



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO PER LA INNOVAZIONE NEI SISTEMI BIOLOGICI, AGROALIMENTARI E
FORESTALI**

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ECOLOGIA FORESTALE - XXIV Ciclo**

Mesocosmi sperimentali per lo studio dei processi fisiologici di specie
arboree forestali nell'ambito della fitodepurazione: recupero di acque
contaminate per la produzione di biomassa legnosa

s.s.d. AGR/05

Dottorando

Dott. ssa Silvia Pietropaoli

Coordinatore del corso

Prof. Paolo De Angelis

Tutore

Dott. Massimo Zacchini

14.04.2014

Indice

1. INTRODUZIONE.....	6
1.1 Problematica inquinamento suoli e acque	6
1.2 Sostanze inquinanti.....	8
1.3 L'inquinamento da metalli pesanti	9
1.4 Le piante e i metalli pesanti: tossicità e tolleranza	13
1.5 Il cadmio: aspetti generali.....	14
1.6 Cenni sugli effetti del cadmio sulla salute umana e sugli ecosistemi naturali.....	18
1.7 Normativa nazionale in tema di bonifica di siti contaminati.....	18
1.8 Tecnologie di bonifica	20
1.8.1 Tecnologie fisiche, chimico-fisiche e termiche.....	23
1.8.2 Tecnologie biologiche	25
1.9 Sostenibilità di approcci di bonifica di siti contaminati	26
1.10 Il fitorimedio	27
1.10.1 Valutazioni nell'applicazione del fitorimedio.....	32
1.10.2 Fitoestrazione e metalli pesanti	32
1.10.3 Fitorimedio e piante iperaccumulatrici.....	35
1.10.4 Fitorimedio e piante forestali	35
1.10.5 Acque reflue - piante forestali e fitodepurazione	39
1.11 Eucalipto: aspetti biologici e colturali	42
1.12 Sistemi di screening in ambiente controllato e semicontrollato	46
2. SCOPO DELLA RICERCA	48
3. MATERIALI E METODI.....	51
3.1 Unità mesocosmo.....	51
3.2 Materiale vegetale.....	54
3.3 Prima parte della ricerca	55
3.4 Seconda parte della ricerca	58
4. RISULTATI RELATIVI ALLA PRIMA PARTE DELLA RICERCA	67
4.1 Unità Mesocosmo	67
4.2 Consumi idrici	67
4.3 Crescita delle piante.....	68

4.4 Relazione diametro-biomassa	71
5. RISULTATI RELATIVI ALLA SECONDA PARTE DELLA RICERCA.....	73
5.1 Consumi idrici	73
5.2 Crescita delle piante: rilievi biometrici.....	74
5.3 Equazione allometrica	81
5.4 Valutazione di parametri fisiologici	84
5.5 Accumulo e distribuzione del cadmio nel sistema pianta-mesocosmo	87
6. CONCLUSIONI.....	96
7. BIBLIOGRAFIA	99

1. INTRODUZIONE

1.1 Problematica inquinamento suoli e acque

Negli ultimi anni si è evidenziato con particolare drammaticità il problema della salvaguardia dell'ambiente che connesso a quello dello sviluppo economico costituisce uno dei temi più rilevanti che il mondo industrializzato deve affrontare. Tocca la coscienza individuale di ciascuno, è molto sentito dall'opinione pubblica di tutti i paesi e condiziona in misura progressivamente crescente la politica dei governi e degli organismi internazionali.

Infatti le attività antropiche, attraverso i processi industriali (chimico e petrolchimico), le attività estrattive, urbane, militari (esplosivi, armi chimiche) ed agricole (pesticidi, erbicidi), hanno determinato un consistente aumento della concentrazione di metalli pesanti ed altri inquinanti inorganici ed organici nell'ambiente (Clijsters et al., 2000). Tale situazione ha determinato un progressivo danneggiamento delle risorse naturali, la compromissione del territorio ed un pericolo per la salute delle popolazioni.

I maggiori effetti sulla salute umana sono legati al contatto diretto con zone contaminate e particolarmente frequentate. Di rilievo tossicologico sono l'assunzione di acqua contaminata, l'inalazione di composti vaporizzati e l'ingresso di sostanze tossiche nella catena alimentare. In quest'ultimo caso appare molto importante il ruolo degli organismi vegetali in quanto le piante, entrando a far parte della catena alimentare, direttamente (consumo di vegetali) o indirettamente (consumo di carne, latte ecc.), possono trasferire all'uomo il 90-95% dei contaminanti presenti nell'ambiente. L'entità del danno biologico è legata a diverse variabili tra le quali: natura chimica del contaminante, modalità di esposizione, quantità di contaminante presente, durata dell'esposizione, fattori genetici individuali.

In base ai dati forniti dalla Comunità Europea nel 2006, il numero di siti potenzialmente contaminati nell'Unione Europea è superiore ai 3.5 milioni (CCE, 2006). Nella sola Europa occidentale, il costo di bonifica dei siti inquinati è valutabile in 500 G€, cioè in circa il 5% del PIL europeo. La situazione italiana è in linea con quella europea, con una previsione di oltre 500 M€ per la bonifica dei soli 1250 siti prioritari. I Siti inquinati di Interesse Nazionale (SIN) coprono circa il 3% del territorio italiano. E' stato stimato che in Italia esistono circa 12.600 siti contaminati (Caiazzo e Viselli, 2010), prevalentemente da metalli pesanti e sostanze organiche, e che tra i metalli risulta alquanto preoccupante la frequente presenza di cadmio e del metalloide arsenico, contaminanti molto mobili nel suolo e fortemente tossici per i sistemi biologici (Legambiente e

WWF, 2004). Tale situazione impone di sospendere la produttività di queste aree e di studiare ed attuare piani di risanamento efficaci ed applicabili alle varie realtà. Problemi di contaminazione intensa e pericolosa per la salute vengono affrontati generalmente *ex situ* con vari metodi fisici e chimico-fisici (US EPA, 1990). In caso di superfici estese tali operazioni di risanamento hanno costi elevati e alterano fortemente la struttura fisica e le caratteristiche chimiche e biologiche dei substrati (Russel et al., 1991). Le azioni di tutela dei suoli nella Comunità Europea sono inquadrare nella proposta di “Strategia tematica per la protezione del suolo” (CCE, 2006), che ha l’obiettivo di salvaguardare le diverse funzioni che il suolo può svolgere alla luce della grande variabilità che caratterizza tale matrice e dei diversi processi di degrado in atto, tenendo conto anche degli aspetti socio-economici coinvolti.

L’inquinamento dell’acqua è uno dei problemi ecologici che desta maggiore preoccupazione poiché l’acqua, una risorsa indispensabile per la vita, sta diventando sempre più scarsa nel mondo moderno. La crescente domanda di acqua per usi civili, industriali ed agricoli deve tenere conto sempre più della diminuzione della disponibilità della risorsa, che talvolta assume aspetti particolarmente critici. Da dati FAO si può prevedere che a partire dall’anno 2025 oltre 50 nazioni nel mondo, per una popolazione complessiva di 3 miliardi di persone, si troveranno a fronteggiare croniche carenze idriche. Per questo motivo, ormai da alcuni anni, il mondo scientifico e tecnico è impegnato nello studio di gestioni più sostenibili del patrimonio idrico e rivolge sempre maggior attenzione allo studio del reperimento di risorse alternative, anche se di qualità meno elevata, da riservare a settori produttivi tradizionalmente più esigenti in fatto di consumi, così da liberare risorse più pregiate da destinare ad usi civili. I consumi idrici italiani sono stimabili in 45,5 miliardi di metri cubi annui di cui 7,9 per usi civili e domestici, 28,1 per l’agricoltura e 9,5 per l’industria. Da questi dati risulta quindi che l’agricoltura è responsabile di circa il 60% dei consumi idrici totali del paese. Poiché l’uso urbano e di alcune attività industriali delle acque non è distruttivo ma soltanto modificativo delle caratteristiche fisiche e chimiche, è possibile dopo un adeguato trattamento il riuso per altre finalità.

Per fare fronte efficacemente alle esigenze del disinquinamento del suolo, delle falde e delle acque di superficie, e della prevenzione di ulteriori danni ambientali è necessario mettere a sistema competenze scientifiche multidisciplinari e disporre di infrastrutture che consentano di attuare azioni articolate su più fronti, ma strettamente correlate ed interagenti. In questo contesto, la comunità tecnico-scientifica è da anni impegnata nell’identificazione di sistemi di gestione dei rifiuti e delle acque di rifiuto coerenti con il concetto di sistema di gestione integrato, finalizzato alla minimizzazione della produzione di rifiuto, al riciclo e riutilizzo dei materiali, al recupero

energetico da tali flussi e allo smaltimento finale dei residui in discariche ambientalmente e socialmente sostenibili (Stegmann, 1995; Driessen et al., 1995).

1.2 Sostanze inquinanti

L'uomo, gli animali e le piante sono continuamente esposti ad un'enorme varietà di sostanze chimiche estranee all'organismo, o xenobiotici, che possono essere di origine naturale o antropogenica. Queste sostanze potenzialmente tossiche comprendono metalli e altri composti inorganici ed un gran numero di complesse molecole organiche. Le principali fonti da cui tali sostanze provengono sono localizzate nei settori industriale, agricolo e domestico. Molte sostanze che l'uomo immette nell'ambiente possono essere lentamente trasformate dagli organismi viventi, specialmente dai decompositori, sino ad essere completamente demolite e sono definite biodegradabili, mentre altre sostanze non sono biodegradabili (o lo sono molto lentamente). La maggior parte delle sostanze inquinanti che si riversano nelle acque e nei suoli sono in grado di accumularsi negli organismi perché sono prevalentemente idrofobiche e attraverso la catena trofica vengono trasferite da un organismo all'altro subendo un progressivo aumento di concentrazione mediante il processo di "amplificazione biologica". Inizialmente presente nel terreno o nelle acque, la sostanza tossica si accumula prima nelle piante, successivamente negli erbivori che se ne nutrono e più tardi nei carnivori. L'accumulo delle sostanze inquinanti, che prende il nome di bioaccumulo, può avvenire attraverso due differenti meccanismi:

- a) La bioconcentrazione: captazione diretta degli xenobiotici, disciolti nell'acqua. E' un fenomeno di natura fisica che dipende unicamente dalla lipofilità del composto (le sostanze liposolubili vengono assorbite più facilmente di quelle idrosolubili).
- b) La biomagnificazione: accumulo crescente di inquinanti, che raggiunge in un organismo quantità più elevate rispetto agli organismi che lo precedono nella catena alimentare.

Una sostanza tossica è capace di produrre delle risposte dannose in un sistema biologico, alterandone seriamente le funzioni o producendone la morte. Una volta immessa in una catena alimentare si propaga rapidamente attraverso tutti i suoi anelli. Nel passaggio da un anello all'altro si concentra sempre più, raggiungendo livelli preoccupanti soprattutto in quegli organismi sfruttati dall'uomo a fini alimentari. Per produrre una manifestazione tossica, un agente chimico o un suo metabolita deve potere interagire con specifici siti dell'organismo ed essere presente in una appropriata concentrazione per un periodo sufficientemente lungo: perciò l'eventuale

manifestazione tossica dipende dalle proprietà chimico-fisiche dell'agente chimico, dall'esposizione e dalla sensibilità del sistema biologico. Il compartimento ambientale più esposto all'inquinamento è quello acquatico. Infatti, nelle acque si riversano un'ampia varietà di composti tossici sotto forma di effluenti zootecnici, scarichi di processi industriali e rifiuti domestici (La Rocca, 2005).

1.3 L'inquinamento da metalli pesanti

Il termine “metallo pesante” si riferisce a quegli elementi metallici che presentano densità superiore a 5 g/cm^3 (Holleman e Wiberg, 1985). I circa 40 elementi che rientrano in questa categoria si comportano usualmente come cationi e sono caratterizzati da diversi stati di ossidazione (elementi metallici di transizione), da bassa solubilità dei loro ossidi, da grande attitudine a formare complessi e da grande affinità per i solfuri (Riffardi e Levi-Minzi, 1989). In base a tali caratteristiche possono essere definiti metalli pesanti elementi chimici come piombo, cadmio e mercurio; questi metalli non sono essenziali per il metabolismo e pertanto determinano fenomeni di tossicità anche a bassissima concentrazione intracellulare. Altri elementi pesanti quali ferro, rame, zinco, cobalto e manganese sono micronutrienti essenziali per il metabolismo (ad es. come attivatori o regolatori enzimatici); tuttavia il loro apporto in eccesso risulta estremamente tossico (Siedlecka, 1995; Bargagli, 1998). La quasi totalità delle piante è in grado di accumulare metalli pesanti, quali Fe, Zn, Mn, Cu, indispensabili ai loro processi vitali. Alcune piante possono accumulare anche altri tipi di ioni metallici, che apparentemente non svolgono una funzione biologica, ma che al contrario risultano notevolmente tossici per la maggior parte degli organismi viventi, come il metalloide arsenico.

Le possibili sorgenti di contaminazione da metalli pesanti, nell'ambiente hanno due origini: naturale o antropica.

La principale fonte naturale è il substrato geologico, mentre tra le sorgenti d'origine antropica le più rilevanti sono dovute alle attività civili ed industriali (sorgenti di emissione puntiforme o lineare) nonché alle pratiche agricole (sorgenti di emissione diffuse).

Sorgenti naturali: il substrato roccioso

L'origine naturale dei metalli pesanti è da ricercarsi nella degradazione delle rocce che li contengono in piccole quantità e dalle condizioni ambientali in cui la pedogenesi ha avuto luogo.

Circa l'80% delle rocce crostali è formata da una serie di minerali a bassa densità, per lo più silicati e alluminosilicati; all'interno del reticolo cristallino di questi minerali primari possono inserirsi, per sostituzioni isomorfe e vicarianze, alcuni elementi in traccia tra i quali i metalli pesanti.

Affinché la sostituzione possa avvenire gli elementi vicarianti devono avere raggio ionico, carica ed elettronegatività simili. In generale la sostituzione isomorfa avviene quando la differenza tra il raggio dell'elemento maggiore e quello del metallo pesante non supera il 15% e la differenza di carica è inferiore all'unità.

Le rocce sedimentarie, che da sole costituiscono il 75% delle rocce affioranti, costituiscono il principale substrato parentale per la pedogenesi.

Esse si formano per litificazione di sedimenti che possono essere costituiti da frammenti di rocce ignee, metamorfiche o sedimentarie, da minerali resistenti all'alterazione, da minerali secondari (es. argille) o per precipitazione chimica (gessi, carbonati).

La concentrazione dei metalli pesanti nelle rocce sedimentarie, oltre che dalla composizione mineralogica dei costituenti terrigeni, dipende anche dalla capacità adsorbente del sedimento nonché dalla concentrazione dell'elemento in traccia presente nelle acque in cui i sedimenti si sono depositi o sono successivamente venuti a contatto (Gallini, 2000). Di solito i limi e le argille tendono ad adsorbire elevate quantità di ioni metallici e metalloidi. Al contrario rocce sedimentarie come le arenarie, essendo costituite prevalentemente da granuli di quarzo hanno una più bassa probabilità di contenere elementi in traccia.

Sorgenti antropiche

I flussi di alcuni metalli pesanti, presenti in natura in traccia, hanno subito un netto incremento dovuto all'attività antropica dell'ultimo secolo raggiungendo a volte soglie critiche di tossicità per la flora, la fauna e per l'uomo stesso (Alloway, 1990; Adriano, 1992; Bonanni et al., 2006).

Le cause che portano ad un tale incremento sono imputabili principalmente alla ricaduta di inquinanti aerodispersi emessi da varie sorgenti diffuse e puntiformi, quali: industrie chimiche e di trasformazione del petrolio, incenerimento dei rifiuti, impianti di riscaldamento domestico, traffico veicolare ecc.; non meno importanti sono alcune pratiche agricole le quali possono introdurre notevoli quantitativi di metalli pesanti attraverso l'utilizzo di fertilizzanti chimici, fanghi di depurazione, altri ammendanti organici, fitofarmaci (Battaglia et al., 2007) e l'utilizzo di acque con bassi requisiti di qualità.

Molti studi indicano che i metalli pesanti che hanno subito un incremento maggiore dovuto all'antropizzazione sono il Cd, il Pb e il Hg. La concentrazione media di cadmio nel suolo è sei volte superiore alla concentrazione media crostale; il piombo e il mercurio eccedono di circa il

doppio il valore medio crostale (Mirsal et al., 2008). Per quanto riguarda il suolo le fonti più importanti di inquinamento da metalli pesanti possono essere ricondotte a:

1. deposizioni atmosferiche (Tabella 1) dovute alla circolazione di veicoli a motore e l'utilizzo di combustibili fossili (Cu, Fe, Cr e Zn).

Tabella 1. Principali fonti di emissione in atmosfera di metalli pesanti in Europa (tonn/anno) (Levi-Minzi, 1998).

Origine	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
Centrali elettriche (carbone e nafta)	101	1196	1377	1011	4580	1138	1316
Impianti di riscaldamento	155	1580	2038	1378	7467	1652	1824
Carburanti	31			92	1830	74300	
Miniere	1		192	275	1640	1090	460
Produzione metalli non ferrosi	2156		8471		140	28022	54920
Produzione e trasformazione ferro e leghe ferrose	58	15400	1710	10770	340	14660	10250
Incenerimento rifiuti	84	53	260	114	10	804	5880
Fertilizzanti fosfatici	27		77		77	6	230
Cementifici	15	663				746	
TOTALI	2628	18892	14125	13640	15584	122418	74880

2. Pratiche agricole quali fertilizzanti, pesticidi e liquami zootecnici (Tabella 2). I fertilizzanti fosfatici sono spesso ottenuti dalla lavorazione di rocce fosfatiche che contengono quantità variabili di metalli pesanti. Si ritiene che questa sia la principale fonte antropogenica di Cd riscontrata nei suoli europei (Morselli, 2003). In generale molte sono le impurità contenute in questi composti chimici e più frequentemente si rinvenivano elementi come Cu, Hg, Mn, Pb, As, Sn, V e Zn. Il Co, il Cu e lo Zn sono contenuti, anche in notevoli quantità, nelle deiezioni animali, che, assimilandone soltanto percentuali molto basse, fanno sì che le loro feci e le loro urine ne risultino particolarmente arricchite (Mirsal, 2008). Di particolare interesse e rilevanza è il riutilizzo nell'agricoltura di fanghi ricchi di sostanze organiche e minerali, prodotti dalla depurazione delle acque di scarico urbane (i reflui), la cui principale limitazione d'uso dipende dal loro contenuti in metalli pesanti.

Lo stesso tipo di limitazione nell'utilizzo è dettata per i compost, risultato finale di un processo di trattamento dei rifiuti solidi urbani organici. Questi possono essere particolarmente ricchi di Cr, Cu, Cd e Zn.

Tabella 2. Concentrazioni tipiche di metalli pesanti nei principali ammendanti organici ($\mu\text{g g}^{-1}$). Dati mediati dalle seguenti fonti: Alloway (1990), S.M.Ross (1994), Kabata Pendias (2001).

Concentrazioni tipiche di metalli pesanti nei principali ammendanti organici ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
	Liquami Zootecnici	Compost	Fertilizzanti fosfatici	Fertilizzanti azotati
Cr	40-600	1,8-410	66-245	3,2-19
Mn	60-3900		40-2000	
Co	1-260		1-12	5,4-12
Ni	6-5300	0,9-279	7-38	7-34
Cu	50-8000	13-3580	1-300	
Zn	91-49000	82-5894	50-1450	1-42
Cd	1-3410	0,01-100	0,1-190	0,05-8,5
Hg	0,1-55	0,09-21	0,01-2	0,3-2,9
Pb	2-7000	1,3-2240	4-1000	2-120

3. Tra le fonti d'inquinamento ambientale vanno considerati i possibili rilasci di sostanze tossiche da parte delle discariche costruite prima dell'entrata in vigore del D.P.R. 915/82, le quali non prevedevano un vasto repertorio di accorgimenti strutturali ed operativi indirizzati al "rispetto delle esigenze igienico-sanitarie e ad evitare ogni rischio di inquinamento dell'aria, dell'acqua, del suolo e del sottosuolo". L'interramento dei rifiuti è dunque una fonte puntuale di inquinamento del suolo spesso associata a rilascio di metalli pesanti quali Zn, Cd, Ni e Pb (batterie esauste). L'incenerimento dei rifiuti, essendo un processo che coinvolge combustioni ad elevate temperature, contribuisce alla emissione di polveri e metalli tra i quali i più frequentemente riscontrati sono Zn, Pb, Cd e Hg. Per ogni tonnellata di rifiuti immessi, si ha l'emissione in aria di circa 6000 metri cubi di fumi.

4. Attività industriali che coinvolgono combustioni ad alte temperature come le centrali elettriche a carbone o ad oli combustibili, raffinerie e attività industriali legate alla trasformazione del ferro. Tra i metalli pesanti liberati i più volatili risultano essere Hg, Cd, Zn e Pb. Le industrie metallurgiche e siderurgiche possono contribuire all'inquinamento del suolo mediante:
 - emissione di aerosol e fumi, che, trasportati dai venti, possono depositarsi sul suolo o sulla vegetazione, anche a grandi distanze dalla fonte di emissione;
 - produzione di acque di scarico contaminate;
 - creazione di aree di deposito dei rifiuti, dove i metalli, in seguito a processi di corrosione e lisciviazione, possono trasferirsi negli orizzonti profondi dei suoli.

Un gran numero di elementi in traccia è utilizzato per la fabbricazione di semiconduttori, cavi ed altre componenti dei sistemi elettrici: Cu, Zn, Au, Ag, Pb, Sn, Cr, Se, Co, Mo, Hg, As. Essi possono causare inquinamento, quando vengono in contatto con il suolo.

5. Le attività estrattive e minerarie generano un inquinamento di tipo puntiforme. I metalli pesanti dipendono dalla tipologia di attività considerata. L'inquinamento da elementi in traccia derivanti da attività estrattive di metalli riguarda soprattutto le aree dove tali attività erano molto praticate nei secoli scorsi, quando le tecniche di estrazione erano poco efficienti ed i residui contenevano quantità relativamente alte di elementi in traccia. Secondo i dati raccolti dall'Agenzia Europea per la protezione dell'Ambiente (EEA, 2006) l'attività industriale, la gestione dei rifiuti e il traffico veicolare, sono le principali fonti di emissione di inquinanti in Europa.

1.4 Le piante e i metalli pesanti: tossicità e tolleranza

L'esposizione delle piante a livelli elevati di metalli pesanti induce alterazioni a livello fisiologico, biochimico e genetico tali da determinare una generale condizione di stress, che si manifesta con clorosi diffusa e necrosi a livello fogliare e con riduzione della capacità di crescita fino alla morte della pianta. La condizione di stress che si genera a livello metabolico è dovuta fondamentalmente all'alterazione della nutrizione minerale a livello radicale ed all'incremento cellulare di specie reattive dell'ossigeno (radicali liberi, ROS) che, se non prontamente contrastato dall'attività antiossidativa naturale, genera uno stato di stress ossidativo che può alterare le principali funzioni fisiologiche della pianta (Shützendübel e Polle, 2002). In natura esistono però anche specie vegetali che possono accumulare quantità molto elevate di metalli pesanti nei propri tessuti fogliari senza manifestare sintomi di danno. Esse sono conosciute come piante iperaccumulatrici (Baker e Brooks, 1989; Galardi et al., 2007), e tali proprietà sono una risposta adattativa alla crescita su terreni naturalmente molto ricchi in metalli (terreni serpentini). Tali piante, generalmente appartenenti ai generi *Thlaspi*, *Alyssum*, *Arabidopsis* (Brassicaceae), sono caratterizzate da biomassa molto ridotta ed elevata capacità di compartimentalizzare i metalli in strutture cellulari a bassa reattività metabolica (vacuoli, parete cellulare, tricomi).

Le strategie che le piante adottano per difendersi dall'azione dei metalli pesanti sono di vario tipo. Alcune piante escludono i metalli dalle radici evitando di sviluppare l'apparato radicale nelle zone più contaminate, oppure vi possono essere delle modificazioni indotte nei trasportatori di membrana per ridurre l'influsso o aumentare l'efflusso di metalli (Clemens, 2001). Molte piante reagiscono ad

alte concentrazioni di metalli pesanti accumulandoli nelle radici ed evitando la loro traslocazione nei tessuti epigei; all'interno delle cellule radicali i metalli si legano ad alcuni composti, tipicamente fitochelatine e metallotionine, e vengono immobilizzati nei vacuoli (Cobbett e Goldsbrough, 2000) (Figura 1). Queste molecole sequestrano i metalli pesanti nel vacuolo tramite complessazione. Le metallotionine invece sono proteine a basso peso molecolare ricche in cisteina sintetizzate in seguito all'attivazione di geni specifici. Tuttavia l'induzione di fitochelatine e/o metallotionine è specie-specifica e dipende anche dal tipo di metallo considerato.

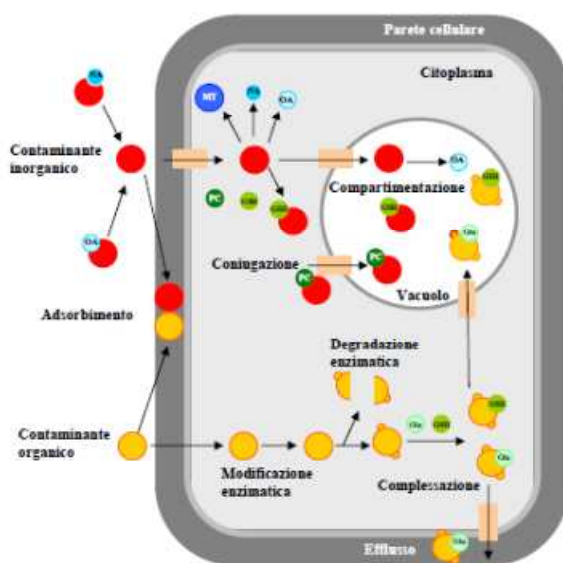


Figura 1. Possibili meccanismi adottati dalle cellule vegetali per tollerare elevate concentrazioni di inquinanti organici e/o inorganici (Pilon-Smits, 2005). (GSH= glutatione; Glu=glucosio; MT=metallotionine; NA=nicotinammina; OA=acidi organici; PC=fitochelatine; il trasporto attivo è rappresentato dai rettangoli rosa con la freccia nera).

Alcune piante rispondono alla presenza di elevate concentrazioni di metalli traslocandone una discreta quantità nella parte aerea e immagazzinandoli nei tessuti fogliari. Qui la tossicità dei metalli viene ridotta tramite complessazione con ligandi specifici (quali fitochelatine, acidi organici e composti amminici quali aminoacidi e poliammine) o precipitazione in composti insolubili, in modo da ridurre la concentrazione del metallo libero. E' stato inoltre messo in evidenza un ruolo di acidi organici e composti amminici nel trasporto dei metalli nello xilema (Sharma e Dietz, 2006; Zorrig et al., 2010).

1.5 Il cadmio: aspetti generali

Il cadmio è un elemento metallico di colore bianco-argenteo, duttile e malleabile, di simbolo Cd e numero atomico 48; è uno degli elementi di transizione ed appartiene al gruppo IIB (o 12) della

tavola periodica. Tale metallo fu scoperto nel 1817 dal chimico tedesco Friedrich Stromeyer che lo individuò nelle incrostazioni presenti all'interno di una fornace di zinco. Fonde a 321 °C, bolle a 765 °C, ha densità relativa 8,64 g/cm³ e peso atomico 112,40. A temperatura ambiente si conserva inalterato per lungo tempo, ma se riscaldato si incendia facilmente in presenza d'aria, generando una fiamma brillante, e si trasforma rapidamente in ossido, CdO. In natura, il Cd non si trova mai allo stato nativo ed è generalmente poco abbondante nella crosta terrestre, dove si ritrova associato ad un eccesso di Zn in molte formazioni rocciose. E' presente in piccole quantità in alcuni minerali, come ad esempio la greenockite, piuttosto rari e difficilmente sfruttabili industrialmente. Si ottiene prevalentemente come sottoprodotto della raffinazione di minerali di Zn, dal quale viene separato mediante distillazione frazionata o elettrolisi. Il Cd viene rilasciato nell'ambiente dalle raffinerie, dai sistemi di riscaldamento, dalle industrie metallurgiche, dagli inceneritori di rifiuti, dal traffico urbano, dalle industrie del cemento e dall'utilizzo di fertilizzanti fosfati. In aree poco antropizzate può essere rilasciato nell'ambiente in seguito al processo di mineralizzazione delle rocce.

La tabella 3 riporta le principali emissioni antropogeniche di Cd nell'atmosfera e nel suolo e le relative entità.

Tabella 3. Emissioni antropogeniche di Cd (modificata da Nriagu e Pacyna, 1988 in accordo con Mhatre e Pankhurst, 1997).

Atmosfera	10³ t/anno
produzione di energia	0,79
fonderie e raffinerie	5,43
processi industriali	0,60
incenerimento di rifiuti	0,75
TOTALE	7,57
Suolo	
rifiuti agricoli e animali	2,20
rifiuti di potatura dei boschi	1,10
rifiuti urbani	4,20
acque di scarico comunali e rifiuti organici	0,18
rifiuti solidi della fabbricazione di metalli	0,04
ceneri di carbone	7,20
fertilizzanti e torba	0,20
scarti di prodotti industriali	1,20
“ricaduta” atmosferica	5,30
TOTALE	21,62
totale complessivo	29,19

Soluzioni di un suolo non inquinato presentano una concentrazione di Cd compresa tra 0,04 e 0,32 μM , mentre se tale concentrazione si attesta tra 0,32 e 1 μM si parla di suoli moderatamente inquinati, e per concentrazioni superiori di suoli inquinati da Cd (Wagner, 1993). Su terreni che raggiungono una concentrazione di Cd superiore a 35 μM riescono a crescere solo le piante iperaccumulatrici, in grado, cioè, di accumulare nei loro tessuti una quantità molto elevata di Cd (almeno 100 mg/kg) senza alcun sintomo di fitotossicità e riuscendo a completare il proprio ciclo vitale. Tra le specie conosciute come iperaccumulatrici di Cd sono annoverate *Thlaspi caerulescens*, che accumula nelle foglie più di 1000 mg/kg di Cd (Baker et al., 2000) e *Arabidopsis halleri*, che ne accumula 157 mg/kg (Bert et al., 2003). Per quanto riguarda la tossicità per gli organismi presenti nel suolo e per i processi microbici, Duxbury (1985) classifica il Cd come un elemento a tossicità intermedia. Alte concentrazioni nel terreno possono risultare mutagene e teratogene per molte specie animali (Degraeve, 1981).

Solo una frazione del Cd totale presente in un terreno risulta disponibile per l'assorbimento da parte delle piante, e la sua entità è largamente influenzata dal pH del suolo e dal suo contenuto in sostanza organica. Oltre alla biodisponibilità, altri due processi determinano il livello di esposizione al metallo e il suo accumulo nella pianta: l'attività di assorbimento dal terreno e l'efficienza di traslocazione. Il Cd è un metallo che viene facilmente assorbito dalle radici della pianta, per poi in minima parte essere traslocato, attraverso lo xilema, alle foglie e ai frutti (Wagner, 1993).

Negli organismi vegetali, l'esposizione ad elevate concentrazioni di Cd comporta l'inibizione della crescita sia delle radici che della parte aerea, la comparsa di clorosi fogliari, l'alterazione del bilancio idrico (Dixit et al., 2001; Pietrini et al., 2010; Gaudet et al., 2011) e l'inibizione dell'apertura stomatica. La riduzione della crescita è legata alla diminuzione del tasso di allungamento delle cellule vegetali, in particolar modo di quelle del fusto, causato dall'inibizione irreversibile esercitata dal metallo sulla pompa protonica responsabile di tale processo (Aidid e Okamoto, 1992).

Numerosi studi hanno infatti dimostrato che il Cd riduce drammaticamente la fotosintesi a vari livelli, in quanto determina:

- effetti diretti sul trasporto elettronico nel PSII (Van Assche et al., 1985; Baszynski, 1986; Pietrini et al., 2010);
- riduzione nel contenuto di plastochinone nel cloroplasto (Krupa et al., 1992);
- inibizione del ciclo di Calvin (Weigel, 1985);

- diminuzione della biosintesi di clorofilla (Padmaja et al., 1990).

In vivo, però gli effetti del Cd sulla fotosintesi possono essere molto vari o addirittura nulli, a seconda della specie vegetale considerata, dell'età della pianta, della durata di esposizione, del regime luminoso a cui è sottoposta la pianta.

Molti studi hanno dimostrato l'interferenza spesso negativa esercitata dal Cd nei confronti del contenuto e dell'attività di molti enzimi metabolici (Van Assche et al., 1990; Mattioni et al., 1997; Siedlecka et al., 1997; Iori et al., 2012).

Le piante rispondono alla presenza di un'eccessiva concentrazione di Cd nel suolo, attraverso una serie di meccanismi atti a contrastare l'assorbimento del metallo e/o a difendersi dai suoi effetti tossici (Sanità di Toppi et al., 1999).

I principali meccanismi di difesa che la pianta mette in atto quando sottoposta ad uno stress da Cd coinvolgono processi per la complessazione del Cd nel citosol tramite il glutatione e nel vacuolo tramite acidi organici quando la pianta è sottoposta a bassi livelli di metallo, mentre la presenza di concentrazioni più elevate richiedono anche altri meccanismi, quali la sintesi e complessazione tramite fitochelatine e solfuro (Vogeli-Lange e Wagner, 1996). Le proteine da stress sembrano essere indotte solo da alte o altissime concentrazioni di Cd e possono agire per limitare e riparare i danni alle proteine cellulari e forse esercitano anche un'azione protettiva delle membrane (Panaretou e Piper, 1992).

L'esposizione al Cd richiede, quindi, una risposta da parte della pianta costituita da eventi in parallelo e/o consecutivi, rapidi processi fisiologici e lenti processi morfologici. La prima linea di meccanismi di difesa è costituita dalle fitochelatine e dalla compartimentazione vacuolare, mentre la seconda linea è formata dalle proteine da stress (in grado di riparare i danni molto velocemente), dall'etilene e dall'attività antiossidativa. Tutti i meccanismi di difesa conosciuti possono agire insieme, in modo mutualistico o additivo per potenziare la risposta della pianta. Si parla quindi, di una risposta a ventaglio, in cui questi diversi sistemi possono agire in diversi modi (Sanità di Toppi et al., 1999).

La risposta alla presenza di Cd è in accordo con la sindrome generale di adattamento (GAS=general adaptation syndrome), infatti non esiste una specificità di risposta a tale metallo, ma i vari meccanismi di difesa sono comuni a quelli che la pianta utilizza in caso di stress da altri metalli pesanti e da altri agenti, come la salinità, la temperatura, l'esposizione all'ozono, la siccità, ecc.

1.6 Cenni sugli effetti del cadmio sulla salute umana e sugli ecosistemi naturali

Le principali fonti di contaminazione di persone esposte al cadmio sono l'ingestione di cibi contaminati o inalazione di particelle di cadmio. Quest'ultimo caso si verifica in particolare durante l'esposizione professionale. L'assorbimento del cadmio inalato risulterebbe quindi essere doppio rispetto a quella del cadmio ingerito (Ragan e Mast, 1990), mentre l'assorbimento per via cutanea risulterebbe praticamente trascurabile. Il cadmio è un elemento che si accumula nell'organismo, aumentando con l'età. Circa l'80% del cadmio è trattenuto nel fegato e nei reni. L'emivita, ovvero il tempo necessario affinché una sostanza dimezzi la sua concentrazione nel sangue o in un organo del corpo, del cadmio nell'organismo è di 10-30 anni e la concentrazione del metallo nei tessuti aumenta, pertanto, per tutta la vita. Per quel che concerne gli effetti del cadmio sugli animali terrestri e acquatici essi includono tossicità acuta e cronica. I principali segni dell'avvelenamento da cadmio nei mammiferi sono anemia, ridotta produttività, riduzione della crescita e lesioni al fegato e ai reni. I pesci esposti a concentrazioni elevate di cadmio sviluppano rapidamente una carenza di calcio ed una bassa concentrazione di emoglobina nel sangue. Sono noti anche effetti tossici sui microrganismi del suolo quali rallentamento ed inibizione della crescita anche con concentrazioni relativamente basse.

Per quanto riguarda gli organismi vegetali, è stata riportata una correlazione lineare significativa tra contenuto di cadmio nelle piante e quello nel suolo (Alloway, 1997). La concentrazione del cadmio antropico nei vegetali risulterebbe essere mediamente il 10-50% maggiore di quella dell'elemento nel suolo indicando la tendenza ad un forte accumulo del metallo nella biomassa vegetale.

1.7 Normativa nazionale in tema di bonifica di siti contaminati

Nel 1996 la Commissione Europea ha fondato CARACAS, un "azione concertata sull'analisi di rischio dei siti contaminati", coordinata dall'Agenzia per l'Ambiente Tedesca, alla quale hanno aderito 16 paesi europei, tra cui l'Italia (Ferguson, 1999). Da questo progetto comune, a livello nazionale, è stata redatta una normativa che indicava un metodo chiaro e dettagliato a livello tecnico ed operativo per la bonifica dei siti contaminati. Il Decreto Legislativo 22/97, noto con il nome di -Decreto Ronchi-, è il recepimento delle direttive europee:

- 91/156/CEE (in tema di rifiuti);
- 91/689/CEE (in tema di rifiuti pericolosi);
- 94/62/CE (sugli imballaggi e rifiuti degli imballaggi);

e costituisce nel panorama italiano il primo decreto che abbia descritto le condizioni per le quali sia necessario intraprendere un'opera di bonifica e quali siano le persone giuridiche e gli enti pubblici coinvolti direttamente nelle attività correlate a questa. Il Decreto Legislativo 22/97 rimandava all'emanazione di un successivo regolamento attuativo: la definizione dei limiti di accettabilità della contaminazione dei suoli e delle acque, le procedure di riferimento per il prelievo e l'analisi dei campioni, i criteri generali per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati e la redazione dei progetti di bonifica. Il regolamento attuativo del decreto 22/97 è il Decreto Ministeriale n. 471 del 25 ottobre 1999. Il D.M. 471/99 è il *“Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'art. 17 del Decreto Legislativo 5 febbraio 1997, n. 2, e successive modificazioni e integrazioni”*. L'allegato 4 del D.M. 471/99 descrive i criteri generali per la redazione del progetto di bonifica.

I valori di concentrazione limite accettabili nel suolo e nel sottosuolo sono indicati nell'Allegato 1 del D.M. n. 471/1999. I limiti per il contenuto di Cd nel suolo hanno valori diversi, a seconda dell'uso del suolo, considerando tali livelli sia come limiti per i suoli contaminati, sia come obiettivi di bonifica. Tali valori sono di 2 mg/kg s.s. per l'uso del suolo come verde e residenziale e di 15 mg/kg s.s. per l'uso commerciale e industriale.

Il limite per il contenuto di Cd nelle acque è indicato nell'allegato 5 del D. Lgs. 471/99, e risulta essere pari a 0,005 mg/L.

Oggi la normativa a livello nazionale è rappresentata dal Decreto Legislativo n. 152 del 3 aprile 2006, noto come Codice sull'Ambiente o Testo Unico (TU) che raccoglie, riordina e modifica la normativa ambientale precedente.

Il Decreto è suddiviso in sei parti. In particolare, nella quarta parte, il D. Lgs. 152/06 disciplina gli interventi di bonifica e di ripristino ambientale dei siti contaminati e definisce le procedure, i criteri e le modalità per lo svolgimento delle operazioni necessarie per l'eliminazione delle sorgenti dell'inquinamento e comunque per la riduzione delle concentrazioni di sostanze inquinanti, in armonia con i principi e le norme comunitarie.

Nel D. Lgs. 152/06 viene inoltre modificata la definizione di sito contaminato e si introducono i concetti di *Concentrazione Soglia di Rischio (CSR)* e di *Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC)*. Le *Concentrazioni Soglia di Rischio* sono *“i livelli di contaminazione delle matrici ambientali, da determinare caso per caso con l'applicazione della procedura di analisi di rischio sito specifica...e sulla base dei risultati del piano di caratterizzazione”*. Il superamento delle CSR richiede la messa in sicurezza e la bonifica del sito ed esse costituiscono i livelli di accettabilità per il sito.

Le Concentrazioni Soglia di Contaminazione sono *“i livelli di contaminazione delle matrici ambientali che costituiscono valori al di sopra dei quali è necessaria la caratterizzazione del sito e l'analisi di rischio sito specifica”*.

In base all'articolo 240 del Testo Unico viene definito sito contaminato *“un'area o porzione di territorio, geograficamente definita e determinata, intesa nelle diverse matrici ambientali (suolo, sottosuolo ed acque sotterranee) e comprensiva delle eventuali strutture edilizie ed impiantistiche presenti, nella quale i valori delle concentrazioni soglia di rischio (CSR)...risultano superati”*.

Nel D. Lgs. 152/2006 i valori di CSR non sono tabellari ma dipendono dalla tipologia del sito; nel decreto sono comunque presenti dei limiti tabellari ma solamente per quanto riguarda le Concentrazioni Soglia di Contaminazione (CSC), i cui valori, per quanto riguarda il suolo e il sottosuolo, figurano nell'Allegato 5 del Testo Unico (T.U.) e precisamente nella Tabella 1 che, come già nell'allegato 1 del DM. n. 471/1999, distingue detti valori a seconda che il sito sia ad uso verde pubblico, privato e residenziale o ad uso commerciale ed industriale (Cerruto, 2006). Il superamento di tali valori, però, non comporta più l'immediata disposizione di attuazione della bonifica. Nel caso in cui in un sito si riscontrino valori di sostanze inquinanti superiori ai valori di concentrazioni soglia di contaminazione, si procede alla caratterizzazione del sito ed alla successiva analisi di rischio sanitario e ambientale sito specifica. Dopo aver eseguito ciò, si determina lo stato di contaminazione secondo le concentrazioni soglia di rischio e in base al superamento o meno di tali valori si procede alla messa in sicurezza e alla bonifica.

Il D. Lgs. n. 152/2006 prevede l'abrogazione del Decreto Ronchi e del D.M. 471/99 (articolo 264, comma 1) con la conseguenza che le disposizioni da seguire in caso di contaminazione di siti sono quelle prescritte dal Testo Unico.

1.8 Tecnologie di bonifica

La scelta della tecnologia di risanamento di un suolo contaminato avviene sulla base di fattori economici, delle caratteristiche sito-specifiche e degli obiettivi della bonifica. Un'accurata caratterizzazione del sito e la conoscenza dei fattori che limitano l'applicabilità delle diverse tecniche sono quindi importanti nel definire un programma di risanamento realistico.

Le tecnologie di bonifica agiscono sul contaminante secondo tre principi:

- *trasformazione*: consiste nell'attacco di composti organici che passano da sostanze a struttura complessa ad intermedi più semplici, fino eventualmente alla completa mineralizzazione;

- *rimozione*: è il caso tipico dei metalli pesanti, già in forma elementare, che non possono essere ulteriormente degradati ma solamente separati ed asportati dalla matrice contaminata;
- *immobilizzazione*: le tecniche basate su questo principio si applicano quando non è possibile ricorrere alle altre alternative ed è necessario immobilizzare l'inquinante nel sito contaminato per evitare l'estensione dell'inquinamento.

Le metodologie di bonifica di un sito contaminato vengono suddivise, sulla base del luogo di intervento, in due principali categorie: trattamenti *ex situ* se vi è movimentazione e rimozione del materiale contaminato in appositi impianti, e trattamenti *in situ*, senza movimentazione di materiale. Le tecnologie *ex situ* possono essere on site o off site. Nel primo caso il terreno viene rimosso per essere trattato in un impianto mobile sul posto; nel secondo caso l'impianto di trattamento è ubicato in un luogo distante dalla zona che necessita di bonifica. Generalmente gli interventi di risanamento vengono classificati, sulla base del processo applicativo (Tabella 4).

In passato le tecnologie *ex situ*, sebbene più costose, erano privilegiate poiché, grazie alla migliore controllabilità delle condizioni operative e talvolta alla possibilità di ottimizzare i parametri, risultavano più rapide. Di recente la necessità di ridurre i costi delle operazioni di bonifica e la calibrazione degli obiettivi di risanamento sulla base dell'effettiva pericolosità dei contaminanti, come indicato dalle recenti normative, ha riportato l'attenzione sulle tecnologie *in situ* che, sebbene a processo più lento, presentano una serie di vantaggi non solo sul piano economico ma anche su altri aspetti: il più delle volte infatti, comportando un ridotto impatto ambientale, risultano più accettabili dall'opinione pubblica e sono meno vincolate alla presenza di infrastrutture (edifici, strade, tubazioni, serbatoi), ed in certi casi consentono di intervenire a profondità difficilmente raggiungibili con l'escavazione (Bonomo e Sezenna, 2005).

La pratica più diffusa nella conduzione di bonifiche di siti contaminati è il conferimento in discarica, che sebbene costituisca a volte l'unica alternativa praticabile, non risolve il problema ma si limita a spostarlo nello spazio (altrove) e nel tempo (futuro). Tale approccio non solo è costoso ma comporta anche la perdita del suolo. Più interessanti risultano quindi le tecnologie di risanamento (distinte in fisiche, chimiche e biologiche) che si propongono di rimuovere l'inquinante consentendo il riutilizzo del suolo.

Tabella 4. Trattamenti di risanamento

TRATTAMENTO	PROCESSO	TIPOLOGIA DI IMPIANTO
CHIMICO FISICI	Soil Venting	<i>In situ, on site</i>
	Soil Washing	<i>On site, off site</i>
	Estrazione con solventi	<i>On site, off site</i>
	Dealogenazione	<i>On site, in situ</i>
	Decontaminazione elettrocinetica	<i>In situ</i>
	Decontaminazione elettroacustica	<i>In situ</i>
	Adsorbimento passivo su polimero	<i>In situ</i>
	Ossidazione	<i>In situ</i>
	Riduzione	<i>In situ, on site</i>
TERMICI	Desorbimento	<i>Ex situ, on site</i>
	Termodistruzione	<i>Ex situ, on site, in situ</i>
	Bioventing (suoli insaturi)	<i>In situ</i>
	Biosparging (suoli saturi)	<i>In situ</i>
	Biofiltri (gas interstiziali)	<i>In situ</i>
BIOLOGICI	Landfarming	<i>Ex situ, on site</i>
	Compostaggio	<i>Ex situ, on site</i>
	Bioreattori	<i>Ex situ, on site</i>
	Fitorimedia	<i>In situ</i>

Non esiste in assoluto la migliore tecnologia di intervento per un determinato contaminante ma è necessario identificare il tipo di intervento/i ottimale/i per la situazione specifica (Zerbi e Marchiol, 2004). Nella maggioranza dei siti contaminati raramente si riscontra la presenza di un unico elemento o composto ma al contrario è frequentissima la situazione di multi contaminazione. In questi casi nasce l'esigenza di applicare i cosiddetti *treatment trains*, ovvero trattamenti integrati nei quali vengono associate tecniche diverse allo scopo di raggiungere gli obiettivi previsti dal piano di bonifica (Roote, 2003).

1.8.1 Tecnologie fisiche, chimico-fisiche e termiche

Metodi chimici

In questo genere di trattamenti i composti tossici sono distrutti, immobilizzati o neutralizzati attraverso una serie di reazioni chimiche. Il principale pregio di un approccio di tipo chimico è che consente la degradazione di sostanze, che a causa della natura recalcitrante o estremamente tossica, sono incompatibili con i sistemi biologici. È probabile, tuttavia, che durante il processo chimico si accumulino composti derivati da una parziale degradazione, rivelandosi talora più tossici di quelli di partenza, oppure che siano gli stessi reagenti introdotti nel terreno a causare danni e inquinamento (Evans e Furlong, 2003). Nei casi di inquinamento da metalli pesanti i trattamenti chimici hanno lo scopo di ridurre la disponibilità e la mobilità dei metalli attraverso reagenti specifici. Le reazioni comprendono ossidazione, riduzione e neutralizzazione (Evanko e Dzomback, 1997); esse convertono gli inquinanti in forme meno pericolose, meno mobili, più stabili ed inerti. L'ossidazione, ad esempio, può ridurre la tossicità dell'arsenico (As) trasformando l'As (III) nel meno solubile e meno tossico As (V) (gli agenti ossidanti maggiormente utilizzati sono ozono, perossido di idrogeno, ipoclorito e diossido di cloro) mentre i trattamenti di riduzione possono trasformare il Cr (VI) in Cr (III), specie meno mobile e meno tossica.

Metodi fisici

I trattamenti fisici non possono essere considerati dei sistemi di risanamento in senso stretto, perché si basano su procedimenti in grado di separare il contaminante dalla matrice solida o liquida e di ottenerli in forma concentrata, destinandoli, successivamente, al trattamento o allo smaltimento finale. Il fatto che si tratti di interventi puramente fisici, senza cioè l'aggiunta di reagenti chimici, potrebbe essere visto come un vantaggio, in quanto riduce di molto i rischi di contaminazione secondarie. Tuttavia, i contaminanti non sono distrutti e la loro concentrazione richiede necessariamente adeguate misure di contenimento. Inoltre vanno considerati i costi generalmente onerosi per lo smaltimento in discarica, soprattutto per i rifiuti speciali.

Per ovviare agli inconvenienti di queste tecnologie e di quelle chimiche, molto spesso si usano tecniche chimico-fisiche che sono una combinazione delle due metodologie, in grado cioè di sfruttare i pregi di entrambe riducendone i difetti, un esempio applicativo è il *soil washing*. Nella tecnica del soil washing vengono applicati *in primis* trattamenti fisici che prevedono la separazione meccanica delle particelle di suolo pulite; in secondo luogo la matrice contaminata viene trattata con diversi agenti chimici specifici per ottimizzare la rimozione dell'inquinante (Moutsatsou et al.,

2006). È una delle tecniche di bonifica più diffuse, anche se può presentare problemi a lungo termine in quanto anche i contenimenti migliori possono danneggiarsi nel tempo. Il contenimento può essere predisposto sul posto, *in situ*, oppure *on site*, escavando il suolo inquinato che viene confinato in discariche appositamente approntate. Il tipo di intervento dipende dal caso specifico: il più comune detto *capping* consiste nell'impiego di cemento, bentonite o membrane polimeriche per la copertura del sito inquinato. Questo tipo di intervento deve garantire un'effettiva riduzione della permeabilità del sito per ridurre l'infiltrazione idrica e la possibile mobilizzazione e migrazione degli elementi.

Un secondo tipo di interventi, detti interventi di stabilizzazione prevedono l'isolamento del contaminante dall'ambiente circostante. Questi sono basati sul trattamento del suolo con cemento, bitumi o pozzolana silicea. Il cemento e la pozzolana silicea reagiscono con i metalli producendo la formazione di idrossidi, carbonati e silicati di solubilità molto bassa; la solidificazione con il cemento del substrato inquinato riduce il suo contatto con l'aria e l'acqua. Questo trattamento non è efficiente per quei metalli che formano idrossidi solubili (es. Hg) o per anioni (USEPA, 1990).

Metodi termici

I trattamenti termici possono indurre la separazione dell'inquinante mediante desorbimento/volatilizzazione, causarne la distruzione per pirolisi o incenerimento o provocarne l'immobilizzazione mediante fusione della matrice solida nella quale si trovano (vetrificazione). In tutti i casi è importante il controllo delle emissioni gassose del processo. Sebbene più di ogni altro procedimento permetta di ottenere la totale degradazione dei contaminanti, i costi energetici unitamente al rischio di generare nuovi residui inquinanti e agli effetti negativi sulla struttura e sulla sostanza organica del terreno ne limitano l'uso (Evans e Furlong, 2003). Nei siti contaminati da metalli pesanti è possibile applicare la separazione pirometallurgica, che permette, previo trattamento della matrice contaminata ad alte temperature (200-700 °C) in forni rotanti o ad arco, il recupero dei metalli volatilizzati. Questa applicazione è particolarmente indicata quando il suolo è talmente contaminato (5-20% in peso) da rendere vantaggioso il recupero del metallo (Mulligan et al., 2001).

1.8.2 Tecnologie biologiche

Processi biochimici e microbiologici

I metodi di risanamento biologici sfruttano soprattutto la capacità dei microrganismi di trasformare il materiale inquinante sia in biomassa che in anidride carbonica ed acqua, ovvero di mineralizzare il substrato. I trattamenti biologici, infatti, promuovono la mineralizzazione o la trasformazione dei contaminanti in forme meno tossiche, oppure più tossiche ma meno biodisponibili. I principali vantaggi di questi metodi riguardano la possibilità di intervenire su un vasto numero di molecole inquinanti di tipo organico, il loro potenziale effetto benefico sulla struttura e sulla fertilità del terreno, e il fatto di essere assolutamente non invasivi. Per contro, in un intervento di risanamento biologico, di per sé lento e influenzato dalle condizioni ambientali, i tempi di realizzazione risultano difficili da stimare, oltre al fatto che non tutti i contaminanti possono essere trattati con mezzi biologici (Evans e Furlong, 2003). Le tecniche basate sull'utilizzo di microrganismi in genere sono state sviluppate per il trattamento di composti organici. Tuttavia sono state sperimentate tecniche di questo tipo anche per rimuovere metalli pesanti dal suolo, sfruttando lisciviazione biologica (bio-leaching) o reazioni ossidoriduttive.

Batteri quali i *Thiobacillus sp.*, in condizioni aerobiche, possono produrre acido solforico portando così alla solubilizzazione dei metalli. Alcuni studi preliminari sembrano indicare la fattibilità di questo processo (Tichy et al., 1992; Mulligan et al., 2001), che è stato anche applicato su larga scala (Karavaiko et al., 1988). La lisciviazione può anche avvenire grazie alla produzione da parte di *Aspergillus niger* di acido citrico e gluconico, che oltre ad agire come acidi sono buoni agenti chelanti (Mulligan et al., 2001). Un altro modo di utilizzare i microrganismi è sfruttare la loro capacità di mediare reazioni ossidoriduttive. Essi sono per esempio in grado di ossidare Hg e Cd o ridurre As e Fe. Batteri solfato-riduttori e batteri come *Bacillus subtilis* possono formare, in condizioni opportune, solfuri metallici insolubili. Ciò comporta la bioprecipitazione dei metalli, che non migrano lungo il profilo di suolo e quindi non raggiungono l'acquifero. Nel 1999 è stato proposto da parte del "Flemish Institute for Technological Research" un progetto che sfrutta questo principio per la bioprecipitazione di Zn, Cd, As, Pb, Cr, Ni e Cu in barriere biologiche reattive.

Infine i microrganismi possono essere sfruttati in processi di biometilazione, che implicano l'attacco di un gruppo metilico a metalli come As, Hg, Cd o Pb trasformandoli in forme più mobili e talvolta volatili (es. Se) (Mulligan et al., 2001).

Nei siti inquinati da metalli è possibile utilizzare il metabolismo dei batteri indigeni, che sono già adattati alla sopravvivenza nel suolo inquinato, per modificare la valenza dei metalli e causarne il desorbimento dalle particelle del suolo, o al contrario di immobilizzarli nelle medesime particelle.

Nonostante l'applicazione delle tecniche di *bioremediation* non possa essere estesa *tout court* a tutti i casi di inquinamento da metalli pesanti sono già stati ottenuti risultati molto interessanti. Ad esempio, scorie minerarie sono state trattate con sospensioni del fungo *Aspergillus niger* che nel suo metabolismo genera acidi organici che possono attaccare e fungere da agenti chelanti per i metalli pesanti che si liberano in ambiente acidificato dalla matrice (Mulligan et al., 2001).

1.9 Sostenibilità di approcci di bonifica di siti contaminati

Numerose sono le tecnologie di bonifica disponibili per il risanamento di siti contaminati: la scelta del tipo di intervento più idoneo è importante per la massimizzazione dell'efficacia nella rimozione degli inquinanti dal suolo a costi contenuti, ma è limitata dall'applicabilità alle diverse situazioni ambientali e alle caratteristiche specifiche del sito.

Molto interessante risulta esplorare l'applicabilità di metodologie *in situ*, che non richiedano movimentazione e rimozione del mezzo contaminato e che implicino emissioni ridotte di CO₂. Possibili alternative alle tecnologie tradizionali di bonifica (interventi di tipo chimico-fisico) che abbiano costi ambientali, economici e sanitari contenuti sono fornite da approcci che assecondano ed eventualmente stimolano, in modo controllato, processi naturali di attenuazione della contaminazione, come ad esempio il fitorimediazione o l'attenuazione naturale monitorata (MNA, *Monitored Natural Attenuation*).

Le tecniche biologiche, rispetto ad altre tecniche tradizionali di bonifica, presentano dei vantaggi interessanti dal punto di vista della sostenibilità del processo: sono metodi meno invasivi, a basso impatto ambientale, sono tecniche di risanamento *in situ* (non prevedono quindi la rimozione del mezzo contaminato) e i costi degli interventi e di gestione sono bassi. Offrono inoltre benefici dal punto di vista paesaggistico, nel caso in cui si intervenga in aree altrimenti lasciate in condizioni di abbandono.

Per quanto riguarda la valutazione del *Carbon Footprint* (indicatore sintetico di emissioni di gas serra) che misura l'impatto che le attività umane hanno sull'ambiente in termini di quantità di gas serra prodotti, espresso in "unità di CO₂" durante l'intero ciclo di vita di un prodotto o di un servizio (Wiedmann e Minx, 2001), i metodi di risanamento biologici presentano vantaggi in termini di sottrazione di CO₂, in quanto vengono impiegati organismi fotosintetizzanti, inoltre l'impatto dovuto ai trasporti è minimo e viene utilizzato un numero ridotto di macchinari (per lo più macchinari agricoli per la gestione delle aree trattate). Tali tecniche presentano naturalmente anche dei limiti, che sono principalmente dovuti ai tempi di intervento lunghi (dipendenti dal ciclo vitale della pianta e dall'efficienza di estrazione), alle limitate profondità raggiungibili (che dipendono

dall'apparato radicale della pianta) ed al livello di contaminazione del mezzo, che non deve superare le concentrazioni fitotossiche per le specie impiegate. Infine vi è il problema della biomassa prodotta, che deve essere smaltita come rifiuto speciale nel caso in cui non possenga le caratteristiche qualitative per poter essere assimilata a rifiuto urbano.

Il Protocollo di Kyoto riconosce agli ecosistemi vegetali un ruolo importante nelle strategie di mitigazione dei cambiamenti climatici in quanto le piante, attraverso il processo di fotosintesi, assorbono grandi quantità di CO₂ che trasformano in biomassa. Nel Protocollo di Kyoto stesso la vegetazione viene valutata in relazione alla sua capacità di assorbire carbonio e quindi di generare crediti contro l'inquinamento: all'art. 3.4 infatti si prevede l'impiego dei pozzi (*sinks*) di carbonio per la riduzione del bilancio netto nazionale delle emissioni di gas serra.

La copertura vegetale di un suolo contaminato può assolvere a funzioni molto importanti, fra le quali il contenimento del fenomeno dell'erosione, la regolarizzazione dei regimi idrici ed il mantenimento della biodiversità, oltre ad avere un importante ruolo estetico - paesaggistico ed una funzione ricreativa; una copertura a prato che immobilizzi i contaminanti presenti nel terreno (fitostabilizzazione) può consentire di restituire al pubblico utilizzo un'area altrimenti interdetta all'accesso.

1.10 Il fitorimedio

La necessità di decontaminare vaste porzioni di territorio è rallentata dal costo elevatissimo delle tecniche attualmente disponibili, normalmente di tipo chimico-ingegneristico, che, oltre ad essere poco convenienti da un punto di vista economico, risultano essere invasive e origine di profonde alterazioni chimiche, fisiche e biologiche per i substrati oggetto della bonifica. Le bonifiche che si avvalgono di tecniche chimico-fisiche, infatti, restituiscono spesso un suolo non più adatto alla coltivazione poiché durante il processo di decontaminazione ogni attività biologica compresa quella dei microrganismi utili (funghi, batteri azoto fissatori, micorrize) e della fauna terricola viene drasticamente compromessa (Mancuso et al., 2004). Per ovviare a queste problematiche, la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di alternative più economiche e rispettose dell'ambiente. Una tecnologia innovativa, affidabile, ecosostenibile ed applicabile su larga scala è rappresentata dalla *Phytoremediation* o fitorimedio.

Il fitorimedio è una tecnica di bonifica che consiste fondamentalmente nell'utilizzo di piante per il trattamento delle matrici inquinate (Salt et al., 1998; Raskin e Ensley, 2000; Pulford e Watson, 2003; Barbafieri, 2005). Il termine anglosassone *Phytoremediation* deriva dall'associazione del greco *phytos* (pianta) e dalla radice latina *remedium* (curare, risanare). Il fitorimedio, o

fitodecontaminazione, ha diverse possibilità di applicazione (Salt et al., 1998), dalla detossificazione di molecole organiche complesse, come i pesticidi, al trattamento dei reflui di origine civile, industriale o agricola (US EPA, 2000).

La tecnica si basa su alcuni processi naturali che vengono svolti dalle piante, tra i quali:

- assorbimento diretto di metalli e di alcuni composti organici;
- accumulo o trasformazione delle stesse sostanze chimiche attraverso la lignificazione, metabolizzazione, volatilizzazione;
- utilizzo di enzimi rilasciati dalle piante per catalizzare la degradazione dei composti organici inquinanti;
- rilascio di essudati nella rizosfera, che apportano carbonio al suolo, modificano il pH e stimolano l'attività microbica per la degradazione dei contaminanti.

L'utilizzo della *phytoremediation* per bonificare suoli contaminati si sta affermando grazie ai molti vantaggi che offre (Bonomo e Sezenna, 2005):

- costi inferiori del 40% rispetto ad altre applicazioni *in situ*; i costi si riducono fino al 90% per i trattamenti *ex situ*;
- rimozione di bassi livelli di contaminazione in aree anche molto estese;
- applicazione anche in località remote di difficile accesso;
- controllo dell'erosione del suolo, dello scorrimento delle acque superficiali, delle infiltrazioni e delle emissioni di polvere;
- applicazione contemporanea a più siti da bonificare con contaminanti multipli o associati;
- ottimo impatto sull'opinione pubblica, utilizzo anche come barriera contro il rumore, esteticamente piacevole.

Come tutte le tecnologie di bonifica, anche il fitorimedio presenta dei limiti, quali:

- sistema di crescita della vegetazione;
- capacità di penetrazione delle radici delle piante;
- quantità di terreno disponibile alla piantumazione;
- stretta dipendenza dalle condizioni pedo-climatiche.

Sebbene l'uso delle piante per la bonifica di siti inquinati risulti vantaggioso per molti aspetti, esistono alcuni limiti che ne potrebbero ostacolare l'applicabilità su ampia scala.

In molti casi le concentrazioni degli inquinanti nel suolo possono essere elevate a tal punto da risultare fitotossiche o comunque tali da non consentire alle piante di crescere sufficientemente per fornire un'adeguata biomassa. In altri casi può essere la scarsa fertilità del suolo a costituire un fattore di limite rallentando la crescita delle piante. A questo si deve aggiungere il fatto che la popolazione microbica nei suoli contaminati risulta generalmente depressa sia in termini di diversità genetica che di abbondanza numerica, portando ad avere una limitata dotazione di microrganismi utili per attuare un'efficiente azione degradativa sui contaminanti (Pilon-Smits, 2005).

Sulla base dei diversi meccanismi di azione è possibile classificare le varie tecniche di fitorimedio in: *fitoestrazione*, *fitotrasformazione*, *fitostabilizzazione*, *fitovolatilizzazione* e *rizofiltrazione* (Salt et al., 1998; Pulford and Watson, 2003; Rizzi et al., 2004; Kramer, 2005).

- ✓ *Fitotrasformazione o Fitodegradazione.* È un meccanismo molto efficace nella decontaminazione del suolo da inquinanti organici moderatamente idrofobici. Consiste nella trasformazione di molecole organiche complesse in molecole semplici e nell'eventuale accumulo di cataboliti non tossici nei tessuti vegetali. Le piante trasformano il contaminante organico attraverso processi metabolici operati da vari enzimi, degradandoli a molecole semplici immagazzinate nei vacuoli o incorporate nei tessuti vegetali (Figura 2).



Figura 2. Rappresentazione schematica del meccanismo di fitodegradazione

- ✓ *Fitostabilizzazione.* Consiste nell'utilizzare piante che tollerano elevate concentrazioni di metalli e che li immobilizzano all'interfaccia suolo-radice. Le piante attraverso l'assorbimento radicale, la complessazione, la precipitazione, la riduzione dei metalli, l'umificazione o l'alterazione nella rizosfera delle caratteristiche chimico-fisiche del substrato, modificano la mobilità dei soluti, aumentano la stabilità dei metalli e riducono l'effetto di diffusione derivante dagli agenti atmosferici (Figura 3). Si può avere stabilizzazione:
 - nella zona radicale: le proteine ed altri composti ligandi dei metalli prodotti dalla pianta vengono rilasciati nella rizosfera dalle radici;

- sulle pareti cellulari: le proteine direttamente associate con le pareti delle cellule radicali possono legare e stabilizzare il contaminante all'esterno della cellula radicale;
- nelle cellule radicali: le proteine presenti sulle membrane radicali possono facilitare il trasporto del contaminante all'interno della cellula. Qui il contaminante viene sequestrato nel vacuolo.



Figura 3. Rappresentazione schematica del meccanismo di fitostabilizzazione

La fitostabilizzazione è particolarmente indicata nei siti dove è indispensabile mantenere i metalli in forma non mobile, per evitarne la dispersione. Inoltre, quando la concentrazione è molto elevata, i processi di fitoestrazione richiederebbero tempi troppo lunghi per il raggiungimento degli obiettivi di bonifica.

- ✓ *Fitovolatilizzazione*. Consiste nella trasformazione di alcuni metalli e di alcune sostanze organiche in forme chimiche volatili, che vengono rilasciate in atmosfera (Burken e Schnoor, 1997; Banuelos et al., 1997). La specie chimica del contaminante può essere trasformata nella rizosfera prima di essere assorbita, oppure nella pianta dopo l'assorbimento. All'interno della pianta il contaminante o una forma modificata di esso verrà traslocato e poi rilasciato in atmosfera attraverso la traspirazione (Figura 4). La volatilizzazione permette di rimuovere gli inquinanti da un sito senza la necessità di una continua raccolta del materiale vegetale e del suo smaltimento (Pilon e Smits, 2005).



Figura 4. Rappresentazione schematica del meccanismo di fitovolatilizzazione

- ✓ *Rizofiltrazione*. Questa tecnologia prevede che i contaminanti presenti in soluzione siano assorbiti e traslocati dalle piante oppure fatti precipitare e immobilizzati a livello delle radici. Questa tecnica è specifica per le acque, ma può includere percolati del terreno, dal momento che necessita che i contaminanti si trovino in soluzione e liberi di entrare in contatto con l'apparato radicale delle piante (Figura 5). Si utilizzano piante accumulatrici di metalli ad apparato radicale particolarmente diffuso, in grado di assorbire e concentrare i metalli nelle radici, nonché di promuovere la precipitazione a seguito di essudazione di fosfati (Dushenkov et al., 1995).

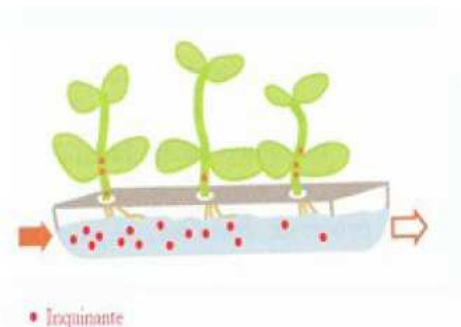


Figura 5. Rappresentazione schematica del meccanismo di rizofiltrazione

- ✓ *Fitoestrazione*. Si avvale di piante in grado di accumulare un'elevata quantità di contaminanti (Figura 6). La rimozione degli inquinanti dal suolo avviene tramite assimilazione e traslocazione all'interno dei tessuti epigei (foglie e fusto) della pianta stessa (Kumar et al., 1995). Le piante iperaccumulatrici sono in grado di accumulare quantità di metalli fino a 550 volte maggiori delle quantità presenti nelle piante non accumulatrici (Lasat, 2002), raggiungendo concentrazioni di metalli nelle foglie anche superiori al 5% del peso secco (McGrath, 2003).

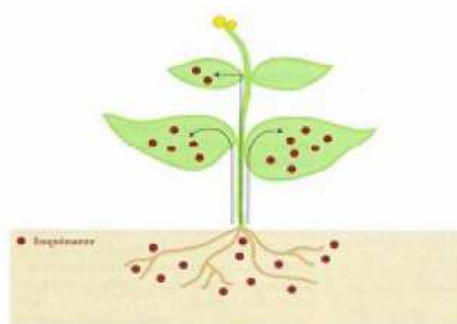


Figura 6. Rappresentazione schematica del meccanismo di fitoestrazione

1.10.1 Valutazioni nell'applicazione del fitorimedia

Una delle principali limitazioni nell'applicazione del fitorimedia è costituita dalla necessità di mettere in contatto l'apparato radicale della pianta con la matrice contaminata. In relazione alla specie considerata e alle condizioni pedo-climatiche, l'apparato radicale generalmente esplora il terreno ad una profondità che varia dai 50 centimetri delle specie erbacee ai circa 5 metri di alcune Salicaceae. Questo problema può essere risolto ad esempio eseguendo arature profonde in modo da portare la matrice contaminata nella zona di influenza dell'apparato radicale.

Un altro aspetto importante da valutare è il destino delle piante usate negli impianti di bonifica ed in modo particolare il loro smaltimento. Infatti a causa della elevata presenza di metalli al loro interno, non è possibile lasciarle sul sito ma è necessaria la loro rimozione. La biomassa asportata potrebbe essere riutilizzata per il recupero energetico all'interno di un impianto di termovalorizzazione. Questo, però, richiederebbe la disponibilità di un impianto adeguato, munito di dispositivi per l'abbattimento delle emissioni di metalli pesanti in atmosfera (ad es. elettrofiltro) (Lewandowski et al., 2006). Alternativamente gli scarti vegetali potrebbero essere impiegati per la produzione di biogas mediante fermentazione guidata (Singhal e Ray, 2003) o come fonte di materia prima per l'industria, specialmente nel caso dei pioppi (Licht e Isebrands, 2005). Uno degli utilizzi principali della biomassa raccolta è la produzione di energia per combustione (Chaney et al., 1997; Kramer, 2005). Non è da trascurare anche la possibilità del recupero dei metalli dalla biomassa "arricchita" mediante processi di compattazione ed incenerimento (Miceli, 2001).

Il tempo necessario per completare un intervento di bonifica è un altro aspetto critico nell'uso del fitorimedia in quanto tale tecnica richiede tempi molto lunghi per l'impianto e per l'effettiva rimozione dei contaminanti dal suolo e ciò ne restringe il campo di applicabilità solo ai casi in cui non c'è urgenza di riutilizzare il sito e la contaminazione non costituisce un rischio immediato per l'uomo e l'ambiente.

L'uso di questa tecnica non esclude, però, il ricorso alle tecnologie tradizionali non biologiche. Poiché la distribuzione e la concentrazione degli inquinanti sono eterogenee per molti siti, nella definizione di una strategia di bonifica efficace e a basso costo si può far ricorso a più soluzioni tecnologiche, che vanno utilizzate congiuntamente o in cascata (Pilon-Smits, 2005).

1.10.2 Fitoestrazione e metalli pesanti

La scelta delle specie vegetali da utilizzare è una fase cruciale nella definizione di una strategia di fitorimedia. Numerose specie vegetali sono state riportate in letteratura per le loro capacità dis inquinanti e la loro scelta avviene in relazione all'ubicazione della zona da trattare e alla loro

presenza spontanea in loco, al fine di evitare, con l'introduzione di specie esotiche, un'alterazione dell'equilibrio ecosistemico esistente.

I risultati ottenuti da un processo di fitoestrazione risentono dell'estrema variabilità delle diverse piante anche nell'ambito della stessa specie, senza considerare poi quella collegata alle diverse condizioni di crescita e caratteristiche del terreno (Dushenkov, 1995). L'efficienza di fitoestrazione di una pianta è determinata da fattori chiave:

- alta produzione di biomassa;
- fattore di traslocazione;
- alto fattore di bioaccumulo per la fitoestrazione (McGrath e Zhao, 2003);
- radici profonde.

Il fattore di bioaccumulo (BAF), è definito come il rapporto fra la concentrazione del metallo nella parte epigea di una pianta e la concentrazione dello stesso riscontrata nel suolo.

$$BAF = [Me]_p / [Me]_s$$

$[Me]_p$ = concentrazione del metallo nella pianta espressa in $mg\ kg^{-1}$

$[Me]_s$ = concentrazione del metallo nel suolo espressa in $mg\ kg^{-1}$

Il fattore di traslocazione (TF), è dato dal rapporto fra la concentrazione del metallo nella parte epigea e quella misurata nelle radici, e dà una stima della capacità della pianta a traslocare i metalli dalla radice agli organi in superficie, che più facilmente possono essere raccolti e smaltiti.

$$TF = [Me]_e / [Me]_r$$

$[Me]_e$ = concentrazione del metallo nella parte epigea espressa in $mg\ kg^{-1}$

$[Me]_r$ = concentrazione del metallo nelle radici espressa in $mg\ kg^{-1}$

Nelle piante non iperaccumulatrici il fattore di bioconcentrazione o bioaccumulo per i metalli pesanti e per i metalloidi risulta in genere minore di 1. L'impiego di piante con un basso fattore di traslocazione ai fini della fitoestrazione potrebbe non essere conveniente perché, indipendentemente da quanto grande sia la biomassa, è calcolato che per ridurre della metà la concentrazione di un metallo nei primi venti centimetri di terreno, sarebbero necessari oltre 100 raccolti (McGrath e Zhao, 2003). Un elenco delle specie erbacee, arbustive ed arboree utilizzate più frequentemente è riportato nella Tabella 5.

Tabella 5. Elenco di alcune specie erbacee, arbustive ed arboree utilizzate frequentemente per studi di fitorimedia.

Specie		Nome comune	Metallo accumulato
<i>Brassica juncea</i>	Erbacee	Senape indiana	Pb
<i>Pisum sativum</i>		Pisello	Pb
<i>Helianthus annuus</i>		Girasole	Zn, Cu
<i>Zea mays</i>		Granturco	Zn
<i>Sedum alfredii</i>		Borracina	Cd
Felci (varie specie)		Felce	As
<i>Nicotiana tabacum</i>	Arbustive	Tabacco	Cd
<i>Nicotiana glauca</i>		Tabacco glauco	Zn, Cu
<i>Mimosa pudica</i>		Mimosa sensitiva	As
<i>Melastoma malabathricum</i>		Melastoma di malabar	As
<i>Populus alba</i>	Arboree	Pioppo bianco	vari
<i>Populus spp</i>		Pioppo	vari
<i>Salix spp</i>		Salice	vari

L'uso di piante in grado di fitoestrarre metalli pesanti in terreni contaminati costituisce una delle strategie di fitorisanamento più promettenti e accolte favorevolmente dall'opinione pubblica in virtù dei bassi costi, della possibilità di intervenire su un ampio spettro di metalli tossici inclusi i radionuclidi, per la minima interferenza sull'ecosistema e per la mancata produzione di nessun tipo di rifiuto secondario. Tuttavia, molte delle piante accumulatrici di metalli pesanti finora identificate, o hanno una crescita molto lenta oppure producono una biomassa esigua.

La scelta di quale meccanismo d'azione utilizzare dipende dal tipo e dal grado di inquinamento e dagli obiettivi della bonifica. Obiettivi diversi possono essere il contenimento, la stabilizzazione, l'isolamento, l'assimilazione, la riduzione, la detossificazione, la degradazione degli inquinanti. A seconda di questi obiettivi la definizione della strategia di fitorimedia non può prescindere dalla conoscenza appropriata delle caratteristiche del sito in ogni suo aspetto pedologico, climatico, idrologico nonché da considerazioni economiche, amministrative e sociali (Barbafieri, 2005).

La rimozione dei metalli pesanti dai suoli contaminati si presenta come un problema piuttosto complicato da affrontare in quanto non essendo soggetti ad alcun processo di decomposizione,

permangono inalterati nel suolo, a differenza di una larga parte di contaminanti organici, che dopo un tempo più o meno lungo di persistenza nell'ambiente iniziano a degradarsi naturalmente (Wade et al., 1993).

1.10.3 Fiorimedio e piante iperaccumulatrici

La maggior parte degli studi sul fitorisanamento è stata condotta su specie iperaccumulatrici, piante, cioè, in grado di accumulare elevati livelli di metalli nei loro tessuti (Baker e Brooks, 1989; McGrath et al., 1997). Questo tipo di piante cresce di solito su suoli metalliferi ed è in grado di completare il suo ciclo di vita senza mostrare alcun sintomo di fitotossicità rispetto ai metalli (Baker et al., 2000). Il termine “iperaccumulatore” è stato utilizzato per la prima volta da Brooks et al. (1977) per indicare piante contenenti (0,1%) 1000 mg/kg di Ni nella loro sostanza secca (s.s.). Oggi i criteri per identificare le specie iperaccumulatrici variano a seconda del tipo di metallo ed in particolare sono definite tali le piante che accumulano:

- più di 100 mg/kg SS di Cd;
- più di 1000 mg/kg SS di Cu, Co, Pb;
- più di 10000 mg/kg SS di Zn e Mn (Baker e Brooks, 1989).

Finora sono state identificate in tutto il mondo più di 400 specie iperaccumulatrici, la maggior parte delle quali appartengono alle seguenti famiglie: Caryophyllaceae, Brassicaceae, Cyperaceae, Poaceae, Fabaceae, Chenopodiaceae (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Poiché queste specie sono generalmente caratterizzate da un ridotto accrescimento, specie vegetali con minore capacità di bioaccumulo ma con una maggiore velocità di crescita e con una più elevata biomassa ottenibile, sono state recentemente rivalutate (Chaney et al., 1997; Stoltz e Greger, 2002). Infatti la maggior parte delle piante non è in grado di traslocare elevate percentuali di metalli alla parte aerea, ma è possibile sfruttare quelle che producono molta biomassa, magari associandole a trattamenti del suolo che favoriscano la biodisponibilità e quindi l'assorbimento da parte delle piante (Pulford e Watson, 2003).

1.10.4 Fitorimedio e piante forestali

Negli ultimi anni si è incrementata notevolmente la sperimentazione sull'utilizzo delle piante arboree per gli scopi del fitorimedio, in quanto tali specie, producendo molta più biomassa rispetto a quelle erbacee, seppur in molti casi con una capacità fitoestrattiva minore a livello individuale, possono però determinare bilanci di fitoestrazione più efficienti per superficie interessata. In questo

contesto, la scarsità di sintomi di tossicità riportata in alcune specie arboree potrebbe indicare che i loro meccanismi di tolleranza permettono un adattamento anche in suoli con concentrazioni di metalli pesanti molto elevate, superando in taluni casi anche quelle tollerate dalle colture erbacee (Riddell-Black, 1994). Tali piante non specificatamente selezionate per la tolleranza verso i metalli riescono a sopravvivere in suoli molto contaminati, sebbene di solito con tassi di crescita ridotti (Dickinson et al., 1992).

In letteratura sono riportate evidenze sia di meccanismi non specifici di tolleranza ai metalli, sia di tolleranza specifica ad un solo metallo pesante. I più comuni caratteri di resistenza ai metalli pesanti sono la limitazione del loro accumulo nelle radici e la scarsa traslocazione nelle foglie (Dickinson, 2000), anche se la manifestazione di una tolleranza richiede la partecipazione di uno o più meccanismi fisiologici precisi con base genetica (Dickinson et al., 1997). Dickinson et al. (1992) hanno descritto la tolleranza e la sopravvivenza delle piante nei suoli contaminati da metalli come derivanti da “un’orchestrata molteplicità di risposte fisiologiche e biochimiche, includendo sia meccanismi di evitazione che di vera resistenza”.

In questo contesto, specie arboree con basso impatto sulla catena alimentare, rapido accrescimento, elevata biomassa ed apparato radicale esteso costituiscono dei buoni candidati per il fitorisanamento e possono essere impiegate per la produzione di biomassa per scopi energetici (Calfapietra et al., 2003).

Numerose specie di *Populus* e *Salix* negli ultimi anni sono state proposte per l'utilizzo nel fitorimediale per la loro elevata capacità di accumulare metalli pesanti (Robinson et al., 2000; Pilon-Smits, 2005) e numerosi composti organici tossici (Greger e Landberg, 1999; Lunackova et al., 2004; Hinchman et al., 1996), inclusi atrazina (Burken e Schnoor, 1997), idrocarburi (Jordahl et al., 1997), erbicidi (Gullner et al., 1997), tricloetilene (Newman et al., 1997) e residui farmaceutici (Iori et al., 2013). Oltre a queste due specie arboree a rapida crescita, altre specie quali *Robinia*, *Platanus* e *Paulownia* sono potenzialmente interessanti per la fitodepurazione e specialmente per la bonifica dei terreni inquinati. In generale salice e pioppo hanno dimostrato una buona capacità di assorbire ed estrarre metalli pesanti e inquinanti da substrati contaminati (Zacchini et al., 2009) e sono adatti alla selvicoltura a turno breve per la loro rapidità di accrescimento. Alcuni cloni con caratteristiche di accumulo e traslocazione di metalli pesanti ed altri composti organici tossici sono stati individuati in alcune specie di salice (Greger e Landberg, 1999) e pioppo (Predieri e Gatti, 2000). Rispetto alle piante erbacee, le piante arboree mostrano caratteristiche importanti per la fitoestrazione: radici profonde, elevata traspirazione e produzione di biomassa (Stomp et al., 1993). Alcuni studi hanno mostrato che le piante arboree ed in particolare le Salicaceae sono in grado di crescere in condizioni estreme, caratteristiche delle aree contaminate e di assorbire ed accumulare

nei loro tessuti metalli pesanti e residui potenzialmente tossici, producendo nello stesso tempo una discreta quantità di biomassa, utilizzabile per la produzione di energia (Laureysen et al., 2004). Infatti i pioppi ed i salici possono essere coltivati mediante piantagioni a turno breve governate a ceduo (SRC: “short rotation coppice”), caratterizzate da durata intorno ai 15 anni, durante i quali si effettua un taglio alla base del tronco ad intervalli di tempo molto brevi (generalmente da 1 a 3 anni, ma è possibile arrivare fino a 5) ottenendo una maggiore resa in termini di produzione di biomassa rispetto alle tecniche tradizionali (Sennerby-Forsse et al., 1992; Ceulemans et al., 1992; Macpherson, 1995; Scarascia-Mugnozza et al., 1997; Perttu, 1999). Le colture a turno breve sono considerate una risorsa per le industrie della carta e del legno e negli ultimi anni anche un’importante fonte di energia poiché sono in grado di sequestrare il carbonio presente nell’atmosfera e rappresentano una valida alternativa ai combustibili fossili (Dickmann e Stuart, 1983; Perttu, 1995). In quanto specie arboree possono, inoltre, proteggere i suoli dall’acqua e dall’erosione, stabilizzare i siti contaminati, limitando la diffusione degli agenti tossici inquinanti nelle aree circostanti e contribuire ad un miglioramento paesaggistico delle zone stesse (Schnoor, 2000; Di Baccio et al., 2003; Pulford e Watson, 2003). Rispetto alle piante iperaccumulatrici, queste colture tendono, però, a bioconcentrare in misura minore il metallo pesante ma, essendo in grado di produrre 10-15 t ha⁻¹ anno⁻¹ di peso secco, possono rimuovere dal suolo un contenuto più elevato di inquinante in termini assoluti, potendo inoltre fornire un ritorno economico dalla produzione di biomassa (Cannell e Smith, 1980; Hansen, 1991).

La disponibilità di cloni in grado di produrre elevata biomassa e di resistere alle fitopatie è un aspetto molto importante per l’utilizzo delle piante forestali nella tecnologia del fitorimedio. La maggior parte degli studi compiuti sulle specie arboree ha evidenziato come le piante che mostrano una maggior capacità di tollerare i metalli pesanti, tendono ad accumulare questi inquinanti prevalentemente a livello delle radici e mostrano una ridotta capacità di trasporto a livello delle foglie. Questo risulta probabilmente il principale problema da affrontare per un più efficiente utilizzo di queste specie per il biorisanamento di suoli inquinati. Infatti una caratteristica importante per le piante da utilizzare nel fitorimedio è la capacità di traslocare il metallo nella parte aerea, soprattutto nel fusto che non è rinnovabile come le foglie e può essere facilmente rimosso ed utilizzato per la produzione di energia.

La capacità di fitoestrazione dei metalli pesanti dal suolo da parte degli organismi vegetali è notevolmente influenzata da due fattori: la quantità totale di biomassa prodotta dalla pianta e la capacità di accumulo del metallo pesante nei tessuti (fattore di bio-concentrazione). Infatti una elevata potenzialità produttiva in termini di biomassa, pur essendo legata a molteplici fattori, è notevolmente correlata alla capacità traspirativa che costituisce una “driving force” per la

traslocazione dei metalli lungo l'asse vegetativo della pianta. La capacità di immagazzinare i metalli pesanti in strutture cellulari (es. vacuoli) o tissutali (es. tricomi), limitando la loro reattività con le macromolecole fondamentali della cellula vegetale (acidi nucleici, enzimi, ecc), permette alla pianta di accumulare notevoli quantità di metallo riducendo notevolmente il danno (prevalentemente di tipo ossidativo) a livello cellulare.

In questo contesto piante con elevata capacità produttiva di sostanza secca e con un alto fattore di bioconcentrazione del metallo pesante nei propri tessuti rappresentano candidati ideali per un'applicazione soddisfacente delle tecniche di fitorimediazione.

I composti inquinanti che possono essere rimossi e/o degradati attraverso il fitorimediazione sono i più vari: gli elementi nutrienti per le piante o fito-nutrienti (in primis azoto-N, e fosforo-P), molti metalli pesanti (Cu, Cd, Zn, Pb), molti inquinanti organici, idrocarburi petroliferi (Licht e Isebrands, 2005; Rockwood et al., 2004).

L'utilizzo di Salicaceae (*Populus* e *Salix* spp.) come pompe idrauliche naturali per rimuovere l'eccesso di acqua dal suolo è legato alla loro notevole capacità di evapotraspirazione che può assommare, in piante di cinque anni, a 100 litri al giorno. Inoltre alle Salicacee sono riconosciute capacità di fitorimediazione nei confronti di diversi metalli grazie soprattutto alla loro rapida velocità di crescita, all'estensione dell'apparato radicale e alla capacità specifica di alcuni cloni di accumulare diversi metalli nelle radici e nella parte aerea. Alcuni studi di laboratorio e di campo hanno mostrato l'elevata variabilità fra specie e cloni rispetto alla capacità di gestire un inquinamento da metalli; i pioppi sono generalmente capaci di accumulare: Zn e Cd nei tessuti fogliari (Gallagher et al., 2008; Chang et al., 2008), e sono stati anche usati come bioindicatori per l'inquinamento di As nel suolo; alcuni cloni di salice hanno mostrato buone capacità di rilocalizzazione di Zn and Cd nelle foglie e rami (Rosselli et al., 2003).

Alcuni pioppi sembrano inoltre ben tollerare la presenza di alcuni metalli pesanti nel suolo riuscendo a mantenere un buon tasso di crescita anche in suoli fortemente degradati dalla presenza di questi inquinanti.

Le tecnologie di fitorimediazione più comuni con alberi forestali includono (Licht e Isebrands, 2005):

- le fasce tampone, per il disinquinamento di corpi idrici interessati da inquinamento diffuso di provenienza agricola (nitrati, fosfati, pesticidi);
- le piantagioni da biofiltro, per la dismissione di acque reflue, urbane e zootecniche, con l'obiettivo di assorbire macro e micro nutrienti, nonché metalli pesanti in eccesso;

- le piantagioni decontaminanti di suoli alterati da inquinanti di diversa origine (discariche, deposizioni inquinanti da polveri in sospensione nei fumi industriali, etc.).

Ognuna delle suddette tecnologie forestali di fitorimedio presenta per lo più molteplici obiettivi. Le fasce tampone, come sistemi lineari, diversificano l'ambiente agroforestale, creando nicchie ecologiche per organismi animali e vegetali, svolgendo allo stesso tempo azione di frangivento e di controllo dell'erosione del suolo. Tanto le piantagioni da biofiltro, quanto quelle decontaminanti, possono assolvere egregiamente la loro funzione ecologica, producendo rilevanti quantità di biomassa legnosa, e contenendo l'erosione del suolo.

1.10.5 Acque reflue - piante forestali e fitodepurazione

Le acque reflue possono avere diversa origine.

Secondo il D.lgs n. 152/06 e ss.mm.ii. (art. 74) le acque reflue vengono definite nel seguente modo:

- acque reflue domestiche: acque reflue provenienti da insediamenti di tipo residenziale e da servizi e derivanti prevalentemente dal metabolismo umano e da attività domestiche; le sostanze provenienti dalle deiezioni umane contengono essenzialmente cellulosa, lipidi, sostanze proteiche, urea, acido urico e glucidi;
- acque reflue industriali: qualsiasi tipo di acque reflue provenienti da edifici od installazioni in cui si svolgono attività commerciali o di produzione di beni, le caratteristiche di tali reflui sono variabili in base al tipo di attività industriale. In base a quanto stabilito dall'all.5 parte III del D.lgs n. 152/06, in base alla loro pericolosità per l'ambiente le acque industriali si distinguono in:
 - ✓ pericolose;
 - ✓ non pericolose;
- acque reflue urbane: il miscuglio di acque reflue domestiche, di acque reflue industriali, e/o di quelle cosiddette di ruscellamento (meteoriche di dilavamento, acque di lavaggio delle strade, ecc.) , le acque di ruscellamento contengono varie sostanze microinquinanti, quali idrocarburi, pesticidi, detersivi, detriti di gomma.
- acque reflue industriali assimilabili alle domestiche: acque reflue provenienti da installazioni commerciali o produttive che per legge oppure per particolari requisiti qualitativi e quantitativi, possono essere considerate come acque reflue domestiche (art. 101 c. 7 d.lgs 152/06).

Le sostanze inquinanti presenti devono essere ridotte drasticamente nelle acque reflue, prima che esse siano scaricate in fognatura oppure nei corpi idrici. Tale processo è chiamato depurazione ed è stato regolato dai Decreti legislativi 152/99, poi dal 258/00 e oggi dal 152/06 (Borin, 2003; Cima, 2007).

I processi di depurazione tradizionali sono solitamente distinti in quattro gruppi: pre-trattamenti, trattamenti primari, secondari e terziari. Il pre-trattamento ha lo scopo di eliminare il materiale più grossolano o pericoloso per le fasi successive dei cicli; in pratica, esso ha la funzione di predisporre il materiale nella situazione migliore per il funzionamento dei trattamenti successivi. Il trattamento primario, opera attraverso metodi fisici, che sono: grigliatura, dissabbiatura, disoleatura, sedimentazione, flottazione ed essiccamento. Il trattamento secondario è identificato come livello minimo di trattamento svolto attraverso processi microbici, prima che il refluo sia scaricato. I mezzi usati possono essere filtri percolatori, o processi a fanghi attivi o attivati. Infine il trattamento terziario è costituito da metodi fisici e chimici differenti secondo il tipo inquinante da abbattere e da rimuovere. Negli impianti che operano questi trattamenti, i prodotti derivanti sono i fanghi di depurazione e le acque reflue. I primi subiscono dei trattamenti, per renderli facilmente trasportabili e lavorabili, mentre per i secondi, è generalmente scaricato in corpo idrico recettore, come un fiume o un lago; possono essere anche impiegati per scopi agricoli, come l'irrigazione o per alimentare infrastrutture civili, ricreative o processi industriali (Borin, 2003; Albuzio, 2007).

Negli ultimi due decenni in alternativa a queste tecnologie si sono studiati e valutati con molto interesse nuovi approcci, con tecnologie e biotecnologie “in situ” basate su attività di microrganismi e piante (Marmioli et al., 2003, 2011).

La fitodepurazione è un processo naturale per depurare le acque reflue che sfrutta i processi di autodepurazione tipici delle aree umide. Il termine “sistema naturale di depurazione” implica, nella sua accezione più rigorosa, che il processo avvenga senza l'utilizzo di macchine o di energie esterne, come avveniva nel passato. Nell'accezione più moderna (D. Lgs. 152/2006) non è più possibile ritrovare l'integrità totale di questo concetto. Oggi annoveriamo più o meno propriamente, sotto la definizione di “sistema naturale di depurazione” sistemi quali:

- subirrigazione;
- fertirrigazione;
- vassoi fitoassorbenti;
- lagunaggio biologico;
- fitodepurazione in tutte le sue varianti.

L'etimologia della parola fitodepurazione può trarre in inganno nel far ritenere che siano le piante gli attori principali nei meccanismi di rimozione degli inquinanti. In realtà le piante hanno il ruolo di favorire la creazione di microhabitat idonei alla crescita della flora microbica, vera protagonista della depurazione biologica.

Le tecniche di fitodepurazione esistenti possono essere classificate in base all'ecologia delle piante acquatiche utilizzate:

- sistemi a idrofite galleggianti (pleustofite);
- sistemi a idrofite radicate sommerse;
- sistemi a macrofite radicate emergenti (alofite);
- sistemi a microfite (alghe unicellulari).

Il successo dei sistemi di fitodepurazione è imputabile a fattori economici e pratici. Se non vi sono grandi differenze nei costi di realizzazione rispetto alla depurazione tradizionale lo stesso non si può dire per i costi di esercizio e manutenzione. Il funzionamento prescinde dal massiccio e costante impiego di energia elettrica e la manutenzione, limitata a periodici controlli, può essere eseguita da personale non specializzato. Il loro impatto paesaggistico è nullo, e inoltre queste tecniche sono in grado di diminuire decisamente l'effetto antropico sull'ambiente, sia dal punto di vista dell'emissione di sostanze inquinanti sia come creazione di aree verdi.

Quando però, la quantità di sostanze inquinanti è elevata, i processi sopra citati non risultano efficaci ai fini di una buona depurazione.

Per quanto riguarda la rimozione di metalli pesanti il processo a cui si fa riferimento è la fitoestrazione. Per valutare la possibile realizzazione di un progetto di fitoestrazione i parametri più significativi sono la superficie del sito, la profondità della contaminazione, la quota totale di metallo da estrarre e la capacità estrattiva della pianta prescelta. Questi fattori determineranno il numero totale di raccolti necessari al conseguimento di un determinato obiettivo. Per rendere la fitoestrazione efficace per abbattere il livello di metallo tossico in un tempo massimo di 1-3 anni bisognerebbe usare piante in grado di accumulare più dell'1% di metallo nella parte aerea, e produrre più di 20 t/ha di biomassa asportabile all'anno (Cunningham e Berti, 2000). Nel valutare la produzione di biomassa di una specie bisogna tener conto anche che alte concentrazioni di contaminante possono inibire la crescita delle piante stesse e quindi limitare l'applicabilità al sito o ad alcune zone o comunque agire prolungando il periodo di trattamento. Si può affermare pertanto che la fitoestrazione è una tecnica applicabile, con risultati presumibilmente positivi, a siti caratterizzati da una contaminazione mediamente estesa, di concentrazione non elevata e comunque limitata alla porzione di terreno raggiungibile dalle radici.

Le specie erbacee maggiormente utilizzate sono *Brassica juncea* L., *Carex* spp., *Glyceria aquatica* L., *Iris* spp., *Juncus* spp., *Lemna* spp., *Nymphaea* spp., *Phragmites australis* (Cav.), *Scirpus* spp., *Spartina* spp., *Typha latifolia* L., (Kadlec and Knight, 1996; Knight, 1997; Vymazal, 2000).

Per rendere l'uso di queste biotecnologie competitivo ed efficiente occorre avere specie vegetali utili per il risanamento ambientale e in grado di crescere in varie zone climatiche (Massacci et al., 2001).

Gli studi effettuati negli ultimi anni sulle specie iper-accumulatrici di metalli pesanti e su quelle in grado di colonizzare aree contaminate da sostanze organiche hanno fornito qualche importante indicazione sulle caratteristiche che possono ritenersi utili in piante eleggibili per tali scopi (Baker et al., 2000). In particolare, per la decontaminazione di metalli pesanti sembra importante che la pianta accumuli rapidamente elevata biomassa e, contemporaneamente, sia in grado di traslocare alla parte aerea il metallo assorbito dalle radici e di neutralizzarne la tossicità (Pollard et al., 2002). Una strategia in sintonia con queste esigenze potrebbe essere quella di ricercare queste caratteristiche sulle specie arboree, ed in particolare sulle specie ad elevato accumulo di biomassa.

Almeno 45 famiglie di piante superiori comprendono specie con caratteristiche che si avvicinano a quelle di iperaccumulatrici e tolleranti di metalli pesanti (Schnoor, 2002). Secondo Gupta et al. (2000) l'azione depurativa effettuata dalle piante nei confronti di vari inquinanti è tanto più elevata quanto più si riescono ad associare in una stessa specie una notevole produzione di biomassa e un'alta concentrazione di metalli nei suoi tessuti. Le specie dei generi *Populus* spp. e *Salix* spp. negli ultimi anni sono state proposte per la capacità di accumulare metalli pesanti e composti organici tossici. Ad esempio Gregersen e Brix (2001) hanno realizzato in Danimarca una zona umida ricostruita a *Salix viminalis* L. allo scopo di trattare acque di scarico e riciclare i nutrienti provenienti da singole abitazioni in siti dove gli standard di qualità degli scarichi erano molto restrittivi e dove non era possibile l'infiltrazione del suolo. In tale sistema sperimentale non era previsto uno scarico dell'acqua in uscita dall'impianto, infatti tutti i nutrienti contenuti nel refluo venivano utilizzati per produrre biomassa vegetale e tutta l'acqua veniva traspirata nell'atmosfera attraverso i salici.

1.11 Eucalipto: aspetti biologici e culturali

Il termine *Eucalyptus* nasce dalla combinazione di due vocaboli greci: *éu* = bene e *kalypto* = nascondo, in riferimento al fatto che i petali nascondono il resto del fiore. A questo genere appartengono circa seicento specie originarie della Tasmania, della Nuova Guinea, ma soprattutto

dell'Australia. Nel Nuovissimo Continente gli eucalipti fanno parte delle formazioni forestali della savana alberata (prateria alberata pascolata da pecore), della foresta arida spontanea a sottobosco di acacie varie, delle foreste localizzate ai margini della zona desertica centrale ed, infine, delle foreste umide localizzate nelle zone montuose e caratterizzate da elevata piovosità e ridottissimi periodi di siccità. Da specie alte pochi metri si passa gradualmente a specie con esemplari giganteschi che possono superare i 100 metri di altezza (Figura 7). Attualmente gli eucalipti sono diffusi in numerosi Paesi in ragione dell'adattabilità delle differenti specie a climi diversi, della rapida crescita e dei molteplici scopi per cui vengono coltivati. L'introduzione in Italia dei primi esemplari di eucalipto avvenne alla fine del '700, contemporaneamente a quanto avveniva nel resto d' Europa.



Figura 7. Eucalipto - *Eucalyptus globulus* Labill. (foto Forest Starr & Kim Starr)

Le specie maggiormente diffuse in Italia sono:

- *Eucalyptus globulus*, pianta originaria della Tasmania, diffuso in Liguria, Sardegna e sulla costa tirrenica. Può raggiungere i 50-65 metri di altezza ed un diametro di 2 metri; in Italia non supera i 40 metri.
- *Eucalyptus camaldulensis*, in Australia è diffusa in tutto il territorio continentale, segnatamente lungo i corsi d'acqua e nei terreni soggetti ad inondazioni primaverili. E' la specie più diffusa in Italia. Può raggiungere i 50-60 metri di altezza e diametri di 2 metri.
- *Eucalyptus viminalis*, è originario dell'Australia sud orientale, in Italia è noto da tempo, ma è relativamente poco diffuso tranne che nell'Agro Pontino. Questa pianta raggiunge i 30 metri di altezza;
- *Eucalyptus amygdalina*, l'albero più alto del genere, superando in Australia i 100 metri di altezza; in Italia raggiunge i 25-30 metri.

- *Eucalyptus botryoides*, specie diffusa nelle piantagioni forestali della Sardegna e della Pianura Pontina nelle formazioni di barriere frangivento, adattabile alle più disparate condizioni pedoclimatiche.
- *Eucalyptus gomphocephala*, specie originaria di zone caratterizzate da scarse precipitazioni atmosferiche, che ha dato buoni risultati in Sicilia e nell'Agro Pontino.

La diffusione degli eucalipti è legata alla loro capacità di valorizzare terreni a reddito scarso, non altrimenti utilizzabili; è questa la ragione che ne ha permesso l'estesa coltivazione sulle dune sabbiose lungo le coste della Toscana e del Lazio. Circa un terzo delle specie di eucalipto contengono nelle foglie oli essenziali richiesti in diverse industrie, profumeria ed in particolare in farmacia, in quanto da esso si ricavano prodotti che hanno funzioni calmanti della tosse, antisettiche, balsamiche, antiparassitarie. Alcune specie di eucalipto contengono, sia nel legno sia nella corteccia, tannino usato nell'industria conciaria.

Due sono le caratteristiche peculiari del genere: il dimorfismo fogliare e l'opercolo fiorale (Figura 8). Nelle piantine ancora in semenzaio le foglie sono orizzontali, opposte, sessili (senza peduncolo) e cordate (a forma di cuore, come quelle dell'edera); nelle piante adulte le foglie assumono una posizione verticale, sono alterne e picciolate e la forma varia dal rotondato al lanceolato-acuminato. I fiori sono comunemente raggruppati in infiorescenze differenti e si compongono di due parti saldate lungo una linea visibile: la parte inferiore corrisponde al calice e la superiore, detta opercolo, alla corolla; con la maturazione del fiore l'opercolo si stacca lasciando apparire sia gli stami che il pistillo. L'opercolo differisce di forma da specie a specie ed ha valore diagnostico. I fiori sono usualmente bianchi, con numerosi stami dalle piccole antere ed uno stilo indiviso. Il frutto è una capsula legnosa racchiusa nel tubo del calice che contiene numerosi semi normalmente piccoli e spigolosi.



Figura 8. Eucalipto - *Eucalyptus globulus* Labill. (foto T. Scoepke www.plant-pictures.de)

L'eucalitticoltura nell'Italia centro meridionale è una delle "coltivazioni fuori foresta" più adatte alla produzione di elevate quantità di biomassa lignocellulosica (legna da ardere, cippato), risorsa energetica rinnovabile più economica dei combustibili tradizionali produttori di gas serra (gasolio, metano e GPL) e che contribuisce alla riduzione delle emissioni di anidride carbonica (CO₂) nell'atmosfera. Infatti la CO₂ prodotta con la combustione delle biomasse viene riassorbita nel corso della crescita delle piante determinando un bilancio vicino alla parità.

Le caratteristiche di alcune specie di eucalipto, quali l'elevata produttività, la capacità agamica, la pronta risposta alle concimazioni, l'adattabilità a diverse tipologie di terreni, la fioritura già in età giovanile, la facilità di incrocio interspecifico e la capacità rizogena, permettono la selezione di varietà clonali in grado di dare produzioni elevatissime in tempi brevi, con turni compresi tra 2-3 e 10-15 anni. Produrre biomassa attraverso colture dedicate come l'eucalitticoltura è la condizione di base per ridurre il prelievo dai boschi cedui naturali ed avviarli alla trasformazione in fustaie, più adatte ad assolvere il ruolo di immagazzinamento di carbonio (carbon sink), di salvaguardia della biodiversità, di protezione dei suoli, di fruibilità collettiva e valenza paesaggistica.

L'impiego di specie arboree da biomassa quali l'eucalipto (ma anche pioppi, salici, robinia) per il fitorisanamento permetterebbe di ottenere simultaneamente la produzione di biomassa per uso energetico, e contribuire alla bonifica del sito inquinato. Aspetto positivo da non sottovalutare è che le specie in questione sono piante non utilizzate per l'alimentazione per cui non si corre il rischio che la biomassa raccolta venga immessa nella catena alimentare con la conseguenza di arrivare fino agli alimenti di uso umano. Inoltre il costo del fitorisanamento può essere recuperato in parte dalla vendita della biomassa che con queste specie viene prodotta in quantità elevata se confrontata alle produzioni ottenibili con specie erbacee. L'azione di fitorisanamento da sostanze indesiderate da parte delle suddette specie arboree si esplica principalmente per fitoestrazione, quando queste vengono fissate nei tessuti della pianta, fitostabilizzazione, quando sono bloccate nel terreno dagli apparati radicali, fitodegradazione quando sono metabolizzate dalle piante e trasformate in altri composti. Anche l'efficienza depurativa delle specie citate può essere aumentata attraverso la selezione di cloni con maggior capacità di accumulo di sostanze indesiderate in quanto esiste una elevata variabilità intraspecifica per questo carattere.

L'eucalipto è una specie forestale caratterizzata da alcuni aspetti interessanti per il suo possibile utilizzo in strategie di fitorimedio: crescita rapida, un lungo periodo vegetativo, un'elevata traspirazione e produzione di biomassa, un apparato radicale molto esteso, una notevole adattabilità a differenti condizioni climatiche ed edafiche (Shah et al., 2011). Inoltre l'eucalipto comprende oltre 500 specie distribuite dal deserto e le foreste pluviali agli ambienti alpini, e la maggior parte di

queste produce legno di qualità interessante, per l'alta densità che lo rende idoneo per scopi bionergetici e legname (Rockwood et al., 2008). In letteratura è inoltre riportato che l'eucalipto è idoneo per la piantumazione in terreni degradati e contaminati, riducendo la disponibilità nel suolo dei contaminanti ed il loro percolamento verso la falda, aumentando la stabilizzazione del suolo (King et al., 2008). In questo contesto è stato messo in evidenza che piantagioni di eucalipto possono contribuire alla riduzione di metalli pesanti quali Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in suoli contaminati da residui minerari (Asensio et al., 2013). Inoltre, le potenzialità di piante di *Eucalyptus camaldulensis* di rimuovere cadmio da substrati acquosi sono state messe in evidenza da Gomes et al. (2012) e Fine et al. (2013) in idroponica. Di notevole interesse risulta inoltre la possibilità di utilizzare acque reflue da scarichi civili, industriali ed agricoli per la coltivazione di piantagioni di eucalipto, realizzando un molteplici servizio ecologico legato alla riduzione del carico inquinante dei reflui, della produzione di biomassa per energia e nel risparmio di acqua di qualità più elevata. In tale ambito, è stato mostrato come l'irrigazione di colture di eucalipto con acque reflue provenienti da scarichi domestici, ricche di azoto e fosforo, oltre a rappresentare una forma alternativa di trattamento terziario delle acque porti ad un aumento della produttività rispetto alle coltivazioni tradizionali con evidenti vantaggi per la fornitura di legno per uso industriale e per attività quali la produzione di energia (Marinho et al., 2013). Prospettive interessanti per l'utilizzo di Eucalipto per la decontaminazione di acque di scarico industriali e civili da contaminanti organici e inorganici sono state discusse da Rockwood et al. (2004) e Langholtz et al. (2005), anche in virtù della buona tolleranza della specie alla parziale sommersione.

1.12 Sistemi di screening in ambiente controllato e semicontrollato

L'utilizzo dei mesocosmi per lo studio dei sistemi ambientali fornisce dei modelli test in mesoscala in cui è possibile, tramite un controllo ed un' interazione sufficiente fra delle variabili indipendenti e i parametri chimici, fisici o biologici, lo studio dei sistemi dinamici in diverse regioni dello spazio e del tempo. Differenti lavori hanno dimostrato la grande versatilità e potenzialità di tali sistemi nel ricreare i processi naturali (Takeuchi et al., 2002). Strutture di forma cilindrica (Engel et al., 2002), rettangolare (Lebaron et al., 2001) o a vasca (Santas et al., 1998); dalla capacità di poche centinaia di litri (Takeuchi et al., 2002) ad alcune migliaia (Reilly, 1999); di differente materiale come vetroresina (Engel et al., 2002), plexiglass (Santas et al., 1998) o acciaio (Lebaron et al., 2001) sono state proposte per ottimizzare la riproduzione degli ambienti naturali.

L'analisi della letteratura ecologica di questi ultimi anni rivela un sempre maggiore utilizzo di sistemi sperimentali chiusi (microcosmi, mesocosmi) come strumento per lo studio dei sistemi ecologici ambientali (Ives et al., 1996). I sistemi in scala sono stati ampiamente accettati come strumento di studio nell'ecologia sperimentale perché essi permettono la riproduzione di un ecosistema naturale sotto condizioni controllate e con caratteristiche di replica e di ripetibilità. Le differenze di scala rendono un sistema pilota diverso dall'ecosistema naturale che è caratterizzato, di norma, da un'ampia serie di fenomeni naturali non sempre riproducibili.

Sebbene il problema della scala è relativamente nuovo all'ecologia, altre discipline hanno una sostanziale esperienza nel trattare questo fenomeno; infatti l'analisi dimensionale è una tecnica adottata già da parecchi anni, ad esempio, dagli ingegneri che disegnano modelli in scala (aeroplani, valvole, canali ecc.) che conservano funzioni specifiche attribuite ai grandi sistemi di interesse. Va però tenuto conto dell'impatto della scala sull'ottimizzazione dei sistemi sperimentali utilizzati, e questo può avvenire o attraverso la creazione di esperimenti in multiscala o comparando i risultati ottenuti durante le sperimentazioni condotte in mesocosmi con quelli ottenuti nell'ecosistema naturale o per mezzo di vasta indagine della letteratura, attraverso l'identificazione di una scala ottimale di ricerca e di studio. L'utilizzo dei mesocosmi è correlato a dei limiti dovuti alla scala. Il primo è che gli ecosistemi riprodotti nei mesocosmi sono, per definizione, in una scala spaziale ridotta rispetto alle controparti naturali; così come ridotte sono anche la scala temporale, la durata degli esperimenti, la tempistica di molti processi ecologici, i tassi di materiale, le vie geochimiche e i livelli funzionali (Petersen et al., 1999). Il secondo limite della scala riguarda gli artefatti connessi alla natura "chiusa" dei sistemi pilota. Con questo termine possono essere identificate tutte quelle alterazioni riconducibili alle variazioni dipendenti dal volume, dalla profondità e dalla struttura del sistema. Il terzo limite strettamente collegato alla scala potrebbe essere identificato con il termine di "distorsioni scalari" e si riferisce alle variazioni ecologiche che accadono mentre la scala è ridotta.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Le piante si trovano molto spesso a vivere in un contesto ambientale caratterizzato dalla presenza di molte attività antropiche che immettono nell'ambiente sostanze in grado di modificare i delicati equilibri che regolano i diversi comparti ambientali e che permettono la sopravvivenza degli ecosistemi.

I fattori abiotici sono i componenti di un ecosistema che non hanno vita (dal greco bios, cioè vita, con il prefisso a-, senza). Si tratta quindi dell'ambiente circostante tranne animali e piante: luce, terra (suolo e sottosuolo), rocce, acqua, aria, l'insieme dei fattori climatici etc. La temperatura sulla superficie terrestre può raggiungere i limiti estremi di +60 °C e -70 °C. Ogni specie animale o vegetale vive bene solo entro un certo intervallo di temperatura. A temperature molto basse, infatti, i processi vitali rallentano o vengono temporaneamente sospesi.

I fattori biotici, detti anche fattori biologici, sono quelli “vitali”, la parola deriva dal greco “bios”, cioè vita. Come ad esempio la presenza di specie viventi in competizione, le malattie e la disponibilità di cibo che costituiscono l'ecosistema. L'ecosistema è un sistema complesso formato da organismi che vivono in un determinato ambiente. Gli animali e le piante costituiscono le componenti biotiche dell'ecosistema.

Il crescente aumento dell'inquinamento diffuso di origine antropica pone la necessità di individuare tecniche che possano essere impiegate su ampia scala e con costi contenuti. A tale necessità risponde efficacemente il fitorimediale che si pone come metodo per il risanamento delle matrici inquinate attraverso l'impiego di specie vegetali, finalizzato alla rimozione di inquinanti quali i metalli tossici presenti nei suoli e nelle acque. Il crescente interesse verso la decontaminazione delle acque è dovuto dalla conoscenza della notevole fragilità dell'ecosistema acquatico e dal fatto che le acque risultano essere un veicolo estremamente rapido per il trasferimento degli inquinanti tossici verso la catena alimentare. Inoltre, la necessità di individuare metodi più naturali ed economici per depurare acque reflue civili, industriali e agro-zootecniche nasce dalla considerazione che la progressiva scarsità di acqua per uso civile costringerà sempre più nei prossimi anni, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, ad utilizzare per l'agricoltura acque reflue che, se non opportunamente depurate, potrebbero divenire un notevole mezzo di diffusione della contaminazione tra tutte le componenti dell'ecosistema, andando ad interessare anche le catene trofiche.

Uno degli approcci sviluppati con un certo successo per estrarre metalli pesanti dal suolo è l'utilizzo di specie arboree a rapida crescita e ad elevato accumulo di biomassa. In questi ultimi anni è notevolmente cresciuto l'interesse per un possibile utilizzo di specie vegetali ad elevata capacità

evapotraspirativa anche per la depurazione di acque contaminate da eccesso di nutrienti e metalli pesanti. Specie forestali caratterizzate da una buona tolleranza alla sommersione e con notevole produzione di biomassa sono state indicate come potenzialmente molto utili per questo scopo. Inoltre, esse hanno anche un ruolo importante dal punto di vista energetico poiché consentono di sostituire i combustibili fossili con un combustibile rinnovabile quale il legno con un bilancio tra assorbimento ed emissione di CO₂ pari a zero.

L'obiettivo generale di questo programma di ricerca è stato quello di dimostrare l'efficacia di sistemi biologici nel settore del risanamento ambientale e quindi di avviare una sperimentazione volta a verificare le capacità di una specie forestale a rapida crescita di operare un duplice servizio ecologico, la mitigazione del carico inquinante di acque contaminate da un metallo pesante particolarmente diffuso e pericoloso per la salute umana e degli ecosistemi, quale il cadmio, e la produzione di biomassa per successivi usi energetici. La specie utilizzata per lo studio appartiene al genere *Eucalyptus*, si tratta di un clone selezionato dal CRA-Unità di Ricerca per le Produzioni Legnose Fuori Foresta (Roma) all'interno di ibridi tra *Eucalyptus camaldulensis* x *E. globulus* ssp bicostata (clone Viglio ex 358). In precedenza, in esperimenti di laboratorio in idroponica è stato valutato che la capacità dell'eucalipto di estrarre e concentrare metalli pesanti nelle varie componenti ed in particolare nelle radici è paragonabile a quella di pioppi e salici (Zacchini et al., 2011). L'eucalipto inoltre è una specie a rapida crescita, elevata produzione di biomassa, facile propagazione, ha un apparato radicale molto esteso, si adatta a terreni marginali, ha buona tolleranza alla sommersione, ha un lungo periodo vegetativo annuale e può essere coltivato in selvicoltura a turno breve. I meccanismi fisiologici che sono alla base delle capacità di fitodepurazione in questa specie sono ancora in larga parte da chiarire e necessitano di studi mirati, oltre che in campo, anche in ambiente controllato o semi-controllato. Per approfondire queste conoscenze e contribuire alla valutazione della specie *Eucalyptus* per capacità di fitorimedio di acque contaminate, altrimenti detto fitodepurazione, è stata condotta una sperimentazione su di un sistema pilota su piccola scala (mesocosmo) in ambiente esterno, in grado di poter monitorare in continuo gli apporti ed i consumi idrici e nutritivi, lo stato fisiologico e la crescita delle piante, l'andamento della contaminazione da cadmio nella soluzione circolante.

La prima parte della ricerca è stata dedicata alla messa a punto dell'unità sperimentale di riferimento ovvero il sistema mesocosmo, quale sistema di crescita delle piante in mezzo semi-idroponico in ambiente esterno.

La seconda parte della ricerca ha invece avuto lo scopo di valutare nelle piante di eucalipto le capacità di accumulo, di traslocazione e di tolleranza del cadmio attraverso studi sulla ripartizione

nelle componenti del sistema mesocosmo del metallo pesante, sulle caratteristiche della rimozione del metallo dalla soluzione circolante da parte delle piante, sulla capacità di traspirazione delle piante per lo studio della relazione tra traspirazione e assorbimento e trasporto del metallo e sulla produzione totale di biomassa. Inoltre è stata valutata l'efficienza del sistema mesocosmo per la mitigazione della contaminazione da cadmio nella soluzione circolante.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Unità mesocosmo

Nell'Area della Ricerca di Roma 1- sez. Montelibretti è stato creato, presso il campo sperimentale, un sistema di crescita per le piante in coltura semi-idroponica per mezzo di mesocosmi.

Il mesocosmo è costituito da un contenitore in PVC con una capacità volumetrica di 1.000 litri con dimensioni di 120 cm (diametro massimo), 100 cm (diametro minimo) e 120 cm (altezza), e poggia su una piattaforma di cemento alta 50 cm e larga 100 cm. E' stato scelto il PVC in quanto materiale inerte e atossico.

Ogni mesocosmo è destinato ad ospitare fino a 4 talee ed è chiuso con un coperchio in cui sono presenti 4 finestre (12x12 cm) costituite da serraggi di Perplex che permettono l'ancoraggio delle piante ed evitano l'infiltrazione nel sistema di acqua piovana (Figura 9a).

Ogni mesocosmo contiene 20 cm di ghiaia grande ($\varnothing = 30$ mm), 5 cm di ghiaia piccola ($\varnothing = 15$ mm) e 75 cm di agriperlite. La ghiaia grande e piccola posta sul fondo ha la funzione di drenaggio, mentre l'agriperlite è stata scelta in quanto materiale inerte, leggero, ad alta capacità drenante e con buona funzione di ancoraggio per le piante (Figura 9b). La piattaforma di cemento isola i contenitori dal calore del suolo e sollevandoli di circa 50 cm agevola il movimento dell'aria e il funzionamento delle pompe per il riciclo dell'acqua.



Figura 9. Mesocosmo: a) vista frontale e b) profilo del substrato

La perlite utilizzata nell'esperimento è un materiale che deriva da rocce riolitiche vulcaniche che si espandono anche di 20 volte rispetto alle dimensioni originali quando sono rapidamente riscaldate oltre gli 870 °C. Contiene circa il 70% di silicio e risulta essere un materiale sterile chimicamente inerte, esente da agenti patogeni, non inquinante, inalterabile nel tempo, leggero ad alta porosità e

quindi in grado di assorbire elevate quantità di liquidi. È un eccellente isolante, sia termico che acustico, resistente al fuoco e classificato come materiale ultraleggero (Chesterman, 1975). La tabella 6 riporta la composizione chimica della perlite.

Tabella 6. Analisi chimica della perlite (da Chakir et al., 2002)

Costituente	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	P ₂ O ₅	TiO ₂	CaO	MgO	MnO	K ₂ O	Na ₂ O
Perlite (%)	75,22	13,08	1,83	0,02	0,13	1,43	0,10	0,06	4,95	3,00

Il sistema idraulico è costituito da un contenitore SOVRAPP con capacità di 50 l e dimensioni di 50 cm (diametro massimo), 40 cm (diametro minimo) e 50 cm (altezza) poggiante su una piattaforma di cemento alta 10 cm e larga 40 cm. All'interno sono posti un galleggiante meccanico, un galleggiante automatico e una pompa della portata di 1,95 l/s (Figura 10a).

E' presente inoltre nel sistema un rubinetto, un'elettrovalvola, un tubo graduato e un contatore idraulico. Tubi in pvc e valvole collegano tra loro i vari componenti.

L'acqua è stata prelevata dall'acquedotto a servizio dell'area di ricerca. L'agriperlite è stata completamente imbibita e sono stati aggiunti ulteriori 500 l di acqua per creare un livello di falda visibile dal tubo graduato all'esterno.

Tutta l'acqua del mesocosmo viene riciclata in 150 minuti mantenendo un'ossigenazione costante del mesocosmo e permettendo una miscelazione continua dell'acqua e dell'eventuale trattamento.

In corrispondenza del foro di uscita dell'acqua è stato inserito un setto filtrante da 2 mm per impedire il passaggio di detriti che potrebbero ostruire e bloccare il galleggiante meccanico.

Quando il livello dell'acqua raggiunge circa i 25 litri un galleggiante automatico mette in funzione la pompa che riporta l'acqua nel mesocosmo. La pompa, inoltre, grazie ad una ventola esterna, rimescola, ossigena e omogeneizza l'acqua (e l'eventuale trattamento) all'interno del bidone. Una volta riportata nel mesocosmo dalla pompa, l'acqua viene ridistribuita mediante un anello posto a circa 15 cm sopra il livello dell'agriperlite (Figura 10b) a cui sono collegati 4 tubicini da 6 mm posizionati in profondità in corrispondenza delle radici ed un sistema a nebulizzazione rotatoria per la distribuzione omogenea del trattamento.



Figura 10. Sistema di riciclo dell'acqua: a) galleggiante meccanico, automatico e pompa posti nel contenitore SOVRAPP e b) anello di redistribuzione

Il livello della falda è visibile da un tubo graduato esterno (Figura 11a) in cui si ha un riferimento numerico per rendere immediato il confronto tra i vari mesocosmi.

Il mesocosmo consente di monitorare le perdite di acqua per traspirazione del sistema grazie ad appositi contatori installati all'esterno dei mesocosmi (Figura 11b) che misurano le perdite d'acqua con una precisione di 0,05 litri.



Figura 11. Monitoraggio dei consumi idrici: a) tubo graduato e b) contatore idraulico

Per evitare un eccessivo aumento dei valori di umidità e temperatura all'interno del mesocosmo sono stati adottati alcuni accorgimenti: sono stati praticati 4 fori da 32 mm tra lo strato di agriperlite e il coperchio ed è stata installata una impalcatura metallica a 30 cm dai coperchi per il sostegno di un telo ombreggiante.

L'elettrovalvola consente di programmare l'attivazione delle pompe e il ripristino del livello di falda all'interno dei mesocosmi (Figura 12a e 12b).



Figura 12. Sistema di ripristino: a) elettrovalvola e b) rubinetto

In figura 13 si riporta lo schema dell'unità mesocosmo:

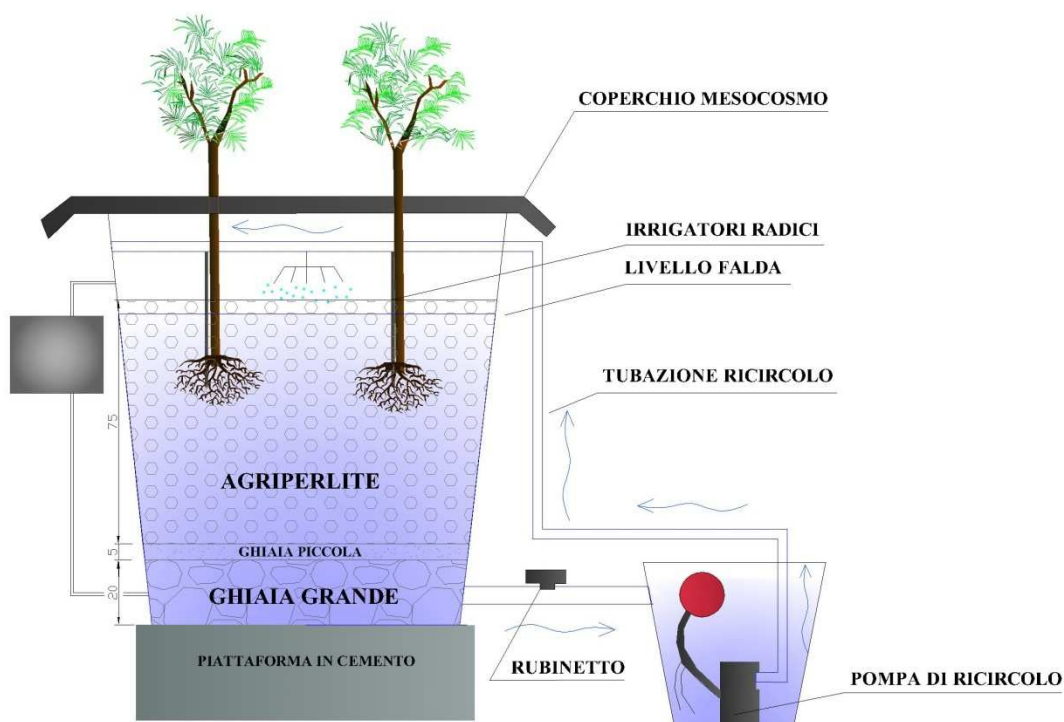


Figura 13. Schema del mesocosmo e del suo sistema di ricircolo dell'acqua

3.2 Materiale vegetale

La specie utilizzata per lo studio appartiene al genere *Eucalyptus*, ed in particolare sono state valutate le performances di un clone selezionato dal CRA-Unità di Ricerca per le Produzioni

Legnose Fuori Foresta (Roma) all'interno di ibridi tra *Eucalyptus camaldulensis* x *E. globulus* ssp. *bicostata* (clone Viglio ex 358).

Tale clone è il risultato dell'attività di questa unità di ricerca mirata alla selezione e caratterizzazione di varietà clonali di eucalipto per:

- l'impiego in piantagioni da biomassa e per legname di qualità con caratteristiche di adattabilità, elevata capacità di accrescimento e resistenza alle principali avversità biotiche e abiotiche (Mughini, 1996);
- l'individuazione di varietà clonali di eucalipto adatte al fitorisanamento di terreni e acque contaminati da sostanze indesiderate quali metalli pesanti, idrocarburi, eccesso nutrienti (Mughini, 2013);
- l'ottimizzazione dei metodi di coltivazione, la stima delle produttività e degli assortimenti ritraibili (Mughini, 2007).



Figura 14. Talee radicate di eucalipto: a) accrescimento in serra e b) impianto delle talee all'interno dei mesocosmi

Le talee radicate di 1 anno utilizzate per il trapianto nel sistema mesocosmo (Figura 14a e 14b) sono state fornite dal dr. Mughini del CRA-Unità di Ricerca per le Produzioni Legnose Fuori Foresta (Roma).

3.3 Prima parte della ricerca

Il lavoro svolto nella prima parte della ricerca ha riguardato fondamentalmente la messa a punto del sistema pianta-mesocosmo. In particolare sono stati affrontati e risolti alcuni problemi legati alla particolare condizione di crescita che si determina nel mesocosmo, in ordine a parametri ambientali quali temperatura, irradianza, contenuto di nutrienti, tenore di ossigeno nella soluzione circolante e piovosità.

Nel mese di aprile 2010 le talee radicate di eucalipto sono state trapiantate all'interno del sistema mesocosmo. Sono stati utilizzati 5 mesocosmi. All'interno di 4 mesocosmi sono state impiantate due talee ciascuno mentre un mesocosmo è stato lasciato senza piante ed utilizzato come riferimento per il consumo di acqua da parte del sistema.

A partire dal mese di maggio 2010 è stato effettuato il monitoraggio del sistema pianta-mesocosmo al fine di valutare l'accrescimento degli eucalipti, attraverso le seguenti operazioni:

Ottimizzazione dei parametri di crescita

Per ciò che concerne temperatura e irradianza, nel periodo estivo si è evidenziato un eccessivo carico radiativo, con conseguente stato di sofferenza delle giovani talee. Al fine di superare il problema sono stati studiati sistemi per la riduzione dell'energia radiante mediante teli ombreggianti posizionati secondo differenti angolazioni.

Poiché è stata riscontrata una sofferenza da parte delle talee di eucalipto, si è ipotizzato che potesse essere dovuta ad una mancanza di ossigeno all'interno del sistema mesocosmo. L'inserimento di due pompe per arricchire l'acqua di ossigeno nei bidoncini collegati con i mesocosmi ha permesso di superare questo problema.

Analisi della soluzione acquosa

I risultati delle analisi della soluzione acquosa circolante all'interno dei mesocosmi, effettuate nel periodo di crescita delle piante, in corrispondenza dell'inizio del trattamento con cadmio e al termine del trattamento sono riportati in Tabella 7. Il campionamento è stato effettuato secondo la procedura APAT CNR-IRSA 1030 Man. 29/2003. Le analisi sono state realizzate in laboratorio riconosciuto dal Ministero della salute, l'incertezza è stata calcolata con un livello di probabilità del 95% e con un fattore di copertura pari a 2.

Messa a punto dei trattamenti e dei dosaggi della soluzione nutritiva

Per quanto riguarda l'apporto di nutrienti, mediante analisi cinetiche delle asportazioni di elementi nutritivi dalle soluzioni circolanti da parte delle piante, è stato definito uno schema di concimazione liquida. Lo schema ha previsto una somministrazione settimanale di un formulato commerciale N-P-K 20-20-20 (Nutrileaf Miller) con microelementi per fertirrigazione, con un apporto a dosaggio incrementato lungo la stagione vegetativa, seguendo le richieste nutritive delle piante in funzione

delle varie fasi di accrescimento. Tale piano di concimazione ha fornito alle piante un adeguato apporto di macro e microelementi, evitando carenze nutritive e le conseguenti fisiopatie.

Tabella 7. Analisi della soluzione acquosa circolante all'interno dei mesocosmi.

	Crescita delle piante	Inizio del trattamento con Cd	Fine del trattamento con Cd		
Parametro	Valore	Valore	Valore	U.M.	Metodo
Concentrazione ioni idrogeno	7	7,1	7,1	PH	APAT CNR-IRSA 2060 Man. 29/2003
Conduttività	1518	1629	1377	$\mu\text{S}/\text{cm}$ (20°C)	APAT CNR-IRSA 2030 Man. 29/2003
Ossidabilità	0,2	0,2	0,2	mgO_2/l	Met. Interno Man. C 36 rev. 0
Alcalinità totale	492	436	480	mgCaCO_3/l	APAT CNR-IRSA 2010B Man. 29/2003
Durezza totale	55 (± 4)	38 (± 3)	41 (± 3)	°F	APAT CNR-IRSA 2040A Man. 29/2003
Calcio	168 (± 3)	117 (± 2)	124 (± 2)	mg/l	APAT CNR-IRSA 3010A+3020 Man. 29/2003
Magnesio	30 (± 2)	21 (± 2)	23 (± 2)	mg/l	APAT CNR-IRSA 3010A+3020 Man. 29/2003
Ammonio (NH_4)	<0,30	<0,30	<0,30	mg/l	APAT CNR-IRSA 4030B Man. 29/2003
Nitrito (NO_2)	<0,10	<0,10	<0,10	mg/l	APAT CNR-IRSA 4020 Man. 29/2003
Nitrato (NO_3)	8 (± 1)	11 (± 1)	7 (± 1)	mg/l	APAT CNR-IRSA 4020 Man. 29/2003
Cloruri	83 (± 4)	79 (± 4)	79 (± 4)	mg/l	APAT CNR-IRSA 4020 Man. 29/2003
Fosforo totale (P_2O_5)	<200	<200	<200	$\mu\text{g}/\text{l}$	APAT CNR-IRSA 4020 Man. 29/2003
Ferro totale	13	85 (± 2)	82 (± 1)	$\mu\text{g}/\text{l}$	APAT CNR-IRSA 3010A+3020 Man. 29/2003
Zinco	334 (± 8)	199 (± 5)	1182 (± 28)	$\mu\text{g}/\text{l}$	APAT CNR-IRSA 3010A+3020 Man. 29/2003

Misura della capacità evapotraspirativa del sistema mesocosmo

Il monitoraggio dell'oscillazione dei livelli di falda all'interno dei mesocosmi e l'analisi dei dati di evapotraspirazione sono stati effettuati con cadenza settimanale grazie alla presenza di contatori del consumo idrico associati ad ogni mesocosmo. Il monitoraggio del sistema pianta-mesocosmo è stato inoltre condotto mediante confronto con un mesocosmo privo di piante utilizzato come controllo. Il contatore utilizzato per il calcolo dell'acqua consumata è un contatore a turbina con la portata nominale pari a $1,5 \text{ m}^3/\text{h}$, pressione nominale 16 bar. Le prime cinque cifre in nero indicano unità in

m³ e le tre restanti in rosso corrispondono a sottomultipli del m³. Pertanto il contatore permette di effettuare una lettura minima pari a 0,05 l.

Valutazione della crescita delle piante

Le piante di eucalipto trapiantate all'interno dei mesocosmi non hanno sopportato il forte calo della temperatura avvenuto tra il mese di dicembre 2010 e gennaio 2011, con temperature minime notturne di -8 °C. Di conseguenza nel mese di marzo 2011 è stata asportata tutta la parte aerea delle piante, con un taglio al colletto, in maniera da valutare una ripresa vegetativa avventizia. Poiché non si è verificata un'adeguata ripresa vegetativa delle piante, nel mese di giugno gli eucalipti sono stati rimossi dai mesocosmi e nuove talee sono state impiantate nel sistema.

Relativamente agli eucalipti rimossi, dopo aver rilevato i dati morfometrici, le piante sono state pesate e separate in fusto, foglie e radici. Il materiale così ottenuto è stato posto ad essiccare in stufa a 85°C finché non è stato raggiunto un peso costante. E' stata quindi rilevata la biomassa secca delle radici, fusto e foglie.

3.4 Seconda parte della ricerca

Nel mese di giugno 2011 nuove talee di eucalipto sono state trapiantate all'interno dei mesocosmi.

Anche per la seconda parte della ricerca alle talee è stato adottato lo stesso schema di concimazione con la soluzione nutritiva con cadenza settimanale ad incrementi e sono stati monitorati i consumi idrici.

Nel mese di settembre, per la sperimentazione relativa alla capacità di fitodepurazione di acque contaminate da cadmio da parte di piante di eucalipto, sono stati allestiti cinque mesocosmi suddivisi in tre gruppi:

- 1) Un mesocosmo privo di piante è stato allestito come controllo per l'evapotraspirazione del sistema (mesocosmo 5: bianco);
- 2) due mesocosmi (mesocosmi uno e tre: trattati) sono stati allestiti per la prova di fitodepurazione di acque contaminate mediante trattamento di due piante per mesocosmo con una soluzione circolante finale di CdSO₄ 50 µM ottenuta mediante aggiunte in più riprese nell'arco di 24 ore di soluzioni concentrate di CdSO₄;

3) due mesocosmi (mesocosmi 2 e 4: controlli) sono stati allestiti per il controllo della crescita delle piante mediante trattamento di due piante per mesocosmo con la soluzione circolante priva di aggiunta di cadmio (Figura 15).



Figura 15. Schema dei mesocosmi utilizzato per la sperimentazione

Durante il trattamento sono stati effettuati il prelievo (giornaliero e poi settimanale) di campioni di acque e le analisi chimiche durante il ciclo vegetativo per monitorare il contenuto di cadmio.

Inoltre a partire dal mese di settembre, si è dato corso al monitoraggio del contenuto di clorofilla totale nelle foglie attraverso misurazioni non distruttive con misuratore portatile (Chlorophyll Meter Spad-502 Minolta).

Sono state effettuate due misurazioni per ogni foglia: all'apice e alla base, su foglie completamente espanse di alcuni rami rappresentativi per ogni pianta (dal 14.09.2011 al 07.11.2011).

Al termine del periodo di trattamento, durato 65 giorni, nel mese di novembre le piante di eucalipto sono state rimosse dai mesocosmi, avendo cura di prelevare l'intera massa radicale. Dopo aver rilevato i dati morfometrici le piante sono state pesate e separate in fusto, foglie e radici. Il materiale così ottenuto è stato posto ad essiccare in stufa a 85 °C finché non è stato raggiunto un peso costante. E' stata quindi rilevata la biomassa secca delle radici, fusto e foglie.

Al momento della raccolta, sono stati effettuati:

- Misure di clorofilla sulle foglie.
 - o Il contenuto di clorofilla nella pianta viene determinato per estrazione in una soluzione acquosa di acetone e successivo dosaggio mediante spettrofotometro UV-VIS ad opportune lunghezze d'onda. Si pesano 0,5 g di foglia fresca e si omogeneizza con una soluzione di acetone all'80%. L'estratto di clorofilla viene analizzato allo spettrofotometro, contro un bianco costituito da acetone all'80%, alle lunghezze d'onda 663 nm e 645 nm.
- Preparazione dei campioni di vegetali (foglie, fusti e radici) per le analisi chimiche.

- Determinazioni chimiche sui vegetali: contenuto di nutrienti e metalli con l'uso di spettrometri ICP-AES
 - o L'azoto totale è stato determinato con il metodo per distillazione secondo Kjeldahl.
 - o I metalli e i nutrienti totali (escluso l'azoto) nei vegetali sono stati analizzati, dopo digestione con acido nitrico per 20 ore a 140 °C, mediante spettroscopia di emissione al plasma ICP-AES (Dual View, Thermo Jarrel).
- Determinazione chimiche sulle acque:
 - o Le acque sono state analizzate mediante spettroscopia di emissione al plasma ICP-OES (Dual View, Thermo Jarrel).
- Prelievo e analisi dei campioni di agriperlite.

Analisi del contenuto di cadmio

I campioni essiccati di fusto, foglie, radici e perlite sono stati ridotti in polvere ed inceneriti in muffola a 550 °C per 6 ore per eliminare la parte organica. Le ceneri sono state riprese in HNO₃ 20% e diluite successivamente con acqua deionizzata fino ad un rapporto 1:5 (peso/volume). I campioni di soluzione circolante sono stati acidificati con HNO₃ fino ad una concentrazione del 4%. Le analisi della concentrazione di cadmio sono state eseguite mediante spettrofotometro ad assorbimento atomico (Modello Perkin-Elmer 2380). Sono poi stati calcolati i seguenti fattori:

Bioconcentration factor (o Fattore di bioconcentrazione)

Il bioconcentration factor (BCF) è un parametro che descrive l'assorbimento del metallo pesante da parte della pianta e fornisce un indice della capacità della pianta di accumulare un determinato metallo rispetto alla sua concentrazione nel substrato (Zayed et al., 1998). Esso è calcolato con la seguente formula :

$$BCF = [\text{concentrazione del metallo nell'organo della pianta (mg kg}^{-1}\text{)}]/[\text{concentrazione del metallo presente nel substrato (mg kg}^{-1}\text{)}]$$

Translocation factor (o Fattore di traslocazione)

Il translocation (Tf) descrive la capacità potenziale della pianta di traslocare gli elementi metallici nella parte aerea ed è dato da (Ghosh e Singh, 2005):

$$Tf = [\text{concentrazione del metallo nella parte aerea (mg kg}^{-1}\text{)}]/[\text{concentrazione del metallo nelle radici (mg kg}^{-1}\text{)}]$$

Metal uptake ratio (o Rapporto di assorbimento del metallo)

Il metal uptake ratio è un parametro che descrive la capacità dei vari organi della pianta di bioaccumulare il metallo. Esso è calcolato con la seguente formula :

$$\text{MUR} = [\text{contenuto del metallo nell'organo della pianta (mg)}]/[\text{contenuto del metallo presente nel substrato (mg)}]$$

Metal translocation index (o Indice di traslocazione del metallo)

Il metal translocation index permette di mettere in evidenza la reale quantità di metallo assorbita dalla pianta che viene trasferita dalla radice alla parte aerea. Esso è calcolato con la seguente formula :

$$\text{MTI} = [\text{contenuto del metallo nella parte aerea (mg)}]/[\text{contenuto del metallo nelle radici (mg)}]$$

Calcolo dell'area fogliare

Sono state prelevate 8 foglie dal sacco M4B e sono state pesate e fotografate; la foto è stata analizzata con il programma ImageJ per calcolare l'area fogliare. Le foglie sono state messe in stufa a 70° C per 24h e poi ripesate. E' stato calcolato il rapporto $r = \text{Area fogliare}/\text{peso secco}$.

Analisi statistica

I dati ottenuti nelle varie analisi sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e le medie comparate con il test t di Student con un livello di significatività $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$.

Parametri ambientali

I dati riportati sono stati scaricati dal sito web <http://www.cracma.it/homePage.htm> dove l'Unità di Ricerca per la Climatologia e la Meteorologia Applicate all'Agricoltura (CMA) del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA) ex Ufficio Centrale di Ecologia Agraria (UCEA) del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali pubblica la Banca Dati Agrometeorologica Nazionale. Nella tabella 8 si riporta la configurazione della stazione di Monterotondo che è stata utilizzata come riferimento:

Tabella 8. Configurazione della stazione metereologica di Monterotondo (Unità di Ricerca per la Climatologia e la Meteorologia Applicate all'Agricoltura)

Sensori installati	Intervallo di acquisizione	Tipo di misura	Massimi e minimi	Unità di misura
Temperatura aria a 2 m	60 min.	Istantanea	Si	°C
Temperatura aria a 5 cm	60 min.	Istantanea	Si	°C
Temperatura suolo a -10 cm	180 min.	Istantanea	Si	°C
Temperatura suolo a -50 cm	180 min.	Istantanea	Si	°C
Precipitazione a 2 m	10 min.	Totale	No	mm
Umidità relativa a 2 m	60 min.	Istantanea	Si	%
Velocità del vento a 10 m	10 min.	Media	No	m/s
Direzione del vento a 10 m	10 min.	Istantanea	No	gradi
Pressione atmosferica	60 min.	Istantanea	Si	hPa
Radiazione globale	60 min.	Totale	No	KJ/m ²
Eliofania	60 min.	Totale	No	ore
Bagnatura fogliare	60 min.	Totale	No	ore

I dati riportati nelle Figure 16, 17 e 18 a)-f), sono relativi alla prima parte, alla seconda parte della ricerca e al periodo di trattamento ed in particolare sono stati analizzati i seguenti parametri:

Precipitazione

Per precipitazione si intende l'insieme delle particelle d'acqua, liquide e/o solide, che cadono o vengono spinte verso il basso dalle correnti discendenti (venti discendenti) delle nubi fino a raggiungere il suolo. La quantità di precipitazione è espressa in millimetri. L'altezza di un millimetro di pioggia corrisponde ad un litro d'acqua versato su una superficie piana di un metro quadrato. Nel grafico sono riportati i valori di precipitazione giornaliera.

Pressione atmosferica

La pressione è il peso che una colonna d'aria esercita sull'unità di superficie. Tale peso è funzione della densità dell'aria, la quale a sua volta è funzione della temperatura. La pressione si esprime in hPa (ettoPascal) che rappresenta oggi l'unità standard internazionale (1 mbar = 1 hPa). Nel grafico sono riportati i valori di pressione atmosferica media giornaliera.

Radiazione solare a suolo

La radiazione solare al suolo globale è la radiazione a onde corte misurata a terra su un piano orizzontale data dalla somma dei contributi di radiazione diretta, diffusa e riflessa. E' il flusso di energia totale, sotto forma di onde elettromagnetiche, che raggiunge la superficie terrestre in un intervallo di tempo misurata in kJ/m^2 . Nel grafico sono riportati i valori di radiazione solare giornalieri.

Umidità relativa

L'umidità relativa dell'aria, è definita come il rapporto espresso in percentuale tra la quantità di vapore contenuto nell'aria e la quantità massima che la stessa aria può contenere nelle medesime condizioni di temperatura e pressione (cioè a saturazione). L'umidità relativa è espressa in valore percentuale (%) nel grafico sono riportati i valori di umidità relativa dell'aria diurni e notturni.

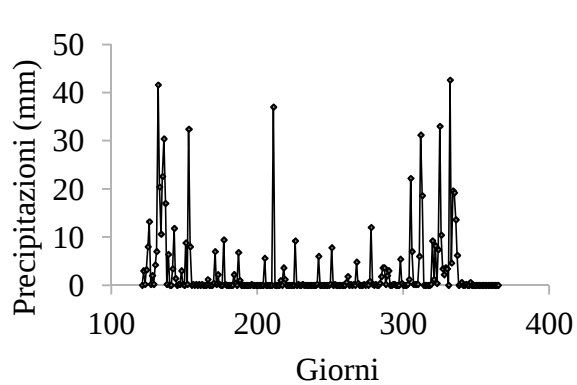
Temperatura dell'aria

La temperatura dell'aria è una grandezza fisica variabile che rappresenta lo stato termico dell'atmosfera esistente in un punto e in un determinato momento. Essa esprime il livello energetico dell'aria, cioè l'energia cinetica media associata alle molecole dell'aria per effetto del riscaldamento indotto dalla radiazione solare. Per questa peculiarità, la temperatura rappresenta uno degli elementi meteorologici più importanti, poiché la sua distribuzione spazio-temporale è strettamente connessa all'energia solare ricevuta dalla superficie terrestre e dall'atmosfera.

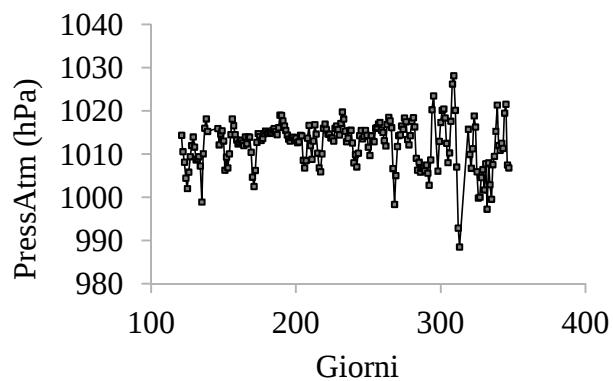
La temperatura è espressa in $^{\circ}\text{C}$. Nel grafico è riportata la media giornaliera tra valori minimi e massimi giornalieri misurati nelle 24 ore.

Vento

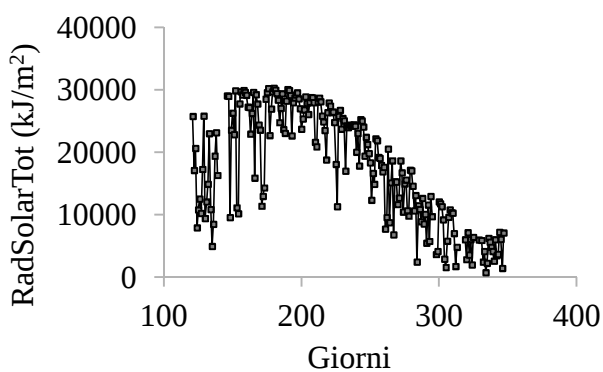
Il vento è ogni sensibile movimento dell'aria, si tratta di una grandezza vettoriale tridimensionale, caratterizzata da variazioni aleatorie a piccola scala che intervengono nello spazio e nel tempo e che si sovrappongono al moto principale d'insieme determinato dalla differenza di pressione preesistente fra zone contigue: maggiore è la differenza di pressione fra queste, più veloce sarà lo spostamento delle masse d'aria. Il "vento sfilato", indica la distanza percorsa dal vento in un intervallo di tempo sufficientemente lungo (giorno, decade, ...) e si esprime in chilometri. Nel grafico vengono riportati i valori di vento sfilato a 10 m giornalieri.



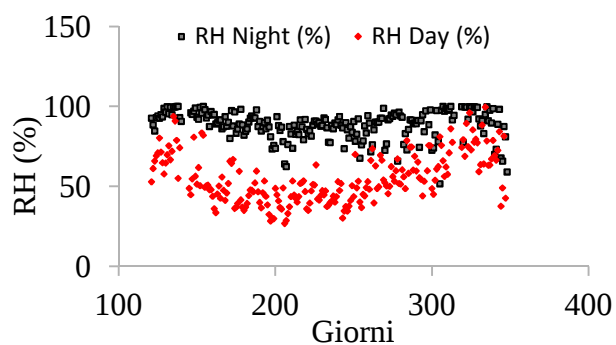
a)



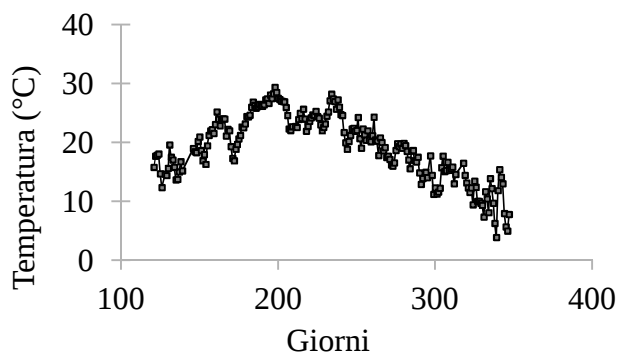
b)



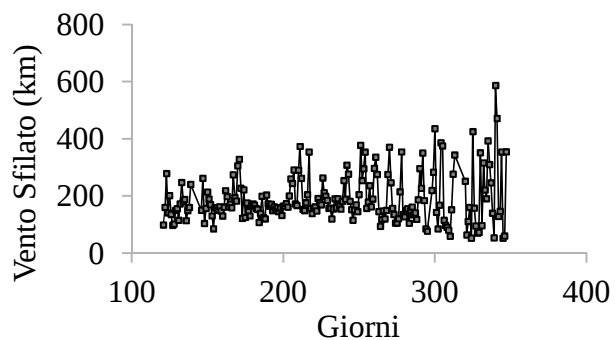
c)



d)



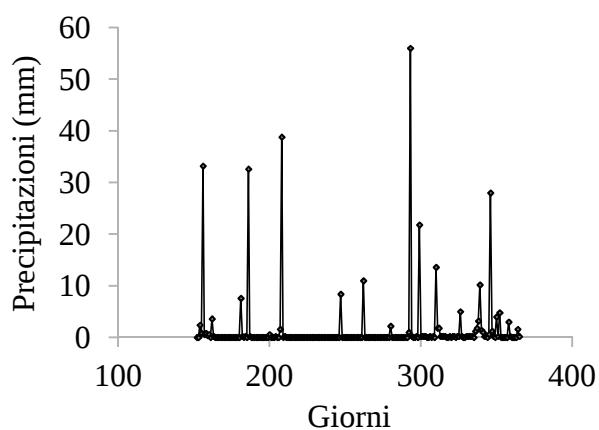
e)



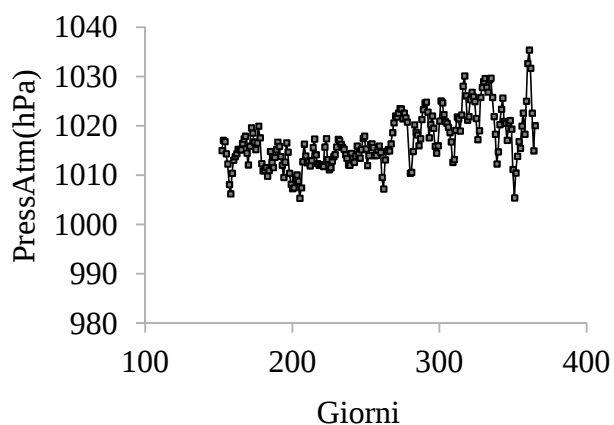
f)

Figura 16: Valori relativi al periodo 01.05.2010-31.12.2010

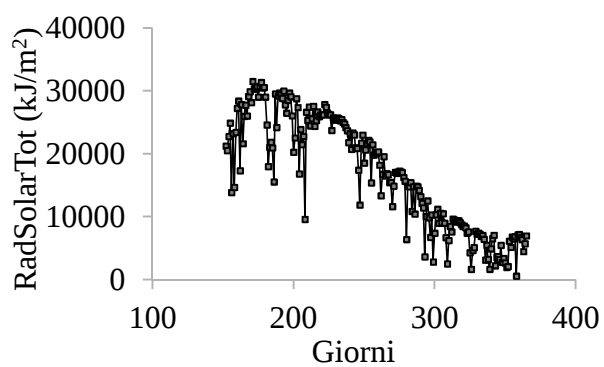
- a) Precipitazione giornaliera
- b) Pressione atmosferica
- c) Radiazione solare
- d) RH
- e) Temperatura
- f) Vento



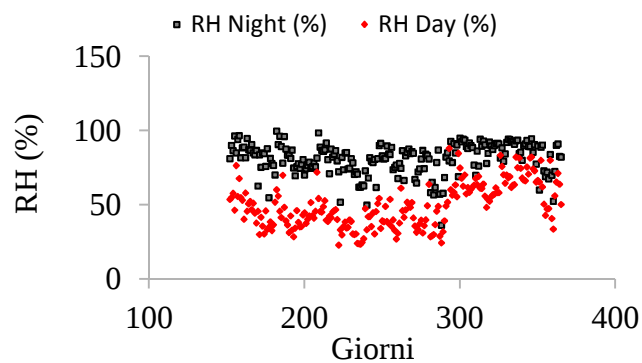
a)



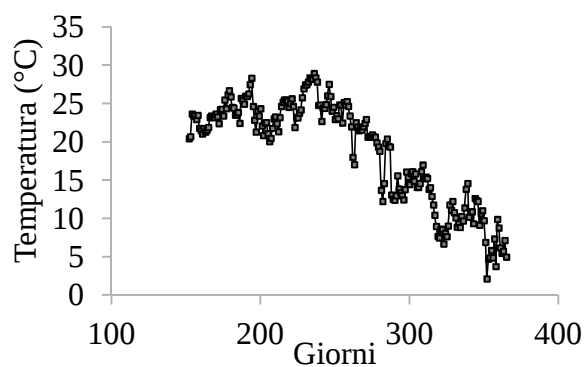
b)



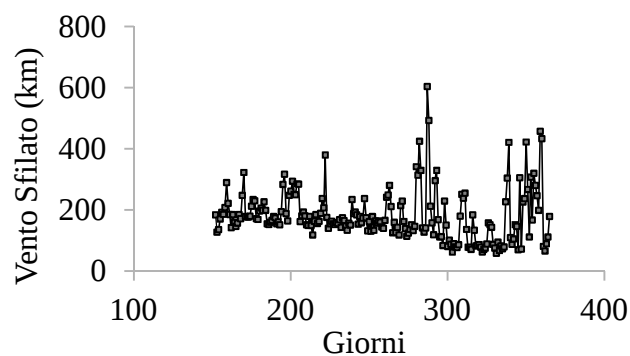
c)



d)



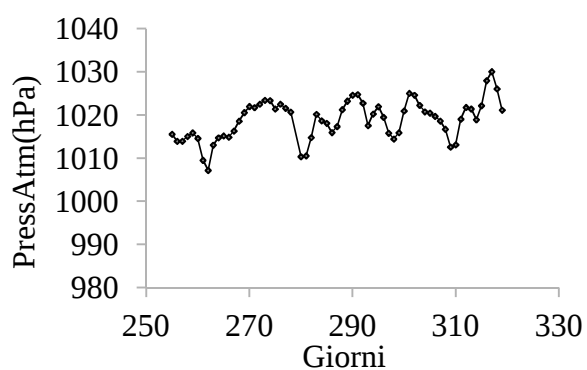
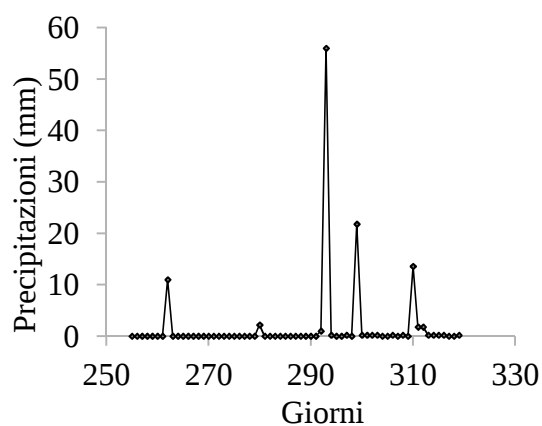
e)



f)

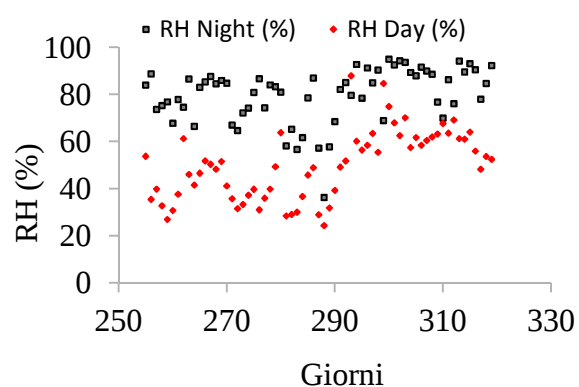
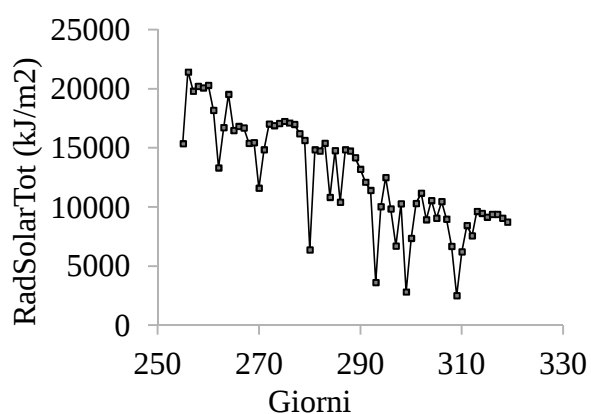
Figura 17: Valori relativi al periodo 01.06.2011-31.12.2011

- a) Precipitazione giornaliera
- b) Pressione atmosferica
- c) Radiazione solare
- d) RH
- e) Temperatura
- f) Vento



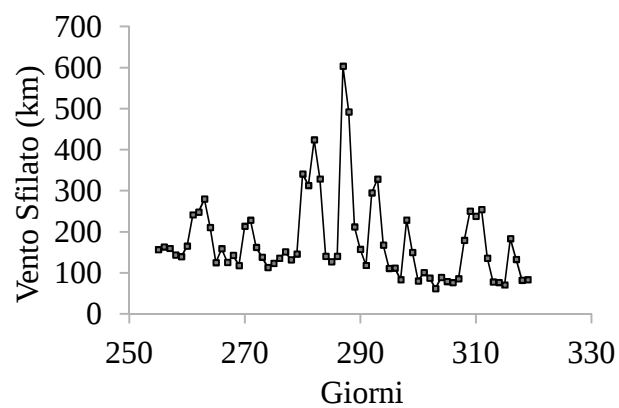
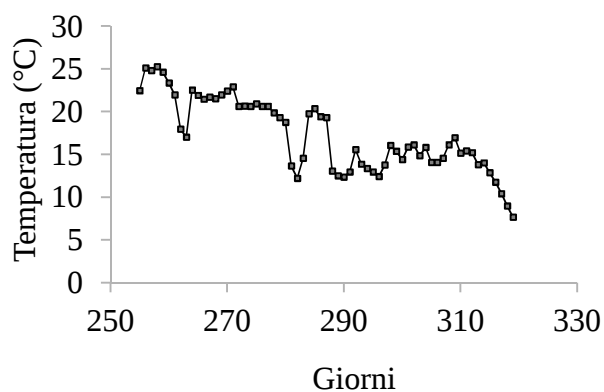
a)

b)



c)

d)



e)

f)

Figura 18: Valori relativi al periodo di trattamento 12.09.2011-15.11.2011

- a) Precipitazione giornaliera
- b) Pressione atmosferica
- c) Radiazione solare
- d) RH
- e) Temperatura
- f) Vento

4. RISULTATI RELATIVI ALLA PRIMA PARTE DELLA RICERCA

4.1 Unità Mesocosmo

L'impianto costituito da 4 mesocosmi ha prodotto, nel suo complesso, un totale di 18,45 kg di biomassa consumando 5060 litri di acqua in 202 giorni con un'efficienza dell'uso dell'acqua (WUE) di 0,00365 kg/L. Il consumo di acqua da parte della pianta nel mesocosmo è misurato con una accuratezza maggiore rispetto alle misure in campo in quanto solo l'acqua traspirata dalla pianta è misurata e non anche quella dal terreno. Nella biomassa totale si è tenuto conto anche della biomassa dell'apparato radicale che normalmente in campo non viene considerata, osservando quindi la crescita della pianta nel suo complesso.

Criticità del sistema si sono avute con gelate improvvise che, a differenza di quanto avviene nel terreno, hanno lasciato esposta la pianta, e in particolar modo le radici, alle basse temperature, causando la morte delle piante stesse. Di conseguenza nell'eventualità di far crescere nel mesocosmo piante sempreverdi per tutto il corso dell'anno è utile considerare l'implementazione di un miglior isolamento termico nel periodo invernale.

4.2 Consumi idrici

Il monitoraggio dell'oscillazione dei livelli di falda all'interno dei mesocosmi e l'analisi dei dati di evapotraspirazione sono stati effettuati con cadenza settimanale grazie alla presenza di contatori del consumo idrico giornaliero associati ad ogni mesocosmo. Il monitoraggio del sistema pianta-mesocosmo è stato inoltre condotto mediante confronto con un mesocosmo privo di piante utilizzato come controllo (BIANCO). In figura 19 si riportano i dati raccolti a partire da maggio 2010 fino al mese di dicembre 2010.

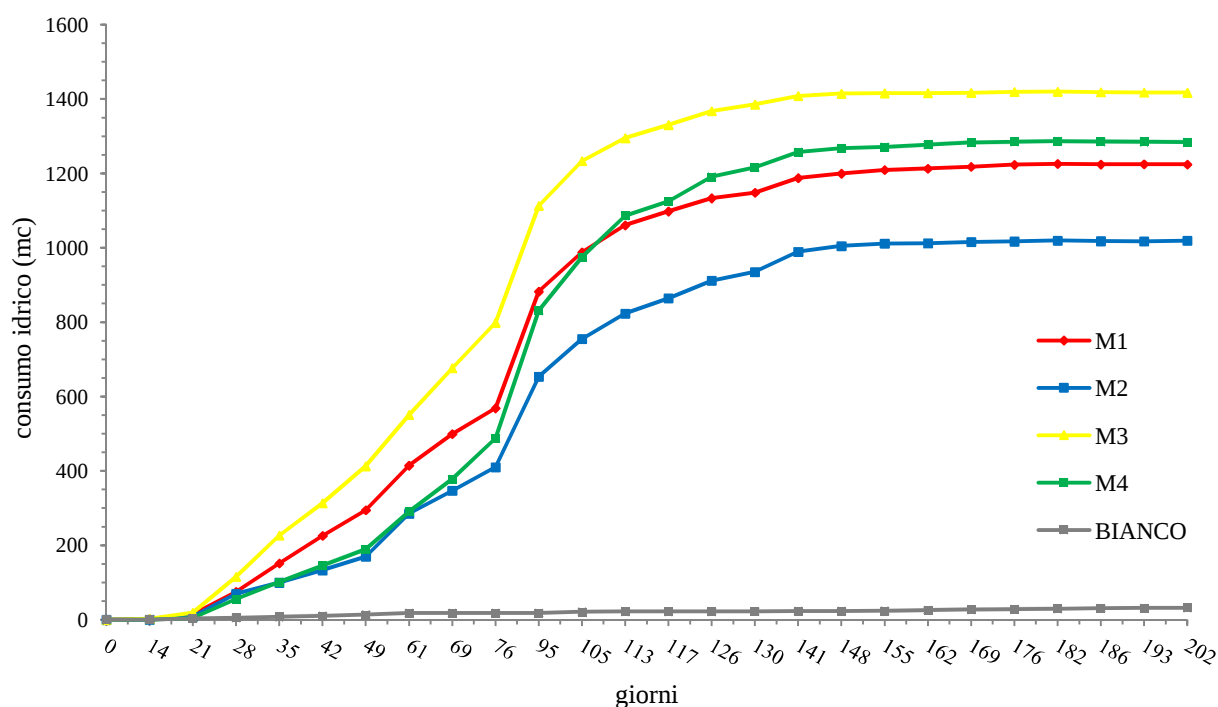


Figura 19. Curve relative al consumo idrico delle piante di eucalipto presenti all'interno dei mesocosmi (M1, M2, M3 e M4) e del mesocosmo di controllo (BIANCO) - maggio 2010 - dicembre 2010.

Possiamo vedere, come atteso, che la maggior parte del consumo idrico è avvenuta nella stagione estiva, per diminuire nella stagione autunnale e praticamente arrestarsi nella parte finale dell'anno quando ormai l'irraggiamento e le temperature sono basse. Mediamente il consumo di acqua in tutto il periodo è stato di 1268 ± 165 L per mesocosmo con tassi di evapotraspirazione da fine giugno a fine luglio di circa 10 L/giorno sempre per mesocosmo mentre nel mese di agosto e in particolare nella seconda metà di agosto si è avuto un picco di 15 L/giorno per poi diminuire gradualmente da metà settembre a fine ottobre fino a circa 1 L/giorno. L'eucalipto è una pianta sempreverde ma dal consumo di acqua nella stagione fredda possiamo affermare che pur non perdendo le foglie l'attività evapotraspirativa si arresta.

4.3 Crescita delle piante

L'adattamento dei cloni di eucalipto al sistema mesocosmo è stato determinato confrontando il peso fresco e il peso secco complessivo e quello delle singole componenti radici, fusti, rami e foglie, con quello di ibridi cresciuti nel suolo in ambiente naturale. Inoltre è stato misurato il diametro dei fusti e l'altezza delle piante di eucalipto per ricavare equazioni allometriche che permettessero di stimare

la biomassa prodotta nel mesocosmo in funzione di parametri facilmente misurabili senza dover applicare campionamenti distruttivi.

La valutazione della biomassa fresca delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi per 7 mesi è stata effettuata in seguito al taglio delle piante. Gli eucalipti sono stati suddivisi nei vari organi: radici, fusti, rami e foglie e questi sono stati pesati separatamente. I dati ottenuti sono stati analizzati, ed è stato calcolato il peso medio dei vari organi per ogni mesocosmo e per ogni dato sono stati calcolati la deviazione standard e l'errore standard.

Il peso fresco dei vari organi della pianta è riportato in figura 20. Ogni istogramma rappresenta il peso fresco medio delle radici, del fusto, dei rami e delle foglie e il peso fresco medio totale ($\pm$ E.S., $n=2$) degli eucalipti, ricavati dalla media delle 2 piante presenti all'interno di ogni mesocosmo.

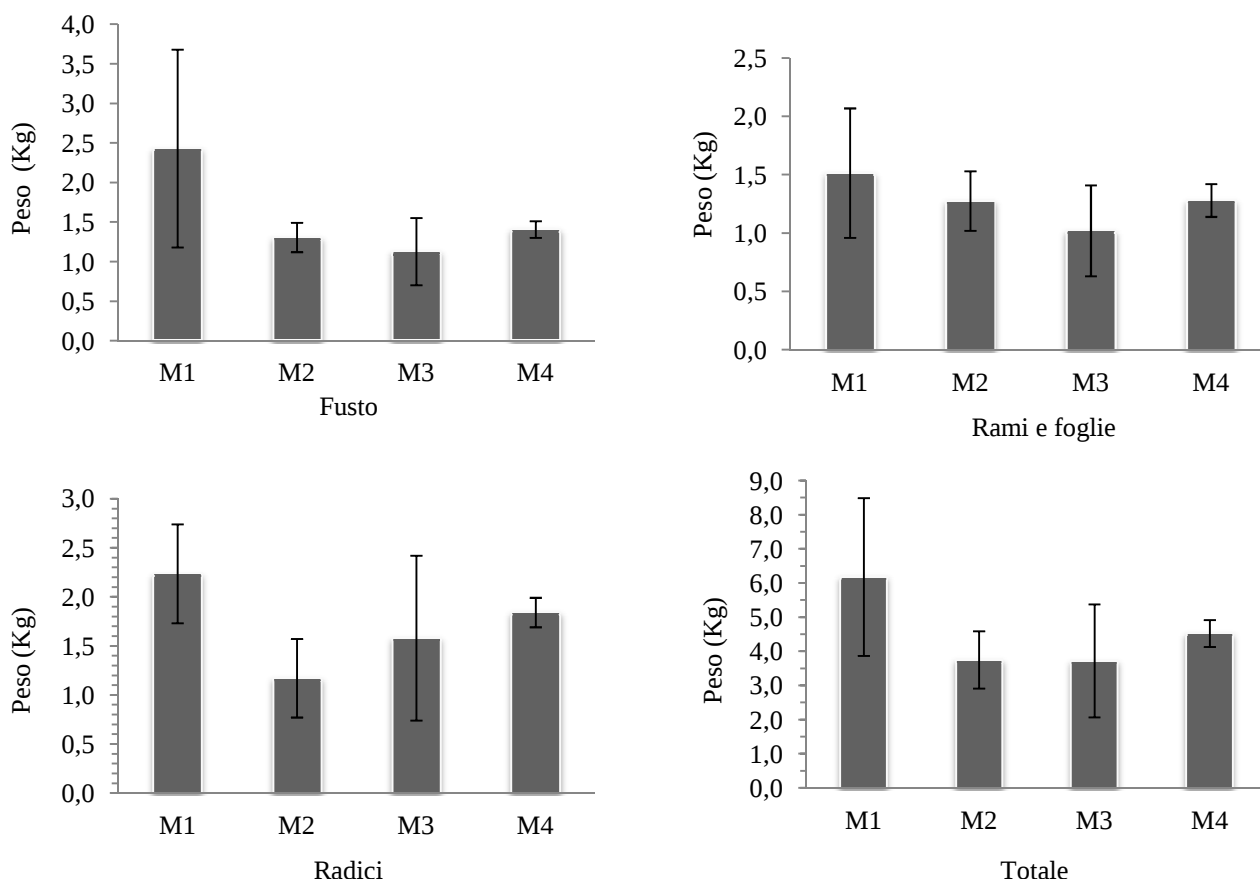


Figura 20. Peso fresco di fusti, rami e foglie e radici e peso fresco medio totale delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi. I valori riportati sono stati ottenuti al termine dei 7 mesi di crescita e rappresentano la media $\pm$ E.S., ($n=2$).

La valutazione della biomassa secca delle piante di eucalipto è stata effettuata dopo che le varie parti sono state essiccate in stufa a 80 °C dai 7 ai 15 giorni fino al raggiungimento del peso costante. I dati ottenuti sono stati analizzati, ed è stato calcolato il peso medio delle singole parti per ogni mesocosmo con deviazione standard ed errore standard. In figura 21 sono riportati i pesi secchi dei vari organi.

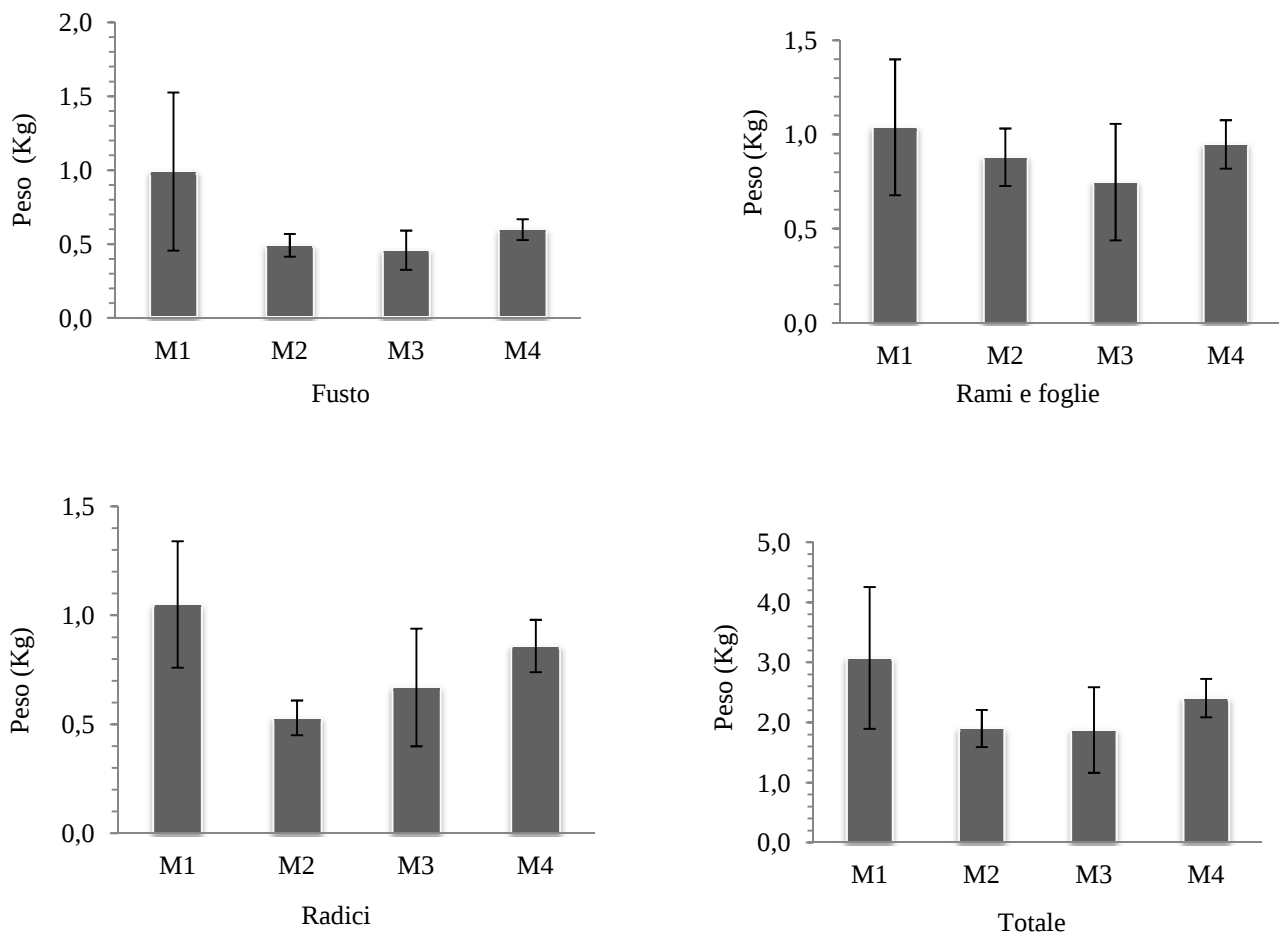


Figura 21. Peso secco di fusti, rami e foglie e radici e peso secco medio totale delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi. I valori riportati sono stati ottenuti al termine dei 7 mesi di crescita e rappresentano la media $\pm$ E.S., (n=2).

Possiamo osservare come il contenuto di acqua sia circa la metà del peso complessivo fresco mediamente in tutte le piante con un *moisture content* complessivo per la parte epigea (Jacquemound and Ustin, 2003) del $80\% \pm 10$. Analizzando le varie componenti troviamo un contenuto d'acqua nel fusto del 59%, nei rami e foglie del 28% e nelle radici del 53%. Ibridi di eucalipto cresciuti nel suolo in ambito naturale (sono piante che prediligono zone con acqua abbondante) hanno un *moisture content* del $94\% \pm 10$ (McComb et al., 2004) che corrisponde ad un

contenuto d'acqua intorno al 50%, possiamo quindi vedere che c'è poca differenza nel contenuto d'acqua tra piante cresciute nel terreno e piante cresciute nel mesocosmo, inoltre per quanto riguarda la densità basale del fusto troviamo un valore di $0,504 \pm 0,029$ g/cc in linea con quello dell'ibrido cresciuto nel terreno di $0,507 \pm 0,028$ g/cc (McComb et al., 2004) indicando che le piante sono riuscite ad adattarsi dal punto di vista della crescita strutturale al sistema mesocosmo.

Dai dati riportati precedentemente è possibile osservare come a fine stagione tutti i cloni hanno raggiunto buone dimensioni (H: 2-3 m; D: 4-6 cm) ed un robusto apparato radicale che rappresenta circa un terzo della biomassa complessiva, dimostrando così che con questo particolare sistema a coltura semi-idroponica è possibile ottenere piante con caratteristiche morfologiche simili a quelle cresciute in campo.

Il diametro alla base finale (mm) e l'altezza (cm) delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi sono rappresentati in figura 22, in ascissa sono riportati i quattro mesocosmi. A sinistra ogni istogramma rappresenta il diametro alla base ($\pm$ E.S., $n=2$) e a destra ogni istogramma rappresenta l'altezza ($\pm$ E.S., $n=2$) degli eucalipti ricavati dalla media delle 2 piante presenti all'interno di ogni mesocosmo.

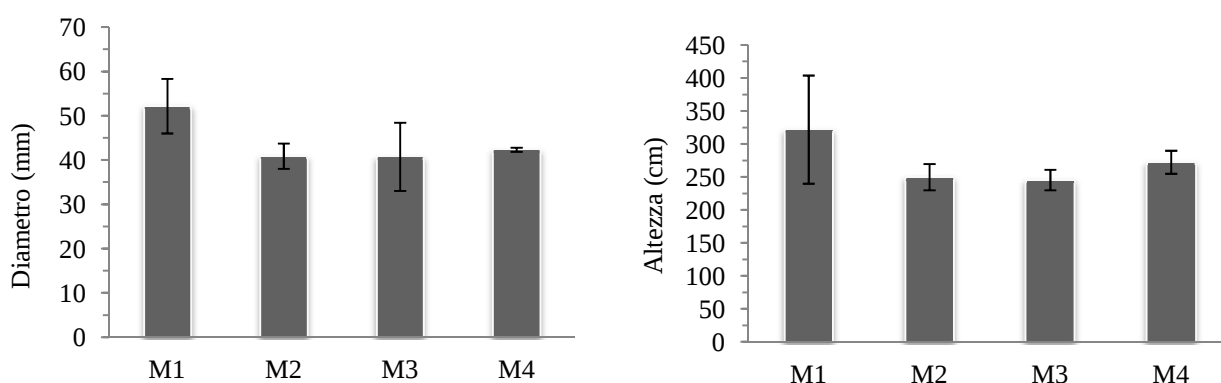


Figura 22. Diametro e altezza delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi. I valori riportati sono stati ottenuti al termine dei 7 mesi di crescita e rappresentano la media $\pm$ E.S., ($n=2$).

4.4 Relazione diametro-biomassa

E' stata individuata un'equazione allometrica relativa al rapporto diametro/biomassa per le piante cresciute all'interno dei mesocosmi per 7 mesi (maggio-dicembre 2010).

La relazione allometrica ha permesso di trovare un rapporto tra la fitomassa totale (compresi quindi rami e foglie, ma non le radici) e il diametro.

Il modello di regressione utilizzato è (Niklas, 1994):

$$M=aD^b$$

dove M = massa totale (kg sostanza secca) e D = diametro alla base (cm) e i parametri a e b, sono detti rispettivamente coefficiente di scala ed esponente di scala.

Il rapporto diametro/biomassa delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi per 7 mesi è rappresentato in figura 23, in ascissa sono riportati i diametri degli eucalipti presenti all'interno dei 4 mesocosmi, mentre in ordinata sono riportati i valori di biomassa (kg) corrispondenti ai diametri.

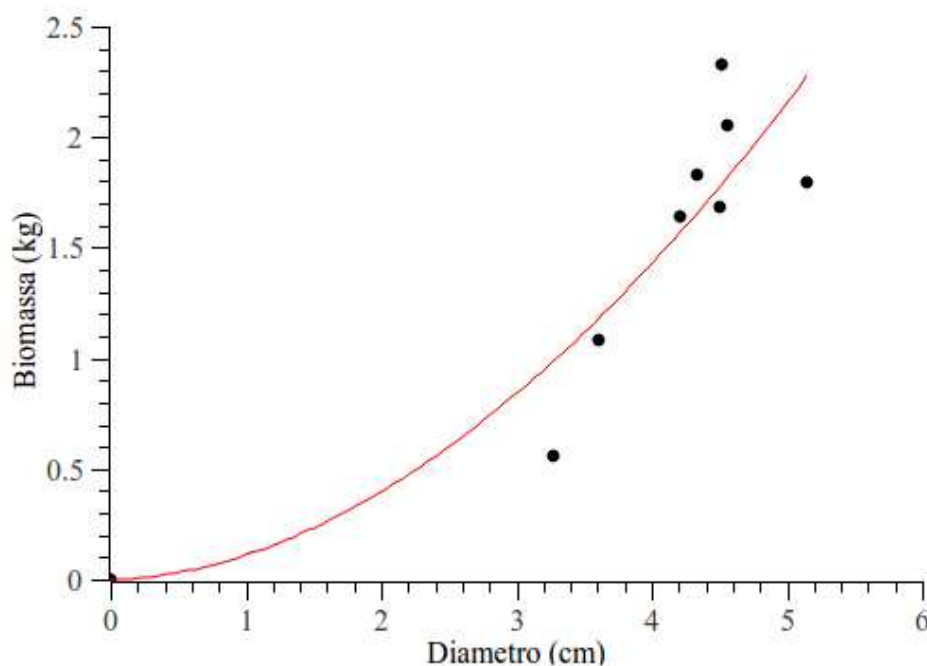


Figura 23. Equazione allometrica delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi: $B = a \cdot D^b$ $a = 0,110 \pm 0,108$ $b = 1,846 \pm 0,650$ $R^2 = 0,818$. I valori riportati sono stati ottenuti al termine dei 7 mesi di crescita

5. RISULTATI RELATIVI ALLA SECONDA PARTE DELLA RICERCA

5.1 Consumi idrici

Il monitoraggio dell'oscillazione dei livelli di falda all'interno dei mesocosmi e l'analisi dei dati di evapotraspirazione sono stati effettuati con cadenza settimanale grazie alla presenza di contatori del consumo idrico giornaliero associati ad ogni mesocosmo. Il monitoraggio del sistema pianta-mesocosmo è stato inoltre condotto mediante confronto con un mesocosmo privo di piante utilizzato come controllo (BIANCO). In figura 24 si riportano i consumi idrici relativi al periodo settembre-novembre 2011.

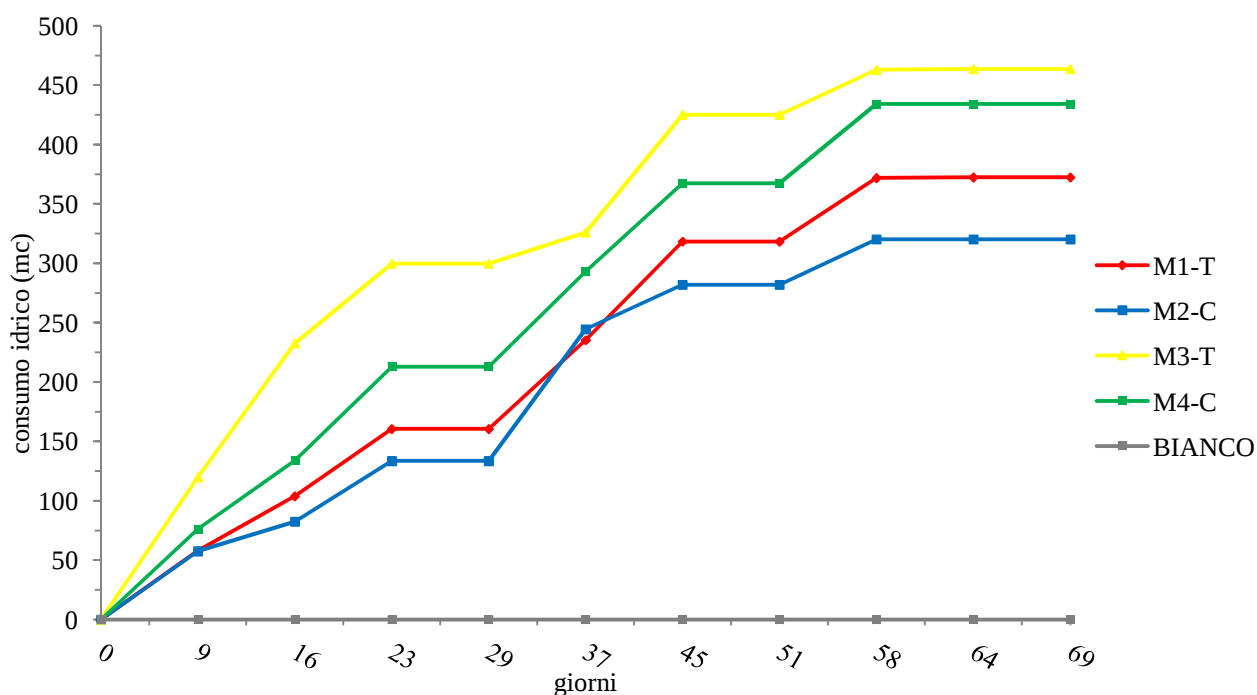


Figura 24. Curve relative al consumo idrico delle piante di eucalipto presenti all'interno dei mesocosmi (M1-T, M2-C, M3-T e M4-C) e del mesocosmo di controllo (BIANCO) - settembre-novembre 2011.

I dati riportati nel grafico precedente sono stati analizzati al fine di valutare il consumo idrico dei mesocosmi di controllo rispetto ai trattati. In figura 25 sono riportati i consumi idrici dei controlli e dei trattati ($\pm$ E.S., $n=2$), ricavati dalla media delle letture dei contatori presenti all'esterno di ogni mesocosmo.

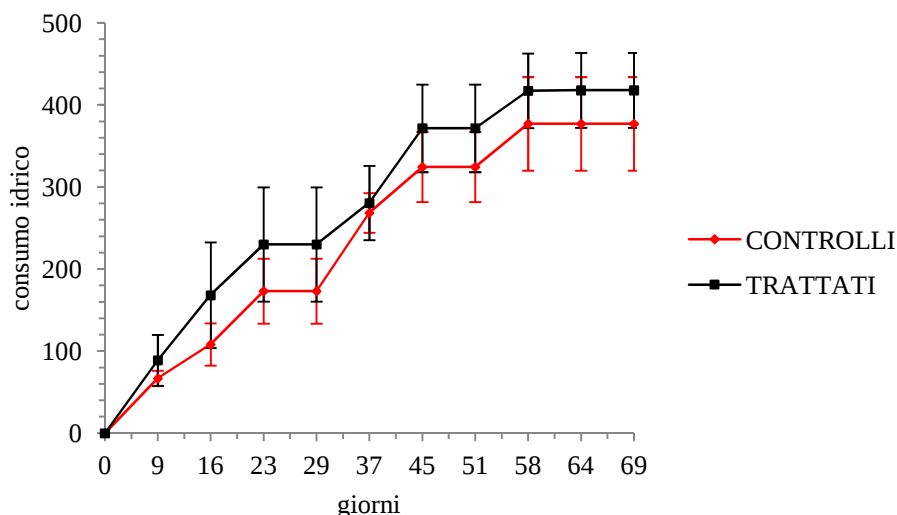


Figura 25. Curve relative al consumo idrico dei mesocosmi di controllo e dei trattati. I valori riportati si riferiscono al periodo settembre-novembre 2011 e rappresentano la media $\pm$ E.S., (n=2)

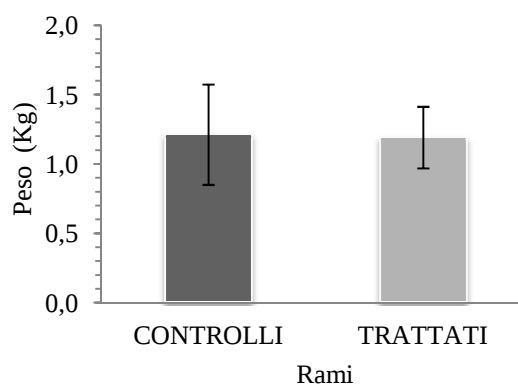
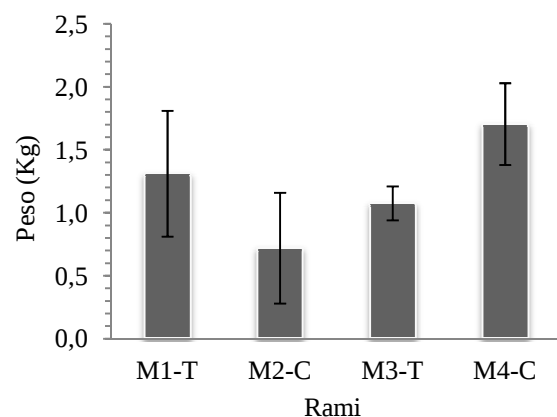
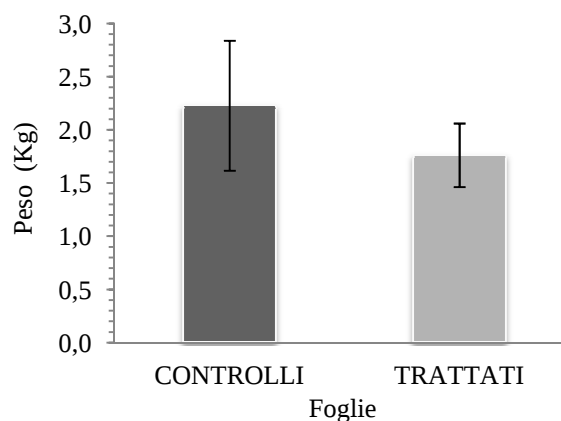
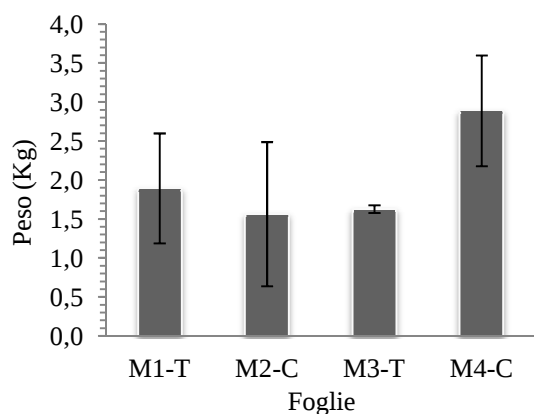
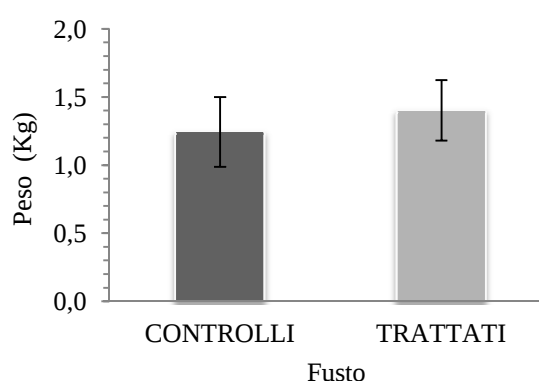
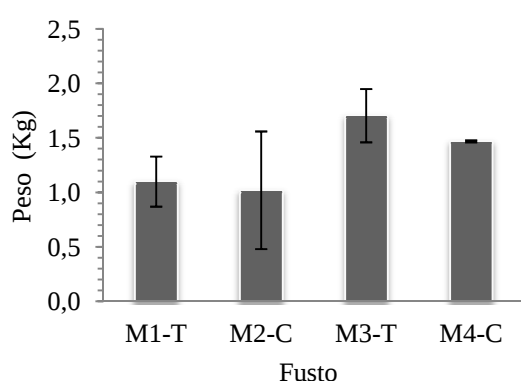
5.2 Crescita delle piante: rilievi biometrici

Al fine di valutare le variazioni della crescita e l'incidenza dei trattamenti eseguiti al termine della prova è stato misurato il peso fresco e il peso secco di fusti, foglie e rami e radici, il diametro dei fusti e l'altezza delle piante di eucalipto. La valutazione della biomassa fresca delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane è stata effettuata in seguito al taglio delle piante. Gli eucalipti sono stati suddivisi nelle varie parti: fusti, rami, foglie e radici e queste sono state pesate separatamente. I dati ottenuti sono stati analizzati, è stato calcolato il peso medio dei vari organi per ogni mesocosmo e per ogni dato sono stati calcolati la deviazione standard e l'errore standard.

I dati ottenuti inoltre sono stati analizzati suddividendo i mesocosmi in trattati e controlli sottoponendoli all'analisi della varianza (ANOVA) per valutare la significatività della differenza fra le medie dei due campioni: trattato e controllo, con un livello di significatività pari al 95% ($p < 0,05$, t-test).

Il peso medio fresco dei vari organi (fusto, foglie e rami) e il peso medio fresco totale delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane è rappresentato in figura 26, a) in ascissa sono riportati i quattro mesocosmi. Ogni istogramma rappresenta il peso fresco medio delle parti in cui sono stati suddivisi gli eucalipti (fusto, rami e foglie) e il peso fresco medio totale ($\pm$ E.S., n=2),

ricavati dalla media delle 2 piante presenti all'interno di ogni mesocosmo, b): in ascissa sono riportati i controlli e i trattati. Ogni istogramma rappresenta il peso fresco medio delle parti in cui sono stati suddivisi gli eucalipti (fusto, rami e foglie) e il peso fresco medio totale ($\pm$ E.S., $n=4$) degli eucalipti di controllo e dei trattati, ricavati dalla media delle 4 piante presenti all'interno di ogni coppia di mesocosmi. Non è stato riportato il peso fresco delle radici poiché al momento del taglio le radici erano immerse nell'agriperlite e si trovavano al di sotto del livello di falda, per rimuovere l'agriperlite sono stati necessari diversi giorni e si è ritenuto che al termine della ripulitura delle radici il dato relativo al peso fresco delle radici non fosse più rappresentativo.



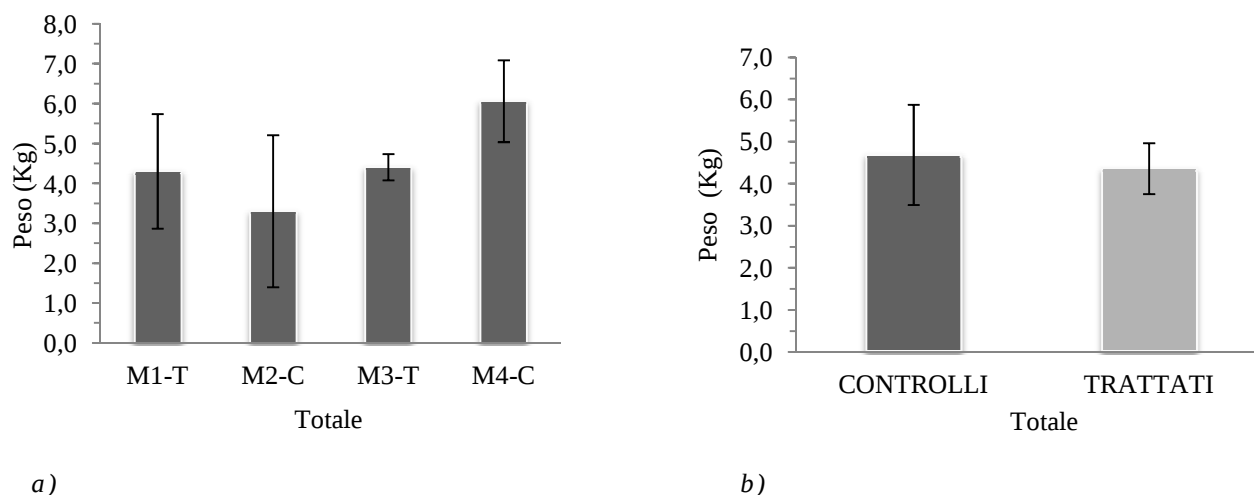


Figura 26. Peso fresco dei fusti, dei rami e delle foglie e peso fresco totale delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane.

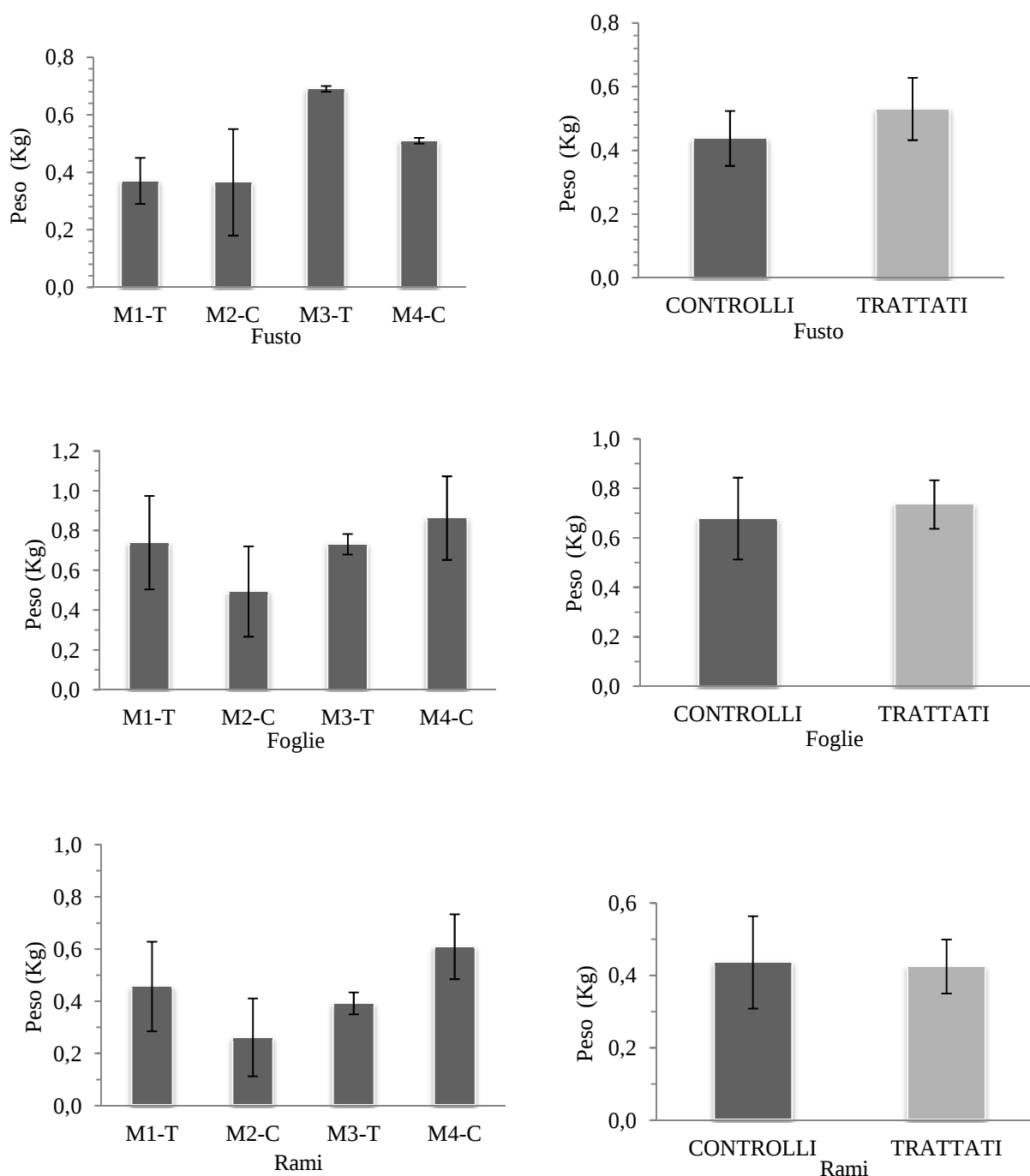
a) I valori riportati rappresentano la media del peso fresco degli eucalipti presenti all'interno dei 4 mesocosmi $\pm$ E.S., ($n=2$). b) I valori riportati rappresentano la media dei pesi freschi degli eucalipti suddivisi in mesocosmi di controllo e trattati $\pm$ E.S., ($n=4$). I valori di significatività calcolati con l'ANOVA (differenze significative per $P<0,05$ t-test) dall'alto verso il basso sono i seguenti: FUSTI $p=0,6585$, FOGLIE $p=0,5194$, RAMI $p=0,9639$, TOTALE $p=0,8141$.

Dai dati riportati precedentemente è possibile dedurre che il peso fresco non è influenzato dai trattamenti con cadmio, infatti il peso fresco dei vari organi (fusto, rami, foglie) e il peso fresco totale non presentano differenze statisticamente significative tra i trattati e i controlli.

La valutazione della biomassa secca delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane è stata effettuata in seguito al taglio delle piante. Gli eucalipti sono stati suddivisi nelle varie parti: fusti, rami, foglie e radici e queste sono state essiccate in stufa a 80 $^{\circ}\text{C}$ dai 7 ai 15 giorni fino al raggiungimento del peso costante. I dati ottenuti sono stati analizzati, è stato calcolato il peso medio dei vari organi per ogni mesocosmo e per ogni dato sono stati calcolati la deviazione standard e l'errore standard. I dati ottenuti inoltre sono stati analizzati suddividendo i mesocosmi in trattati e controlli sottoponendoli all'analisi della varianza (ANOVA) per valutare la significatività della differenza fra le medie dei due campioni: trattato e controllo, con un livello di significatività pari al 95% ($p<0,05$, t-test).

Il peso medio secco delle parti (fusto, rami, foglie e radici), il peso medio secco della biomassa aerea e il peso medio secco totale delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane è

rappresentato in figura 27, a) in ascissa sono riportati i quattro mesocosmi. Ogni istogramma rappresenta il peso medio secco delle parti in cui sono stati suddivisi gli eucalipti (fusto, rami, foglie e radici), il peso medio secco della biomassa aerea e il peso medio secco totale ($\pm$ E.S., $n=2$), ricavati dalla media delle 2 piante presenti all'interno di ogni mesocosmo, b) in ascissa sono riportati i controlli e i trattati. Ogni istogramma rappresenta il peso medio secco degli organi (fusto, rami, foglie e radici), il peso medio secco della biomassa aerea e il peso medio secco totale ($\pm$ E.S., $n=4$) degli eucalipti di controllo e dei trattati, ricavati dalla media delle 4 piante presenti all'interno di ogni coppia di mesocosmi.



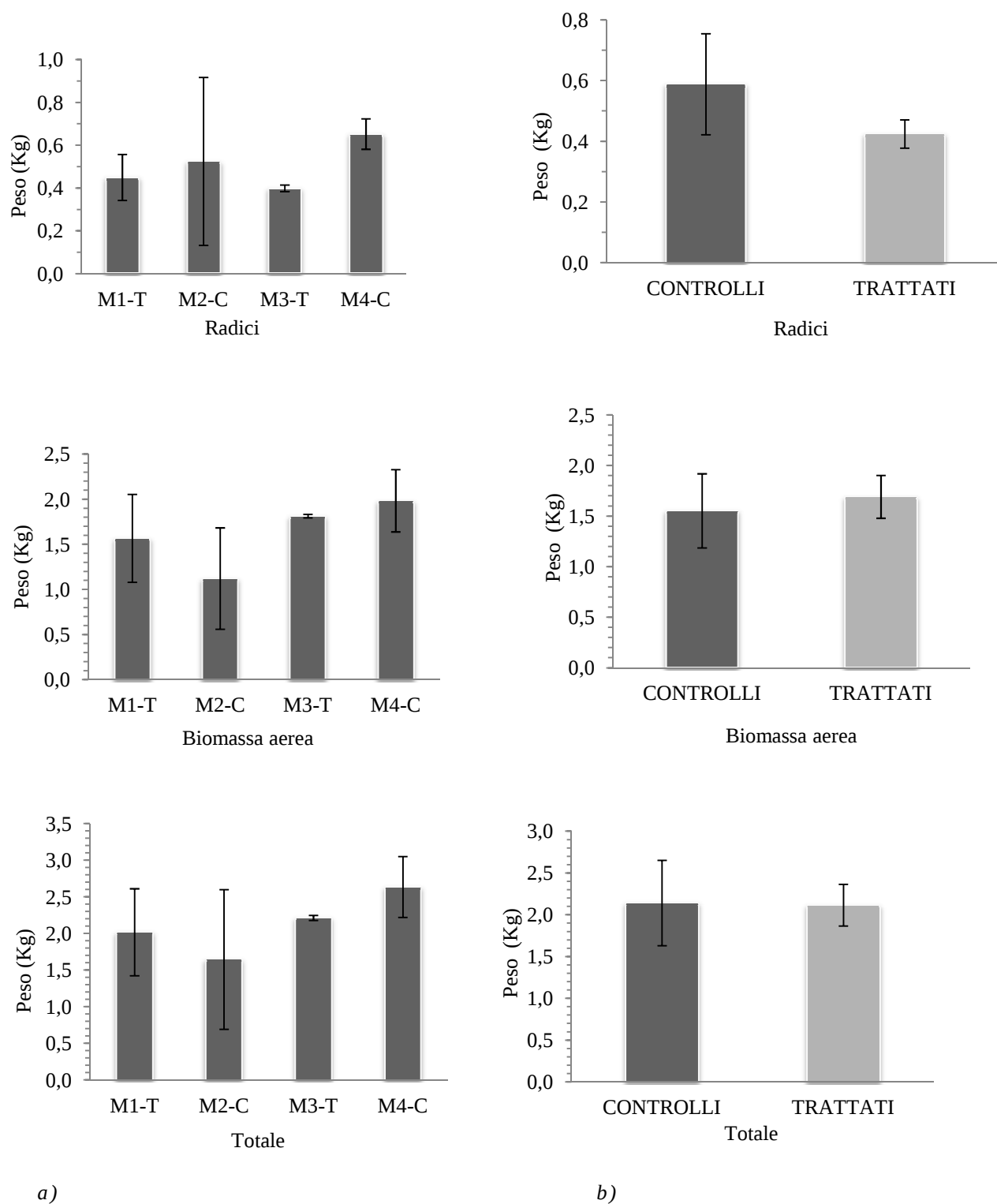


Figura 27. Peso secco dei fusti, dei rami, delle foglie e delle radici e peso secco della biomassa aerea e totale delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane. a) I valori riportati rappresentano la media del peso secco degli eucalipti presenti all'interno dei 4 mesocosmi $\pm$ E.S., (n=2). b) I valori riportati rappresentano la media dei pesi secchi degli eucalipti suddivisi in mesocosmi di controllo e trattati $\pm$ E.S., (n=4). I valori di significatività calcolati con l'ANOVA (differenze significative per $P < 0,05$ t-test) dall'alto verso il basso sono i seguenti: FUSTI $p = 0,5057$, FOGLIE $p = 0,7832$, RAMI $p = 0,9483$, RADICI $p = 0,3807$, BIOMASSA AEREA $p = 0,7603$, BIOMASSA TOTALE $p = 0,9630$

Dai dati riportati precedentemente è possibile dedurre che anche il peso secco delle piante di eucalipto non è influenzato dai trattamenti con cadmio, infatti il peso secco delle parti in cui sono stati suddivisi gli eucalipti (fusto, rami, foglie), del totale della biomassa aerea, delle radici e il peso secco totale non presentano differenze statisticamente significative tra i trattati e i controlli.

Il diametro medio finale (mm) delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane è rappresentato in figura 28, a) in ascissa sono riportati i quattro mesocosmi. Ogni istogramma rappresenta il diametro medio finale degli eucalipti ($\pm$ E.S., $n=2$), ricavato dalla media delle 2 piante presenti all'interno di ogni mesocosmo, b) in ascissa sono riportati i controlli e i trattati. Ogni istogramma rappresenta il diametro medio finale ($\pm$ E.S., $n=4$) degli eucalipti di controllo e dei trattati, ricavati dalla media delle 4 piante presenti all'interno di ogni coppia di mesocosmi.

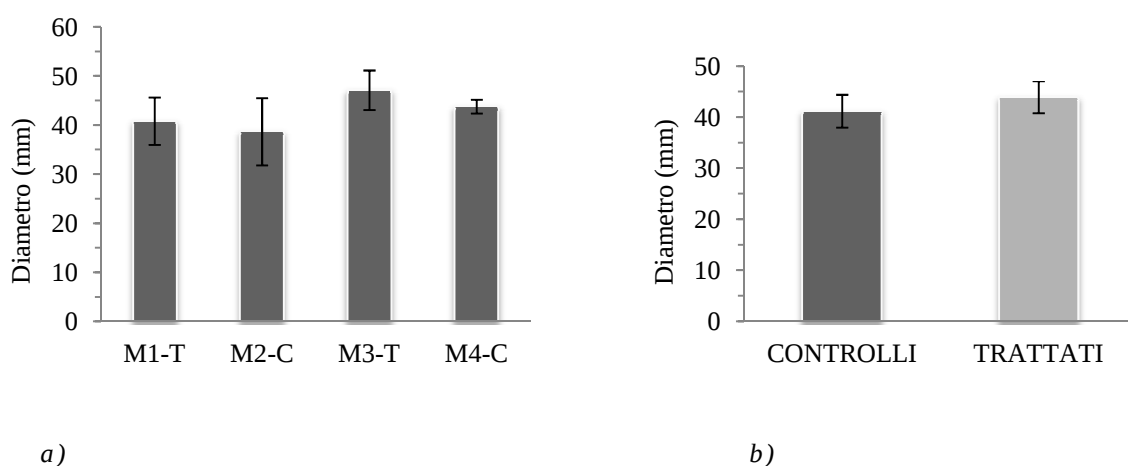


Figura 28. Diametro medio finale delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane. a) I valori riportati rappresentano i diametri medi finali degli eucalipti presenti all'interno dei 4 mesocosmi $\pm$ E.S., ($n=2$). b) I valori riportati rappresentano i diametri medi finali degli eucalipti suddivisi in mesocosmi di controllo e trattati $\pm$ E.S., ($n=4$). Il valore di significatività calcolato con l'ANOVA (differenze significative per $P<0,05$ t-test) è $p=0,5617$.

L'altezza media finale (cm) delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane è rappresentata in figura 29, a) in ascissa sono riportati i quattro mesocosmi. Ogni istogramma rappresenta l'altezza media finale degli eucalipti ($\pm$ E.S., $n=2$), ricavata dalla media delle 2 piante presenti all'interno di ogni mesocosmo, b) in ascissa sono riportati i controlli e i trattati. Ogni

istogramma rappresenta l'altezza media finale ($\pm$ E.S., $n=4$) degli eucalipti di controllo e dei trattati, ricavati dalla media delle 4 piante presenti all'interno di ogni coppia di mesocosmi.

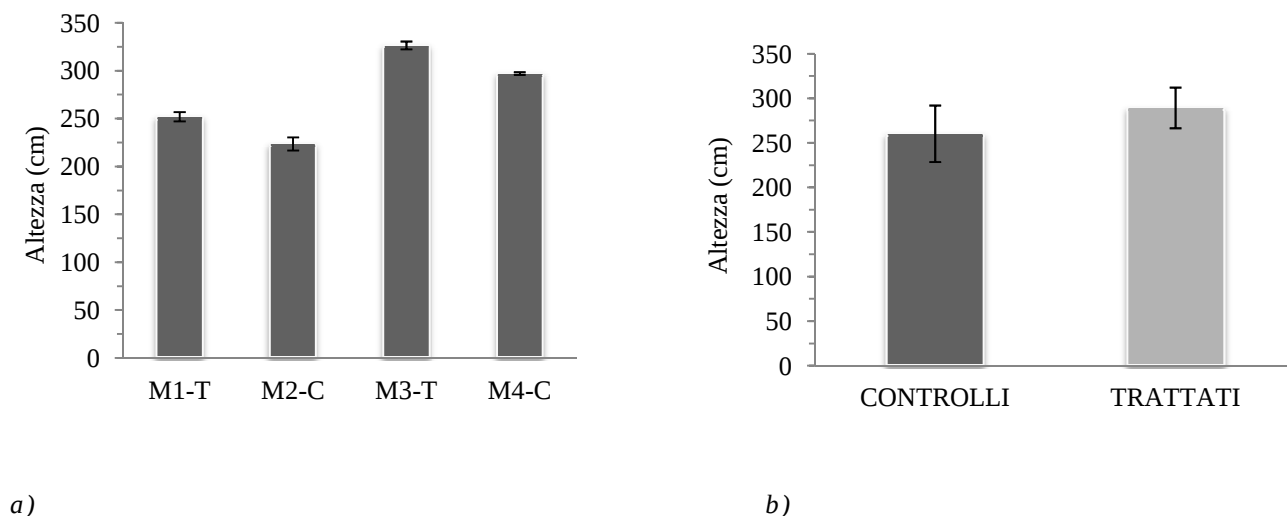


Figura 29. Altezza media finale delle piante di eucalipto cresciute all' interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μ M (trattato) CdSO_4 per 8 settimane. a) I valori riportati rappresentano l'altezza media finale degli eucalipti presenti all'interno dei 4 mesocosmi $\pm$ E.S., ($n=2$). b) I valori riportati rappresentano l'altezza media finale degli eucalipti suddivisi in mesocosmi di controllo e trattati $\pm$ E.S., ($n=4$). Il valore di significatività calcolato con l'ANOVA (differenze significative per $P < 0,05$ t-test) è $p = 0,4856$

Come già visto per il peso fresco e per il peso secco anche i valori di diametro e altezza non sono influenzati dai trattamenti con cadmio non presentando differenze statisticamente significative tra i trattati e i controlli.

La capacità di tollerare il cadmio a livello fogliare è una caratteristica importante nel fitorimedio in quanto un efficiente apparato fotosintetico permette alle piante di mantenere il flusso di traspirazione necessario per il trasporto dei metalli dalle radici alla parte aerea (Salt et al., 1995; Pietrini et al., 2010).

L'area fogliare (mq) delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μ M (trattato) CdSO_4 per 8 settimane è rappresentata in figura 30, a) in ascissa sono riportati i quattro mesocosmi. Ogni istogramma rappresenta l'area fogliare degli eucalipti ($\pm$ E.S., $n=2$), ricavata dalla media delle 2 piante presenti all'interno di ogni mesocosmo, b) in ascissa sono riportati i controlli e i trattati. Ogni istogramma rappresenta l'area fogliare ($\pm$ E.S., $n=4$) degli eucalipti di controllo e dei trattati, ricavati dalla media delle 4 piante presenti all'interno di ogni coppia di mesocosmi.

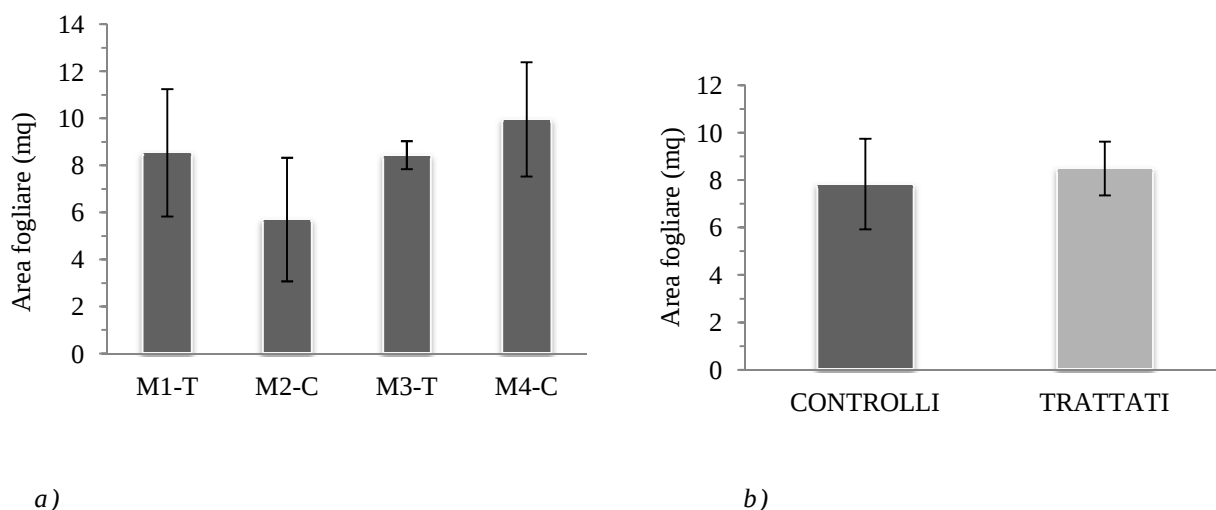


Figura 30. Area fogliare delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane.

a) I valori riportati rappresentano l'area fogliare degli eucalipti presenti all'interno dei 4 mesocosmi $\pm$ E.S., (n=2).

b) I valori riportati rappresentano l'area fogliare degli eucalipti suddivisi in mesocosmi di controllo e trattati $\pm$ E.S., (n=4). Il valore di significatività calcolato con l'ANOVA (differenze significative per $P < 0,05$ t-test) è $p = 0,7767$

Dai grafici riportati risulta che i cloni di eucalipto non mostrano alcuna riduzione indotta dal trattamento con il cadmio relativamente all'area totale fogliare.

5.3 Equazione allometrica

E' stata individuata un'equazione allometrica relativa al rapporto diametro/biomassa per le piante cresciute all'interno dei 4 mesocosmi per 3 mesi e successivamente trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per 8 settimane. La relazione allometrica ha permesso di trovare un rapporto tra la fitomassa totale (compresi rami e foglie, ma non le radici) e il diametro.

Il modello di regressione utilizzato è (Niklas, 1994):

$$M = aD^b$$

dove M = massa totale (kg sostanza secca) e D = diametro alla base (cm) e i parametri a e b , sono detti rispettivamente coefficiente di scala ed esponente di scala.

Il rapporto diametro/biomassa delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi è rappresentato in figura 31, in ascissa sono riportati i diametri degli eucalipti presenti all'interno dei 4 mesocosmi, mentre in ordinata sono riportati i valori di biomassa (kg) corrispondenti ai diametri.

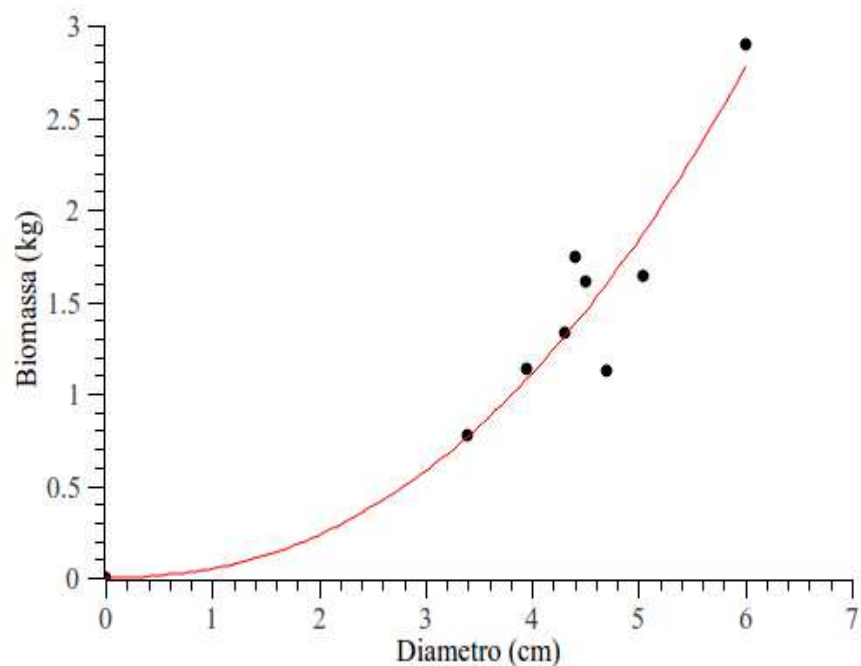


Figura 31. Equazione allometrica delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi: $B = a \cdot D^b$ $a = 0,0483 \pm 0,0282$ $b = 2,259 \pm 0,360$ $R^2 = 0,907$. I valori riportati sono stati ottenuti al termine dei 3 mesi di crescita e delle successive 8 settimane di trattamento.

Il peso totale secco delle varie parti (fusto, rami, foglie e radici) delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi nella prima e nella seconda parte della ricerca è rappresentato in figura 32, ogni istogramma rappresenta il peso totale secco degli eucalipti cresciuti all'interno dei mesocosmi nella prima parte (2010) e nella seconda parte (2011) della ricerca.

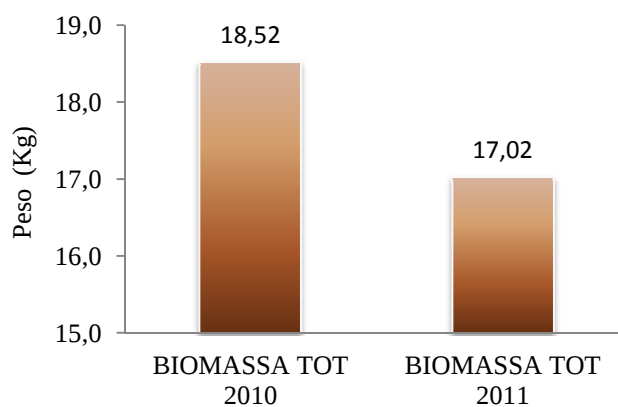


Figura 32. Peso secco totale delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei 4 mesocosmi nella prima parte (2010) e nella seconda parte della ricerca (2011)

E' stata eseguita un'analisi della varianza (ANOVA) dei dati ottenuti nella prima parte e nella seconda parte della ricerca per valutare se ci fossero differenze significative tra i due set di dati. Poiché non sono risultate differenze statisticamente significative è stata ricavata un'equazione allometrica complessiva dei dati del 2010 e del 2011. La figura 33 rappresenta l'equazione allometrica ricavata con i dati ottenuti nella prima e nella seconda parte della ricerca quindi utilizzando i dati relativi a 16 piante di eucalipto (8 per il 2010 e 8 per il 2011).

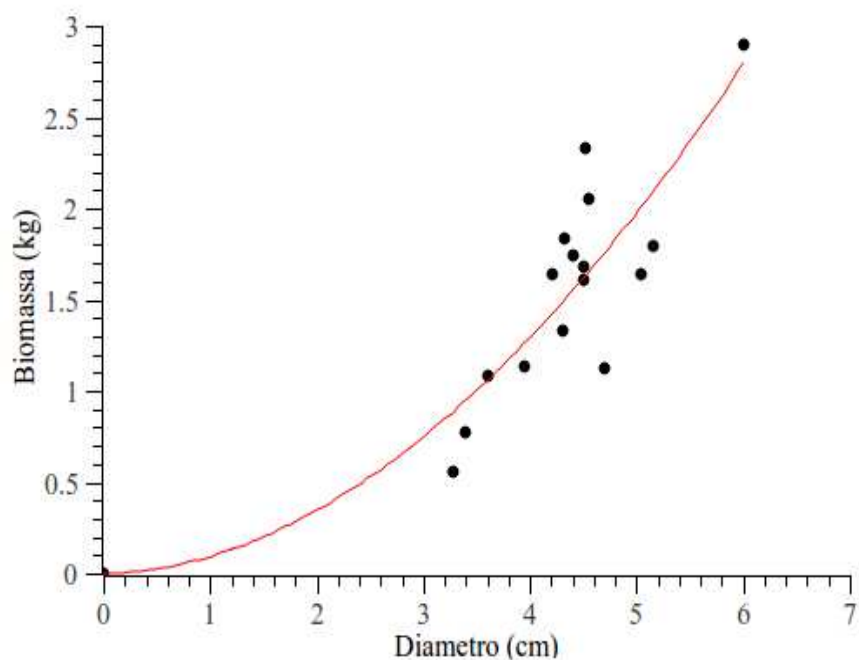


Figura 33. Equazione allometrica delle piante di eucalipto cresciute all'interno dei mesocosmi: $B = a \cdot D^b$ $a = 0,0924 \pm 0,0498$ $b = 1,901 \pm 0,334$ $R^2 = 0,777$. I valori riportati sono relativi alla prima e alla seconda parte della ricerca (dati 2010 e 2011).

Nel complesso, l'analisi dei parametri biometrici associati alla crescita e produzione di biomassa ha mostrato come la presenza di cadmio non abbia determinato sulle piante di eucalipto effetti apprezzabili, mettendo pertanto in evidenza una elevatissima tolleranza dell'ibrido di eucalipto utilizzato all'esposizione al metallo pesante. In questo contesto, i pochi lavori disponibili in letteratura mostrano come il trattamento con Cd determini un effetto negativo sulla crescita di piante di *Eucalyptus camaldulensis*, anche se con estensioni differenti. Infatti, mentre riduzioni di crescita intorno al 50% sono state riportate da Gomes et al. (2012) sia a livello di peso secco radicale che della parte aerea, una più elevata tolleranza al cadmio è stata mostrata da Fine et al. (2013) attraverso una valutazione del peso fresco totale delle piante. Occorre però evidenziare che seppure la concentrazione di cadmio nei due lavori citati fosse molto simile a quella utilizzata in

questa tesi, le condizioni di crescita delle piante erano piuttosto differenti, trattandosi di un'idroponica classica (solo mezzo nutritivo liquido) in serra con esposizione al metallo pesante per un tempo decisamente inferiore a quello dell'esperimento discusso nella presente tesi. A questo riguardo, oltre alle condizioni ambientali di crescita, deve essere tenuto in conto che la presenza dell'agriperlite come substrato all'interno dei mesocosmi può aver modificato le relazioni radice-metallo nella soluzione circolante e ridotto la biodisponibilità dello stesso rispetto ad un'esposizione al metallo in soluzione completamente acquosa. Ciò verrà più adeguatamente discusso nella parte relativa all'analisi della capacità di accumulo di cadmio da parte delle piante di eucalipto. In letteratura sono inoltre presenti altri studi riguardanti l'esposizione di altre specie di eucalipto a metalli pesanti differenti dal cadmio da cui si evidenziano, rispettivamente, una riduzione di crescita della biomassa aerea in piante accresciute in suolo contaminato con piombo (Arriagada et al., 2005), una discreta tolleranza all'arsenico presente in residui minerari (King et al., 2008), ed infine una buona capacità delle piante di eucalipto di sopravvivere su residui metalliferi, tanto da proporre la specie come possibile bioindicatore di qualità ambientale (Pyatt, 2001).

5.4 Valutazione di parametri fisiologici

Per valutare gli effetti fitotossici del Cd sono state svolte indagini per la valutazione delle alterazioni fisiologiche causate dall'esposizione all'inquinante. Di seguito si riporta la tabella relativa alle concentrazioni fogliari di alcuni elementi chimici, su campioni prelevati al termine del periodo di trattamento in corrispondenza del taglio delle piante di eucalipto trattate (15.11.2011). Dal confronto delle concentrazioni riportate in tabella e i valori di concentrazione in letteratura (Saur et al., 1999; Pereira Carvalho Neto et al., 2011) è possibile affermare che le concentrazioni misurate non differiscono molto dai valori presenti in letteratura considerando la variabilità che di solito si verifica in ambienti differenti per una singola specie.

I dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) per valutare la significatività della differenza fra le medie dei due campioni: trattato e controllo, con un livello di significatività pari al 95% ($p < 0,05$) e al 99% ($p < 0,01$). L'analisi delle concentrazioni fogliari degli elementi chimici riportati in tabella 9 conferma che non esistono differenze statisticamente significative tra piante controllo e trattate.

Tabella 9. Concentrazioni fogliari di elementi chimici in piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 in mesocosmo. I valori riportati sono stati ottenuti al termine dei 3 mesi di crescita e delle successive 8 settimane di trattamento e sono relativi al prelievo effettuato il 15.11.2011 e rappresentano la media $\pm$ E.S., (n=4).

Elemento chimico	Controllo	Trattato
N (%)	2,03 $\pm$ (0,07)	1,93 $\pm$ (0,07)
P (%)	0,23 $\pm$ (0,02)	0,26 $\pm$ (0,01)
K (%)	1,95 $\pm$ (0,25)	1,99 $\pm$ (0,24)
Mg (%)	0,41 $\pm$ (0,06)	0,44 $\pm$ (0,04)
Ca (%)	1,76 $\pm$ (0,32)	2,41 $\pm$ (0,22)
Na (%)	0,39 $\pm$ (0,04)	0,32 $\pm$ (0,02)
Fe (mg/kg)	51,32 $\pm$ (2,45)	46,09 $\pm$ (2,31)
Mn (mg/kg)	26,25 $\pm$ (1,69)	30,54 $\pm$ (1,36)
Cu (mg/kg)	10,67 $\pm$ (1,53)	7,13 $\pm$ (0,67)
Zn (mg/kg)	40,40 $\pm$ (4,60)	35,00 $\pm$ (3,73)
Al (mg/kg)	64,38 $\pm$ (4,17)	58,25 $\pm$ (4,29)
B (mg/kg)	80,26 $\pm$ (8,41)	86,54 $\pm$ (4,84)
Pb (mg/kg)	3,00 $\pm$ (0,30)	2,27 $\pm$ (0,63)

La clorofilla è un pigmento, contenuto nei tessuti vegetali, in grado di assorbire la luce necessaria per la fotosintesi. L'attività fotosintetica viene normalmente riferita al contenuto in clorofilla del campione in esame, tale parametro viene ritenuto quindi un indicatore delle condizioni vegetative delle piante. L'analisi del contenuto di clorofilla nella pianta, è stata effettuata mediante Chlorophyll Meter Spad-502 Minolta, durante il periodo di trattamento delle piante fino al taglio (12.09.2011-15.11.2011). I valori delle misurazioni SPAD sono rappresentati in figura 34. Anche in questo caso non è stato possibile rilevare differenze statisticamente significative tra piante controllo e piante trattate (analisi statistica t-test). E' inoltre da rimarcare come l'esposizione al cadmio non alteri il contenuto di clorofilla durante l'intero periodo di trattamento.

La relazione fra misurazioni SPAD e contenuto totale di clorofilla è rappresentata in figura 35.

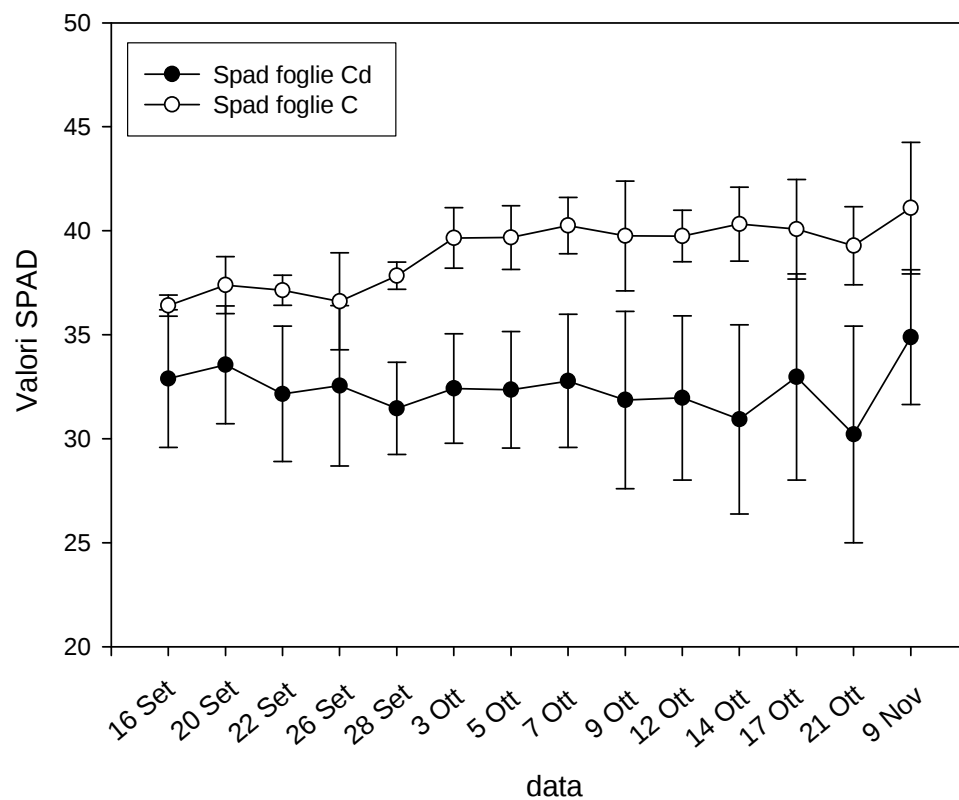


Figura 34. Valori SPAD in piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 in mesocosmo. I valori riportati sono stati registrati nelle 8 settimane di trattamento e rappresentano la media $\pm$ E.S.

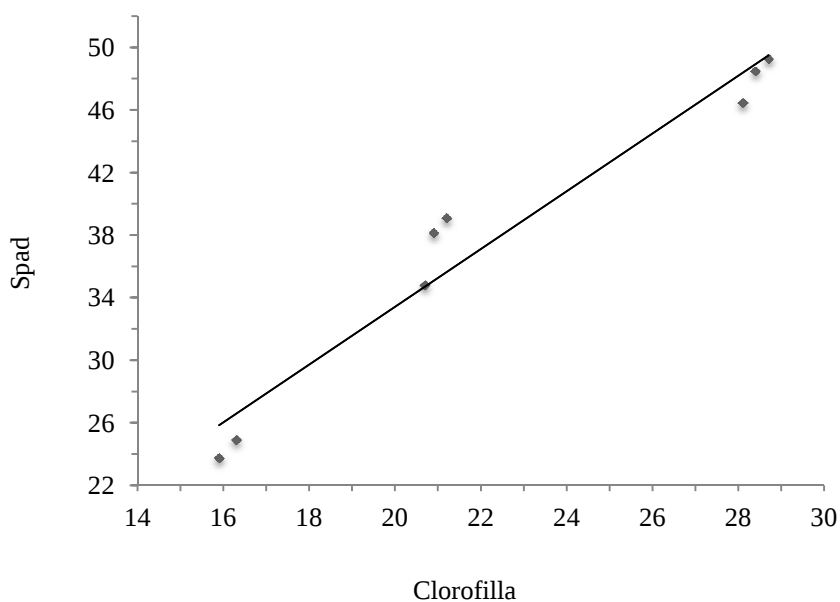


Figura 35. Relazione tra valori SPAD e contenuto di clorofilla in piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 in mesocosmo: $y = 1,847x - 3,5271$ $R^2 = 0,9532$. I valori riportati sono stati registrati nelle 8 settimane di trattamento.

La linea di tendenza che descrive più accuratamente il set di dati relativo alle misure spad e al contenuto totale di clorofilla è un'equazione lineare $y=mx+b$, dove m è la pendenza e b è l'intercetta.

Il valore R al quadrato (coefficiente di correlazione al quadrato) calcolato per determinare la affidabilità della tendenza e l'accuratezza della previsione è pari a 0,9532. Da tale valore possiamo dedurre che il modello matematico ipotizzato ha un elevato grado di affidabilità, di conseguenza possiamo affermare che esiste una relazione lineare tra le misurazioni spad e i valori di contenuto totale di clorofilla.

La valutazione complessiva dei dati ottenuti nelle analisi dell'area totale fogliare, del contenuto di nutrienti e clorofilla totale mette in chiara evidenza come il trattamento con cadmio delle piante di eucalipto non abbia modificato né dal punto di vista strutturale né da quello biochimico-fisiologico la funzionalità dell'apparato fogliare rispetto alle piante controllo. Ciò è in accordo con quanto è stato già osservato e discusso per quanto concerne l'analisi della crescita, dove è stato indicato come un fattore chiave per la valutazione di questi dati risulti essere la ridotta quantità di metallo pesante traslocato nelle foglie, come riportato nel paragrafo successivo. In letteratura, come già discusso, è possibile reperire solo poche evidenze sperimentali per un confronto con i dati della presente tesi. Tali evidenze mostrano, in apparente contrasto con quanto analizzato in questo lavoro, come il trattamento con cadmio di piante di eucalipto in idroponica modifichi il contenuto fogliare di micro- e macro-elementi. Infatti, Fine et al. (2013) hanno mostrato come il contenuto di alcuni nutrienti quali K, Cu, Mn e Mo si riduca in piante trattate con una concentrazione di cadmio simile a quella utilizzata nella presente tesi. E' da mettere però in evidenza come, al di là delle diverse condizioni sperimentali, il contenuto di cadmio nelle foglie di piante trattate, riportato nel succitato lavoro, fosse superiore a quello che è stato analizzato in questa tesi e che è mostrato nel paragrafo successivo. Anche Gomes et al. (2012) hanno messo in evidenza una riduzione rispetto al controllo dei contenuti dei principali elementi nutritivi, quali N, P, K, Mg, Cu e Fe, in piante di eucalipto trattate con cadmio in idroponica. E' comunque da osservare che la concentrazione di cadmio riportata da Gomes et al. (2012) nella parte aerea delle piante era notevolmente superiore a quella rilevata nel presente lavoro e mostrata nel paragrafo successivo.

5.5 Accumulo e distribuzione del cadmio nel sistema pianta-mesocosmo

La capacità di accumulo e di traslocazione del Cd è stata valutata misurando la concentrazione dell'elemento nei diversi organi della pianta (foglie, fusto, rami e radici).

Tabella 10. Analisi della concentrazione di cadmio (ppm) negli organi di piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per otto settimane in mesocosmo (per ulteriori dettagli vedi Materiali e metodi). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e successivamente analizzati per la loro significatività statistica. Nelle colonne, a lettere diverse corrispondono valori medi ($\pm$ E.S., $n=4$) significativamente differenti (t-test).

Tesi	Concentrazione Cd					
	Foglie	Fusto	Rami	Radici	parte aerea	pianta totale
Controllo	0,033 ($\pm 0,004$) ^b	0,018 ($\pm 0,003$) ^a	0,022 ($\pm 0,002$) ^b	6,68 ($\pm 0,25$) ^b	0,075 ($\pm 0,003$) ^b	6,75 ($\pm 0,25$) ^b
Trattato	0,981 ($\pm 0,254$) ^a	0,025 ($\pm 0,002$) ^a	0,033 ($\pm 0,003$) ^a	152,4 ($\pm 23,03$) ^a	1,04 ($\pm 0,25$) ^a	153,4 ($\pm 23,2$) ^a

In tabella 10 è riportata la concentrazione del cadmio nei vari organi delle piante di eucalipto esposte al Cd aggiunto nella soluzione nutritiva oppure in presenza di soluzione nutritiva di controllo. Inoltre, in tabella è presentata la concentrazione totale di cadmio nella parte aerea e nell'intera pianta. I risultati mostrano anzitutto che, data la presenza di cadmio come impurità nell'acqua utilizzata come soluzione circolante, evidenziata al termine dell'esperimento, anche nelle piante controllo è stato possibile misurare una concentrazione del metallo che comunemente, data la bassissima presenza nei terreni non contaminati e la non essenzialità dell'elemento per la nutrizione minerale delle piante, non viene rilevata nei tessuti vegetali da strumenti quali gli spettrometri ad assorbimento atomico, rimanendo tale concentrazione al di sotto della loro soglia di detenzione. Sia nelle piante controllo che in quelle esposte alla concentrazione di cadmio 50 μM la concentrazione più elevata del metallo è stata apprezzata nell'apparato radicale delle piante di eucalipto. La concentrazione di cadmio nelle radici delle piante trattate è risultata oltre 20 volte superiore a quelle delle piante controllo. Per quanto riguarda la parte aerea, le piante controllo risultano caratterizzate da concentrazioni di cadmio molto simili tra foglie, fusto e rami, mentre nelle piante trattate le concentrazioni del metallo sono state notevolmente superiori nelle foglie rispetto agli altri organi. Nel confronto tra i trattamenti, è possibile evidenziare come le foglie di piante trattate presentino una concentrazione di cadmio di quasi 30 volte superiore rispetto a quelle di piante controllo, come non vi siano differenze statisticamente significative nella concentrazione di cadmio nel fusto tra piante controllo e piante trattate e come invece queste ultime presentino una concentrazione di cadmio significativamente più elevata nei rami rispetto al controllo. Nel totale, la parte aerea di piante trattate è risultata caratterizzata da una concentrazione di cadmio circa 14 volte superiore rispetto a quella delle piante controllo, mentre mediamente la pianta intera trattata con cadmio

presenta una concentrazione del metallo pesante di circa 22 volte più elevata rispetto alla pianta controllo.

Tabella 11. Distribuzione percentuale della concentrazione di cadmio negli organi di piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per otto settimane in mesocosmo (per ulteriori dettagli vedi Materiali e metodi).

Tesi	Concentrazione Cd (%)			
	Foglie	Fusto	Rami	radici
Controllo	0,48	0,26	0,32	98,96
Trattato	0,63	0,01	0,02	99,34

La tabella 11 riporta la distribuzione percentuale della concentrazione del cadmio nei vari organi delle piante di eucalipto trattate o no con cadmio 50 μM . Come già evidenziato in termini assoluti nella precedente tabella, la presenza in concentrazione del metallo pesante è quasi esclusivamente rilevabile nell'apparato radicale che, sia in piante controllo che in quelle trattate, rappresenta circa il 99% della concentrazione totale di cadmio analizzata nelle piante. Una diversa distribuzione percentuale della concentrazione del metallo caratterizza l'apparato aereo delle piante controllo e trattate, con queste ultime che evidenziano una percentuale più elevata del metallo nelle foglie mentre valori percentuali superiori rispetto al trattato sono osservabili sia nel fusto che nei rami delle piante controllo.

Tabella 12. Valutazione della capacità di bioconcentrare il cadmio (Bioconcentration factor) negli organi della pianta e di traslocarlo dalla radice alla parte aerea (Translocation factor) in piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per otto settimane in mesocosmo (per ulteriori dettagli vedi Materiali e metodi). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e successivamente analizzati per la loro significatività statistica. Nelle colonne, a lettere diverse corrispondono valori medi ($\pm$ E.S., $n=4$) significativamente differenti (t-test).

Tesi	Bioconcentration factor						Translocation factor
	Foglie	Fusto	Rami	Radici	Parte aerea	Pianta totale	
Controllo	1,69 ($\pm 0,19$) ^a	0,965 ($\pm 0,14$) ^a	1,174 ($\pm 0,09$) ^a	342,5 ($\pm 13,1$) ^a	3,83 ($\pm 0,13$) ^a	346,4 ($\pm 13,1$) ^a	0,011 ($\pm 0,0002$) ^a
Trattato	0,21 ($\pm 0,05$) ^b	0,005 ($\pm 0,0004$) ^b	0,007 ($\pm 0,0003$) ^b	33,7 ($\pm 5,09$) ^b	0,22 ($\pm 0,05$) ^b	33,9 ($\pm 5,13$) ^b	0,006 ($\pm 0,0013$) ^b

Al fine di valutare la capacità delle piante di eucalipto di concentrare il cadmio nei propri tessuti rispetto alla concentrazione del metallo pesante presente nella soluzione circolante è stato calcolato il fattore di bioconcentrazione (o bioconcentration factor), che misura appunto il rapporto tra la concentrazione in mg kg^{-1} di cadmio nel comparto pianta rispetto a quella del comparto soluzione circolante. In altri termini, tale indice esprime la capacità potenziale di una pianta di immagazzinare un metallo pesante nei propri tessuti in presenza di una data concentrazione del metallo nel substrato di crescita. I dati evidenziano una notevolissima capacità di bioconcentrazione del metallo pesante nell'apparato radicale di piante di eucalipto esposte a una concentrazione molto bassa di cadmio (quale quella presente nella soluzione circolante di piante controllo come valore di fondo del metallo presente come impurità) che si riduce, pur evidenziando un fattore di circa 34, nelle piante esposte a concentrazioni più elevate quali quelle del trattato con cadmio $50 \mu\text{M}$. Anche nella parte aerea, la più elevata capacità delle piante di eucalipto di bioconcentrare il metallo pesante in presenza di concentrazioni esterne di cadmio più basse (controllo) rispetto a quelle più elevate (trattato) è stata evidenziata mediante un fattore di bioconcentrazione di circa 8, 190 e 170 volte superiore rispettivamente nelle foglie, nel fusto e nei rami delle piante controllo rispetto alle piante trattate. Queste ultime hanno manifestato valori del fattore di bioconcentrazione riferiti agli organi aerei notevolmente inferiori all'unità. Nel totale della parte aerea, le piante controllo hanno evidenziato una capacità di bioconcentrare il cadmio circa 17 volte superiore delle piante trattate, mentre a livello radicale tale rapporto è di circa dieci volte. Per valutare in termini di concentrazione la capacità delle piante di eucalipto di trasferire il metallo assorbito dall'apparato radicale alla parte aerea della pianta, è stato calcolato il fattore di traslocazione (o translocation factor) come rapporto tra le concentrazioni del cadmio nella parte aerea rispetto a quella della radice (tabella 12). I dati mettono in evidenza la limitata potenzialità della specie saggiata di trasferire il metallo nelle parti epigee. Le piante controllo hanno mostrato comunque un valore di translocation factor quasi doppio di quello delle piante trattate con cadmio $50 \mu\text{M}$.

Tabella 13. Analisi del contenuto di cadmio (mg pianta^{-1}) negli organi di piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o $50 \mu\text{M}$ (CdSO_4 per otto settimane in mesocosmo (per ulteriori dettagli vedi Materiali e metodi). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e successivamente analizzati per la loro significatività statistica. Nelle colonne, a lettere diverse corrispondono valori medi ($\pm \text{E.S.}$, $n=4$) significativamente differenti (t-test).

Tesi	Contenuto Cd					
	Foglie	Fusto	Rami	Radici	Parte aerea	Pianta totale
Controllo	0,022 ($\pm 0,005$) ^b	0,0087 ($\pm 0,001$) ^a	0,0087 ($\pm 0,002$) ^a	3,91 ($\pm 1,15$) ^b	0,04 ($\pm 0,0093$) ^b	3,94 ($\pm 1,16$) ^b
Trattato	0,72 ($\pm 0,24$) ^a	0,014 ($\pm 0,003$) ^a	0,015 ($\pm 0,003$) ^a	63,4 ($\pm 8,91$) ^a	0,75 ($\pm 0,24$) ^a	64,2 ($\pm 9,11$) ^a

La valutazione della quantità effettiva di cadmio assorbita dalle piante di eucalipto durante la prova nei mesocosmi è stata effettuata mediante la separazione degli organi della pianta al campionamento, la loro triturazione con successiva mineralizzazione in ambiente acido e lettura degli estratti in spettrofotometria ad assorbimento atomico. I dati di contenuto del metallo sono stati riportati per pianta e mostrati in tabella 13. Come già evidenziato per i valori di concentrazione, l'organo in cui sono state misurate le quantità maggiori di cadmio è la radice, seguita dalle foglie, e da fusto e rami che presentano un contenuto di metallo molto simile. Questo comportamento è stato osservato sia nelle piante controllo che in quelle trattate con cadmio. In queste ultime, il contenuto di metallo per pianta è stato di circa 16 e 32 volte statisticamente superiore alle piante controllo rispettivamente nell'apparato radicale e nelle foglie. A livello del fusto e dei rami, invece, pur essendo i valori di contenuto di cadmio più elevati nelle piante trattate rispetto ai controlli, tali differenze non sono risultate significative. Pertanto, la differenza di contenuto in cadmio della parte aerea tra piante trattate e controllo è quasi totalmente da ascrivere al contenuto fogliare, mentre per quanto riguarda il contenuto totale di metallo nella pianta, sia nel controllo che nel trattato, esso è dovuto fondamentalmente alla quantità di cadmio stoccato nella radice. Tale comportamento è più facilmente osservabile calcolando la distribuzione percentuale del contenuto medio di cadmio per pianta, sia per le piante controllo che in quelle trattate con cadmio (tabella 14).

Tabella 14. Distribuzione percentuale del contenuto di cadmio negli organi di piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per otto settimane in mesocosmo (per ulteriori dettagli vedi Materiali e metodi).

Tesi	Contenuto Cd (%)			
	Foglie	Fusto	Rami	Radici
Controllo	0,55	0,22	0,22	99,23
Trattato	1,12	0,02	0,02	98,75

La potenzialità delle piante di eucalipto di accumulare il cadmio nei vari organi in rapporto alla quantità del metallo presente nella soluzione circolante è stata valutata mediante il calcolo del rapporto di assorbimento del metallo (o metal uptake ratio) (tabella 15).

Tabella 15. Valutazione della capacità di bioaccumulare il cadmio (metal uptake ratio) negli organi della pianta e di traslocarlo dalla radice alla parte aerea (metal translocation index) in piante di eucalipto trattate con 0 (controllo) o 50 μM (trattato) CdSO_4 per otto settimane in mesocosmo (per ulteriori dettagli vedi Materiali e metodi). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e successivamente analizzati per la loro significatività statistica. Nelle colonne, a lettere diverse corrispondono valori medi ($\pm$ E.S., $n=4$) significativamente differenti (t-test).

Tesi	Metal Uptake Ratio (mg mg^{-1})						Metal translocation index
	Foglie	Fusto	Rami	Radici	Parte aerea	Pianta totale	
Controllo	2,52 ($\pm 0,61$) ^a	0,99 ($\pm 0,19$) ^a	0,99 ($\pm 0,29$) ^a	445 (± 131) ^a	4,52 ($\pm 1,06$) ^a	449 (± 131) ^a	0,0114 ($\pm 0,015$) ^a
Trattato	0,28 ($\pm 0,009$) ^b	0,0055 ($\pm 0,001$) ^b	0,0059 ($\pm 0,001$) ^b	25,1 ($\pm 3,52$) ^b	0,29 ($\pm 0,09$) ^b	25,4 ($\pm 3,6$) ^b	0,0113 ($\pm 0,022$) ^a

In analogia a quanto evidenziato per la bioconcentrazione del cadmio negli organi delle piante di eucalipto, i dati hanno mostrato che sia nelle piante controllo che in quelle trattate con cadmio 50 μM la radice è l'organo che presenta il valore più elevato di metal uptake ratio, seguita dalle foglie ed infine, con valori simili tra loro, dal fusto e dai rami. Anche in questo caso è stato possibile osservare che le piante di eucalipto manifestano una maggiore potenzialità di bioaccumulare il cadmio da una soluzione a bassa concentrazione di metallo, quale quella presente nella soluzione circolante di piante controllo a causa dell'impurità da cadmio nell'acqua utilizzata. Tale maggiore capacità è stata apprezzata con un valore del metal uptake ratio rispettivamente di circa 18, 9, 180 e 167 volte statisticamente superiore nelle radici, foglie, fusto e rami delle piante controllo rispetto alle piante trattate con cadmio 50 μM . In queste ultime, è comunque da evidenziare il valore del metal uptake ratio a livello radicale che indica una capacità di bioaccumulare il metallo dalla soluzione circolante di circa 25 volte. Nel totale della parte aerea, la capacità delle piante controllo di bioaccumulare il cadmio è risultata di circa 15 volte superiore alle piante trattate. A livello della pianta intera tale rapporto è di circa 17 volte. La valutazione della capacità di trasferire il metallo assorbito a livello radicale negli organi della parte aerea della pianta è stata effettuata mediante il calcolo dell'indice di traslocazione del metallo (o metal translocation index). I risultati hanno evidenziato un valore molto simile di tale fattore tra le tesi, con una minima differenza statisticamente non significativa, mostrando che, sia in presenza di metallo in tracce che di una medio-alta concentrazione di cadmio in soluzione, le piante di eucalipto del clone saggiato si caratterizzano per una modesta capacità di traslocare il metallo assorbito agli organi della parte aerea.

Nel complesso, i risultati relativi all'accumulo e la distribuzione del cadmio negli organi delle piante di eucalipto trattate con questo metallo pesante hanno mostrato come il cadmio sia assorbito in quantità molto limitate rispetto alla quantità presente nella soluzione circolante, e come questo sia confinato quasi esclusivamente nell'apparato radicale. Questi risultati sono in linea con le poche evidenze sperimentali riportate in letteratura a riguardo di piante di eucalipto trattate con cadmio in substrato liquido. Infatti, una maggiore concentrazione di Cd nella parte radicale rispetto alla parte aerea, sia a basse che ad alte concentrazioni del metallo pesante, è stato riportato da Gomes et al. (2012) e Fine et al. (2013) in esperimenti in idroponica su *Eucalyptus camaldulensis*. Inoltre, un accumulo preferenziale di rame e di piombo nelle radici di *E. globulus* e di ibridi di eucalipto è stato messo in evidenza rispettivamente da Arriagada et al. (2009) e Bafeel (2008), seppur in esperimenti in serra con suolo contaminato. Tali caratteristiche sono in accordo con quanto riportato sul trattamento con metalli pesanti di piante forestali (Dos Santos Utmazian et al. 2007; Zacchini et al. 2009; Fernández et al. 2012) in esperimenti in idroponica. Nel nostro esperimento in mesocosmo, l'eucalipto ha mostrato una discreta capacità di bioconcentrare il cadmio dalla soluzione circolante, con un fattore più elevato in presenza di cadmio in tracce. Risultati simili sono stati messi in evidenza da Gomes et al. (2012) e sono in accordo con quanto precedentemente riportato su ibridi di *Eucalyptus camaldulensis* x *E. globulus* ssp *bicostata* in esperimenti in idroponica da Zacchini et al. (2011). Una notevole capacità di bioconcentrare metalli pesanti negli organi di piante forestali è comunemente riportata in letteratura in esperimenti in idroponica (Kuzovkina et al., 2004; Dos Santos et al., 2007; Fernandez et al., 2012). In questo contesto, è stato messo in evidenza che l'abilità di bioconcentrare il metallo, rilevata in queste specie vegetali nel particolare mezzo di coltura che è l'idroponica, deve essere considerata come una caratteristica potenziale dato che la biodisponibilità del metallo, oltre a quella di nutrienti ed acqua, non è un fattore limitante. Nella nostra esperienza in mesocosmo, rispetto ad esperimenti in idroponica pura, la biodisponibilità del metallo potrebbe comunque essere stata alterata dalla presenza dell'agriperlite, la quale risulta avere un'interazione con il cadmio presente nella soluzione circolante, dal momento che è stata rilevata una concentrazione di cadmio presente nell'agriperlite ed una variazione di questa concentrazione lungo il profilo del mesocosmo (Figura 36).

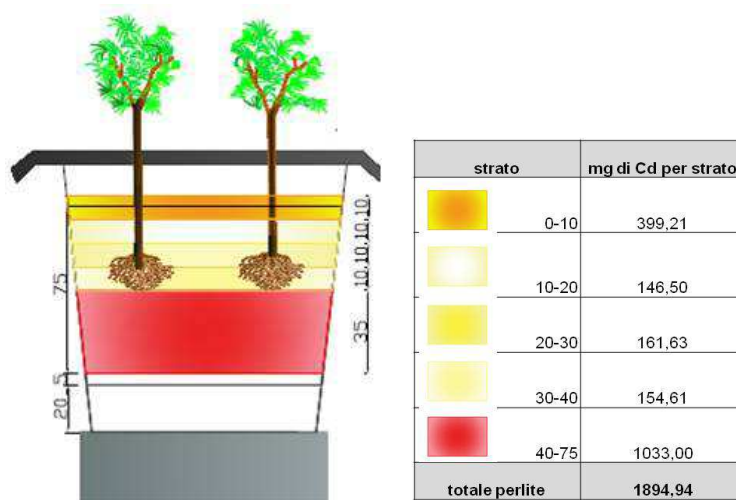


Figura 36. Rappresentazione grafica della distribuzione di Cd lungo il profilo dell'agriperte.

I nostri dati indicano inoltre una modesta capacità di accumulo del metallo nei tessuti fogliari e nella parte aerea più in generale, sia in termini di quantità assoluta che di concentrazione, evidenziando sia mediante il metal translocation index che tramite il translocation factor una ridotta potenzialità dell'ibrido di eucalipto studiato di mobilitare il metallo assorbito nelle radici per essere trasportato alle parti epigee, sia legnose che erbacee. Ciò è in accordo con quanto riportato da Gomes et al. (2012) e Fine et al. (2012), anche per quanto riguarda una più elevata capacità di traslocazione del metallo nelle parti aeree a concentrazioni più basse di cadmio. In questo contesto è ipotizzabile che a livello radicale siano attivi meccanismi di chelazione e immagazzinamento del metallo in strutture subcellulari e cellulari, come riportato per altre specie forestali (Cocozza et al., 2008), limitanti il trasporto ai vasi xilematici e quindi alla parte aerea mediante i flussi traspirativi. Come già richiamato, in questo esperimento nel clone di eucalipto studiato è stata rilevata una bassa quantità assoluta ed una modesta concentrazione di cadmio nelle foglie. In accordo con questo risultato, seppur in condizioni sperimentali differenti (residui minerari contaminati da arsenico) King et al. (2008) hanno riportato come una bassa concentrazione del metalloide arsenico fosse presente nelle foglie di differenti specie di eucalipto. Data la buona tolleranza espressa da queste piante, tali autori pertanto suggerivano per l'eucalipto un possibile ruolo come pianta fitostabilizzatrice in suoli contaminati da arsenico. Anche Mughini et al. (2007) in una prova di valutazione della capacità fitorimediale di specie forestali su terreni contaminati da metalli pesanti mettevano in evidenza basse concentrazioni di arsenico nelle foglie di differenti cloni di ibridi di eucalipto (tra cui *Eucalyptus camaldulensis* x *E. globulus* ssp *bicostata*, l'ibrido utilizzato per la nostra prova), anche se superiori a quanto analizzato nelle foglie di cloni di pioppo e salice. Gli

autori discutevano inoltre circa una maggiore variabilità clonale presente in eucalipto, rispetto alle altre specie forestali saggiate, per quanto riguarda la concentrazione fogliare di arsenico.

Un accumulo preferenziale di metalli nelle radici ed un basso valore di translocation factor è comunemente riportato nelle piante non iperaccumulatrici di metalli (Cosio et al., 2006; Dai et al., 2013; Iori et al., 2013) ed ascrivito ad un meccanismo di tolleranza messo in atto in queste piante per evitare che quantità tossiche di metalli raggiungano gli organi fotosintetizzanti, essendo il processo di fotosintesi molto sensibile alla presenza dei metalli a livello cellulare (Pessarakli, 2001; Prasad, 2004; Pietrini et al., 2010). Pertanto, nelle piante non iperaccumulatrici di metalli, quali le specie forestali, la ridotta quantità di metallo trasportato alle foglie, riducendo notevolmente la possibilità che i sistemi fotosintetici possano venir danneggiati dalla condizione di stress ossidativo indotto dal metallo stesso, può permettere il mantenimento di uno stato fisiologico più idoneo alla crescita della pianta, che risulterà così in grado di estrarre nel tempo ulteriori quantità di metallo dal substrato. Inoltre, la ridotta presenza di metallo nelle foglie è elemento favorevole per evitare una indesiderata mobilitazione del metallo dalle zone più profonde del terreno al cosiddetto top soil dovuta alla caduta delle foglie e alla loro mineralizzazione. Ciò sembrerebbe in apparente contrasto con quanto riportato comunemente riguardo alla necessità di aumentare la capacità di accumulo di metallo nelle parti epigee delle piante utilizzabili per il fitorimedio, in quanto tali parti sono quelle comunemente asportabili tramite raccolta meccanica. In questo contesto, Arriagada et al. (2005) e Zacchini et al. (2009) hanno discusso come l'ideotipo di pianta per la fitoestrazione di metalli da suoli contaminati dovrebbe accumulare tali contaminanti nelle parti legnose non rinnovabili quali il tronco ed i rami. Tuttavia, per utilizzi particolari della tecnologia del fitorimedio, è stato messo in evidenza (Iori et al., 2013) come un'allocazione preferenziale nelle radici non sia un fattore totalmente negativo. Infatti, per scopi di decontaminazione da metalli pesanti di acque contaminate, l'utilizzo delle cosiddette wetlands, dei mesocosmi o di altri sistemi tecnologici per la fitodepurazione di acque, permettendo la raccolta anche della biomassa radicale, rende possibile la rimozione del metallo estratto e confinato nell'apparato radicale. Pertanto l'utilizzo di piante che non accumulano elevate quantità di metalli nelle foglie e che invece concentrano tali contaminanti nelle radici, che possono tollerare il metallo e crescere lungo tutto il periodo vegetativo esplicando la loro attività fisiologica di fitorimozione del contaminante dal substrato acquoso, è da ritenersi vantaggioso per gli scopi di fitodepurazione di acque contaminate da metalli pesanti.

6. CONCLUSIONI

Il recupero di matrici naturali (suoli ed acque) fortemente degradate costituisce un problema di grande urgenza ed attualità. L'aumento dei siti contaminati soprattutto nei paesi industrializzati richiede nuovi approcci tecnologici più efficaci e sostenibili sia dal punto di vista economico che ambientale. Le tecnologie di bonifica tradizionali, ad elevato contenuto ingegneristico, non sempre riescono a soddisfare questi requisiti. Per quanto riguarda la decontaminazione di acque reflue, la fitodepurazione è una tecnica che desta particolare interesse in quanto oltre ad avere basso impatto ambientale e costi ridotti, ha il vantaggio di essere ben accettata dalle comunità locali.

Nella fase di progettazione di un impianto di fitodepurazione è fondamentale la scelta accurata delle specie vegetali da utilizzare, in relazione al tipo di contaminante, alle condizioni di crescita e ai tempi di decontaminazione. Tale scelta può infatti pregiudicare l'efficacia dell'azione fitodepurante. L'individuazione delle specie più adatte alla rimozione/stabilizzazione dell'inquinante non può quindi prescindere da un'adeguata attività di ricerca.

La sperimentazione di un prototipo quale il sistema mesocosmo realizzato presso l'IBAF-CNR ha evidenziato le sue notevoli potenzialità applicative, mostrando però anche alcune problematiche legate alla particolare condizione di coltura.

Come è stato dimostrato nella prima parte della tesi, in termini di ricerca, esso può contribuire allo studio delle relazioni idriche associate alla crescita e produzione di biomassa in piante forestali, in quanto permette la valutazione del quantitativo di acqua realmente evapotraspirata dall'intera pianta. Infatti è stata dimostrata l'effettiva possibilità di far crescere cloni di eucalipto all'interno di un mesocosmo come quello suggerito da questo studio attraverso la valutazione dell'accrescimento delle piante all'interno del sistema, ed all'osservazione della mancanza di sintomi derivanti da stress, come clorosi o necrosi fogliare.

A livello sperimentale-applicativo, il mesocosmo può risultare molto interessante per selezionare genotipi vegetali (specie, varietà, cloni) per la fitodepurazione di acque contaminate da utilizzare in applicazione più estese quali constructed wetlands, ponds, sistemi di lagunaggio.

A causa della elevata produzione di biomassa e della buona capacità di bioaccumulo del cadmio prevalentemente nella radice l'eucalipto rappresenta un valido candidato per la tecnica della fitodepurazione. Infatti l'accumulo prevalente del cadmio nella radice, oltre ad evitare un'alterazione dei processi fisiologici a livello fogliare, con mantenimento nel tempo della capacità di crescita, può rappresentare un fattore importante nell'utilizzo della biomassa legnosa aerea per scopi energetici. Infatti l'eucalipto può essere coltivato mediante una tecnica colturale che permette di sfruttare le capacità di accrescimento e di bioaccumulo di metalli pesanti nella fase giovanile.

Questa tecnica colturale, denominata SRC (Short Rotation Coppice) prevede dei tagli alla base del tronco ad intervalli di tempo molto brevi (1-3 anni).

Con la possibile applicazione del taglio ricorrente della parte aerea, il sistema può svolgere un doppio servizio ecologico, depurando acque contaminate e producendo biomassa per energia. Al termine del ciclo produttivo, l'apparato radicale può essere rimosso dal sistema e trattato come materiale contaminato. Inoltre un sistema di questo tipo presenta numerosi aspetti positivi sia ambientali in riferimento alla possibilità di riutilizzare le acque depurate ed alla riduzione dell'impiego di mezzi chimici, che economici per i numerosi incentivi che in molte regioni d'Italia sono riservati alle colture dedicate a destinazione energetica.

Le piante di eucalipto hanno evidenziato una buona tolleranza al cadmio non mostrando durante ed al termine del periodo di trattamento sintomi di danno a livello dei pigmenti fotosintetici ed alterazioni della concentrazione dei micro- e macro-nutrienti a livello fogliare. La crescita delle piante non è apparsa pertanto influenzata dalla presenza del metallo pesante, essendo la biomassa secca dei vari organi delle piante trattate non statisticamente differente da quella delle piante controllo. La determinazione del cadmio nei vari organi, sia in termini di bioconcentrazione che di accumulo quantitativo, ha mostrato come la quasi totalità del metallo assorbito dalle radici non venga trasferito alla parte aerea e come la componente legnosa di questa ne contenga, sia in termini assoluti che di bioconcentrazione, i livelli più bassi. Il bilancio di ripartizione del cadmio nel sistema mesocosmo ha evidenziato come la maggior parte del metallo rimanga adsorbito all'agriperlite, disponibile per la pianta durante le successive fasi della crescita in un periodo di trattamento più lungo (Figura 37).

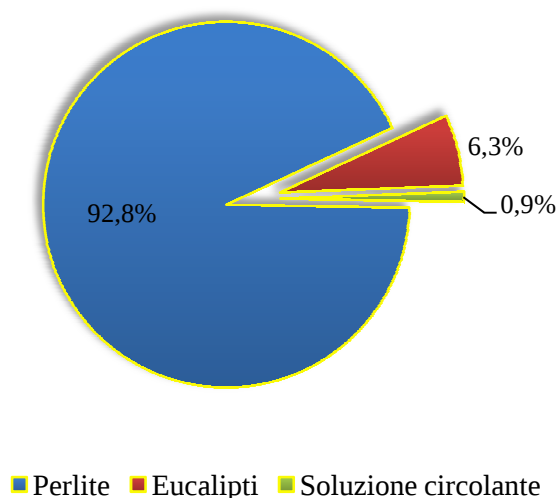


Figura 37. Bilancio di ripartizione del Cd nel sistema mesocosmo

La contaminazione dell'acqua da cadmio nel periodo di trattamento è comunque passata da oltre 900 volte a solo 6 volte superiore ai limiti di legge (5 µg/L).

In termini più generali, nell'ottica di un utilizzo di questa specie per la decontaminazione di suoli e sedimenti, la elevata capacità di concentrare il metallo nella parte radicale e la ridotta traslocazione alla parte epigea rende l'eucalipto una specie più adatta alla fitostabilizzazione piuttosto che alla fitoestrazione, in quanto il cadmio viene immobilizzato e non è più soggetto a fenomeni di lisciviazione con conseguente contaminazione delle acque superficiali e profonde.

Per quanto riguarda l'applicabilità dei risultati ottenuti in questo lavoro, una sperimentazione di più lungo termine con una possibile messa in serie di più mesocosmi potrà fornire risultati più esaustivi sulla capacità del sistema mesocosmo di produrre biomassa vegetale depurando acque reflue contaminate.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adriano D.C., 1992. Biogeochemistry of Trace Metals. Lewis Publisher.
- Aidid S.B., Okamoto H., 1992. Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem: symplast interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*. *Environmental Experimental Botany*, 32, 439-448.
- Albuzio A., Paparelli P., 2007. Note di uso e riciclo di biomasse (seconda edizione). Collana di chimica agraria. Ed. CLEUP.
- Alloway B.J., 1990-1995. Heavy metals in soil. Blackie and Halsted Press.
- Alloway B.J., Ayres, D.C., 1997. Chemical Principles of Environmental Pollution. Second Edition. Ed. CRC Press.
- Alloway B.J., Hird A., Zhang P., Chambers B., Nicholson F., Smith S.R., Calton-Smith C., 1997. The Vulnerability of Soils to Pollution by Heavy Metals. MAFF Open Contract. Unpublished Report.
- APAT CNR-IRSA, 2003. Metodi analitici per le acque. Manuali e linee guida, 29, 145-151.
- Arriagada C., Aranda E., Sampedro I., Garcia-Romera I. and Ocampo J.A., 2009. Interactions of *Trametes Versicolor*, *Coriolopsis Rigida* and the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus Deserticola* on the Copper Tolerance of *Eucalyptus Globulus*. *Chemosphere*, 77, 273–78.
- Arriagada C.A., Herrera M.A., Garcia-Romera I., Ocampo J.A., 2005. Tolerance to Cd of soy bean (*Glycine max*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) inoculated with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Symbiosis*, 36, 285–299.
- Arriagada C.A., Herrera M.A., Ocampo J.A., 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. *Water Air & Soil Pollution*, 166, 31–47.
- Asensio V., Vega F.A., Singh B.R., Covelo E.F., 2013. Effects of Tree Vegetation and Waste Amendments on the Fractionation of Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in Polluted Mine Soils. *Science of the Total Environment*, 443, 446–53.
- Bafeel Sameera O., 2008. Contribution of Mycorrhizae in Phytoremediation of Lead Contaminated Soils by *Eucalyptus rostrata* Plants. *World Applied Sciences Journal*, 5 (4), 490-498.
- Baker A.J.M., Brooks R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1, 81-126.

- Baker A.J.M., Ewart K., Hendry G.A.F., Thorpe P.C., Walker P.L., 2000. The evolutionary basis of cadmium tolerance in higher plants. In: 4th International Conference on Environmental Contamination, Barcelona, 23-29.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R.D., Smith J.A.C., 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N., Banuelos G. (Eds.). Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis, Boca Raton, Florida, 85-108.
- Banuelos G.S., Ajwa H.A., Mackey L.L., Wu C., Cook S., Akohoue S., 1997. Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. J. Environ Qual, 26, 639-646.
- Barbaferi M., 2005. Phytoremediation in Bonifica dei siti contaminati, McGraw-Hill.
- Bargagli R. 1998b. Mosses as passive and active biomonitors of trace elements. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery, 207-236.
- Bargagli R., 1998a. Chemical elements and plants life. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery, 1-21.
- Baszynski T., 1986. Interference of Cd²⁺ in functioning of the photosynthetic apparatus in higher plants. Acta Societate Botanica Poland, 55, 291-305.
- Battaglia A., Calace N., Nardi E., Petronio B. M., Pietroletti M., 2007. Reduction of Pb and Zn bioavailable forms in metal polluted soils due to paper mill sludge addition. Effects on Pb and Zn transferability to barley. Bioresource Technology, 98(16), 2993-9.
- Bert V., Meerts P., Saumitou-Laprade P., Salis P., Gruber W., Verbruggen N., 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in Arabidopsis halleri. Plant Soil, 249, 9-18.
- Bonanni P., Buffoni A., Daffinà R., Silli V., Cirillo M.C., 2006. APAT: Sensibilità del territorio italiano alle deposizioni atmosferiche di cadmio e piombo. 9-11.
- Bonomo L. e Sezenna L., 2005. Criteri per la selezione delle tecnologie. In: Bonifica di siti contaminati. McGraw-Hill.
- Borin M., 2003. Fitodepurazione. Soluzioni per il trattamento dei reflui con le piante. Edagricole, 208.
- Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D., Jaffre T., 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants. J. Geochem. Explor., 7, 49-57.
- Burken J.G. and Schnoor J.L., 1997. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. Environmental Science & Technology, 31, 1399-1406.
- Caiazza M., Viselli R., 2010. Rapporto Bonifiche Federambiente, p. 96.

- Calfapietra C., Gielen B., Galema A.N.J., Lukac M., De Angelis P., Moscatelli M.C., Ceulemans R., Scarascia-Mugnozza G., 2003. Free air CO₂ enrichment (FACE) enhances biomass production in a short rotation poplar plantation. *Tree Physiol.*, 23 (12), 805-14.
- Cannell M.G.R., Smith R.I., 1980. Yields of minirotation closely spaced hardwoods in temperate regions: review and appraisal. *Forest Science*, 26, 415-28.
- CCE (Commissione delle Comunità Europee), 2006. Proposta di “Strategia tematica per la protezione del suolo”, Comunicazione della Commissione al Consiglio, al Parlamento Europeo, al Comitato Economico e Sociale e al Comitato delle Regioni COM(2006)231, Bruxelles.
- Cerruto S.R., 2006. Note semi-brevi in tema di bonifiche. Analisi delle principali novità portate dal D.Lgs. n. 152/2006 reperibile al sito internet www.ambientediritto.it
- Ceulemans R., Scarascia-Mugnozza G., Wiard B.M., Braatne J.H., Hinckley T.M., Stettler R.F., Isebrands J.G., Heilman P.E., 1992. Production physiology and morphology of *Populus* species and their hybrids grown under short rotation. Clonal comparisons of 4-year growth and phenology. *Canadian Journal of Forest Research*, 22, 1937-48.
- Chakir A., Bessiere J., Kacemi K.E., Marouf B., 2002. A comparative study of the removal of trivalent chromium from aqueous solutions by bentonite and expanded perlite. *Journal of Hazardous Materials*, B 95, 29-46.
- Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Angle J.S., Baker A.J.M., 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 279-284.
- Chang P., Kim J.Y., Kim K.W., 2008. Concentration of arsenic and heavy metals in vegetation at two abandoned mine tailings. *SILVAE - Anno VII n. 15/18* - 141
- Chesterman C.W., 1975. *Industrial minerals and rocks*. 4th edition. AIME, New York, 927.
- Cima R., 2007. Fitodepurazione: interventi ad impatto ambientale positivo. Inquadramento legislativo.
- Clemens S., 2001. Phytochelatins and metallothioneins: role in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Physiology*, 53, 159-182.
- Clijsters H., Vangronsveld J., Van Der Lelie N., Colpaert J., 2000. Ecological aspects of phytostabilization of heavy metal contaminated soils. In: Ceulemans R., Bogaert J., Deckmyn G., Nijs I. (Eds.). *Topics in Ecology, Structure and Functions in Plants and Ecosystems*. University of Antwerp, UIA, Wilrijk, Belgium, 299-306.
- Cobbett C.S. and Goldsbrough P.B., 2000. Mechanisms of metal resistance: phytochelatins and metallothioneins. In: *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*, ed. I Raskin, BD Ensley, 247–71. New York. Wiley.

- Coccozza C., Minnocci A., Tognetti R., Iori V., Zacchini M., Scarascia-Mugnozza G., 2008. Distribution and concentration of cadmium in root tissue of *Populus alba* determined by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray microanalysis. *iForest–Biogeosciences and Forestry*, 1, 96–103.
- Cosio C., Vollenweider P., Keller C., 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of tolerant willows (*Salix viminalis* L.). Part I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 64–74.
- Cunningham S.D., Berti W.R., 2000. Phytoextraction and phytoestabilization: technical, economic, and regulatory considerations of soil-lead issue. In: Terry N., Banuelos G. (Ed.). *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Boca Raton: Lewis Publishers, 359-376.
- Dai H.-P., Shan C.-J., Jia G.-L., Yang T.-X., Wei A.-Z., Zhao H., Wu S.-Q., Huo K.-K., Chen W.-Q., Cao X.-Y., 2013. Responses to Cadmium Tolerance, Accumulation and Translocation in *Populus × canescens*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(4), 1-9.
- Degraeve N., 1981. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutation Research*, 86, 115–135.
- Di Baccio D., Tognetti R., Sebastiani L., Vitagliano C., 2003. Responses of *Populus deltoides* x *P. nigra* (*P. x euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytologist*, 159, 443-52.
- Dickinson N.M., 2000. Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. *Chemosphere*, 41, 259-63.
- Dickinson N.M., Lepp N.W., 1997. Metals and trees: impacts, responses to exposure and exploitation of resistance traits. In: Prost, R. (Ed.), *Contaminated soils: the 3rd International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*. Paris: INRA 247-254.
- Dickinson N.M., Turner A.P., Watmough S.A., Lepp N.W., 1992. Acclimation of Trees to Pollution Stress: Cellular Metal Tolerance Traits, *Annals of Botany*, 70 (6), 569-572.
- Dickmann D.I., Stuart K.W., 1983. *The culture of poplars in Eastern North America*. Michigan State University Publications, East Lansing, Michigan.
- Dixit V., Pandey V., Shyam R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot.*, 52, 1101–1109.
- Dos Santos Utmazian M.N., Wieshammer G., Vega R., Wenzel W.W., 2007. Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willow and poplars. *Environmental Pollution*, 148, 155-65.
- Driessen J.H.A., Moura M.L., Korzilius E.P.A., van der Sloot H.A., 1995. The Sustainable Landfill, 15-24.

- 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 & Technology* 29, 1239-1245.
- Duxbury T., 1985. Ecological aspects of heavy metal responses in micro-organisms. *Advances in Microbial Ecology*, 8, 185-235.
- Engel A., Goldthwait S., Passow U., Alldredge A., 2002. Temporal coupling of carbon and nitrore dynamics in a mesocosm diatom bloom. *Limnology Oceanographic*, 47(3), 753-761.
- Evanko C., Dzombak D.A., 1997. Remediation of metals-contaminated soils and groundwater. GWRTAC (Ground Water Remediation Technologies Analysis Center), Pittsburg, PA.
- Evans G.M. and Furlong J.C., 2003. Contaminated land and bioremediation in *Environmental Biotechnology: theory and application*, John Wiley & Sons Ltd., 89-111.
- Ferguson C.C., 1999. Assessing Risks from Contaminated Sites: Policy and Practice in 16 European Countries. *Land Contamination & Reclamation*, 7, 33-54.
- Fernández J., Zacchini M., Fleck I., 2012. Photosynthetic and Growth Responses of Populus Clones Eridano and I-214 Submitted to Elevated Zn Concentrations. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 77–86.
- Fine P., Rathod P.H., Beriozkin A., Mingelgrin U., 2013. Uptake of cadmium by hydroponically grown, mature Eucalyptus camaldulensis saplings and the effect of organic ligands. *Int J Phytoremediation*, 15, 585-601.
- Galardi F., Corrales I., Mengoni A., Pucci S., Barletti L., Barzanti R., Arnetoli M., Gabbrielli R., Gonnelli C., 2007. Intra-specific differences in nickel tolerance and accumulation in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 377-384.
- Gallagher F.J., Pechmann I., Bogden J.D., Grabosky J., Weis P., 2008. Soil metal concentrations and vegetative assemblage structure in an urban brownfield. *Environmental Pollution*, 153, 351-361.
- Gallini L., 2000. Comportamento chimico e mobilità di alcuni metalli pesanti in un'area circostante una fonderia. Tesi di Dottorato. Università di Torino.
- Gaudet M., Pietrini F., Beritognolo I., Iori V., Zacchini M., Massacci A., Scarascia Mugnozza G., Sabatti M., 2011. Intraspecific variation of physiological and molecular response to cadmium stress in *Populus nigra* L. *Tree Physiology*, 31, 1309-1318.
- Ghosh M., Singh S.P., 2005. A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. *Environmental pollution*, 133, 365-71.
- Gomes M.P., Marques T.C.L.L.S.M., Carneiro M.M.L.C, Soares Â.M., 2012. Anatomical characteristics and nutrient uptake and distribution associated with the Cd-phytoremediation

capacity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12, n.3, 481-496.

- Greger M., Landberg T., 1999. Use of willow for Phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation*, 2, 1-10.
- Gregersen P., Brix H., 2001. Zero-discharge of nutrients and water in a willow dominated constructed wetland. *Water Science & Technology*, 44, 407-412.
- Gullner G., Komives T., Rennenberg H., 2001. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing g-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *The Journal of Experimental Botany*, 52, 971-979.
- Gupta R., Ahuja P., Khan S., Saxena R.K., Mohapatra H., 2000. Microbial Biosorbents: Meeting Challenges of Heavy Metal Pollution in Aqueous Solutions. *Current Science*, 78, 17-21.
- Hansen E.A., 1991. Poplar woody biomass yields: a look to the future. *Biomass and Bioenergy*, 1, 1-7.
- Hinchman R.R., Negri M.C., Gatliff E.G., 1996. Phytoremediation using green plants to clean up contaminated soil, groundwater and wastewater. In: "Phytoremediation" Argonne National Laboratory Applied Natural Sciences, Inc 1-10.
- Holleman A.F. and Wiberg E., 1985. *Lehrbuch der anorganischen chemie*. Walter De Gruyter, Berlin 868.
- Iori V., Pietrini F., Massacci A., Zacchini M., 2012. Induction of Metal Binding Compounds and Antioxidative Defence in Callus Cultures of Two Black Poplar (*P. nigra*) Clones with Different Tolerance to Cadmium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108, 17-26.
- Iori V., Zacchini M., Pietrini F., 2013. Growth, Physiological Response and Phytoremoval Capability of Two Willow Clones Exposed to Ibuprofen under Hydroponic Culture. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 796–804.
- Ives A.R., Foufopoulos J., Klopfer E.D., Klug J.L., Palmer T.M., 1996. Bottle or big-scale studies: how do we do ecology?. *Ecology*, 77, 681-685.
- Jacquemoud S., Ustin S.L., 2003. Application of radiative transfer models to moisture content estimation and burned land mapping. *Proc. 4th Int. Workshop on Remote Sensing and GIS Applications to Forest Fire Management, Ghent (Belgium)*, 5-7 June 2003, 3-12.
- Jordahl J.L., Foster L., Schnoor J.L., Alvarez P.J.J., 1997. Effect of Hybrid Poplar Trees on Microbial Populations Important to Hazardous Waste Bioremediation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(6), 1318-1321.

- Kabata-Pendias A., 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd edition. CRC Press, Ann. Arbor, 365.
- Kadlec R.H., Knight R.L., 1996. Treatment wetlands. New York, CRC Lewis Publishers, Boca Rator.
- Karavaiko G.I., Rossi G., Agates A.D., Groudev S.N., Avakyan Z.A., 1988. Biogeotechnology of Metals: Manual. Center for International Projects GKNT, Moscow, Soviet Union.
- King D.J., Doronila A.I., Feenstra C., Baker A.J., Woodrow I.E., 2008. Phytostabilisation of arsenical gold mine tailings using four Eucalyptus species: growth, arsenic uptake and availability after 5 years. *Science of the Total Environment*, 406, 35-42.
- Knight R.L., 1997. Wildlife habitat and public use benefits of treatment wetlands. *Water Science and Tecnology*, 35 (5), 35-43.
- Kramer U., 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current opinion in Biotechnology* 16, 133-141.
- Krupa Z., Oquist G., Huner N.P.A., 1992. The influence of cadmium on primary photosystem II photochemistry in bean as revealed by chlorophyll fluorescence – a preliminary study. *Acta Physiologia Plantarum*, 14, 71-76.
- 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 & Technology*, 29, 1232-1238.
- La Rocca F., 2005. Biomarcatori e bioindicatori nella valutazione della qualità delle acque interne. Tesi di Laurea.
- Langholtz M., Carter D.R., Rockwood D.L., Alavalapati J.R.R., Green A., 2005. Effect of Dendroremediation Incentives on the Profitability of Short-Rotation Woody Cropping of Eucalyptus Grandis. In: *Forest Policy and Economics*, 806-17.
- Lasat M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, 31, 19-20.
- Laureysens I., Blust R., De Temmerman L., Lemmens C., Ceulemans R., 2004. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution*, 131, 485-94.
- Lebaron P., Servais P., Troussellier M., Courties C., Muyzer G., Bernard L., Schäfer H., Pukall R., Stackebrandt E., Guindulain T., Vives-Rego J., 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: change in abundances, activity and composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 255-266.

- Legambiente e Wwf, 2004. Lo stato di salute del mare. Elaborazione dei dati del piano triennale di monitoraggio marino-costiero 2001-2004 del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio. Roma, 1-56.
- Lewandowski I., Schmidt U., Londo M., Faaij A., 2006. The economic value of the phytoremediation function- Assessed by the example of cadmium remediation by willow (*Salix ssp.*). *Agricultural systems* 89.
- Licht L.A., Isebrands J.G., 2005. Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. *Biomass and Bioenergy*, 28, 203-218.
- Lunackova L., Sotnikova A., Masarovicova E., Lux A., Stresso V., 2004. Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. *Biologia Plantarum*, 47 (3), 403-411.
- Macpherson G., 1995. Home-grown energy from short-rotation coppice. Farming Press Books, Ipswich, UK.
- Mancuso S., Pandolfi C., Azzarello E., Mugnai S., 2004. Fitorimediazione, bonificare con le piante. Quaderno informativo n.1 progetto FITOMED, 3-12.
- Marinho L.E.D.O., Coraucci Filho B., Roston D.M., Stefanutti R., Tonetti A.L., 2013. Evaluation of the Productivity of Irrigated *Eucalyptus grandis* with Reclaimed Wastewater and Effects on Soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225 (1), 1830.
- Marmiroli M., Pietrini F., Maestri E., Zacchini M., Marmiroli N., Massacci A., 2011. Growth, physiological and molecular traits in *Salicaceae* trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. *Tree Physiol Tree Physiology*, 31, 1319-1334.
- Marmiroli N., Maestri E., Tissut M., 2003. Phytoremediation and phytotechnologies: basic data. In: Vanek T., Schwitzguébel J.P (Eds.), *Inventory COST Action 837 view*. Hlavàček tisk, 1-9.
- Massacci A., Pietrini F., Iannelli M.A., 2001. Remediation of wetlands by *Phragmites australis*: the biological basis. *Minerva Biotechnologica* 13, 135-140. *SILVAE - Anno VII n. 15/18*, 143.
- Mattioni C., Gabbrielli R., Vangronsveld J., Clijsters H., 1997. Nickel and cadmium toxicity and enzymatic activity in Ni-tolerant and non-tolerant populations of *Silene italica*. *Pers. Journal of Plant Physiology*, 150, 173-177.
- McComb J.A., Meddings R.A., Siemon G., Davis S., 2004. Wood density and shrinkage of five-year-old *Eucalyptus camaldulensis* × *E. globulus* hybrids: preliminary assessment. *Australian Forestry* 67 (4), 236-239.
- McGrath S.P. and Zhao F.J., 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 277-28.

- McGrath S.P., Shen Z.G., Zhao F.J., 1997. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant Soil*, 188, 153-59.
- Mhatre G.N., Pankhurst C.E., 1997. Bioindicators to detect contamination of soils with special reference to heavy metals. In: Pankhurst C., Doube B.M., Gupta V.V.S.R., *Biological Indicators of Soil Health and Sustainable Productivity*, CAB International, New York, 349-369.
- Miceli A., 2001. Fitodecontaminazione e risanamento dei suoli. *Ambiente Risorse Salute*, 77, 21-4.
- Mirsal I.A., 2008. *Soil Pollution. Origin, Monitoring and Remediation*. Second edition. Springer.
- Morselli L., Olivieri P., Brusori B., Passarini F., 2003. Soluble and insoluble fractions of heavy metals in wet and dry atmospheric depositions in Bologna, Italy. *Environmental Pollution*, 124, 457-469.
- Moutsatsou M.G., Matsas D., Protonotarios V., 2006. Washing as a remediation technology applicable in soils heavily polluted by mining-metallurgical activities. *Chemosphere*, 63, 1632-1640.
- Mughini G., Alianiello F., Benedetti A., Mughini Gras L., Gras M.A., Salvati L., 2013. Clonal Variation in Growth, Arsenic and Heavy Metal Uptakes of Hybrid *Eucalyptus* Clones in a Mediterranean Environment. *Agroforestry Systems*, 87, 755-66.
- Mughini G., Facciotto G., Sperandi G., Confalonieri P., Gras M.A., Giorcelli A., Allegro G., 1996. Ricerche sulla selvicoltura a breve rotazione a scopo energetico. Ente Nazionale per l'Energia Elettrica-Centro di Ricerca Ambiente e Materiali, Milano.
- Mughini G., Gras M.A., Facciotto G., 2007. *Eucalyptus* clones selection in central-south Italy for biomass production. In: *Proceedings of the fifteenth European biomass conference and exhibition*, Berlin, 7-11 May 2007, 3.
- Mulligan C.N., Young R.N., Gibbs B.F., 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60, 193-207.
- Newman L.A., Strand S.E., Choe N., Duffy J., Ekuan G., Ruszaj M., Shurtleff B.B., Wilmoth J., Heilman P., Gordon M.P., 1997. Uptake and Biotransformation of Trichloroethylene by Hybrid Poplars. *Environmental Science and Technology*, 31, 1062-1067.
- Niklas K.J., 1994. The Allometry of Safety-Factors for Plant Height. *American Journal of Botany*, 81, 345.
- Nriagu J.O., Pacyna J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature*, 333, 134-139.

- Padmaja K., Prasad D.D.K., Prasad A.R.K., 1990. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedling by cadmium acetate. *Photosynthetica*, 24, 399-405.
- Panaretou B., Piper P.W., 1992. The plasma membrane of yeast acquires a novel heat shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. *European Journal of Biochemistry*, 206, 635-640.
- Pereira Carvalho Neto J., Silva E.B., Campos Santana R., Graziotti P. H., 2011. Effect of NPK fertilization on production and leaf nutrient content of *Eucalyptus* minicuttings in nutrient solution. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35 (1), 249-254.
- Perttu K.L., 1995. Ecological, biological balances and conservation. *Biomass and Bioenergy*, 9, 107-16.
- Perttu K.L., 1999. Environmental and hygienic aspects of willow coppice in Sweden. *Biomass and Bioenergy*, 16, 291-97.
- Pessarakli M., 2001. *Handbook of Plant and Crop Physiology* (2nd ed.). Books in Soils, Plants, and the Environment, Ed. CRC Press.
- Petersen J.E., Chen C.C., 1999. A method for measuring depth-integrated community metabolism in experimental planktonic-benthic ecosystems. *Hydrobiologia*, 391, 23-32.
- Pietrini F., Zacchini M., Iori V., Pietrosanti L., Ferretti M., Massacci A., 2010. Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. *Plant Biology*, 12, 355-363.
- Pietrini F., Zacchini M., Pietrosanti L., Iori V., Bianconi D., Massacci A., 2010. Screening of poplar clones for cadmium phytoremediation using photosynthesis, biomass and cadmium content analyses. *International Journal of Phytoremediation*, 12, 105-120.
- Pilon-Smits E., 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39.
- Pollard A.J., Powell K.D., Harper F.A., Smith J.A.C., 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 1-28.
- Prasad M.N.V., Freitas H.M.O., 2003. Metal hyperaccumulation in plants- Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Journal of Molecular Biology & Genetics*, 6, 276-312.
- Predieri S., Gatti E., 2000. Exploiting in vitro culture for collection clonino and screening plants suitable for phytoremediation. In: Kaltsikes P.J. (Ed.): COST Action 837 Workshop 55-56. Agricultural University of Athens, Hersonissos.
- Pulford I.D., Watson C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees : A review. *Environment International*, 29, 529-540.

- Pyatt F.B., 2001. Copper and lead bioaccumulation by *Acacia retinoides* and *Eucalyptus torquata* in sites contaminated as a consequence of extensive ancient mining activities in Cyprus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50, 60-64.
- Ragan H.A., and Mast T.J., 1990. Cadmium inhalation and male reproductive toxicity. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 114, 1-22.
- Raskin I., Ensley B.D., 2000. *Phytoremediation of toxic metals*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Reilly T.J., 1999. The use of mesocosms in marine oil spill. *Pure Applied Chemistry*, 71, 153-160.
- Riddell-Black D., 1994. Heavy metal uptake by fast growing willow species. In: Aronsson P., Perttu K. (Eds.), *Willow Vegetation Filters for Municipal Wastewaters and Sludges. A Biological Purification System*. Department of Ecology and Environmental Research, Section of Short Rotation Forestry, Uppsala, Sweden, 145-51.
- Riffardi R. and Levi-Minzi R., 1989. Il controllo degli inquinanti in agricoltura. Gli inquinanti organici. *Chimica del suolo*, Patron Editore.
- Rizzi L., Petruzzelli G., Poggio G., Vigna Guidi G., 2004. Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere*, 57, 1039-1046.
- Robinson B.H., Mills T.M., Petit D., Fung L.E., Green S.R., Clothier B.E., 2000. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil*, 227, 301-306.
- Rockwood D.L., Alan W.R., Sally A.R., Zhu J.Y., Jerrold E.W., 2008. Energy Product Options for *Eucalyptus* Species Grown as Short Rotation Woody Crops. *International journal of molecular sciences*, 9, 1361-78.
- Rockwood D.L., Naidu C.V., Carter D.R., Rahmani M., Spriggs T.A., Lin C., Alker G.R., Isebrands J.G., Segrest S.A., 2004. Short-Rotation Woody Crops and Phytoremediation: Opportunities for Agroforestry?. *Agroforestry Systems*, 61-62, 51-63.
- Roote D.S., 2003. Technology Status Report. TS 03-01, GWRTAC (Ground Water Remediation Technologies Analysis Center), Pittsburg, PA.
- Ross S. M., 1994. *Toxic metals in soil-plant systems*. J. Wiley&Sons.
- Rosselli W., Keller C., Boschi K., 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil*, 256, 265-272.

- Russel M., Colglazier E.W., English M.R., 1991. Hazardous Waste Remediation: The task ahead. Waste Management Research and Education Institute. University of Tennessee, Knoxville, T.N.
- Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J., Raskin I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology*, 109, 1427-33.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I., 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643-668.
- Sanità di Toppi L., Gabbrielli R., 1999. Response to cadmium in higher plants: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 105-130.
- Santas R., Korda A., Lianou Ch., Santas Ph., 1998. Community responses to UV radiation. Enhanced UVB effects on biomass and community structure of filamentous algal assemblages growing in a coral reef mesocosm. *Marine Biology*, 131, 153-162.
- Saur E., Nambiar E.K.S., Fife D.N., 1999. Foliar Nutrient Retranslocation in *Eucalyptus Globulus*. *Tree physiology*, 20 (16), 1105-1112.
- Scarascia-Mugnozza G., Ceulemans R., Heilman P.E., Isebrands J.G., Stettler R.F., Hinckley T.M., 1997. Production physiology and morphology of *Populus* species and their hybrids grown under short rotation. II. Biomass components and harvest index of hybrid and parental species clones. *Canadian Journal of Forest Research*, 27, 285-94.
- Schnoor J.L., 2000. Phytostabilization of metals using hybrid poplar trees. In: Raskin I., Ensley B.D. (Eds). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. Wiley, New York, 135-50.
- Schnoor J.L., 2002. Phytoremediation of Soil and Groundwater. Technology Evaluation Report TE 02-01, Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC).
- Schützendübel A., and Polle A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1351-1365.
- Sennerby-Forsse L., Ferm A., Kauppi A., 1992. Coppicing ability and sustainability. In: Mitchell C.P., Ford-Robertson J.B., Hinckley T., Sennerby-Forsse L. (Eds). *Ecophysiology of short rotation forest crops*. Elsevier Applied Science, Oxford, 146-84.
- Shah F.R., Ahmad N., Masood K.R., Zahid D.M., Zubair M., 2011. Response of *Eucalyptus camaldulensis* to exogenous application of cadmium and chromium. *Pakistan Journal of Botany*, 43 (1), 181-189.

- Sharma S.S., and Dietz K.J., 2006. The Significance of Amino Acids and Amino Acid-Derived Molecules in Plant Responses and Adaptation to Heavy Metal Stress. *Journal of experimental botany*, 57, 711-26.
- Siedlecka A., 1995. Some aspects of interaction between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 64, 265-272.
- Siedlecka A., Krupa Z., Samuelsson G., Oquist G., Gardeström P., 1997. Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd:Fe interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35, 951-957.
- Singhal V., Rai J.P.N., 2003. Biogas production from water hyacinth and channel grass used for phytoremediation of industrial effluents. *Bioresource technology*, 86.
- Stegmann R., 1995. Concepts of waste landfilling. In: Christensen T.H., Cossu R., Stegmann R. (Eds.), *Proceedings Sardinia 95, Fifth International Landfill Symposium*, vol. 1 CISA, Cagliari (1995), 3-12.
- Stoltz E., Greger M., 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 47, 271-280.
- Stomp A.M., Han K.H., Wilbert S., Gordon M.P., 1993. Genetic improvement of trees species for remediation of hazardous wastes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 29, 227-32.
- Takeuchi K., Sugimori M., Furukawa S., Fujioka Y., Ishizaka J., 2002. Impacts of CO₂ on microbial communities in a mesocosm experiment. E3-5.
- Tichy R., Grotenhuis J.T.C., Rulkens W.H., 1992. Bioleaching of zinc-contaminated soil with thiobacilli. *Proc. Int. Conf. Eurosols*, Maastricht, The Netherlands.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) 1990. Handbook on in situ treatment of hazardous-waste containing soils - Risk Reduction Engineering Laboratory, Cincinnati, OH.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) Report 2000. Introduction to Phytoremediation.
- Van Assche F., Clijsters H., 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*, 7, 31-40.
- Van Assche F., Clijsters H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment*, 13, 195-206.
- Vögeli-Lange R., Wagner G.J., 1996. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Sci.*, 114, 11-18.

- Vymazal J., 2000. The use of sub-surface constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic: 10 years experience. *Ecological Engineering*, 18, 633-646.
- Wade M.J., Davis B.K., Carlisle J.S., Klein A.K., Valoppi L.M., 1993. Environmental transformation of toxic metals. *Occupational Medicine*, 8, 575-601.
- Wagner G.J., 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy*, 51, 173-212.
- Weigel J.H., 1985. The effect of Cd²⁺ on photosynthetic reaction of mesophyll protoplast. *Physiologia Plantarum*, 63, 192-200.
- Wiedmann T., Minx J., ISA UK Research Report, 2001.
- Zacchini M., Iori V., Scarascia Mugnozza G., Pietrini F., Massacci A., 2011. Cadmium accumulation and tolerance in *Populus nigra* and *Salix alba*. *Biologia Plantarum*, 55 (2), 383-386.
- Zacchini M., Pietrini F., Scarascia Mugnozza G., Iori V., Pietrosanti L., Massacci A., 2009. Metal Tolerance, Accumulation and Translocation in poplar and willow Clones Treated with Cadmium in Hydroponics. *Water, Air, and Soil Pollution*, 197, 23-34.
- Zacchini M., Polcaro C., Donati E., Paris P., Spina S. Massacci A., 2011. Field-Scale Rhizoremediation of a Contaminated Soil with Hexachlorocyclohexane (HCH) Isomers: The Potential of poplars for Enviromental Restoration and Economical Sustainability. In: Golubev I.A. (ed) *Handbook of Phytoremediation*, Chapter 31, Ed. 2011, Nova Science Publishers.
- Zayed A., Gowthaman S., Terry N., 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, 27, 715-21.
- Zerbi G. e Marchiol L., 2004. Fitoestrazione di metalli pesanti - Ed. universitaria Udinese, Udine.
- Zorrig W., Rouached A., Shahzad Z., Abdelly C., Davidian J.C., Berthomieu P., 2010. Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1239-47.

SITI WEB

- <http://dataservice.eea.europa.eu/atlas>
- <http://www.cracma.it/homePage.htm>

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutte le persone che, in modo diverso, mi sono state vicine in questa esperienza di dottorato e hanno contribuito alla riuscita di questo lavoro.

Innanzitutto ringrazio il mio tutor, Dr. Massimo Zacchini, per il supporto scientifico, per l'aiuto, la presenza costante e rassicurante dimostratami in ogni momento in tutti questi anni.

Un particolare ringraziamento va al Dr. Valerio Muzzini, per avermi sostenuta e aiutata, con il quale ho condiviso importanti momenti di confronto e di lavoro.

Un ringraziamento per la preziosissima collaborazione al Dr. Fabrizio Pietrini, alla Dott.ssa Valentina Iori, alla Dott.ssa Daniela Di Baccio e al Dott. Angelo Massacci per aver messo sempre a disposizione la loro esperienza e per l'aiuto concreto e la disponibilità.

Ringrazio inoltre per la collaborazione e la disponibilità il Dott. Giovanni Mughini dell'Unità di ricerca per le Produzioni Legnose fuori Foresta del CRA, il Dr. Claudio Beni e Antonio Barchetti del Centro di Ricerca per lo Studio delle relazioni fra pianta e suolo del CRA, Ermenegildo Magnani e il Dr. Ettore D'Andrea dell' Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale del CNR.

Ringrazio infine tutto il personale dell' Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale per la disponibilità e la cortesia dimostratemi durante questi anni.