.J., Dushenkov, S., Kumar, N.P.B.A., Kapulnik, Y., (1999). Inducing hyperaccumulation of metals in plant shoots. S.U. Patent 5 917 117. Date issued: 29 June 1999.
- Fagnano, M., Quaglietta Chiarandà, F., (2004). Relazioni tra qualità dell' ambiente e produzione agricola. *Riv. Agron.*, 38, 33-84.
- Fagnano, M., Adamo, P., Zampella, M., Fiorentino, N., (2011). Environmental and agronomic impact of fertilization with composted organic fraction from municipal solid waste: a case study in the region of Naples, Italy. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 141, 100-107.

- Favoino, E., Centemero, M., (1993). Il compostaggio dei residui della manutenzione del verde: qualità agronomica e possibilità di impiego. *ACER* 5; 57.
- Feng, M. H., Shan, X. Q., Zhang, S., and Wen, B., (2005). Comparison of rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* 59, 939–949.
- Fiala, M., (2008). Produzione di energia da fonti biologiche rinnovabili, Accademia dei Georgofili, Firenze.
- Fiorentino, N., Impagliazzo, A., Ventrino, V., Pepe, O., Piccolo, A., Fagnano, M., (2010). Biomass accumulation and heavy metal uptake of giant reed on polluted soil in southern Italy. *Journal of biotechnology*, 150, S1, 261. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.155.
- Fiorentino, N., Fagnano, M., Ventrino, V., Pepe, O., Zoina, A., Impagliazzo, A., Spigno, P., (2012). Assisted phytoextraction of heavy metals: compost and *Trichoderma* effects on giant reed uptake and soil quality. *Plant Soil Environ.* (in press).
- Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology & Biochemistry* 23, 1011-1020.
- Gianoni, C., (2000). La produzione sostenibile, una realtà: 11 esempi "made in Switzerland". UFAFP, Berna.
- Glass, D.J., (1999). Economic potential of phytoremediation. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Ed.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*. John Wiley & Sons, New York, 15-32.
- Gou, Z.H., Miao, X.F., (2010). Growth changes and tissues anatomical characteristics of giant reed (*Arundo donax* L.) in soil contaminated with arsenic, cadmium and lead. *J. Cent. South Univ. Technol* 17, 770–777.
- Halim, M., Conte, P., Piccolo, A., (2003). Potential availability of heavy metal to phytoextraction from contaminated soils by exogenous humic substances. *Chemosphere* 52, 265-375.

- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., (2004). Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2, 43-56.
- Hossner, L.R., (1996). Dissolution for total Elemental Analysis. *Methods of Soil Analysis Part 3. Chemical Methods*. SSSA Book Series no.5. Madison WI. USA, 49-64.
- Hulzebos, E.M., Adema, D.M.M., Dir Ven-Van Breemen, E.M., Henzen L., Van Dis, W.A., Herbold, H.A., Hoekstra, J.A., Baerselman, R., Van Gestel, C.A.M., (1993). Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environ. Toxicol Chem* 12, 1079-1094.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., (1989). Trace elements in the soil and plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kayser, A., Schulin, R., Felix, H., (1999). Field trials for the phytoremediation of soils polluted with heavy metals. In: Umweltbundesamt (Ed.), Proc. Int. Workshop am Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg, Germany, 1-2 Dec. 1997. Erich Schmidt Verlag, Berlin 170-182.
- Kim, B., Mc Bride, M.B., (2006). A test of sequential extractions for determining metal speciation in sewage sludge-amended soils. *Environmental Pollution* 144, 475 e 482.
- Kirk, G. J. D., Santos, E.E., Santos, M.B., (1999). Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice growing in aerobic soil : rates of excretion and decomposition, effects on rhizosphere pH and effects on phosphate solubility and uptake. *New Phytol* 142, 185-200.
- Krishnamurti, G.S.R., Naidu, R., (2000). Speciation and phytoavailability of cadmium in selected surface soils of south Australia. *Aust. J. Soil Res.* 38, 991-1004.
- Kumar, P. B. A. N., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I., (1995). Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29, 1232–1238.
- Lasat, M.M., (2000). Phytoextraction of metal from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *J. of Hazard. Sub. Res.* 2, 5-25.

- Lindsay, W. L., and Norvell, W. A., (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 421–428.
- Marinella, V., (2008). Siti contaminati in Campania, Regione Campania POR 2000-2006, Napoli.
- Mathis, P., Kayser, A., (2001). Plant uptake of heavy metals following glyphosate treatment. In: International Society for Trace Element Biogeochemistry (Ed.), *Proceedings of the Sixth International Conference on the Geochemistry of Trace Elements (ICOBTE)*, Guelph, ON, Canada, 29 July-2 Aug. 2001.
- Maywald, F., Weigel, H.J., (1997). Biochemistry and molecular biology of heavy metal accumulation in higher plants. *Landbauforsch. Volk.* 47, 103-126.
- Mc Grath, S.P., Zhao, F.L., Dunham, S.J., Crosland, A.R., Coleman K., (2000). Long-term changes in the extractability and bioavailability of Zinc and Cadmium after sludge application. *Environ. Qual.*, 29, 875-883.
- Meers, E., Du Laing, G., Unamuno, V., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., (2007). Comparison of cadmium extractability from soils by commonly used single extraction protocols. *Geoderma* 141, 247-259.
- Mosca, G., Vamerali T., Ganis A., Coletto, L., Bona, S., (2004). Miglioramento dell'efficienza agronomica della fitodecontaminazione di metalli pesanti. In: Zerbi G. e Marchiol L. (Ed.) *Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta*. Ed. Forum, Udine, 105-135.
- Mosca, G.,(2008) *Produzione di energia da fonti biologiche rinnovabili*, Accademia dei Georgofili, Firenze.
- Padmavathiamma Prabha, K., Loretta, Y., Li., (2007). Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. *Water Air Soil pollution* 184, 105–126.
- Papazoglou, E.G., Karantounias, G.A., Vemmos, S.N., Bouranis, D.L., (2005). Photosynthesis and growth responses of giant reed (*Arundo donax* L.) to the heavy metals Cd and Ni. *Environ.* 31(2), 243-249.

- Papazoglou, E.G., Serelis, K.G., and Bouranis, D.L., (2007). Impact of high cadmium and nickel soil concentration on selected physiological parameters of *Arundo donax* L. *European J. of Soil Biol.* 43, 207-215.
- Piccolo, A., (1989). Reactivity of added humic substances towards plant available heavy metals in soils. *The Sci. of the Total Environ.*, 81/82, 607-614.
- Pirozzi, D., Yousuf, A., Fagnano, M., Mori, M., Fiorentino, N., Impagliazzo, A., (2010). Lipids production by yeast grown on giant reed biomass. *Journal of biotechnology*, 150, S1, 167-168. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.08.434.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O., (2003). Metals hyperaccumulation in plants – biodiversity prospecting phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6, 1-22.
- Radaelli, L., Calamai, L., (2001). *Chimica del terreno*. Ed. Piccin Nuova Libraia, Padova.
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 8, 221-226.
- Reeves, R.D., Baker, M., (2000). Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD, (Ed.) *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. New York John Wiley and Sons, 193-229.
- Renella, G., Landi, L., Nannipieri, P., (2004). Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma*, 122, 311-315.
- Riva, G., Foppa Pedretti, E., Toscano, G., (2008). *Produzione di energia da fonti biologiche rinnovabili*, Accademia dei Georgofili, Firenze.
- Rossa, B., TuAers, A.V., Naidoo, G., von Willert, D.J., (1998). *Arundo donax* L. Poaceae - a C₃ species with unusually high photosynthetic capacity. *Botanica Acta* 111, 216-221.
- Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J.P., Deus- Neumann, B., Zenk, M.H., (1998). Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* 47(3), 339-347.

- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 49, 643-668.
- Sawhney, B.L., Stilwell, D.E., (1994). Dissolution and elemental analysis of minerals, soils and environmental samples. In: Amonette J.E. and Zelazny L.W. (Ed.) *Quantitative Methods in Soil Mineralogy*. SSSA, Madison, WI.
- Shaheen, S.M., (2009). Sorption and lability of cadmium and lead in different soils from Egypt and Greece. *Geoderma* 153, 61-68.
- Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman G.E. and Kubicek C. (Ed.) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis, London.
- Soil Survey Staff, (1996). Soil survey laboratory methods manual. Soil Survey Investigations Report No. 42. Version 3.0. U.S. Dept. of Agriculture, National Resources Conservation Service, National Soil Survey Center, Lincoln, NE.
- Stigliani, W. M., (1992). Overview of the chemical time bomb problem in Europe. In: Meulen G.R.B. ter, Stigliani W.M., Salomons W., Bridges E.M., Imeson A.C. (Ed.), *Chemical Time Bombs, Proceedings of the European State-of-the-Art Conference on Delayed Effects of Chemicals in Soils and Sediments*. The Foundation for Ecodevelopment "Stichting Mondiaal Alternatief", The Netherlands: 2-5.
- Vallini, G., De Gregorio, S., Pera, A., Chuna Queda, A.C.F., (2002). Exploitation of composting management for either reclamation of organic wastes or solid-phase treatment of contaminated environmental matrices. *Environmental Reviews/Dossiers Environ.* 10(4), 195-207.
- Vighi, M., Bacci, E., (1998). *Ecotossicologia. Trattato di tossicologia e terapia*. UTET, Torino.
- Wade, M.J., Davis, B.K., Carlisle, J.S., Klein, A.K., Valoppi, L.M., (1993), *Environmental transformation of toxic metals*, *Occup. Med.* 8(3), 574-601.
- Woo, S.L., Lorito, M., (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro M., Gressel J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, 107-130.

Yang, Y., Nan, Z., Zhao, Z., Wang, S., Wang Z., Wang, X., (2011). Chemical fractionations and bioavailability of cadmium and zinc to cole (*Brassica campestris* L.) grown in the multi-metals contaminated oasis soil, northwest of China. *Journal of Environmental Science* 23(2) 275-281.

Zaccheo, P., Crippa, L., (2004). Fitoestrazione dei metalli: aspetti relativi alla biodisponibilità dei metalli nei suoli agrari. In: Zerbi G. e Marchiol L. (Ed.), *Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi-pianta*. Ed. Forum, Udine, 77-102.

Zerbi, G., Marchiol, L., (2004). *Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-organismi-pianta*. Forum, Editrice Universitaria Udinese Srl.