

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO



Dipartimento di Scienze dell'Ambiente Forestale e delle sue Risorse (DISAFRI)

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

Ecologia Forestale XXIII Ciclo

**Applicazione sperimentale di Rizorimedio su suoli inquinati
da composti organici: “LE POTENZIALITÀ DELLA SHORT
ROTATION COPPICE (SRC) PER IL RECUPERO AMBIENTALE E LA
SOSTENIBILITÀ ECONOMICA”**

(AGR/05)

Coordinatore: Prof. Paolo De Angelis

Tutor 1: Dott. A. Massacci

Tutor 2: Prof. G. Scarascia Mugnozza

Dottorando: Daniele Bianconi

INDICE

1.INTRODUZIONE

1.1 Aspetti generali

1.2 Le normative in materia di bonifica dei suoli contaminati

1.3 Gli inquinanti organici

1.4 L'esaclorocicloesano (HCH): natura e caratteristiche

1.4.1 Degradazione nell'ambiente

- ✓ In aria
- ✓ In acqua
- ✓ Nel Suolo e nei sedimenti

1.5 Tecnologie di bonifica

1.5.1 Tecnologie di bonifica in Europa

1.5.2 Tecnologie di bonifica in Italia

1.6 Fitorimediazione

1.6.1 Il Rizorimediazione

1.6.2 Rizorimediazione con pioppi

1.6.3 Valutazioni nell'applicazione del fitorimediazione

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

2.1 Area di studio

PARTE 1 - SELEZIONE DI CLONI DI PIOPPO IDONEI AD UNA APPLICAZIONE DI RIZORIMEDIO
CON SHORT ROTATION COPPICE (SRC) SU UN'AREA CONTAMINATA DA
ESACLOROCICLOESANO (HCH)

3. MATERIALI E METODI

- 3.1 Campionamento del suolo
- 3.2 Preparazione del suolo e analisi di C, N e pH
- 3.3 Trattamento del campione di suolo per le analisi microbiologiche
- 3.4 Trattamento dei campioni per le analisi chimiche
 - 3.4.1 Composti organo-clorurati
 - 3.4.2 Analisi del contenuto di metalli pesanti
- 3.5 Selezione in serra di cloni di pioppo
 - 3.5.1 Materiale vegetale
 - 3.5.2 Condizioni di crescita e campionamento
 - 3.5.3 Batteri degradatori di HCH ed inoculo su pioppo
 - 3.5.4 Micorimedio degli isomeri di HCH
 - 3.5.5 Ammendamento con sostanza rilasciante ossigeno (ORC)
- 3.6 Impianto sperimentale (S.R.C.)
 - 3.6.1 Interventi colturali
 - 3.6.2 Stima della produzione di biomassa vegetale
 - 3.6.3 Batteri degradatori di HCH ed inoculo su pioppo
 - 3.6.4 Micorimedio degli isomeri di HCH
 - 3.6.5 Ammendamento con sostanza rilasciante ossigeno (ORC)
 - 3.6.6 Analisi statistica

4. RISULTATI

- 4.1 Caratteristiche chimico-fisiche e biologiche del suolo
- 4.2 Conta delle popolazioni batteriche
- 4.3 Analisi metalli pesanti in suolo
- 4.4 Analisi metalli pesanti del materiale vegetale
- 4.5 Micorimedio degli isomeri di HCH
- 4.6 Analisi chimiche dei composti organo-clorurati
- 4.7 Produzione di biomassa

PARTE 2 - SPERIMENTAZIONE IN SERRA PER INDAGARE LE POTENZIALITÀ DI RIZORIMEDIO DEL CLONE MONVISO

5. MATERIALE E METODI

- 5.1 Condizioni di crescita e campionamento
- 5.2 Funghi micorrizici
- 5.3 Ammendamento con sostanza rilasciante ossigeno (ORC)
- 5.4 Stima della superficie radicale
- 5.5 Scambi gassosi
- 5.6 Stima della produzione di biomassa vegetale
- 5.7 Preparazione del suolo e analisi di C, N e pH
- 5.8 Conta delle specie batteriche
- 5.9 Trattamento dei campioni per le analisi chimiche dei composti organo-clorurati
- 5.10 Analisi statistica

6. RISULTATI

- 6.1 Scambi gassosi
- 6.2 Stima della produzione di biomassa vegetale
- 6.3 Effetto dell'esposizione all'HCH sullo sviluppo dell'apparato radicale di pioppo
 - 6.3.1 Superficie totale della radice
 - 6.3.2 Lunghezza totale della radice
- 6.4 Azoto Organico e Azoto Totale
- 6.5 Carbonio Organico e Carbonio Totale
- 6.6 Misure di pH
- 6.7 Carica microbica
- 6.8 Analisi chimiche dei Composti organo-clorurati

7. DISCUSSIONE

8. CONCLUSIONI

9. BIBLIOGRAFIA

10. SITOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1 Aspetti generali

La crescente numerosità dei cosiddetti “disastri ambientali” ha portato i Paesi più avanzati a dover concentrare la loro attenzione sulla tutela dell’ambiente spostando la loro traiettoria di sviluppo verso l’obiettivo della “sostenibilità”. La compromissione delle risorse naturali è stata la conseguenza più grave dell’uso indiscriminato da parte dell’uomo di agenti inquinanti nello svolgimento sia di svariate attività economiche, nell’industria così come nell’agricoltura, sia di molte attività quotidiane destinate a soddisfare i propri bisogni.

Il crescente inquinamento del suolo, dell’aria e dell’acqua trova purtroppo conferma anche in un recente censimento realizzato dall’APAT (Agenzia per la Protezione dell’Ambiente e per i servizi Tecnici, oggi ISPRA) avente per oggetto i siti contaminati. Una riflessione più attenta a portato ha sottolineare che il suolo è una risorsa che sconta un tempo di recupero molto più lungo dell’acqua e dell’aria una volta rimossa la fonte di contaminazione; la causa di ciò è da individuare nei fenomeni di migrazione, trasformazione e ripartizione tra le varie componenti del suolo (gas interstiziale, particelle solide, acqua) che gli inquinanti subiscono una volta rilasciati in esso; tali fenomeni favoriscono l’estensione in termini spaziali e temporali della contaminazione con conseguenze negative sulla fertilità del terreno e sulla probabilità che, con il trascorrere del tempo, si verifichi il trasferimento all’uomo e agli organismi animali e vegetali. L’assunzione di acqua contaminata, l’inalazione di composti vaporizzati e l’ingresso di sostanze tossiche nella catena alimentare genera effetti nocivi sulla salute umana. In particolar modo l’ingresso di organismi vegetali contaminati sia direttamente (consumo vegetali) che indirettamente (consumo di carne, latte ecc.) può determinare il trasferimento all’uomo del 90-95% dei contaminanti presenti nel suolo; l’entità del danno biologico che ne consegue 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.

La contaminazione del suolo può avere conseguenze irreversibili per gli ecosistemi poiché va ad alterare sia il metabolismo dei microrganismi sia il metabolismo delle piante. Molte sostanze chimiche possono infatti indurre cambiamenti radicali della chimica del suolo persino a basse concentrazioni.

Per quanto riguarda il metabolismo delle piante la presenza di inquinanti può alterarlo, diminuendo la produzione e, nei casi più estremi, compromettendo la presenza stessa degli organismi vegetali a favore di fenomeni di erosione del suolo. Alcuni contaminanti chimici inoltre possiedono lunga persistenza, mentre in altri casi si formano dei composti chimici in seguito a reazioni secondarie che avvengono nel suolo stesso.

E' chiaro pertanto che se l'uomo vuole evitare di diventare preda del proprio sistema di sviluppo e crescita la ricerca e l'attivazione di politiche di risanamento e sostenibilità dell'ambiente diventa fondamentale.

1.2 Le normative in materia di bonifica dei suoli contaminati

I problemi relativi alla contaminazione del suolo non sono certamente una novità degli ultimi anni, ma lo è il forte interesse (sebbene non ancora largamente diffuso) rivolto alla tematica ed alle eventuali soluzioni. Fino agli anni '90 del XX secolo mancava un approccio integrato al problema dell'inquinamento delle matrici ambientali, resistendo un approccio per compartimenti (acqua, suolo, aria) che non coglieva pienamente la complessità dei fenomeni (Boschi, 2004). L'interesse tardivo per la problematica dei terreni contaminati da parte dell'opinione pubblica e della comunità scientifica si riflette in una tardiva azione legislativa volta alla difesa ed al recupero del suolo, che a questo punto viene inteso come un bene ambientale, al pari dell'acqua e dell'aria. Se sul fronte della difesa dall'inquinamento si possono fissare vincoli e limiti tesi a non immettere quantità eccessive di inquinanti nel suolo, la questione del risanamento dei siti già compromessi appare particolarmente spinosa. Non che fino agli anni '90 il problema delle bonifiche fosse stato totalmente ignorato: risale al 1972 la preparazione di una Carta del suolo da parte del Consiglio della Comunità Europea; compaiono nel 1982 la World Soil Charter (FAO) e la World Soil Policy (UNEP). Ma è nel 1992, con la Conferenza sulla Terra di Rio de Janeiro, che si aprono nuove prospettive per la tutela dei beni ambientali, in armonia con il principio dello sviluppo sostenibile portato avanti in quest'occasione. Estremamente importante, sul piano dei principi enunciati, è anche la Convenzione di Lugano dell'anno successivo, voluta dal Consiglio europeo, nella quale si definiscono delle responsabilità civili per i danni derivati da attività pericolose per l'ambiente; trova così affermazione il principio PPP, Polluter Pays Principle (chi inquina paga), secondo il quale chi si rende responsabile di danno ambientale è tenuto in

prima persona a risarcire il danno (accollandosi tra l'altro le spese per il ripristino ambientale). Ma la responsabilità di far valere i principi è lasciata ai singoli Paesi dell'Unione Europea, senza una regolamentazione unitaria. Nel 1995 arriva uno studio pilota su nuove tecnologie di decontaminazione di acqua e suolo, realizzato stavolta dalla Commissione sulle sfide della società moderna, creata nel 1969 dalla NATO. Nel 1996 a livello dell'Unione Europea vengono istituiti due network per lo scambio di informazioni e conoscenze su siti contaminati e loro recupero: CARACAS, Concerted Action on Risk Assessment for Contaminated Sites in the European Union (adesso è diventato CLARINET), e NICOLE (Network for Industrial COntaminated Land in Europe), il primo destinato fondamentalmente alle pubbliche amministrazioni, il secondo alle industrie. Nel 1998 l'Agenzia Europea per l'Ambiente (EEA), attraverso l'ETCS (European Topic Center /Soil), pubblica un rapporto sullo stato dell'arte delle bonifiche, evidenziando grande disomogeneità nella situazione dei vari Paesi.

Tirando le somme dell'azione comunitaria dell'ultima dozzina di anni in tema di bonifiche, si nota che ci sono state un'analisi della dimensione del problema, un'attenzione verso la risoluzione di certe singole situazioni, l'espressione di principi generali, la costituzione di reti di contatto e di informazione, ma sono sostanzialmente mancati indirizzi legislativi netti ed adeguate incentivazioni per la ricerca sulle tecniche d'intervento (Boschi, 2004). Riguardo all'Italia, la legislazione nazionale nel campo delle bonifiche si è sviluppata a partire dagli anni '90 sulla scorta delle indicazioni comunitarie. Fino ad allora erano state prese più che altro misure di emergenza legate a situazioni particolarmente compromesse, con riferimento soprattutto alle problematiche relative alla contaminazione da rifiuti. Episodi legislativi comunque significativi sono, negli anni '80, il D.P.R. 915/82 e la legge 441/87, entrambi sullo smaltimento dei rifiuti. In particolare la l. 441/87 ("Disposizioni urgenti in materia di smaltimento dei rifiuti"), indica la necessità di redigere dei Piani di Bonifica relativi alle varie Regioni, demandando a queste tale compito. Tale necessità viene ripresa dal D.M. 185/89 del Ministero dell'Ambiente, "Criteri e linee guida per l'elaborazione e la disposizione, con modalità uniformi da parte di tutte le Regioni e Province autonome dei Piani di Bonifica", che si sofferma sulle modalità di censimento dei siti e di accertamento della loro contaminazione. Ma l'auspicata uniformazione dell'operato delle singole Regioni di fatto non avrà luogo. Nella prima metà degli anni '90 le leggi 132/92 e 133/92 sulla protezione delle acque e la 549/95 sulle discariche abusive segnano ulteriori passi in avanti, ma la vera svolta si ha soltanto nel 1997, col Decreto Legislativo 5 febbraio

1997, n. 22 (decreto Ronchi): “Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/686/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio”. Il decreto introduce alcune chiare definizioni di base, distinguendo tra l’altro fra la messa in sicurezza (contenimento degli agenti inquinanti all’interno del sito degradato, evitando pericoli per l’ambiente esterno e per la salute umana) e la vera e propria bonifica (rimozione degli inquinanti fino a valori limite fissati); inoltre vengono determinati responsabilità ed obblighi riguardo alle azioni di risanamento da intraprendere. Di fondamentale importanza l’articolo 17, al quale si legge: “*Chiunque cagiona, anche in maniera accidentale, il superamento dei limiti di cui al comma 1, lettera a), ovvero determina un pericolo concreto ed attuale di superamento dei limiti medesimi, è tenuto a procedere a proprie spese agli interventi di messa in sicurezza, di bonifica e di ripristino ambientale delle aree inquinate e degli impianti dai quali deriva il pericolo di inquinamento*”. Lo stesso articolo fissa le procedure di riferimento per le operazioni di risanamento (tra cui anche il ripristino ambientale, ossia il riportare l’area a condizioni compatibili con quelle dell’ambiente circostante), con tutta una serie di scadenze che il soggetto responsabile è tenuto a rispettare. Dal decreto vengono inoltre specificati funzioni e contenuti dei Piani regionali di Bonifica, adesso inquadrati all’interno dei Piani di gestione dei rifiuti. L’anno seguente la legge 426/98, “Nuovi interventi in campo ambientale”, indica alcune aree da bonificare di interesse nazionale, da inserire nel Piano nazionale di bonifica e ripristino ambientale; questo verrà definitivamente adottato con D.M. 18 settembre 2001, n. 468 (ed aggiornato successivamente con l’aggiunta di altre aree per effetto di ulteriori decreti ministeriali). Nel frattempo viene emanato il D.M. 25 ottobre 1999, n. 471, “Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell’articolo 17 del D. Lgs. 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modificazioni e integrazioni”: qui si individuano le aree che necessitano di intervento sulla base del superamento dei valori soglia (valori limite di concentrazione), relativi ai diversi inquinanti ed all’uso del sito (residenziale, ricreativo o verde pubblico oppure industriale e commerciale); qui si specificano le modalità di intervento (notifica, ordinanza comunale, interventi ad iniziativa degli interessati). Da questo decreto emergono indicazioni sulla scelta delle tecniche di decontaminazione, le quali indicazioni, pur non vincolanti, evidenziano chiaramente l’indirizzo caldeggiato dal legislatore: si prospettano metodologie efficaci e dai costi sostenibili, che limitino la movimentazione del suolo inquinato ed il suo smaltimento altrove, e che consentano di

riutilizzare agevolmente il sito dopo l'intervento. Si vuole insomma indirizzare la ricerca verso tecniche in situ a basso impatto ambientale, come la biorimediazione. Questa tendenza è confermata nella "Strategia d'azione ambientale per lo sviluppo sostenibile in Italia", redatta dal Ministero dell'Ambiente nel 2002, la quale peraltro appare in sintonia con il "Sesto programma di azione per l'ambiente", col quale l'UE stabilisce la propria politica ambientale fino al 2010. La ricerca sui metodi di bonifica è sostenuta da finanziamenti pubblici a livello sia comunitario, sia nazionale, sia regionale (Devoto *et al.*, 2004). Sul piano comunitario il VI Programma Quadro, che finanzia la ricerca dal 2002 al 2006, prevede tra le priorità tematiche una che riguarda sviluppo sostenibile, cambiamento globale ed ecosistemi; in particolare si può fare riferimento all'area II (Water cycle, including soil related aspects) e più specificatamente al tema II.2.2 (Water soils system functioning and management). Sul piano nazionale ci si riferisce al Fondo per le Agevolazioni alla Ricerca previsto dal D.Lgs. 297/99 all'art. 5 (per attività di ricerca industriale), ed al Fondo Innovazione Tecnologica previsto dalla l. 46/82 (per programmi di prevalente sviluppo precompetitivo). Si può rilevare comunque che, se la normativa si va ormai definendo, l'applicazione pratica delle tecniche di bonifica, almeno di quelle più innovative come la biorimediazione, è ancora a livello embrionale in Italia; per valutare i risultati si fa riferimento soprattutto ad esperienze straniere, americane più che europee.

1.3 Gli inquinanti organici

Gli agenti di contaminazione del suolo di origine organica, per varietà di caratteri chimici, fonti di provenienza e comportamento nella pedosfera, sfuggono ad una caratterizzazione complessiva. Loro proprietà è quella di potere essere degradati chimicamente o biologicamente, oltre che ampiamente trattenuti sia dalla sostanza organica sia dalla frazione minerale. Tuttavia i ritmi ed i livelli di degradazione sono vincolati da molti fattori, principalmente: temperatura (entro certi limiti, aumenta la velocità di reazione), umidità (se non si arriva vicini a condizioni asfittiche, aumenta la degradazione), tipo di suolo, tipo di molecola inquinante. Con riferimento a quest'ultimo aspetto, si può sottolineare come più la struttura chimica differisce da quelle presenti in natura, più per i processi degradativi sarà difficile aggredirla con successo. La biodegradabilità di un composto può essere quantificata attraverso l'indice I.R., corrispondente al rapporto tra BOD5 e COD, oppure attraverso il tempo di dimezzamento. Tra le classi di inquinanti organici di maggiore importanza si possono

citare: cloroalifatici (come il TriCloroEtilene, forse l'inquinante più diffuso tra i solventi industriali, molto stabile, tossico, cancerogeno), policiclici aromatici (IPA, notoriamente cancerogeni), cloroaromatici (per esempio i PCB, bifenili policlorurati, tra cui la diossina), aromatici volatili (indicati con la sigla BTEX, Benzene Toluene Etilbenzene Xilene), alifatici volatili (derivati del petrolio, non fra i più tossici), fenolici, azotati; sono decisamente dannosi molti pesticidi (tra cui tutti gli isomeri dell'esaclorocicloesano), vari erbicidi (ad esempio, atrazina e bentazone), esplosivi quali TriNitroToluene e nitroglicerina (Lozzi, 2004).

1.4 L'esaclorocicloesano (HCH): natura e caratteristiche

Esaclorocicloesano (conosciuto erroneamente anche come *benzene esaclorato*) è il nome di diversi isomeri strutturali del gruppo degli idrocarburi alogenati.

L'esaclorocicloesano (HCH) e in particolare il Lindano (γ -esaclorocicloesano) è uno dei composti organoclorurati più comunemente incontrato (Sala *et al.*, 1999) considerato che in tutto il mondo, sin dal 1940 sono state usate approssimativamente 10 milioni di tonnellate di HCH tecnico come insetticida (Li 1999)

I composti esaclorocicloesanici sono divisi in isomeri in base all'orientazione degli atomi di cloro presenti sull'anello e vengono nominati antecedendo lettere greche minuscole (Fig.1). Gli altri isomeri strutturali commercialmente conosciuti sono l' α -esaclorocicloesano, il β -esaclorocicloesano e il δ -esaclorocicloesano oltre all' ϵ -esaclorocicloesano, gli isomeri η - e il θ - sono stati trovati solo in un prodotto di laboratorio.

In passato il lindano veniva prodotto tramite clorazione del benzene sotto radiazioni UV. Il processo però produceva 5 dei possibili 8 isomeri, quindi anche una grande quantità di prodotti indesiderati come gli α -, β -, δ - e ϵ -isomeri. Questi risultano più tossici, più difficili da degradare e persino meno importanti come insetticidi che la struttura γ . Il lindano venne prodotto per la prima volta nel 1825 da Michael Faraday. Dalla degradazione termica vengono prodotti fosgene e acido cloridrico.

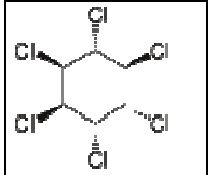
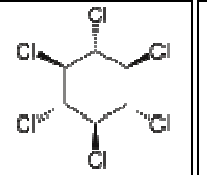
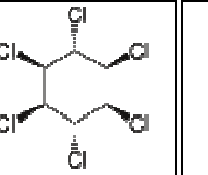
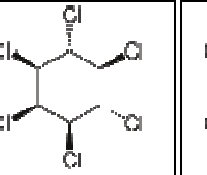
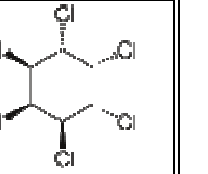
Esaclorocicloesani					
Nome	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	δ -HCH	ϵ -HCH
Formula di struttura					

Figura 1: Formule di struttura degli isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH).

Tabella . Caratteristiche chimico-fisiche del lindano

Numero CAS (Chemical Abstract Service)	58-89-9
Formula chimica	C ₆ H ₆ Cl ₆
Peso Molecolare	290.85
Stato fisico	Cristallo
Bianco Punto d'ebollizione	288°C
Punto di fusione	113°C
Densità	1,85 g/cm ³ a 20° C
Pressione di vapore	0.434 x 10 ⁻² Pa a 20°C
Solubilità in acqua	7, 0-17 mg/l a 25°C
Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua	3,2-3,7
Limite olfattivo	12 mg/l
Limite gustativo	12 mg/l

Figura 2: Caratteristiche chimico-fisiche del lindano (γ -HCH)

E' importante sottolineare che gli isomeri dell'HCH hanno marcate differenze in alcune proprietà chimico-fisiche che ne rendono differente la loro distribuzione, persistenza e tossicità nell'ambiente. La loro produzione avviene durante la sintesi del lindano tecnico (t-HCH) per clorinazione del benzene. Ogni tonnellata di lindano prodotta è accompagnata da 6 a 10 tonnellate di scarto costituito dagli altri isomeri (IHPA, 2006).

Gli isomeri differiscono tra loro per la disposizione assiale o equatoriale degli atomi di cloro sulla molecola del cicloesano. Questa differenza strutturale incide sulle singole proprietà chimico-fisiche e biologiche, isomeri con gli atomi di cloro in posizione assiale risultano essere meno persistenti rispetto agli isomeri con gli atomi in posizione equatoriale, questo è particolarmente evidente soprattutto nel β -HCH che ha tutti e sei gli atomi di cloro orientati in posizione equatoriale (Bachmann *et al.* 1988; Beurskens *et al.* 1991). Si ritiene che questo sia il motivo per cui il β -HCH costituisce l'80% dei residui del lindano tecnico che da più di dieci anni inquina un'area industriale della Germania (<http://www.atsdr.cdc.gov/>).

Bisogna comunque considerare anche che fattori biotici o abiotici possono portare al processo di isomerizzazione con l'interconversione dei diversi isomeri dell'HCH (Malaiyandi *et al.* 1982; Huhnerfuss *et al.* 1992).

La propagazione nell'ambiente dell'HCH non avviene attraverso la via di diffusione dell'acqua in quanto il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log K_{OW}$) è vicino a 4. Bisogna invece tener conto della sua pressione di vapore che a 25°C è $6.3 \cdot 10^{-5}$ mmHg, infatti a queste temperature una parte considerevole del β -HCH può essere rilasciata in

atmosfera ed essere trasportata dal vento per lunghe distanze legata a piccole particelle di polvere (Wania *et al.*, 1999).

1.4.1 Degradazione nell'ambiente

Il lindano tende ad accumularsi nell'ambiente poiché biodegrada lentamente: l'emi-vita varia da 88 giorni a più di tre anni, secondo le condizioni ambientali (tipologia del terreno, profondità nel suolo, clima, ecc.). I prodotti di degradazione più frequentemente trovati sono il g-pentaclorocicloesene, l'esa, il penta, il tetra e il tri-clorobenzene, il penta e il tetra-clorofenolo. Le migliori condizioni di biodegradazione si realizzano in anaerobiosi (emi-vita: 12-174 giorni); in queste condizioni i fenoli non si ritrovano come prodotti di degradazione.

✓ In aria

A causa della loro bassa pressione di vapore gli isomeri dell'HCH (HCHs) sono poco volatili; tra i vari isomeri l' α -HCH e il γ -HCH presentano una volatilità più elevata. L'esaclorocicloesano è degradato nell'atmosfera, quando presente nell'aria, reagendo con radicali idrossilici prodotti fotochimicamente, ma la velocità di reazione non è molto rapida quindi l'HCH (β -HCH) presenta un lungo periodo di vita atmosferica. Non assorbendo a lunghezze d'onda >290 nm, la sua diretta fotolisi non si ritiene rilevante nell'ambiente. In condizioni d'alta temperatura i vari isomeri sono in parte degradati dai raggi UV (processo di dechlorurazione) in pentaclorocicloesene e tetraclorocicloesene. (Traiana *et al.*, 2001).

✓ In acqua

Si pensa che la biodegradazione in acqua sia la degradativa dominante, anche se possono svilupparsi l'idrolisi e la fotolisi. È stato dimostrato che il γ -esaclorocicloesano è degradato da cianobatteri azotofissatori. Questi batteri riducono l'effetto tossico del γ -HCH seguendo ripetute inoculazioni (Kar & Singh, 1979). La dechlorinazione del γ -HCH a γ -pentaclorocicloesene è stata dimostrata in sospensione acquosa di funghi (Machholz & Kujawa, 1985) e colture di alghe (Sweeney, 1969). Il processo di idrolisi dell'esaloricloesano non è considerato efficiente in condizioni neutrali di pH, mentre il γ -esaclorocicloesano è idrolizzato abbastanza rapidamente in condizioni alcaline. L'esaclorocicloesano non contiene cromofori che assorbano luce nella regione uv (>290

nm) quindi non è facile che avvenga fotolisi diretta. Sostanze come gli acidi umici o fulvici sono ben noti agenti fotosensibilizzanti e possono assorbire luce e trasferire energia all'esaclorocicloesano. Sostanze ossidanti comunemente trovate in acqua naturale, come radicali perossidici, radicali idrossilici o ossigeno singoletto sono in grado di degradare HCH in acqua. Va ricordato che la degradazione dei diversi isomeri presenta differenti velocità, nell'ordine $\alpha > \gamma > \beta$. Questo perché un numero maggiore di atomi di cloro in posizione planare nel cicloesano, stabilizza la struttura, fornendo un minore guadagno energetico per qualsiasi processo degradativo, e non offre punti di attacco favorevoli per iniziare il processo degradativo. Quindi i tempi di degradazione, già lunghi per il lindano sono ancora più estesi per i suoi contaminati e sottoprodotti di produzione α - e β -esaclorocicloesano.

La scarsa idrosolubilità del lindano ne favorisce l'assorbimento nella frazione organica del terreno. La molecola è pertanto relativamente immobile (migra lentamente nel suolo) e può essere trasportata solo dalle piogge e dalle acque d'irrigazione. Il suo passaggio nelle acque profonde avviene raramente.

✓ **Nel suolo e nei sedimenti**

Il processo biodegradativo è il principale fattore di degradazione del γ -HCH nel suolo o nei sedimenti, anche se l'idrolisi può risultare rilevante in suoli alcalini umidi. È stato riportato che 71 microorganismi su 147 isolati da terra grassa sono capaci di utilizzare soluzioni di γ -HCH come unica sorgente di carbonio (Tu, 1976). Un batterio della specie delle *Pseudomonas*, isolato da suolo pretrattato, è capace di degradare il γ -HCH e l' α -HCH in 10–20 giorni in condizioni sia aerobiche che anaerobiche (Sahu *et al.*, 1993), ma non il β -HCH. Il β -esaclorocicloesano è l'isomero più persistente, con un tempo di dimezzamento di 184 e 100 giorni, rispettivamente su terreno coltivato ed incolto, seguito dal γ -esaclorocicloesano con 107 e 62.1 giorni, l' α -esaclorocicloesano con 54.4 e 56.1 giorni ed infine il δ -esaclorocicloesano con 33.9 e 23.4 giorni. Una ricerca sul suolo e sulla vegetazione di un terreno circostante un sito di interrimento di rifiuti industriali in Germania, a distanza di 10 anni dall'ultimo scarico di esaclorocicloesano, rivelò la presenza di isomero β compresa tra l'80 ed il 100% del totale HCH residuo (Heinisch *et al.*, 1993).

Il processo biodegradativo include la declorinazione idrolitica con la seguente rottura dell'anello cicloesano ed infine la totale o parziale mineralizzazione (Tsezos M. & Wang X, 1991). La trasformazione abiotica e processi degradativi del γ -HCH, come

degli altri isomeri, nel suolo o nei sedimenti, non si ritengono significativi. Come già discusso, nei processi in acqua, la fotolisi e l'idrolisi non sono considerate importanti vie degradative di tutti gli isomeri dell'esaclorocicloesano, nonostante l'eccezione dell'idrolisi in condizioni alcaline.

1.5 Tecnologie di bonifica

Le tecnologie a disposizione per la bonifica di suoli e acque sotterranee possono essere distinte in tecnologie di tipo biologico, chimico, fisico e termico a seconda del meccanismo su cui si basano.

I trattamenti biologici utilizzano microrganismi per i quali i contaminanti presenti nei suoli, nei sedimenti o nelle acque rappresentano una fonte di nutrimento. Le sostanze inquinanti generalmente vengono degradate in anidride carbonica ed acqua. I trattamenti chimici comprendono reazioni redox in grado di trasformare gli inquinanti in composti meno tossici o meno mobili. I trattamenti fisici sono basati su sistemi in grado di separare il contaminante dalla matrice solida o liquida, concentrarlo e destinarlo poi ad un trattamento finale. I trattamenti termici possono indurre la separazione dell'inquinante mediante desorbimento/volatilizzazione, oppure causarne la distruzione per pirolisi o ancora provocarne l'immobilizzazione mediante fusione della matrice solida nella quale si trovano (Russel *et al.*, 1991; Glass, 1999).

Questi processi possono essere applicati direttamente sul luogo della contaminazione, cioè in situ, o dopo aver effettuato l'escavazione del suolo o del sedimento contaminato, ovvero ex situ. A loro volta i trattamenti ex situ vengono definiti on site se effettuati sul luogo dell'escavazione, off site se è necessario ricorrere ad impianti localizzati altrove.

1.5.1 Tecnologie di bonifica in Europa

Le tecniche di monitoraggio e rimedio ambientale attualmente applicate in Europa sono di tipo fisico, chimico e biologico sebbene gli approcci più frequentemente utilizzati consistono in misure tradizionali come D&D (Dig&Dump), cioè approcci che considerano il suolo come un rifiuto da mettere in sicurezza, non una risorsa da recuperare e riutilizzare (European Environment Agency, 2007).

Per promuovere lo scambio di esperienze tra diversi Paesi Europei, requisito essenziale per creare un network avanzato ed efficiente sul rimedio ambientale, la Comunità Europea ha finanziato diversi progetti alcuni dei quali mirati a sviluppare indicazioni tecniche per una gestione sostenibile e soprattutto per il riutilizzo di siti e sedimenti contaminati (SEDNET, <http://www.sednet.org/>), altri come NICOLE (<http://www.nicole.org/>), *Common Forum for Contaminated Land in Europe*, per sviluppare nuove tecniche sostenibili di rimedio attraverso la cooperazione tra il mondo dell'accademia e il mondo dell'industria e come EURODEMO

(<http://www.eurodemo.info>) il cui scopo era di comparare le tecnologie di rimedio ambientale già usate con successo in Europa e di promuovere quelle più efficaci nel contesto europeo. L'Europa si sta lentamente muovendo verso un approccio coordinato nei confronti della contaminazione ambientale; focalizzando i tentativi nel cercare nuove ed efficaci tecnologie di analisi del rischio ambientale per fornire una più efficace ed affidabile caratterizzazione del pericolo reale; implementando e ottimizzando le tecnologie della *bioremediation* già conosciute e disponibili a realizzare un efficace, economico e sostenibile recupero dei siti prioritari ad alto rischio.

1.5.2 Tecnologie di bonifica in Italia

In Italia per il monitoraggio e la riqualifica dei siti contaminati vengono utilizzate le tecniche convenzionali: il D&D (Dig&Dump) per i suoli e il P&T (Pump&Treat) per le acque.

	Remediation Technology	State	Remediation Technology	State
<i>EX SITU</i>	Dig and Dump/Treatment	XXX	Thermal Desorption	XX
	Incinerating	XX		
	Soil washing	XX	Landfarming	XXX
	Pump and Treat	XXX	Biopile	XXX
	Immobilization	X	Compost	XX
<i>IN SITU</i>	Physical barriers	XXX	Electromigration	X
	Soil vapor extraction	XXX	Thermal treatment	X
	Idraulic Fracturation	X	Chemical Oxydation	XX
	Air sparging	XXX		
	Solidification/Stabilization	X	Bioventing	XXX
	Groundwater Circulation Well (GCW)	XX	Biosparging	XXX
	Multi-Phase Extraction	XXX	Reductive Dehalogenation	X
	Permeabile Reactive Barriers	XX	Monitored natural attenuation	XX
	Soil flushing	XX	Phytoremediation	XX

Tabella 1: Quadro riassuntivo delle differenti tecnologie applicate in Italia per il recupero di suoli contaminati. XXX = ampiamente applicato; XX = applicato solo in alcuni casi; X = applicato sperimentazioni pilota

Tuttavia negli ultimi anni si è registrato l'uso sempre più frequente di moderne tecnologie di recupero, la Tab. 1 mostra le tecnologie di recupero attualmente utilizzate in Italia per gestire i siti contaminati.

Prevale l'approccio *ex-situ*: il D&D per il suolo e il P&T per l'acqua sono caratterizzate da una bassa sostenibilità ambientale perché gli inquinanti non sono distrutti, ci sono

pericoli legati alla possibile mobilitazione degli inquinanti e il comparto inquinato (suolo o acqua) non riacquista le sue condizioni originali. Sebbene di recente ci siano stati miglioramenti, l'approccio *in situ* rimane raro ma, quando possibile, da valutare e da preferire (ENI Tecnologie, 2002).

1.6 Fitorimedia

In questi ultimi anni un crescente interesse è stato manifestato verso la possibilità di utilizzare le piante per rimediare a problemi di inquinamento dei suoli e delle acque (Chaney, 1983). Questa tecnologia prende il nome di fitorimedia e comprende tutti quei processi biologici, chimici e fisici che permettono l'assorbimento, il sequestro, la degradazione ed il metabolismo dei contaminanti sia da parte delle piante che dei microrganismi della rizosfera.

Il fitorimedia rappresenta una scelta estremamente interessante nei casi di contaminazione diffusa su ampie superfici, dati i costi ridotti ed il minor impatto ambientale rispetto alle soluzioni tradizionali a maggior contenuto di ingegneria, la minima necessità di intervento da parte di personale specializzato ed il buon livello di "public acceptance" in quanto "tecnologia verde" (Baker e & Brooks, 1989; Cunningham & Berti, 1993; Raskin *et al.*, 1994). Da un punto di vista economico questa tecnologia emergente risulta 2-5 volte meno onerosa delle tecnologie tradizionali (Flathman *et al.*, 1999). Ad esempio l'EPA (Environmental Protection Agency, USA) fornisce una stima media di circa \$200000 (Cunningham, 1996) per un sito di 4,86 ettari contaminato da piombo e sottoposto per un periodo di 30 anni a tecniche di fitorimedia, contro i \$600000 di un trattamento secondo le tecniche di tipo tradizionale. Lewandowski *et al.* (2006) riportano un costo di circa 1550 €/ha per un impianto di salici destinati al trattamento di un'area contaminata da Cd (tempo previsto dell'intervento: 6 anni). Lo stesso costo è stato stimato per l'uso nello stesso sito dell'iperaccumulatore *Thlaspi caerulescens* contro un costo valutato tra i 280000 ed i 680000 €/ha per l'impiego di trattamenti tradizionali.

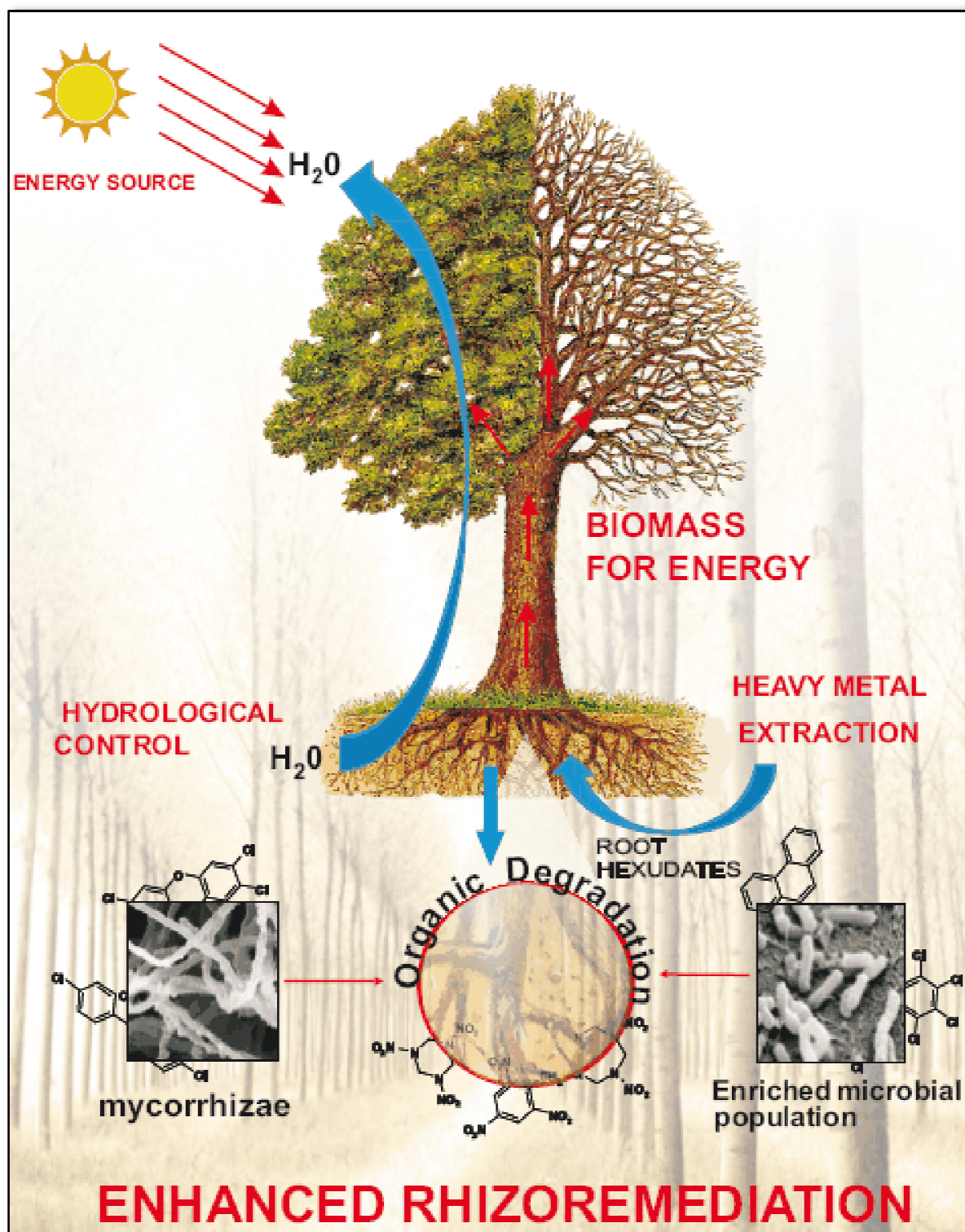


Figura 3: meccanismi biochimici e fisiologici coinvolti nel rizorimediao.

Le piante permettono la decontaminazione da numerosi inquinanti presenti in differenti matrici, attraverso vari meccanismi biochimici (Fig. 3):

- **Rizodegradazione:** degradazione di un contaminante da parte dei microrganismi presenti nella rizosfera, la crescita e l'attività dei quali sono stimulate dai prodotti di fotosintesi essudati dall'apparato radicale (Schnoor et al., 1995);
- **Fitodegradazione:** degradazione di composti organici all'interno della pianta oppure all'esterno mediante enzimi essudati dall'apparato radicale (Newman et al., 1997);
- **Fitoestrazione:** assorbimento dei contaminanti a livello delle radici e successivo immagazzinamento nel fusto e nelle foglie (parti asportabili). Questa tecnica in genere è applicata per i metalli pesanti, di cui viene considerato anche il recupero (Blaylock et al., 1997);
- **Rizofiltrazione:** i contaminanti, presenti in soluzione acquosa, vengono assorbiti o adsorbiti dalle radici. A differenza della fitoestrazione le sostanze inquinanti non vengono traslocate nella parte aerea, rimanendo localizzate nell'apparato radicale. In genere questo meccanismo è applicabile al trattamento di acque contaminate da metalli e radionuclidi in condizioni di bassa concentrazione (Raskin et al., 1997).
- **Fitostabilizzazione:** la maggior parte degli inquinanti organici è lipofila ed interagisce con le superfici idrofobiche delle matrici organiche, come l'humus ed i componenti della parete cellulare delle piante o con le particelle del suolo. Immobilizzando gli inquinanti, le piante li rendono non estraibili né veicolabili agli animali ed all'uomo attraverso la catena alimentare (Cunningham et al., 1996).
- **Fitovolatilizzazione:** assorbimento del contaminante, eventuale trasformazione, e volatilizzazione mediante la traspirazione della pianta. E' indicata per composti volatili e per specie vegetali caratterizzate da elevata evapotraspirazione (Vrobley et al., 1999).
- **Controllo idraulico:** uso delle piante, soprattutto arboree, per rimuovere l'acqua di falda attraverso l'assorbimento ed il consumo allo scopo di controllare e contenere la migrazione dei contaminanti (Suresh & Ravishankar, 2004).

Sebbene il fitorimedio sia una tecnica relativamente recente (tale termine è stato coniato solo nel 1991) ed ancora in una fase di sviluppo, sono state già concluse con successo sperimentazioni, anche dimostrative in pieno campo, di trattamento di varie classi di inquinanti, come solventi organici (es. TCE-Tricloroetilene, il principale inquinante presente nelle acque) (Newman et al., 1997; Shang et al., 2003), esplosivi (es. TNT-

Trinitrotoluene) (Hughes *et al.*, 1997), erbicidi (es. atrazina) (Burken & Schnoor, 1997), idrocarburi (es. gasolio, benzene, toluene e PAH-idrocarburi policiclici aromatici) (Aprill & Sims, 1990; Schnoor *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 2003), metalli pesanti (Blaylock & Huang, 2000; Horne 2000), isotopi radioattivi (Negri & Hinchman, 2000; Dushenkov, 2003).

1.6.1 Il Rizorimedio

Il rizorimedio è un tipo di fitorimedio che prende luogo nella rizosfera attraverso una complessa interazione tra radici (essudati radicali) e microrganismi con i contaminanti (Kuiper *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2003). Per definizione viene indicata la rizosfera il volume di suolo influenzato dall'azione diretta delle radici che si estende approssimativamente per 1-3 mm dalla superficie radicale (Shimp, *et al.*, 1993). Oltre alla capacità di degradare metabolicamente alcuni organici ed estrarre alcuni metalli pesanti, le radici forniscono nutrienti e sostanze in grado di stimolare la crescita microbica e le attività di rimedio ambientale (Cardon & Gage, 2006). Tra queste sostanze possiamo trovare piccole molecole come amminoacidi, acidi organici, zuccheri, fenoli o grandi molecole come mucillagini (polisaccaridi ad alto peso molecolare) e proteine con attività enzimatiche (Cardon and Gage, 2006). Alcune di queste molecole influenzano la rizosfera modificando il suo pH o il suo stato redox e contribuendo significativamente all'apporto di carbonio essenziale per la crescita microbica (El Shatnawi & Makhadmeh, 2001). Tuttavia, altre molecole possono specificatamente indurre o aumentare la degradazione enzimatica di contaminanti organici complessi (Walker *et al.*, 2003). La proliferazione di organismi del suolo in questo comparto di terreno può essere stimata 3-4 volte maggiore rispetto a quella che si sviluppa in suoli non vegetati (ITRC, 2001). La rizosfera può essere considerata come un bioreattore in cui è facilitata la degradazione dei contaminanti organici e la complessazione dei metalli pesanti.

Oltre all'attività degradativa, il complesso di microrganismi del suolo può esercitare la promozione della crescita delle piante, la protezione da agenti patogeni e la produzione di chelanti per l'assorbimento e la traslocazione dei nutrienti essenziali per le piante (Walker *et al.*, 2003; El Shatnawi and Makhadmeh, 2001). A quest'ultimo processo, in alcune specie vegetali, concorrono anche funghi micorrizici associati all'apparato radicale (per esempio nei pioppi). L'infezione di funghi micorrizici sulle radici è definita come una relazione mutualistica in cui i funghi ricevono zuccheri dalla pianta

ospitante in cambio di un incremento nell'assorbimento di nutrienti minerali e contaminanti eventualmente presenti (Quoreshi & Khasa, 2008). Tutte queste attività che prendono atto nella rizosfera e che coinvolgono le popolazioni di batteri autoctoni possono essere indicate come attenuazione naturale. Recenti ricerche hanno dimostrato che tramite l'utilizzo di specifici ammendanti può essere stimolata la crescita e l'attività di questi microrganismi accelerando così il processo di attenuazione naturale. In alcuni casi si è visto che microrganismi isolati dai suoli contaminati, in grado di degradare contaminanti organici, possono essere reinoculati nella rizosfera in concentrazioni elevate (bioaugmentation). L'applicazione di entrambi questi processi alla contaminazione ambientale è ancora limitata, infatti nei pochi casi in cui sono stati preliminarmente sperimentati "*in situ*" per valutarne l'efficienza a fronte di risultati promettenti sono emerse problematiche post-rimedio che devono essere ancora risolte. Una delle maggiori problematiche è legata alla reale biodisponibilità degli inquinanti. Questa dipende dalle proprietà chimiche dell'inquinante, dalla composizione del suolo [pH, potenziale redox, contenuto di materia organica (humus), temperatura, capacità di scambio cationico, composizione chimica e contenuto di acqua (umidità)], dalle condizioni ambientali e dall'attività biologica.

Suoli argillosi, costituiti da particelle di piccole dimensioni sono in grado di trattenere più acqua dei suoli sabbiosi e possiedono un maggior numero di siti di legame per gli ioni, soprattutto i cationi (Taiz & Zaiger, 2002). Anche il contenuto organico (humus) è correlato con la capacità di scambio cationico oltre che con la capacità di legare sostanze inquinanti organiche di natura idrofobica; infatti, l'humus è costituito principalmente di materiale vegetale in decomposizione e le pareti delle cellule vegetali possiedono sia gruppi con carica negativa in grado di interagire con i cationi che lignina capace di legare componenti idrofobici (Burken, 2003). La biodisponibilità degli ioni in genere aumenta in presenza di pH acidi del suolo in quanto viene favorito lo scambio cationi/ioni H^+ ma è influenzata anche dalle condizioni redox. Infatti la maggior parte dei suoli hanno condizioni ossidanti nelle quali gli elementi, che possono esistere in differenti stati di ossidazione, si trovano nella forma ossidata [ad esempio selenato, arsenato, $Cr(VI)$, Fe^{3+}]. Lo stato di ossidazione di un elemento influenza la sua biodisponibilità (ad esempio la sua solubilità), il suo assorbimento da parte della pianta e la sua tossicità. Altre condizioni che influiscono sul movimento dell'inquinante e la sua accessibilità sono la temperatura e il contenuto di acqua nel suolo: in generale

temperature elevate accelerano i processi fisici, chimici e biologici mentre una elevata umidità favorisce il movimento degli inquinanti solubili in acqua.

Nei suoli inquinati la concentrazione delle sostanze tossiche biodisponibili tende a diminuire nel tempo a causa di processi fisici, chimici e biologici. Per tale motivo gli inquinanti presenti nei suoli dopo un lungo periodo di tempo diventano meno disponibili e recalcitranti rendendo più difficile l'applicazione della tecnica di fitorimediazione (Olson *et. al.*, 2003). Conoscere i processi che influenzano la biodisponibilità delle sostanze inquinanti può aiutare ad ottimizzare i risultati della fitoestrazione.

Molti contaminanti, specialmente gli organici, lontano dalla rizosfera diffondono poco e sono scarsamente biodisponibili all'attacco dei microorganismi degradatori. La maggior parte di questi microrganismi sono a metabolismo aerobico e la loro crescita è limitata dalla scarsità di ossigeno nel suolo già alla profondità di 0.3-0.4 m. Bisogna considerare che le variabili e gli imprevisti delle sperimentazioni di rizorimediazione in pieno campo sono numerosi e a volte imprevedibili (Wenzel, 2009), tuttavia gli sforzi per tali ricerche hanno migliorato e continuano a farlo l'efficienza di tali processi eliminando o almeno riducendo questi inconvenienti. Ad esempio la biodisponibilità dei contaminanti, uno dei fattori che maggiormente limita la loro degradazione, può essere aumentata grazie all'applicazione di surfattanti sperimentati idonei da apposite ricerche, molecole antipatiche con una parte idrofobica e una idrofila. Queste molecole sono in grado di abbassare la tensione superficiale e possono formare delle micelle in cui le sostanze che sono genericamente insolubili in acqua, come per esempio gli organici clorurati, possono essere accumulati all'interfaccia e in seguito solubilizzate; la solubilizzazione rende queste molecole più disponibili alla degradazione da parte di microrganismi (Lafrance & Lapointe, 2007). Tuttavia alcuni surfattanti chimici sono loro stessi fonte di contaminazione persistente. Molti microorganismi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, etc.) possono produrre agenti surfattanti strutturalmente diversi, definiti biosurfattanti, i quali sono molto meno dannosi per l'ecosistema grazie alla loro bassa tossicità e alla caratteristica di biodegradabilità. Un ulteriore aiuto per aumentare la biodisponibilità di alcuni contaminanti viene dalla capacità di anastomosi di alcune piante, per esempio i pioppi che vengono selezionati per le piantagioni ad alta densità (i.e. short rotation coppicing, SRC) con 7-8,000 piante ha⁻¹ possono radicare ad una profondità tra 0.80 e 2.43 m (Jordahl *et al.*, 1997; Trapp & Karlson 2001; Zacchini *et al.*, 2008) e già alla fine del primo anno di crescita sono in

grado di formare un tappeto di radici all'interno delle fila (Coleman *et al.*, 2004). Questa rete di radici aumenta le vie di diffusione degli essudati radicali, dei microrganismi, dei nutrienti e dell'ossigeno rendendo i contaminanti più biodisponibili all'attività rizodegradativa.

1.6.2 Rizorimedia con pioppi

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. 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 & Landberg, 1999) e pioppo (Predieri & Gatti, 2000). 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 notevole quantità di biomassa, utilizzabile per la produzione di energia.

Infatti i pioppi ed i salici possono essere coltivati mediante piantagioni a turno breve governate a ceduo (SRC: "short rotation coppice"), caratterizzate da una durata circa 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 per la produzione di calore o energia elettrica (Dickmann & 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 & Watson, 2003).

Gli alberi di pioppo posseggono altre caratteristiche specifiche idonee al rizorimedia: sono piante perenni, di facile propagazione, crescita rapida (soprattutto nella fase

giovanile). Inoltre i pioppi rilasciano nella rizosfera grandi quantità di carbonio organico, infatti come già osservato da Lynch (1987) le piante sono in grado di trasferire circa il 30% dei fotosintati prodotti al terreno e nel caso dei pioppi questa percentuale si è calcolato che arrivi al 35%. Questa capacità di rilasciare grandi quantità di carbonio nel suolo rende l'apparato radicale dei pioppi un luogo ideale, per condizioni di pH e apporto di risorse nutritive, ad ospitare microorganismi in grado di svolgere una vera attività di rizorimediazione di xenobiotici come i contaminanti cloroorganici (Jordahl *et al.*, 1997). Sperimentazioni effettuate sia in campo che in serra hanno evidenziato che i pioppi stessi hanno un ruolo importante nell'uptake e nella degradazione di particolari organici clorurati, potendo ad esempio: degradare il tricloroetilene (TCE) in tricloroetanolo, in acido di e tricloroacetico o persino mineralizzarlo completamente in CO₂ (Gordon *et al.*, 1998); idrolizzare e dealchilare le atrazine in metaboliti meno tossici (Burken & Schnoor 1996, 1997); assorbire e traspirare diossina sia in sperimentazione di crescita idroponica che in suolo (Aitchison *et al.*, 2000); assorbire e traslocare dalle radici ai rami basse quantità di policlorobifenili (PCB) molecole con bassa solubilità in acqua e bassa volatilità (Liu & Schnoor, 2008).

Infine i pioppi hanno un polimorfismo genetico intraspecifico e diversità genetiche, così che un consistente numero di differenti genotipi possono essere disponibili con alta adattabilità sia a una data condizione climatica sia alla tolleranza, accumulo e degradazione di un dato contaminante. Partendo da questa variabilità si può sperimentare in diversi ambienti il materiale vegetale più idoneo per un'applicazione di rizorimediazione di contaminanti organici.

1.6.3 Valutazioni nell'applicazione del fitorimediaio

Una delle principali limitazioni nell'applicazione del fitorimediaio 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 & Rai, 2003) o come fonte di materia prima per l'industria, specialmente nel caso dei pioppi (Licht & Isebrands, 2005).

Il tempo necessario per completare un intervento di bonifica è un altro aspetto critico nell'uso del fitorimediaio 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.

E' evidente che il rizorimediaio porta molti aspetti positivi rispetto alle altre fitotecnologie, per esempio è una tecnologia relativamente a basso costo, che impiegando l'energia solare risulta essere ecosostenibile. Non ha restrizioni di applicazioni su grandi superfici, usa materiale biodegradabile ed è in grado di essere applicata per trattare un largo range di contaminati. Inoltre può essere applicata in tutte le aree geografiche che supportano la vita di specie vegetali. D'altro canto i fattori che evidenziano i limiti del rizorimediaio sono riconducibili alle caratteristiche delle piante impiegate, tra queste le specie arboree risultano essere le più idonee grazie al loro esteso apparato radicale che permette di avere un'efficacia estesa a grandi volumi di suolo.

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).

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

L'associazione di attività di bonifica di suoli inquinati con la produzione di biomassa da utilizzare per scopi energetici è applicata estesamente da diversi anni negli Stati Uniti (Licht & Isebrands 2005). Recentemente anche in alcuni Paesi del Nord Europa sono state finanziate e portate a termine con buon esito sperimentazioni di produzione di bioenergia da pioppo e fitorimediazione in siti industriali dismessi ([http://www. Bioregen. Eu/](http://www.Bioregen.Eu/)).

2.1 Area di studio

La **Valle Latina** o **Valle del Sacco** è una regione del Lazio meridionale, situata in massima parte nella provincia di Frosinone, e per un breve tratto in quella di Roma. È compresa tra i Monti Ernici ed i Monti Lepini ed è attraversata dal fiume Sacco.

L'emergenza ambientale della Valle del Sacco sale alla ribalta solo dopo che il 3 marzo 2005, nel corso di una indagine campionaria prevista dal Piano Nazionale Residui, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT) riscontrò in un campione di latte di un'azienda bovina da latte sita in Gavignano (RM), livelli di **Beta-esaclorocicloesano (β -HCH)** di 0.062 mg/Kg (circa 30 volte superiore ai livelli limite di legge per la matrice considerata, ovvero 0.003 mg/kg) (Centro studi regionale per l'analisi e la valutazione del rischio alimentare, <http://195.45.99.79/csra/>)

A questo evento fanno seguito le indagini del Corpo Forestale e dei NAS che portano al sequestro delle aree di discarica denominate Arpa 1 e Arpa 2 nel Comune di Colleferro, riconosciute come fonte attiva d'inquinamento. A seguito della immediata attivazione di una unità di crisi presso la regione Lazio emergeva che nell'area industriale di Colleferro si produceva nei decenni passati lindano nell'azienda allora denominata SNIA BPD. La ricostruzione degli eventi ha evidenziato un convogliamento di β -HCH presente nei suoli o sottosuoli nell'alveo del fiume Sacco. Le frequenti esondazioni avvenute nell'arco di decenni hanno spesso ricoperto con i sedimenti del fiume i terreni agricoli destinati a foraggio nelle fasce riparie dell'alveo del Sacco. Come rivelato dalle analisi dell'ASL di competenza e come risulta dallo studio della numerosa bibliografia esistente questo inquinante si lega bene ai sedimenti e grazie alla sua liposolubilità ha causato bioaccumulo nella catena alimentare del pascolo ed in quella del fiume ed ha raggiunto la comunità umana attraverso i prodotti caseari.

Questi risultati portarono all'immediata interdizione alle attività agricole nei terreni prossimi al fiume Sacco (Fig.4). La problematica viene quindi affrontata nelle sedi parlamentari con decreto DGR n.540, 19.05.2005 con cui si dichiara " lo stato di emergenza socio-economico-ambientale" della Valle del Sacco e con DGR n.550 del 27.05.2005 veniva prevista una Commissione Tecnica per il "Monitoraggio delle matrici ambientali e degli effetti sulla salute della popolazione nell'area della Valle del Sacco, con il compito di predisporre un piano di iniziative per il monitoraggio delle produzioni animali, delle matrici ambientali e della popolazione. Il sito nel dicembre 2005 è stato inoltre inserito tra i Siti di Interesse Nazionale (S.I.N.) da bonificare.

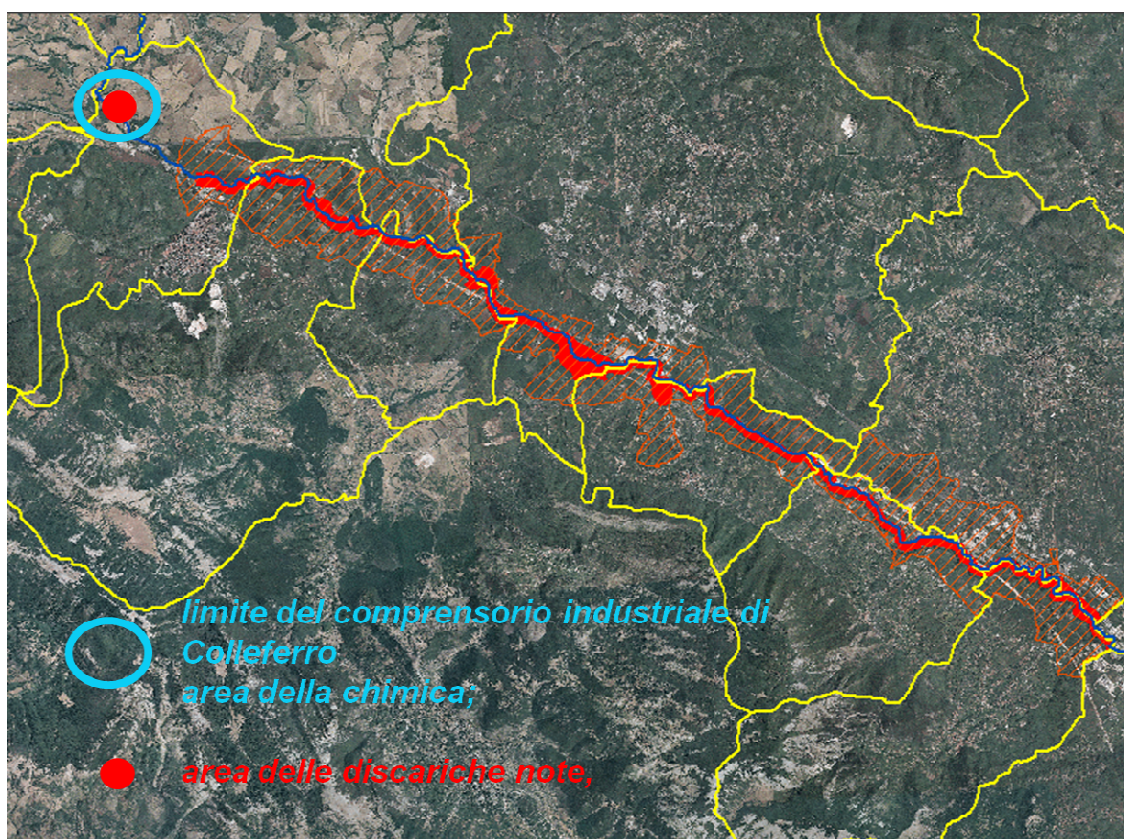


Figura 4: Valle del sacco; aree contaminate interdette all'agricoltura e oggetto della sperimentazione.

Trattandosi di un'area molto estesa, circa 1000 ettari, le attività di bonifica si presentano molto più complesse ed impegnative sia da un punto di vista tecnologico, che ecologico, senonché socio-economico considerato l'elevato numero di piccoli agricoltori che coltiva le aree interdette e che ora si trova sprovvisto di questa fonte di reddito. Proprio per tale ragione sono state valutate le potenziali strategie di decontaminazione di tali aree incluse quelle, innovative ed economicamente più sostenibili di biorimediazione.

Le esperienze maturate in studi di laboratorio ed applicazioni in ambienti contaminati hanno evidenziato che molti cloni di pioppo, utilizzati con efficacia in fitorimedio, spesso conservano una buona produzione di biomassa (tra il 75 e l'80% di quella potenziale). Questi cloni possiedono dei meccanismi protettivi che limitano l'interazione dannosa dei contaminanti con i processi produttivi primari della pianta. E' stato però anche osservato che non tutti i cloni produttivi possono essere utilizzati con efficacia in applicazioni di fitorimedio, infatti una delle caratteristiche più importanti del pioppo è una grande variabilità. Si conoscono circa 30 specie e sono stati descritti ed identificati un numero elevatissimo di ecotipi naturali ed ibridi indotti, in grado di crescere in molte condizioni ambientali anche fortemente contrastanti. E' questa caratteristica che probabilmente rende il pioppo una delle arboree più utilizzate e potenzialmente più efficaci per il fitorimedio dei suoli da contaminanti quali metalli e sostanze organiche. La recente messa a punto di tecniche di selezione rapide e specifiche per individuare il materiale più efficace nell'estrarre o degradare un contaminante e soprattutto la recente costituzione di ricche collezioni di germoplasma disponibile presso l'Università della Tuscia di Viterbo e presso l'IBAF del CNR a Monterotondo Scalo (Roma) hanno permesso di sperimentare applicazioni di pioppi per fitorimedio con buone probabilità di successo.

Si è posto pertanto come obiettivo quello di applicare sperimentalmente il fitorimedio basato sull'uso delle piante arboree, specificatamente i pioppi. Per ovviare ai tempi lunghi della sperimentazione di fitorimedio nella Valle del Sacco ed aumentare le attività di degradazione della rizosfera dei pioppi sono stati valutati diversi trattamenti. In particolare sono state approfondite le capacità degradative di batteri e funghi già studiati dall'Istituto IBAF del CNR in precedenti esperimenti con sostanze organiche clorurate. Inoltre, per aumentare le capacità di recupero naturale del suolo stesso è stato sperimentato un ammendante (ORC) del suolo in grado di rilasciare gradualmente ossigeno in presenza di umidità.

Il secondo obiettivo è stato quello di ottenere contemporaneamente al fitorimedio una produzione di biomassa legnosa qualitativamente e quantitativamente idonea a sostenere processi di filiera di conversione energetica, in modo tale da poter offrire agli agricoltori un parziale indennizzo economico per l'interdizione dei loro terreni dall'esercizio di attività agricole.

PARTE 1 - SELEZIONE DI CLONI DI PIOPPA IDONEI AD UNA APPLICAZIONE DI RIZORIMEDIO CON SHORT ROTATION COPPICE (SRC) SU UN'AREA CONTAMINATA DA ESACLOROCICLOESANO (HCH)

L'attività di messa a punto del trattamento con batteri e funghi e soprattutto la valutazione della loro abilità di associarsi ai vari cloni di pioppo sono state effettuate direttamente in campo dopo aver selezionato in scala di laboratorio (serra) tre cloni di pioppo idonei a tale uso. Questi cloni sono stati scelti tra quelli commercialmente utilizzati in impianti per la produzione di biomassa a fini energetici e già impiegati dal 2005 nelle piantagioni del distretto agro-energetico della Valle dei Latini (ex Valle del Sacco).

PARTE 2 - SPERIMENTAZIONE IN SERRA PER ANALIZZARE LE POTENZIALITÀ DI RIZORIMEDIO DEL CLONE MONVISO

Al fine di poter ottimizzare con opportuni ammendamenti le condizioni di fitorimedio in campo ed accelerare la completa eliminazione dell'HCH dal suolo contaminato e sulla base dei risultati ottenuti dalla selezione in serra e dai risultati della sperimentazione nella Valle del Sacco, il clone Monviso è stato studiato ulteriormente in condizioni controllate per approfondire la conoscenza delle sue potenzialità e le condizioni migliori per la degradazione dell'HCH.

La realizzazione di un programma di biorimedio efficace ha richiesto: a) la conoscenza dell'ecologia, fisiologia e biochimica dell'organismo vivente (microbico e/o vegetale), utilizzato nella trasformazione dell'inquinante, b) un attento protocollo di monitoraggio, mediante indici di qualità affidabili che possano stabilire se il processo di decontaminazione sia avvenuto con successo, c) la progettazione di un programma di intervento appropriato per risolvere il problema in condizioni reali.

PARTE 1 - SELEZIONE DI CLONI DI PIOPPO IDONEI AD UNA APPLICAZIONE DI RIZORIMEDIO CON SHORT ROTATION COPPICE (SRC) SU UN'AREA CONTAMINATA DA ESACLOROCICLOESANO (HCH)

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento del suolo

La procedura di campionamento è stata messa a punto ed adottata per ottenere una caratterizzazione chimica dello stato di contaminazione da isomeri dell'esaclorocicloesano (HCH) del suolo. Le aree indagate sono quelle scelte per la realizzazione del campo sperimentale di Anagni prima dell'impianto di pioppi e durante i trattamenti previsti dall'applicazione di rizorimedio.

Il valore utilizzato come riferimento (bianco) della contaminazione presente nel suolo al momento d'inizio della sperimentazione è stato ottenuto sommando sub-campioni prelevati, tramite trivella manuale (diametro circa 4 cm), in base ad una griglia che coprisse l'intera area di sperimentazione. Il prelievo del suolo è stato effettuato tra i 0 e 0,5 m di profondità (suolo agrario). In seguito alla caratterizzazione iniziale è stato possibile avere un quadro della distribuzione del contaminante sulle superfici indagate e poter così sviluppare un piano di campionamento e monitoraggio (2009-2010) che tenesse conto della grande variabilità dei livelli di contaminazione nelle singole parcelle sperimentali oggetto di studio. L'effetto dei vari trattamenti è stato determinato campionando la rizosfera delle piante nelle parcelle. Ogni valore è da considerarsi la media di quattro campioni.



3.2 Preparazione del suolo e analisi di C, N e pH

Per determinare la granulometria del suolo e la conseguente tessitura si è proceduto alla separazione fisica delle particelle di suolo. La frazione fine costituita da limo e argille è stata separata dalla sabbia sulla base di sedimentazione in acqua seguendo il metodo descritto da Fontaine *et al.* (2000).

Per la misura del pH (HI9321 pH meter, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) 10 g di suolo essiccato in stufa a 60°C e setacciato sono stati messi in agitazione per 2 h all'interno di un beaker contenente 25 ml di KCl 1M.

Le analisi del Carbonio (organico e totale) e dell'Azoto (organico e totale) sono state eseguite con un Elemental analyser (Carlo Erba CHNS 1108, Rodano, Italy) su aliquote di suolo setacciato ed essiccato in stufa a 60°C posto all'interno di capsule di argento e alluminio.

3.3 Trattamento del campione di suolo per le analisi microbiologiche

Al fine di ottenere il rilascio dei microrganismi presenti nei microaggregati di terreno, 5 g di suolo campionato nell'area di studio alla profondità di c.a. 25 cm sono stati sospesi in 45 ml di una soluzione sterile 0.1% di $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pH 7.0), in presenza di sfere di vetro, dal diametro di circa 3 mm e posti su tavolo a scosse a 150 rpm per 2 h a 28°C. Da questa sospensione sono state preparate le diluizioni decimali seriali in soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9%). Sono state effettuate piastrazioni su terreno colturale Estratto di Terra agarizzato (ET), seguendo le tecniche classiche descritte nei Metodi di analisi microbiologica del suolo del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Le piastre sono state incubate a 28°C per 7 giorni e la conta batterica è stata espressa in colony forming units (CFU) per grammo di peso secco di suolo determinato essiccando a peso costante la sospensione di suolo a 80°C.

3.4 Trattamento dei campioni per le analisi chimiche

3.4.1 Composti organo-clorurati

Il campione di suolo essiccato a temperatura ambiente è stato macinato mediante mortaio (criomacinazione con azoto liquido) per ottenere un'aliquota omogenea di campione e successivamente setacciato su vaglio da 2 mm. E' stata quindi pesata

un'aliquota di circa 10 g di campione in una vial da 60 ml: a questa è stata aggiunta terra di diatomee (per migliorare il contatto del solvente con il campione).

Per valutare il recupero degli analiti durante la fase di estrazione alle vial contenenti il terreno sono stati aggiunti i surrogati richiesti dal metodo. Il solvente (acetone-esano in rapporto 1 a 1) è stato aggiunto dopo un tempo prestabilito (1 ora, per dare tempo ai surrogati aggiunti di divenire parte della matrice).

La fase di estrazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di un apparecchio ad ultrasuoni (preparativa EPA 3550 C 2007). Sono stati eseguiti due cicli di estrazione della durata di 40 minuti, la fase organica recuperata dalle due estrazioni è stata riunita in un'unica aliquota e concentrata a piccolo volume sotto flusso di azoto a temperatura controllata.

Successivamente è stata eseguita la fase di purificazione facendo passare l'estratto organico ottenuto in cartucce di "Fluorisil" (che consentono di eliminare la maggior parte delle impurezze di natura vegetale che potrebbero interferire nell'analisi strumentale). L'estratto purificato è stato quindi eluito mediante un'opportuna miscela organica e ridotto a piccolo volume mediante flusso di azoto. Sono stati aggiunti i riferimenti interni utilizzati per valutare il volume finale e l'iniezione strumentale.

I campioni così preparati sono stati iniettati in un sistema gascromatografico dotato di rivelatore massa a triplo quadrupolo (GC-MS/MS); la determinazione viene eseguita in modalità a monitoraggio di reazione multiplo (MRM) (EPA Metodo EPA 8270D-2007).

La calibrazione strumentale è stata eseguita iniettando 5 soluzioni di materiali di riferimento. Il controllo strumentale è stato effettuato, come da metodo, iniettando sia una soluzione di materiale di riferimento di altro fornitore (ICV) sia dei campioni fortificati (LCS). La purezza dei solventi e l'assenza di contaminazione durante tutto il processo è controllata mediante dei "bianchi" di processo.

3.4.2 Analisi del contenuto di metalli pesanti

Il contenuto di As, Zn, V e Pb è stato determinato mediante Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AA) con fornetto a grafite (Spectra A-800 della Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) dopo che i campioni abbiano subito un processo di mineralizzazione (TMD20 Velp Scientifica). Le metodologie di digestione e preparazione del campione analizzato sono state diverse a seconda del tipo di matrice indagata:

- suolo

Per l'analisi del suolo i campioni seccati a 60°C sono stati macinati e setacciati e la determinazione del contenuto di metalli è stata condotta sulla frazione <2 mm. A 1 gr (peso secco) di campione sono stati aggiunti 3 ml H₂O₂ (35%), 9ml di HCl (37%) e 3 ml di HNO₃ (acqua regia, 65%) e la mineralizzazione è stata effettuata per 2 ore a 170°C con una scala graduale di 30 minuti.

- materiale vegetale

Per il materiale vegetale i campioni sono stati conservati a 80°C e poi macinati. Per la mineralizzazione a 500 mg di campione (peso secco), finemente tritato, sono stati aggiunti 5 ml di HNO₃ (65%) e 2 ml di HClO₄ (60%). La mineralizzazione è stata fatta mantenendo i campioni per 6 ore a 280°C dopo una rampa graduale di 3 ore. Soluzioni standard sono state utilizzate per garantire l'accuratezza e la precisione delle analisi.

3.5 Selezione in serra di cloni di pioppo

3.5.1 Materiale vegetale

Sono stati utilizzati i seguenti cloni del genere *Populus* presenti nella collezione di germoplasma disponibile presso il Dipartimento DISAFRI dell'Università della Tuscia (VT) ed il campo-collezione dell'Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale (IBAF) del CNR a Monterotondo Scalo (RM):

Populus deltoides v. **LUX**

Populus x euramericana v. **San Martino** e **I-214**

Populus x canadensis v. **AF2**

Populus x generosa X *Populus nigra* v. **AF6**; **AF8** e **Monviso**



Figura 5: coltura idroponica

3.5.2 Condizioni di crescita e campionamento

Per ciascun clone sono state utilizzate venticinque talee di 20 cm di lunghezza (Fig.5) , ottenute da polloni di ~ 2 m, poste a radicare in vasi contenenti una soluzione di Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) giornalmente rinnovata per mantenere costanti le concentrazioni di nutrienti ed ossigeno. Il materiale vegetale è stato tenuto in coltura

idroponica per 5 giorni all'interno di una camera di crescita (fig.) alle seguenti condizioni:

- Temperatura: 23 °C;
- umidità relativa: 70-80%;
- fotoperiodo: 14 ore;
- irradianza: 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Alla fine di questa procedura le talee , sono state poste in serra in vasi contenenti 2,5 kg di terra setacciata. Per valutare le reali possibilità applicative di questa sperimentazione il suolo utilizzato per la preparazione dei vasi è stato prelevato direttamente dalle aree contaminate da HCH e oggetto della successiva sperimentazione in campo.

Sono state inoltre sperimentati gli effetti di associazioni tra pioppi e microrganismi: due ceppi batterici di *Arthrobacter* e una cultura fungina di *Pleurotus ostreatus* (Rigas F. *et al.*, 2005) con note ed elevate capacità di metabolizzare la molecola inquinante nelle sue diverse forme isomeriche.

L'irrigazione è stata effettuata inizialmente con una miscela nutriente ed in seguito con acqua, mantenendo un'umidità costante al 40%-70%. Dopo due settimane 5 talee di ogni varietà sono state batterizzate con i 2 ceppi batterici. L'applicazione del fungo è stata fatta, invece, al momento della preparazione dei vasi per altrettante 5 talee di ogni varietà miscelandolo al terreno contaminato. Lo stesso numero di talee sono state utilizzate nella preparazione di vasi contenenti solo terreno sia inquinato che non (controllo) e suolo ammendato con 1,25 g/kg di Oxygen Release Compound (ORC). La disposizione dei vasi per la crescita in serra è stata progettata secondo uno schema a blocchi randomizzati.

Trattamenti:

- ✓ controlli di suolo senza talee con ORC
- ✓ controlli di suolo con talee (7 cloni)
- ✓ trattamento di suolo inquinato con talee (7 cloni)
- ✓ trattamento di suolo inquinato con talee e ORC
- ✓ trattamento di suolo inquinato con talee e inoculo di *Arthrobacter*, A2 e A3
- ✓ trattamento di suolo inquinato con talee e micelio di *Pleurotus ostreatus*

Parametri di crescita, percentuale di attecchimento e capacità di sviluppo radicale sono stati utilizzati per la selezione dei cloni.

3.5.3 Batteri degradatori di HCH ed inoculo su pioppo

Due specie di *Arthrobacter*, A2 e A3, sono state fatte crescere in Nutrient Broth per 48h a 28°C a 70 rpm. A distanza di 15 giorni dalla preparazione dei vasi con le talee, i cloni di pioppo sono stati inoculati con le colture batteriche (c.a. 10^8 - 10^9 CFU/ml) in ragione di 1ml/pianta.

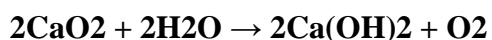
3.5.4 Micorimedio degli isomeri di HCH

Per le note capacità degradative del lindano è stato scelto il *Pleurotus ostreatus*, in collezione presso la International Bank of Edible Saprophytic Mushrooms dell'Istituto di Biologia Agro-Ambientale e Forestale (IBAF) CNR.

Il micelio fungino è stato fatto crescere in terreno liquido all'interno di beute contenenti estratto di malto al 3%, tenute in agitazione su tavolo orbitale a 95 rpm e ad una temperatura di 25 °C. Ottenuta un'abbondante biomassa è stata versata su paglia di grano tritata, contenuta in appositi recipienti e già sterilizzata a 121°C. La biomassa è rimasta a T = 25°C e Umidità Relativa = 60% fino alla completa invasione della paglia da parte del micelio. La paglia infungata è stata utilizzata per prove in vaso mescolandola al suolo di crescita dei cloni di pioppo in quantità pari al 10%.

3.5.5 Ammendamento con sostanza rilasciante ossigeno (ORC)

Durante la fase di preparazione il suolo è stato ammendato con 1,25 g/kg di IXPEN 75C Calcium Peroxide (Solvay Chemicals) in polvere. Questo prodotto è stato scelto per le sue potenzialità nell'aumentare la biodegradazione aerobica di diversi contaminanti organici ed inorganici. Infatti contiene principalmente perossido di calcio (CaO_2 al 78%) che a contatto con l'acqua genera lentamente ossigeno e calore, evitando di produrre H_2O_2 grazie al suo alto pH.



3.6 Impianto sperimentale (S.R.C.)

L'area sperimentale realizzata nel marzo 2008, distinta in due subimpianti, rispettivamente speculari, copre una superficie complessiva di 4000 m². Il disegno sperimentale adottato è stato quello dei blocchi randomizzati in base al quale, ciascun sub- impianto è costituito da 9 parcelle, divise in 3 blocchi; l'impianto in questione è pertanto caratterizzato da un totale di 18 parcelle sperimentali con sesto 2 x 0.5 m più un bordo di 14 parcelle (Fig.6).



Figura 6. Impianto sperimentale SRF - Anagni Stazione (FR).

L'impianto realizzato è un impianto a densità elevata (10.000 piante per ettaro) con tre cloni di pioppo selezionati nelle precedenti sperimentazioni di serra combinati a tre trattamenti.

Per ottenere un sistema radicale omogeneo sia orizzontalmente che in profondità fino ad 1 metro è stato adottato un sesto di impianto di 0.5 x 2 m. Il materiale vegetale utilizzato è costituito da talee non radicate della lunghezza di 22 cm di 3 differenti cloni di Pioppo ibrido (*Populus* spp.) (Tab. 2):

Clone	Specie/ibridi
I-214	<i>Populus x canadensis</i> Mönch
AF2	<i>Populus x Canadensis</i> Mönch
Monviso	<i>Populus x generosa</i> X <i>Populus nigra</i>

Tabella 2 . Cloni di pioppo ibrido utilizzati per la sperimentazione in campo.

di questi, 2 (Monviso, AF-2) risultano specifici per la produzione di biomassa da energia mentre il terzo, l'I-214, rappresenta il controllo in quanto uno dei cloni tipici della pioppicoltura italiana.

3.6.1 Interventi colturali

- **Fertilizzazione e approvvigionamento idrico**

E' stata effettuata la fertilizzazione del fondo tramite aspersione e interrimento di concime minerale complesso "Nitrophoska Blu Special " con potassio e solfato, contenente magnesio e microelementi, indicato per colture sensibili ai cloruri (prodotto dalla BASF – Germania).

L'impianto nei primi due anni è stato irrigato a goccia restituendo due volte la settimana la quantità di acqua evapotraspirata dalla coltura.

- **Operazioni di controllo delle erbe infestanti**

Nel corso della sperimentazione si è reso necessario il controllo della vegetazione spontanea infestante. Considerata la necessità di non apportare variabili esterne che potessero falsare i risultati della sperimentazione non ci si è avvalsi dell'utilizzo di erbicidi, il diserbo quindi è stato realizzato mediante trinciatura superficiale con trincia stocchi tra le file di alberi e pulizia manuale lungo le file per evitare il danneggiamento dell'impianto d'irrigazione e delle piante stesse. L'impossibilità dell'utilizzo degli erbicidi ha permesso un più rapido sviluppo della vegetazione infestante, per contrastare questo fenomeno si è provveduto ad effettuare 3 interventi di pulizia del campo per la stagione primavera-estate 2009 e 2 interventi per la primavera 2010.

3.6.2 Stima della produzione di biomassa vegetale

I campionamenti di materiale vegetale e dei dati di biomassa sono stati effettuati all'inizio e alla fine della stagione di crescita dei pioppi. Nel novembre 2009, al completamento della caduta delle foglie, si è proceduto alla stima dell'accrescimento e della produttività, mediante aree di saggio. In ciascuna parcella, considerando solo due file centrali, è stata pertanto delimitata un'area di saggio, costituita dalle 10 piante centrali, delle 40 tot, di ciascuna fila (circa di 30 m²). All'interno di ogni area di saggio, sono stati misurati i valori diametrici e, contestualmente, si è valutato il numero di polloni per ceppaia. Passo successivo è stato individuare tra le piante misurate, quella più prossima al valore diametrico medio, sottoponendola quindi ad un campionamento distruttivo per la stima della produttività. Dal numero medio di polloni per ceppaia (per area di saggio) si è invece stimato il numero medio di polloni ad ha. Tutti i valori sono stati quindi organizzati per clone, parcella e sub- impianto, i pesi del fusto sono stati mediati e il valore medio moltiplicato per il numero di polloni ad ha, ottenendo la produzione secca Kg/pianta, quindi la produzione secca media distinta per clone e per tesi.

3.6.3 Batteri degradatori di HCH ed inoculo su pioppo

Due specie di *Arthrobacter*, A2 e A3, sono state fatte crescere in Nutrient Broth per 48h a 28°C a 70 rpm. Alla messa in opera delle talee, i cloni di pioppo sono stati inoculati con le colture batteriche (c.a. 10⁸-10⁹ CFU/ml) in ragione di 1ml/pianta. La batterizzazione è stata ripetuta all'inizio delle due stagioni vegetative successive in ragione di 50 ml/pianta.

3.6.4 Micorimedio degli isomeri di HCH

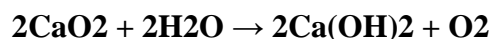
Il micelio di *Pleurotus ostreatus* per l'applicazione nelle parcelle sperimentali è stato prodotto presso l'IBAF-CNR e la propagazione è stata effettuata presso la fungaia MAC di Mattozzi e Azzola in Giulianello (Lt) tramite preparazione di balle di paglia infungate.

Per l'applicazione in campo si è proceduto alla realizzazione di tre parcelle di dimensioni (9x9) m. Il micelio è stato interrato ad una profondità di 20-30 cm durante

l'operazione di raffinamento meccanico del suolo in un rapporto di 20 Kg di biomassa per m².

3.6.5 Ammendamento con sostanza rilasciante ossigeno (ORC)

Durante la fase di preparazione il suolo è stato ammendato con 1,25 g/kg di IXPEN 75C Calcium Peroxide (Solvay Chemicals) in polvere. Questo prodotto è stato scelto per le sue potenzialità nell'aumentare la biodegradazione aerobica di diversi contaminanti organici ed inorganici. Infatti contiene principalmente perossido di calcio (CaO₂ al 78%) che a contatto con l'acqua genera lentamente ossigeno e calore, evitando di produrre H₂O₂ grazie al suo alto pH.



In campo il perossido di calcio (Solvay IXPEN 75C) è stato sparso sul suolo (top soil) lungo le file delle parcelle ed interrato tramite lavorazioni di fresatura antecedenti la piantumazione delle talee di pioppo.

3.6.6 Analisi statistica

I dati per la stima della biomassa e del contenuto degli isomeri dell'HCH nel suolo sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA), usando un software SPSS e le medie sono state comparate con il test di LSD mean comparison test con un livello di significatività $P < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche chimico-fisiche e biologiche del suolo

Dalle analisi chimico-fisiche del sito oggetto della sperimentazione, è risultato un suolo con alta percentuale di sabbia (75%) ma con un contenuto C/N equilibrato e un pH neutrale (Tab.3). Sono state inoltre determinate le caratteristiche microbiologiche indispensabili per valutare un possibile depauperamento dei terreni, i valori di batteri e funghi indicano la presenza di una buona popolazione microbica idonea a piantagioni forestali.

Sand (%)	75.25
Silt + Clay (%)	24.75
pH (H ₂ O)	7.72
Total N (g / Kg)	0.16
Organic C (g / Kg)	12.24
Organic matter (g / Kg)	21.11
Electrical conductivity (mS / cm)	462.0
Bacteria (CFU x 10 ⁷ g ⁻¹)	25±2.80
Actinomycetes (CFU x 10 ⁷ g ⁻¹)	13±1.0
Fungi (CFU x 10 ⁵ g ⁻¹)	23.8±2.9

Tabella 3. Caratteristiche chimico-fisiche e biologiche dei suoli provenienti dalle aree inquinate oggetto di sperimentazione e utilizzati nelle prove in serra (CFU: colony-forming unit dopo 7 giorni di incubazione).

**SELEZIONE IN SERRA DI CLONI DI PIOPPA SU TERRENO CONTAMINATO DA
ESACLOROCICLOESANO**



Figura 7. Selezione in serra di cloni idonei al fitotimedio dell'esaclorocicloesano



Figura 8.: Campionamento dei 7 cloni di pioppa cresciuti in condizioni controllate di serra.

Figura 9. : Particolare della rizosfera. Dopo due mesi la radice dei cloni I-214, AF2 e Monviso ha quasi invaso tutto il suolo a disposizione.



Figura 10.: Apparato radicale sviluppatosi dopo circa due mesi di crescita in vaso.

APPLICAZIONE DI RIZORIMEDIO CON SHORT ROTATION COPPICE (SRC)

4.2 Conta delle popolazioni batteriche

<i>Clone</i>		<i>CFU x 10⁶/g p.s. terreno</i>	
		<i>2009</i>	<i>2010</i>
<i>I-214</i>	<i>Suolo</i>	313,9 ± 30	226,7 ± 26,8
	<i>Rizosfera</i>	475,1 ± 49,6	464,6 ± 32,3
<i>AF-2</i>	<i>Suolo</i>	241,1 ± 22	252,9 ± 29
	<i>Rizosfera</i>	556 ± 62,5	477 ± 39
<i>Monviso</i>	<i>Suolo</i>	255 ± 28	256,3 ± 23,5
	<i>Rizosfera</i>	687,3 ± 49	544,2 ± 42,3

Tabella 4. Conta batterica dei campioni di suolo e di rizosfera prelevati dalle parcelle batterizzate di tre cloni di pioppo del campo sperimentale di Anagni. I valori sono espressi come CFU x 10⁶ g⁻¹ p.s. suolo ± Errore Standard.

La Tab. 4 mostra i dati di popolazione microbica misurata nel suolo e nella rizosfera dei tre cloni di pioppo. Il suolo risulta avere una popolazione microbica uniforme e pressoché costante nel tempo in tutte le parcelle indagate. Nei dati del 2009 si osserva un incremento notevole, rispetto al suolo, della popolazione batterica nella rizosfera di tutti i cloni sperimentati; è particolarmente evidente una diversa risposta dei tre cloni al trattamento di batterizzazione con incrementi percentuali che vanno da un minimo del 50 % nel clone I-214 a un massimo di circa il 170% nel clone Monviso.

L'incremento della popolazione batterica nella rizosfera di tutti i cloni sperimentati viene confermato, in percentuale differente, anche nei dati del 2010; ancora una volta la rizosfera del clone Monviso mostra la percentuale più elevata.

Non sono stati osservati effetti negativi sulle talee dei tre cloni riconducibili all'inoculo batterico.

4.3 Analisi metalli pesanti in suolo

Sono effettuati dei campionamenti atti a verificare che nel suolo dell'area sperimentale non fossero presenti contaminazioni da metalli pesanti che potessero falsare le risposte delle piante ai trattamenti.

Nella Tab.5 sono mostrate le concentrazioni di As, Cd, Pb, e V della matrice suolo prelevato dalle singole parcelle del campo sperimentale. I valori di Pb e As sono al limite dei valori di legge (Italian Guideline Values, dal D. Lgs 152/06) per suoli adibiti a verde pubblico mentre i valori di Cd e V sono ampiamente sotto tali limiti.

	<i>Pb</i>	<i>Cd</i>	<i>V</i>	<i>As</i>
<i>campione</i>	<i>ppm ± E.S.</i>	<i>ppm ± E.S.</i>	<i>ppm ± E.S.</i>	<i>ppm ± E.S..</i>
<i>AF-2</i>	109,1 ± 0,7	0,40 ± 0,01	23,7 ± 3,2	14,3 ± 1,1
<i>AF-2 Batteri</i>	137,5 ± 0,8	0,45 ± 0,02	34,9 ± 0,9	20,1 ± 1,1
<i>AF-2 ORC</i>	114,5 ± 0,5	0,36 ± 0,01	23,8 ± 0,3	15,9 ± 0,2
<i>I-214</i>	136,9 ± 0,7	0,42 ± 0,01	27,9 ± 1,0	19,2 ± 0,7
<i>I-214 Batteri</i>	130,5 ± 1,2	0,40 ± 0,02	28,9 ± 0,1	19,2 ± 0,4
<i>I-214 ORC</i>	128,0 ± 0,5	0,53 ± 0,02	27,1 ± 0,3	18,3 ± 0,8
<i>Monviso</i>	129,9 ± 0,1	0,38 ± 0,02	25,8 ± 0,4	18,7 ± 0,5
<i>Monviso Batteri</i>	132,3 ± 2,9	0,36 ± 0,01	25,7 ± 0,2	17,7 ± 0,5
<i>Monviso ORC</i>	132,3 ± 0,3	0,38 ± 0,00	25,7 ± 1,4	18,2 ± 0,1
<i>Media terreno</i>	127,9 ± 9,7	0,4 ± 0,1	27,1 ± 3,4	17,9 ± 1,8

Tabella 5. Contenuto di metalli pesanti nel suolo della rizosfera campionato nelle parcelle dei diversi trattamenti effettuati (talea + inoculo batteri; talea + ORC (perossido di calcio); talea). I valori sono espressi come parti per milione (ppm) ± Errore Standard.

4.4 Analisi metalli pesanti del materiale vegetale

Nella Tab. 6 sono mostrate le concentrazioni di Cd e Pb della matrice vegetale, i campioni dei cloni di pioppo sono stati prelevati, dopo circa sei mesi, dalle singole parcelle del campo sperimentale. I livelli di contaminazione del fusto e delle foglie sembrano entro i limiti dei coefficienti di trasferimento suolo - pianta riportati in Kloke et al. 1984. Non è stato rilevato trasferimento di V e As dal suolo alla pianta.

<i>campione</i>	<i>Pb</i>		<i>Cd</i>		<i>V</i>		<i>As</i>	
	<i>foglie</i>	<i>fusti</i>	<i>foglie</i>	<i>fusti</i>	<i>foglie</i>	<i>fusti</i>	<i>foglie</i>	<i>fusti</i>
	<i>ppm</i> $\pm E.S.$	<i>ppm</i> $\pm E.S.$	<i>ppm</i> $\pm E.S.$	<i>ppm</i> $\pm E.S.$	<i>ppm</i>	<i>ppm</i>	<i>Ppm</i>	<i>ppm</i>
<i>AF-2</i>	1,28 \pm 0,13	0,60 \pm 0,23	0,35 \pm 0,00	0,31 \pm 0,00	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>AF-2 Batteri</i>	0,78 \pm 0,14	0,31 \pm 0,07	0,27 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>AF-2 ORC</i>	0,57 \pm 0,06	0,44 \pm 0,11	0,30 \pm 0,01	0,88 \pm 0,02	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>I-214</i>	0,47 \pm 0,01	0,29 \pm 0,13	0,39 \pm 0,00	0,43 \pm 0,00	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>I-214 Batteri</i>	0,47 \pm 0,17	0,33 \pm 0,08	0,34 \pm 0,01	0,60 \pm 0,01	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>I-214 ORC</i>	0,64 \pm 0,17	0,65 \pm 0,01	0,49 \pm 0,02	0,53 \pm 0,01	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Monviso</i>	0,66 \pm 0,24	0,35 \pm 0,06	0,37 \pm 0,00	0,36 \pm 0,01	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Monviso Batteri</i>	1,12 \pm 0,06	0,28 \pm 0,03	0,31 \pm 0,00	0,28 \pm 0,03	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<i>Monviso ORC</i>	0,54 \pm 0,13	0,28 \pm 0,01	0,35 \pm 0,00	0,43 \pm 0,01	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

Tabella 6. Contenuto di metalli pesanti nel fusto e nelle foglie campionate nelle parcelle dei diversi trattamenti effettuati nell'area sperimentale denominata come Nobili (talea + inoculo batteri; talea + ORC (perossido di cacio); talea). I valori sono espressi come parti per milione (ppm) \pm Errore Standard.

4.5 Micorimedio degli isomeri di HCH

In campo l'applicazione del micelio fungino non ha dato i risultati sperati, infatti non si è sviluppata propagazione. Si ritiene che l'eccezionale siccità con le relative alte temperature sopraggiunte nell'Aprile/Maggio 2008 siano la concausa di tale insuccesso, bisogna comunque sottolineare che non sono state ancora sviluppate tecnologie idonee alla propagazione del micelio in campo aperto.

4.6 Analisi chimiche dei composti organo-clorurati

Nelle Tab. 7 sono riportati i dati delle campagne analitiche 2009 e 2010 effettuate per indagare il dosaggio del contenuto in HCH isomerici e HCH totale ($\alpha + \beta + \gamma$) nel suolo (denominato "Bianco") e nella rizosfera delle piante. I singoli valori riportati sono la media ottenuta da quattro campioni prelevati da ogni parcella.

Nel dati del 2009 si può osservare sia una diversa capacità degradativa dei tre cloni di pioppo che una differente efficacia dei trattamenti apportati.

In particolare, è da sottolineare l'elevata capacità degradativa mostrata dal clone Monviso; nelle parcelle in cui è stato piantato senza ammendanti si sono avuti buoni risultati di degradazione sia dell'HCH totale (circa il 23%) sia degli isomeri β -HCH (34%) e γ -HCH (22%). I risultati sono piuttosto notevoli (differenze significative $p < 0.05$ Anova LSD multiple range Test) nelle parcelle in cui il clone Monviso è stato batterizzato (α -HCH 36%, β -HCH 63% e γ -HCH 33%) o ammendato con ORC (β -HCH 63% e γ -HCH 23%) arrivando a percentuali di degradazione dell'HCH totale rispettivamente del 55% e 45%.

Buoni effetti di degradazione, sia dell'HCH totale che degli isomeri β (tra il 39% e il 48%) e γ (tra il 15% e il 19%), si sono riscontrati anche nelle parcelle in cui i cloni AF 2 e I-214 hanno avuto trattamenti di batterizzazione e ammendamento di ORC.

<i>CAMPIONE</i>	<i>α-HCH</i>	<i>β-HCH</i>	<i>γ-HCH</i>	<i>totale</i>
	<i>ppm ± E.S.</i>	<i>ppm ± E.S.</i>	<i>ppm ± E.S.</i>	<i>ppm ± E.S.</i>
<i>Bianco</i>	0,0353±0.0028 a	0,0580±0.0106 ab	0,0152±0.0008 ab	0,1039±0.0143 ab
<i>Monviso</i>	0,0332±0.0043 ab	0,038±0.0061 abc	0,0119±0.0011 b	0,0801±0.0123 abc
<i>Monviso + batteri</i>	0,0227±0.0017 b	0,0214±0.0023 c	0,0102 b	0,0467±0.0061 c
<i>Monviso + ORC + Compost</i>	0,0305±0.0029 ab	0,0213±0.0009 c	0,0117±0.0013 b	0,0576±0.0056 c
<i>AF2</i>	0,0429±0.0084 a	0,0588±0.0146 a	0,0194±0.002 a	0,1145±0.0218 a
<i>AF2 + batteri</i>	0,0334±0.0063 ab	0,0354±0.0046 abc	0,0129±0.0029 ab	0,0753±0.0116 abc
<i>AF2 + ORC + Compost</i>	0,0389±0.0055 a	0,0298±0.0028 bc	0,0197±0.0062 a	0,0786±0.0105 abc
<i>I-214</i>	0,0424±0.0033 a	0,0442±0.0057 abc	0,0158±0.0022 ab	0,1024±0.0109 ab
<i>I-214 + batteri</i>	0,0317±0.0057 ab	0,032±0.0036 abc	0,0128±0.0002 ab	0,0701±0.0111 bc
<i>I-214 + ORC + Compost</i>	0,0415±0.0068 a	0,0331±0.005 abc	0,0123±0.0012 b	0,0869±0.0128 abc

Tabella 7. Campagna analitica 2009. Dosaggio del contenuto in HCH isomerici e HCH totale ($\alpha + \beta + \gamma$) nel suolo (denominato “Bianco”) e nella rizosfera delle piante. I valori sono la media ($n = 4$) dei campioni prelevati nelle singole parcelle e sono espressi come parti per milione (ppm) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

I dati della campagna analitica del 2010 confermano la diversa capacità degradativa dei tre cloni di pioppo e le condizioni in cui questa è più evidente (Tab.8).

Nel 2010 sono state confermate le capacità degradative del clone Monviso; nelle parcelle in cui è stato piantato senza ammendanti sono aumentate le percentuali di degradazione rispetto alle condizioni di contaminazione iniziale (bianco) sia dell’ HCH totale (38%) che soprattutto dell’isomero β (57%). La degradazione nelle parcelle in cui

il clone Monviso è stato batterizzato o ammendato con ORC è leggermente aumentata o è rimasta pressoché costante rispetto all'anno precedente.

Buoni incrementi di degradazione, soprattutto dell'isomero β (tra il 52% e il 59%), si sono riscontrati anche nelle parcelle in cui il clone I-214 ha avuto trattamenti di batterizzazione e ammendamento di ORC.

<i>CAMPIONE</i>	<i>α-HCH</i>	<i>β-HCH</i>	<i>γ-HCH</i>	<i>totale</i>
	<i>ppm \pm E.S.</i>	<i>ppm \pm E.S.</i>	<i>ppm \pm E.S.</i>	<i>ppm \pm E.S.</i>
<i>Bianco</i>	0,0353 \pm 0.0028 abc	0,0580 \pm 0.0106 a	0,0152 \pm 0.0008 ab	0,1039 \pm 0.0143 a
<i>Monviso</i>	0,0311 \pm 0.0041 bc	0,0249\pm0.0031 b	0,0115 \pm 0.0004 bc	0,0637 \pm 0.0105 ab
<i>Monviso + batteri</i>	0,0288\pm0.0006 c	0,0221\pm0.0018 b	0,0107\pm0.004 c	0,0562\pm0.0049 b
<i>Monviso + ORC +Compost</i>	0,0276\pm0.0038 c	0,0184\pm0.0017 b	0,0109 c	0,0496\pm0.0084 b
<i>AF2</i>	0,0397 \pm 0.0050 ab	0,0426 \pm 0.0132 ab	0,0161 \pm 0.002 a	0,0984 \pm 0.0196 a
<i>AF2 + batteri</i>	0,0352 \pm 0.0020 abc	0,0325 \pm 0.0047 ab	0,0125 \pm 0.0004 abc	0,0801 \pm 0.0050 ab
<i>AF2 + ORC +Compost</i>	0,0339 \pm 0.0042 abc	0,0297 \pm 0.0029 ab	0,0117 \pm 0.0014 bc	0,0724 \pm 0.0084 ab
<i>I-214</i>	0,0407 \pm 0.0040 ab	0,0346 \pm 0.0049 ab	0,0132 \pm 0.0010 abc	0,0884 \pm 0.0097 ab
<i>I-214 + batteri</i>	0,0351 \pm 0.0018 abc	0,0238\pm0.0014 b	0,0131 \pm 0.0012 abc	0,0720 \pm 0.0031 ab
<i>I-214 + ORC + Compost</i>	0,0421 \pm 0.0034 a	0,0275\pm0.0035 b	0,0129 \pm 0.0006 abc	0,0826 \pm 0.0053 ab

Tabella 8. Campagna analitica 2010. Dosaggio del contenuto in HCH isomerici e HCH totale (α + β + γ) nel suolo (denominato “Bianco”) e nella rizosfera delle piante. I valori sono la media ($n = 4$) dei campioni prelevati nelle singole parcelle e sono espressi come parti per milione (ppm) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test.

4.7 Produzione di biomassa

Notevoli differenze nella capacità di produzione di biomassa secca totale sono state riscontrate nei cloni di pioppo al termine del primo anno di coltura in campo (Fig. 11). In particolare si nota come il clone AF 2 abbia raggiunto il massimo di produttività in tutte le condizioni di trattamento, con quantità doppia rispetto alla produzione dell'I-214.

Per quanto riguarda l'efficacia dei trattamenti con batteri e ORC si può evidenziare un effetto positivo sulla produzione di biomassa totale nei cloni analizzati, particolarmente accentuato nei cloni ad alta capacità di accrescimento AF 2 e Monviso.

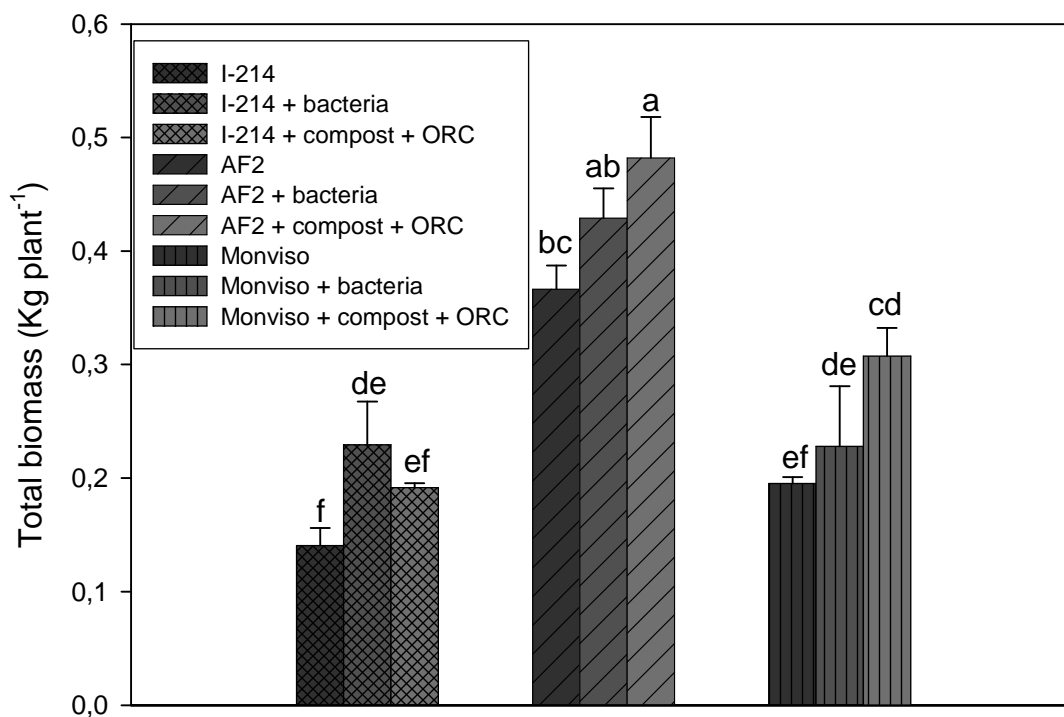


Figura 11. Produzione di biomassa primo anno. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

PARTE 2 - SPERIMENTAZIONE IN SERRA PER ANALIZZARE LE POTENZIALITÀ DI RIZORIMEDIO DEL CLONE MONVISO

5. MATERIALE E METODI

5.1 Condizioni di crescita e campionamento

Per ciascun trattamento sono state utilizzate dodici talee di 20 cm di lunghezza, ottenute da polloni di ~ 2 m, poste a radicare in vasi contenenti una soluzione di Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950).

Populus x generosa X *Populus nigra* v. **Monviso**

Il materiale vegetale è stato tenuto in coltura idroponica per 5 giorni all'interno di una camera di crescita (fig.) alle seguenti condizioni:

- Temperatura: 23 °C;
- umidità relativa: 70-80%;
- fotoperiodo: 14 ore;
- irradianza: 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Alla fine di questa procedura le talee , sono state poste in serra in vasi contenenti 2,5 kg di terra setacciata. Per valutare le reali possibilità applicative di questa sperimentazione il suolo utilizzato per la preparazione dei vasi è stato prelevato direttamente dalle aree contaminate da HCH e oggetto della sperimentazione in campo. Sono state inoltre sperimentati gli effetti di associazioni tra pioppi e una cultura fungina di *Micorrize*. L'applicazione del fungo è stata fatta al momento della preparazione dei vasi miscelandolo al terreno contaminato. Le talee sono state utilizzate nella preparazione di vasi contenenti solo terreno sia inquinato che non (controllo) e suolo ammendato con 1,25 g/kg di Oxygen Release Compound (ORC). La disposizione dei vasi per la crescita in serra è stata progettata secondo uno schema a blocchi randomizzati. L'irrigazione è

stata effettuata 3 volte con una miscela nutriente mantenendo un'umidità costante al 40%-70% (Fig.12).

Trattamenti:

- controlli di suolo senza talee con ORC
- controlli di suolo con talee del clone Monviso
- trattamento di suolo inquinato con talee del clone Monviso
- trattamento di suolo inquinato con talee del clone Monviso e ORC
- trattamento di suolo inquinato con talee del clone Monviso e *Micorrize*



Figura 12. Piante di Monviso nelle diverse condizione di trattamento in serra.

Al termine del periodo di trattamento le piante sono state raccolte e lavate, quindi sono state pesate e separate in talea, fusto, foglie e radici. I campionamenti del suolo dei vasi per le analisi chimiche sono stati effettuati dopo 60 giorni (al termine della sperimentazione).

Tenendo conto che per definizione viene indicata rizosfera il volume di suolo influenzato dall'azione diretta delle radici che si estende approssimativamente per 1-3 mm dalla superficie radicale (Shimp, et al., 1993; Schnook, 1998), durante il campionamento dei vasi il terreno prelevato nei dintorni dell'apparato radicale è stato considerato la "rizosfera", mentre il terreno non raggiunto dalle radici è stato indicato come "suolo" non perturbato.

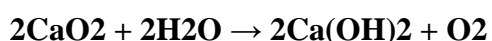
5.2 Funghi micorrizici

MICOSTART: inoculo commerciale di funghi micorrizici: (*Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *Rhizopogon spp.*, *Pisolithus spp.* e *Scleroderma spp.*): (250.000 propaguli/g).

MICOSTART è una formulazione esclusiva formato dalla combinazione di inoculi micorrizici a base di micorrize arbuscolari (VAM), ectomicorrize e *Trichoderma atroviride*, che unitamente agli agenti umettanti, agli estratti d'alga, agli acidi umici e fulvici e alla matrice organica, svolgono una importante azione diretta di stimolo sull'apparato radicale delle piante.

5.3 Ammendamento con sostanza rilasciante ossigeno (ORC)

Durante la fase di preparazione il suolo è stato ammendato con 1,25 g/kg di IXPEN 75C Calcium Peroxide (Solvay Chemicals) in polvere. Questo prodotto è stato scelto per le sue potenzialità nell'aumentare la biodegradazione aerobica di diversi contaminanti organici ed inorganici. Infatti contiene principalmente perossido di calcio (CaO_2 al 78%) che a contatto con l'acqua genera lentamente ossigeno e calore, evitando di produrre H_2O_2 grazie al suo alto pH.



5.4 Stima della superficie radicale

L'area radicale e la lunghezza della radice sono state misurate mediante il Software ROOTEDGE (Kaspar, T. C. and R. P. Ewing. 1997).

5.5 Scambi gassosi

Le misure di scambio gassoso a livello fogliare sono state effettuate con lo strumento HCM-1000 (Waltz, Germany), un sistema a circuito aperto composto da un'unità centrale compatta ed una cuvetta climatizzata. L'umidità relativa dell'aria all'interno della cuvetta è stata settata al 60% e la temperatura è stata mantenuta a circa 25°C. La pressione parziale della CO_2 è stata impostata intorno ai 370 microbar bar-1. L'andamento degli scambi gassosi è stato seguito grazie all'utilizzo di un software con

cui è stato possibile monitorare i parametri fotosintetici. Una sorgente di luce bianca (KL 1500; Schott, Mainz, Germany) è stata utilizzata per l'illuminazione delle foglie durante le misure. I valori di fotosintesi netta (A) e traspirazione (E) sono stati calcolati secondo le equazioni di von Caemmerer e Farquhar (1981).

5.6 Stima della produzione di biomassa vegetale

Al termine del periodo di trattamento si è proceduto alla stima dell'accrescimento e della produttività, le piante sono state raccolte e separate dal suolo, quindi sono state lavate, pesate e separate in talee, fusto, foglie e radici. Il materiale così ottenuto è stato posto ad essiccare in stufa a 25 °C finché non è stato raggiunto un peso costante. È stata quindi rilevata la biomassa secca.

5.7 Preparazione del suolo e analisi di C, N e pH

Per la misura del pH (HI9321 pH meter, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) 10 g di suolo essiccato in stufa a 60°C e setacciato sono stati messi in agitazione per 2 h all'interno di un beaker contenente 25 ml di KCl 1M.

Le analisi del Carbonio (organico e totale) e dell'Azoto (organico e totale) sono state eseguite con un Elemental analyser (Carlo Erba CHNS 1108, Rodano, Italy) su aliquote di suolo setacciato ed essiccato in stufa a 60°C posto all'interno di capsule di argento e alluminio.

5.8 Conta delle specie batteriche

Al fine di ottenere il rilascio dei microrganismi presenti nei microaggregati di terreno, 5 g di suolo campionato nell'area di studio alla profondità di c.a. 25 cm sono stati sospesi in 45 ml di una soluzione sterile 0.1% di $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pH 7.0), in presenza di sfere di vetro, dal diametro di circa 3 mm e posti su tavolo a scosse a 150 rpm per 2 h a 28°C. Da questa sospensione sono state preparate le diluizioni decimali seriali in soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9%). Sono state effettuate piastrazioni su terreno colturale Estratto di Terra agarizzato (ET), seguendo le tecniche classiche descritte nei Metodi di

analisi microbiologica del suolo del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Le piastre sono state incubate a 28°C per 7 giorni e la conta batterica è stata espressa in colony forming units (CFU) per grammo di peso secco di suolo determinato essiccando a peso costante la sospensione di suolo a 80°C.

5.9 Trattamento dei campioni per le analisi chimiche dei composti organo-clorurati

Il campione di suolo essiccato a temperatura ambiente è stato macinato mediante mortaio (criomacinazione con azoto liquido) per ottenere un'aliquota omogenea di campione e successivamente setacciato su vaglio da 2 mm. E' stata quindi pesata un'aliquota di circa 10 g di campione in una vial da 60 ml: a questa è stata aggiunta terra di diatomee (per migliorare il contatto del solvente con il campione).

Per valutare il recupero degli analiti durante la fase di estrazione alle vial contenenti il terreno sono stati aggiunti i surrogati richiesti dal metodo. Il solvente (acetone-esano in rapporto 1 a 1) è stato aggiunto dopo un tempo prestabilito (1 ora, per dare tempo ai surrogati aggiunti di divenire parte della matrice).

La fase di estrazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di un apparecchio ad ultrasuoni (preparativa EPA 3550 C 2007). Sono stati eseguiti due cicli di estrazione della durata di 40 minuti, la fase organica recuperata dalle due estrazioni è stata riunita in un'unica aliquota e concentrata a piccolo volume sotto flusso di azoto a temperatura controllata.

Successivamente è stata eseguita la fase di purificazione facendo passare l'estratto organico ottenuto in cartucce di "Fluorisil" (che consentono di eliminare la maggior parte delle impurezze di natura vegetale che potrebbero interferire nell'analisi strumentale). L'estratto purificato è stato quindi eluito mediante un'opportuna miscela organica e ridotto a piccolo volume mediante flusso di azoto. Sono stati aggiunti i riferimenti interni utilizzati per valutare il volume finale e l'iniezione strumentale.

I campioni così preparati sono stati iniettati in un sistema gascromatografico dotato di rivelatore massa a triplo quadrupolo (GC-MS/MS); la determinazione viene eseguita in modalità a monitoraggio di reazione multiplo (MRM) (EPA Metodo EPA 8270D-2007).

La calibrazione strumentale è stata eseguita iniettando 5 soluzioni di materiali di riferimento. Il controllo strumentale è stato effettuato, come da metodo, iniettando sia una soluzione di materiale di riferimento di altro fornitore (ICV) sia dei campioni fortificati (LCS).

La purezza dei solventi e l'assenza di contaminazione durante tutto il processo è controllata mediante dei "bianchi" di processo.

5.10 Analisi statistica

I dati per la stima della biomassa e del contenuto degli isomeri dell'HCH nel suolo sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA), usando un software SPSS e le medie sono state comparate con il test di LSD mean comparison test con un livello di significatività $P < 0,05$.

6. RISULTATI SERRA

6.1 Scambi gassosi

Per indagare possibili effetti dell'esaclorocicloesano sulla capacità fotosintetica alla fine della sperimentazione è stata misurata la fotosintesi netta delle piante. Come si può vedere dalla Fig. 13 non si evidenzia una sostanziale differenza di fotosintesi delle piante cresciute in tutte le condizioni sperimentali.

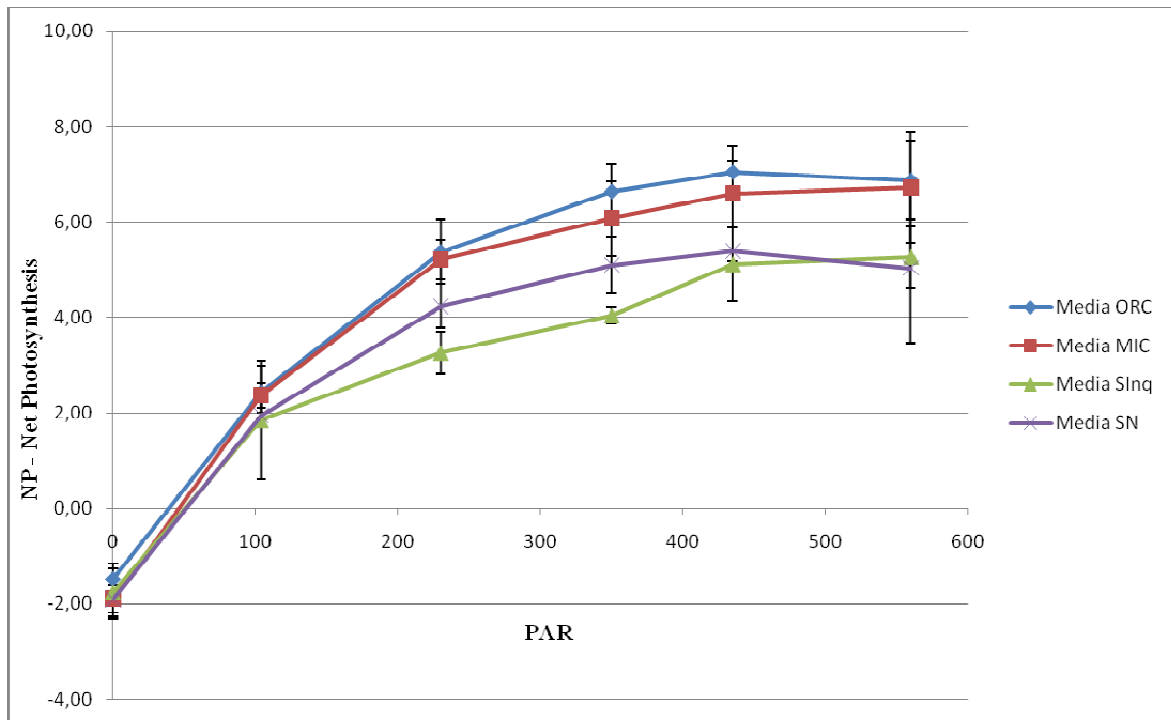


Figura 13. L'andamento degli scambi gassosi è stato misurato alla fine dell'esperimento su foglie espanse. I valori sono la media ($n = 4$) delle piante di replica, la barra di errore indica l'errore standard.

6.2 Stima della produzione di biomassa vegetale

Per avere una stima di produzione di biomassa secca più dettagliata è stata analizzata separatamente la produzione di biomassa dell'apparato radicale, della talea di pioppo, della nuova produzione di biomassa aerea (fusto e foglie) e del loro totale. Dall'analisi dei dati emerge che l'esposizione del Monviso al terreno contaminato dall'esaclorocicloesano non ne ha alterato la capacità di accumulo di biomassa secca sia nell'apparato radicale (Fig. 14) che nella nuova biomassa aerea costituita da fusto e foglie (Fig. 15), che in un terreno ottimale (utilizzato come controllo).

In particolare si nota come le piante di Monviso, nelle condizioni di trattamento con micorrize e ORC, abbiano eguagliato la produttività di biomassa (aerea e radicale) delle piante cresciute in terreno inquinato senza trattamenti.

Nell'ultimo grafico è evidente come la maggiore produzione di biomassa secca totale (Fig. 17) è dovuta prevalentemente ad una più elevata quantità di biomassa secca della talea di Monviso utilizzata all'inizio della sperimentazione (Fig. 16).

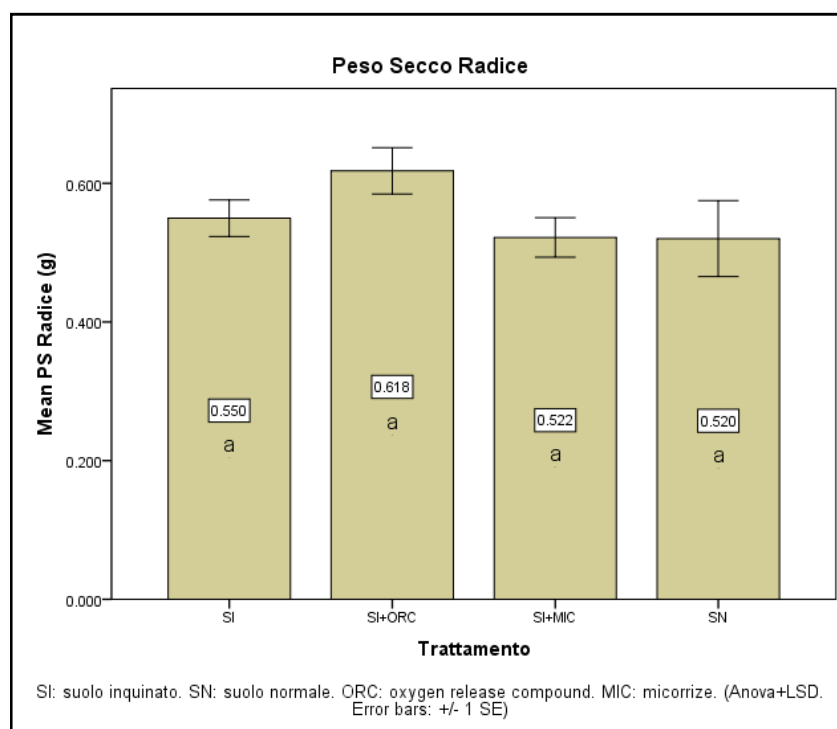


Figura 14. Peso secco dell'apparato radicale. I valori sono la media ($n = 12$) dei campioni prelevati e sono espressi come grammi (g) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test.

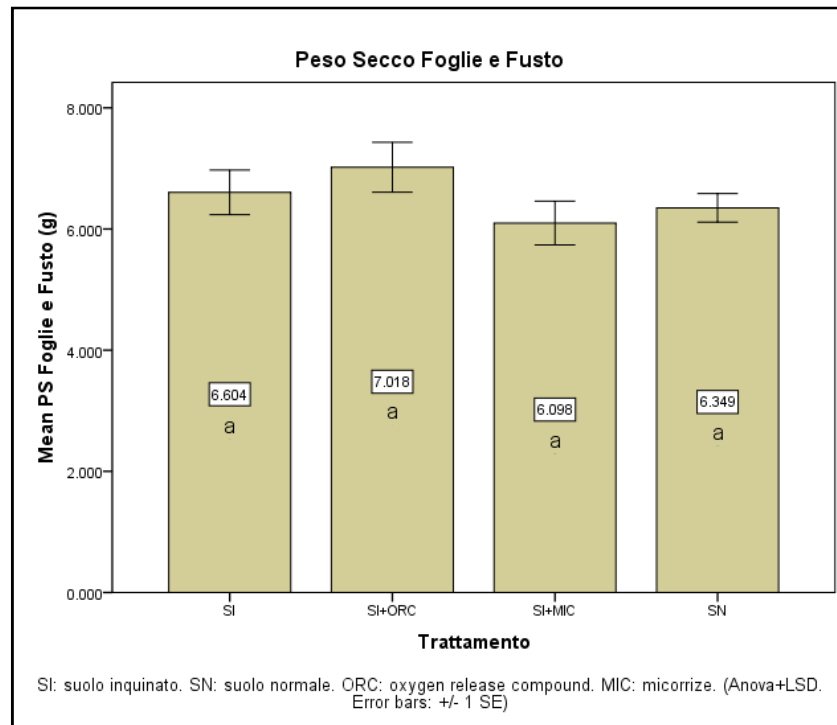


Figura 15. Peso secco della biomassa aerea. I valori sono la media ($n = 12$) dei campioni prelevati e sono espressi come grammi (g) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

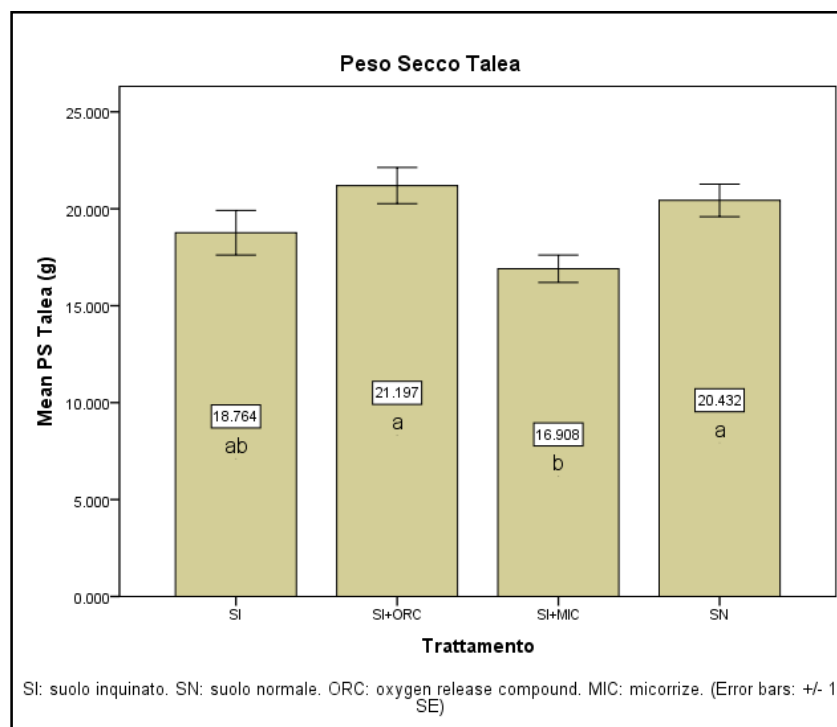


Figura 16. Peso secco della talea del clone Monviso. I valori sono la media ($n = 12$) dei campioni prelevati e sono espressi come grammi (g) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

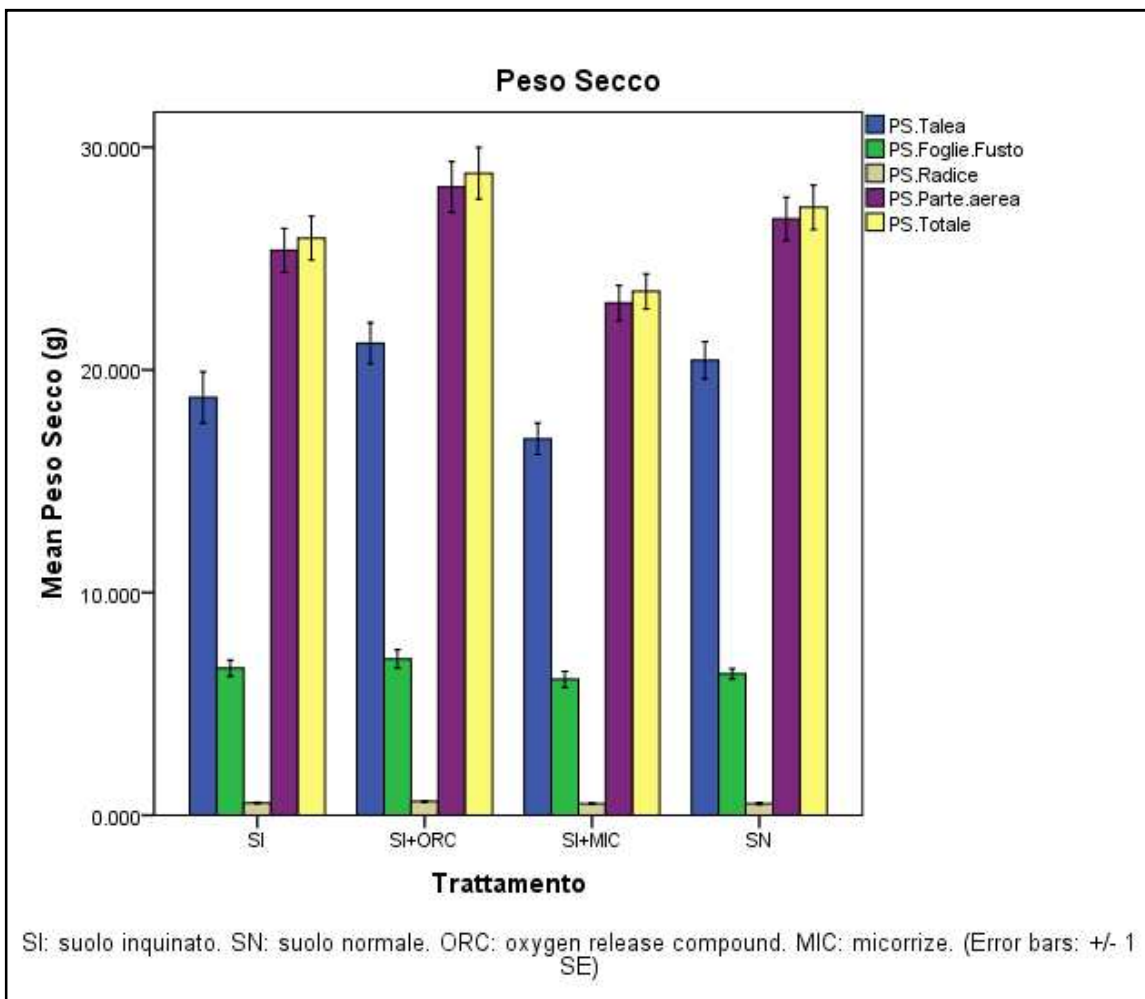


Figura 17. Peso secco della biomassa totale e suddivisa in radici, fusto foglie e talea. Il materiale è stato posto ad essiccare in stufa a 25 °C fino ad ottenere un peso costante.

6.3 Effetto dell'esposizione all'HCH sullo sviluppo dell'apparato radicale di pioppo

L'apparato radicale svolge un ruolo importante nell'interazione tra le sostanze inquinanti e la pianta. Nel clone di pioppo analizzato l'effetto dell'esaclorocicloesano sullo sviluppo dell'apparato radicale è stato valutato tramite l'analisi di alcuni parametri morfologici quali la superficie totale della radice e la lunghezza totale della radice (estensione dell'apparato radicale primario).

6.3.1 Superficie totale della radice

L'analisi dei trattamenti sul pioppo evidenzia una risposta diversa della pianta nello sviluppo dell'apparato radicale in presenza del contaminante (Fig. 18). Come si può notare l'ammendamento dell'ORC alla rizosfera del Monviso ha favorito un aumento della superficie radicale, mentre le piante trattate con le micorrize sembrano aver reagito con una riduzione dello sviluppo radicale.

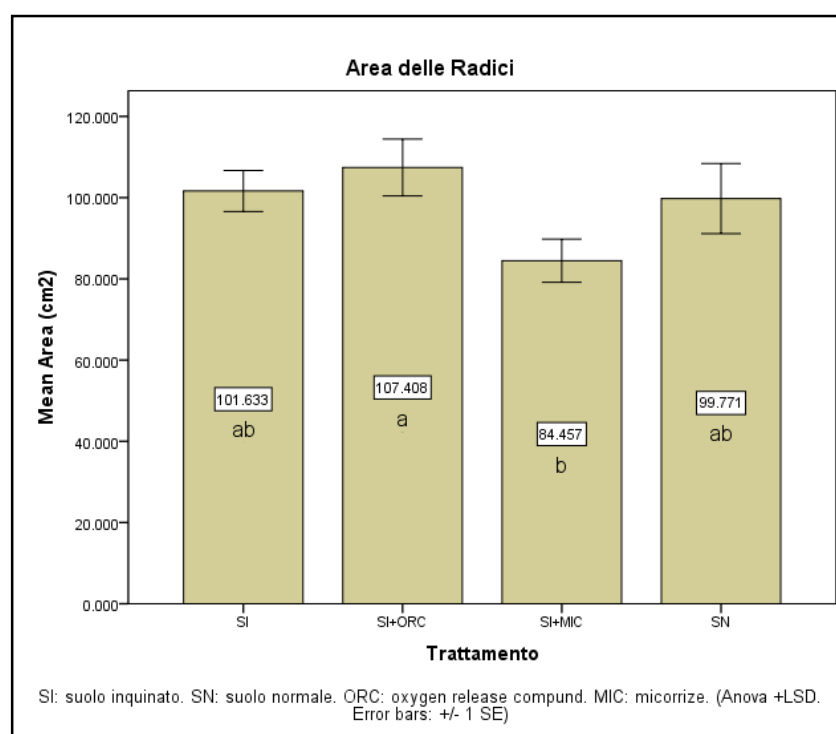


Figura 18. Superficie totale dell'apparato radicale. I valori sono la media ($n = 12$) dei campioni prelevati e sono espressi come $\text{cm}^2 \pm$ Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

6.3.2 Lunghezza totale della radice

La lunghezza dell'apparato radicale, in tutte le condizioni di crescita, non risulta significativamente influenzata dalla presenza dell'esaclorocicloesano (Fig. 19).

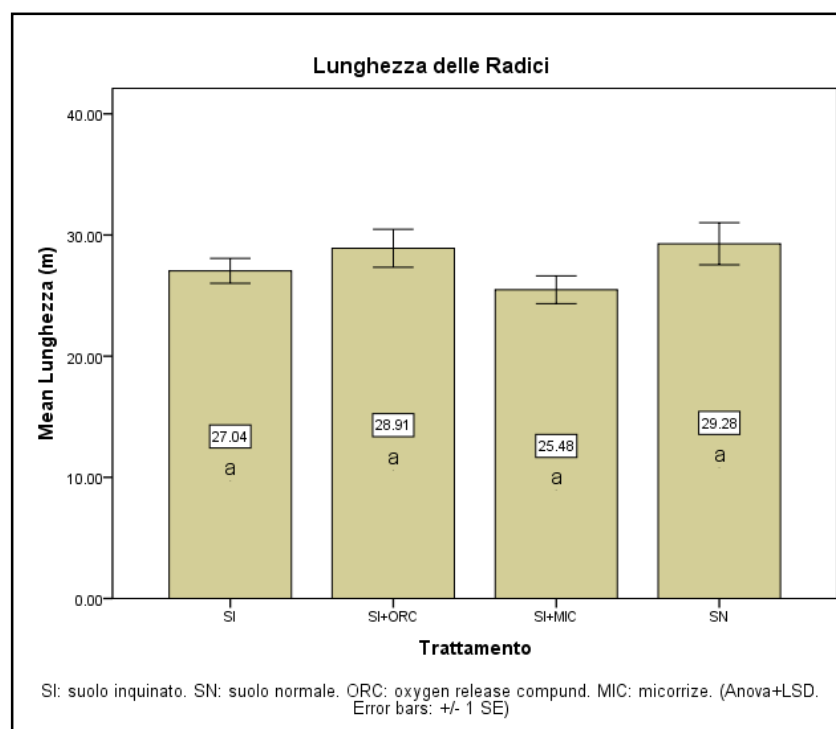
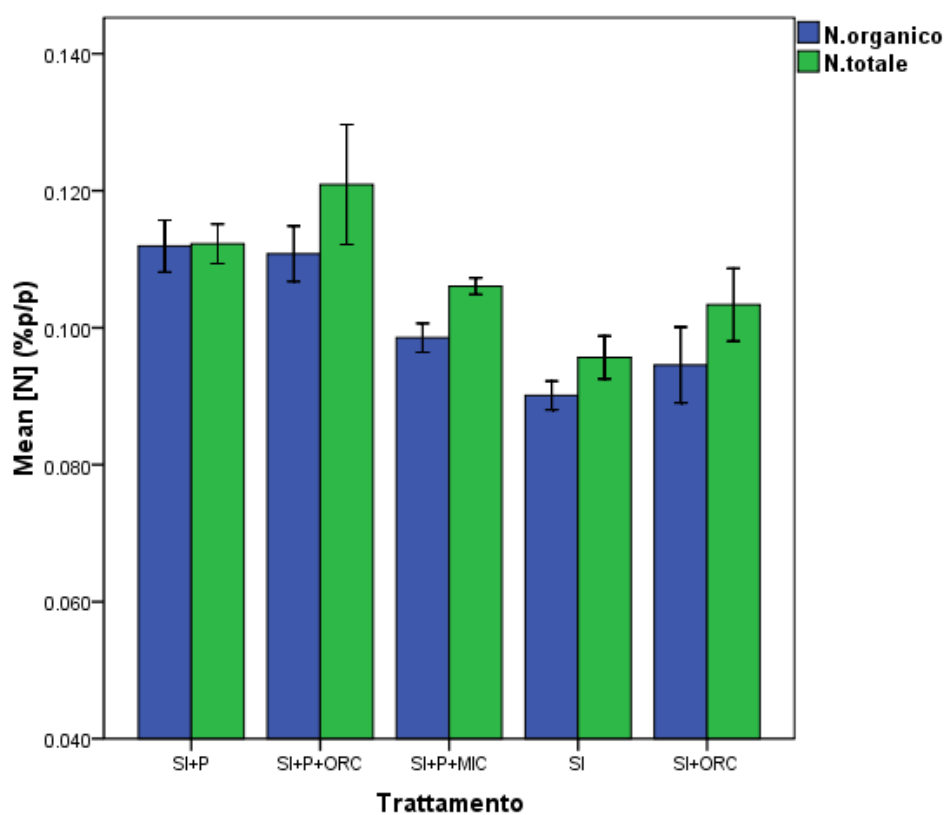


Figura 19. Superficie totale dell'apparato radicale. I valori sono la media ($n = 12$) dei campioni prelevati e sono espressi come $\text{cm}^2 \pm$ Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

6.4 Azoto Organico e Azoto Totale

Considerata l'importanza della percentuale di azoto presente nel suolo sono state misurate le concentrazioni di azoto organico e azoto totale del suolo contaminato utilizzato per la sperimentazione e della rizosfera delle piante (Fig. 20).

Dal confronto dei dati ottenuti risulta evidente che il contenuto di azoto (organico e totale) sia significativamente aumentato, rispetto al suolo, nella rizosfera delle piante sia quando ammendate con ORC che prive di trattamenti.



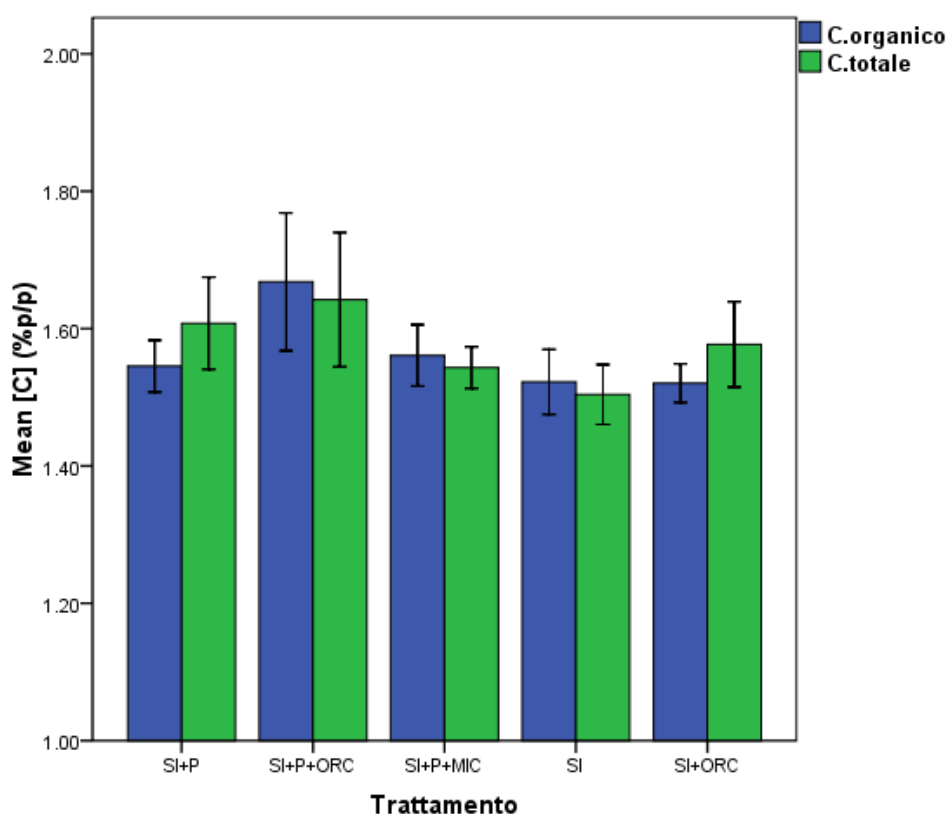
SI: suolo inquinato. P: pianta. ORC: oxygen release compound. MIC: micorrize. (Error bars: +/- 1 SE)

Figura 20. Contenuto di Azoto organico e totale della rizosfera alla fine dell'esperimento. I valori sono la media ($n = 15$) dei campioni prelevati e sono espressi come $\% p/p \pm$ Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

6.5 Carbonio Organico e Carbonio Totale

Come ulteriore parametro sono state misurate le concentrazioni di carbonio organico e carbonio totale del suolo contaminato utilizzato e della rizosfera delle piante (Fig. 21).

In tutte le condizioni non è stato evidenziato alcun effetto significativo sul contenuto di carbonio organico e totale.



SI: suolo inquinato. P: pianta. ORC: oxygen release compound. MIC: micorrize. (Error bars: +/- 1 SE)

Figura 21. Contenuto di Carbonio organico e totale della rizosfera alla fine dell'esperimento. I valori sono la media ($n = 15$) dei campioni prelevati e sono espressi come % p/p \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

6.6 Misure di pH

In Fig. 22 sono riportati i valori del pH relativi al suolo contaminato e a tutti i trattamenti applicati.

Come si può osservare i diversi trattamenti sperimentati sul suolo contaminato hanno determinato una variazione del suo pH originale; in particolare si deve sottolineare come l'ammendamento con l'ORC abbia aumentato il pH portandolo ai valori della rizosfera delle piante cresciute sul suolo di controllo.

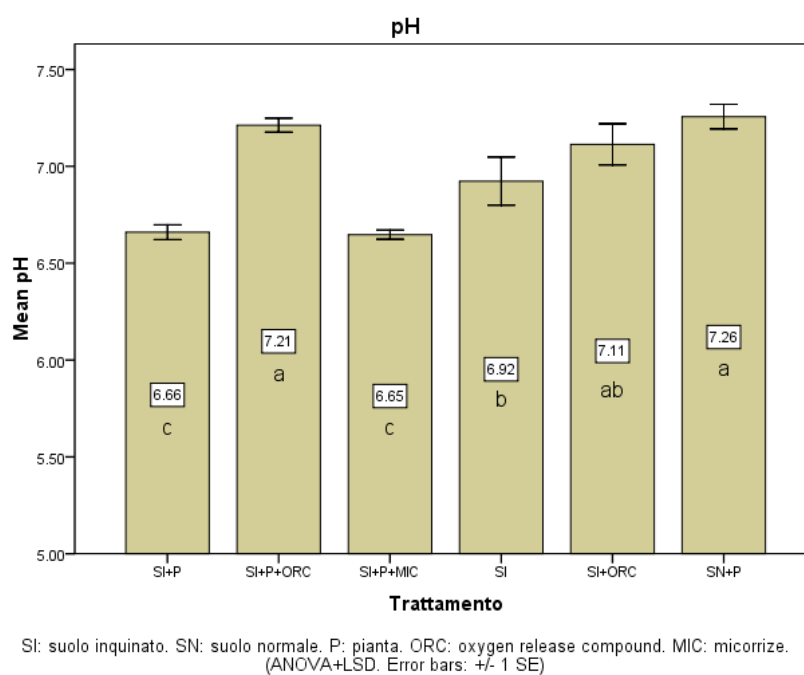


Figura 22. Misure di pH del suolo e della rizosfera dei diversi trattamenti. I valori sono la media ($n = 5$) dei campioni prelevati e sono espressi come $\text{pH} \pm \text{Errore Standard}$. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

6.7 Carica microbica

Dalla conta della popolazione microbica misurata nel suolo e nella rizosfera delle piante di Monviso (Tab. 9) si osserva un incremento notevole, rispetto al suolo inquinato, della popolazione batterica nella rizosfera delle piante ammendate con ORC e micorrize; si è riscontrato un aumento meno marcato nella rizosfera della pianta sola e nel suolo ammendato con ORC.

N° di giorni di crescita	SUOLO NORMALE (SN)+PIANTA	SUOLO INQUINATO (SI)	PIANTA SI	OXIGEN RELEASE COMPOUND SI	ORC + PIANTA SI	MICORRIZE + PIANTA SI
7	263.94±12.5	46.92±8.4	83.6±9.3	130.63 ±10.9	184.99 ±11.2	181.02 ±12.3

Tabella 9. Conta batterica dei campioni di suolo e di rizosfera prelevati alla fine della sperimentazione. I valori sono espressi come CFU x 10⁶ g⁻¹ p.s. suolo ± Errore Standard.

6.8 Analisi chimiche dei Composti organo-clorurati

Nelle Fig. 23, 24, 25 e 26 sono riportati i dati delle analisi effettuate per indagare il dosaggio del contenuto in HCH isomerici e HCH totale ($\alpha + \beta + \gamma$) nel suolo e nella rizosfera delle piante.

Nella Fig. 23 sono mostrate le percentuali di degradazione dell'isomero α -HCH nel suolo (denominato SI) e nella rizosfera delle piante; è da sottolineare come sia i trattamenti applicati in associazione con le piante che l'ammendamento del solo ORC abbiano inciso significativamente sulla degradazione di questo isomero.

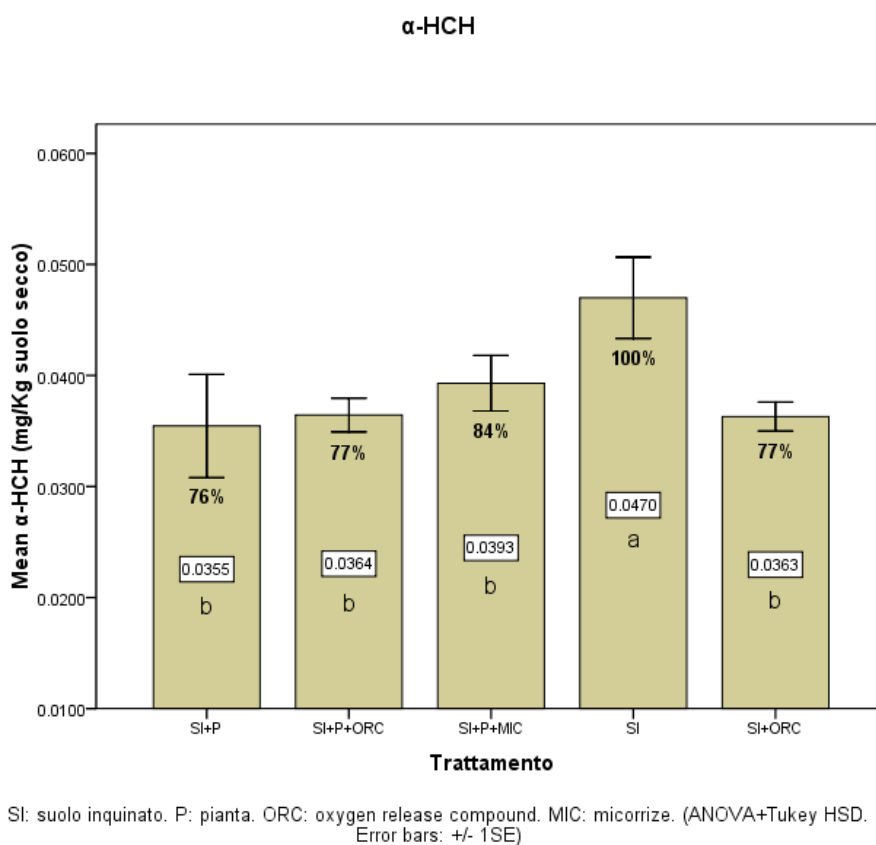


Figura 23. Dosaggio del contenuto dell'isomero α -HCH nel suolo (denominato SI) e nella rizosfera delle piante. I valori sono la media ($n = 5$) dei campioni prelevati e sono espressi come parti per milione (ppm) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

Le analisi mostrano (Fig. 24) che il contenuto dell'isomero β -HCH, il piú recalcitrante degli isomeri, ha subito una diminuzione di circa il 13% nel suolo trattato con ORC e del 9% nella rizosfera delle piante; gli altri trattamenti non hanno inciso significativamente sulla degradazione di questo isomero.

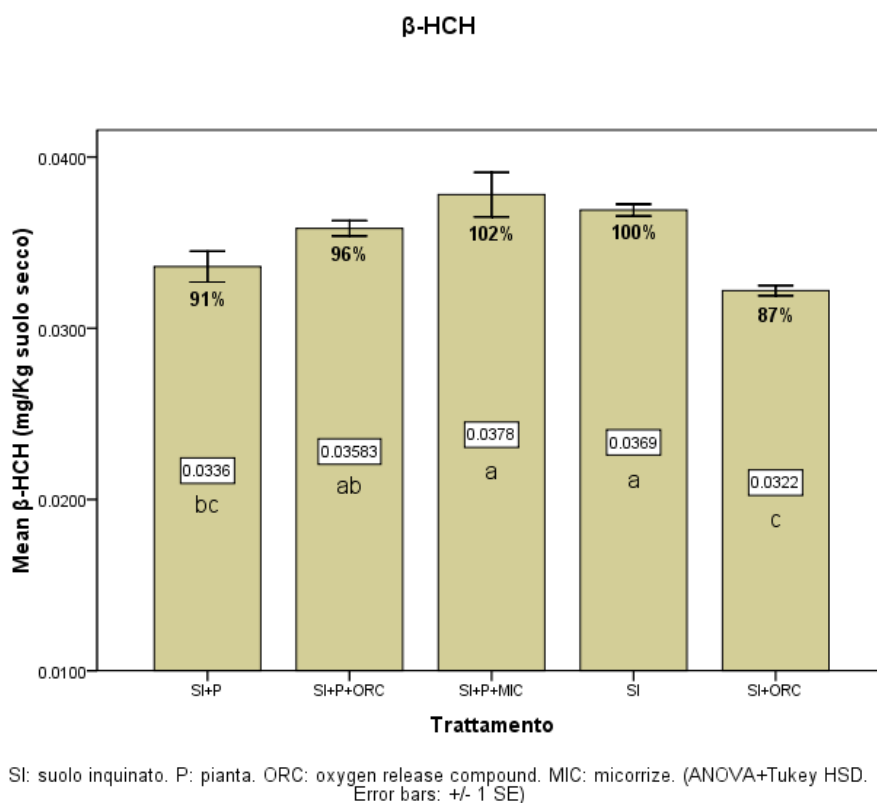


Figura 24. Dosaggio del contenuto dell'isomero β -HCH nel suolo (denominato SI) e nella rizosfera delle piante. I valori sono la media ($n = 5$) dei campioni prelevati e sono espressi come parti per milione (ppm) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

Nella Fig. 25 si può notare che il contenuto dell'isomero γ -HCH (comunemente chiamato lindano) ha subito una diminuzione, nei trattamenti applicati con e senza associazione alle piante, che va dal 15% al 26% rispetto al suolo di partenza.

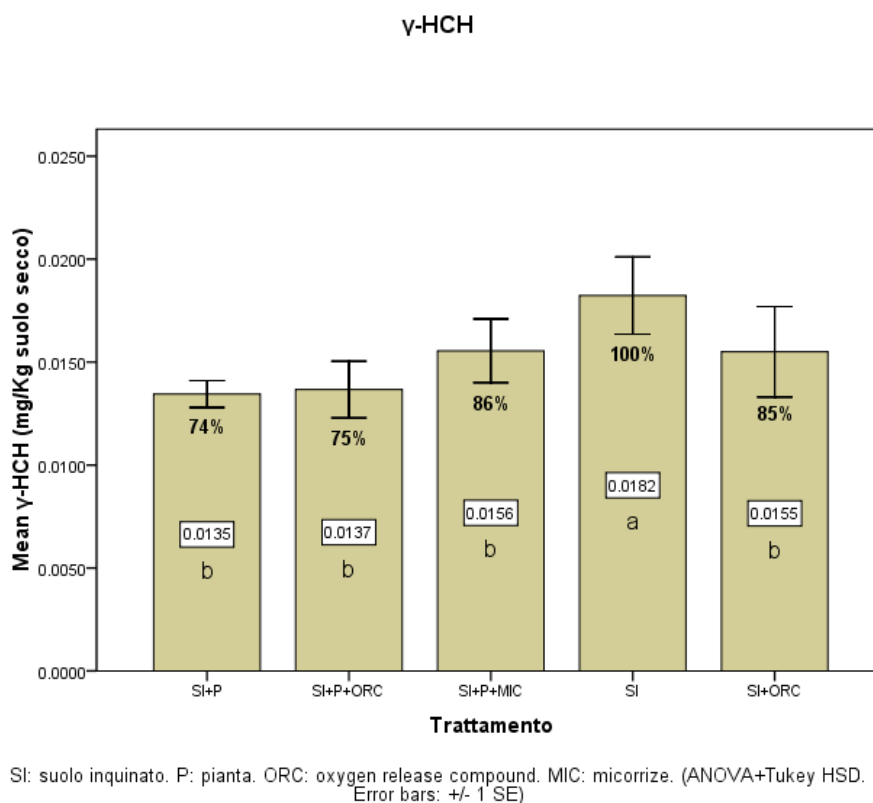


Figura 25. Dosaggio del contenuto dell'isomero γ -HCH nel suolo (denominato SI) e nella rizosfera delle piante. I valori sono la media ($n = 5$) dei campioni prelevati e sono espressi come parti per milione (ppm) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

In generale è da sottolineare la buona capacità degradativa mostrata dal clone Monviso (19%) solo e in associazione con l'ORC (16%) e le micorrize (9%); comunque anche l'ammendamento del solo ORC ha inciso significativamente sulla degradazione dell'esaclorocicloesano totale.

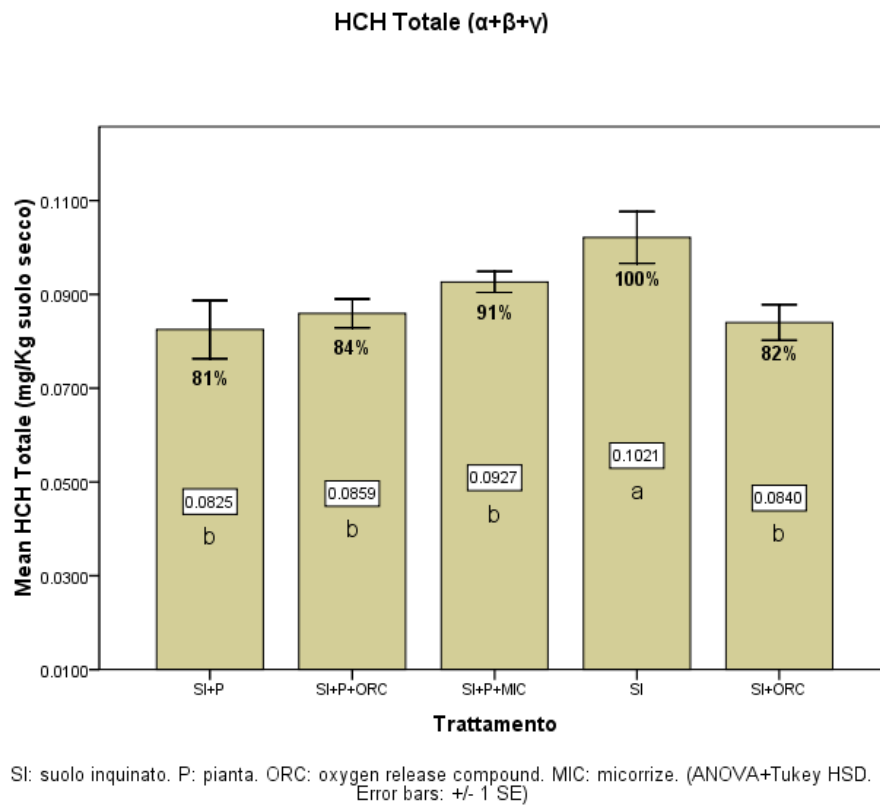


Figura 26. Dosaggio del contenuto di HCH totale ($\alpha + \beta + \gamma$) nel terreno (denominato “Bianco”) e nella rizosfera delle piante. I valori sono la media ($n = 5$) dei campioni prelevati e sono espressi come parti per milione (ppm) \pm Errore Standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le medie, per $p < 0.05$ (Anova) LSD multiple range Test .

7. DISCUSSIONE

L'attività di ricerca è stata finalizzata all'approfondimento di tematiche legate alla bonifica eco-compatibile di suoli contaminati dagli isomeri dell'esaclorocicloesano in alcune aree del bacino del Fiume Sacco interdette all'uso agricolo. I valori di emivita degli isomeri α , β e γ -HCH superano qualche decennio. Per esempio a pH 8 e basse temperature l'emivita stimata dell' α -HCH è di circa 26 anni, mentre per β e γ -HCH è circa 40 anni (Willet, 1998). La diversa persistenza e le proprietà chimiche e chimico-fisiche del β -HCH sono determinate dal particolare orientamento dei sei atomi di cloro, tutti in posizione assiale rispetto alle varie combinazioni assiali ed equatoriali degli altri isomeri. Il β -HCH permanendo nell'ambiente per lungo tempo, a causa della sua più favorevole distribuzione sulle fasi organiche ($K_{ow} \cong 4$) rispetto a quelle più idrofile, è da considerarsi pericoloso per i sistemi viventi nei quali si accumula nella fase grassa entrando così nella catena alimentare. L'Environmental Protection Agency (EPA-USA) ha indicato il β -HCH come potenziale cancerogeno e la probabile causa di numerosi effetti biologici dannosi sull'uomo e su altri organismi biologici. Le aree in cui esso è stato rilevato insieme al lindano ed agli altri isomeri sono sottoposte all'obbligo di bonifica.

La decontaminazione dei suoli agricoli della Valle del Sacco è stata messa a punto partendo dalle esperienze di ricerca maturate presso l'Istituto di Biologia Agro-ambientale e Forestale (IBAF) del CNR negli ultimi venti anni di attività. Si sono utilizzati cloni di pioppo provenienti dalla collezione di germoplasma disponibile presso il Dipartimento DISAFRI dell'Università della Tuscia (VT) le quali sono state oggetto di studio di altre sperimentazioni per quanto riguarda gli aspetti fisiologici e produttivi. Secondo alcuni studi i pioppi sono in grado di degradare varie sostanze organiche xenobiotiche anche in assenza di microrganismi nell'ambiente radicale o nelle foglie. Ad esempio, è stato dimostrato che alcuni pioppi sono in grado di degradare il TCE a tricloroetanolo, di- tricoloroacetico o a CO₂. (Gordon et al., 1998). Altri possono asportare, idrolizzare e dealchilare atrazine e molti altri composti organici a metaboliti meno tossici (Burken and Schnoor 1996, 1997). In più, altri pioppi, possono asportare e traslocare dalle radici alla parte aerea persino composti difenili clorurati (PCBs) ritenuti molto stabili chimicamente (Liu and Schnoor, 2008).

Inoltre è stata anche utilizzata una raccolta storica di micro-organismi e funghi isolati e caratterizzati dal gruppo di microbiologia dello stesso Istituto e già sperimentati con successo per la degradazione di altri fitofarmaci ed erbicidi.

PARTE 1 - SELEZIONE IN SERRA DI CLONI DI PIOPPO SU TERRENO CONTAMINATO DA ESACLOROCICLOESANO

La prima fase sperimentale dell'attività ha avuto come obiettivo la selezione di cloni di pioppo (a partire da un pool di 7), che risultassero idonei alla coltivazione ad alta densità in SRC ("short rotation coppice") e ad una applicazione di fitorimedio dei suoli contaminati della Valle del Sacco. Contemporaneamente alla selezione delle piante si sono sperimentati diversi trattamenti sia biologici che chimici, noti per le potenziali capacità degradative, che potessero aiutare la pianta nell'attecchimento, nello sviluppo radicale e nella produzione di biomassa. Tale sperimentazione, della durata di due mesi, è stata effettuata in serra su suoli contaminati derivanti dal sito del futuro campo sperimentale. Considerata la necessità di condurre l'indagine in tempi brevi, i criteri di selezione adottati sono stati: 1) la percentuale di attecchimento delle talee di ogni clone in ciascuna delle condizioni testate, 2) la capacità di sviluppare sufficienti apparati radicali, 3) la produzione della maggiore biomassa aerea. I cloni idonei sono risultati l'I-214, l'AF2 ed il Monviso.

Le attività di analisi della matrice suolo e della matrice vegetale, effettuate al fine di verificare la presenza di metalli pesanti, hanno permesso di ottenere dei risultati dai quali è emerso che : 1) i valori di Pb e As sono al limite dei valori di legge Decr Min 412/99 per il verde pubblico, 2) i livelli di contaminazione del fusto e delle foglie sono entro i limiti dei coefficienti di trasferimento suolo - pianta riportati in Kloke et al. 1984.

PARTE -1 APPLICAZIONE DI RIZORIMEDIO CON SHORT ROTATION COPPICE (SRC) SU UN'AREA CONTAMINATA DA ESACLOROCICLOESANO (HCH)

Nell'esperimento in campo, al fine di ottenere la massima capacità degradativa, è stato adottato il sistema di coltivazione ad alta densità per impianti a turno di taglio breve (SRC "short rotation coppice"). Le talee dei tre cloni selezionati sono state impiantate meccanicamente su un terreno accuratamente lavorato in profondità per rendere più rapido lo sviluppo radicale. L'impianto è stato realizzato in parcelle delle dimensioni di 9x9 m con 3 repliche per ogni trattamento e cioè: a) ciascun clone di pioppo da solo, b) clone di pioppo inoculato con i batteri, c) clone di pioppo su suolo ammendato con

compost commerciale da materiale vegetale e con un composto che rilascia ossigeno in presenza di umidità del suolo (ORC della Solvay, S.A.). L'aggiunta del compost è stata adottata per verificare se la sua alta carica microbica potesse rappresentare un'alternativa all'inoculo. Lo spargimento dell'ORC incrementa l'attività di crescita e di utilizzazione dei substrati carboniosi di questi microrganismi del compost (Arienza, 2000; Cassidy and Irvine, 1999). Il suolo è risultato equilibrato riguardo al contenuto C/N e idoneo alla crescita sia delle piante, per le quali è importante la disponibilità di azoto, che dei batteri, per i quali è invece più importante la disponibilità di carbonio.

Gli interventi di batterizzazione a livello radicale sono stati effettuati subito dopo l'inizio dell'attività vegetativa. Nei due anni di sperimentazione è stata monitorata la popolazione microbica del suolo imperturbato dai trattamenti e la rizosfera delle piante batterizzate con le due specie di *Arthrobacter*; da tale monitoraggio si è potuto constatare che la popolazione batterica presente nella rizosfera di tutti i cloni di pioppo ha subito un incremento notevole, in particolare nella rizosfera del clone Monviso.

Al termine di ogni stagione vegetativa è stato campionato il suolo, per determinare la riduzione della concentrazione di HCH totale e dei singoli isomeri. I risultati delle campagne analitiche, effettuate per accertare l'effettiva degradazione dell'HCH, evidenziano che:

- 1) I tre cloni di pioppo presentano una diversa capacità degradativa degli isomeri dell'HCH ;
- 2) Sia l'ammendamento con l'ORC che la batterizzazione hanno considerevolmente aumentato la capacità degradativa della rizosfera di tutti i cloni;
- 3) Nell'insieme dei cloni di pioppo utilizzati il clone Monviso, già dopo il primo anno di sperimentazione, è risultato quello avente una capacità di degradazione significativa su tutti gli isomeri dell'HCH e, in particolare, sull'isomero beta (β), il più recalcitrante. Occorre sottolineare che questa capacità del clone Monviso tende ad aumentare notevolmente nelle parcelle in cui è stato batterizzato o ammendato con l'ORC.

Tali effetti sono stati più evidenti nel primo anno, probabilmente in seguito all'iniziale forte perturbazione degli equilibri del suolo che ha favorito un aumento della biodisponibilità del contaminante; nel corso del secondo anno, invece, il sistema si trova a subire un effetto di cosiddetto invecchiamento confermato anche dai dati di stima delle popolazioni batteriche.

Infine è da sottolineare che la produzione di biomassa dei tre cloni di pioppo utilizzati nel campo sperimentale e sottoposti a trattamento con batteri e ammendanti è risultata simile, per i cloni AF2 e Monviso, a quella ottenuta nella stessa area della Valle del Sacco non esposta alla contaminazione da HCH.

PARTE 2 - SPERIMENTAZIONE IN SERRA PER ANALIZZARE LE POTENZIALITÀ DI RIZORIMEDIO DEL CLONE MONVISO

In seguito ai buoni risultati ottenuti dopo il primo anno di sperimentazione in campo si è deciso di studiare ulteriormente il clone Monviso in condizioni controllate (serra) per approfondire le sue potenzialità di sviluppo radicale e di degradazione del contaminante. Al fine di poter ottimizzare l'efficacia di fitorimedio ed accelerare la completa eliminazione dell'HCH dal suolo contaminato sono stati applicati due tipi di ammendanti; con riferimento a quest'ultimi per confermare gli effetti positivi osservati in campo è stato utilizzato l'ORC della Solvay come ammendante chimico anche in serra, mentre per valutare l'utilizzo di ammendanti biologici è stata utilizzata una miscela di funghi micorrizici. Bisogna infatti considerare che i pioppi sono tra i pochi generi di piante che si possono associare in una simbiosi mutualistica con diversi tipi di funghi micorrizici (ectomicorrize e micorrize vescicolari-arbuscolari), i quali ricoprono un ruolo fondamentale nell'aumentare la superficie radicale di circa 800 volte. Non è chiaro se le micorrize siano in grado di degradare direttamente i contaminanti o se lo facciano indirettamente stimolando la crescita batterica nella rizosfera e lo sviluppo delle piante con cui si associano (McCutcheon & Schnoor, 2003; Karlinski *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009).

Come già osservato nei risultati, bisogna sottolineare che la produttività di biomassa accumulata nelle piante non è stata significativamente alterata dall'interazione con il terreno contaminato; questo dato oltre che essere indicativo dal punto di vista fisiologico ha un significato di estrema importanza economica e strategica. Inoltre, si può osservare come i trattamenti con micorrize e ORC a cui sono state sottoposte le piante non hanno provocato effetti evidenti sull'accumulo di biomassa (aerea e radicale), tuttavia il periodo di sperimentazione potrebbe non esser stato sufficiente per poter apprezzare gli stessi esiti del campo sperimentale.

Dalla Fig. 18 si può vedere come l'ammendamento dell'ORC alla rizosfera del Monviso ha favorito un aumento della superficie radicale, il che probabilmente deriva dal fatto

che la maggiore disponibilità di ossigeno ha favorito la respirazione cellulare delle radici, fonte di energia metabolica che supporta i processi di assorbimento minerale (Taiz e Zaiger, 2002). Le piante trattate con le micorrize sembrano aver reagito con una riduzione dello sviluppo radicale; in tal caso è probabile che l'associazione dei funghi micorrizici alle radici ne possa aver limitato lo sviluppo e/o sostituito le funzioni di assorbimento di nutrienti. Spesso, infatti, la quantità di micelio fungino è così estesa che la sua massa totale è paragonabile a quella della stessa radice.

Il contenuto di azoto (organico e totale) ha subito un aumento significativo nella rizosfera delle piante, sia quando ammendate con ORC che prive di trattamenti, rispetto a quello presente nel suolo oggetto di studio; questo dato potrebbe essere associato all'incremento di popolazione batterica nella rizosfera ma deve essere analizzato considerando anche gli effetti della fertilizzazione apportata durante la sperimentazione (Concime NPK 20-20-20). La pianta potrebbe aver restituito alla rizosfera parte dell'azoto organico, sotto forma di amminoacidi contenuti in essudati radicali, mentre il suolo di riferimento privo di radici potrebbe aver subito un processo di dilavamento perdendo parte dell'azoto fornito. Tra i parametri considerati per avere un quadro più completo è stato monitorato il pH di suolo e rizosfera; si può osservare come l'ammendamento con l'ORC abbia leggermente aumentato il pH del suolo e della rizosfera contrastando la normale azione acidificante dell'apparato radicale e confermando gli effetti attesi da questo prodotto conosciuto per caratteristiche chimiche. Questo incremento è da ricollegare all'aumento della superficie radicale e della popolazione batterica, in effetti il pH del suolo può influire sull'accrescimento delle radici delle piante e dei microrganismi del suolo: quanto più elevato risulta essere il pH tanto maggiore è la presenza di batteri, mentre valori di pH acidi favoriscono lo sviluppo di funghi.

Anche in condizioni di serra il clone Monviso ha dimostrato una capacità di degradazione significativa su tutti gli isomeri dell'HCH confermando i risultati ottenuti dal campo sperimentali nel 2009-2010; in particolare, la degradazione maggiore si è osservata sugli isomeri alfa (24%) e gamma (26%); occorre notare che questa capacità del clone Monviso tende ad essere confermata pure nei casi in cui è stato ammendato con l'ORC. L'applicazione dell'ORC anche solo ha dato percentuali di degradazione degli isomeri alfa e beta simili a quelli ottenuti dall'applicazione della pianta, ma minori rispetto al lindano (isomero gamma) e più in generale al totale degli isomeri analizzati.

8. CONCLUSIONI

Il recupero di aree fortemente degradate costituisce un problema di grande urgenza ed attualità. L'aumento dei siti contaminati, soprattutto nei paesi più avanzati, richiede nuovi approcci tecnologici che siano più efficaci e sostenibili dal punto di vista economico e ambientale. Sostenibilità economica e ambientale sono requisiti non sempre soddisfatti dalle tecnologie di bonifica tradizionali; fra le tecnologie più innovative vi è il fitorimediazione, una metodologia ancora in fase di studio che desta particolare interesse poiché oltre ad avere basso impatto ambientale e costi ridotti, ha il vantaggio di essere ben accettata dalle comunità locali. Per poter utilizzare sempre più efficacemente questa nuova tecnologia è necessario approfondire le conoscenze sul comportamento delle diverse specie vegetali in differenti condizioni ambientali (Argese et al., 2005).

La sperimentazione realizzata sia in scala di laboratorio (serra) che in scala di campo su un'area agricola situata nel comune di Anagni e portata avanti dal 2008 fino al 2010, ha valutato positivamente le possibilità applicative di questa tecnologia in tutti i suoi aspetti più importanti.

PARTE 1 - SELEZIONE DI CLONI DI PIOPPO IDONEI AD UNA APPLICAZIONE DI RIZORIMEDIO CON SHORT ROTATION COPPICE (SRC) SU UN'AREA CONTAMINATA DA ESACLOROCICLOESANO (HCH)

1. Il clone Monviso è risultato il clone più idoneo all'utilizzo in un intervento di fitorimediazione su suoli contaminati da esaclorocicloesano; la sua azione rizosferica è stata in grado di degradare significativamente tutti gli isomeri dell'HCH, e particolarmente efficace è risultata l'azione sull'isomero beta (57%), il più recalcitrante. Occorre comunque sottolineare che la sperimentazione di fitorimediazione anche con gli altri cloni, I-214 e AF2, ha dato evidenze di degradazione del contaminante. In questo contesto la disponibilità di materiale vegetale, selezionato allo scopo, sarà fondamentale per rendere questa nuova tecnologia ancora più efficace per le varie tipologie di inquinamento, rendendo sempre più vantaggiosa la sua applicabilità.

2. Lo studio effettuato in laboratorio, con la collaborazione del gruppo microbiologico dell'Istituto IBAF del CNR, per la selezione di specifici batteri degradatori degli isomeri dell'HCH è risultato essere una strategia vincente per un'efficace applicazione di rizorimedio in scala di campo. Come si può vedere dalle tabelle 7 e 8 la batterizzazione ha significativamente aumentato la capacità degradativa della rizosfera di tutti i cloni di pioppo arrivando, nella rizosfera del Monviso, a percentuali massime di degradazione del 36%, 63% e 23% rispettivamente per gli isomeri alfa, beta e gamma. Considerando gli studi sul calcolo dell'emivita di questi contaminanti (Willet, 1998) con l'applicazione dei batteri i tempi necessari alla bonifica dei terreni potrebbero essere notevolmente accorciati (circa di dieci volte). Le operazioni di batterizzazione su larga scala potrebbero essere effettuate con macchine agricole adattate allo scopo da esperti di meccanizzazione.
3. L'associazione di compost e del prodotto ORC ha avuto un effetto positivo rapportabile all'applicazione dei batteri; le riduzioni percentuali degli isomeri alfa, beta e gamma sono state rispettivamente del 18%, 68% e 28% e sono risultate tutte significative.

PARTE 2 - SPERIMENTAZIONE IN SERRA PER ANALIZZARE LE POTENZIALITÀ DI RIZORIMEDIO DEL CLONE MONVISO

I risultati più importanti ottenuti nell'approfondimento delle potenzialità del clone Monviso in condizioni controllate hanno riguardato la sua interazione positiva con il contaminato. Infatti:

- 1) la produttività di biomassa accumulata nelle piante non è stata alterata dall'interazione con il terreno contaminato. Questo risultato ha un rilievo economico non indifferente se si considera che la realizzazione di una piantagione su un terreno contaminato da HCH potrebbe portare ad una produzione quantitativamente pari a quella realizzata su un terreno non contaminato.
- 2) il clone Monviso ha confermato le capacità degradative su tutti gli isomeri dell'HCH
- 3) l'applicazione dell'ORC è risultata, anche in serra, efficace nella degradazione dell'HCH. Come si può notare dalla tabella 9 questo risultato può essere correlato al maggiore sviluppo della carica microbica sviluppatasi in suoli trattati con questo prodotto. Bisognerà però indagare maggiormente sui possibili effetti a lungo termine

causati al terreno dall'ammendamento di questo prodotto chimico e dal rilascio di possibili metaboliti secondari prodotti dalla degradazione dell'HCH.

In generale la sperimentazione condotta ha consentito di mettere a punto dei protocolli di applicazione del fitorimedio e di selezionare e testare con successo batteri e cloni di pioppo in grado di rimediare, con la loro associazione a livello di rizosfera, l'inquinamento del suolo da isomeri di HCH. Inoltre, sono state sviluppate metodologie di gestione e controllo dell'andamento delle colture di pioppo per fitorimedio.

L'esperienza applicativa nella Valle del Sacco induce a ritenere che questa metodologia di decontaminazione possa essere estesa all'intera area contaminata e attualmente inutilizzabile per la coltivazione. Tuttavia, affinché gli interventi di disinquinamento di tali siti risultino efficaci, è necessario che vi sia un'azione preliminare che miri al blocco delle fonti attive di inquinamento e alla bonifica dei sedimenti fluviali; laddove ciò non avvenisse la decontaminazione con questa "tecnologia verde" potrebbe essere vanificata dalle esondazioni del fiume e dall'afflusso di nuovi inquinanti.

Il pioppo potrebbe rappresentare il mezzo di messa in sicurezza più economico per affrontare il problema dell'emergenza di alcune aree agricole nel bacino del Fiume Sacco. Grazie alle caratteristiche di elevata produzione di biomassa e di buona capacità di biodegradazione dell'esaclorocicloesano i pioppi rappresentano dei validi candidati per la tecnica del fitorimedio, queste specie, infatti, possono essere coltivate mediante una tecnica colturale che permette di sfruttare le capacità di rapido accrescimento nella fase giovanile ai fini della degradazione dei contaminanti. Questa tecnica colturale, denominata SRC (Short Rotation Coppice), prevede dei tagli alla base del tronco ad intervalli di tempo molto brevi (1-3 anni). Inoltre, la presenza di una coltura "no food" è in grado di mantenere le caratteristiche di fertilità del terreno e di contribuire ad un miglioramento paesaggistico della zona interessata.

La scelta di questo approccio per la risoluzione del problema dei suoli contaminati implica tempi più lunghi rispetto ai tradizionali sistemi di bonifica, del resto tale apparente svantaggio viene più che compensato da più vantaggi di tipo economico, ossia: da un lato a parità di costi sostenuti è possibile bonificare aree molto più estese rispetto alle tecniche tradizionali, dall'altro la produzione di biomassa nel corso degli interventi di decontaminazione potrebbe diventare fonte di profitto, in una filiera corta, attraverso la sua conversione in energia elettrica o termica riconsegnando alla fine del ciclo dei terreni con qualità agronomiche notevolmente migliorate.

9. BIBLIOGRAFIA

- Aitchison E.W., Kelley S.L., Alvarez P.J.J., Schnoor J.L. (2000). Phytoremediation of 1,4-dioxane by hybrid poplar trees. *Water Environ Fed* 72(3): 313-321.
- Aprill W., Sims R.C. (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253-65.
- Arienzo M. (2000). Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene in water and soil slurry utilizing a calcium peroxide compound. *Chemosphere* 40(4):331-337.
- Argese E., Rigo C., Gamper U., Bedini S., Simion M., Gobbo L., Sburlino G. (2005). Studio sul bioaccumulo di metalli pesanti in specie vegetali di un sito contaminato. *XV Congresso della Società Italiana di Ecologia*, Torino.
- Bachmann A., Walet P., Wijnen P., de Bruin W., Huntjens J.L.M., Roelofsen W. and Zehnder A.J.B. (1988). Biodegradation of Alpha- and Beta-Hexachlorocyclohexane in a Soil Slurry under Different Redox Conditions *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 143–149.
- 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.
- Beurskens J.E.M., Stams A.J.M., Zehnder A.J.B., Bachmann A. (1991). Relative biochemical reactivity of three hexachlorocyclohexane isomers. *Ecotoxicol Environ Safety* 21: 128–136.
- Blaylock M.J., Salt D.E., Dushenkov V., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Raskin I., (1997). Enhanced accumulation of lead in Indian mustard by soil applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 31: 860-65.
- Blaylock M.J. & Huang J.W. (2000). Phytoextraction of metals. In *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*. Eds. I. Raskin, B.D. Ensley, pp: 53-70. New York: Wiley.
- Burken J.G. & Schnoor, J.L. (1996). Phytoremediation: Plant uptake of atrazine and role of root exudates. *J Envir Engrg* 122(11): 958-963.
- Burken J.G. & Schnoor, J.L.(1997). Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environ Sci Technol* 31(5): 1399-1406.
- Burken J.G. (2003). Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. Eds S.C. McCutcheon, J.L. Schnoor, pp: 59-84. New York: Wiley.
- Cardon Z.G. & Gage D.J. (2006). Resource Exchange in the Rhizosphere: Molecular Tools and the Microbial Perspective. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37: 459-488.

- Cassidy D.P. & Irvine R.L. (1999). Use of calcium peroxide to provide oxygen for contaminant biodegradation in a saturated soil. *Journal of Hazardous Materials* 69(1): 25-39.
- 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. I. Clonal comparisons of 4-year growth and phenology. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 1937-48.
- Chaney R.L., (1983). Plant uptake of inorganic waste constituents. In *Land Treatment of Hazardous Wastes*. Eds. JF Parr et al. 50-76. Noyes Data Corp, Park Ridge.
- Coleman M.D., Friend A.L., Kern C.C. (2004). Carbon allocation and nitrogen acquisition in a developing *Populus deltoides* plantation. *Tree Physiology* 24: 1347–1357.
- Cunningham S.D. & Berti W.R., (1993). Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 207-12.
- Cunningham S.D., Anderson T.A., Schwab A.P., Hsu F.C. (1996). Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56: 55-114.
- Datta J., Maiti A.K., Modak D.P., Chakrabarty P.K., Bhattacharyya P., Ray P.K. (2000). Metabolism of γ -hexachlorocyclohexane by *Arthrobacter citreus* strain BI-100: Identification of metabolites. *J Gen Appl Microbiol* 46: 59-67.
- Dickmann D.I. & Stuart K.W. (1983). The culture of poplars in Eastern North America. *Michigan State University Publications, East Lansing, Michigan*.
- 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 Phytol.* 159: 443-52.
- Dushenkov S. (2003). Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil* 249: 167-75.
- EEA (1998). Annual Report. *Environmental European Agency*.
- El-Shatnawi M.K.J. & Makhadmeh I.M. (2001). Ecophysiology of the Plant–Rhizosphere System. *Journal of Agronomy and Crop Science* 187 (1): 1 – 9.
- Eni Tecnologie, Eni Corporate University, 2002. La bonifica biologica di siti inquinati da idrocarburi. *Biblioteca Tecnica Hoepli*.
- EPA (2007). Metodo EPA 8270D. Semivolatile organic compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS).

- Flathman P.E., Lanza G.R., Glass D.J. (1999). Phytoremediation issue. *Soil and Ground Water Cleanup* 2: 4-11.
- Fontaine T.A., Moore T.D., Burgoa B. (2000). Distributions of contaminant concentration and particle size in fluvial sediment. *Wat. Res.* 34, (13): 3473-3477
- Glass DJ, (1999). US and International Markets for Phytoremediation, 1999-2000. *Needham, MA: D. Glass Assoc.*
- Gordon M., Choe N., Duffy J., Ekuan G., Heilman P., Muiznieks I., Ruszaj M., Shurtleff B.B., Strand S., Wilmoth J., Newman L.A. (1998). Phytoremediation of trichloroethylene with hybrid poplars. *Environ Health Perspect* 106(4):1001-4.
- Greger M. & Landberg T., 1999. Use of willow for Phytoextraction. *Int. J. Phytorem.* 2: 1-10.
- Heinisch E., Jonas K. e Klein S. (1993). HCH isomers in soil and vegetation from the surroundings of an industrial landfill of the former GDR, 1971-1989. *Sci. Total. Environ. (Suppl Part 1)*:151-159.
- Hoagland D.R. & Arnon D.I. (1950). The water culture, method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347: 1-32.
- Horne A.J. (2000). Phytoremediation by constructed wetlands. In *Phytoremediation of Contaminated Soil and Waters. Eds N. Terry, G. Banuelos*, pp: 13-40. Boca Raton: Lewis.
- Hughes J.B., Shanks J., Vanderford M., Lauritzen J., Bhadra R. (1997). Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environ. Sci. Technol.* 31: 266-71.
- Huhnerfuss H., Faller J., Konig W.A., Ludwig P. (1992). Gas chromatographic separation of the enantiomers of marine pollutants. 4. Fate of Hexachlorocyclohexane isomers in the Baltic and North Sea. *Environ Sci Technol* 26: 2127–2133.
- IHPA. (2006). The Legacy of Lindane HCH Isomer Production. A global Overview of residue Management, Formulation and Disposal. *International HCH & Pesticides Association* www.ihpa.info.
- ITRC (2001). Technical and regulatory guidance document, phytotechnology. *Interstate Technology Regulatory Council*, <http://www.itrcweb.org>.
- 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. *Environ Toxicol Chem* 16: 1318-1321.
- Kar S. & Singh P.K.. (1979). Detoxification of pesticides carbofuran and hexachlorocyclohexane by bluegreen algae *Nostoc muscorum* and *Wollea bharadwajae*.. *Microbios. Lett.* 10: 111-114.

- Karlinski L., Rudawska M., Kieliszewska-Rokicka B., Leski T. (2009). Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza* (Epub ahead of print).
- Kaspar, T. C. & Ewing R. P. (1997). ROOTEDGE: Software for measuring root length from desktop scanner images. *Agronomy Journal* 89:932-940.
- Kloke et al. In “Changing metal cycle and human health” , Nriagu, J.O. Ed., Berlin, *Springer-Verlag*, 1984,. Pp. 113-141.
- Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., and Lugtenberg B.J.J. (2004). Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(1): 6-15.
- Lafrance P. & Lapointe M. (2007). Mobilization and Co-Transport of Pyrene in the Presence of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants in Sandy Soil Columns. *Ground Water Monitoring & Remediation* 18(4): 139–147.
- 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* spp.). *Agricultural systems* 89.
- Li Y.F. (1999). Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Sci. Total Environ.* 232, 121–15.
- Licht L.A., Isebrands J.G. (2005). Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. *Biomass and Bioenergy* 28.
- Liu J. & Schnoor J.L. (2008). Uptake and translocation of lesser-chlorinated polychlorinated biphenyls (PCBs) in whole hybrid poplar plants after hydroponic exposure. *Chemosphere* 73(10):1608-16.
- Liu J., Hu D., Jiang G., Schnoor J.L. (2009). In vivo biotransformation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by whole plants–poplars and switchgrass. *Environ Sci Technol* 43(19): 7503–7509.
- Lynch J.M. (ed.) (1987). *The rhizosphere*. Chichester: Wiley Interscience.
- Ma L., Wu X.Q., Zheng L. (2009). *Relationship between plant hormone level excreted by ectomycorrhizal fungi and growth of poplar NL-895*. *Front For China* 4(2): 236-241.
- Machholz RM & Kujawa M. (1985). Recent state of lindane metabolism: Part III.. *Res. Rev.* 94: 119-149.
- Malaiyandi M., Shah S.M., Lee P. (1982). Fate of alpha- and gamma-hexachlorocyclohexane isomers under simulated environmental conditions. *J Environ Sci Health, Part A* A17: 283–297.

- McCutcheon S.C. & Schnoor J.L. (eds) (2003). *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants. Wiley Interscience.*
- Macpherson G. (1995). Home-grown energy from short-rotation coppice. *Farming Press Books, Ipswich, UK.*
- Nagata Y., Endo R., Ito M., Ohtsubo Y., Tsuda M. (2007). Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 741-752.
- Negri M.C. & Hinchman R.R. (2000). The use of plants for the treatment of radionuclides. In *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*. Eds. I. Raskin, B.D. Ensley, pp: 107-32. New York: Wiley.
- Newman L.A., Strand S.E., Choe N., Duffy J., Ekuan G. et al., (1997). Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1062-67.
- Olson P.E., Reardon K.F., Pilon-Smits E.A.H. (2003). Ecology of rhizosphere bioremediation. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. Eds. S.C. McCutcheon, J.L. Schnoor, pp 317-54. New York: Wiley.
- Phillips T.M., Seech A.G., Lee H., Trevors J.T. (2005). Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation* 16: 363-392.
- Pilon-Smits E. (2005). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 15-39.
- Predieri S & Gatti E. (2000). Exploiting in vitro culture for collection cloning and screening plants suitable for phytoremediation. In: Kaltsikes P.J. (Ed.): *COST Action 837 Workshop 55-56. Agricultural University of Athens, Hersonissos.*
- 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.
- Pulford I.D. & Watson C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees- a review. *Environment International* 29: 529-40.
- Quoreshi A.M. & Khasa D.P. (2008). Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on root colonization, growth, and nutrient uptake of aspen and balsam poplar. *Biomass and Bioenergy* 32: 381-391.
- Rahman K.S., Rahman T., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I.M. (2002). Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *J Basic Microbiol* 42(4): 284-91.

- Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkow S., Salt D.E., (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 285-290.
- Raskin I., Smith R.D., Salt D.E. (1997). Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 221-26.
- Rigas F., Dritsa V., Marchant R., Papadopoulou K., Avramides E.J., Hatzianestis I. (2005). Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. *Environment International* 31: 191-196.
- 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.*
- Sahu S.K., Patnaik K.K., Bhuyan S. e Sethunathan N. (1993). Degradation of soil-applied isomers of hexachlorocyclohexane by a *Pseudomonas* sp.. *Soil Biol. Biochem.* 25: 387-391.
- Sala M., Sunyer J., Otero R., Santiago-Silva M., Camps C., Grimalt J.O. (1999). Organochlorine compound concentration in the serum of inhabitants living near an electrochemical factory. *Occup Environ Med.*, 56:152–158.
- 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., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carreira L.H. (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 29: 318A-23A.
- 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, pp:135-50.
- 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, pp: 146-84.
- Shang T.Q., Newman L.A., Gordon M.P. (2003). Fate of trichloroethylene in terrestrial plants. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. Eds S.C. McCutcheon, J.L. Schnoor, pp 529-60. New York: Wiley.
- Shimp J.F., Tracy J.C., Davis L.C., Lee E., Huang W., Erickson L.E., Schnoor J.L. (1993). Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 23(1): 41 – 77.

- Singhal V., Rai J.P.N. (2003). Biogas production from water hyacinth and channel grass used for phytoremediation of industrial effluents. *Bioresource technology* 86.
- Suresh B. & Ravishankar G.A. (2004). Phytoremediation- A novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24(2-3): 97-124.
- Sweeney (1969). Metabolism of lindane by unicellular algae. *Proc. Conf. Great. Lakes Res.* 94: 98-102.
- Taiz L. & Zeiger E. (2002). Plant Physiology. *Sunderland, MA: Sinauer.* 690 pp.
- Traiana M.E., Urbani E., Rescia M., Mantovani A. (2001). L'insetticida lindano: identificazione dei rischi possibili per la riproduzione umana. *Rapporto Istituto Superiore di Sanità.* 59 p. Rapporti ISTISAN 01/3. ISSN 1123-3117.
- Trapp S. & Karlson U. (2001). Aspects of phytoremediation of organic pollutants. *J Soils Sediments* 1(1): 37-43.
- Tsezos M. e Wang X. (1991). Biosorption and biodegradation interactions—a study on lindane. *Biotech Forum Europe* 8: 120-125.
- Tu C.M. (1976). Utilization and degradation of lindane by soil microorganisms. *Arch. Microbiol.* 108: 259-263. DOI:10.1007/BF00454850.
- von Caemmerer S., & Farquhar G.D. (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376–387.
- Vroblesky D.A., Nietch C.T., Morris J.T., (1999). Chlorinated ethanes from ground water in tree trunks. *Environ. Sci. Technol.* 33: 510-515.
- Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E., Vivanco J.M. (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol* 132: 44-51.
- Wania F., Mackay D., LI Y.-F., Bidleman T.F., Strand A. (1999). Global chemical fate of a-hexachlorocyclohexane. 1. Evaluation of a global distribution model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(7): 1390–1399.
- Wenzel W.W. (2009). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321: 385-408.
- Zacchini M., Pietrini F., Scarascia Mugnozza G., Iori V., Pietrosanti L., Massacci A.(2008). Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water Air Soil Pollut* 197: 23-34.

10. SITOGRAFIA

<http://www.atsdr.cdc.gov>

<http://www.bioregen.eu>

<http://195.45.99.79/csra>

<http://www.eurodemo.info>

<http://www.nicole.org>

<http://www.sednet.org/>