



Bollettino

della Società Italiana della Scienza del Suolo

Volume 50, 2001

No. 3

Lit. 40.000 / € 20,66

Atti del Convegno
La "bioremediation" in Italia: dalla teoria alla pratica
Roma, 14-15 dicembre 2000

Saluto di benvenuto

G. Lelli 549

Sessione 1: La teoria

La Bioremediation: una strategia multidisciplinare per detossificare suoli e acque inquinati -
S. Nocciolini, A. Costa, E. Lorenzoni, L. Spadafina, M.R. Vacri 553

Pedofauna: possibile agente di bioremediation? - C. Jacomini, E. Rota 571

Il fitorimediaio: organismi vegetali come potenziali agenti disinquinanti - A. Massacci,
M.A. Iannelli, F. Pietrini 581

Sessione 2: La ricerca

I progetti di ricerca italiani sulla bioremediation - S. Grego 591

I progetti di ricerca italiani nella cooperazione tecnica e scientifica a livello europeo -
A. Benedetti 595

Bioremediation: stato di applicazione in Europa - F. Quercia, G. Petruzzelli 603

Sessione 3: La pratica

Trattamento biologico di siti industriali: dalla sperimentazione all'applicazione in campo -
A. Bernardi, A. Robertiello 625

I muschi acquatici utilizzati come indicatori e accumulatori di metalli: limiti e vantaggi -
R.M. Cenci 633

Indicatori molecolari delle variazioni della comunità batterica in suoli inquinati -
A. Gelsomino, C. Creccchio, G. Cacco 641

Fitoestrazione da un suolo contaminato da più metalli pesanti: accumulo e tolleranza -
M.F. Quartacci, C.L.M. Navari, F. Izzo 649

Studio di alcuni fattori che determinano l'efficienza della tecnica di fitoestrazione assistita
in un suolo inquinato da piombo - G.A. Sacchi, A. Rivetta, A. Abruzzese, G. Lucchini,
A. Paganetto, F. Gambale, M. Cocucci 661

Microorganismi da siti industriali: selezione per resistenza ai metalli pesanti, accumulo di
zinco e applicazioni biotecnologiche - A.R. Sprocati, C. Cremisini, E. Fantauzzi,
M. Galletti, S. Sabelli, L. Segre, F. Vitali 673

Studio dell'efficienza del mais nella fitoremediation in un suolo contaminato da metalli
pesanti - P. Zaccheo, L. Crippa, C. Gigliotti 685

Tavola rotonda

"Dalla teoria alla pratica" - M. Angelone 695

Sessione 4: Poster

Variazione di parametri morfo-fisiologici di piante di orzo e di avena allevate in microcosmi
trattati con metalli pesanti - E. Argese, E. Delaney, F. Agnoli, F. Faraon, A. Sorgonà,
G. Cacco 709

continua in II di copertina

Il codice TMVOC per la simulazione numerica del trasporto di compost organici nel sottosuolo in condizioni multifase - <i>A. Battistelli, K. Pruess</i>	723
Valutazione della capacità di Pb-decontaminante di due specie ornamentali - <i>G. Carratù, A.M. Carafa, G.G. Aprile</i>	733
Attività protettiva delle sostanze umiche presenti nei composts nei confronti dell'attività mutagene dei metalli pesanti - <i>C. De Simone, A. De Marco, C. D'Ambrosio, M. Owczarek, F. Beretta</i>	739
Indagini preliminari sull'uso di tecniche SEM per lo studio di piante accumulatrici - <i>A. Fornaroli, E. Capri, M. Trevisan</i>	747
Utilizzazione di <i>Azolla</i> e <i>Lemna</i> per la rimozione di N e P da acque reflue - <i>C. Forni, M.A. Nicolai, L. Tancioni</i>	751
Biosensori per bioremediation da erbicidi - <i>D. Esposito, P. Giardi, E. Pace, M. Rizzuto, M.T. Giardi</i>	759
Fitoestrazione di metalli pesanti: primi risultati sperimentali - <i>L. Marchiol, G. Zerbi</i>	765
Modelli sperimentali di <i>Bioremediation</i> : piante cquatiche e antibiotici di uso veterinario - <i>L. Migliore, C. Forni, S. Cozzolino</i>	777
Stima della tossicità ambientale dei residui di attività mineraria (Estrazione di pirite). Contributi conoscitivi per le attività di bonifica e bioremediation. Studi preliminari - <i>S. Nocciolini, A. Costa, E. Lorenzoni, L. Spadafina, M.R. Vacri</i>	781
Possibile recupero biologico di un suolo d'altura precedentemente adibito a stazzo - <i>L. Pompili, F. Tittarelli, F. Pinzari, A. Benedetti, S. Baccella</i>	791
Fitoestrazione mediante <i>Brassica Napus</i> (colza): capacità di assorbimento nei confronti di zinco e cadmio - <i>G. Rossi, A. Figliolia, S. Socciarelli</i>	803
Detossificazione di suoli inquinati da idrocarburi: un caso studio - <i>F. Saccomandi, L. Gianfreda</i>	811
La laccasi: un possibile agente disinquinante? - <i>F. Sannino, L. Gianfreda</i>	817
Effetti delle poliammine sull'accumulo e la traslocazione del piombo in mais: interessanti prospettive di fitorimedio - <i>M. de Agazio, E. Rea, A. Fruggerio, M. Zacchini</i>	825
Interazione tra funghi micorrizici e metalli pesanti: prospettive nel biorisanamento - <i>S. Perotto, E. Martino, P. Bonfante</i>	833

Contributi dei soci

Aspetti tecnico economici dell'inquinamento da gas serra (Protocollo di Kyoto: riciclo della sostanza organica e controllo delle emissioni) - <i>P.T.Perri</i>	847
Il riciclo delle ceneri - <i>F. Tittarelli</i>	853

Vito Amadio Santoro



Bollettino

della Società Italiana della Scienza del Suolo

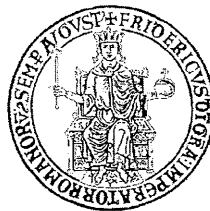
Volume 50

No. 3 2001





Società Italiana della
Scienza del Suolo



Università degli Studi di Napoli
"Federico II"

Atti del Convegno

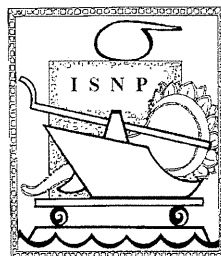
La "bioremediation" in Italia: dalla teoria alla pratica

Organizzato dalla Società Italiana della Scienza del Suolo
Commissione III "Biologia del Suolo"
Commissione IV "Fertilità del suolo e Nutrizione delle Piante"

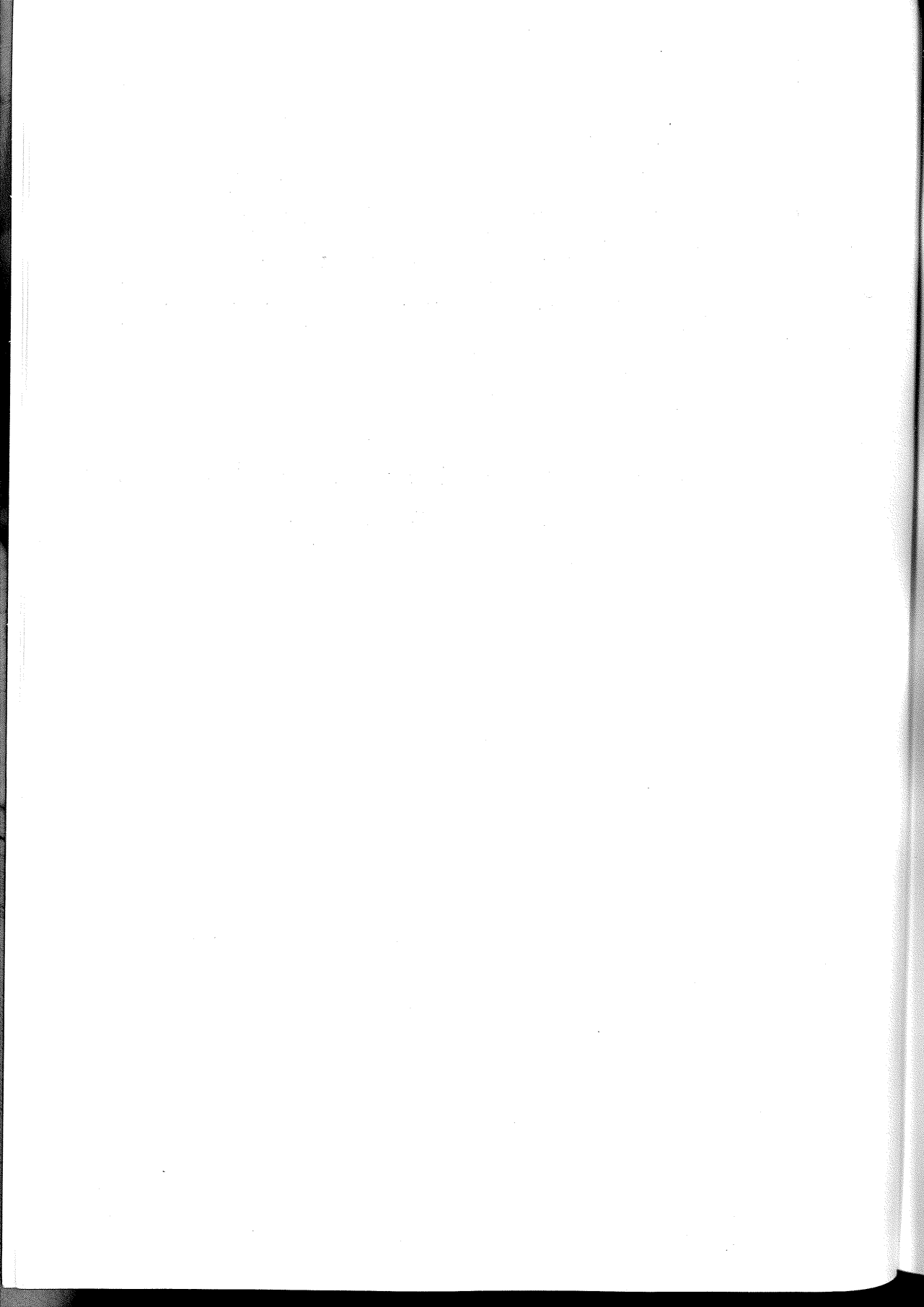
ENEA Sede Centrale
Lungotevere Thaon de Ravel, 76 - Roma
14-15 Dicembre 2000



Ente per la Nuova Tecnologia,
l'Energia e l'Ambiente



Istituto Sperimentale per la
Nutrizione delle Piante



SALUTO DI BENVENUTO

Giovanni Lelli

Vice-Direttore Generale ENEA

Porgo il mio saluto di benvenuto in nome del Presidente Prof. Carlo Rubbia e del Direttore Generale Ing. Tedeschi, che si scusano per non essere presenti di persona poiché occupati da impegni assunti in precedenza.

Se si può usare uno slogan: dalla pala alla bioremediation, possiamo tranquillamente affermare che qui, in Enea, esiste la consapevolezza dei problemi legati alla questione dei rifiuti e al risanamento di siti contaminati. Ne è testimonianza specifica, il tipo di attività fin qui effettuata e i programmi sui quali verterà una parte della nostra attività futura.

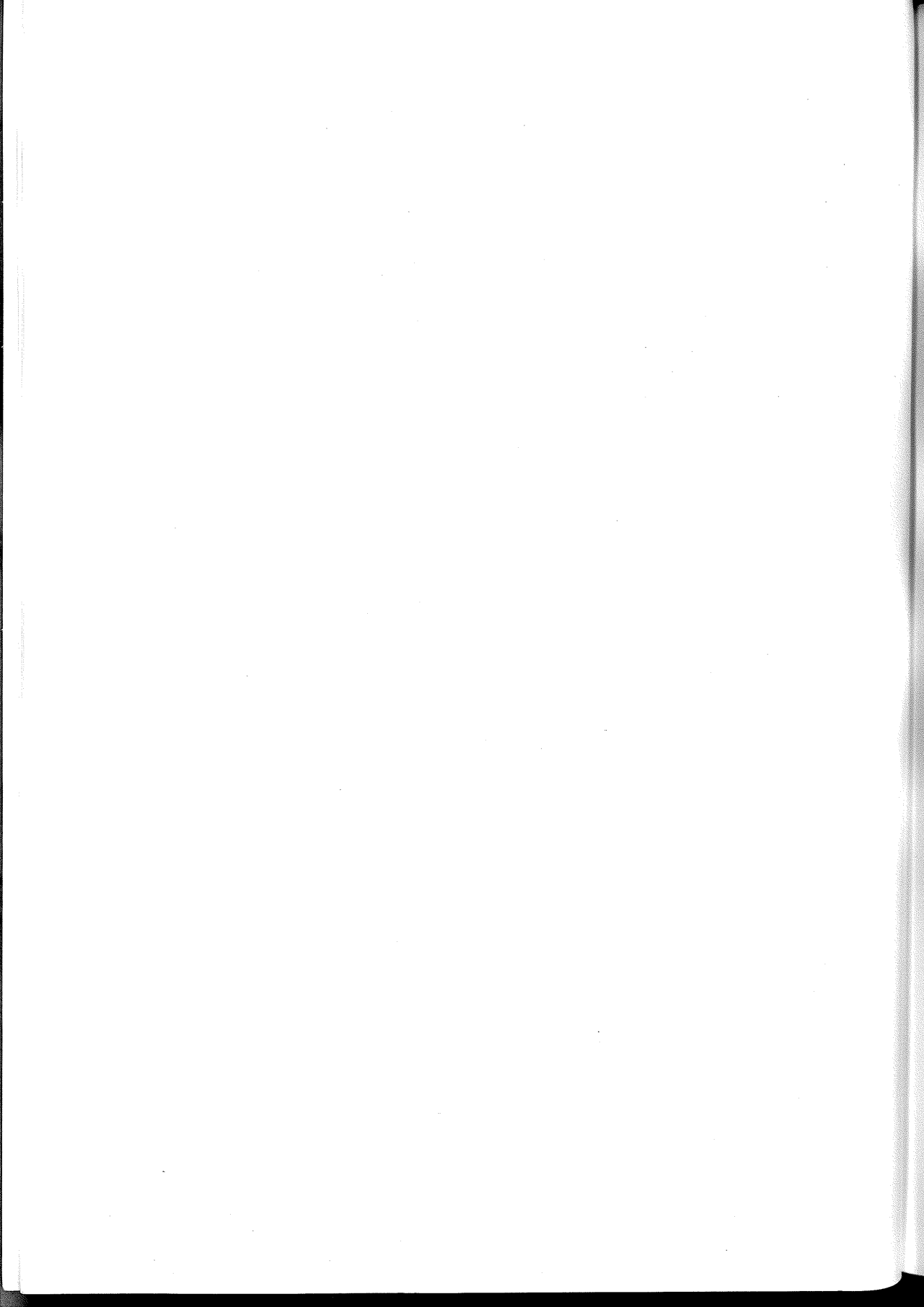
Sono convinto che organizzare un convegno di questo tipo sia una cosa molto utile, soprattutto nel nostro Paese, non solo perché siamo indietro rispetto ad altre nazioni occidentali ma, soprattutto, perché il nostro Paese è il Paese dei piccoli comuni, delle piccole realtà, così importanti economicamente. Tuttavia, in un periodo in cui la competitività non è solo fra aziende ma fra territori, è importante presentarsi con un territorio 'pulito'. Volendo poi considerare, in particolare, le aree meridionali, ove l'economia del territorio si basa sulla fruizione dello spazio, il fatto che in ambito nazionale sono stati riconosciuti almeno 5000 siti contaminati e da decontaminare, fa capire quanto siamo in credito di tecnologie ed interventi in questo settore.

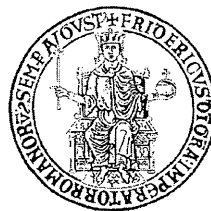
In ogni modo è ormai chiaro che, anche se con ritardo, nel nostro Paese si è acquisita un'esperienza operativa di riduzione dell'inquinamento con tecniche di Bioremediation.

In questa sede vorrei ribadire l'impegno dell'ENEA su questi temi di ricerca, temi che già da qualche tempo ci vedono impegnati. Inoltre, una volta individuate delle linee comuni di ricerca, il nostro Ente è disponibile per eventuali collaborazioni sia su aspetti teorici sia applicativi.

E' evidente che le attività applicative vedranno anche l'impegno delle amministrazioni locali. Per qualificare un intervento di decontaminazione di un sito, sarà opportuno presentarsi con credenziali e con un'organizzazione che garantisca della bontà del metodo applicato. Gli operatori del settore che dovranno applicare gli interventi di Bioremediation sul territorio, saranno chiamati a qualificare il metodo. Questa qualificazione dovrà avvenire con l'aiuto degli enti di ricerca, le università e anche dell'Enea.

In conclusione vi porgo i ringraziamenti per aver voluto organizzare questo convegno all'interno del nostro Ente e per l'attenzione prestata. Ci auguriamo che quest'occasione rappresenti un punto di partenza per porre le basi di una rete di collaborazione nazionale fra gli attori interessati alla risoluzione delle tematiche ambientali.



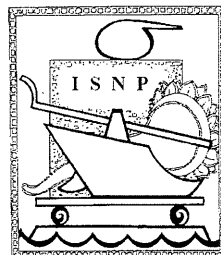


La "bioremediation" in Italia: dalla teoria alla pratica

Sessione 1:

La teoria

ENEA





LA BIOREMEDIATION: UNA STRATEGIA MULTIDISCIPLINARE PER DETOSSIFICARE SUOLI E ACQUE INQUINATI

Liliana Gianfreda e Flavia Saccomandi

Dipartimento di Scienze Chimico Agrarie Università degli Studi di Napoli "Federico II"
Via Università, 100 - 80055 Portici

Negli ultimi anni un numero molto elevato di sostanze inquinanti, o potenzialmente tali, sono state introdotte nell'ambiente. Tuttora, numerose attività industriali e/o pratiche agricole contribuiscono ad aumentare il livello di tali sostanze in tutti gli ecosistemi, dove esse vanno a ripartirsi, in diversa misura, secondo la loro origine e natura. Fra i vari sistemi ambientali interessati a questo massivo inquinamento, gli ambienti acquatici, fiumi, laghi o più in generale acque superficiali, quelli terrestri, suoli e sedimenti e, infine, le acque di falda sono di sicuro gli ecosistemi più interessati al fenomeno.

In Tabella I è riportata una lista di sostanze ad alto potere inquinante e la loro distribuzione nel suolo e nelle acque. Molte delle sostanze organiche, che vanno ad inquinare i nostri ambienti, sono molto nocivi per la salute dell'uomo e degli altri esseri viventi. Ad esempio, gli idrocarburi policiclici aromatici hanno un alto potenziale inquinante, essendo dei forti agenti mutageni e cancerogeni. Analogamente, molti metalli, se presenti a determinati livelli di concentrazione, variabile da elemento ad elemento, sono molto tossici e possono facilmente distribuirsi tra i vari organismi viventi attraverso, la catena alimentare.

Tutto ciò ha reso necessario, già nel passato, la ricerca di metodologie per il disinquinamento e il recupero di siti contaminati. Ovviamente, lo scopo d'ogni strategia di decontaminazione dovrebbe essere quella di ripristinare, nel sito trattato, livelli di qualità compatibili con la sopravvivenza degli essere viventi, rispondendo nel frattempo a principi d'economicità, facile applicabilità, e bassi o nulli rischi d'impatto ambientale.

Diverse sono la strategie e le metodologie che possono essere utilizzate nella decontaminazione dell'ambiente e, in particolari, dei suoli e delle acque inquinate. Due tipi base di strategie sono possibili (Figura 1), strategie di tipo ingegneristico, basate principalmente su metodologie chimiche e fisiche, e strategie biologiche, cioè che si avvalgono di agenti biologici per la decontaminazione (Bollag e Bollag, 1995).

Tabella I. Tipi di inquinanti e loro presenza nei distretti ambientali

Categoria di inquinanti	Suolo	Acque profonde	Acque superficiali	Aria
Nutrienti (N e P)	+	+	+	
Pesticidi	+	+	+	
Sostanze pericolose (oli, solventi, idrocarburi, policiclici aromatici)	+	+	+	+
Elementi in tracce (metalli pesanti, elementi a basse conc.)	+	+	+	+
Sedimenti			+	
Particolato				+
Smog				+
Gas serra				+

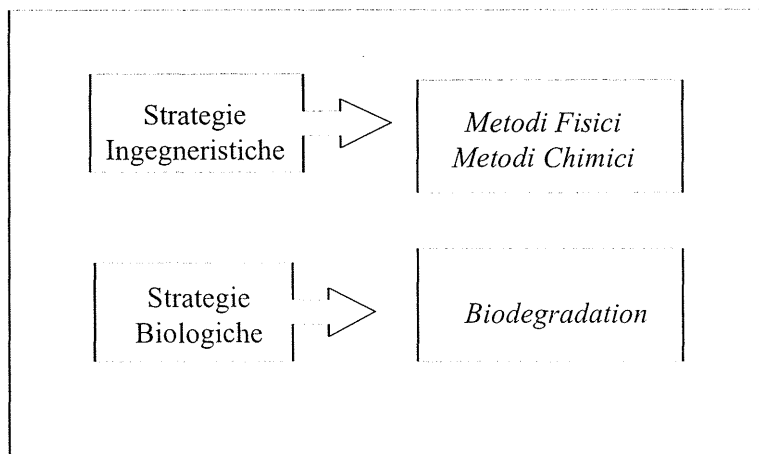


Figura 1. Approcci per il recupero di sistemi inquinati.

La *bioremediation* o recupero biologico, è una strategia biologica per il recupero di ambienti inquinati in particolare di suoli e acque inquinate. Come definito dall'Accademia Americana di Microbiologia la *bioremediation* è "the use of living organisms to reduce or eliminate environmental hazard resulting from accumulation of toxic chemicals and other hazardous wastes" (Adriano *et al.*, 1999). La suddetta definizione è piuttosto ampia, perché fa riferimento all'accumulo di sostanze e rifiuti di varia natura, purché tossici o pericolosi. Infatti, alcune sostanze, che naturalmente non sono inquinanti, lo possono diventare, quando la loro concentrazione supera determinati livelli soglia, al di sopra dei quali si possono instaurare dei fenomeni di tossicità o di pericolosità per gli esseri viventi. Un esempio è dato dai metalli pesanti, normalmente presenti nell'ambiente e che, anzi, a bas-

si livelli sono indispensabili per la sopravvivenza degli organismi viventi (vedi il loro ruolo nei numerosi biochimismi), ma che a livelli elevati, così come definiti da precisi criteri indicati dagli enti preposti, diventano elementi tossici da dover eliminare.

I principali agenti utilizzabili nei processi di *bioremediation* sono i microrganismi. Tali organismi, infatti, hanno una naturale capacità e versatilità metabolica e, come sarà descritto in seguito, sono capaci di trasformare numerose sostanze, anche quelle normalmente definibili xenobiotiche, cioè del tutto estranee al complesso metabolico ed enzimatico di ogni organismo vivente.

I microrganismi possono potenzialmente detossificare numerosi ambienti inquinati e ripristinarli al loro stato originario. L'importanza dei microrganismi come agenti di *bioremediation* è tale che per alcuni studiosi quest'ultima è intesa solo come applicazione di agenti microbici per il disinquinamento. In realtà, altri agenti che potenzialmente possono essere utilizzati nel disinquinamento non solo dei suoli e delle acque inquinate, ma anche degli ambienti aerei, sono le piante. In questo caso, tuttavia, si preferisce parlare di *phytoremediation*, proprio per indicare in modo preciso e univoco che gli agenti biologici impiegati sono gli organismi vegetali.

I principali protagonisti dei processi sia microbici sia vegetali sono le proteine enzimatiche; quindi anche queste ultime sono state considerate a loro volta come possibili agenti di *bioremediation*, ed alcuni esempi della loro applicabilità e possibile efficacia sono ampiamente riportati in letteratura (Bollag, 1992; Nannipieri e Bollag, 1991).

Una volta che ci si propone di applicare un programma di *bioremediation* ad un sito inquinato è necessario prevedere almeno tre fasi distinte da percorrere, perché l'intervento, che si vuole attuare, possa avere successo (Figura 2).

Una prima fase necessaria è quella dell'identificazione. E', cioè, necessario conoscere in modo dettagliato la storia pregressa e il tipo di attività, sia essa industriale o non, avvenuta nel sito e avere delle indicazioni, anche sommarie, sul grado di inquinamento. Successivamente, è necessario effettuare una precisa valutazione della gravità del problema che si vuole affrontare. E' necessario, cioè, conoscere qual è il grado e l'entità del problema di inquinamento. La terza fase, poi, è quella vera e propria della progettazione del programma di risanamento. Infatti, è necessario, alla luce delle informazioni preliminari ottenute nelle due fasi precedenti, poter prevedere, nel caso ad esempio si tratti di un suolo inquinato, fino a che profondità bisogna spingersi per risanare completamente il suolo e se le acque superficiali

necessitino o non di essere trattate. Ciò dipende strettamente dal momento in cui si vuol far partire il trattamento di recupero, rispetto al momento in cui è avvenuto l'evento che ha provocato l'inquinamento. Infatti, è prevedibile aspettarsi che quanto più tardi s'interviene, tanto più difficile possa essere il problema da affrontare e più profonda e vasta sia la zona da trattare.

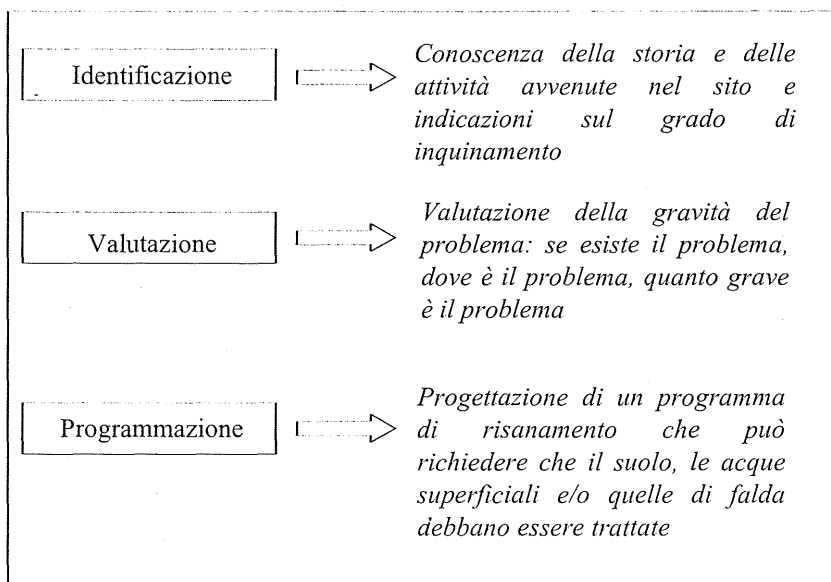
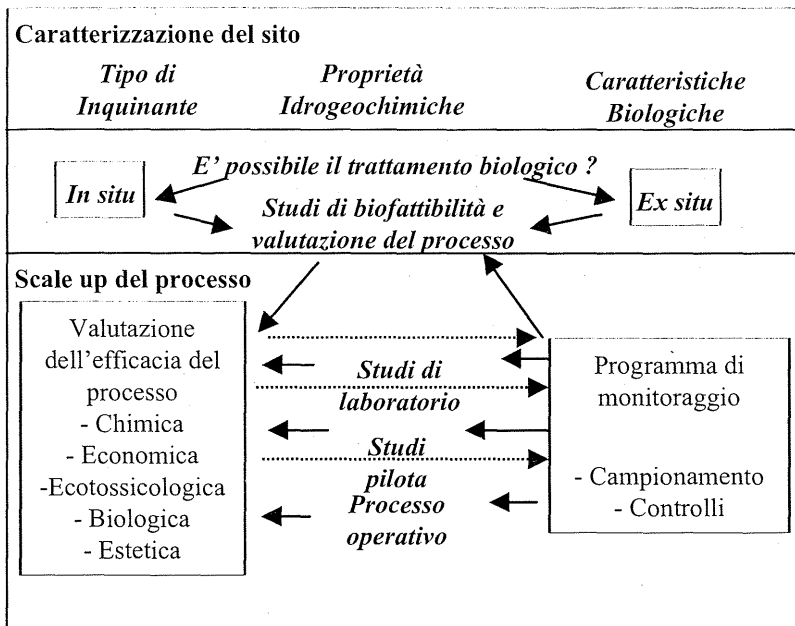


Figura 2. Fasi di un programma di (bio)remediation.

Nel caso, ad esempio, di residui o reflui dannosi, prodotti da attività industriali, è ovvio che un possibile approccio è quello di intervenire all'origine, nel senso di trattare i rifiuti potenzialmente inquinanti prima del loro sversamento nell'ambiente, sia esso acquatico o terrestre. In questo caso, i processi e le metodologie che si adottano, anche se utilizzano agenti biologici, sono fondati su principi e tecniche diverse, che non saranno affrontate in questo contesto.

In accordo con quanto riportato da Smith e Mason (1999) e da Haitzer e Sayler (1993) la progettazione di un programma di bioremediation e soprattutto, la dimostrazione che tale programma ha risolto in modo efficace il problema di contaminazione, può essere rappresentato come una successione gerarchica di livelli di intervento, strettamente collegati l'uno all'altro (Figura 3).

Per ciascuno di questi livelli, è necessario attuare una strategia interdisciplinare capace di monitorare e di valutare in modo sistematico le varie parti che lo compongono.



* adattato da Heitzer and Sayler (1993)

Figura 3. Progettazione di un programma di bioremediation.

Caratterizzazione del sito

Prioritaria a qualunque tipo di trattamento che si possa ipotizzare o attuare, è la caratterizzazione accurata del sito da decontaminare, in termini di tipo, natura e complessità del o degli inquinanti presenti, delle proprietà idrogeologiche e delle caratteristiche biologiche.

Parametri essenziali per una corretta caratterizzazione dell'inquinante sono le sue proprietà chimiche, quali natura, concentrazione, complessità e composizione chimica, e proprietà fisiche, come solubilità, volatilità ed adsorbimento, e nel caso dei metalli pesanti, la speciazione. Tutte queste proprietà influenzano e determinano due dei tre principi base su cui si deve basare la scelta di una strategia di *bioremediation* e cioè la biodegradabilità, che è definita come suscettibilità dell'inquinante a subire la trasformazione biologica in prodotti meno tossici, e la biodisponibilità, o accessibilità dell'inquinante all'agente biologico. Il terzo principio base è la bioattività, o possibilità di ottimizzare l'attività biologica (Blackburn e Hafker, 1993).

La biodegradabilità dipende strettamente sia dalle proprietà in-

trinseche dell'inquinante che da quelle dell'ambiente, in cui deve avvenire la trasformazione biologica.

Come precedentemente detto, numerose sostanze chimiche possono essere trasformate da batteri e funghi fino a completa mineralizzazione in anidride carbonica ed acqua (Tabella II). Quando invece la trasformazione non porta alla completa mineralizzazione delle sostanze, ma porta ad intermedi di diversa complessità, è estremamente importante sapere se questi composti sono più o meno tossici di quelli di partenza.

Tabella II Mineralizzazione microbica di inquinanti organici.

Inquinante	Microrganismo
Tricloroetilene	<i>Metanotrofi</i> <i>Escherichia coli</i>
Pentaclorofenolo	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Flavobacteri</i>
BTEX	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Politiclici aromatici	<i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Cuuninghaella elegans</i>
PCBs	<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>
Clorobenzeni	<i>Alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas</i>
Insetticidi Alchilarilici	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

Tuttavia alcune sostanze, quali ad esempio gli idrocarburi, possono presentare una resistenza più o meno marcata alla degradazione microbica in base alla loro struttura chimica (Tabella III) (Blackburn e Hafker, 1993). Alcuni di essi, ad elevata e complessa struttura molecolare, come i composti che presentano molti anelli aromatici condensati, posseggono un'intrinseca ed elevata resistenza alla degradazione microbica e sono definiti recalcitranti.

Tabella III. Biodegradabilità degli idrocarburi.

Biodegradabilità	Idrocarburi
Elevata	N- e iso-alcani
Alta	1-,2-,5-,e 6-cicloalcani, aromatici (1-anello), aromatici solforati
Moderata	3-e 4- cicloalcani, aromatici (2- e 3-anelli)
Alta resistenza	Tetra-aromatici, sterani, triterpeni nafteno-aromatici
Elevata resistenza (recalcitranza)	Penta-aromatici, resine

* Modificata da Blackburn e Hafker (1993)

Un altro fattore che è strettamente collegato alla struttura molecolare delle sostanze e che può influenzare in modo significativo la sua bio-

degradabilità, è la solubilità nella fase acquosa. Molti inquinanti di natura organica sono praticamente insolubili in acqua e costituiscono fasi organiche completamente separate. Tali sostanze, di solito indicate con la sigla NAPL, Non Aqueous Phase Liquids, sono presenti in molti siti inquinati, a seguito di attività industriali, impianti di raffinazione del petrolio, o dovuti allo spargimento o perdita più o meno accidentale dalle petroliere, o associati a rifiuti della lavorazione del carbon fossile (Alexander, 1994). Essi costituiscono un grosso problema per un eventuale disinquinamento biologico, in quanto risultano poco accessibili all'azione dei microrganismi. Tuttavia è riportato in letteratura che, almeno in condizioni di laboratorio, alcuni microrganismi quali ad esempio *Pseudomonas* sp. o *Mycobacterium* sp. sono capaci di accedere a tali sostanze e successivamente di metabolizzarle (Cerniglia, 1992). Altri microrganismi producono dei (bio)surfattanti che, secreti nell'ambiente circostante alla fase organica, favoriscono l'attacco microbico (Alexander, 1994).

Un altro parametro che può ulteriormente influenzare la trasformazione microbica di un inquinante organico è il suo livello di concentrazione. Infatti, sia elevate sia basse concentrazioni possono risultare sfavorevoli al processo di trasformazione microbica. Infatti, elevati livelli di inquinante possono risultare così tossici per la comunità microbica da impedire praticamente ogni possibilità di crescita e trasformazione metabolica. Analogamente, bassi livelli di concentrazione possono essere insufficienti a soddisfare le esigenze, in termini di fonti di carbonio e di energia, per sostenere la crescita del o dei microrganismi.

Nel caso di inquinanti inorganici, i microrganismi possono comportarsi come efficaci agenti di decontaminazione, perché possono contribuire alla trasformazione del metallo da una forma solubile tossica, ad una forma insolubile o modificata, che risulta immobile e, quindi, potenzialmente non tossica (Francis, 1999). Tali trasformazioni passano, ovviamente, attraverso passaggi di ossido riduzione degli inquinanti inorganici. Un esempio è rappresentato dai meccanismi di bioriduzione messi in atto dalla *Pseudomonas fluorescens*, nel ridurre significativamente i livelli di cromo da Cr(VI) a Cr(III) molto meno tossico (Ehrlich, 1997). Analogamente, i generi *Clostridium*, *Desulfovibrio* e *Neurospora crassa* possono attuare la riduzione del mercurio Hg(II) a Hg(0), a minore effetto inquinante (Ehrlich, 1997).

I microrganismi, tuttavia, possono contribuire, anche con altri meccanismi, alla rimozione dei metalli pesanti. Infatti, i microrganismi possono agire come fonti di bioaccumulo o di biorimozione attraverso fenomeni di sequestro, adsorbimento o scambio ionico che possono avvenire in diversi compartimenti della cellula microbica. Gadd e White (1993) hanno indicato una possibile localizzazione, nei vari distretti della cellula microbica,

dei possibili meccanismi messi in atto da quest'ultima. La Figura 4 schematizza quanto proposto da Gadd e White. E' interessante sottolineare l'intervento di sostanze escrete dalla cellula microbica, quale ad esempio i siderofori, nei meccanismi di rimozione di tali inquinanti inorganici.

Distretto cellulare	Processo
Intracellulare	Legami non specifici/intrappolamento, reazioni redox/ trasformazione
Extracellulare	Precipitazione con prodotti escreti (ossalati, solfati), complessazione e chelazione, siderofori.
Membrana cellulare/regione periplasmatica	Adsorbimento/scambio ionico, reazioni redox/trasformazioni, precipitazione, diffusione e trasporto
Parete cellulare	Adsorbimento/scambio ionico e legami covalenti, reazioni redox, precipitazione, intrappolamento di particelle
Cellule associate a materiali (polisaccaridi, mucillagine, capsule)	Scambio ionico, intrappolamento di particolato, legami non specifici, precipitazione

* Adattata da Gadd e White (1993)

Figura 4. Localizzazione nei vari distretti cellulari e dei possibili meccanismi messi in atto da un microrganismo.

I fenomeni, associati all'escrezione di molecole, da parte di particolari strutture degli organismi viventi, ricoprono un ruolo estremamente importante in una particolare zona del suolo che è la rizosfera. Sebbene non sia semplice definire i limiti precisi della rizosfera, essa di solito è intesa come quella parte di suolo che è in intimo contatto con gli apparati radicali. La rizosfera, che può essere definita come un'oasi biologica, ha proprietà chimiche, fisiche e biologiche molto peculiari e che sono intrinseche alla sua esistenza.

Rispetto alle problematiche relative alla *bioremediation*, la rizosfera risulta di estremo interesse, soprattutto per quello che genericamente è definito "effetto rizosferico" e che ricopre un ruolo importante nei processi di detossificazione di inquinanti organici, mediati da organismi vegetali.

Questi ultimi possono contribuire direttamente alla rimozione di sostanze organiche da suoli inquinati, attraverso fenomeni di assunzione diretta, biotrasformazione, compartimentalizzazione. Dopo l'assunzione, il composto organico in un vegetale può subire diversi destini: essere traslocato ad altre parti della pianta e successivamente volatilizzato (questo è strettamente dipendente dalla volatilità del composto, a sua volta funzione della complessità molecolare), o essere trasformato in composti meno tossici e legato nei tessuti vegetali, in forme non disponibili. Tuttavia, il meccanismo più importante, nell'azione dei vegetali verso gli inquinanti organici, è proprio quello che avviene nel suolo rizosferico. In questo caso, la trasformazione microbica degli inquinanti può essere estremamente magnificata, in quanto gli essudati radicali, secreti dalla pianta all'esterno, contribuiscono in modo significativo a supportare la crescita e l'attività metabolica di funghi e batteri presenti nelle loro immediate vicinanze. Walton *et al.* (1994) osservarono che la densità di batteri rizosferici può essere maggiore, anche di quattro volte, di quella del bulk soil ed avere un'elevata capacità metabolica anche nei riguardi di xenobiotici recalcitranti. I microrganismi rizosferici possono anche accelerare i processi di trasformazione di alcuni inquinanti organici, favorendone ad esempio la volatilizzazione o trasformarli attraverso la secrezione di enzimi specifici, quali ad esempio enzimi ossidoriduttivi, che possono catalizzare la polimerizzazione di contaminanti su frazioni umiche e sulle superfici radicali (Adler *et al.*, 1994; Hartman, 1975). Siciliano e Germida (1998) e Walton *et al.* (1994) individuarono due effetti mutualistici che possono meglio definire "l'effetto rizosferico". Secondo Siciliano e Germida (1998), i microrganismi possono ridurre la fitotossicità dei contaminanti consentendo alle piante di crescere in condizioni avverse. In questo modo, viene stimolata anche la degradazione di altri contaminanti non fitossici. Secondo Walton *et al.* (1994), la difesa delle piante verso i contaminanti può essere supportata dalla degradazione di queste sostanze, operata dai microrganismi della rizosfera. Inoltre, essi sottolinearono che le piante e la fauna microbica si sono evolute in una simbiosi mutualistica per diminuire la fitotossicità. Nella suddetta simbiosi i microrganismi beneficiano degli essudati radicali e le piante della capacità dei microrganismi di metabolizzare i composti tossici.

In letteratura sono riportati alcuni esempi di degradazione di inquinanti organici, attribuibili principalmente all'effetto rizosferico (Frick *et al.*, 1999). Ad esempio, Grosser *et al.* (1991) hanno riportato che residui di petrolio erano efficientemente degradati dall'attività metabolica di *Bacillus* sp., che era stato isolato dalla rizosfera del riso e che era attivo solo in presenza degli essudati radicali. Analogamente, aumentati livelli di degradazione di TCE (tricloro etilene) sono stati osservati nel suolo rizosferico di soia (Frick *et al.*, 1999).

Questi ultimi possono contribuire direttamente alla rimozione di sostanze organiche da suoli inquinati, attraverso fenomeni di assunzione diretta, biotrasformazione, compartimentalizzazione. Dopo l'assunzione, il composto organico in un vegetale può subire diversi destini: essere traslocato ad altre parti della pianta e successivamente volatilizzato (questo è strettamente dipendente dalla volatilità del composto, a sua volta funzione della complessità molecolare), o essere trasformato in composti meno tossici e legato nei tessuti vegetali, in forme non disponibili. Tuttavia, il meccanismo più importante, nell'azione dei vegetali verso gli inquinanti organici, è proprio quello che avviene nel suolo rizosferico. In questo caso, la trasformazione microbica degli inquinanti può essere estremamente magnificata, in quanto gli essudati radicali, secreti dalla pianta all'esterno, contribuiscono in modo significativo a supportare la crescita e l'attività metabolica di funghi e batteri presenti nelle loro immediate vicinanze. Walton *et al.* (1994) osservarono che la densità di batteri rizosferici può essere maggiore, anche di quattro volte, di quella del bulk soil ed avere un'elevata capacità metabolica anche nei riguardi di xenobiotici recalcitranti. I microrganismi rizosferici possono anche accelerare i processi di trasformazione di alcuni inquinanti organici, favorendone ad esempio la volatilizzazione o trasformarli attraverso la secrezione di enzimi specifici, quali ad esempio enzimi ossidoriduttivi, che possono catalizzare la polimerizzazione di contaminanti su frazioni umiche e sulle superfici radicali (Adler *et al.*, 1994; Hartman, 1975). Siciliano e Germida (1998) e Walton *et al.* (1994) individuarono due effetti mutualistici che possono meglio definire "l'effetto rizosferico". Secondo Siciliano e Germida (1998), i microrganismi possono ridurre la fitotossicità dei contaminanti consentendo alle piante di crescere in condizioni avverse. In questo modo, viene stimolata anche la degradazione di altri contaminanti non fitossici. Secondo Walton *et al.* (1994), la difesa delle piante verso i contaminanti può essere supportata dalla degradazione di queste sostanze, operata dai microrganismi della rizosfera. Inoltre, essi sottolinearono che le piante e la fauna microbica si sono evolute in una simbiosi mutualistica per diminuire la fitotossicità. Nella suddetta simbiosi i microrganismi beneficiano degli essudati radicali e le piante della capacità dei microrganismi di metabolizzare i composti tossici.

In letteratura sono riportati alcuni esempi di degradazione di inquinanti organici, attribuibili principalmente all'effetto rizosferico (Frick *et al.*, 1999). Ad esempio, Grosser *et al.* (1991) hanno riportato che residui di petrolio erano efficientemente degradati dall'attività metabolica di *Bacillus* sp., che era stato isolato dalla rizosfera del riso e che era attivo solo in presenza degli essudati radicali. Analogamente, aumentati livelli di degradazione di TCE (tricloro etilene) sono stati osservati nel suolo rizosferico di soia (Frick *et al.*, 1999).

Un altro parametro estremamente importante, e che può pregiudicare in modo significativo il processo di recupero biologico, è la biodisponibilità dell'inquinante, cioè la sua accessibilità all'agente biologico.

Tale proprietà dipende sia dalle caratteristiche dell'ambiente in cui si trova la sostanza inquinante, che da quelle intrinseche dell'inquinante. Se l'inquinante è un composto organico e se l'ambiente è il suolo, i numerosi fenomeni che avvengono in quest'ultimo e che dipendono strettamente dalle sue proprietà influenzano la biodisponibilità dell'inquinante. Infatti, una sostanza organica può andare incontro a fenomeni di adsorbimento sui colloidali organici ed inorganici del suolo, a processi di lisciviazione e volatilizzazione o a fenomeni di degradazione chimica e fotochimica.

Ovviamente l'entità di tali fenomeni, che possono diminuire, fino anche ad annullare, la biodisponibilità della sostanza in questione, dipendono da specifiche *proprietà del suolo*, quali contenuto e quantità della sostanza organica, grado di aggregazione ed eterogeneità della natura del suolo, dimensione delle particelle argillose o quantità di materiale organico disciolto, ma anche da quelle *della sostanza*, quale i livelli di concentrazione e la complessità della struttura molecolare, che a sua volta influenzerà la solubilità della molecola.

Anche nel caso degli inquinanti inorganici, come i metalli pesanti, è importante tener presente che nel suolo i metalli sono presenti sotto diverse specie (speciazione) (Figura 5) e la quantità delle varie specie e gli equilibri, che si possono stabilire fra esse, sono funzioni sia del metallo sia delle proprietà e caratteristiche del suolo.

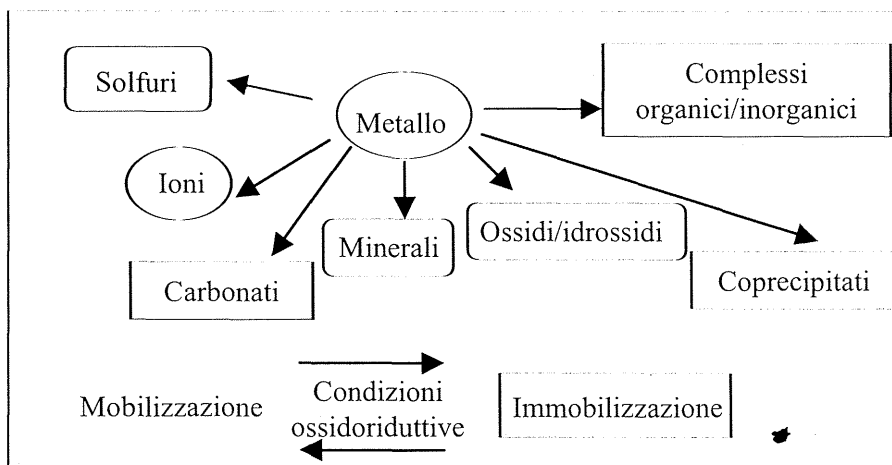


Figura 5. Metalli nel suolo.

Il secondo stadio per una completa caratterizzazione di un sito inquinato riguarda la conoscenza, nel dettaglio, delle sue caratteristiche idrogeochimiche. Parametri quali le proprietà geologiche, l'eterogeneità del sistema, la conduttività idrica e le caratteristiche dei flussi, in termini di direzione e velocità dei flussi, potranno dare indicazioni precise per determinare se le condizioni idrogeologiche sono favorevoli o non ad una eventuale attività biologica.

Per stabilire, poi, se le condizioni ambientali possono favorire la crescita e l'attività degli eventuali agenti degradativi e se eventualmente tali condizioni, se sfavorevoli, possano essere migliorate, è fondamentale conoscere con precisione la natura e l'entità dei nutrienti presenti, la disponibilità di sostanze che possano fungere da accettori di elettroni, il pH, la temperatura, il potenziale osmotico.

Il regime ossidoriduttivo, presente nel sito, assume un ruolo fondamentale perché l'attività biologica possa attuarsi in modo efficiente. La maggioranza delle trasformazioni microbiche di inquinanti organici sono di natura aerobica e, quindi, richiedono livelli di ossigeno sufficienti a sostenere i processi metabolici ad essi connessi. Ad esempio, molte delle reazioni iniziali che avvengono nelle trasformazioni microbiche dei PAH sono mediate da ossigenasi, enzimi che catalizzano l'inserzione di uno o due gruppi ossidrilici (OH^-) sull'anello aromatico, rendendolo così più suscettibile di successive trasformazioni (Tabella IV).

Tabella IV. Reazioni aerobiche di attivazione dei PAH.

Reazione iniziale	Catalizzata da
Attivata da diossigenasi per produrre cis-diidrodioli	Batteri (alghe Verdi)
Attivata da metanomonossigenasi per produrre fenoli	Batteri metanotrofici
Attivata da Citocromo P450 monossigenasi per produrre ossidi di arene	Molti funghi e pochi batteri
Attivata da enzimi che degradano la lignina a chinone	Funghi lignolitici

Tuttavia, se l'inquinante è presente a profondità, sufficientemente elevate da presentare situazioni anossiche, la trasformazione microbica è ancora possibile, posto che possano intervenire composti capaci di fungere da accettori di elettroni nei processi ossidoriduttivi.

Esiste quello che è stato definito da Bouwer e Zehnder (1993) un gradiente di accettori di elettroni e di condizioni redox che può cambiare nel tempo e nello spazio, sotto il quale molti microrganismi possono ancora

esplicare la loro attività e contribuire alla trasformazione più o meno completa degli inquinanti organici. La figura 6 schematizza i possibili accettori di elettroni che possono intervenire in successione (da sinistra a destra) in mancanza di quelli che li precedono, e le sostanze che possono essere trasformate sotto quel determinato regime. In altre parole, data la specificità che i microrganismi spesso presentano verso gli accettori di elettroni, la disponibilità di uno particolare di questi ultimi, determinerà quale microrganismo è in grado di crescere e, di conseguenza, quale sostanza sarà degradata.

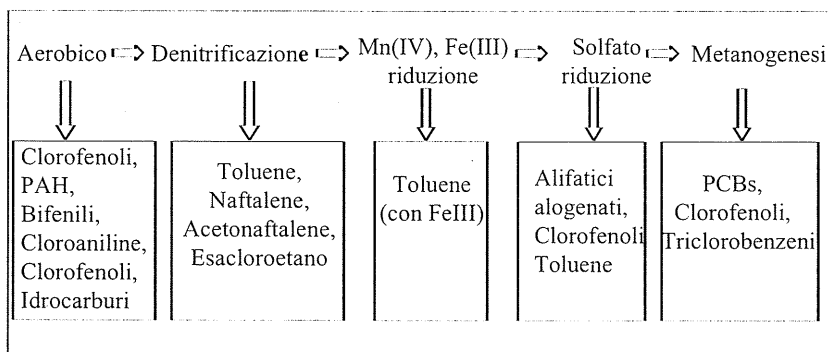


Figura 6. Schematizzazione di un possibile regime Redox.

L'ultima fase di caratterizzazione del sito è quella che riguarda le sue caratteristiche biologiche. In altri termini è necessario poter determinare se è presente un potenziale biologico degradativo, se esiste una popolazione microbica attiva, di quale tipo è la suddetta popolazione e se possiede attività e diversità metaboliche specifiche. Analoghe considerazioni si possono fare per gli organismi vegetali. E' inoltre importante poter valutare se la popolazione intrinseca possa essere stimolata in modo da magnificare la sua attività metabolica o se invece si rende indispensabile introdurre ceppi microbici dall'esterno. Tutto ciò, in effetti, si collega al terzo parametro che si deve considerare in una tecnica di *bioremediation* che è la bioattività. Come detto in precedenza, la bioattività indica se le condizioni nel sito sono ottimali per l'attività biologica, e riguarda tutti i passi che si possono fare per ottimizzare quest'ultima.

Numerose cause e fattori possono limitare la bioattività. Essi sono di natura fisica, chimica e biologica e possono riguardare sia l'agente biologico in sé sia l'ambiente in cui il processo biologico deve avvenire.

Fattori fisici, che possono limitare l'attività biologica, sono l'adsorbimento o l'intrappolamento sulle componenti del suolo, soprattutto della sostanza inquinante da trasformare, ma, probabilmente, anche delle

specie microbiche. Si possono, poi, verificare delle situazioni di limitata distribuzione nello spazio degli accettori di elettroni, associati spesso ad assenza di livelli di umidità, tale da sostenere la vita microbica. Fattori chimici, strettamente connessi a quelli biologici, sono, ad esempio, la presenza di contaminanti, valori di pH o concentrazioni di sali e/o metalli, tali da essere tossici per la vita di eventuali specie microbiche. E' anche possibile che vi sia invece una vera e propria assenza di capacità metabolica, o perché vi è assenza completa di specie microbiche, o perché la presenza di nutrienti è così bassa, o addirittura nulla, da aver determinato la morte di queste ultime.

Al fine di migliorare la bioattività si può intervenire in modo diverso a seconda dei limiti presenti da superare (Figura 7). Come schematizzato in Figura 7, sia i limiti chimici sia quelli ambientali possono essere in parte superati, intervenendo dall'esterno e cercando di sopperire alle mancanze esistenti, ad esempio, aggiungendo miscele di nutrienti e/o di agenti ossidoriduttivi. Questi tipi di interventi tendono a stimolare la flora microbica esistente *in situ* e a promuovere l'accrescimento con conseguente amplificazione dell'attività metabolica e successiva trasformazione delle sostanze inquinanti. Interventi di biostimolazione sono stati effettuati con successo in processi di *bioremediation* in siti inquinati da composti aromatici, quali pirene e benzopirene (Grosser *et al.* 1991).

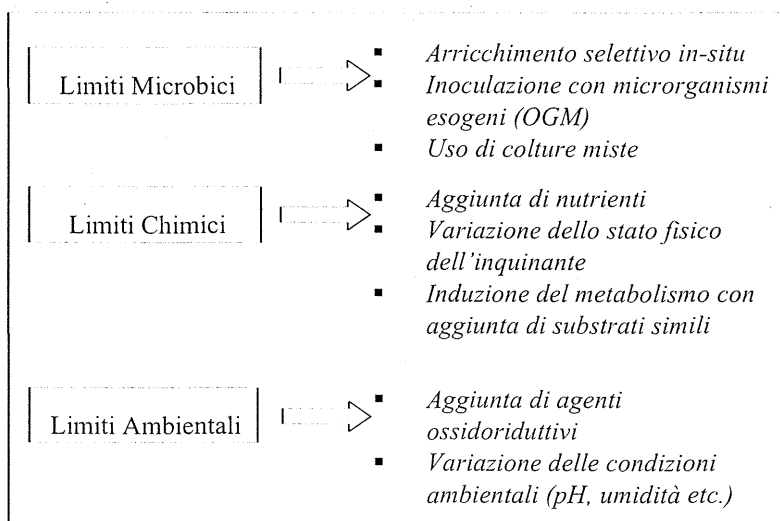


Figura 7. Strategie per il miglioramento della bioattività.

Nel caso che tali processi di biostimolazione, o non si possano effettuare, perché vi è completa assenza di specie microbiche nel sito da bonificare, o siano risultati inefficaci, è possibile comunque intervenire e cer-

specie microbiche. Si possono, poi, verificare delle situazioni di limitata distribuzione nello spazio degli accettori di elettroni, associati spesso ad assenza di livelli di umidità, tale da sostenere la vita microbica. Fattori chimici, strettamente connessi a quelli biologici, sono, ad esempio, la presenza di contaminanti, valori di pH o concentrazioni di sali e/o metalli, tali da essere tossici per la vita di eventuali specie microbiche. E' anche possibile che vi sia invece una vera e propria assenza di capacità metabolica, o perché vi è assenza completa di specie microbiche, o perché la presenza di nutrienti è così bassa, o addirittura nulla, da aver determinato la morte di queste ultime.

Al fine di migliorare la bioattività si può intervenire in modo diverso a seconda dei limiti presenti da superare (Figura 7). Come schematizzato in Figura 7, sia i limiti chimici sia quelli ambientali possono essere in parte superati, intervenendo dall'esterno e cercando di sopperire alle mancanze esistenti, ad esempio, aggiungendo miscele di nutrienti e/o di agenti ossidoriduttivi. Questi tipi di interventi tendono a stimolare la flora microbica esistente *in situ* e a promuovere l'accrescimento con conseguente amplificazione dell'attività metabolica e successiva trasformazione delle sostanze inquinanti. Interventi di biostimolazione sono stati effettuati con successo in processi di *bioremediation* in siti inquinati da composti aromatici, quali pirene e benzopirene (Grosser *et al.* 1991).

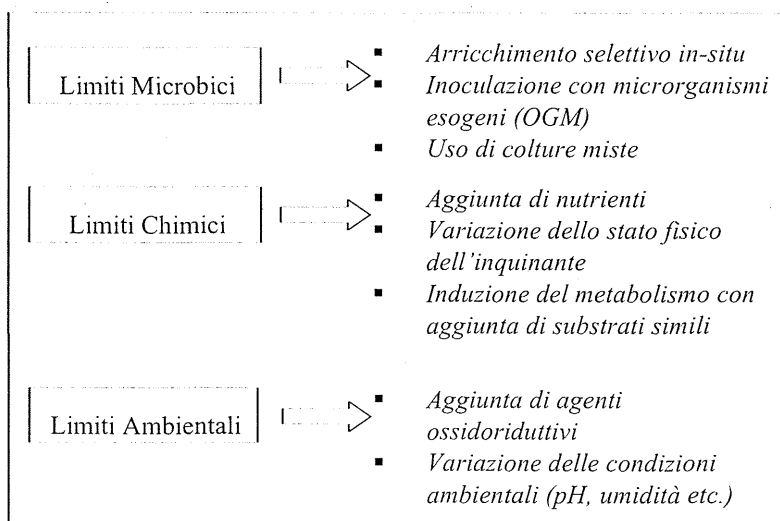


Figura 7. Strategie per il miglioramento della bioattività.

Nel caso che tali processi di biostimolazione, o non si possano effettuare, perché vi è completa assenza di specie microbiche nel sito da bonificare, o siano risultati inefficaci, è possibile comunque intervenire e cer-

care di ripristinare il sito biologicamente, aggiungendo ad esso inoculi di colture pure o miste o addirittura di organismi geneticamente modificati (OGM), di cui è nota la capacità degradativa nei confronti dell'inquinante in oggetto. Questa tecnica (*bioaugmentation*) prevede l'inoculo di microrganismi capaci di trasformare le sostanze inquinanti presenti nel sito trattato. Tali inoculi possono essere o colture prelevate da banche microbiche ed amplificate in laboratorio e di cui si conosce la capacità degradativa, oppure essere prodotte in laboratorio, a partire da colture sito specifiche e opportunamente arricchite.

L'inoculo di colture esogene in siti contaminati tuttavia non sempre è destinata ad avere successo. Infatti molti fattori possono contribuire a determinare il successo o il fallimento di tale procedura. Il tipo di organismo, le caratteristiche dell'inoculo, la sua capacità a raggiungere i punti in cui l'inquinamento è presente, la sua suscettibilità a fenomeni di predazione o di competizione da parte di altri individui presenti nel sito inquinato, sono tutti fattori legati strettamente alla natura dell'organismo microbico inoculato. Di contro, l'adsorbimento sulle componenti del suolo (nel caso sia questo il sistema inquinato) con i conseguenti riflessi sui fenomeni di diffusione, la concentrazione del contaminante, la disponibilità dei nutrienti e di accettori di elettroni, incluso l'ossigeno, la temperatura e l'umidità sono, poi, fattori ambientali, strettamente dipendenti al sito inquinato, che possono influenzare l'intervento di *bioaugmentation*.

Parte di questi fattori che, se deficienti, costituiscono dei limiti di natura chimica e ambientale per la bioattività, possono essere superati e migliorati opportunamente, intervenendo con delle azioni specifiche. Ad esempio, all'assenza di nutrienti o di accettori di elettroni si può sopperire mediante l'aggiunta diretta al sito inquinato di questi ultimi. Analogamente alcune condizioni ambientali quali pH o umidità, se sfavorevoli, possono essere migliorate intervenendo dall'esterno.

Come definito da Doelman e Breedveld (1999) è possibile rappresentare un processo efficace di biodegradazione microbica, quale il punto di convergenza di tre triangoli (perciò indicato dagli autori come triangolo d'oro), ciascuno dei quali rappresenta un aspetto critico del processo. Solo quando opportune condizioni ambientali (accettori di elettroni, temperatura, forza ionica, nutrienti, porosità, umidità, pH) coincideranno con determinate proprietà dell'inquinante (evaporazione, solubilità, disponibilità) e vi è la presenza di una flora microbica autoctona o alloctona adatta, è possibile che avvenga una efficiente ed efficace degradazione microbica.

Fattibilità di un processo di *bioremediation*

Lo stadio successivo, nel progetto di un processo di *bioremediation*, è quello in cui bisogna decidere se il processo biologico è possibile o non, e scegliere quale tipo di strategia, *in situ* o *ex situ* si vuole adottare (Figura 3). In altri termini bisogna fare uno studio di fattibilità e di valutazione del processo.

In questa fase possono essere di aiuto dei principi di carattere generale (Figura 8). Come riportato in Figura 8, tali linee guida sono essenzialmente basate sul fatto che qualunque generalizzazione fatta nel passaggio, da scala di laboratorio a scala pilota, o nel traslare delle conclusioni raggiunte nello studio di un sito inquinato ad un altro sito con proprietà e caratteristiche diverse, può essere pericoloso, nel senso che può portare a conclusioni completamente errate.

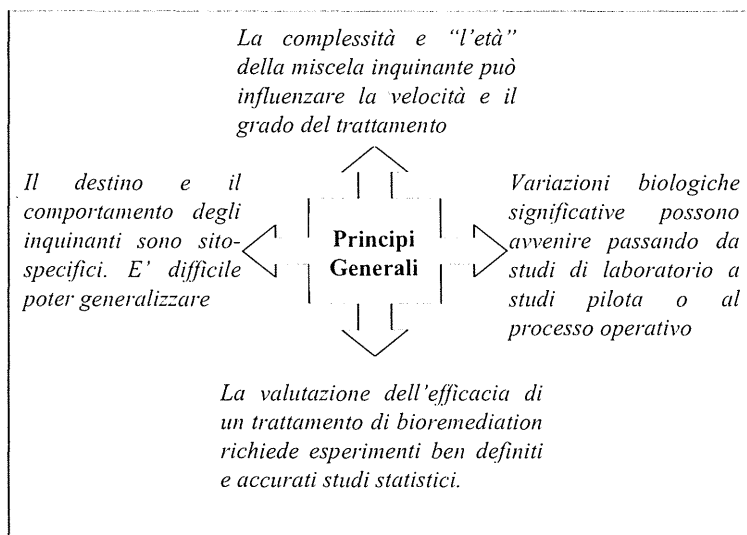


Figura 8. Applicazione di un programma di bioremediation.

La terza fase di un programma di *bioremediation* riguarda poi la trasferibilità, prima su scala pilota e poi al sito inquinato. In questa fase diventa critico il valutare l'efficacia del processo, che ovviamente richiede un programma accurato di monitoraggio e controllo.

I criteri da adottare per valutare l'efficacia di un processo di *bioremediation* sono vari e riguardano i diversi aspetti del processo stesso. Primi fra tutti, vi sono gli aspetti chimici ed ingegneristici. In altre parole bisogna poter affermare che il sito è stato effettivamente risanato ed è stato possibi-

le fare opportuni bilanci di materia. A tale scopo è molto importante il disporre di indicatori chimici, che siano in grado di monitorare la presenza o meno dell'inquinante o, comunque, di qualche fattore strettamente connesso a quest'ultimo, e quindi indicativo dell'avvenuto processo di rimozione.

E' importante, poi, poter definire che: a) il processo è stato effettivamente di natura biologica e il contributo di processi abiotici è stato nullo o trascurabile (aspetti biologici); b) l'inquinamento è stato completamente rimosso e che il trattamento non ha comportato ulteriori rischi per l'uomo e per l'ambiente (aspetti ecotossicologici). Una verifica del punto a) può essere particolarmente problematica per un trattamento *in situ*, poiché il processo biologico può richiedere un tempo lungo, settimane o anche mesi, e durante questo lasso di tempo, presumibilmente perdite di tipo abiotico possono aumentare in modo significativo. Per poter affermare che il processo avvenuto è effettivamente di natura biologica, bisognerebbe disporre di tecniche di monitoraggio, di campionamento e analitiche in grado di valutare perdite del contaminante in oggetto dovuto a fenomeni di adsorbimento o lisciviazione (Shannon e Unterman, 1993).

Altri due aspetti estremamente importanti e che spesso non vengono tenuti nella dovuta considerazione sono quelli economici e quelli estetici. Perché un programma di *bioremediation* sia effettivamente perseguibile, deve essere economicamente vantaggioso e competitivo. Esso inoltre, deve aver contribuito a migliorare significativamente il sito inquinato; cioè una valutazione visiva ed estetica di questo ultimo deve poter affermare che un miglioramento sensibile è avvenuto, a valle del processo.

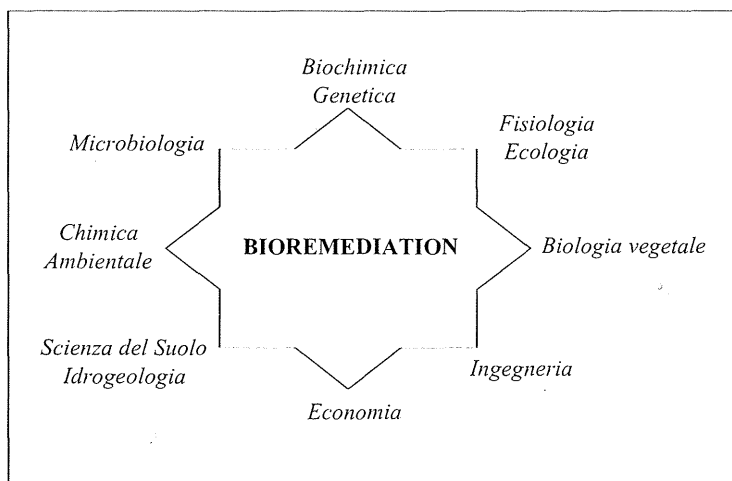


Figura 9. Interdisciplinarietà di un programma di bioremediation.

Da tutto quanto è stato riportato finora, risulta evidente la complessità di un approccio biologico a problemi di disinquinamento dell'ambiente. Ciò implica necessariamente il contributo di diverse competenze e professionalità (Figura 9). Solo se studiosi di diversi campi delle scienze di base e applicate possono cooperare in modo integrato e complementare fra loro, è immaginabile che un programma di *bioremediation* possa avere successo.

Riferimenti bibliografici

- ADLER P.R., ARORA R., EL GHAOUTH A., GLENN D.M., SOLAR J.M. 1994. Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. *J. Environ. Qual.* 23: 1113-17.
- ADRIANO D.C., BOLLAG J.-M., FRANKENBERGER W.T.JR., SIMS R.C., 1999. *Biodegradation of Contaminated Soils* Agronomy Monograph 372, Soil Science Society of America, Madison, 772 pp.
- ALEXANDER M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*, Academic Press, San Diego, pp 139.
- BLACKBURN J.W., HAFKER W.R., 1993. The impact of biochemistry bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *Trends in Biotech.* 11: 328-333.
- BOLLAG J.-M., 1992. Decontaminating soil with enzymes. *Environ. Sci. Technol.* 26: 1876-1881.
- BOLLAG J.-M., BOLLAG W.B. 1995. Soil Contamination and the Feasibility of Biological Remediation. In *Bioremediation Science and Application*. Soil Science Society of American, Madison, special publication 43 pp 1-12.
- BOUWER E.J., ZEHNDER A.J.B., 1993. Bioremediation of organic compounds – putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotech.* 11: 360-367.
- CERNIGLIA, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3: 351-368.
- DOELMAN, BREEDVELD 1999. In situ versus on site practices. In: *Biodegradation of Contaminated Soils* (Adriano D.C., Bollag J.-M., Frankenberger W.T.Jr, Sims R.C., Eds) Agronomy Monograph 372, Soil Science Society of American, Madison, pp 539-558.
- EHRlich H.L., 1997. Microbes and metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 687-692.
- FRANCIS A.J., Bioremediation of radionuclide and toxic metal contaminated soils and wastes. In *Biodegradation of Contaminated Soils* (Adriano D.C., Bollag J.-M., Frankenberger W.T.Jr, Sims R.C., Eds) Agronomy Monograph 372, Soil Science Society of American, Madison, pp 239-271.
- FRICK C.M., FARRELL R.E., GERMIDA J.J. 1999 Assesment of Phytoremediation as an In-Situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. *Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC)*.
- GADD G.M., WHITE C., 1993. Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology? *Trends in Biotech.* 11: 353-359.
- GROSSER R. J., WARSHAWSKY D, VESTAL J.R., 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1509-1515.
- HARTMAN W.J. Jr. 1975. An Evaluation of land treatment of municipal wastewater and physical siting of facility installations. Washington D.C.: US Dep. Army.
- HEITZER A., SAYLER G. S., 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in Biotech.* 11: 334-343.
- NANNIPIERI P., BOLLAG J.-M., 1991. Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters. *J. Environ. Qual.* 20: 510-517.
- SHANNON M.J.R., UNTERMAN R., 1993. Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction. *Ann. Rev. Microbiol.* 47: 715-738.
- SICILIANO S.D., GERMIDA J.J. 1998. Mechanism of Phytoremediation: biochemical and ecological interactions bet-

ween plants and bacteria. *Environmental Review*. 6: 65-79.

SMITH S., MASON J.R., 1999. Microbial bioremediation in situ of land contaminated with organic chemicals. *Progress in Environmental Science* 1, 1: 71-87.

WALTON B.T., HOYLMAN A.M., PEREZ M.M., ANDERSON T.A., JOHNSON T.R., GUTHRIE E.A., CHRISTMAS R.F. 1994. Rhizosphere microbial community as a plant defense against toxic substances in soils. In *Bioremediation Through Rhizosphere Technology* (T.A. Anderson, J.R.Coats eds.), American Chemical Society: Washington D.C. 82-92.

PEDOFAUNA: POSSIBILE AGENTE DI BIOREMEDIATION?

Carlo Jacomini, Emilia Rota

Università di Siena

Riassunto

Le comunità animali del suolo svolgono un ruolo fondamentale nella "catena del detrito", partecipando direttamente ed indirettamente al riciclo di sostanze organiche ed inorganiche, nonché al controllo delle popolazioni di funghi, batteri ed altri organismi. Le comunità della macro e mesofauna hanno una funzione di regolazione e disseminazione dei microrganismi, di apertura e rivestimento dei microcanali di aerazione e drenaggio del suolo, di sminuzzamento e digestione della materia organica in decomposizione (il che aumenta la superficie attaccabile dai microrganismi), e di formazione di complessi organici ed organo-minerali, che sequestrano alcune sostanze e ne mobilizzano altre. Queste capacità pongono la pedofauna in una possibile posizione di rilievo per quanto riguarda il ripristino di qualità strutturali e funzionali in suoli degradati. Mentre la microfauna, che vive nelle porosità del suolo imbevute d'acqua, non modifica fisicamente l'habitat e interagisce con i microrganismi principalmente tramite la predazione, gli elementi della mesofauna ed anche i grossi artropodi e i lombrichi, cibandosi e scavando gallerie nella lettiera e nel suolo, operano una trasformazione dei parametri fisici di porosità, aggregazione, densità e penetrabilità. Essi, inoltre, stabiliscono relazioni mutualistiche con i microrganismi all'interno delle pellets fecali ("rumine esterno") o del canale alimentare ("rumine interno"), relazioni che consentono un'accelerazione della mineralizzazione della materia organica e la formazione di aggregati stabili, che fungono da riserva di nutrienti per l'ecosistema.

I lombrichi sono il gruppo che ha riscosso maggiore attenzione ai fini della bioremediation. È noto che l'introduzione di lombrichi in terreni che ne sono privi o poco popolati ha effetti positivi sulla crescita della vegetazione e sulla produttività agricola. I lombrichi possono anche contribuire alla riabilitazione di suoli abbandonati, compattati, o da recuperare in ambito naturale, così come ad accelerare i processi di maturazione di suoli in stadi precoci della pedogenesi (es. quelli dei polder). Le specie da utilizzare e le tecniche di inoculazione variano a seconda del tipo di terreno e degrado, ma è dimostrato che i migliori risultati si ottengono impiegando più specie, di dimensioni e ruoli ecologici complementari.

Resta da esplorare la dinamica degli elementi tossici che possono essere sequestrati ed immobilizzati in forme non tossiche negli animali del suolo. Mancando però ricerche specifiche, al momento le intuizioni dettate dalla teoria ecologica permettono solo di ipotizzare l'uso di questi organismi come agenti di decontaminazione.

Pedofauna: introduzione

La fauna che vive nel suolo è organizzata in uno dei sistemi più complessi esistenti in natura, paragonabile solo alla complessa rete alimentare che si incontra nella colonna d'acqua superiore degli oceani (Margalef, 1974, 1991).

In base alle dimensioni, la fauna edafica viene convenzionalmente divisa in tre grandi raggruppamenti: alla microfauna appartengono gli animali più piccoli di 0,2 mm (ad es. protozoi, rotiferi, nematodi, tardigradi); nella mesofauna si riuniscono quelli compresi tra 0,2 e 2 mm (acari, collemboli, enchitreidi, proturi, dipluri, sinfili, pauropodi, pseudoscorpioni, ecc.); la macrofauna riunisce tutti gli altri (lombrichi, diplopodi, chilopodi, isopodi, coleotteri, formiche, ecc.).

La pedofauna è interconnessa tramite reti alimentari assai intricate, dovute in parte alla ricchezza di specie e abbondanza relativa (numero di individui per specie/numero totale), e in parte alla molteplicità degli adattamenti, sviluppati in centinaia di milioni di anni.

Da un punto di vista generale, tali reti sono quindi riconducibili a tre grosse categorie (Pokarzhevskii, 1996; Lavelle, 1997):

- le MICRO-RETI, dove si trovano i microrganismi (batteri, alghe, lieviti e funghi) e la microfauna, legati alla pellicola d'acqua nelle porosità del suolo, alla rizosfera e alla lettiera. Queste reti svolgono un ruolo fondamentale a livello locale, partecipando alla formazione di associazioni simbiotiche di specie ed esercitando funzioni indispensabili per l'ecosistema, sebbene in un'area d'azione assai ristretta, nell'ordine di qualche centimetro cubico. Il tempo di sviluppo di una sequenza successionale ("tempo ecologico") è nell'ordine di giorni o mesi; il "tempo di turnover biologico" (vale a dire quello necessario ai flussi di nutrienti per ricolmare le riserve di nutrienti) varia da un giorno a una settimana.

- le MESO-RETI, dove interagiscono i cosiddetti "trasformatori della lettiera" (mesofauna, forme larvali di macrofauna), che hanno funzioni di regolazione e disseminazione delle micro-reti, di apertura e rivestimento dei microcanali di aerazione del suolo, di triturazione e digestione della materia organica in decomposizione (che aumenta la superficie attaccabile dalle micro-reti) e di formazione di complessi organici ed organo-minerali, sequestrando alcune sostanze e mobilizzandone altre. L'ordine di grandezza spaziale varia da qualche centimetro a pochi metri; il tempo ecologico varia da una settimana a qualche mese, il tempo di turnover biologico da giorni a mesi.

• le MACRO-RETI, che includono i cosiddetti “ingegneri del suolo” (come termiti, formiche e lombrichi), in grado di spostarsi liberamente nel suolo. Essi hanno la capacità di poter modificare in modo notevole anche ampi tratti di terreno (si pensi all’impatto sul territorio di un termitaio), scavando cavità che permettono una circolazione agevolata dell’acqua, consumando in misura rilevante la sostanza organica in decomposizione e controllando in numero e qualità le sottostanti reti. Il tempo ecologico varia da qualche settimana a mesi, quello di turnover biologico impiega dei mesi, anche degli anni (Pokarzhevskii, 1996).

Questa classificazione pone un’enfasi speciale sulla creazione di strutture da parte degli invertebrati, e sulla natura di tali strutture. La microfauna non crea strutture: essa interagisce con i microrganismi principalmente tramite la predazione, nei sistemi delle micro-reti alimentari. La mesofauna crea strutture puramente organiche (le “*pellets*” fecali), all’interno delle quali si sviluppa con i microrganismi una relazione mutualistica (la cosiddetta “digestione del rumine esterno”, *sensu* Lavelle, 1997). In pratica, le feci fungono da terreno di coltura per i microrganismi, che così vengono anche disseminati nel terreno (Lussenhop, 1992). In più, l’azione di predazione selettiva esercitata dai microartropodi (acari, collemboli, proturi, dipluri, ecc.) sembra favorire la crescita dei microrganismi saprotrofi, rispetto a quelli patogeni, accelerando il tempo ecologico. I lombrichi, le termiti e, a un livello inferiore, le formiche, sono “ingegneri dell’ecosistema” che creano strutture organico-minerali e la cui interazione con i microrganismi avviene tramite un tipo di digestione detta “del rumine interno” (Lavelle, 1997).

Le strutture olorganiche prodotte dai trasformatori della lettiera permettono una dinamica in due fasi della materia organica: 1) accelerazione della mineralizzazione su una breve scala di tempo, seguita da 2) una significativa riduzione della respirazione microbica dovuta al compattamento della struttura (Lavelle, 1997).

Le strutture organico-minerali hanno un effetto comparabile sulla dinamica della materia organica del suolo, ma possono durare per periodi assai più lunghi.

A causa della loro diversità ed abbondanza occasionale, queste strutture possono influenzare significativamente la dinamica della materia organica e le proprietà fisiche del suolo, specialmente la porosità e l’aggregazione che determinano l’accumulo e la circolazione dell’acqua, e quindi, la potenziale erosione.

Molte specie della pedofauna si comportano da vicarianti, cioè i loro ruoli trofici possono non solo sovrapporsi, ma anche sostituirsi. In pra-

tica, se le condizioni ambientali si rivelano insoddisfacenti per una popolazione (per esempio, pH troppo elevato per la sopravvivenza o la riproduzione di una specie), che quindi diminuisce in densità e tasso d'attività, è facile che il suo ruolo ecologico venga svolto da un'altra popolazione presente nel microhabitat (e che quindi varia le proprie abitudini alimentari o il proprio tasso riproduttivo) o da popolazioni che vi giungono da aree vicine.

Mentre alcune specie risultano estremamente sensibili alle alterazioni ambientali, e vengono sfruttate nei monitoraggi come bioindicatori, altre tollerano ambienti a forte contaminazione, e sono quindi considerate pioniere ed opportuniste (v. ad es. Lebrun & Van Straalen, 1995; Siepel, 1995; Skubaña, 1996, 1997a, 1997b, 1998, 1999, 2000; Skubaña & Ciosk, 1999; Van Straalen, 1994). Su queste specie e sulle comunità da esse formate si dovrebbero concentrare future ricerche, mirate a sfruttarle per i programmi di ripristino di qualità strutturali e funzionali in suoli degradati.

Esperienze di bioremediation

I lombrichi, cibandosi e scavando gallerie nella lettiera e nel suolo, operano una forte trasformazione dei parametri fisici di porosità, aggregazione, densità e penetrabilità e pertanto costituiscono il gruppo della pedofauna che ha riscosso maggiore attenzione ai fini della bioremediation. I primi tentativi di migliorare la struttura e la fertilità dei terreni stimolando le popolazioni residenti di lombrichi o introducendo lombrichi in suoli che ne erano privi risalgono a dopo la II guerra mondiale (Hopp & Slater, 1948; Nielson, 1951; Waters, 1951; Stockdill, 1959).

Gli effetti benefici sulla produttività dei pascoli sono stati particolarmente studiati in Nuova Zelanda, dove la pastorizia ha sempre avuto grande importanza economica. Tutto cominciò con le pratiche empiriche di un agricoltore dell'Isola del Nord (Mr. A.S. Ashmore) il quale, negli anni 40, constatato come nel suo podere l'erba crescesse meglio nel frutteto, popolato da lombrichi, che non altrove e come le condizioni dei campi adiacenti andassero naturalmente migliorando man mano che i lombrichi vi si diffondevano, iniziò a prelevare zolle di terra dal frutteto e a trapiantarle nelle aree a pascolo. I miglioramenti ottenuti nel corso degli anni, sia in termini di qualità sia di produttività, furono tali da attrarre fortemente l'attenzione del mondo scientifico.

L'assenza di lombrichi in molte aree disboscate della Nuova Zelanda, come nei pascoli su citati, ha ragioni storiche ed ecologiche precise. Tutti i suoli della Nuova Zelanda ospitavano allo stato naturale ricche po-

polazioni di lombrichi autoctoni (Megascolecidae), comprendenti specie di lettiera, specie endogee e specie le cui gallerie permanenti si estendevano dagli strati profondi alla superficie del suolo. A seguito della colonizzazione europea, negli ultimi 150 anni la vegetazione nativa è stata eliminata da più della metà del territorio, per creare pascoli o coltivazioni di piante paleartiche, e la lombricofauna endemica neozelandese è andata incontro ad estinzione, essendo incapace di adattarsi alle nuove condizioni ambientali. Solo le specie endemiche endogee hanno resistito, mostrandosi indifferenti ai cambiamenti della copertura vegetale (Lee, 1985).

Le specie di Lumbricidae introdotte accidentalmente dall'Europa nel 19° secolo, col tempo, hanno soppiantato i Megascolecidae autoctoni in molte aree della Nuova Zelanda, in termini sia di dominanza numerica sia di ruoli ecologici nei nuovi habitat. In alcune zone di agricoltura intensiva, tuttavia, anche i lombrichi alloctoni si sono estinti (come del resto accade in Europa), pur permanendo in aree pastorali e suoli non sfruttati adiacenti. Finché i terreni rimangono in regime di produzione intensiva, con elevato uso di fertilizzanti e pesante lavorazione meccanica, il degrado strutturale e l'assenza di lombrichi possono non avere conseguenze sui raccolti, ma quando questi suoli vengono convertiti a pascolo o a frutteto (kiwi, mele), nello spazio di 2-4 anni soffriranno per problemi associati al deterioramento strutturale e alla bassa attività biologica (Springett *et al.*, 1992).

Infatti, nei terreni seminati a pascolo e in prati naturali, dove i lombrichi e altri gruppi della pedofauna scarseggiano, se non si interviene con mezzi meccanici per rimuovere le radici morte, le foglie e altro detrito vegetale che si accumula in superficie, questi materiali col tempo vengono a formare un feltro che ostacola la penetrazione dell'acqua, tende a diventare acido e influisce negativamente sulla qualità e sulla produttività vegetale. La struttura del suolo, inoltre, diventa sempre più compatta. L'inoculazione di lombrichi consente in questi casi l'incorporazione graduale della lettiera negli orizzonti sottostanti, una maggiore infiltrazione di acqua e il passaggio ad una struttura granulare del suolo.

È stato dimostrato che i lombrichi contribuiscono anche a far penetrare in profondità (e a rendere quindi più efficaci) i fertilizzanti, gli insetticidi e altro materiale applicato in polvere o come granuli sulla superficie del terreno. Ciò vale anche per i trattamenti a base di carbonato di calcio (*liming*) cui vengono sottoposti certi suoli per attenuarne l'acidità.

Le capacità di dispersione attiva dei lombrichi sono molto basse. Le popolazioni riescono ad espandersi naturalmente solo di 4-6 m/anno. Per ottenere un ripopolamento in tempi rapidi si deve quindi procedere con introduzioni artificiali.

L'inoculazione su vasta scala è stata usata per accelerare il processo di maturazione di terreni paludosi o sommersi bonificati (es. i *polder* olandesi), rendendoli nuovamente produttivi. Nei *polder* studiati da van Rhee (1969, 1971), i cui suoli non trattati avrebbero richiesto 50-100 anni per maturare, gli alberi da frutto cominciarono a produrre molto più rapidamente a seguito dell'introduzione di lombrichi. La produzione erbacea quadruplicava e i raccolti di trifoglio decuplicavano.

Un'accelerazione della pedogenesi mediante inoculazione di lombrichi è stata ottenuta anche in zone desertiche irrigate per renderle disponibili per l'agricoltura (es. oasi dell'Uzbekistan; Ghilarov & Mamajev, 1966).

Perché si ottengano dei buoni risultati, i terreni in cui i lombrichi sono inoculati non devono risultare all'inizio troppo ostili per questi animali. Spesso sono necessari trattamenti preliminari per rimediare parzialmente al basso contenuto organico, all'eccessivo compattamento, a condizioni di umidità sfavorevoli, a valori estremi di pH o alla presenza di sostanze tossiche.

È necessaria, inoltre, una scelta delle specie più appropriate per le condizioni vigenti del terreno e questi lombrichi dovrebbero trovarsi in condizioni di salute e stato fisiologico tali da consentire lo sviluppo e la sopravvivenza di robuste popolazioni.

La non conoscenza dell'ecologia dei lombrichi ha portato alla diffusa introduzione di *Eisenia fetida* come "miglioratore dei suoli". Questa specie vive nei mucchi di letame, negli accumuli di detriti agricoli e in altre raccolte di substrato organico. Il suo habitat naturale è probabilmente sotto la corteccia e nello sfasciume di alberi morti. È facilmente allevabile e può formare popolazioni molto numerose, ma non sarà mai in grado di insediarsi in modo permanente in suoli agricoli o pastorali (Lee, 1985).

Nei climi temperati, le specie di Lumbricidae che hanno maggiore capacità di colonizzazione in questi suoli sono *Aporrectodea caliginosa*, *A. rosea*, *A. longa*, *Allolobophora chlorotica* e *Lumbricus rubellus*. Soprattutto *A. rosea* e *L. rubellus* si diffondono rapidamente, il secondo facilitato anche dall'elevato tasso riproduttivo. *Lumbricus rubellus* è un importante consumatore di lettiera e di escrementi, ma la sua azione rimane confinata agli orizzonti superficiali. *Aporrectodea rosea*, invece, vive nel suolo minerale, come *A. caliginosa*, che mostra anche una forte tolleranza per la scarsità di acqua. Specie che scavano gallerie verticali profonde, come *Lumbricus terrestris* e *Aporrectodea longa*, sono spesso colonizzatori meno efficaci, poiché hanno una riproduzione lenta e sono più sensibili alle condizioni di degrado che spesso persistono in profondità. Queste specie an-

drebbero introdotte in stadi di recupero più avanzati; nel caso di ripristino di suoli argillosi compattati, l'inoculazione tramite trapianto di unità di suolo può facilitare la sopravvivenza a lungo termine di queste specie.

Laddove possibile, andrebbero introdotte simultaneamente più specie con ruoli ecologici complementari, poiché ciò porta a comportamenti reciprocamente benefici, che favoriscono la riproduzione e l'insediamento delle popolazioni (es. *Aporrectodea longa* e *A. rosea*; Butt *et al.* 1997).

In modo analogo, Blanchart *et al.* (1997, 1999) hanno dimostrato che la presenza di lombrichi endogei, di diversa taglia e abitudini alimentari, è essenziale per il mantenimento della struttura dei suoli nella savana umida tropicale. Specie di grossa taglia (come *Millsonia anomala*, un megascolecide) ingeriscono suolo senza selezionarlo e lo restituiscono sotto forma di grosse deiezioni globulari contenenti macroaggregati di diametro > 5 mm, che tendono a compattare il suolo (il che può provocare una diminuita infiltrazione d'acqua nel suolo). Al contrario, specie più piccole (come gli Eudrilidae) ingeriscono solo particelle ricche di sostanza organica e producono piccole deiezioni granulari contenenti microaggregati di diametro di 0.5-2 mm, max 5 mm, che tendono a diminuire la densità del suolo, anche perché queste specie scavano nei macroaggregati delle prime.

Quindi, l'inoculazione di una combinazione di specie che rifletta una certa diversità funzionale, è necessaria per un uso sostenibile dei suoli.

L'inoculazione può avvenire tramite lo spargimento superficiale di animali estratti da terreni dove sono abbondanti, o col trapianto di zolle intatte raccolte in località naturali, o con l'impianto di unità di inoculazione in cui sono state allevate le specie desiderate.

Il prelievo/trapianto di zolle dà luogo a densità generalmente basse, permette uno scarso controllo sulle specie e sulla loro abbondanza; consente per lo più il trasferimento di orizzonti superficiali, e richiede un duro lavoro. I vantaggi sono dati dal microambiente protettivo che accompagna gli animali e dal trasferimento dei bozzoli.

L'estrazione/rilascio superficiale di lombrichi costituisce una procedura molto faticosa e costosa che non sempre dà luogo a popolamenti stabili. Gli animali possono rimanere feriti durante l'estrazione, al rilascio sono privi di un microambiente protettivo, e non c'è trasferimento di bozzoli. I vantaggi sono dati dalla possibilità di selezionare le specie e utilizzarle ad alte densità.

Secondo Butt *et al.* (1997), l'uso di unità di inoculazione, laddove possibile, consente l'introduzione nel suolo, all'interno di un mi-

croambiente protettivo, di adulti, giovani e bozzoli della specie o della combinazione di specie desiderate, fornendo le condizioni ottimali per la colonizzazione.

Un settore di ricerca di recente sviluppo indaga sulla possibilità di utilizzare i lombrichi come agenti di dispersione nel suolo (nella rizosfera) di microrganismi benefici per le piante, quali i batteri *Pseudomonas* (utili per il controllo biologico di patologie vegetali, ad es. la micosi che colpisce le radici del frumento), i funghi micorrizici, i batteri simbiotici delle leguminose, ed altri che sono in grado di sopravvivere al passaggio nel canale alimentare dei lombrichi. I microrganismi vengono inoculati in appositi mangimi, appetibili per i lombrichi ma che al tempo stesso consentono la crescita e il sostentamento dei microrganismi fino a che questi raggiungono il loro bersaglio. Questi mangimi devono contenere una componente organica (lettieria di foglie, letame, farina di cereali mista a paglia, ecc.) che fa da substrato per i microrganismi, ma anche una parte di suolo minerale che li renda appetitosi per i lombrichi (Doube *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1997).

Il suolo ha funzioni diverse e importanti sia dal punto di vista ecologico, sia socioeconomico. Blum (1988, 1990) ne identifica almeno sei, spesso in conflitto tra loro: fonte di materiali grezzi, luogo di produzione di biomassa, riserva genetica e protezione delle specie, funzione di filtro/tampone, supporto per gli insediamenti umani, conservazione delle eredità culturali.

La funzione di filtro/tampone si svolge attraverso la filtrazione meccanica, l'adsorbimento fisico-chimico e la precipitazione sulle sue superfici interne, la mineralizzazione microbiologica e biochimica, e la metabolizzazione dei composti organici e inorganici. In conseguenza delle attività antropiche, questa funzione sta diventando sempre più importante, a causa delle sempre più numerose ed eterogenee deposizioni solide, liquide e gassose, sia organiche sia inorganiche, con cui il suolo interagisce. Così, il suolo fornisce all'ecosistema un servizio che risulta sempre più aggravato e quindi messo in pericolo dalle attività umane (Blum, 1990).

Gli animali del suolo, come le piante e i microrganismi, hanno un ruolo importante come indicatori sensibili e bioaccumulatori di sostanze tossiche. Alcuni di essi, come i lombrichi, possono anche assistere nei programmi di recupero di siti contaminati grazie agli effetti benefici sulla struttura dell'ecosistema (Vimmerstedt & Finney, 1973). Resta da esplorare quali sostanze tossiche possano essere sequestrate e immobilizzate in forme non tossiche negli animali del suolo. Mancando ricerche specifiche, al momento le intuizioni dettate dalla teoria ecologica permettono solo di ipotizzare l'uso di questi organismi come veri e propri agenti di decontaminazione.

Bibliografia

- BLANCHART E., LAVELLE P., BRAUDEAU E., LE BISONNAIS Y., VALENTIN C., 1997. Regulation of soil structure by geophagous earthworm activities in humid savannas of Côte d'Ivoire. *Soil Biol. Biochem.* 29: 431-439.
- BLANCHART E., ALBRECHT A., ALEGRE J., DUBOISSET A., VILLENAVE C., PASHANASI B., LAVELLE P., BRUSSAARD L., 1999. Effects of earthworms on soil structure and physical properties. In: Lavelle P., Brussaard L., Hendrix P. (Eds.) *Earthworm management in tropical agroecosystems*, CAB International, Oxon, UK, pp. 149-172.
- BLUM, W.E.H., 1988. *Problems of soil conservation*. Nature and Environment, Series 39. Council of Europe, Strasbourg, 62 pp.
- BLUM, W.E.H., 1990. The challenge of soil protection in Europe. *Environmental Conservation*, 17: 72-74.
- BUTT K.R., FREDERICKSON J., MORRIS R.M., 1997. The earthworm inoculation unit technique: an integrated system for cultivation and soil-inoculation of earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 29: 251-257.
- DOUBE B.M., SCHMIDT O., KILLHAM K., CORRELL R., 1997. Influence of mineral soil on the palatability of organic matter for lumbricid earthworms: a simple food preference study. *Soil Biol. Biochem.* 29: 569-575.
- GHILAROV M.S., MAMAJEV B.M., 1966. Über die Ansiedlung von Regenwürmern in den artesisch bewässerten Oasen der Wüste Kysyl-Kum. *Pedobiologia* 6: 197-218.
- HOPP H., SLATER C.S., 1948. Influence of earthworms on soil productivity. *Soil Sci.* 66: 421-428.
- LAVELLE, P., 1997. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research* 27: 93-132.
- LEBRUN P. & STRAALEN N.M. van, 1995. Oribatid mites: prospects for their use in ecotoxicology. *Experimental and Applied Acarology*, 19 (7): 361-380.
- LEE K.E., 1985. *Earthworms. Their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, Sydney, 411 pp.
- LUSSENHOP J., 1992. Mechanisms of Microarthropod-Microbial Interactions in Soil. *Advances in Ecological Research* 23: 1-31.
- MARGALEF R., 1974. *Ecologia*. Omega, Barcellona, 951 pp.
- MARGALEF R., 1991. Individuation of structure in ecology. In: (G. Lanzavecchia & R. Valvassori, Eds.) *Form and function in zoology*. Collana U.Z.I., Selected Symposia and Monographs. 5: 325-334.
- NIELSON R.L., 1951. Earthworms and soil fertility. Proc. 13th Conf. NZ. Grassl. Assoc. New Plymouth, pp. 158-167.
- POKARZHEVSKII A.D., 1996. The problem of scale in bioindication of soil contamination. In: N.M. van Straalen & D.A. Krivolutsky (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL. Pp. 111-121.
- RHEE J.A. van, 1969. Inoculation of earthworms in a newly-drained polder. *Pedobiologia* 9: 128-132.
- RHEE J.A. van, 1971. Some aspects of the productivity of orchards in relation to earthworm activities. *Ann. Zool. Ecol. (Spec. Publ.)* 4: 99-108.
- SCHMIDT O., DOUBE B.M., RYDER M.H., KILLHAM K., 1997. Population dynamics of *Pseudomonas corrugata* 2140R lux8 in earthworm food and in earthworm casts. *Soil Biol. Biochem.* 29: 523-528.
- SIEPEL H., 1995. Are some mites more ecologically exposed to pollution with lead than others? *Experimental and Applied Acarology*, 19 (7): 391-398.
- SKUBAÛA P., 1997a. Oribatid mite communities (Acari, Oribatida) on postindustrial dumps of different kinds. I. Abundance and species richness. *Abh. Ber. Naturkundemus. Görlitz* 69 (6): 63-68.
- SKUBAÛA P., 1997b. The structure of oribatid mite communities (Acari, Oribatida) on mine dumps and reclaimed lands. *Zool. Beitr. N.F.* 38 (1): 59-80.
- SKUBAÛA P., 1998. Oribatid mite communities (Acari: Oribatida) on postindustrial dumps of different kinds. II.

- Community organization. *Fragmenta faunistica, Warsaw*, 41 (14): 193-207.
- SKUBAŪA P., 1999. Colonization of a dolomitic dump by oribatid mites (Acari, Oribatida). *Pedobiologia* 43: 145-159.
- SKUBAŪA P., 2000. Development of oribatid mite communities (Acari, Oribatida) on a mine dump. *Proceedings of the 4th Symposium of the EURAAC*, Siena, July 24-28, 2000: 13 pp.
- SKUBAŪA P. & CIOŚK M., 1999. Oribatid mites (Acari, Oribatida) colonizing the zinc metallurgic dump. *Fragmenta faunistica, Warsaw*, 42 (6): 41-55.
- SPRINGETT J.A., GRAY R.A.J., REID J.B., 1992. Effect of introducing earthworms into horticultural land previously denuded of earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1615-1622.
- STOCKDILL S.M.J., 1959. Earthworms improve pasture growth. *New Zealand J. Agric.* 98: 227-233.
- STRAALEN N.M. van, 1994. Biodiversity of ecotoxicological responses in animals. *Netherlands J. of Zoology*, 44: 112-129.
- TYLER G., BALSBERG PÅHLSSON M., BENGTTSSON G., BÅÅTH G. & TRANVIK L., 1989. Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. *Water, Air and Soil Pollution* 47: 189-215.
- VIMMERSTEDT J.P., FINNEY J.H., 1973. Impact of earthworm introduction on litter burial and nutrient distribution in Ohio strip-mine spoil banks. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 37: 388-391.
- WATERS R.A.S., 1951. Earthworms and the fertility of pasture. *Proc. 13th Conf. NZ. Grassl. Assoc.* New Plymouth, pp. 141-146.

IL FITORIMEDIO: ORGANISMI VEGETALI COME POTENZIALI AGENTI DISINQUINANTI

Angelo Massacci, Maria Adelaide Iannelli, Fabrizio Pietrini

Istituto di Biochimica ed Ecofisiologia Vegetali del CNR.

Via Salaria Km 29. 00016 Monterotondo Scalo (Roma)

Negli ultimi venti anni numerosi studi hanno permesso di stabilire che le piante sono in grado di svolgere funzioni utili per rimuovere sostanze inquinanti da suolo, terreni umidi, acque ed aria. Sicuramente, però, affinché questa idea venga sviluppata in una tecnologia e diventi realistica la stima che negli USA, l'uso di piante in progetti di decontaminazione potrà avere nei prossimi cinque anni un mercato tra i 100 e 200 milioni di dollari (1), occorre fare ancora importantissimi passi avanti nelle conoscenze scientifiche su tali funzioni. Sono infatti scarse le informazioni sui meccanismi fisiologici e biochimici dell'assorbimento degli inquinanti (2), del loro trasporto e della loro degradazione nelle maggior parte delle specie utilizzate. Inoltre, il numero di queste specie, una decina quelle importanti (tabella 1), è sicuramente inadeguato per formulare combinazioni efficaci tra piante, i vari ambiente climatici. e le varie tipologie di inquinamento. Esiste, quindi, la necessità di esplorare le vaste risorse della biodiversità vegetale per aumentare il numero di specie disponibili. Non occorre poi trascurare il problema di fondo del fitorimedio: i lunghi tempi di decontaminazione (3). Non c'è dubbio che stando alle conoscenze attuali sulle cinetiche di rimozione di alcuni contaminanti questo problema può essere affrontato con più probabilità successo se non si trascura il ricorso alle biotecnologie di trasformazione genetica per amplificare la capacità e l'efficienza dei meccanismi di estrazione e detossificazione in piante ad elevatissimo accumulo di biomassa.

Dopo tali premesse riteniamo utile analizzare le conoscenze finora acquisite sulle basi biochimiche e fisiologiche della funzione depurante delle piante cercando di enfatizzare i meccanismi che potrebbero essere più importanti per riconoscere nelle piante sia questa funzione sia la tolleranza verso la tossicità degli inquinanti più diffusi. Consideriamo quindi le conoscenze su quei meccanismi che permettono ad una pianta di assorbire un inquinante, assumendo che sia totalmente biodisponibile (4), trasportarlo nel suo interno e confinarlo in un compartimento per disattivare la sua tossicità sia mediante la sua completa o parziale degradazione metabolica (5), se possibile, oppure mediante il suo sequestro (per esempio attraverso complessazione ed insolubilizzazione nel caso di alcuni metalli pesanti) (6).

Assorbimento di nutrienti ed inquinanti a livello radicale

Gli inquinanti entrano nelle piante attraverso un processo di assorbimento sulla superficie radicale (7). In una prima fase le molecole che sono vicine a zone di questa superficie, in cui si trovano derivati di fosfati, pectine, altri polisaccaridi e proteine, sono sottoposte a varie forze attrattive che le avvicinano e le concentrano trattenendole con debolissimi legami chimici (8).

Questa concentrazione successivamente facilita sia la loro diffusione attraverso le membrane (via intracellulare o simplastica) e sia quella su di esse (via extracellulare o apoplastica). In genere, la diffusione attraverso le membrane è attiva, utilizza energia ed avviene in canali proteici e mediante trasportatori specifici (9). Alcuni di questi canali e trasportatori non sono però così selettivi da impedire che alcuni inquinanti diffondano più dei nutrienti (ad esempio alcuni metalli pesanti con metalli essenziali) grazie ad una certa affinità chimica, a dimensioni simili dello ione idratato ed alla loro più elevata concentrazione (10). Ad eccezione di questi casi di competizione ed in pochi altri casi in cui sembra che alcune piante, definite iperaccumulatrici, abbiano sviluppato la capacità di assorbire attivamente alcuni metalli pesanti, la diffusione degli inquinanti sia sulle membrane sia attraverso le membrane avviene in modo passivo e con una velocità proporzionale alla loro concentrazione sulla superficie esterna delle radici (11). Il meccanismo di tale diffusione non è completamente chiaro. E' ipotizzato che gli inquinanti utilizzano particolari canali adattabili alle loro caratteristiche fisiche o chimiche, oppure che si muovono insieme alle molecole alle quali sono legati sulla superficie esterna delle radici oppure nel caso siano adsorbiti su radici giovani vengono inglobati nelle modificazioni conformazionali e strutturali durante la loro maturazione.

La recente introduzione di tecniche molecolari mirate ad effettuare ibridazione e PCR in situ, all'alterazione dell'espressione su singole cellule marcate con proteine fluorescenti utilizzando fattori di trascrizione esogeni, sta aumentando notevolmente le conoscenze sui processi di trasporto dei nutrienti in cellule dei capillari, della corteccia e del cilindro vascolare o stele radicali e sulla loro ripartizione tra il citosol ed i vacuoli (12). Sicuramente questo rappresenta un passo importante verso il controllo dell'assorbimento di nutrienti. Per estensione, visto che questi approcci sono utilizzabili anche per lo studio del trasporto di inquinanti, potrebbe essere controllata la capacità del loro assorbimento attivo, analizzata la biodiversità vegetale per questa capacità, e la manipolazione ge-

netica mediante alterazione dell'espressione dei trasportatori nei singoli tipi di cellule in specie con elevatissimo accumulo di biomassa.

Compartimentazione di nutrienti ed inquinanti

Una volta che i nutrienti o gli inquinanti si trovano all'interno della radice debbono arrivare allo xilema per essere poi eventualmente traslocati nella parte aerea della pianta. Purtroppo, le conoscenze su questa importante fase del trasporto radicale sono scarse e lacunose. Si sa che le barriere nell'endoderma sono molto selettive (13) e che per questo motivo i nutrienti in eccesso e gli inquinanti, per i quali non sono stati sviluppati dalla pianta trasportatori specifici oppure che non passano attraverso i canali proteici generici, vengono traslocati all'interno dei vacuoli.

L'accumulo di queste sostanze nei vacuoli avviene attraverso il tonoplasto, segue una cinetica lineare con la loro concentrazione esterna ed è noto che utilizza l'energia di una specifica e molto efficiente pompa ATP-ase-protonica (14). I nutrienti possono essere attivamente trasportati attraverso il tonoplasto come ioni liberi o come complessi chelati-metalli. Anche alcuni inquinanti possono essere attivamente trasportati attraverso il tonoplasto. Ad esempio il Cd può entrare come ione libero attraverso il sistema di antiporto Cd/H^+ oppure come $\text{Cd}-(\gamma \text{ EC})_3$ $\text{G}/\text{Cd}-(\gamma \text{ EC})_2$ G che è un complesso metallo-peptide, che viene fornito di energia dall'idrolisi dell'ATP (14). All'interno del vacuolo gli ioni dei nutrienti e dei metalli pesanti sono normalmente chelati o da acidi organici come l'acido citrico o malico, oppure da (γ -isopeptidi sintetizzati enzimaticamente e noti come fitochelatine (15). La presenza nei vacuoli di alcune idrolasi, carbossipeptidasi ed altri enzimi degradativi sembra indicare che i vacuoli oltre che a compartimentalizzare gli inquinanti possano svolgere anche un'importantissima attività detossificante (5). In questi processi vacuolari il metabolismo dello zolfo, sembra, particolarmente rilevante (16). Oltre al ruolo complessante-detossificante delle fitochelatine si sa che la glutatione-s-trasferasi sono enzimi importantissimi per il trasporto nei vacuoli di diversi tipi di sostanze xenobiotiche e metalli pesanti come il Cd. Le GST sono, comunque, proteine sulle quali esiste un'abbondante letteratura e si ritiene quindi più utile rimandare ad articoli che analizzano le informazioni disponibili in modo più specialistico (17).

Tabella 1. Esempi di studi sull'utilizzo di piante per decontaminare acque e suoli da metalli ed altre sostanze xenobiotiche

PIANTA	INQUINANTE	NOTE
<i>Thlaspi caerulescens</i> ^a	Cd	1.8 g Cd/kg peso secco
<i>Thlaspi caerulescens</i> ^a	Zn	51.6 g Zn/kg peso secco
<i>T. rotundifolium</i> ^a	Pb	8.2 g Pb/kg peso secco
<i>Sebertia acuminata</i> ^a	Ni	25% peso secco sap
<i>Arabidopsis thaliana</i> ^a	Zn	130 µg Zn/g peso secco
<i>Brassica juncea</i> ^a	Pb	3.5% peso secco
<i>Thlaspi spp</i> ^a	Ni	0.1 - 3% peso secco
<i>Thlaspi spp</i> ^a	Co e Mn	2% peso secco
<i>Sebertia acuminata</i> ^b	Ni	26% peso secco latak
<i>Nyssa sylvatica</i> ^c	Co	0.01%
<i>Helianthus annuum</i> ^d	¹³⁷ Cs, ⁹⁰ Sr, U	
<i>Arundo donax</i> ^d	nitriti, fosfati	
<i>Phragmites australis</i> ^d	nitriti, fosfati	
<i>Lemna gibba</i> ^d	Pb, Cr, Cd, Ni, Cu	
<i>Populus spp</i> ^d	erbicidi triazinici	
<i>Salix nigra</i> ^d	cloroacetamidi	
<i>Myriophyllum spicatum</i> ^d	YTNT	
Alfalfa ^d	Naftalene	
<i>Eucalyptus viminalis</i> ^d	NO ₂	6.6 mg N-NO ₂ g ⁻¹ peso secco
<i>Tillandsia ionantha</i> ^d		0.01 mg N-NO g ⁻¹ peso secco

a. D. Cunningham and D.W.Ow, 1996. Promises of phytoremediation. *Plant Physiol* 110:715-719

b. Phytoremediation of contaminated soil and water. N. Terry, G Banuelos eds. Lewis Publishers.2000.

c. Salt, D.E., Smith, R.D. and Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-68.

d. Phytoremediation Bibliography Database. <http://www.rtdf.org/public/phyto/phytodoc.htm>.

Trasporto di nutrienti ed inquinanti sulla parte aerea della pianta

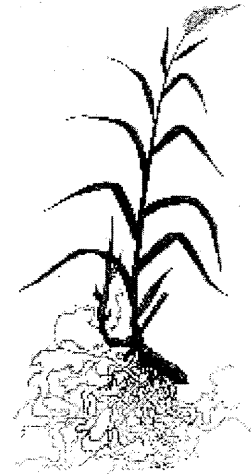
La complessità e soprattutto le lacune delle conoscenze di cui abbiamo accennato sopra costituiscono dunque una concreta limitazione scientifica allo sviluppo del fitorimedio. A queste lacune si aggiungono quelle ancora più vaste sul trasporto xilematico degli inquinanti. E' noto che alcune piante, in particolare quelle cresciute in zone molto inquinante da metalli pesanti ed alcuni inquinanti, accumulano queste sostanze nelle foglie anche in quantità superiori alle loro concentrazioni nell'ambiente. Lo studio dei meccanismi alla base di quest'abilità è quindi un ulteriore strada obbligata per il futuro di questa tecnologia.

Il fitorimedia di metalli pesanti e la *phragmites australis* come agente di fitorimedia

Dopo avere fornito alcuni elementi che a nostro parere possono contribuire a rendere l'idea di utilizzare le piante un'idea attuale e di successo, forse è opportuno enfatizzare quelle che sono le osservazioni importanti dalle quali si è sviluppata la convinzione che le piante sono utili a svolgere funzioni decontaminanti. Il fitorimedia, come idea, nasce dall'osservazione che esistono piante iperaccumulatrici, in grado quindi di estrarre i metalli ed accumularli senza subire la loro tossicità. Ancora più in là nel tempo esistono documenti come una bolla papale della fine del 1500 che individua con estrema chiarezza che una specie vegetale, molto rigogliosa sulle rive del Trasimeno svolgeva un ruolo protettivo molto importante per la salute di quelle acque. Per questo motivo la seconda parte di questo esame delle potenzialità del fitorimedia verranno concentrati su Cd e *Phragmites*.

Il Cd è un metallo pesante (densità 8.5 g cm^{-3}) che negli ultimi decenni sembra accumularsi maggiormente nell'ambiente ($10^{-3} - 5 \text{ mg/m}^3$ nell'aria, 0,001-11 mg/kg nel suolo, 0,05-0,2 $\mu\text{g/L}$ nelle acque) ed in modo preoccupante nella catena alimentare. Questo accumulo è attribuito principalmente ad un aumento della distribuzione in agricoltura di fertilizzanti contenenti fosfati (18). Il pericolo di questo accumulo è che il Cd è assorbito facilmente dalle piante e la sua tossicità è veramente ad ampio effetto sulle più importanti funzioni biologiche (19). L'assorbimento di Cd avviene nella sua forma cationica e sembra essere in competizione per gli stessi trasportatori transmembrana, con metalli essenziali come potassio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), ferro (Fe), manganese (Mn), rame (Cu), zinco (Zn) e nickel (Ni) (20). Generalmente la quantità più elevata di Cd si trova nelle radici ma è stato notato che la sua ripartizione negli altri organi e la tolleranza della sua tossicità è fortemente specie-specifica (20). A tal riguardo, un enorme quantità di studi evidenziano ancora che il metabolismo del glutathione è alla base del più importante meccanismo di difesa dal Cd (21). Le fitochelatine sono polimeri con n ripetizioni (variabili da 2 a 11) dell'unità $\gamma\text{-Glu-Cys}$, formano un complesso con il Cd attraverso i numerosi gruppi tiolici delle cisteine e di conseguenza impediscono che il suo ione si trovi libero nel citosol ed interferisca con altre reazioni metaboliche. Oltre alle fitochelatine il Cd ed altri metalli pesanti possono essere complessati e detossificati dalle metallotioneine, un gruppo di peptidi anch'essi ricchi in cisteina (22). Nelle piante superiori però le informazioni su questi peptidi sono contraddittorie. Queste osservazioni evidenziano che le piante debbono essere selezionate più che per la loro abilità ad accumulare Cd, diffusa in molte piante, per la loro capacità di tollerarlo.

La *Phragmites* è una specie molto diffusa in molte zone umide, appartiene all'ordine delle Poales, si fissa ai sedimenti sommersi mediante rizomi e radici avventizie (Fig. 1). E' importante per il fitorimediao per due importanti caratteristiche: possiede una considerevole tolleranza verso stress di tipo fisico e chimico ed è in grado di accumulare una considerevole quantità di biomassa (tabella 2). I nitrati ed i fosfati, inquinanti comuni delle zone umide in cui vive, sono rimossi con buona efficacia dalla *Phragmites*.



Phragmites australis

Tabella 2. Accumulo di biomassa ed azoto di *Phragmites australis* presso il lago Trasimeno (Umbria).

Pianta (parte aerea)	63.3 ± 10.2	(g ps pianta ⁻¹)	14.0% pf
Foglie	13.6 ± 2.2	(g ps pianta ⁻¹)	
Altezza	272.4 ± 44	(cm)	
Area fogliare	937.0 ± 105	(cm ² pianta ⁻¹)	
Numero di foglie	18.7 ± 4		
Densità	440.8 ± 200	(piante m ⁻²)	
Contenuto fogliare di azoto	3.9 ± 1.3	(g pianta ⁻¹)	

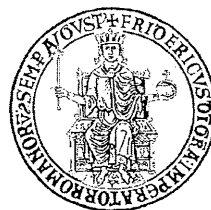
In realtà, una parte considerevole del nitrato viene rimossa dalla denitrificazione batterica che ha luogo nell'estesissimo rizoma di questa pianta. Al contrario, il fosfato rimosso viene immagazzinato nella biomassa delle piante (vive o morte) e quindi la sua rimozione è effettuata solamente dalla pianta in una quantità assai inferiore a quella del nitrato. E' stato osservato che diversi metalli, incluso il Cd, possono essere immobilizzati nella rizosfera della *Phragmites* e quindi successivamente in parte estratti (23). Pesticidi e molecole xenobiotiche di diversa origine possono essere abbondanti nelle acque reflue da suoli agricoli. Diverse sperimentazioni hanno mostrato che la *Phragmites* contribuisce a rimuovere e degradare tali sostanze e che probabilmente un ruolo primario in quest'attività è svolto dalla popolazione microbica (24). Un aspetto molto trascurato per quanto riguarda le conoscenze sulla *Phragmites* è la loro caratterizzazione genetica. Queste monocotiledoni tendono ad essere perenni come habitus, diffondendosi più con propagazione vegetativa a partire dai rizomi che non mediante i semi. Si verifica così che settori considerevoli delle zone umide siano popolati da cloni di piante tutte uguali o da miscele di pochi cloni diversi. Spesso si riscontra inoltre una va-

riabilità nel livello di ploidia di tali specie, associata talvolta a differenze morfologiche macroscopiche. La scarsa vitalità dei semi e la preferenziale disseminazione vegetativa rende inoltre difficile l'analisi genetica formale. Un vantaggio non trascurabile consiste tuttavia nell'appartenenza di queste piante all'ordine delle Poales, quindi a una posizione tassonomica piuttosto vicina a quella di cereali di grande interesse agronomico quali mais, sorgo e le Triticee in genere. Come ormai ampiamente dimostrato, all'interno di questi taxa esiste un notevole grado di somiglianza genetica che si manifesta sia nella conservazione evolutiva di sequenze geniche sia nella colinearità tra genomi. L'esistenza di queste accentuate somiglianze genetiche è naturalmente di grande importanza per trasferire a specie poco note le conoscenze acquisite in specie più facili da manipolare. Ad esempio, a partire dai geni già isolati in altre specie sarebbe possibile isolare e clonare le sequenze di geni codificanti per enzimi o proteine importanti nei processi di decontaminazione, quali metallotioneine, citocromo ossidasi, enzimi per la sintesi di fitochelatine, glutathione-S-transferasi, trasportatori di membrana.

Bibliografia

1. GLASS DJ. (1998). Phytoremediation Market Report, D. Glass Associates, Inc. 124 Bird Street, Needham, MA 02492
2. SALT, D.E., SMITH, R.D. and RASKIN, I. (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-68.
3. SCHNOOR, JR (1997). Technology evaluation report: Phytoremediation. GWRTA, University of Iowa, Dept of Civil and Env Eng Center for Global and Regional Env Research
4. RASKIN I., SMITH RD, SALT D. (1998) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr Op in Biotech* 8:221-226
5. WOLF AE, DIETS K-J, SCHROEDER P. (1996). Degradation of glutathione-s-coniugates by a carboxypeptidas in the plant vacuole. *FEBS Letters* 384:31-34.
6. MEAGHER RB. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Op in Plant Biol* 3:153-162.
7. NEDELKOSKA T.V., DORAN P.M. (2000). Hyperaccumulation of Cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biot and Bioeng* 67:607-616.
8. SCHREIBER L., HARTMAN K., SKRABS M, ZEIER J. (1999). Review article. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J Exp Bot* 50:1267-1280.
9. CLARKSON, DT., LUTTGE, U. (1989) Mineral nutrition: divalent cations, transport and compartmentation. *Prog Bot* 51: 93-112.
10. MAATHUIS FJM, SANDERS D. (1999) Plasma membrane transport in context making sense out of complexity. *Curr Op in Plant Biol.* 2:236-243.
11. BAKER AJ, MCGRATH S.P., REEVES R.D., SMITH J.A. (2000) Metal Hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In *Phytoremediation of contaminated soil and water*. N Terry and G. Banuelos eds, Lewis Publishers, London, pp 85-107.
12. TESTER M., LEIGH R.A. (2001). Partitioning of nutrient transport processes in roots. *J Exp Bot* 52:445-457.
13. KUHN A.J., SCRODER W.H., BAUCH J. (2000). The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots. *Planta* 210:488-496.
14. RASKIN I, KUMAR P.B.A. DUSHENKOV S., Salt D. E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr*

- Op in Biotech* 5:285-290.
15. SAKT D.E., PRINCE R.C., PICKERING U., RASKIN I. (1995) Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in *Indian mustard*. *Plant Physiol* 109:1427-1433.
 16. COBBETT C.S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 123:825-832.
 17. MARRS K.A. (1996). The functions and regulation of glutathione-S-transferases in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 47:127-158.
 18. CABRERA C., ORTEGA E., LORENZO M.L. LOPEZ M.d.C. (1998). Cadmium contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. *Rev Env Contam Toxicol* 154:55-81.
 19. DAS P., SAMANTARAY S., ROUT G.R. (1998) Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Env Poll* 96: 29-36.
 20. SANITÀ DI TOPPI L., GABBRIELLI R. (1999). Responses to cadmium in higher plants. *Env Exp Bot* 41:105-130.
 21. DIAZ-CRUZ M.S., MENDIETA J., TAULER R., ESTEBAN M. (1997) Cadmium-binding properties of glutathione: a chemometric analysis of voltammetric data. *J Inorg Biochem*.29-36.
 22. MEJARE M., BULOW L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotech* 19:67-73.
 23. YE Z. H., Baker A. J. M., WONG M. H. and WILLIS A. J. (1997). Zinc, Lead and Cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common reed, *Phragmites Australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel. *Ann Bot*. 80:363-370.
 24. MASSACCI A., PIETRINI F. IANNELLI M.A. (2001). Remediation of wetlands by *Phragmites australis*. *Min Biotech* 13: 135-140.

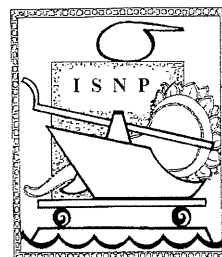


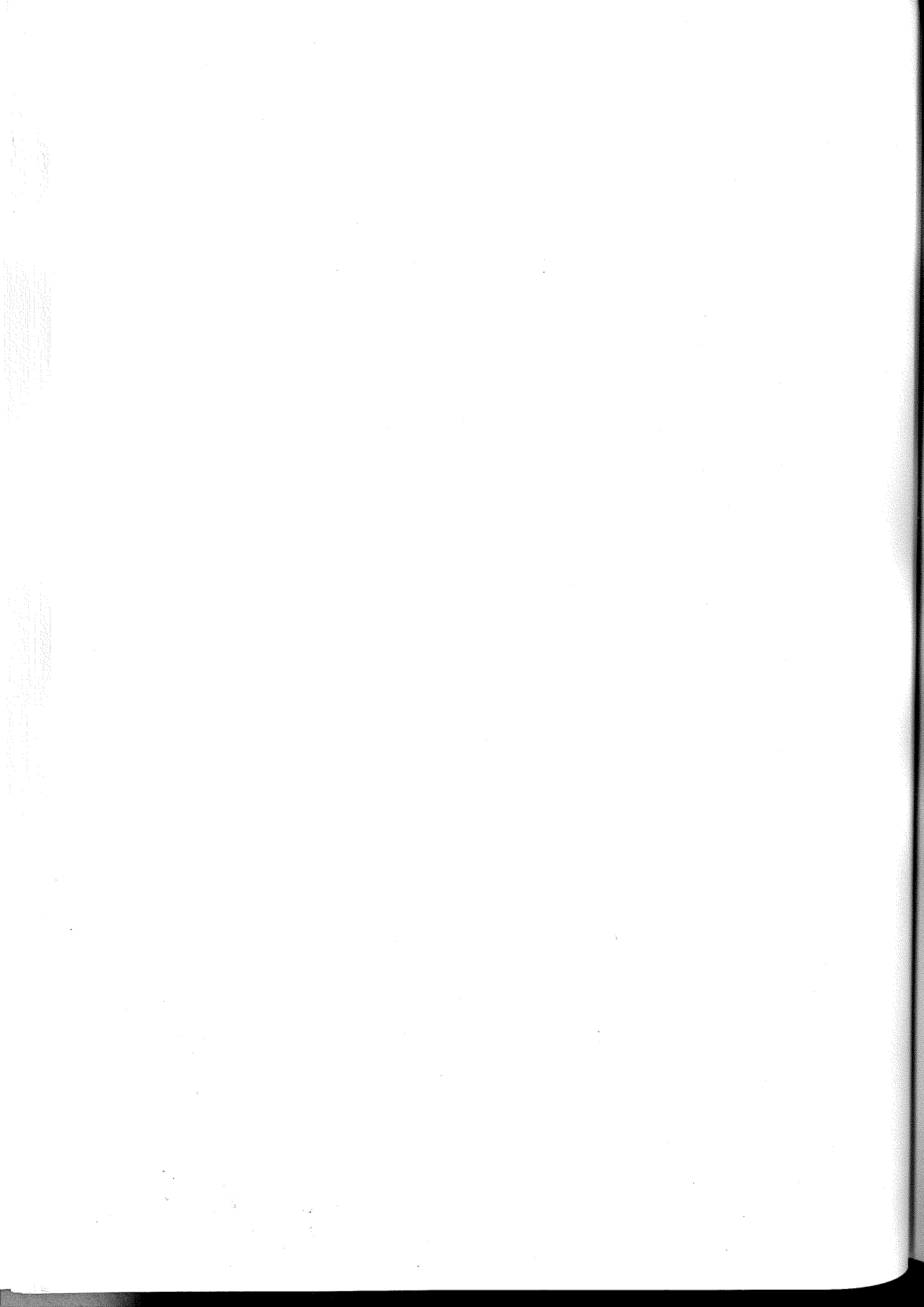
La "bioremediation" in Italia: dalla teoria alla pratica

Sessione 2:

La ricerca

ENEA





I PROGETTI DI RICERCA ITALIANI SULLA BIOREMEDIATION

Stefano Grego

Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica
Università della Tuscia, Viterbo

Nell'affrontare il tema che mi è stato assegnato mi sono preoccupato di verificare quali erano i *temi* sui quali l'attività di ricerca sulla bioremediation si stava sviluppando, *chi* era coinvolto in detti programmi e quali erano le fonti di *finanziamento*. Non esistendo un data base né un coordinamento nazionale sull'argomento i dati che sono riportati in questa relazione sono stati trovati nella rete internet. Mi scuso in anticipo per tutti i programmi, attività e azioni che hanno come base la bioremediation e che non sono state censite a causa unicamente della difficoltà di reperire informazioni. D'altra parte non era mia intenzione fare l'elenco di tutte le attività di ricerca sulla bioremediation in atto in Italia, ma piuttosto era quello di verificare quale è l'interesse del mondo scientifico per l'argomento e quali erano i temi che maggiormente hanno l'attenzione dei ricercatori.

I temi di ricerca riguardano i tre comparti ambientali (aria, acqua e suolo) che sono influenzati dall'attività umana e che hanno bisogno quindi di disinquinamento con sistemi biologici. Non ci occuperemo di tutta l'attività di ricerca che riguarda l'atmosfera e la presenza dei gas prodotti dall'attività umana che sono alla base dell'effetto serra, attività che occupa centri di ricerca altamente specializzati ma poco diffusi sul territorio nazionale.

L'inquinamento del suolo è strettamente legato a quello delle acque superficiali e profonde. Quindi molto spesso nei progetti e studi di bioremediation i due comparti sono studiati in parallelo e con metodologie simili. Tra i progetti in atto sulle acque vale la pena citare gli studi sul disinquinamento del mare da metalli pesanti ed idrocarburi che coinvolgono soprattutto le facoltà di ingegneria non solo delle università situate nelle città con un porto sul mare (Napoli, Ancona, Genova) ma anche università di città lontane dal mare (Milano, Firenze) o senza porto (Roma).

Lo studio sul disinquinamento da metalli pesanti (MP) con sistemi biologici coinvolge un gran numero di gruppi di ricerca praticamente in tutte le regioni italiane. L'attività, che interessa sia istituzioni universita-

I PROGETTI DI RICERCA ITALIANI SULLA BIOREMEDIATION

Stefano Grego

Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica
Università della Tuscia, Viterbo

Nell'affrontare il tema che mi è stato assegnato mi sono preoccupato di verificare quali erano i *temi* sui quali l'attività di ricerca sulla bioremediation si stava sviluppando, *chi* era coinvolto in detti programmi e quali erano le fonti di *finanziamento*. Non esistendo un data base né un coordinamento nazionale sull'argomento i dati che sono riportati in questa relazione sono stati trovati nella rete internet. Mi scuso in anticipo per tutti i programmi, attività e azioni che hanno come base la bioremediation e che non sono state censite a causa unicamente della difficoltà di reperire informazioni. D'altra parte non era mia intenzione fare l'elenco di tutte le attività di ricerca sulla bioremediation in atto in Italia, ma piuttosto era quello di verificare quale è l'interesse del mondo scientifico per l'argomento e quali erano i temi che maggiormente hanno l'attenzione dei ricercatori.

I temi di ricerca riguardano i tre comparti ambientali (aria, acqua e suolo) che sono influenzati dall'attività umana e che hanno bisogno quindi di disinquinamento con sistemi biologici. Non ci occuperemo di tutta l'attività di ricerca che riguarda l'atmosfera e la presenza dei gas prodotti dall'attività umana che sono alla base dell'effetto serra, attività che occupa centri di ricerca altamente specializzati ma poco diffusi sul territorio nazionale.

L'inquinamento del suolo è strettamente legato a quello delle acque superficiali e profonde. Quindi molto spesso nei progetti e studi di bioremediation i due comparti sono studiati in parallelo e con metodologie simili. Tra i progetti in atto sulle acque vale la pena citare gli studi sul disinquinamento del mare da metalli pesanti ed idrocarburi che coinvolgono soprattutto le facoltà di ingegneria non solo delle università situate nelle città con un porto sul mare (Napoli, Ancona, Genova) ma anche università di città lontane dal mare (Milano, Firenze) o senza porto (Roma).

Lo studio sul disinquinamento da metalli pesanti (MP) con sistemi biologici coinvolge un gran numero di gruppi di ricerca praticamente in tutte le regioni italiane. L'attività, che interessa sia istituzioni universita-

rie che enti di ricerca, riguarda sia i microrganismi del suolo che le piante. Notevole impulso hanno le ricerche che riguardano l'effetto dei MP sulla biodiversità dei batteri e funghi nel suolo e sulle relazioni tra i diversi gruppi. Interessanti sono gli studi sulla possibilità di diminuire la mobilità dei MP nel suolo inducendo la produzione di colloidali o di chelanti difficilmente degradabili da parte dei microrganismi presenti nel suolo che, interagendo con l'inquinante, ne riduce così la biodisponibilità per il mondo biologico. Molti studi soprattutto nel centro-nord del paese riguardano la fitoestrazione utilizzando piante che accumulano grandi quantità di MP nella parte aerea. Oggetto dello studio sono i meccanismi biochimici che determinano l'iperaccumolo di MP, la loro solubilizzazione da parte di composti prodotti dall'apparato radicale e le condizioni che favoriscono la fitoestrazione (p.e., fertilizzazioni). Alcuni studi sulle relazioni suolo-pianta che sono portati avanti da alcuni gruppi di ricercatori (Torino) hanno sempre lo scopo di favorire l'assorbimento del MP da parte dell'apparato radicale dei vegetali.

Il rapporto suolo-pianta è inoltre oggetto di studio nei progetti di "phytoremediation" che riguardano la degradazione di inquinanti organici ad opera dei sistemi rizosferici. Molti sono i gruppi che in Italia studiano questo processo presso Università, Enti di ricerca e gruppi privati (Roma, Pisa, Udine, Bologna, Torino, Terni, Viterbo, Perugia, Padova, Firenze, Napoli, Bari). La degradazione di xenobiotici viene anche studiata isolando microrganismi da ambienti inquinati e valutandone la potenzialità disinquinante in ambienti controllati. Questo tipo d'approccio ha portato alla formulazione di brevetti da parte di alcuni gruppi di ricerca. Con lo stesso sistema viene anche studiata la biodegradabilità di plastiche da parte di microrganismi o di comunità di microrganismi isolati da ambienti naturali. La mobilità di xenobiotici nell'ambiente viene studiata da molti gruppi di ricerca utilizzando modelli previsionali (progetti coordinati storicamente dall'Università di Piacenza).

Una notevole attività di ricerca viene dedicata alla trasformazione e riciclo dei residui organici di varia origine. Gli studi riguardano il riciclo allo stato solido, il compostaggio, la trasformazione guidata dei residui organici, utilizzando ceppi particolari di funghi, per ottenere enzimi, sostanze chimiche da utilizzare nell'industria alimentare, per fare la carta da residui ligno-cellulosici, e per ottenere dei compost di qualità da utilizzare in agricoltura. Molti sono i gruppi, soprattutto al centro-sud, che studiano la trasformazione delle acque di vegetazione che si ottengono dalla estrazione dell'olio dalle olive (reflui oleari). Di reflui di origine industriale e della loro biodegradazione nei suoli si occupano molti gruppi soprattutto nelle facoltà di ingegneria (Genova, Ancona, Roma).

Particolarmente abbondante è l'attività di ricerca sui bioindicatori ambientali che riguardano il monitoraggio di siti inquinati e del processo di bioremediation. I bioindicatori riguardano: i microrganismi sia come singole specie che come biomassa nel suo complesso, la loro attività e diversità (molti gruppi lavorano in questo ambito, come Bari, Palermo, Napoli, Potenza, L'Aquila, Roma-ENEA, CNR, Viterbo, Firenze, Ferrara, Genova, Piacenza, Reggio Calabria); le crittogame (progetto coordinato da Trieste che coinvolge molte realtà di ricerca); gli organismi acquatici (progetto di alcune Università tra cui Bologna e Caserta); la mesofauna terrestre (lombrichi); la macrofauna (Università di Roma La Sapienza). L'uso di enzimi del suolo come indicatori ambientali è anche oggetto di studio da parte di alcuni gruppi di ricerca (Bari, Firenze, Napoli, Viterbo, Palermo).

Particolarmente rilevante è l'attività di formazione che viene fatta presso le Università, Consorzi e Gruppi privati. In particolare, sono attivati alcuni dottorati di ricerca dedicati al problema della bioremediation, un master (Ancona) si occupa di formare esperti per il recupero ambientale e il Consorzio della Chimica per l'Ambiente sviluppa attività di ricerca e formazione anche sul biorisanamento.

Questa è soltanto la punta dell'iceberg. Moltissima attività di ricerca non è facilmente reperibile e questo censimento è fortemente lacunoso. A fronte di questo ampio e competente impegno della comunità scientifica i mezzi messi a disposizione sono molto scarsi. Si lamenta l'assenza di un programma nazionale che coordini e guidi l'attività di ricerca sulla bioremediation. La maggior parte dei fondi è messo a disposizione dal MURST tramite i progetti COFIN ex 40%, che comunque si limitano a finanziare alcuni progetti approvati da referees nazionali ed internazionali ma che non ha nei suoi fini istituzionali il coordinamento dell'attività che i diversi gruppi svolgono. Il CNR ha una scarsa attenzione per il problema e lascia che l'attività sia svolta dai singoli gruppi senza un reale coinvolgimento del Consiglio e soprattutto in assenza di un progetto finalizzato al disinquinamento. Alcune Regioni finanziano attività di studio e ricerca su aspetti molto specifici spesso utilizzando fondi europei. Le Regioni, inoltre, sono più propense a finanziare sistemi che sia a basso impatto ambientale e che quindi inquinino poco o niente piuttosto che a recuperare aree inquinate. Preferiscono dedicarsi alla prevenzione e alla riduzione dell'inquinamento. Il MIPAF ha per la prima volta finanziato un programma, nato dalla gemmazione del programma PANDA, che si chiama "I microrganismi per l'ambiente" che ha un gruppo di lavoro sulla bioremediation. Il Ministero per l'Ambiente ha finanziato molte attività di monitoraggio anche se ancora il numero di siti inquinati censiti sembra essere notevolmente basso.

La mancanza di un piano organico a livello specifico non facilita l'accesso ai fondi messi a disposizione dalla UE malgrado la domanda di bonifica sia destinata ad aumentare sia per necessità improrogabile di trovare soluzioni efficaci a problemi già individuati e in corso di definizione, sia per l'urgenza di bonificare aree dismesse derivanti da importanti installazioni industriali o destinate ad uso residenziale o di ricreazione o ad un nuovo tipo di deindustrializzazione.

I PROGETTI DI RICERCA ITALIANI NELLA COOPERAZIONE TECNICA E SCIENTIFICA A LIVELLO EUROPEO

Anna Benedetti

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Nell'ambito della Cooperazione Tecnica e Scientifica (COST) promossa dalla DG XII dell'U.E. ed in particolare all'interno del Comitato Tecnico Agricoltura e Biotecnologie operano diverse azioni, a cui partecipa l'Italia, in cui vengono sviluppati studi sul recupero biologico. In particolare esse sono : Azione 831 sulle biotecnologie del suolo per il monitoraggio, la conservazione ed il ripristino della fertilità biologica (coordinata da A. Benedetti, I), l'Azione 837 sulle biotecnologie vegetali per la purificazione da inquinanti organici e metalli pesanti di acque e siti contaminati (coordinata da Schwitzguebel Jean-Paul, CH) e l'Azione 838 sull'utilizzo delle micorrize arbuscolari per migliorare la qualità e la salute in agricoltura (coordinata da S. Gianinazzi, F) nonché l'Azione 830 sugli inoculanti microbici (coordinata da G. Catroux, F). Nel mese di novembre 2000 (15-18) si è tenuto a Sorrento (NA) un Convegno organizzato congiuntamente dalle Azioni 831, 837 e 838 cui hanno partecipato circa 100 ricercatori da tutti i Paesi aderenti al COST ed i diversi gruppi italiani coinvolti nella ricerca sul recupero biologico. Dai gruppi di ricerca italiani sono stati presentate diciannove comunicazioni come riportato nella Tab. 1.

A questi gruppi ne vanno aggiunti altri non erano presenti al Convegno, ma coinvolti nelle diverse azioni e che si occupano di rimedio biologico come ad esempio M. Nuti e M. Giovannetti del Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie-Università di Pisa, S. Grego del Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica-Università di Viterbo, N. Mi Claus dell'Istituto Sperimentale Studio e Difesa del Suolo di Firenze, ecc..

Come appare sia dai lavori presentati durante il Convegno di Sorrento che dalle specificità dei gruppi di lavoro coinvolti nelle diverse Azioni COST è possibile individuare tre differenti filoni di attività di ricerca e precisamente:

- a) Fitodepurazione;
- b) Relazioni pianta-microrganismo;
- c) Microrganismi come agenti di recupero

Tabella n. 1: Contributo dei ricercatori italiani al Convegno COST sulla bioremediation (Sorrento 14-18 novembre 2000)

Azione 837

- **Phyto 2000: from the enthusiasm for a scientific research to the public acceptance of an innovative technology.** Nelson Marmioli (I)
- **Biochemical aspects of copper tolerance in *Raphanus sativus* c.v. Rimbo.** C. Sgherri, E. Cosi, and F. Navari-Izzo.
- **Exogenous spermine enhances lead accumulation and translocation in maize.** M. de Agazio, E. Rea, A. Fruggerio, and M. Zacchini.
- **Phytoremediation: investigation on cadmium decontamination by in Vitro growing aquatic plant *Hygrophila corymbosa* "stricta".** S.R. La Starza, C. Damiano, A. Frattarelli, P. Ferrazza, A. Marcucci, and A. Figliolia.
- **Phytoextraction of cadmium and zinc by *Brassica napus*: preliminary results.** G. Rossi, S. Socciarelli, and A. Figliolia.
- **Uptake and translocation of copper and cadmium in *Brassicaceae*.** M.F. Quartacci, E. Cosi, C.L.M. Sgherri, and F. Navarri Izzo.
- **Drugs uptake and degradation by aquatic plants (water velvet and duckweed) as a bioremediation technique.** L. Migliore, A. Cascone, and C. Forni.
- **Selection of woody species with enhanced uptake capacity for protection against hazards posed by pesticides stored in bunkers.** S. Predieri, J. Figaj, E. Gatti, and F. Rapparini.
- **Phragmites australis growing in a contaminated environment: ecophysiological characteristics.** M. Antonielli, S. Pasqualini, L. Ederli, P. Batini, F. Loreto, and A. Massacci.
- **Lead phytoextraction and ion transport in plant cell membranes.** M. Bregante, A. Paganetto, P. Magistrelli, A. Ripetta, G.A. Sacchi, P. Downey, M. Cocucci, F. Loschiavo, and F. Gambale.
- **Cd-induced sulphate uptake in maize roots.** F. Nocito, L. Pirovano, M. Cocucci, F. Loschiavo, and F. Gambale.
- **Changes, in the level of acid-soluble thiols in plants, as physiological marker of heavy metal pollution.** A. Rivetta, M. Dell'Orco, N. Negrini, M. Cocucci.

Azione 831

- **Basic principles, agents and feasibility of soil bioremediation.** L. Gianfreda.
- **Use of enzymes to detoxifying pesticide-polluted soils.** P. Nannipieri.
- **Study on chelate-assisted phytoextraction of lead from soil.** Abruzzese, A. Rivetta, G. Lucchini, F. Gambale, M. Cocucci, and G.A. Sacchi.
- **Should we be able to define soil quality before "restoring" it?** F. Pinzari, A. Trinchera, and A. Benedetti.
- **Diversity of Bacterial Community in soils with different level of chromium.** C. Viti, F. Favilli, and L. Giovannetti.

Azione 838

- **Use of microbial genomes for bioremediation.** Graziella Berta.
- **Interactions between ericoid mycorrhizal fungi and heavy metals: a biochemical and molecular analysis.** Silvia Perotto.

Nel primo filone vengono affrontati studi che vanno dalla comprensione dei meccanismi di captazione e trattenimento dello xenobiotico, allo studio di organismi geneticamente modificati in grado di tollerare alte concentrazioni di inquinanti oppure di catturarli in maniera specifica.

Nel secondo filone affluiscono invece gli studi che vedono le micorrize quali elemento di legame tra suolo-pianta e microrganismo. Anche in questo caso troviamo studi sull'individuazione di nuove specie di funghi in grado di colonizzare siti inquinati e studi di ingegneria genetica per stimolare nella pianta caratteristiche utili al disinquinamento.

Al terzo filone si riconducono invece studi relativi all'individuazione di microrganismi in grado di degradare sostanze xenobiotiche ed alla loro ingegnerizzazione nonché studi di rilascio controllato di microrganismi inoculanti, e ricerche che individuano idonei trattamenti del suolo al fine di ottimizzare l'attività microbica endogena di siti inquinati per ottenere autodepurazione.

Le applicazioni più frequenti vengono operate nei confronti di un inquinamento da metalli pesanti, da prodotti organici di sintesi o da idrocarburi aromatici.

In Italia pochi esempi si hanno di studi mirati a controllare l'inquinamento dovuto ad alte concentrazioni di sali come ad esempio il cloruro di sodio, realtà di ricerca ben presenti invece in altri Paesi europei, in Spagna (Barea, 2000) o in Germania (Bothe, 2000). Tali studi andrebbero invece per la realtà italiana particolarmente potenziati; vale qui la pena di ricordare che attualmente in Italia più di 4,500 Km² corrispondenti all'1,5% del territorio nazionale sono sottratti all'agricoltura perché inquinati da un eccesso di sali (Fierotti, 1999).

Appare altresì in maniera molto evidente che mancano completamente studi sull'utilizzo della mesofauna (vermi, insetti, ecc..) quale agente di disinquinamento. In realtà tali studi non sono molto sviluppati nemmeno negli altri Paesi europei. I lombrichi ad esempio nel corso degli anni ottanta sono stati ampiamente utilizzati nella bioconversione di biomasse organiche inquinate soprattutto da metalli pesanti come i fanghi di depurazione delle acque, oppure in ambiente aperto per il disinquinamento ad esempio da scorie radioattive, ma queste applicazioni, sia pur molto promettenti si sono spente nel corso degli anni tanto da perdere l'interesse dei ricercatori in maniera del tutto inspiegabile.

Infine è opportuno ricordare studi di tipo trasversale mirati all'individuazione di opportuni parametri diagnostici in grado di definire l'ef-

ficacia dell'intervento di recupero. È questo il caso ad esempio dei parametri microbiologici e biochimici per la definizione della qualità del suolo, sia essa degradata o ripristinata (Benedetti, 1998; Bloem, 2000).

Dall'analisi dei lavori presentati nell'Inter Cost Meeting sia da parte degli italiani che degli altri studiosi appare che la ricerca è ancora poco applicata. È spesso una ricerca condotta in laboratorio ed ambiente controllato, pochi esempi sono infatti stati riferiti su siti recuperati mediante bioremediation. Mergeay ha illustrato una serie di esperimenti di recupero ambientale che hanno impegnato due diverse istituzioni del Belgio negli ultimi 10 anni su suoli inquinati da metalli pesanti mediante un approccio di fitostabilizzazione e di fitoestrazione con piante iperaccumulatrici (Vansgronsveld, 2000).

Barea ha riferito di un progetto di fitodepurazione delle acque del Rio Tinto nel parco di Dognana in Spagna anch'esso inquinato da metalli pesanti. Altri esempi di recupero ambientale sono stati descritti per la Germania da Bothe ed in questo caso si trattava di studi su alte concentrazioni di sali.

Quali possono essere le motivazioni di un così ampio divario tra ricerca e applicazione? La ricerca è ancora indietro rispetto all'applicazione perché si stanno ancora studiando i meccanismi d'azione per piante e microrganismi? Oppure non si hanno ancora le tecnologie adatte per operare su larga scala? Essendo state emanate solo da poco tempo le normative a livello europeo per il recupero dei siti contaminati, fino ad ora non venivano individuati o meglio denunciati i siti contaminati? Forse la risposta a queste domande deriva da una concorrenza di tutti gli aspetti sopra ricordati. Altra considerazione importante che deve essere fatta e che la bioremediation di un sito inquinato non può essere condotta da un solo gruppo di ricerca, ma da un sinergismo di competenze che necessariamente devono spaziare dalla microbiologia, alla chimica, alla fisica, alla fisiologia vegetale, all'ingegneria ambientale, all'economia ambientale ecc. e pertanto necessita del supporto finanziario da parte delle amministrazioni statali. I costi di trasferimento della ricerca dal laboratorio o dall'ambiente confinato a situazioni reali su larga scala investe infatti scelte di politica ambientale molto precise che partendo dall'acquisizione scientifica attuano progetti di recupero biologico su vasta scala.

Questo argomento è stato ampiamente dibattuto nella tavola rotonda tenutasi a conclusione del Convegno di Sorrento dal titolo: la bioremediation una montatura giornalistica o una speranza? Dalla tavola rotonda coordinata abilmente da Jim Lynch dell'Università del Surrey sono scaturite quattro mozioni da presentare alla DG XII e precisamente:

a) stimolare l'attivazione di una nuova azione di tipo ingegneristico al fine di generare i necessari contatti affinché la ricerca sulle potenzialità disinquinanti degli organismi viventi trovi congiuntamente alla tecnologia impiantistica la sua applicazione su larga scala.

b) coinvolgere di economisti ambientali al fine di valutare la reale fattibilità di un recupero biologico di situazioni ambientali degradate con i mezzi che ci derivano dalla bioremediation.

c) Individuare possibili suggerimenti legislativi per il recupero di ambienti degradati attraverso il biorimediazione nell'ambito di una pianificazione territoriale.

d) Considerare gli organismi ingegnerizzati quali agenti di recupero purché vengano effettuati i necessari controlli sulla loro innocuità ambientale.

La tavola rotonda ha altresì dibattuto sulla estensivizzazione del concetto di recupero biologico non solo ai siti inquinati, ma a siti con una degenerazione della qualità dell'ambiente dimostrando che si è già in possesso di acquisizioni tali da trasformare il quesito iniziale in "bioremediation una montatura o una speranza", bensì in "bioremediation una speranza o una realtà".

Altri progetti

Dalla relazione che S. Grego ha presentato in questo medesimo convegno sui programmi italiani sulla Bioremediation appare un grande fermento di attività a livello nazionale, che però non trova riscontro a livello europeo.

Nell'ambito del V programma quadro a tutt'oggi su tre progetti sulla Bioremediation e Fitoremediation finanziati dall'UE ha trovato spazio solo il consorzio Mario Negri Sud (Arielli) con una ricerca dal titolo "Strategies to accelerate the productive biodegradation of several herbicides under environmental stress condition" in un progetto coordinato da Umweltforschungszentrum Leipzig-halle (GMBM) Leipzig Germania, finalizzato allo studio della cinetica di degradazione e alle risposte di adattamento alla degradazione di erbicidi da parte dei batteri. obiettivo della ricerca è la regolazione dei geni catabolici per differenti erbicidi come la Glutatione-Stransferasi.

Altri esempi di progetti europei come CLARINET verranno

presentati nel corso di questo convegno da parte di altri relatori, ma restano comunque pochi rispetto all'attività di tipo nazionale. Infine merita una menzione il Workshop dell'UE che si è tenuta lo scorso giugno a Venezia su tematiche collegate alla Bioremediation. In questo workshop sono stati illustrati 15 progetti a livello europeo con la partecipazione di ricercatori italiani in cinque di essi Tab. 2.

Tabella n. 2: Project Contributions EU Workshop (Venezia, giugno 2000)

1) PREDICTION OF THE BEHAVIOR OF POTENTIAL ENDOCRINE DISRUPTORS IN SOILS USING VITELLOGENIN ELISA ASSAYS BIOSENSORS

Partner: Prof. Dr. Nicola Senesi (Univ. degli Studi di Bari (USB) Istit. di Chimica Agraria, Bari)

2) THE APPLICATION OF ADVANCED GROUND PENETRATING RADAR TO THE EVALUATION OF HYDROCARBON POLLUTION IN EUROPE (GROPREP)

Partner: EUROMIN S.r.l. (Trieste, Italy)

3) HOLOGRAPHIC GROUND PROBING RADAR SYSTEM

Co-ordinator: Luigi Sambuelli (Dip. Di Georisorse e Territorio Politecnico di Torino)

Partner: Luigi Giubolini (CNR-IRITI, Torino)

4) BIOREMEDIATION IN THE RHIZOSPHERE. AN INTEGRATED APPROACH FOR THE PHYTOREMEDIATION OF ORGANIC POLLUTANTS IN THE RHIZOSPHERE

Partner: Prof. Liliana Gianfreda (Dip. di Scienze Chimico-Agrarie, Univ. di Napoli "Federico II")

Partner: Prof. Guido Greco, subcontractor (Dip. di Scienze Chimico-Agrarie, Univ. di Napoli "Federico II")

5) PROTECTION OF GROUNDWATER RESOURCES AT INDUSTRIALLY CONTAMINATED SITES (PURE)

Co-ordinator: Paolo Cortesi (EniChem S.p.A., Novara)

Partner: Raffaello Sisto (ENITECNOLOGIE S.p.A., Roma)

Conclusioni

Da questa breve carrellata sulla partecipazione italiana a livello europeo in progetti sulla Bioremediation appare che poche ricerche sono state fino ad ora finanziate. Massiccia invece la partecipazione alle iniziative COST che, come è noto, finanzia agli aderenti unicamente le spese per la partecipazione alle riunioni dei gruppi di lavoro. Per definizione il COST promuove iniziative a livello precompetitivo pertanto garantisce il network essenziale alla realizzazione di iniziative progettuali finanziabili a parte.

Dunque ci troviamo in una fase di organizzazione delle nostre attività di ricerca dobbiamo compiere il passo successivo. Uno degli obiettivi che ci siamo prefissati per questo convegno è stato proprio quello di promuovere una aggregazione tra i gruppi italiani nell'intento di trovare i necessari collegamenti che portino ad una azione progettuale propositiva a livello europeo.

Bibliografia

- BAREA J.M.: "Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal contaminated soils and its implications for bioremediation". Inter Cost Meeting Sorrento 14-15 novembre 2000, *Atti Inter Cost Workshop Action 831-837-838*. Sorrento 2000.
- BENEDETTI A.: "Defining Soil Quality". In *Proceeding of the COST Action 831 Joint Working Groups Meeting*. Rome 9-10 dicembre 1998, COST ed. 2000.
- BERTA G.: "Use of microbial genomes for bioremediation". Inter Cost Meeting Sorrento 14-15 novembre 2000, *Atti Inter Cost Workshop Action 831-837-838*. Sorrento 2000.
- BLOEM J., SORENSEN S.: "Evaluating Soil Quality". In *Proceeding of the COST Action 831 Joint Working Groups Meeting*. Kiel 16-18 maggio 2000. In corso di stampa.
- BOTHE H.: "Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal salt tolerance". Inter Cost Meeting Sorrento 14-15 novembre 2000, *Atti Inter Cost Workshop Action 831-837-838*. Sorrento 2000.
- BOWMAN L.: "Microbial indicators of soil quality". Inter Cost Meeting Sorrento 14-15 novembre 2000, *Atti Inter Cost Workshop Action 831-837-838*. Sorrento 2000.
- CASTRO P.: "Plants colonising polluted sites: integrating microbial aspects". Inter Cost Meeting Sorrento 14-15 novembre 2000, *Atti Inter Cost Workshop Action 831-837-838*. Sorrento 2000.
- DUMAS-GAUDOT E.: "Proteomic approach for studying cadmium-induced protein modification in mycorrhizal roots". Inter Cost Meeting Sorrento 14-15 novembre 2000, *Atti Inter Cost Workshop Action 831-837-838*. Sorrento 2000.
- FIEROTTI G.: "I suoli di fronte all'irrigazione con acque anomale". *Bollettino SISS* n. 48 (1), 179-199 (1999).
- REGVAR M.: "Mycorrhiza as a bioindicator of the polluted sites". Inter Cost Meeting Sorrento 14-15 novembre 2000, *Atti Inter Cost Workshop Action 831-837-838*. Sorrento 2000.
- RIVERA-BECERRIL F.: Heavy metal tolerance in symbiotic legumes: arbuscular mycorrhiza and genes of interest.
- VAN DER LELIE D.: "A microbial biosensor concept to predict bioavailable heavy metals in soil and their transfer to plants". Inter Cost Meeting Sorrento 14-15 novembre 2000, *Atti Inter Cost Workshop Action 831-837-838*. Sorrento 2000.
- VANSGRONSVELD J., COLPAERT J., CARLEER R., DIELS L., MERGEAY M. and D. VAN DER LELIE: "The use of living Organisms to decontaminate and evaluate polluted site 1".



BIOREMEDIATION: STATO DI APPLICAZIONE IN EUROPA

Francesca Quercia¹, Giannantonio Petruzzelli²

¹ ANPA/CLARINET

Dipartimento Rischio Tecnologico e Naturale
Via V. Brancati, 48 - 00144 Roma

² CNR - Istituto per la Chimica del Terreno
Via Alfieri, 1 - 56127 Ghezzano (Pisa)

Premessa

L'analisi dello stato dell'arte e dell'applicazione delle tecnologie di risanamento dei siti contaminati in Europa è oggetto delle attività di uno dei sette Gruppi di Lavoro di CLARINET (Contaminated Land Rehabilitation Network for Environmental Technologies). CLARINET è una Azione Concertata Europea, finanziata dalla DG Ricerca della Commissione, coordinata dall'Agenzia dell'Ambiente Austriaca e composta da delegati dei governi di 16 Paesi europei, appartenenti alla pubblica amministrazione e al mondo della ricerca.

Il Gruppo di Lavoro '*Remediation Technologies*', coordinato da Aquateam - Norwegian Water Technology Centre A/S - sta elaborando un catalogo sulle tecnologie di risanamento in Europa e sviluppando gli elementi a supporto delle raccomandazioni di CLARINET per il risanamento sostenibile e rivitalizzazione dei siti contaminati. Il catalogo, attualmente in fase di elaborazione (Vick, 2000), sarà disponibile nella sua versione definitiva nell'autunno 2001.

Nel presente lavoro si anticipano alcuni contenuti salienti del catalogo, con particolare riguardo alle tecniche di bioremediation.

1. Il sondaggio sullo stato di applicazione delle tecnologie

Per giungere ad un quadro dello stato di applicazione delle diverse tecniche di bonifica in Europa, il GdL di CLARINET ha raccolto, attraverso un questionario distribuito ai coordinatori nazionali, alcune interes-

santi informazioni circa le tecnologie utilizzate nel rispettivo paese. Gli aspetti che si intende mettere in risalto con l'indagine sono lo stato dell'arte delle applicazioni, in termini quantitativi e qualitativi, ed i progetti per lo sviluppo di tecnologie innovative. I quesiti posti sono articolati nelle tre tabelle seguenti.

Tabella 1. Ditte con permesso permanente di smaltimento e trattamento ex situ di suoli e sedimenti contaminati

Ditta/ indirizzo	Trattamento	Capacità (ton/anno)	Costi (?/?/ton- 199?) basso-alto	Tipo di contaminanti trattati	Commenti

Tabella 2. Lista delle tecnologie utilizzate per bonificare il suolo scavato on site e grado di riutilizzo del suolo

Tecnologia	Numero siti o ton/anno	Costi (?/?/ton-199?) basso-alto	Tipo contaminanti trattati	Efficienza del trattamento/ limiti	Commenti condizioni particolari

Strategie nei confronti dei trattamenti on-site rispetto ad off-site?

Tabella 3. Tecnologie in situ in corso o completate

Tecnologia	Numero siti e volumi trattati	Costi (?/?/ton) basso-alto	Tipo contaminanti trattati	Risultati esperienze limitazioni	Commenti

Strategie in situ nei confronti di ex situ?

Particolare attenzione nel sondaggio viene rivolta ai requisiti di monitoraggio della performance delle tecnologie, soprattutto quelle in situ, nei confronti della qualità del suolo o delle acque trattate.

2. Bioremediation - Stato dell'arte e strategie nazionali

Sulla base dei dati dell'indagine fin qui raccolti, di seguito vengono riassunte le risposte fornite da diversi paesi, con particolare riguardo all'applicazione delle tecniche di biorisanamento.

Austria

In Austria, a fronte di 2.476 siti potenzialmente contaminati e di 150 siti accertati contaminati, di cui 14 risanati e 41 con interventi in corso, esistono 8-10 ditte che offrono tecnologie di trattamento ed una ventina di consulenti con esperienza specifica. Attualmente sono registrati 18 impianti, di cui 5 mobili, per il trattamento biologico, termico e chimico-fisico ex-situ per una capacità totale di 147.000 t/a. Il suolo leggermente contaminato viene smaltito in discarica. Nel 1996 sono state trattate 67.000 tonnellate di suolo.

Nei progetti finanziati dal governo, oltre a quelli di messa in sicurezza, sono stati eseguiti i seguenti interventi di bonifica:

• excavation off site	24
• groundwater remediation	11
• soil-air-sucking	18
• in-situ-remediation	2
• soil washing	1
• thermal treatment	4
• biological treatment	4
• immobilisation	4

L'applicazione della bioremediation, almeno nei progetti finanziati da fondi pubblici, sembra essere a tutt'oggi limitata. Tuttavia il Ministero Federale dell'Ambiente ha avviato due studi relativi a: a) un processo decisionale per la scelta tra diverse tecnologie, b) controllo dell'efficacia di diverse tecniche di biorisanamento in-situ.

Belgio/Fiandre

In Belgio esistono 7 ditte con permesso di trattamento del suolo contaminato per una capacità totale di 340.000 t/a di trattamento biologico e 370.000 di trattamenti fisico-chimici. Il costo del trattamento biologico varia da 20 a 40 euro/t di suolo. La scelta di tecnologie ex situ piuttosto che in situ si basa sui principi BATNEEC. Fino ad oggi sono stati bonificati 10 siti con tecnologie biologiche on site e circa 15 siti con bioventing in situ.

Danimarca

In Danimarca esistono 7 ditte con capacità di trattamento di suoli contaminati, per un totale di più di 570.000 t/a, con tecniche soprattutto di compostaggio, ma anche di lavaggio e termiche. Non esiste una strategia precisa che indirizzi la scelta delle tecnologie, ma lo smaltimento in discarica è gravato di tasse che ne limitano il conferimento di suolo. Per quanto riguarda il riutilizzo dei suoli trattati biologicamente, il riciclaggio, senza restrizioni d'uso, è regolato dal rispetto dei seguenti criteri di qualità:

⇒ contaminazione da petrolio: 25 mg/kg (idrocarburi totali), 0.5 mg/kg BTEX, 1.5 mg/kg IPA (5 composti specifici);

⇒ contaminazione da gasolio: 50 mg/kg (idrocarburi totali), 0.5 mg/kg BTEX, 1.5 mg/kg IPA (5 composti specifici).

A breve verranno pubblicati requisiti analoghi per la presenza di altre sostanze contaminanti.

Finlandia

Il trattamento delle sostanze organiche attraverso compostaggio è la tecnica più di frequente utilizzata per degradare prodotti petroliferi e clorofenoli presenti nei suoli. In Finlandia esistono molti siti per la lavorazione del legno, contaminati da fenoli. Il suolo viene trattato in impianti di compostaggio on site o off site. In presenza di VOC, il compost viene coperto o preparato in container speciali. I risultati si ritengono soddisfacenti, ma alcune sostanze, come particolari miscele di fenoli, diossine e furani, se pur in piccole quantità, risultano difficili o impossibili da trattare.

Esiste un unico bioreattore a scala reale per degradare i clorofenoli nelle acque sotterranee, ed un inceneritore, dotato anche di stripping termico, per diossine e furani. Attualmente le ditte in possesso di impianti e tecnologie adeguate di trattamento sono 8 e gli impianti fissi autorizzati al compostaggio dei suoli sono 54.

Per quanto riguarda le tecnologie in situ, quella più comune è il soil ventilation alla quale si integrano progetti pilota di bioventing, biostimulation e natural attenuation.

Francia

La proporzione di tecnologie di intervento fino ad oggi utilizzate in Francia è riportata nella tabella seguente.

In Francia esistono circa 20 ditte che possiedono l'esperienza, impianti permanenti e tecnologie per trattare suoli contaminati con tecniche biologiche in situ ed ex situ. Dati sulle tecnologie offerte da ciascuna ditta sono disponibili sul CD ROM ASTRES recentemente proposto dal CNRSP (Centre National de Recherche sur les Sites et Sols Pollués) in collaborazione con il Pole de Competence sui siti e suoli contaminati di Nord-Pas de Calais.

Tabella 4. Proporzione delle diverse tecnologie di risanamento utilizzate in Francia

Trattamento	% di siti interessati
Landfill	44
Biological treatment	29
Soil washing	10
Thermal treatment	29
Confinement	60
Ventilation	17
Natural degradation	15
Stabilisation	12
Altri	33

Nelle tabelle seguenti sono riassunti i costi dei trattamenti ex situ ed in situ, includendo quelli biologici.

Tabella 5. Costi delle tecnologie ex situ

Tecnologia	Costi (FF/ton-1999) basso-alto	Commenti
Landfarming	50 - 400	
Composting	50 - 400	
Bioreactor		
Biopile	400 - 1300	5 centri specializzati in Francia
Solvent extraction	500 - 1000	1 unità
Soil washing	200 - 600	
Thermal desorption	250 - 1350	6 unità di trattamento in Francia
Incineration	2000 - 7000	
Landfill	1000 - 1500	13 siti: è necessaria un'autorizzazione che dipende dal tipo ed entità della contaminazione

Tabella 6. Costi delle tecnologie in situ

Tecnologia	Costi (FF/ton-1999) basso-alto	Commenti
Biodegradation	100 - 500	
Pump and treat	100 - 500	
Dual phase extraction		
Vacuum extraction	100 - 200	Tempo impiegato 4 - 8 mesi
Venting	2000 - 7000	
Sparging		
Stripping	150 - 300	
In asitu soli washing	200 - 600	
Sabilisatio/ solidification	150 - 12000	
Confinement	200 - 300 F/m ² 200 - 500 F/m ²	Per capping con raccolta gas Per geomembrana

Attualmente le tecniche di biodegradazione sono le tecniche innovative più frequentemente adottate per la bonifica dei suoli. I contaminanti trattati sono i composti petroliferi, gli oli pesanti e leggeri e gli idrocarburi policiclici aromatici. Il bio-venting è frequentemente associato al soil-venting per la bonifica degli idrocarburi volatili e solventi clorurati presenti nel sottosaturo.

Germania

I Lander hanno inventariato in Germania più di 300.000 siti potenzialmente contaminati.

Negli ultimi 20 anni il Ministero della Ricerca e Sviluppo ha stanziato 200 milioni di DM in circa 70 progetti per lo studio di tecnologie ed

impianti per il trattamento ex situ. Le industrie hanno investito circa 900 milioni di DM per l'installazione di impianti di decontaminazione. Attualmente esistono più di 100 impianti per il trattamento dei suoli per una capacità totale di 4 milioni di tonnellate l'anno. Lo spettro di tecnologie applicabili *on* od *off site* va da *soil washing* ai trattamenti biologici e termici.

Da un'indagine sulla gestione dei suoli contaminati in Germania condotta dall'Agenzia Federale per l'Ambiente, risulta che 85 impianti (dei 108 intervistati) hanno trattato, da 409.000 tonnellate nel 1993 a 1.8 milioni di tonnellate di suolo nel 1997. Di queste, nel 1993 circa 335.000 tonnellate sono state riciclate. Il tasso di riciclaggio raggiunge quasi il 100% (Fig.1).

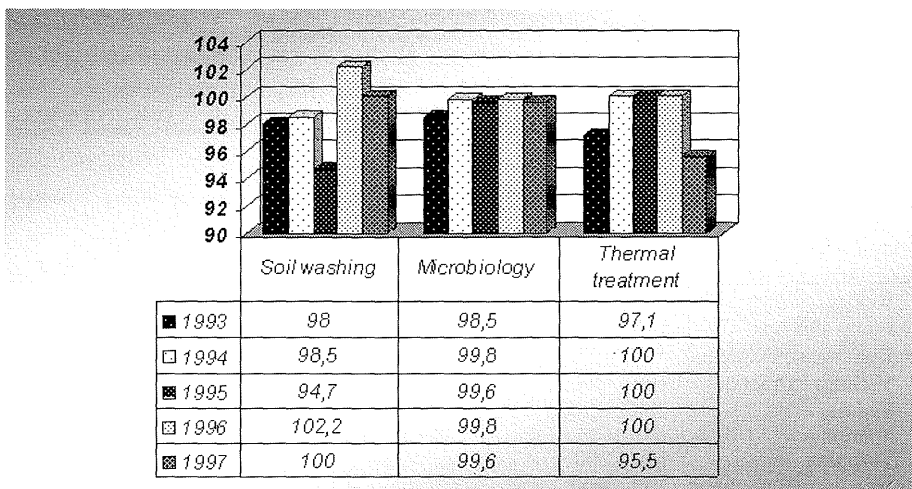


Fig. 1: Germania - Tasso di riciclaggio del suolo con tecnologie di bonifica ex situ

L'Agenzia Federale per l'Ambiente ha prodotto un database completo, TERESA 2.1 (acronimo in tedesco per "Registro delle Tecnologie per il Risanamento dei Suoli Contaminati") delle tecnologie disponibili in Germania. Questo include informazione dettagliata su 110 ditte che offrono servizi di bonifica. Le tecnologie offerte sono descritte in base alla performance individuale in funzione dei tipi di contaminanti, e all'efficacia in relazione alle condizioni del sottosuolo. Il database include anche rapporti su 680 interventi in sito e 75 diverse sostanze trattate.

Per quanto riguarda gli interventi in situ, le seguenti tecnologie sono state applicate in oltre 100 siti:

- Interventi sulla fase gassosa
- Interventi idraulici
- Trattamenti biologici del suolo

- Tecnologie elettrocinetiche
- Immobilizzazione

Le tecnologie in situ sono spesso integrate con metodi di trattamento on oppure off site. Le più comuni sono l'iniezione di agenti specifici nel suolo (NO_3 , O_2 , H_2O_2) allo scopo di attivare o mantenere i processi di degradazione biologica.

Grecia

In Grecia non esistono ditte con impianti permanenti per il trattamento ex situ dei suoli, che vengono spesso trattati all'estero. Solo 4 ditte sono autorizzate alla gestione di rifiuti pericolosi e suoli contaminati.

In alcuni casi il Ministero dell'Ambiente ha rilasciato alle industrie del cemento il permesso di trattare il suolo contaminato da creosoli e fenoli nel rotary kiln.

In generale l'informazione sulle tecnologie e su progetti a scala reale di bonifica on site o in situ è molto limitata.

Irlanda

L'EPA irlandese ha stimato la presenza di circa 2.000 siti industriali dismessi potenzialmente contaminati. Per gli interventi di risanamento è necessaria l'autorizzazione dell'EPA o dell'autorità locale sulla base dell'EPA Act e dell'IPC (Integrated Pollution Control) licensing system. Le discariche autorizzate in Irlanda non accettano rifiuti pericolosi; per tanto buona parte dei suoli contaminati viene portata all'estero per il trattamento. Recentemente una ditta irlandese ha ottenuto la licenza IPC per installare un impianto di bioremediation per il trattamento dei suoli (fino a 20.000 m³/anno) contaminati da prodotti petroliferi. Anche se l'informazione disponibile è limitata, esistono in Irlanda esperienze di bonifica biologiche e chimico-fisiche sia ex situ che in situ, condotte da una dozzina di ditte diverse.

Italia

In Italia non esistono impianti fissi per il trattamento biologico ex situ di suoli contaminati (solo un impianto per il trattamento biologico per la capacità di 20.000 t/a è stato recentemente costruito). Sono state tuttavia condotte diverse esperienze full-scale di bonifica biologica, che vengono riportate, assieme agli altri trattamenti, nella tabella seguente nella quale vengono riassunti i casi di siti bonificati o in corso di bonifica (1999-2000) condotti da 7 ditte specializzate (Golder, Aquater, Dames&Moore, ITCorp, ERM, FosterWheeler, SET Srl) (Quercia *et al.*, 2000).

Tabella 7. Tipologie degli interventi di trattamento in Italia

Totale siti bonificati o in corso di bonifica	400
Su tali siti sono state applicate le seguenti tecnologie	
Contenimento statico (barriere impermeabili e/o capping e/o discarica ad hoc)	205
Barriere di pozzi	43
Estrazione in doppia fase	49
Soil vapor extraction, Soil venting	98
Bioventing, Bonifica biologica in situ, Air Sparging	74
Bioslurping	3
Biopile	9
Landfarming	18
Desorbimento termico	4
Soil washing	3
Inertizzazione	2
Incenerimento	1
Barriere attive	3
Natural attenuation	4

Nota: 1 - Mancano diverse risposte importanti: non sono stati considerati alcuni interventi in grandi aree (P. Marghera, ecc.) quindi i dati presentati si devono considerare parziali. 2 - La sommatoria degli interventi è superiore al numero dei siti, poichè su alcuni siti sono state impiegate tecnologie integrate.

E' interessante notare che se gli interventi di contenimento e, per i metalli pesanti, l'asportazione e lo smaltimento in discariche esterne continuano ad essere le soluzioni maggiormente praticate, per gli idrocarburi, i composti aromatici e clorurati si stanno facendo strada soluzioni di intervento in situ ed on-site, principalmente di tipo biologico (bioventing, bio-sparging e composting) e fisico (soil vapor extraction).

Per quanto riguarda i programmi di ricerca, è in corso un progetto, coordinato da AREA e finanziato dal MURST, sulla sperimentazione in laboratorio e in situ di alcune tecnologie di biorisanamento per il saturo ed insaturo. Inoltre sono in corso alcuni progetti di ricerca condotti da CNR, Università di Verona e Politecnico di Milano, finanziati da MAMB ed AN-PA, su tecniche di bioremediation, fitodepurazione e processi integrati.

Olanda

In Olanda è disponibile un'informazione capillare sulla quantità dei siti contaminati e sulle priorità di intervento. Le proiezioni stimano in 100 miliardi di fiorini (50 miliardi di euro) le risorse finanziarie necessarie al risanamento. La tabella seguente elenca le tipologie ed i siti più seri ed urgenti.

Nel 1999 è stato speso circa un miliardo di fiorini per la bonifica dei suoli. Circa un terzo è a carico di imprese e privati, un terzo del governo centrale e un terzo di altri enti pubblici. Il governo ha recentemente deciso di dare un ulteriore impulso alle strategie di gestione e recupero dei

suoli, abbandonando i criteri di multifunzionalità ed accelerando le procedure autorizzative.

Tabella 8. Categorie di siti contaminati e costi dei casi urgenti in Olanda

Tipologie (urgenti)	Numeri	Costi in milioni di fiorini
1. Gasworks	234	3393
2. (Former) waste dumps	950	9975
3. Filled - in canals, ditches, etc.	1250	687
4. Former industrial sites	33600	11088
5. Current industrial sites	19200	21120
6. Petrol station	2500	315
7. Ministry of Defence sites		440
8. Netherlands Railways sites	410	3830
9. Fuel tanks	1000	30
10. Extermes cases	286	7150
11. Other Government cases	PM	PM
Totale	59430	58028

Solo una piccola percentuale dei suoli viene smaltita in discarica. Per il trattamento ex situ esistono diverse installazioni per il trattamento termico (700.000 t/a), umido (suoli e sedimenti per un totale di 1.300.000 t/a, capacità in rapida crescita) e biologico (400.000 t/a in rapida crescita).

Data la piccola scala degli interventi, la limitata distanza del trasporto e la frequente prossimità di aree costruite o residenziali, gli interventi di trattamento on site sono rari.

Sono attualmente in corso 50-100 interventi di bonifica in situ, iniziati o completati negli ultimi 5 anni. Si prevede che questo tipo di soluzione avrà un notevole sviluppo nei prossimi anni, incentivato dalla nuova strategia di risanamento.

I metodi principali applicati sono i seguenti:

Rimozione attraverso le acque sotterranee

- Estrazione di acque contaminate ed infiltrazione ("smart pump and treat");
- Estrazione in-situ;
- Electroreclamation.

Rimozione attraverso l'aria

- Estrazione dell'aria dal suolo e bioventing;
- Iniezione di aria compressa e biosparging;
- Stripping del vapore.

Rimozione per conversione

- In-situ bioremediation, per sostanze che vengono degradate in condizioni aerobiche ed anaerobiche.

Nella pratica si usano spesso strategie integrate, attraverso le quali le sostanze sono rimosse o controllate con bioscreens o degradate con metodi in situ. Secondo una recente ricerca di mercato in Olanda, in virtù della nuova policy, si stima che la bonifica biologica in situ possa risolvere il 15% dei casi. In circa il 70% dei siti la bioremediation in situ può essere associata ad altri metodi che possano controllare le sostanze difficili da degradare. Si stima che la quota di mercato della bioremediation in situ, che era del 5% nel 1998, possa crescere fino al 40% negli anni prossimi.

Norvegia

Nel 1997 sono stati registrati più di 23.350 siti contaminati, di cui 750 sono stati sottoposti ad indagini e 350 sono attualmente oggetto di interventi. Pur non esistendo statistiche specifiche, si stima che circa 100.000 tonnellate di suolo vengano trattate annualmente. Sono i progetti di edilizia nelle aree urbane che trainano le iniziative di risanamento.

Il compostaggio biologico, presso le discariche di rifiuti urbani, rappresenta oggi il trattamento più comune dei suoli contaminati. Sono disponibili 18 siti in 9 diverse città dove il suolo contaminato può essere conferito per essere sottoposto a questo processo.

Tecnologie di bonifica biologiche in situ ed ex situ/on site sono offerte da 5-10 società di consulenza e 3-5 ditte specializzate. Le tecnologie biologiche in situ disponibili sono:

- bio-venting
- bioremediation (air sparging + aggiunta di nutrienti)

Spagna

A fronte di un numero cospicuo di siti industriali potenzialmente contaminati e accertamenti condotti a livello regionale, esistono in Spagna alcune esperienze di risanamento attraverso bonifica ex situ (stabilizzazione, smaltimento, trattamenti chimico-fisici e biologici).

Tecnologie in situ sono rappresentate da interventi di confinamento ed isolamento idraulico e venting/vacuum extraction per le sostanze volatili presenti nel sottosaturo.

Svezia

La Swedish EPA ha stimato in Svezia la presenza di circa 22.000 siti contaminati.

La maggior parte degli interventi è consistito fino ad oggi nello scavo e smaltimento in discarica dei suoli, ma recentemente si è afferma-

to un mercato competitivo per cui i costi di soluzioni alternative stanno gradualmente scendendo. Per il trattamento ex situ, esistono circa 20 ditte con una capacità di trattamento di alcune centinaia di migliaia di tonnellate di suolo all'anno. Alcune offrono tecnologie on site. Tuttavia va notato che la legislazione corrente richiede dei permessi particolari per il trattamento, poiché classifica il suolo contaminato come rifiuto pericoloso. Inoltre la tassa svedese sullo smaltimento dei rifiuti non si applica ai suoli contaminati e pertanto non rappresenta un disincentivo allo smaltimento.

Tuttavia diverse discariche municipali (circa 30) possono accogliere suoli contaminati da idrocarburi che vengono trattati nei rispettivi impianti di compostaggio.

Esistono una decina di ditte svedesi più un certo numero di società di consulenza in grado di offrire tecnologie in situ quali: pump and treat, air sparging, vacuum extraction e natural attenuation. I metodi biologici in situ sono oggetto di progetti dimostrativi.

Svizzera

Non esiste una statistica dei volumi trattati ex situ in Svizzera. La gran parte del materiale è smaltito in discarica. Il suolo scavato che non rientra nei limiti normativi svizzeri, viene portato nelle miniere di sale in Germania. Va sottolineato che possono essere accettate solo le tecnologie che centrano gli obiettivi di bonifica entro un certo intervallo di tempo, al termine del quale il sito possa essere rilasciato senza controlli.

Volumi considerevoli di suolo sono trattati in impianti di trattamento termico e in due impianti di lavaggio (uno fisso ed un mobile). Inoltre esistono un certo numero di ditte che offrono trattamenti biologici ex situ, ma non sono disponibili dati precisi sulle capacità di trattamento. I contaminanti organici, come gli oli minerali, sono trattati soprattutto in impianti termici e solo subordinatamente con soil washing e bioremediation. Contaminanti organici del tipo solventi clorurati/alogenati sono trattati con tecniche in situ pump and treat o barriere reattive (ad es. funnel&gate). Altri sono trattati in impianti di incenerimento ad alta temperatura. I metalli pesanti sono trattati con metodi termici, soil washing o esportati in siti di stoccaggio in Germania.

La bioremediation in situ viene applicata principalmente per la bonifica di oli minerali e sono in corso progetti di ricerca per stimare l'evoluzione dell'attività microbica nel corso dei processi di degradazione, allo scopo di definire sistemi di monitoraggio appropriati.

UK

In UK vengono spese ogni anno circa 500 milioni di sterline per il risanamento dei siti contaminati. Le tecniche di intervento adottate sono le seguenti:

- monitoraggio
- soluzioni di ingegneria civile - scavo o contenimento
- processi in situ - termici, chimici, fisici, biologici, solidificazione/stabilizzazione
- tecniche a processi continui ex situ
- tecniche batch ex situ

L'Agenzia per l'Ambiente ha in corso la compilazione di un registro delle tecnologie di intervento adottate in Inghilterra e Galles. Le tecnologie disponibili e applicazioni a carattere commerciale adottate sono le seguenti: bioventing, composting, landfarming, biopile, solidificazione/stabilizzazione on site ed ex situ, thermal desorption, pump and treat, SVE, insitu funnel and gate, immobilizzazione in situ con argille modificate, soil washing, bioremediation ex situ, bioaugmentation, molecular bonding, ed altre.

3. Confronto dei costi delle diverse tecnologie

Sulla base delle notizie preliminari raccolte dal questionario CLARINET, nelle tabelle seguenti si riportano i costi indicativi di diverse tecnologie di risanamento sia ex situ che in situ, incluse quelle biologiche.

Tabella 9. Costi in Euro per tonnellata di suolo trattato ex situ

Trattamento	Be (Fiandre)	Dk	F	Gr	I	NI	Nor	Swe	UK
Biological	20-40 low on s.				<240	20-45			50-65
Landfarming			8-60		basso	90			
Composting		25-35	8-60				20-200	25-350 10-100	
Biopile			60-200		75-600 alto				
Bioventing				20-65					
Solvent extraction			75-150		>240				565
Soil washing			30-90	45-170	medio- alto		40-250	25-350	
Thermal desorption			40-205		80-240 medio alto			55-90	50-
Incineration			305- 1065		80-240 240-700 medio- alto		380	590	1055 1410

Phys./Chemical	30-50				
Landfilling	150-230	340-515	100-400		70/m ³
Stabilisation/ Solidification		45-170		40-250	55 vetrif.
Thermal	50-60 on s.	95-220		25-80	

Note: 1. I trattamenti hanno luogo generalmente off site a meno che non sia diversamente specificato (on s.). 2. Alcuni paesi possono aver indicato la stessa tecnologia con nomi diversi: ad.es. trattamento termico ed incenerimento. 3. m.c.: compostaggio operato da Azienda Municipalizzata.

Tabella 10. Costi in Euro per tonnellata di suolo (o acqua) trattati in situ

Trattamento	Be (Fiandre)	F	Gr	I	UK
Air Sparging	moderato	24-45		70	65-75/m ³
Soil vapor extraction	moderato		20-40	medio-alto 65-80	55-58/m ³
Bioventing	moderato		20-50	basso 25-80	
Landfarming				basso-medio basso	
Biodegradation		15-75		80-240	
Bioslurping				medio 85	
Biosparging				40	
Pump and treat		15-75		30	30-40/m ³
Dual phase extraction				medio-alto	
Vacuum extraction		15-30			
Venting/ Stripping		25-45			
Soil washing		30-90	35-155		
Stabilisation/ solidification		25-30			
Encapsulation					55-170/m ²
Active barriers				alto	
Confinement		30-75/m ²			20-40/m ²
Chemical oxidation					capping 55-110/m ³
Free-product recovery				50	10-20/m ³

4. Programmi di Ricerca, Studi Pilota e Progetti

Di seguito si descrivono brevemente gli studi pilota, i principali programmi di ricerca e progetti dimostrativi in corso. Alcuni programmi internazionali sono condivisi con partners extraeuropei.

Lo studio internazionale più ampio è il NATO/CCMS (Committee on Challenges of Modern Society) Pilot Study. Nell'ambito di questo programma un certo numero di paesi europei ed extraeuropei si confronta nella speri-

mentazione di nuove tecnologie. Lo studio comprende la valutazione di un ampio spettro di tecnologie per la bonifica di benzine, fenoli, tar, BTEX, metalli, ecc. in diverse matrici ambientali. I risultati di singoli progetti sono presentati e discussi a livello internazionale. Lo studio è ora alla terza fase con la dimostrazione di 15 diverse tecnologie sperimentate da 10 paesi diversi. I rapporti sulle fasi precedenti sono disponibili nel testo *'Evaluation of Demonstrated and Emerging Technologies for the Treatment of Contaminated Soil and Groundwater'* (1998 Annual report no 228, EPA/542/R-98/002) ed in formato elettronico (<http://www.nato.int/ccms/pilot-studies/pilot007/>).

Nel 1998 la società ADEME ha avviato in Francia un programma della durata di 4-5 anni - IRH 'Test per il trattamento dei suoli contaminati e sviluppo di nuove tecnologie'. Il programma prevede la sperimentazione di otto tecnologie diverse e otto tipi di siti/suoli contaminati. I siti contaminati considerati ospitavano (o ospitano tuttora) le seguenti attività industriali:

- Officine gas
- Stoccaggio idrocarburi
- Conservazione del legno
- Attività minerarie
- Trattamento di superfici
- Industrie metallurgiche
- Rigenerazione di solventi
- Contaminazioni accidentali da PCB

Le tecnologie di trattamento considerate sono:

- Separazione fisica dei contaminanti
- Estrazione chimica - lavaggio con solventi organici
- Estrazione in pressione - venting
- Stabilizzazione
- Trattamento termico
- Trattamento biologico (biodegradazione di composti organici, lisciviazione e immobilizzazione di metalli pesanti)
- Lavaggio con surfattanti
- Fitodepurazione di metalli pesanti

Nella sperimentazione sono coinvolti diversi laboratori che, in base ad un programma di sperimentazione coordinato, ricevono i campioni di suolo contaminato. Ogni laboratorio applica una tecnica di bonifica, sulla base di test di caratterizzazione. I protocolli e le metodologie adottate vengono presentati insieme ai risultati ottenuti. A questa fase sperimentale se-

gue una fase di validazione condotta in collaborazione con le industrie specializzate nel trattamento del suolo.

Sono in corso inoltre diversi programmi di ricerca per lo sviluppo di tecniche di bioremediation adatte a degradare sostanze recalcitranti quali IPA e PCB e per lo sviluppo di nuove tecniche di trattamento come le reactive barriers, supercritical extraction ed electromitigation.

In **Germania** il Ministero per l'Educazione e la Ricerca ha lanciato nel 1990 un programma di otto anni per sperimentare e valutare nuove tecnologie di bonifica direttamente in campo. Lo scopo è quello di dare impulso all'uso effettivo di tecniche innovative e di valutarne i risultati e l'efficacia nel lungo termine. Il programma è articolato in 13 progetti dimostrativi per un costo totale di 250 milioni di DM.

Nel 1995 lo stesso Ministero, insieme al Ministero dell'Ambiente del Baden-Wurttemberg, ha dato vita al progetto VEGAS per la ricerca sui metodi di bonifica del sottosuolo. VEGAS rappresenta un centro di ricerca in cui i metodi di risanamento sono testati in vasche di ampie dimensioni dai 30 ai 790 m³. I progetti principali riguardano le tecniche di bonifica idraulica, il trattamento di NAPL nell'insaturo, la bonifica di IPA e la trasformazione di contaminanti per riduzione. Al progetto partecipano vari istituti di ricerca, industrie e società di servizi.

Per quanto riguarda la bioremediation recentemente sono stati fatti notevoli progressi ed è stato costituito un Gruppo di Ricerca interdisciplinare sui 'Processi di Bioremediation del Suolo' che ha sviluppato 7 programmi di collaborazione tra vari istituti comprendenti più di 30 singoli progetti. Questo gruppo interdisciplinare lavora allo sviluppo di processi di bioremediation innovativi. Alla fase di laboratorio segue una fase in condizioni operative in cui viene sperimentata l'efficacia del metodo e monitorata la performance con metodi che vanno oltre le analisi chimiche convenzionali. I risultati di questo programma, che saranno a breve disponibili in un manuale, contribuiranno notevolmente ad una applicazione più ampia della bioremediation in Germania.

Dal 1994 è in corso il programma BOMB relativo a 'Metodi di decontaminazione biologica del suolo'. Consiste di oltre 40 singoli progetti relativi allo studio di batteri e funghi e piante erbacee e arbustive per la distruzione o rimozione di composti organici come TNT, nitrofenoli, amine aromatiche, fenoli e diossine. I metodi sviluppati sono ora testati a scala commerciale; la sperimentazione include la degradazione di composti tipici degli esplosivi nel sito 'Tanne' nei pressi di Clausthal-Zellerfeld.

In generale le frontiere della ricerca sono rappresentate da nuove tecniche di bioremediation dei suoli, dalle barriere per il risanamento degli acquiferi, incluse quelle reattive permeabili, e dall'attenuazione naturale. Per quanto riguarda il trattamento in situ degli acquiferi, notevoli progressi si stanno registrando nell'impianto pilota SAFIRA a Bitterfeld. Sul sito, contaminato da una miscela di sostanze, soprattutto idrocarburi clorurati, sono stati costruiti otto diversi reattori che sperimentano tecnologie diverse di bonifica, alcune delle quali si avvalgono di reazioni di degradazione biologica.

Il programma per la Bioremediation In-Situ (*NOBIS*) lanciato in **Olanda** è iniziato nel 1995. E' una iniziativa di collaborazione tra circa 100 soggetti pubblici e privati. Sono in corso circa 100 progetti - 25 progetti di ricerca, 50 studi di fattibilità, 25 progetti esecutivi - con un budget annuale di 4 milioni di dollari per la durata di 5 anni.

Da quando i Paesi Bassi hanno abbandonato il metodo puramente 'tabellare' per definire la qualità accettabile dei suoli, è iniziata una ricerca di metodologie di bonifica efficaci dal punto di vista economico. *NOBIS* punta pertanto allo studio di tecnologie di risanamento economiche in funzione di esigenze sito-specifiche e focalizzate alla riduzione dei rischi piuttosto che alla riduzione delle concentrazioni.

Uno studio di mercato ha dimostrato che la bioremediation in -situ può svolgere un ruolo importante nella soluzione del 70% dei casi di bonifica dei suoli. Nel 15% dei casi la bioremediation offre la soluzione totale. Questa considerazione implica che molto spesso è necessario integrare più tecniche.

Le soluzioni di risanamento sperimentate, e spesso applicate a larga scala, prevedono costantemente la partecipazione dei soggetti interessati ed un attento inserimento nei programmi di riqualificazione e pianificazione territoriale.

Nell'ambito del programma *NOBIS* è stato sviluppato il Sistema di Supporto alle Decisioni *REC* - Risk reduction, Environmental merit and Costs - per la valutazione e la scelta delle alternative di bonifica. Oltre all'analisi di rischio, il sistema tiene conto dei seguenti fattori:

- Il fattore 'tempo'
- La capacità autodepurativa del suolo
- La stimolazione dei processi naturali
- La bonifica intensiva in situ se necessaria

In **UK** nel 1997 si è costituito il consorzio ExSite supportato dai più importanti soggetti britannici operanti nel campo del risanamento del territorio, dal settore pubblico, privato ed accademico. ExSite finanzia progetti per lo sviluppo e sperimentazione di tecnologie di bonifica a scala di campo per supportare il riutilizzo pratico e sicuro di siti post-industriali. I progetti sono volti al recupero e rivitalizzazione del territorio attraverso:

- il riutilizzo dei materiali bonificati;
- la garanzia di un riutilizzo produttivo e commerciale del territorio come parte integrante del processo di risanamento;
- la dimostrazione del potenziale commerciale di tecniche di recupero di siti post-industriali.

ExSite opera come un'organizzazione di ricerca applicata e include tra i suoi membri BG, Shell, VHE, British Steel, the Welsh Development Agency, Parkman Environment, Shanks Waste Solutions, L'Agenzia per l'Ambiente, il Ministero dell'Ambiente e Trasporti - DETR -, Barclays ed il Transport Research Laboratory. Queste organizzazioni sono tutte interessate al recupero e riutilizzo dei brownfields, che rappresenta un obiettivo di sviluppo prioritario in UK come in altri paesi europei.

Inoltre in UK si è costituito il consorzio pubblico/privato CLAIRE che include i seguenti soggetti:

- responsabili delle normative e strategie di governo
- legislatori
- industrie
- organismi di ricerca
- produttori di tecnologie

CLAIRE mette a punto strategie di ricerca, supporta il finanziamento di progetti specifici ed elabora programmi educativi e dimostrativi.

CLAIRE fornisce un terreno di incontro tra i principali soggetti che operano sul risanamento ed ha lo scopo di catalizzare lo sviluppo di tecniche efficaci per le bonifiche sostenibili. CLAIRE ha creato un network tra isiti contaminati in UK, rappresentativi di diverse realtà industriali:

- Impianti di estrazione e lavorazione del carbone • Officine gas • Ferrovie
- Impianti petrolchimici • Siti contaminati da solventi

Di seguito si presenta una tabella riassuntiva dell'applicazione delle tecnologie di risanamento in situ in Europa, con particolare riguardo ai progetti di ricerca e pilota, ma anche agli interventi full-scale.

Tabella 11. Diffusione delle tecnologie in situ in Europa

Technology	R&D	Pilot	Demonstration	Commercial/full scale
Bioventing	DK, NL		DK, SF	DK, B, F, G, EI, I, N, UK
Soil vapor Extraction (SVE)	DK, NL	UK, F, A	DK, D	DK, B, F, SF, G, EI, N, E, S
Air sparging/ biosparging	NL		DK	DK, B, F, EI, I, N, S
Dual phase extraction				DK, NL, F, EI, I
Bioslurping			NL, D, A	EI
Steam stripping		D	DK	DK, NL, F, SF
Biostimulation	DK, NL, D, A	DK, NL, D, A	NL, D, A	D, B, SF, EI, N, CH, UK
ORC		DK, D, EI		DK, UK
Soil washing/flushing		D, I		DK, F, G
Electro kineticiscs	DK, NL	DK, NL	DK, NL, S	D, NL, F
Electrical hesating		SF DK		
Phytoextraction	DK, NL, B UK, F, D	DK, F, B, UK, EI	DK	F, EI
Phytostabilization	DK, NL		DK	
Permeable Reactive Barriers (PRB)	DK, D, UK, A	D, NL, SF, G	DK, D, NL, I	DK, D, F, EI, CH, UK
Encapsulation/ containment	D	D, A	D, E	DK, D, F, B, SF, EI, I, E CH
Solidification		UK, EI		D, SF, G, UK
Stabilisation/ immobilisation		D, F, A, B, G	NL, I	D, B, F, SF, G
Biostabilisation	D			
Chemical oxidation	DK, D, SF	F, I, EI	DK, S	DK, D, EI, N
Thermal desorption			DK	F
Hydraulic fracturing	DK		DK	D
Hydraulic containment				
P&T	DK, NL, D		DK	DK, D, B, SF, EI, S, CH, UK
Monitored Natural Attenuation (MNA)	DK, D, NL	UK, A, EI	DK, NL, I	DK, NL, F, EI, S

5. Osservazioni

L'ipotesi di partenza dell'indagine del GdL, era che le azioni di risanamento del suolo fino ad oggi condotte in Europa si fossero avvalse principalmente di metodi ex-situ. Questi includono la rimozione e smaltimento del suolo e trattamenti on site ed off site. I metodi in situ e l'attenuazione naturale sono applicati di rado, e quasi esclusivamente nell'ambito di progetti pilota e dimostrativi. I rigorosi requisiti per il monitoraggio della performance di queste tecnologie, possono rappresentare un vincolo nei confronti dello sviluppo e più ampia applicazione delle tecnologie in-situ. L'indagine si ripropone di verificare se questa ipotesi è valida.

Le osservazioni che seguono si basano su informazioni non an-

cora complete e la gran parte delle risposte ricevute si basa su stime e solo in pochi casi derivano da analisi statistiche condotte a livello nazionale.

Sulla base dei dati fin qui raccolti, la soluzione più comune per il risanamento dei siti contaminati sembra essere una qualche forma di contenimento, sia fisico che idraulico. In seconda battuta, e per alcuni paesi la soluzione più frequente, si ricorre allo scavo del suolo contaminato. Il suolo rimosso può essere trattato o smaltito in discarica. Qui si registra una chiara differenza tra i paesi che possiedono un mercato florido per il risanamento del suolo, in cui il suolo asportato viene generalmente trattato in un impianto, e quelli senza un mercato fiorente nei quali il suolo è portato in discarica. Va sottolineato che in alcuni paesi quest'ultima soluzione è attualmente l'unica mentre in altri il mercato delle soluzioni di bonifica ed innovative inizia a svilupparsi.

Viceversa, nei paesi in cui si è stabilito un mercato delle bonifiche dei suoli, esiste un intero spettro di metodi di trattamento. I più comuni di questi metodi sono quello termico ed il lavaggio del suolo. Nella maggior parte dei paesi i trattamenti off site sono più frequenti di quelli on site.

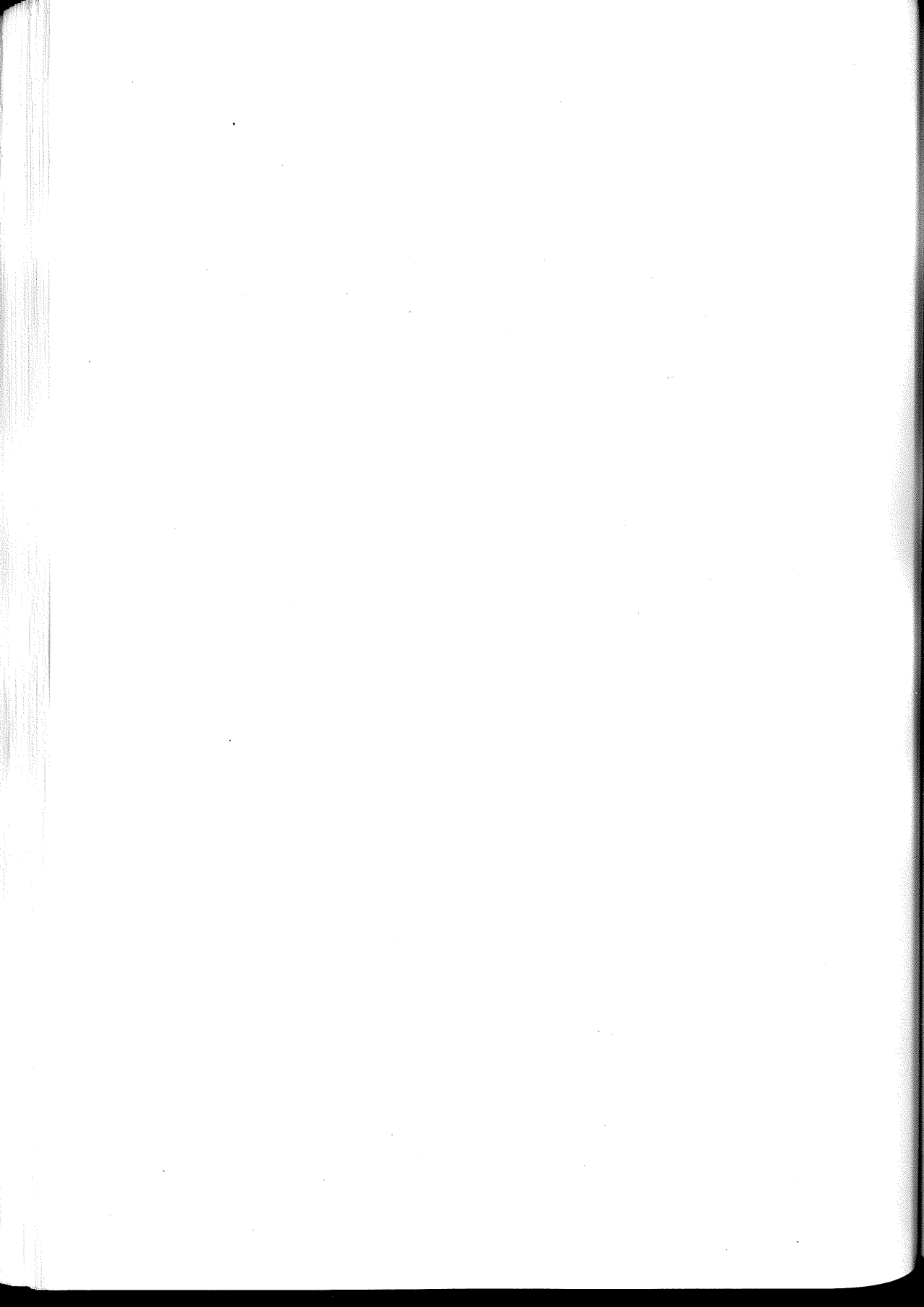
Sembra che solo in pochi paesi gli interventi in situ, diversi dal contenimento, rappresentino una vera alternativa allo scavo. I metodi in situ più frequentemente citati nel sondaggio sono il soil venting (soil vapor extraction), air sparging, bioventing e biodegradation.

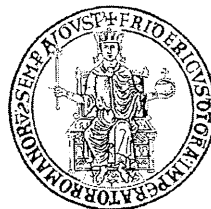
Il trattamento biologico in situ o ex situ, sembra essere di gran lunga il vero metodo di bonifica auspicato ed utilizzato in Europa, ed intravisto come soluzione sostenibile in grado di sostituire a regime le tecniche tradizionali.

Bibliografia

VICK E., CLARINET WG7 Catalogue 'Remediation Technology for Europe', 7th Draft Document, October 2000

QUERCIA F, MARIOTTI C., NOCENTINI M., *Stato dell'arte della bonifica dei siti contaminati in Italia*, Acqua&Aria, gennaio 2000



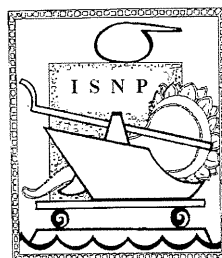


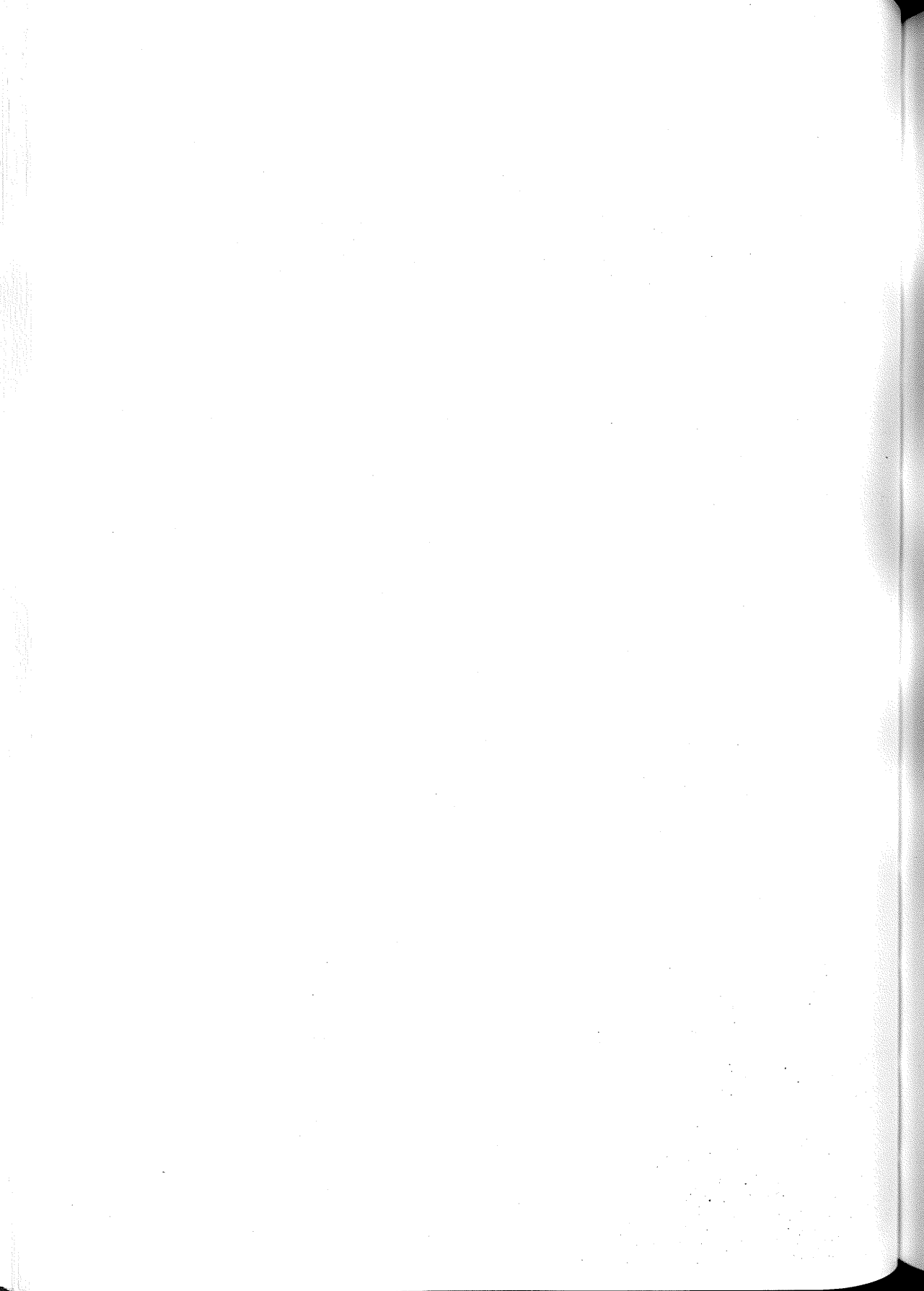
La "bioremediation" in Italia: dalla teoria alla pratica

Sessione 3:

La pratica

ENEA





TRATTAMENTO BIOLOGICO DI SITI INDUSTRIALI: DALLA SPERIMENTAZIONE ALL'APPLICAZIONE IN CAMPO

Antonella Bernardi¹, Andrea Robertiello²

¹ EniChem - Centro Ricerche Novara "Istituto Guido Donegani"
Dipartimento di Tecnologie Ambientali
Via Fauser, 4 - 28100 Novara

² EniTecnologie S.p.A.
Monterotondo (Roma)

Introduzione

La contaminazione dei terreni e delle acque sotterranee, comune a tutti i paesi sviluppati, è una problematica trasversale, seppure con diversa rilevanza, a tutti i settori industriali.

Già nei primi anni '80, a seguito dell'introduzione di normative sempre più specifiche e stringenti, sono state sviluppate, prevalentemente negli Stati Uniti ed in alcuni stati europei (Olanda, Germania) tecnologie e metodi per la bonifica di siti (suoli ed acque sotterranee) cronicamente o accidentalmente contaminati. L'Italia, dove questa problematica ambientale è emersa nella sua reale e non trascurabile consistenza solo da pochi anni, si sta allineando rapidamente con gli altri Paesi attraverso una serie di azioni parallele, ma interconnesse:

- introduzione di strumenti normativi cui far riferimento (D.L. 22/97, D.L. 471/99)
- partecipazione a networks europei quali CLARINET (Contaminated Land Rehabilitation Network for Environmental Technologies in Europe) o NICOLE (The Network for Industrially Contaminated Land in Europe) dove poter definire/acquisire standard comuni di gestione dei problemi ambientali
- potenziamento della ricerca
- sviluppo di una cultura tecnologica adeguata

L'Industria, gli Enti Pubblici e le Università sono tutti, ciascuno per le proprie competenze, protagonisti di questo processo di allineamento.

In questo contesto va ricordato il ruolo fondamentale dell'industria chimica interessata a sistematizzare ed ottimizzare il proprio sforzo di ricerca, confrontandosi con altri "problem owner" per migliorare il proprio know-how scientifico e tecnologico in merito ai processi di risanamento, sviluppando tecnologie oltre che efficaci anche a basso impatto ambientale e costi sostenibili.

Un consistente numero di tecnologie di risanamento sono state sviluppate a livello di laboratorio e poi validate, solo in parte, in campo e si basano su processi riconducibili essenzialmente a tre principali categorie: chimici, fisici e biologici.

All'interno di questi macroaccorpamenti, sono state poi perseguite soluzioni le più diverse, peraltro sempre riconducibili a tipologie applicative relative ad operazioni *in situ* (senza rimozione del terreno) o *ex-situ* (che prevedono oneri aggiuntivi costituiti da escavazione, trasporto ed eventuale ripristino del terreno rimosso).

Da alcuni anni i processi di tipo biologico, conosciuti come approcci di "bioremediation", sono andati acquisendo maggiore attenzione e risorse di Ricerca e Sviluppo.

I motivi che stanno alla base del successo di questa disciplina, si possono così riassumere:

- buon grado di accettabilità da parte dei cittadini e quindi dell'interlocutore pubblico di controllo
- ottimale compromesso tra efficienza di rimozione e costi di bonifica
- particolare adattabilità della tecnologia alle applicazioni *in situ*, che comportano una ovvia riduzione dei costi
- basso impatto ambientale delle operazioni di bonifica
- soluzione definitiva al problema poichè i contaminanti vengono generalmente mineralizzati.

In questo articolo, come esempio di risultato di questa tendenza, si illustra l'approccio metodologico e sperimentale sviluppato per l'applicazione di un intervento di bioremediation ad un sito industriale contaminato.

Protocollo di fattibilità della bioremediation

In presenza di un sito che si sospetta inquinato da sostanze potenzialmente biodegradabili, è opportuno svolgere uno studio di fattibilità di

un intervento di bioremediation che deve prevedere due fasi:

1. approfondire il livello di conoscenza del problema
2. attivare una fase sperimentale di laboratorio mirata al sito.

Il risultato finale identifica il processo di biorisanamento più idoneo.

1. Approfondire il livello di conoscenza del problema, tenendo conto di quanto ora previsto dal D.L. 471/99 in termini di caratterizzazione di un sito, vuol dire acquisire il maggior numero di informazioni relativamente:

- al sito, in particolare la sua geologia e idrogeologia
- ai contaminanti in termini di
 - distribuzione verticale ed orizzontale degli inquinanti definendo una mappa di distribuzione sia nei suoli sia nella falda. Le difficoltà tecniche che a questo livello emergono sono la rappresentatività del campionamento e la standardizzazione delle analisi
 - caratterizzazione delle principali proprietà chimico-fisiche (solubilità, volatilità, ripartizione solvente organico-acqua, adsorbimento). Questi parametri giocano, infatti, un ruolo fondamentale in quasi tutte le fasi che compongono il programma di bonifica. Molte sono le banche dati disponibili per la conoscenza delle suddette proprietà, ma poche di esse sono affidabili e complete
 - definizione delle principali proprietà biologiche (tossicità, biodegradabilità e processi metabolici dei contaminanti organici oggetto di studio), fondamentali per valutare l'efficacia e l'efficienza di applicazione di una tecnica di trattamento di tipo biologico

- ad eventuali processi di Natural Attenuation (NA) cioè fenomeni di tipo chimico, fisico e biologico che avvengono spontaneamente nel suolo in questione e che determinano l'abbattimento dei contaminanti nel tempo: in caso di disponibilità di informazioni pregresse, si studia la correlazione tra andamento della concentrazione degli inquinanti e dei parametri di attività microbica (anaerobici ed aerobici: O₂ disciolto, CO₂, solfati, solfiti, nitrati, nitriti, ferro nei diversi stati di ossidazione, ecc.).

Recentemente (1998) la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) ha redatto un protocollo relativo alla NA dei solventi clorurati, mediante il quale standardizzare la metodologia. Sempre l'EPA ha pubblicato semplici modelli di simulazione dei processi di NA come BIOSCREEN (1996), ri-

volto alla gestione di contaminazioni da BTEX, e BIOCHLOR (1999), specificamente destinato alle contaminazioni da solventi clorurati.

2. L'esecuzione di una fase sperimentale serve infine a verificare le "potenzialità" di un approccio biologico di risanamento.

Essa prevede:

- la caratterizzazione microbiologica del sito al fine di evidenziare la presenza di popolazioni microbiche autoctone in grado di degradare i contaminanti (contenute "inquinante-ossidanti", isolamenti, ecc)

- la sperimentazione su scala microcosmo (<100 g di campione): verifica della biodegradabilità degli inquinanti a carico delle popolazioni microbiche autoctone o alloctone in differenti condizioni sperimentali (con variazione di ossigeno, temperatura, pH, ammendanti, ecc.); sono utili anche i test respirometrici

- la simulazione su scala macrocosmo (0.1÷10 kg di suolo) per consentire l'identificazione dei parametri fondamentali al passaggio di scala successivo

- lo scale-up (impianto pilota)

Un caso reale

Come esempio di applicazione dell'approccio descritto al paragrafo precedente, viene illustrato un progetto di bioremediation, realizzato in un sito industriale.

L'intervento riguarda un terreno di circa 20.000 m² che, originariamente, consisteva in una depressione naturale con un fondo di torba impermeabile, poi utilizzato come vasca di neutralizzazione delle acque dello Stabilimento ed infine riempita con materiali di riporto di varia natura. Dagli anni '90 l'area è stata oggetto di numerose ricerche per meglio caratterizzarne il profilo geologico, idrogeologico, chimico e biologico.

Sondaggi eseguiti all'interno di tale area (n° 60 a carotaggio continuo), hanno evidenziato la presenza di idrocarburi aromatici, soprattutto benzene, etilbenzene e cumene sia nel terreno che nella falda sottostante.

Messa in sicurezza dell'area

La prima misura finalizzata a bloccare l'esportazione della contaminazione è stata la messa in sicurezza dell'area mediante la realizzazione di una barriera idraulica costituita da 8 pozzi di emungimento.

mento ad una profondità di 20 m.

E' stata inoltre realizzata una ricopertura impermeabile della zona con un manto di argilla (per impedire l'infiltrazione delle acque meteoriche ed il conseguente dilavamento dei contaminanti).

Il monitoraggio della qualità delle acque posteriore alla messa in sicurezza ha evidenziato una diminuzione della concentrazione di idrocarburi aromatici.

Intervento di bonifica

Secondo il protocollo di fattibilità della bioremediation sopra descritto, si distinguono le seguenti fasi:

1. La prima fase dell'intervento di bonifica è consistita in una accurata caratterizzazione (site assessment) dell'area i cui risultati conclusivi sono riassunti di seguito:

- lo spessore dei materiali di riporto è di ~ 4-7 m
- alla loro base sussiste uno strato di limi torbosi dello spessore di 0,2 - 1,5 m

- al di sotto del livello torboso è presente un letto di sabbia, spesso 10-12 m, entro il quale scorre la falda con soggiacenza variabile tra 2 e 7 m dal piano campagna

- il livello sabbioso poggia sopra un banco di limi argillosi e sabbiosi di spessore 2-8 m

- i materiali di riporto contengono acque stagnanti idraulicamente indipendenti dalla falda sottostante

- il terreno di riempimento è inquinato da idrocarburi aromatici

- lo strato sabbioso ove scorre la falda non è inquinato da idrocarburi aromatici che sono invece presenti in soluzione nelle acque

2. La seconda fase ha verificato le potenzialità biologiche autoctone:

- all'interno del terreno contaminato sussistono condizioni compatibili con la vita di microrganismi dotati di attività degradative nei confronti dei contaminanti organici (pH leggermente alcalino, presenza di azoto e fosforo, salinità non eccessiva)

- le analisi microbiologiche hanno indicato la presenza di microrganismi appartenenti a diversi gruppi trofici (solfato riduttori, denitrificanti, idrocarburo-ossidanti).

Un tale quadro del sito ha orientato la sperimentazione verso la verifica di fattibilità di una bonifica per biorisanamento (bioremediation) *in situ* (senza movimentazione del suolo inquinato).

Sono stati così allestiti centinaia di microcosmi, per lo studio delle numerose variabili coinvolte nei complessi fenomeni biodegradativi e per l'individuazione del gruppo trofico più indicato.

In particolare sono state osservate le cinetiche di degradazione dei contaminanti in condizioni aerobiche (idrocarburo-ossidanti), anossiche (denitrificanti) ed anaerobiche (solfatoriduttori).

Sulla base dei risultati ottenuti e delle indicazioni fornite dal site assessment la tecnica del biosparging è sembrata la più adatta per l'area in questione in quanto:

- bonifica biologica operante *in situ*
- nell'area sono presenti popolazioni microbiche idrocarburo-ossidanti in grado di metabolizzare gli inquinanti target
- le caratteristiche idrogeologiche del sito sono favorevoli all'immissione di aria e nutrienti necessari a promuovere una più rapida cinetica di abbattimento degli inquinanti
- i costi si possono ritenere sostenibili.

La tecnica di "biosparging" ha lo scopo di favorire la degradazione aerobica dei microrganismi idrocarburo-ossidanti, già selezionati nel terreno in modo da mineralizzare i composti idrocarburi presenti. Tali processi di degradazione hanno tuttavia richiesto di ottimizzare le concentrazioni di ossigeno e/o nutrienti (azoto e fosforo) al fine di ridurre i tempi di trattamento. A causa dell'eterogeneità del sottosuolo (geologica, idrogeologica, di "nicchia ecologica" e microbiologica) è stato opportuno definire tali parametri di processo mediante la realizzazione di due impianti dimostrativi operanti in campo (impianti pilota), ubicati in siti di differente caratterizzazione e aventi configurazione diversa.

Con il primo impianto si è mirato a dimostrare la possibilità di biorisanare un terreno prevalentemente sabbioso, quindi con buona permeabilità (campo B); con il secondo si è previsto di bonificare gli strati di fanghi neri (e bianchi) caratterizzati da permeabilità scarsa (campo A).

Entrambi gli impianti hanno trattato il suolo fino alla profondità di circa 6 m e hanno evidenziato:

- crescita microbica autoctona
 - consumo di nutrienti
 - abbattimento degli inquinanti
-

Un tale quadro del sito ha orientato la sperimentazione verso la verifica di fattibilità di una bonifica per biorisanamento (bioremediation) *in situ* (senza movimentazione del suolo inquinato).

Sono stati così allestiti centinaia di microcosmi, per lo studio delle numerose variabili coinvolte nei complessi fenomeni biodegradativi e per l'individuazione del gruppo trofico più indicato.

In particolare sono state osservate le cinetiche di degradazione dei contaminanti in condizioni aerobiche (idrocarburo-ossidanti), anossiche (denitrificanti) ed anaerobiche (solfatoriduttori).

Sulla base dei risultati ottenuti e delle indicazioni fornite dal site assessment la tecnica del biosparging è sembrata la più adatta per l'area in questione in quanto:

- bonifica biologica operante *in situ*
- nell'area sono presenti popolazioni microbiche idrocarburo-ossidanti in grado di metabolizzare gli inquinanti target
- le caratteristiche idrogeologiche del sito sono favorevoli all'immissione di aria e nutrienti necessari a promuovere una più rapida cinetica di abbattimento degli inquinanti
- i costi si possono ritenere sostenibili.

La tecnica di "biosparging" ha lo scopo di favorire la degradazione aerobica dei microrganismi idrocarburo-ossidanti, già selezionati nel terreno in modo da mineralizzare i composti idrocarburi presenti. Tali processi di degradazione hanno tuttavia richiesto di ottimizzare le concentrazioni di ossigeno e/o nutrienti (azoto e fosforo) al fine di ridurre i tempi di trattamento. A causa dell'eterogeneità del sottosuolo (geologica, idrogeologica, di "nicchia ecologica" e microbiologica) è stato opportuno definire tali parametri di processo mediante la realizzazione di due impianti dimostrativi operanti in campo (impianti pilota), ubicati in siti di differente caratterizzazione e aventi configurazione diversa.

Con il primo impianto si è mirato a dimostrare la possibilità di biorisanare un terreno prevalentemente sabbioso, quindi con buona permeabilità (campo B); con il secondo si è previsto di bonificare gli strati di fanghi neri (e bianchi) caratterizzati da permeabilità scarsa (campo A).

Entrambi gli impianti hanno trattato il suolo fino alla profondità di circa 6 m e hanno evidenziato:

- crescita microbica autoctona
 - consumo di nutrienti
 - abbattimento degli inquinanti
-

I dati ottenuti dalla gestione dei due impianti per sei mesi hanno permesso di formulare un piano di biorisanamento in due fasi che prevede la realizzazione, per ciascuna fase, di due moduli di trattamento contemporanei, ognuno di 5000 m².

Un "modulo di trattamento" è caratterizzato da tre sezioni:

1. compressione e distribuzione aria
2. preparazione e distribuzione dei nutrienti
3. immissione aria e nutrienti nel terreno.

In particolare la sezione n° 3 è costituita da 150 puntazze infisse nel terreno, fino alla profondità di 6 m, e poste ai vertici di un triangolo equilatero ad una distanza reciproca di ca. 6 m in modo da interessare un'area di trattamento di ca. 5000 m²; tale configurazione deriva dalle esperienze dei campi dimostrativi per i quali erano state adottate distanze reciproche fra le puntazze rispettivamente di ca. 3 m e ca. 10 m.

Le puntazze sono collegate ai circuiti di distribuzione dell'aria e dei nutrienti.

Per la distribuzione dell'aria sono stati realizzati 5 circuiti chiusi collegati fra loro; inoltre, per migliorare la distribuzione alle varie puntazze di immissione, i circuiti del primo modulo sono collegati ai 5 circuiti del secondo campo in modo da formare una maglia.

La regolazione delle portate d'aria sulle singole puntazze è effettuata utilizzando i misuratori di portata mobili già usati nel corso della sperimentazione.

Anche per la distribuzione dei nutrienti sono stati realizzati 5 circuiti chiusi alimentati, in maniera indipendente, da altrettante pompe dosatrici; l'immissione nel terreno è effettuata tramite collegamenti, dotati di valvole, con le puntazze di immissione aria.

Per controllare i risultati ottenuti nel tempo dalla gestione dei due moduli di biorisanamento è stato attuato un programma di monitoraggio delle acque sotterranee e dei terreni.

All'interno dell'area trattata, 23 punti di monitoraggio del suolo e 12 punti di monitoraggio dell'acqua hanno consentito di seguire l'andamento della bonifica.

I controlli sono stati effettuati con frequenza bimestrale sulle acque e con frequenza pressoché trimestrale nei terreni di riporto e sul terreno contaminato.

Per completare il quadro analitico relativo alla qualità del suolo, dopo due anni di trattamento si è provveduto a prelevare, tramite carotaggi a 6 m di profondità, altri 10 campioni di terreno indisturbato.

Conclusioni

Dopo due anni di gestione della bonifica si conclude:

1. la zona inizialmente contaminata è stata posta in condizioni di perfetta sicurezza
2. tutti i contaminanti organici (benzene, toluene, etilbenzene, xileni, cumene, stirene) sono risultati abbattuti con efficienze variabili comunque stimabili con un minimo di circa il 20% per gli xileni ed un massimo di circa il 75% per il toluene
3. Sulla base di stime, può essere quantificato un abbattimento complessivo di solventi aromatici nell'area trattata dell'ordine di 7-8 tonnellate.

Sulla base delle positive evidenze raccolte nel corso dell'esecuzione del lavoro, è risultato opportuno estendere il metodo di biorisanamento utilizzato alla restante parte dell'area da bonificare.

I MUSCHI ACQUATICI UTILIZZATI COME INDICATORI E ACCUMULATORI DI METALLI: LIMITI E VANTAGGI

Roberto Michele Cenci

Commissione Europea, Centro Comune di Ricerca
Istituto dell'Ambiente

TP 730 - 21020 Ispra (VA)

Riassunto

Gli organismi biologici, in particolar modo i vegetali, possono essere impiegati nel monitoraggio dell'inquinamento sia come bioindicatori sia come bioaccumulatori.

L'esperienza effettuata con il muschio acquatico, appartenente alla specie *Fontinalis antipyretica* ha permesso una diagnosi precisa in merito alla qualità delle acque lacustri e fluviali.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che in *Fontinalis antipyretica* l'accumulo dei contaminanti avviene in tempi brevi (poche ore, giorni), mentre per il rilascio occorrono alcuni mesi.

Contestualmente alle capacità di controllo, il muschio ha accumulato nel periodo di 28 giorni una massa totale, per tutti gli elementi considerati, pari a 4 g kg^{-1} di muschio secco.

Abstract

AQUATIC MOSSES USED AS INDICATORS AND ACCUMULATORS OF HEAVY METALS: LIMITS AND ADVANTAGES

Living organism, especially vegetables, can be used to monitor environmental pollutants either as bio-indicators or bio-accumulators.

This project, using aquatic mosses of the species *Fontinalis antipyretica*, allowed an accurate diagnosis of water quality in lakes and rivers.

The results showed that *Fontinalis antipyretica* had the ability to accumulate great amounts of trace elements in a short time (few days and/or few weeks), whereas the release occurred in medium time (few months).

Aquatic mosses, in a period of 28 days, accumulated a total mass, for all considered elements, of 4 g kg^{-1} (dry weight).

Key words: *bio-accumulation, fresh water, aquatic mosses, heavy metals*

Introduzione

Gli studi sulla contaminazione di ecosistemi acquatici spesso devono prendere in considerazione tanto i compartimenti abiotici (acque e sedimenti), che quelli biotici (organismi animali e vegetali).

Ciascuno dei differenti compartimenti può offrire utili indicazioni circa origine, destino e intensità della contaminazione, ma allo stesso tempo il compartimento soffre di determinati svantaggi.

L'acqua, ad esempio, specialmente negli ambienti fluviali, offre solo indicazioni «istantanee» e una corretta valutazione richiede pertanto un prolungato sforzo di campionamento per integrare nel tempo tali informazioni.

La fase solida presente nell'acqua, per il suo maggiore tempo di permanenza, è già un indicatore migliore, ma anche i sedimenti ed il particolato pongono problemi di rappresentatività del campionamento e di interpretazione dei risultati.

Gli organismi viventi, generalmente, possono essere considerati come bioindicatori, tra quelli utilizzati si possono ricordare:

animali

- acelomati e pseudocelomati
- molluschi
- anellidi
- artropodi
- pesci

vegetali

- fitoplancton
- briofite
- tracheofite

Per quanto concerne l'uso di compartimenti biologici quali mezzi diagnostici dell'inquinamento ambientale, una prima distinzione va operata tra organismi mobili e organismi sessili.

I primi, rappresentati da vari gruppi animali, proprio per la loro capacità di spostarsi pongono difficoltà interpretative in quanto sussiste l'impossibilità di appurare se e quanto una loro contaminazione è realmente indicativa di un'analogha contaminazione del sito ove sono stati raccolti.

Inoltre, fisiologia e metabolismo sono spesso controllati da sesso, età, periodo stagionale, ecc., nonché dalla posizione dell'organismo nella catena trofica e dalle interazioni con gli altri organismi con i quali convive.

Tra i vegetali, il fitoplancton soffre degli stessi svantaggi sopra accennati e, per la maggior parte dei corsi d'acqua, è una componente trascurabile. I secondi rappresentati principalmente dalle tracheofite, a causa della stretta dipendenza dal substrato, offrono una risposta di tipo misto, in quanto possono alternativamente accumulare contaminanti dal mezzo liquido e da quello solido.

Le briofite, al contrario, sembrano offrire un integratore biologico con notevoli vantaggi:

- l'assenza di vere radici e sistemi vascolari specializzati permette di trascurare completamente l'influenza del substrato e di porre in relazione l'accumulo esclusivamente con la quantità delle acque (Smith, 1978; Thomas, 1979);

- le briofite sono ubiquitarie nell'emisfero nord, ed anche in caso di assenza sono facilmente trasferibili da un luogo ad un altro (bioindicatori attivi) così da permettere lo studio di corsi d'acqua molto differenti tra loro (Mouvet, 1984 c);

- la variabilità nella composizione chimica di esemplari raccolti all'interno di una popolazione solitamente non supera il 20% per elementi quali: Cd, Pb, Hg, Cu e Zn (Empain, 1977);

- l'accumulo dei contaminanti avviene in tempi rapidi (da poche ore a pochi giorni), mentre il rilascio si verifica nell'arco di settimane o mesi (Mouvet, 1983 a, 1984 a e c);

- il fattore di concentrazione è spesso il più elevato di tutti i compartimenti dell'ecosistema acquatico (Empain *et al.*, 1980; Wehr e Whitton, 1983 a);

- le briofite possono tollerare generalmente elevate contaminazioni sia di origine minerale che organica (Empain, 1977; Wehr, 1983; Mouvet *et al.*, 1985).

Per questi motivi, le briofite sono state scelte tra i diversi indicatori per studiare le relazioni tra parametri chimico-fisici e accumulo di inquinanti nei muschi.

Mentre alcune metodologie quali i sedimenti, il particellato e l'acqua sono consolidate ed usate routinariamente, l'utilizzazione di bioindicatori stenta ad affermarsi a causa dello scetticismo di molti ricercatori troppo legati a schemi tradizionali. In particolar modo in Italia, essa è praticamente assente se si esclude la scuola di Ghetti (1986) e l'uso di microinvertebrati acquatici per mappare la qualità dei corsi d'acqua.

Scopo della ricerca

I muschi acquatici vengono attualmente utilizzati, per il monitoraggio di elementi in tracce e microinquinanti organici presenti nei corpi idrici, in alcuni paesi della Comunità Europea quali: Belgio, Francia, Germania, Inghilterra, Lussemburgo e Portogallo.

Gli enti preposti alla gestione ed al controllo della qualità delle acque sono sempre più interessati ad avere in modo preciso e continuo lo stato di condizione e l'evoluzione dei contaminanti presenti nei corsi fluviali.

Questo lavoro intende proporre un punto di focalizzazione, affinché attiri l'attenzione e l'interesse di ricercatori e politici per uno sviluppo più ampio e per un impiego generalizzato nell'uso dei bioindicatori al fine di avere un migliore e più consolidato controllo degli ecosistemi fluvio-lacustri. Occorre ricordare che in alcuni casi tali metodiche permettono un recupero ambientale riducendo la concentrazione di contaminanti indesiderati.

Materiali e metodi e discussione dei risultati

Per tutte le prove eseguite sia in laboratorio che *in situ* si è utilizzato un muschio appartenente alla specie *Fontinalis antipyretica*. Complessivamente sono state eseguite più di 3500 analisi di muschi, sedimenti, particellato ed acque. La ricerca, articolata in tre fasi si è così svolta:

- Fase prima, individuazione e coltivazione di muschi la cui concentrazione di elementi in tracce fosse il più possibile stabile nel tempo, valutando in laboratorio il condizionamento-rilascio di elementi in tracce (Cd, Pb, Cr, Cu e Hg).
- Fase seconda in laboratorio, valutazione della velocità di accumulo degli elementi in tracce e la risposta dei muschi a variazioni della concentrazione idrogenionica e ionica.
- Fase terza, valutazione del potenziale diagnostico, gli stessi muschi immessi in nove ambienti naturali contaminati prevalentemente da sostanze inorganiche di origine industriale (Cu, Cr, Hg e Pb), e contemporaneamente in corsi d'acqua a più ridotta concentrazione, valutando inoltre il loro potenziale di accumulo.

Vengono ora presentati brevemente i risultati ottenuti nelle tre fasi della ricerca che ha avuto come scopo quello di appurare se i muschi acquatici potessero essere utilizzati per il controllo della contaminazione di

elementi in tracce presenti nelle acque lotiche e lentiche, e contestualmente valutare la loro capacità di recupero.

Nella fase 1, il muschio *Fontinalis antipyretica* è stato trattato con acqua di lago per 133 giorni durante i quali si è verificato un rilascio dei 64% per il Hg, dell'83% per il Cr e del 70% per il Pb; Cd e Cu hanno mantenuto le loro concentrazioni iniziali poiché l'acqua di coltura e quella della stazione di provenienza avevano concentrazioni iniziali molto simili.

Nella fase 2, i muschi condizionati sono stati immessi in tre vasche ciascuna contenente 100 litri di acqua del lago Maggiore a concentrazione controllata. Tre pompe aventi ognuna una portata di 15 l/minuto facevano circolare l'acqua che bagnava i muschi posti all'interno di un tubo di vetro. In due vasche il valore di pH è stato modificato mediante aggiunte di acido nitrico e soda caustica, mentre per la terza veniva mantenuto il pH pari a 8.1 senza nessun intervento. Le tre vasche sono state inoltre contaminate con aggiunte note di Cu, Cd, Pb e Hg, quindi 105 talli, equivalenti ad una biomassa di 4.5 g di *Fontinalis antipyretica* venivano posizionati nel tubo di vetro posto all'interno di ciascuna vasca; la cinetica dell'accumulo veniva definita con prelievi di muschio e acqua effettuati a tempi stabiliti: tempo zero, dopo 1 h, 6 h, 1 giorno, 4, 9, 14, e 28 giorni.

L'accumulo è pronunciato nelle prime ore di esposizione, in seguito si osserva, fatta eccezione per l'elemento Cu, una cinetica di saturazione in accordo con l'equazione di Michaelis-Menten.

Questa saturazione avviene principalmente per gli elementi considerati tra il 7° e il 14° giorno, fatta eccezione per il Cu che, anche dopo 28 giorni di esposizione non raggiunge la saturazione sia nella vasca con pH neutro che in quella a pH basico.

Nella terza fase della ricerca è stato effettuato il posizionamento dei muschi in nove stazioni: zona del lago d'Orta, il fiume Toce e corsi d'acqua minori. I risultati di accumulo degli elementi, durante i 28 giorni, sono riportati in tabella 1. Ciò ha permesso di localizzare l'origine delle fonti d'inquinamento per i metalli: Cu, Pb e Hg.

Per tre stazioni la concentrazione media del Cu in *Fontinalis antipyretica* è passata da un valore iniziale di 167 mg/kg a 2100 mg/kg di muschio secco dopo 14 giorni per arrivare dopo 28 giorni ad un valore di 2900 mg/kg.

Anche per il Pb, nelle stesse stazioni e nello stesso intervallo di tempo, si è passati da 13 mg/kg di muschio secco a 376 dopo 14 giorni per arrivare ad una concentrazione di 465 mg/kg alla fine dei 28 giorni.

Per il Hg, il muschio *Fontinalis antipyretica* ha mostrato nella stazione 6 un notevole accumulo, partendo da una concentrazione iniziale di 0.2 mg/kg si è passati dopo 14 giorni a 17.7 per arrivare dopo 28 giorni ad un valore di 26.4 mg/kg.

A riguardo dell'accumulo totale di elementi, nelle stazioni 2, 2A e 3, in ventotto giorni i muschi hanno assorbito mediamente 4 g di elementi per chilo di muschio.

Le buone informazioni ottenute con i muschi hanno permesso di comprendere ed apprezzare anche la loro capacità di accumulare metalli pesanti anche in acque a ridotta concentrazione degli stessi.

Tabella 1. Bioaccumulo di metalli pesanti (mg kg⁻¹) nell'arco di 28 giorni

	Hg		Cd		Cu		Pb		Cr	
	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂
1	0.06	0.13	5.5	3.1	157	84	11	30	0.90	1.4
2	0.11	1.49	6.4	3.3	157	2941	10	465	1.26	73.5
2A	0.12	0.68	5.0	1.8	200	2505	17	319	2.00	53.8
3	0.10	0.21	4.8	4.1	150	3470	12	611	1.82	71.2
4	0.09	0.11	6.4	4.1	153	519	9	106	1.26	145
5	0.09	0.13	3.9	3.8	150	92	13	252	1.78	14
6	0.21	26.4	5.0	5.0	127	95	13	52	1.34	16.8
6A	0.12	0.11	5.0	5.5	143	126	12	132	1.66	5.5
7	0.13	0.12	8.7	1.8	165	35	19	19	1.25	1.41

t₁ tempo zero del posizionamento del muschio

t₂ tempo dopo 28 giorni di permanenza del muschio

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno evidenziato per gli elementi considerati una elevata velocità di accumulo da parte di *Fontinalis antipyretica*, la saturazione viene raggiunta in un tempo che va da pochi giorni ad alcune settimane. Il rilascio degli stessi elementi avviene in modo lento nell'arco di alcuni mesi. Inoltre il loro comportamento in ambienti a differente acidità, contaminazione industriale ed urbana-industriale è risultato essere positivo. Si può quindi affermare che il loro impiego porterebbe ad un miglior controllo della qualità delle acque «dolci» e in certi casi il loro utilizzo potrebbe essere impiegato per ridurre la concentrazione presente nelle acque.

I limiti dell'utilizzo dei muschi sono imputabili principalmente alla loro natura biologica, non permettono informazioni istantanee della qualità delle acque in quanto integrano nel tempo le informazioni. Per quanto riguarda l'utilizzo per ridurre le concentrazioni di metalli pesanti, l'impiego

dei muschi non consente il recupero di grandi masse di acqua, l'impiego sarebbe ottimale per ridotte entità.

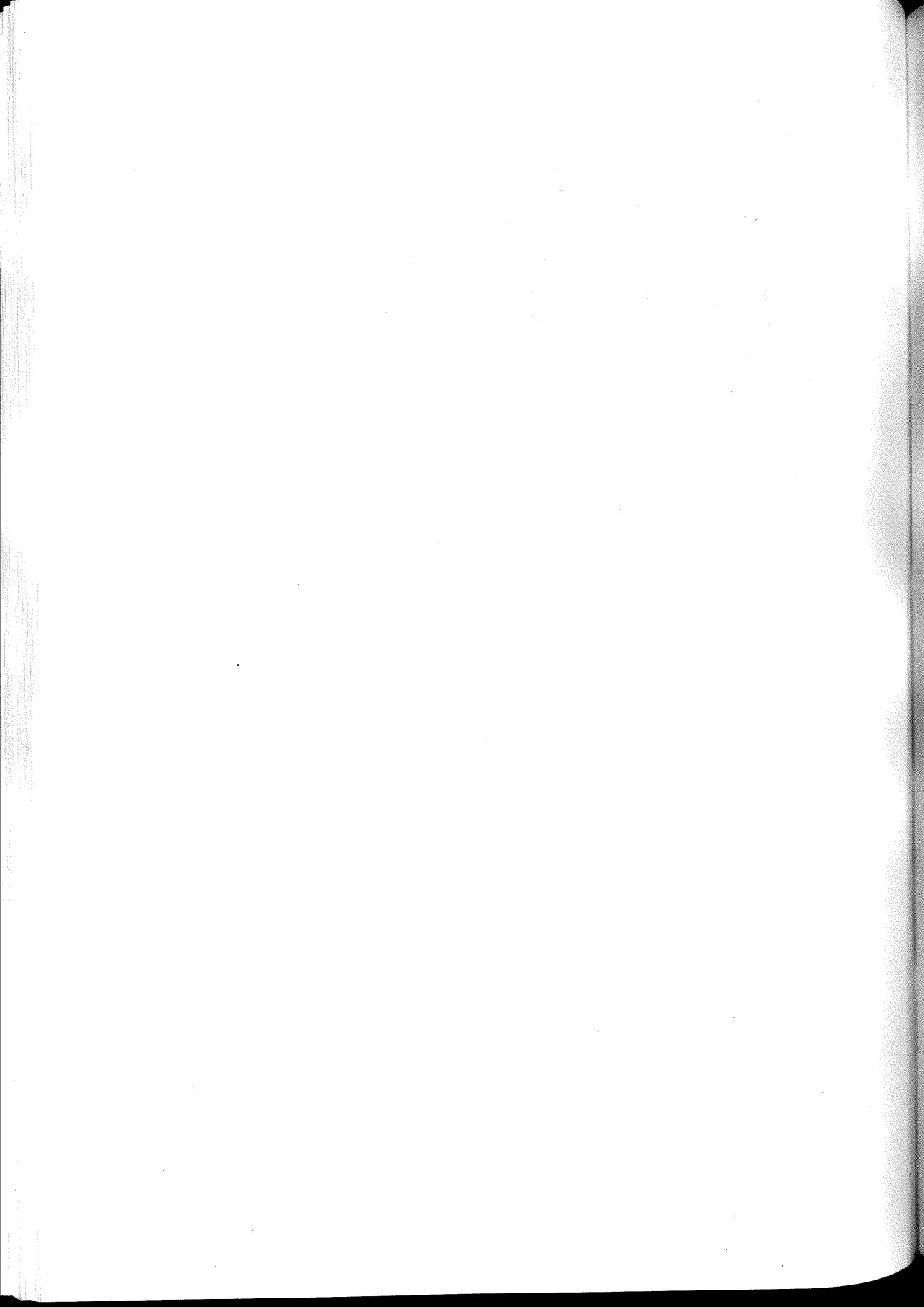
Bibliografia

- EMPIAN A., 1977. Ecologie des populations bryophytiques aquatiques de la Meuse, de la Sambre et de la Somme. Relations avec la qualité des eaux, écophysologie comparée et étude de la contamination par métaux lourds. *Mém. Doct. Sci. Bot. Univ. de Liège*; 179
- EMPIAN A., J. LAMBINON, C. MOUVET & R. KIRCHAMANN, 1980. Utilisation des bryophytes aquatique et sub-aquatiques comme indicateurs biologiques de la qualité des eaux courantes. *La pollution des eaux continentales*, 2e éd. Pesson, P., Ed., Gauthier-Villars, Paris; 195-223.
- GHETTI P.F., 1986. I macroinvertebrati nell'analisi di qualità dei corsi d'acqua. *Provincia autonoma di Trento*; 109.
- MOUVET C., 1983 a. Bryophytes aquatiques et métaux lourds. *Rapport de contrat à l'Agence Financière de Bassin Rhin-Meuse, F-57160 Moulins-lès-metz, France*; 38
- MOUVET C., 1984 c. Accumulation of chromium and copper by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. Transplanted in a metal-contaminated river. *Environ. Technol. Letters*, 5; 541-548.
- MOUVET C., GALLISSOT B. & CORDEBAR P., 1985. Micropolluants organochlores et mousses aquatiques. *Rapport de contrat à l'Agence Financière de Bassin Rhin-Meuse, F-57160 Moulins-lès-metz, France*; 74.
- THOMAS W., 1979. Monitoring organic and inorganic trace substances by epiphytic mosses. A regional pattern of air pollution. *Trace substances in environmental health*, 13; 285-289.
- WEHR J. D., 1983. Accumulation of heavy metals by aquatic bryophytes in streams and rivers in Northern England. *Univ. Durham, Dept. of Botany, Durham DH1 3L3, England*; 432.
- WEHR J. D., & WHITTON B. A., 1983 a. Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 2: *Rhynchostegium riparioides*. *Hydrobiol.*, 100; 261-284.

dei muschi non consente il recupero di grandi masse di acqua, l'impiego sarebbe ottimale per ridotte entità.

Bibliografia

- EMPIAN A., 1977. Ecologie des populations bryophytiques aquatiques de la Meuse, de la Sambre et de la Somme. Relations avec la qualité des eaux, écophysiologie comparée et étude de la contamination par métaux lourds. *Mém. Doct. Sci. Bot. Univ. de Liège*; 179
- EMPIAN A., J. LAMBINON, C. MOUVET & R. KIRCHAMANN. 1980. Utilisation des bryophytes aquatique et sub-aquatiques comme indicateurs biologiques de la qualité des eaux courantes. *La pollution des eaux continentales*, 2e éd. Pesson, P., Ed., Gauthier-Villars. Paris; 195-223.
- GHETTI P.F., 1986. I macroinvertebrati nell'analisi di qualità dei corsi d'acqua. *Provincia autonoma di Trento*; 109.
- MOUVET C., 1983 a. Bryophytes aquatiques et métaux lourds. *Rapport de contrat à l'Agence Financière de Bassin Rhin-Meuse, F-57160 Moulins-lès-metz*, France; 38
- MOUVET C., 1984 c. Accumulation of chromium and copper by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. Transplanted in a metal-contaminated river. *Environ. Technol. Letters*. 5; 541-548.
- MOUVET C., GALLISSOT B. & CORDEBAR P., 1985. Micropolluants organochlores et mousses aquatiques. *Rapport de contrat à l'Agence Financière de Bassin Rhin-Meuse, F-57160 Moulins-lès-metz*. France; 74.
- THOMAS W., 1979. Monitoring organic and inorganic trace substances by epiphytic mosses. A regional pattern of air pollution. *Trace substances in environmental health*, 13; 285-289.
- WEHR J. D., 1983. Accumulation of heavy metals by aquatic bryophytes in streams and rivers in Northern England. *Univ. Durham, Dept. of Botany, Durham DH1 3L3*, England; 432.
- WEHR J. D., & WHITTON B. A., 1983 a. Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 2: *Rhynchostegium riparioides*. *Hydrobiol.*, 100: 261-284.



INDICATORI MOLECOLARI DELLE VARIAZIONI DELLA COMUNITÀ BATTERICA IN SUOLI INQUINATI

Antonio Gelsomino¹, Carmine Crecchio², Giovanni Cacco¹

¹ Dipartimento di Agrochimica ed Agrobiologia,
Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria
Piazza San Francesco, 4 - 89061 Gallina (RC)

² Dipartimento di Biologia e Chimica Agro-forestale ed Ambientale,
Università degli Studi di Bari,
Via Amendola 165/A - 70126 Bari

Riassunto

Lo studio delle variazioni della struttura delle comunità batteriche presenti in tre suoli agrari, che hanno subito una forte pressione antropica, è stato condotto mediante tecniche di biologia molecolare. Il DNA di origine batterica è stato estratto dal suolo mediante la procedura di estrazione indiretta e quindi purificato per precipitazione con cloruro di cesio e filtrazione con colonnine cromatografiche. L'estratto nucleare purificato è stato quindi sottoposto ad amplificazione genica, mediante reazione a catena della polimerasi (PCR), di specifiche sequenze della regione genica 16S rDNA codificante per la sintesi dell'RNA ribosomiale (16S) della subunità piccola (30S) del ribosoma procariotico. L'analisi dei frammenti di amplificazione mediante la tecnica di separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide con gradiente denaturante (DGGE) ha fornito dei profili molecolari con una distribuzione caratteristica di bande, ciascuna associabile ad una specie batterica, che nel complesso descrivono la struttura molecolare della comunità batterica del suolo.

Introduzione

I microrganismi del suolo sono considerati come agenti di primaria importanza ai fini di un loro possibile impiego per il recupero ambientale ed il ripristino della fertilità in suoli contaminati (Stotzky, 1997; Middeldorp e Schraa, 1998; Nannipieri *et al.*, 2000). Al fine di poter selezionare quei ceppi microbici o, meglio, quelle comunità batteriche capaci di sopravvivere e di detossificare i suoli inquinati, è opportuno caratterizzare le popolazioni batteriche presenti in un sito contaminato e monitorarne le evoluzioni nel tempo. Le conoscenze maturate nel corso degli ultimi due decenni nel settore della biologia molecolare hanno promosso una crescente diffusione di tecniche molecolari applicate alla scienza del suolo ed, in particolare, alla microbiologia del terreno (van Elsas *et al.*, 1997a). Tali tecniche, infatti, basate sull'analisi degli acidi nucleici estratti dalle popolazioni batteri-

che del suolo, sono in grado di rilevare quelle specie batteriche residenti nel terreno che normalmente sfuggono ad indagini convenzionali perché non coltivabili su terreni di coltura in laboratorio (Holben, 1994).

Oggetto della presente indagine sono stati tre diversi terreni agrari sottoposti ad una forte pressione antropica (spargimenti di fanghi di depurazione e liquami zootecnici, esondazioni incontrollate da canale di fanghi di origine urbana ed industriale, irrigazione protratta nel tempo con acque salmastre), e pertanto, a rischio di degrado ambientale. La struttura delle comunità batteriche nei suoli inquinati è stata indagata mediante tecniche di caratterizzazione del DNA batterico estratto da suolo mediante il metodo dell'estrazione indiretta (estrazione delle cellule batteriche da suolo mediante rimozione delle particelle solide e successiva lisi cellulare con rilascio di DNA). Dopo la purificazione dell'estratto le sequenze amplificate codificanti per la sintesi della sub-unità ribosomale 16S sono state caratterizzate mediante la tecnica di separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide con gradiente di agente chimico di denaturazione (DGGE).

Materiali e metodi

I suoli agrari utilizzati nella presente ricerca sono stati campionati da tre diverse aree di studio: (i) un alfisuolo formato su sabbie ghiaiose non calcaree, ben drenato, profondo, mediamente dotato di sostanza organica, sito nel comune di Torre de' Picenardi (CR) ed intensamente coltivato in monosuccessione cerealicola. Il sito contaminato ha ricevuto negli ultimi 10-15 anni intensi spargimenti di fanghi di depurazione di origine urbana e di liquami zootecnici (suini). Il suolo testimone è molto simile per proprietà chimiche al suolo campione. (ii) Un suolo vulcanico della fascia pedemontana sita in località Palma Campania (NA), caratterizzato da tessitura sabbioso-limosa, pH subacido, ben dotato in sostanza organica e K scambiabile. Il suolo in esame, coltivato a nocciolo, è stato sottoposto per anni a ripetuti apporti di sedimenti dovuti ad esondazioni da un canale fortemente inquinato da immissioni incontrollate di scarichi urbani ed industriali. Il suolo testimone differisce dal campione per un minor contenuto di sostanza organica, per una minor conducibilità dell'estratto acquoso e per una lieve acidità. (iii) Una terra rossa pugliese della costa sud di Bari, località Ripagnola, caratterizzata da un'elevata presenza in superficie di una componente argillosa di tipo caolinitico, formatasi su rocce calcaree compatte, unitamente alla presenza di ossidi di ferro che impartiscono al suolo la tipica colorazione rossa. Alcune proprietà fisico-chimiche del suo-

lo in esame sono: tessitura limo-argillosa, pH vicino alla neutralità, elevata capacità di scambio cationico. Il suolo è destinato ad orticoltura intensiva ed è stato irrigato con acque ad elevato contenuto salino (conducibilità elettrica dell'acqua, EC_w , da 1.6 a 4 dS m^{-1}) per numerosi anni. Il suolo testimone, presenta un maggiore contenuto di sostanza organica, una minore densità apparente (1.31 kg dm^{-3} rispetto a 1.88 kg dm^{-3} del campione), ed una minore presenza di Na di scambio. La caratterizzazione fisico-chimica e mineralogica dei suoli in esame è stata curata dall'Unità di ricerca dell'Università del Molise, coordinata dal Prof. Colombo.

Nel corso del 2000 sono stati effettuati due campionamenti: l'uno nel periodo primaverile, l'altro nel periodo autunnale. Il DNA delle popolazioni batteriche del suolo è stato estratto, secondo la procedura di estrazione indiretta (van Elsas *et al.*, 1997b), subito dopo setacciatura a 2 mm del suolo fresco. Dopo la purificazione degli estratti mediante precipitazione con CsCl e filtrazione attraverso colonnine cromatografiche Wizard® DNA Clean-up System (Promega, USA), le sequenze geniche codificanti per la sintesi della sub-unità 16S dell'RNA ribosomale (16S rDNA) sono state amplificate mediante PCR e separate per elettroforesi su gel con gradiente di agente chimico di denaturazione (DGGE) (Gelsomino *et al.*, 1999). Dopo la corsa il gel è stato colorato con SYBR® Green I (Molecular Probes, USA) e fotografato sotto luce ultravioletta. I profili elettroforetici sono stati acquisiti mediante elaborazione computerizzata di immagine.

Risultati e discussione

La tecnica di separazione per elettroforesi su gel con gradiente di agente chimico di denaturazione (DGGE) risolve frammenti di DNA della stessa dimensione ma con differente composizione in basi azotate (Muyzer *et al.*, 1993). L'analisi dunque fornisce una serie di profili elettroforetici con una distribuzione caratteristica di bande, ciascuna associabile ad una specie batterica, che nel complesso descrive la struttura molecolare della popolazione microbica del suolo (Heuer e Smalla, 1997).

I profili elettroforetici ottenuti mediante analisi DGGE di sequenze amplificate del 16S rDNA del DNA batterico estratto dai suoli in esame, evidenziano una diversa struttura molecolare in ciascun tipo di suolo indagato (figure 1 e 2). In particolare, nella figura 1 sono presentati i profili elettroforetici relativi ai campioni di suolo provenienti dal primo campionamento nelle due aree di saggio rispettivamente di Ripagnola (BA) e di Torre de' Picenardi (CR). Relativamente alla terra rossa pugliese il sistema DGGE

ha prodotto profili molecolari ricchi in bande di forte e media intensità, ma differenti tra il suolo campione ed il suolo testimone non irrigato con acque salmastre (figura 1). Ciò suggerirebbe l'ipotesi della presenza di una comunità batterica con un alto grado di diversità genetica, intesa come numerosità di specie (species richness), e capace di produrre un diverso profilo molecolare in risposta a situazioni ambientali di stress salino. Nel suolo agrario della Pianura Padana, invece, sono stati evidenziati profili molecolari con un basso numero di bande di media/forte intensità e con minori differenze significative tra il suolo campione ed il testimone.

Ripagnola (BA) | **Torre de' Picenardi (CR)**
 C1 T1 C2 T2 C3 T3 C4 T4 C5 T5 C1 T1 C2 T2 C3 T3 C4 T4 C5 T5

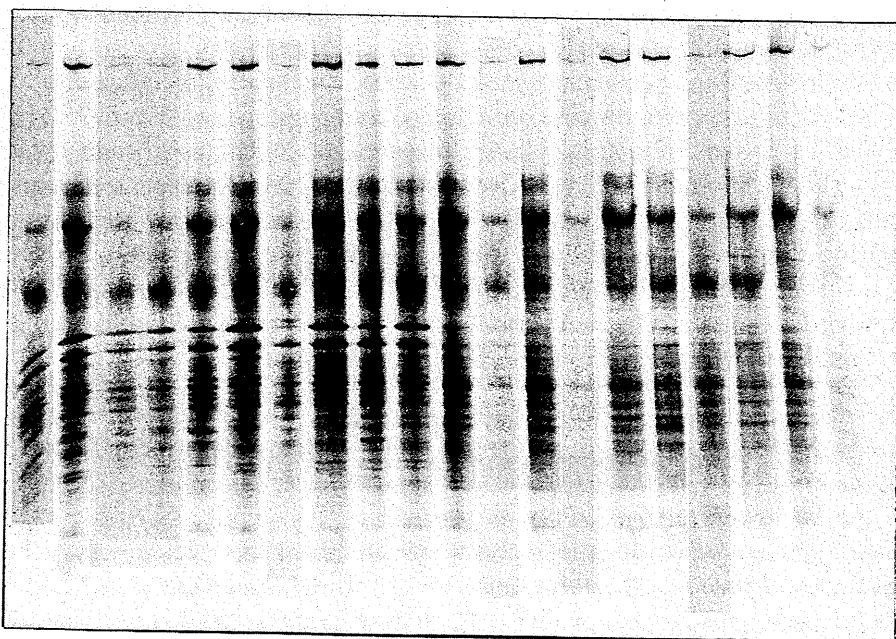


Figura 1. Profili molecolari del 16S rDNA delle comunità batteriche dei suoli pugliesi e padani. Per ogni sito sono riportati i cinque campionamenti replicati di suolo trattato (C1-C5) con i rispettivi controlli (T1-T5). I dati sono relativi al solo campionamento primaverile.

In figura 2 sono confrontati i profili dell'analisi DGGE relativi al suolo del sito campano (Palma Campania) campionato nelle due epoche, primaverile ed autunnale. Il confronto dei profili evidenzia una differenza maggiore tra il suolo campione ed il suolo testimone, rispetto allo stesso suolo campionato nelle due diverse epoche.

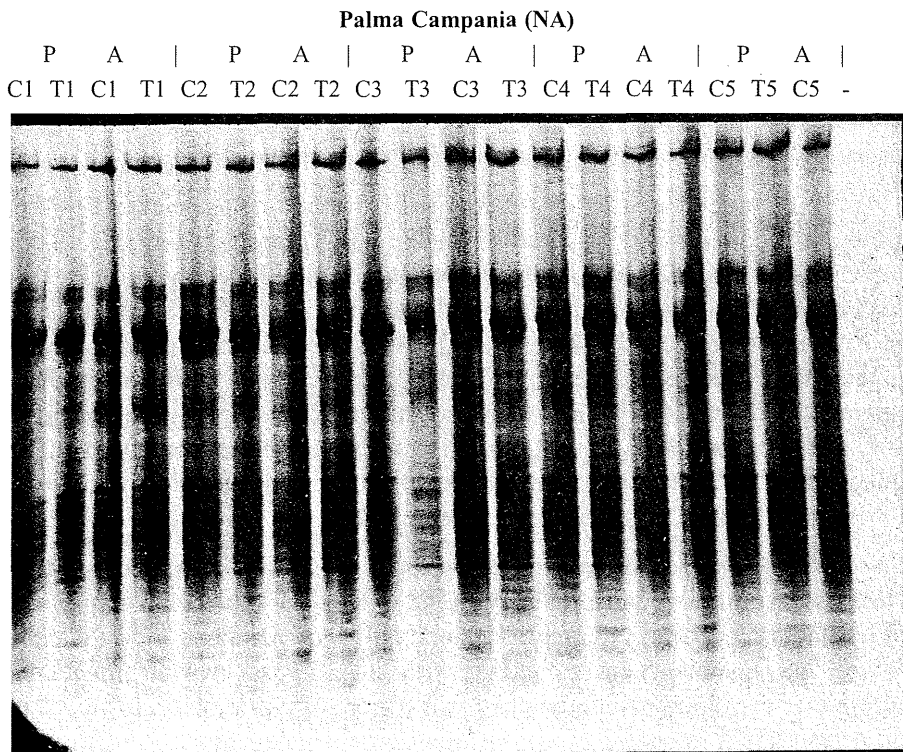


Figura 2. Profili molecolari del 16S rDNA delle comunità batteriche del suolo campano prelevato nelle due epoche, primaverile (P) ed autunnale (A), a confronto. Sono riportati i cinque campionamenti replicati del suolo campione (C1-C5) e dei rispettivi controlli (T1-T5). - è il controllo negativo dopo PCR-DGGE.

L'attività antropica può influenzare sia direttamente che indirettamente gli equilibri di popolazione ed i livelli di attività delle comunità microbiche del suolo. I dati riportati nel presente lavoro descrivono le modificazioni nella struttura di popolazione in risposta a particolari situazioni ambientali di stress. A tal proposito sono stati recentemente suggeriti (Giller *et al.*, 1998) due modelli per descrivere gli effetti prodotti sulla struttura delle comunità microbiche del suolo da parte di un fattore di stress, quale quello dovuto alla tossicità da metalli pesanti: (i) un modello che prevede una diminuzione lineare della diversità genetica, e dunque della "species richness", all'interno della comunità microbica legata all'incapacità degli individui più sensibili di tollerare concentrazioni crescenti del fattore di stress; (ii) un modello "a campana" che prevede per moderate concentrazioni dell'inquinante un aumento della diversità genetica dovuto alla proliferazione di individui sensibili in risposta ad una diminuita competitività di individui altrimenti dominanti, causata dalla presenza del fattore di inquinamento; alte dosi di in-

quinante, tuttavia, causano la progressiva estinzione di specie con conseguente perdita di diversità. Una risposta del tipo (ii) potrebbe giustificare l'apparente aumento di "species richness" nei profili DGGE relativi al suolo campano ed al suolo padano. Viceversa, nella terra rossa pugliese le condizioni di salinità potrebbero aver selezionato le specie alofile.

Sebbene utile per descrivere la struttura delle comunità microbiche (soil communities structure) l'analisi molecolare non fornisce alcuna indicazione sui reali livelli di attività metabolica (soil functioning) della biomassa microbica. Dati preliminari relativi al sito di Palma Campania (Sannino *et al.*, 2001) indicano infatti più alti livelli di attività enzimatiche nel campione che nel testimone, mentre l'N della biomassa non è risultato significativamente differente tra i due trattamenti. Inoltre, il tasso di respirazione è risultato superiore nel suolo campione rispetto al testimone, contrariamente a quanto verificato nei suoli delle due are di studio di Ripagnola e di Torre de' Picenardi (Gennari, comunicazione personale).

In conclusione, pur non sottovalutando la moltitudine di fattori che possono inficiare la riproducibilità delle tecniche molecolari impiegate, in particolare nella fase di amplificazione del DNA mediante PCR (Wang e Wang, 1997), si può ritenere che la tecnica DGGE possa realisticamente descrivere le comunità batteriche del suolo e, con sistemi molecolari opportuni, permettere il riconoscimento di singoli gruppi sistematici, eventualmente utilizzabili per applicazioni biotecnologiche. Una visione integrata riguardante l'interazione ambiente-struttura di comunità-livelli di attività nel suolo è raggiungibile attraverso l'uso di opportuni indicatori che combinino tecniche microbiologiche e biochimiche convenzionali con le più recenti tecniche di indagine molecolare.

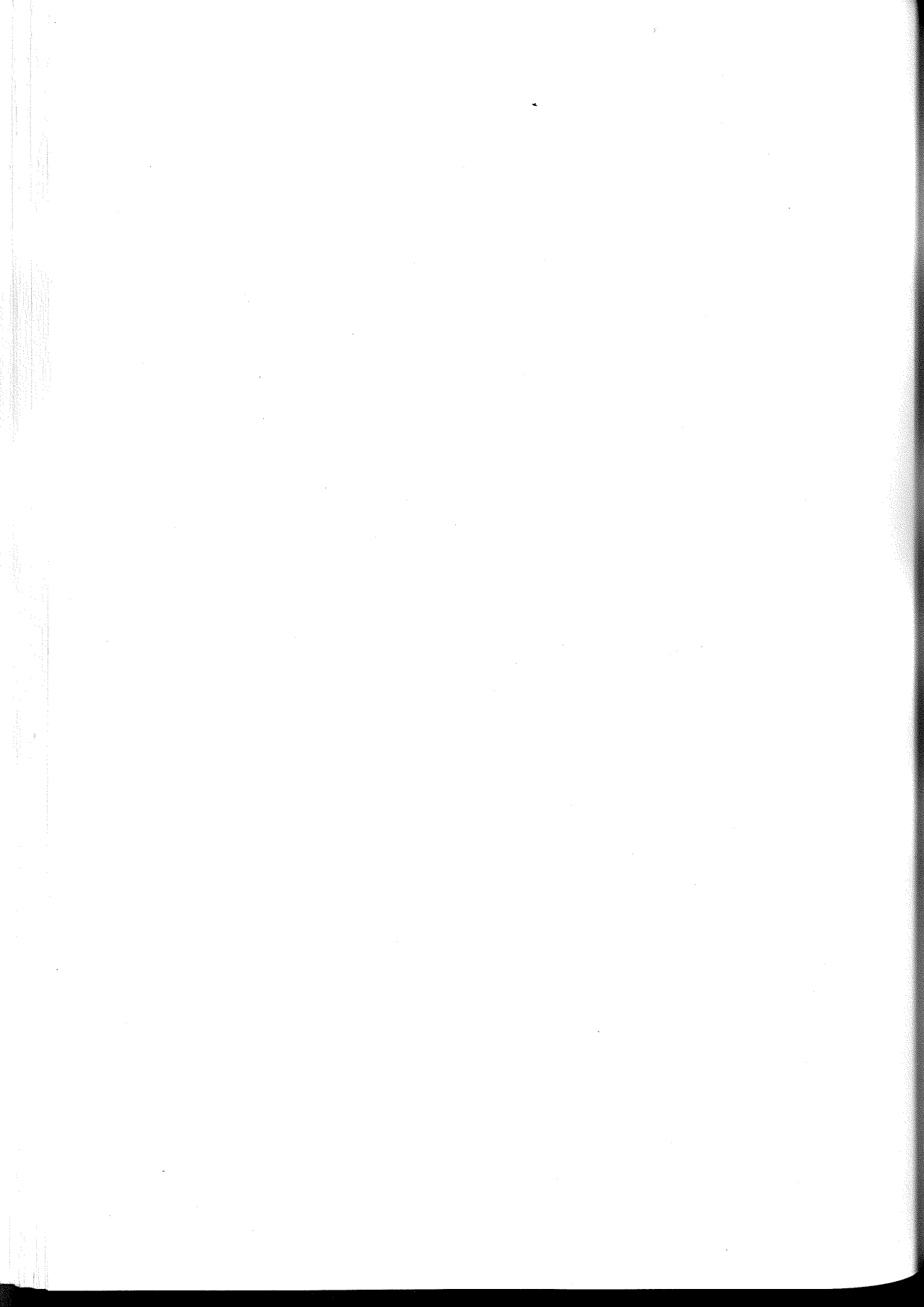
Ringraziamenti

La presente ricerca è stata condotta con il supporto finanziario del MURST nell'ambito del Programma di ricerca scientifica di rilevante interesse nazionale dal titolo: "Uso potenziale di indicatori biologici per valutare la qualità del suolo per un ambiente sostenibile", anni 1999-2000.

Bibliografia

- GELSOMINO A., KEIJZER-WOLTERS A.C., CACCO G., van ELSAS J.D. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 38, 1-15.
- GILLER K.E., WITTER E., McGRATH S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389-1414.

- HEUER H., SMALLA K. 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: *Modern Soil Microbiology* (J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 353-373.
- HOLBEN W.E. 1994. Isolation and purification of bacterial DNA from soil. In: *Methods of Soil Analysis Part 2*. (S.H. Mickelson ed.), Soil Science Society of America, Madison, pp. 727-751.
- VAN ELSAS J.D., TREVORS J.T., WELLINGTON E.M.H. 1997a. *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker Inc., New York, 683 pp.
- VAN ELSAS J.D., MÄNTYNYEN V., WOLTERS A.C. 1997b. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils* 24, 188-195.
- MIDDELDORP P.J.M., SCHRAA G. 1998. Bioremediation of contaminated soils: Factors influencing the biological process. In: *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry* (N.S. Subba Rao, Y.R. Dommergues eds.), Science Publishers Inc., Enfield (USA), pp. 239-253.
- NANNIPIERI P., BENEDETTI A., PIETRAMELLARA G. 2000. Applications and risks in soil biotechnology. In: *Biotechnology of soil: Monitoring, conservation and remediation* (A. Benedetti, F. Tittarelli, S. de Bertoldi, F. Pinzari eds.). European Communities, Luxembourg, Proceedings of the Cost Action 831 Joint Working Groups Meeting, Rome, Italy, 10-11 december 1998.
- SANNINO P., PALUMBO G., COLOMBO C., GIANFREDA L. 2001. Caratterizzazione chimica e biologica di un suolo inquinato da fanghi di origine urbana. *XVIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria (SICA)*, Catania, Atti del Convegno. In stampa.
- SMALLA K., WACHTENDORF U., HEUER H., LIU W.-T., FORNEY L. 1998. Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1220-1225.
- STOTZKY G. 1997. Soil as an environment for microbial life. In: *Modern Soil Microbiology* (J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-20.
- WANG G.C.-Y., WANG Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4645-4650.



FITOSTRAZIONE DA UN SUOLO CONTAMINATO DA PIÙ METALLI: ACCUMULO E TOLLERANZA

Quartacci M.F., Sgherri C.L.M., Navari-Izzo F.

Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie, Università di Pisa
Via del Borghetto, 80 - 56124 Pisa

Introduzione

Terreni e acque inquinate da metalli tossici rappresentano un problema ambientale con gravi ripercussioni sulla salute dell'uomo che ancora richiede una soluzione. Il rischio che l'accumulo di metalli in terreni agrari possa avvelenare la catena alimentare, specialmente in particolari condizioni di acidità del terreno, è di crescente preoccupazione (Salomons e Stigliani, 1995). La "bioremediation" microbica può essere utile ed ha avuto successo limitatamente alla degradazione di composti organici, ma è risultata poco efficace per eliminare l'inquinamento del terreno dai metalli. Infatti, differentemente dalle molecole organiche che possono essere degradate, l'eliminazione della maggior parte dei metalli e dei radionuclidi dai suoli richiede l'estrazione fisica dalle sorgenti inquinate. E' noto ormai che l'assorbimento delle piante può essere usato come mezzo per bonificare biologicamente terreni inquinati da metalli. La "phytoremediation" permette, a paragone delle tecnologie convenzionali, una progressiva bonifica dei terreni contaminati ed è potenzialmente una attrattiva tecnica "verde" a basso costo. La potenzialità di questa tecnica per decontaminare i suoli viene ulteriormente accresciuta se la si paragona con l'impiego di tecnologie fisico-chimiche a costi molto elevati e soprattutto se si considera che tali tecnologie sterilizzano i suoli annullandone le attività biologiche e la fertilità (Cunningham e Ow, 1996). E' noto infatti che il ciclo vitale di una pianta ha un effetto benefico sulle proprietà chimico-fisiche del terreno e sui processi biologici che avvengono nelle sue immediate vicinanze. La "phytoremediation" offre quindi la possibilità di rimuovere selettivamente solo i metalli contaminanti lasciando il terreno in condizioni inalterate per quanto riguarda tutte le altre proprietà (Baker *et al.*, 1999). Al presente, comunque, tale tecnologia potrebbe essere usata per diminuire la concentrazione di alcuni metalli nel suolo più che per una piena decontaminazione (Baker *et al.*, 1999). Infatti prima che la fitoestrazione dei suoli sia possibile su larga scala devono essere risolte parecchie problematiche, tra cui quelle collegate alle piante iperaccumulatrici. Queste piante, endemiche di suoli metalliferi,

possono accumulare metalli nella parte aerea in concentrazioni molto superiori alle concentrazioni normali, fino a 100-1000 volte superiori a quelle presenti nei terreni. Esse sono però relativamente rare e molto spesso si trovano in aree geograficamente remote. Gli svantaggi da esse presentati sono principalmente una crescita lenta, una scarsa biomassa, tecniche agricole non ancora ottimizzate, selettività nell'assorbimento e necessità di substrati e climi particolari. La possibilità di coltivare specie agrarie ad elevata biomassa, quali mais e girasole, è stata proposta come mezzo di bonifica di suoli contaminati. Inoltre studi recenti suggeriscono che l'aggiunta di agenti chelanti al terreno può rappresentare una strategia efficace per aumentare l'assorbimento dei metalli da parte delle piante (Huang *et al.*, 1997; Blaylock *et al.*, 1997). Questa strategia dovrebbe anche abbassare il rischio di tossicità nei tessuti della pianta e permettere quindi una maggiore tolleranza a più alte concentrazioni di metalli. Huang e Cunningham (1996) hanno trovato che l'aggiunta di acido N-idrossietilenediamminotriacetico (HEDTA) al terreno aumentava l'assorbimento del Pb in *Brassica juncea* di 265 volte in una settimana, tempo dopo il quale la pianta moriva. Blaylock e collaboratori (1997), usando piante di senape indiana di tre settimane, riportano un aumento di 1000 volte nell'assorbimento di Pb usando acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), mentre Huang e collaboratori (1997) riscontrano un aumento nell'estrazione di Pb di sole 60-110 volte in pisello prima cresciuto per due settimane in terreno non contaminato. L'uso di EDTA ha determinato un aumento anche nell'assorbimento di Cd, Ni, Zn e Cu (Blaylock *et al.*, 1997; Ebbs e Kochian, 1998). L'accumulo di Zn da parte di avena, orzo e senape indiana aumentava notevolmente in presenza di EDTA (Ebbs e Kochian, 1998). Kulli e collaboratori (1999) riportano che l'estrazione di metalli pesanti in presenza di chelanti non risultava mai maggiore di 2,5 volte rispetto alle piante non trattate ed imputavano la scarsa efficienza di estrazione al fatto che il chelante veniva aggiunto dopo una sola settimana di crescita della pianta e/o a competizione nell'assorbimento tra i differenti metalli. Prove condotte da Cooper e collaboratori (1999) ed Epstein e collaboratori (2000) sulla fitoestrazione di Pb in presenza di chelanti hanno tuttavia messo in luce i rischi ambientali derivanti da questa pratica a causa della loro degradazione e della potenziale tossicità per l'ecosistema.

Un aumento della resistenza alla tossicità da metalli è un altro importante tratto che può migliorare l'efficienza della fitoestrazione, in quanto piante con maggiore tolleranza possono continuare a produrre quantità di biomassa abbastanza elevate pur in presenza di quantità tossiche di metalli.

Un possibile meccanismo attraverso il quale elevate concentrazioni di metalli possono danneggiare i tessuti delle piante è la stimolazione

della produzione di radicali liberi (Aust *et al.*, 1998; Navari-Izzo *et al.*, 1998, 1999; Navari-Izzo e Quartacci, 2001) che può causare la degradazione delle biomembrane (Navari-Izzo *et al.*, 1993; Quartacci *et al.*, 1995, 2000, 2001) provocando alterazioni nei processi correlati alla ATPasi ed alle ossidasi di membrana ed inibendo il processo fotosintetico netto (Ciscato *et al.*, 1997) con conseguente riduzione della biomassa.

Il danno ai tessuti probabilmente compare solo quando la capacità di detossificazione dei sistemi antiossidativi naturali è inferiore al ritmo con cui vengono prodotti i radicali liberi. Gli antiossidanti sono composti che inibiscono o ritardano l'ossidazione di altre molecole bloccando l'inizio o la propagazione della catena di reazioni ossidative (Sgherri e Navari-Izzo, 1995). Tra gli antiossidanti utili alle piante per la resistenza alla tossicità dei metalli particolare rilevanza assumono l'acido ascorbico, il glutatione e gli acidi fenolici (Aruoma e Cuppet, 1997).

Scarse sono le informazioni sulle relazioni tra l'attività di ascorbato e glutatione da un lato e sostanze fenoliche dall'altro. Piante di *Helianthus annuus* e *Brassica juncea*, cresciute in un terreno altamente inquinato da Cd, Cr, Cu, Pb e Zn, sono state analizzate per verificare l'assorbimento dei metalli tossici in presenza ed in assenza di chelanti. Prove effettuate su *Raphanus sativus* cv Rimbo hanno mostrato la sua capacità di crescere, assorbire ed accumulare metalli (Quartacci *et al.*, 2001). I dati relativi all'accumulo dei metalli inquinanti in *H. annuus* e *B. juncea* sono discussi in relazione ad alcuni aspetti biochimici della tolleranza ai metalli tossici riscontrati in *R. sativus*.

Materiali e metodi

Il terreno è stato prelevato da una marcita situata in una azienda cerealicolo-zootecnica irrigata per lungo tempo con acque di roggia fortemente contaminate da Cd, Cr, Cu, Pb e Zn. Il terreno, lasciato per molti anni ad incolto produttivo, presentava un contenuto di argilla, limo e sabbia del 5, 17 e 78%, rispettivamente, aveva un pH (H₂O) pari a 7,1, un contenuto di sostanza organica del 6,9% ed una capacità di scambio cationico di 14,6 cmol₍₊₎ kg⁻¹. La caratterizzazione del suolo è stata eseguita seguendo le procedure descritte da McRae (1988). Le concentrazioni nel terreno dei metalli estratti con EDTA sono risultate essere di 37±2 mg kg⁻¹ Cd, 4±1 mg kg⁻¹ Cr, 200±8 mg kg⁻¹ Cu, 707±11 mg kg⁻¹ Pb e 5835±40 mg kg⁻¹ Zn (Lakanen ed Erviö, 1971). Il suolo è stato disgregato e setacciato attraverso un vaglio da 2 mm, mescolato, seccato all'aria fino ad un contenuto di acqua del 5% e

conservato a temperatura ambiente per alcuni giorni in modo da consentirne la stabilizzazione. Il suolo è stato poi trasferito in vasi di plastica nella quantità di 3,5 kg di terreno per vaso.

Le specie vegetali impiegate sono state *Brassica juncea* L. cv 426308 ed *Helianthus annuus* L. ibrido Benvenuto. In ciascun vaso sono stati posti inizialmente dieci semi per ciascuna specie. Dopo l'emergenza le plantule sono state diradate a 5 piante per vaso. Le piante sono state cresciute per 28 giorni in condizioni di campo durante i quali esse sono state irrigate con una soluzione nutritiva quando l'umidità del terreno raggiungeva il 25% della capacità di campo. La soluzione conteneva $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M, KH_2PO_4 0,1 M e KNO_3 0,5 M. Al 28° giorno una parte delle piante è stata irrigata fino alla capacità di campo con una soluzione contenente EDTA 2,5mM. Dopo una settimana, sia le piante trattate con EDTA che quelle non trattate sono state raccolte per le analisi. Le piante sono state separate nei loro vari organi, pesate e seccate per le determinazioni della sostanza secca e del contenuto di metalli.

La traspirazione è stata misurata sottraendo al peso di ciascun vaso dopo la somministrazione della soluzione nutritiva quello del vaso prima dell'adacquamento successivo.

La determinazione del contenuto di metalli è stata eseguita dopo digestione umida dei campioni con HNO_3 concentrato mediante uno spettrofotometro ad assorbimento atomico (Perkin Elmer mod. 373).

Risultati e discussione

Al contrario di quanto viene fatto generalmente negli studi riguardanti la fitoestrazione di metalli da parte di piante iperaccumulatrici e non, i semi sono stati fatti germinare direttamente sul suolo inquinato per evitare lo stress conseguente al trapianto delle piante fatte crescere dapprima su substrati ottimali non contaminati. La semina diretta in campo consentirebbe inoltre di risparmiare quelle spese dovute al trapianto delle piante cresciute in vaso, specialmente nel caso che siano possibili e necessari più cicli/anno.

La concentrazione di EDTA somministrato al suolo nel presente lavoro (2,5 mM) è inferiore a quello riportato in altri studi dove le quantità di chelanti impiegati sono risultate essere notevolmente superiori (Blaylock *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 1999). Questo per minimizzare l'insorgenza di problemi legati alla lisciviazione del chelante negli strati infe-

riori del terreno fino a raggiungere le acque di falda con conseguente inquinamento dell'ambiente. Un test di lisciviaggio su colonna ha indicato che le quantità degli elementi lisciviati sotto forma di EDTA-complessi non superava in nessun esperimento gli 80 cm.

La crescita delle piante non è stata influenzata dal trattamento con EDTA nel caso della *B. juncea*, mentre il girasole ha subito un arresto della produzione di biomassa a seguito della somministrazione del chelante (Fig. 1). In questo caso, la minore formazione di sostanza secca è stata osservata a livello di tutti gli organi della pianta, radici, stelo e foglie. E' stato dimostrato che l'EDTA entra nella pianta insieme al metallo chelato (Blaylock *et al.*, 1997). Oltre una certa soglia, che dipende sia dalla capacità della pianta di detossificare il composto che dall'intensità con la quale il chelante viene assorbito, l'EDTA diventa tossico e determina una riduzione della crescita (McGrath, 1998).

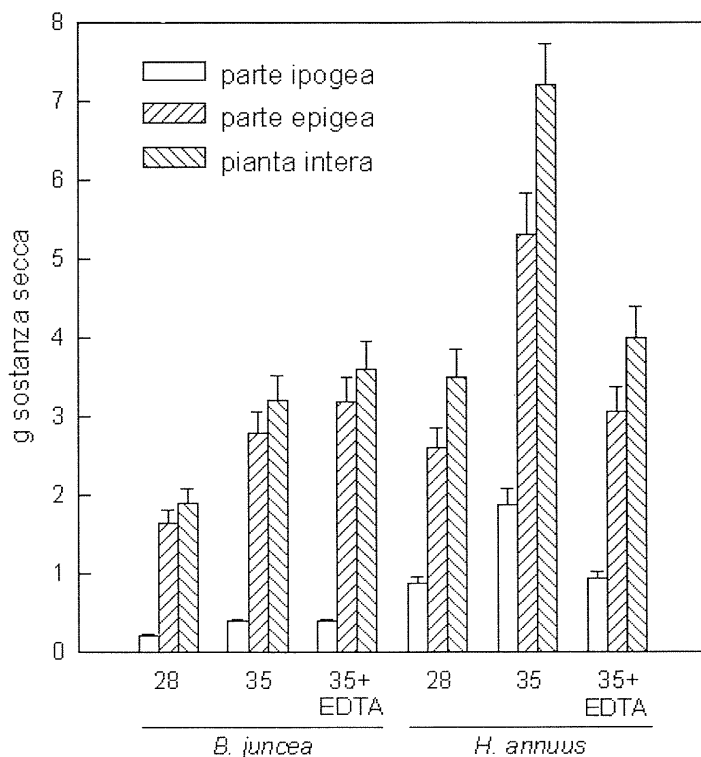


Fig. 1. Peso secco di piante di *Brassica juncea* ed *Helianthus annuus* cresciute in un suolo contaminato da più metalli e sottoposte a trattamento con EDTA per 7 giorni a partire dal 28° giorno dalla semina. I valori rappresentano la media ($n=20$) \pm ES.

Anche i dati sulla traspirazione mostrano che il girasole ha risentito negativamente dell'applicazione di EDTA (Fig. 2). Infatti, mentre la *B. juncea* non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i campioni di controllo e quelli trattati, il girasole cresciuto in presenza del chelante ha mostrato una netta riduzione del flusso di traspirazione che può essere messa in relazione con la riduzione di crescita osservata in questa specie.

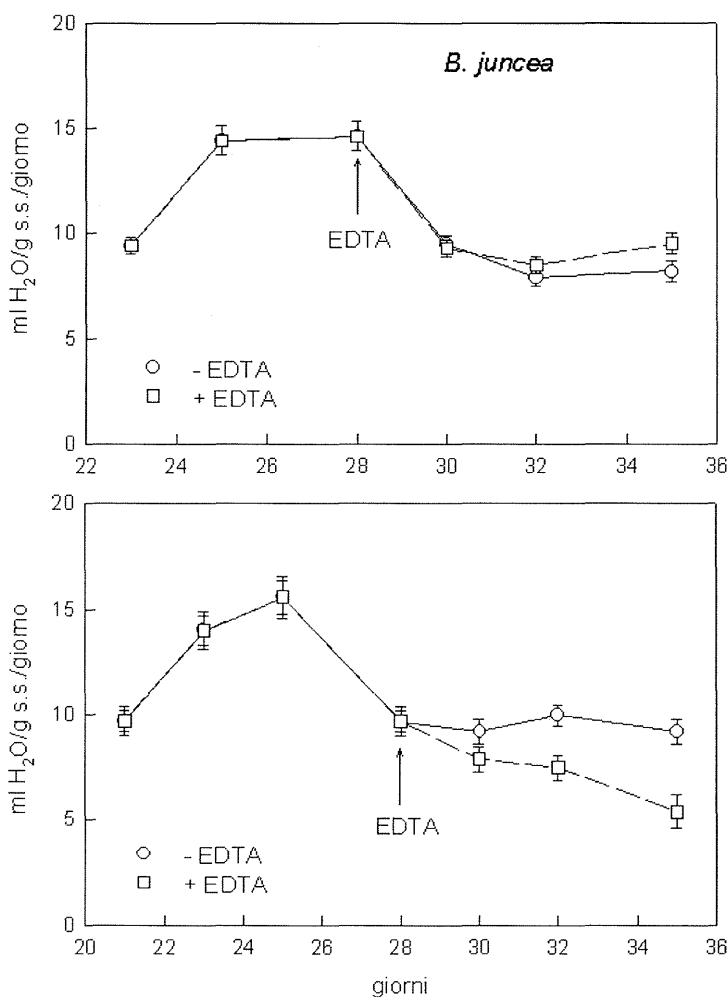


Fig. 2. Traspirazione di piante di *B. juncea* ed *H. annuus* cresciute in un suolo contaminato da più metalli e sottoposte a trattamento con EDTA per 7 giorni a partire dal 28° giorno dalla semina. I valori rappresentano la media ($n=10$) \pm ES.

E' noto infatti che la capacità della pianta di assorbire e traslocare gli elementi è legata all'efficienza del processo traspiratorio (Blaylock *et al.*, 1997). La diminuzione della traspirazione verificatasi in entrambe le specie nell'ultima settimana di crescita è da imputarsi ad un abbassamento della temperatura riscontrata in quel periodo.

Per quanto riguarda la *B. juncea* cv 426308, i dati mostrano che per tutti i metalli tossici l'applicazione di EDTA ha aumentato il loro contenuto per pianta (Fig. 3). I risultati sono stati riportati per pianta e non per grammo di sostanza secca in modo da tener conto della notevole disformità nella produzione di biomassa da parte delle diverse specie, che spesso rende la comparazione tra le capacità di accumulo non immediata.

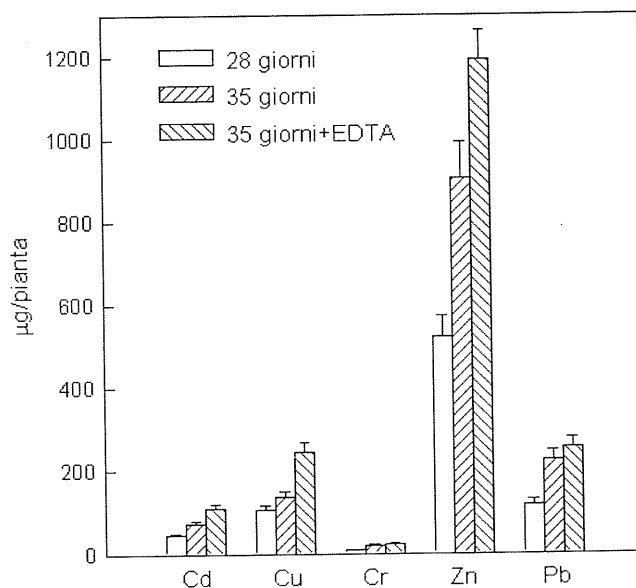


Fig. 3. Contenuto di metalli di piante di *B. juncea* cresciute in un suolo contaminato da più metalli e sottoposte a trattamento con EDTA per 7 giorni a partire dal 28° giorno dalla semina. I valori rappresentano la media ($n=3$) \pm ES.

L'effetto del chelante si è dimostrato maggiore in modo particolare per il rame e lo zinco, mentre, contrariamente a quanto riportato in altri studi (Blaylock *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1997), il piombo non ha risentito in maniera particolare del trattamento con EDTA probabilmente a causa del valore di pH del terreno. Inoltre, è probabile che l'interazione tra i metalli presenti contemporaneamente nel terreno non abbia permesso alla pianta di assorbire il piombo con la stessa efficienza riscontrata nei lavori sopra menzionati dove il piombo era l'unico elemento tossico aggiunto al terreno.

In generale, la somministrazione di EDTA ha incrementato in *B. juncea* la percentuale dei metalli traslocati nella parte aerea (Fig. 4), ad eccezione del cromo che peraltro ha mostrato mediamente la più alta traslocazione (circa il 70%). Più che il contenuto di metalli nella pianta, un'efficace applicazione della fitoestrazione nella bonifica di suoli inquinati presuppone che gli elementi tossici siano attivamente traslocati verso la parte aerea, che generalmente è quella più facilmente raccoglibile meccanicamente.

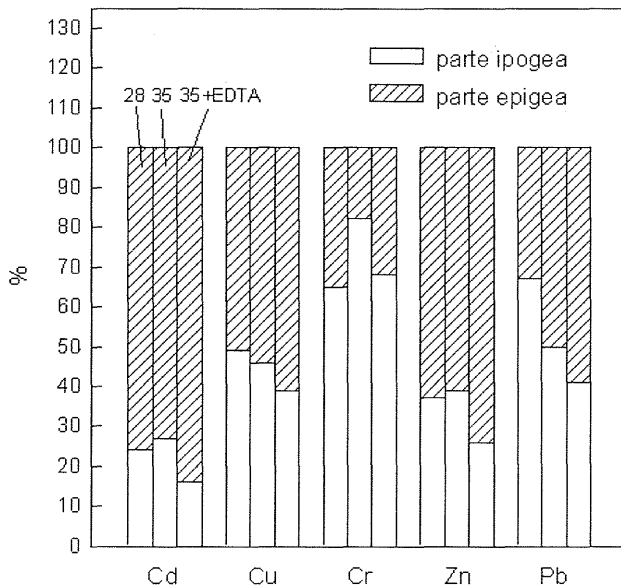


Fig. 4. Distribuzione percentuale degli elementi nelle parti di *B. juncea* cresciuta in un suolo contaminato da più metalli e sottoposta a trattamento con EDTA per 7 giorni a partire dal 28° giorno dalla semina.

Al contrario di quanto avviene per *B. juncea*, nel girasole il trattamento con EDTA ha determinato una netta riduzione del contenuto dei metalli per pianta ad esclusione dello zinco (Fig. 5). Il blocco dell'assorbimento di cadmio, rame, cromo e piombo può essere messo in relazione sia all'effetto tossico del chelante sulla crescita della pianta e sulla produzione di sostanza secca (Fig. 1) che alla minore traspirazione riscontrata a seguito del trattamento (Fig. 2). In uno studio precedente su *B. juncea*, Espen et al. (2000) avevano già osservato una relazione diretta tra entità della traspirazione ed accumulo di cadmio nelle foglie. A differenza della *B. juncea*, il girasole, ibrido Benvenuto, sembra possedere una assai minore capacità di tollerare l'EDTA.

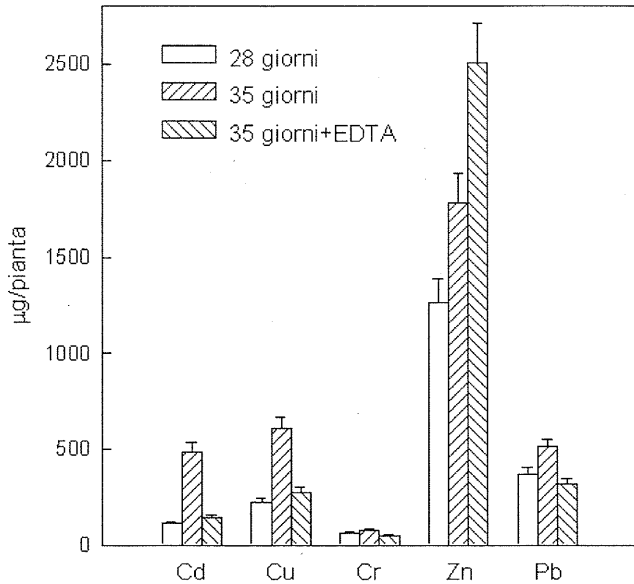


Fig. 5. Contenuto di metalli di piante di *H. annuus* cresciute in un suolo contaminato da più metalli e sottoposte a trattamento con EDTA per 7 giorni a partire dal 28° giorno dalla semina. I valori rappresentano la media ($n=3$) \pm ES.

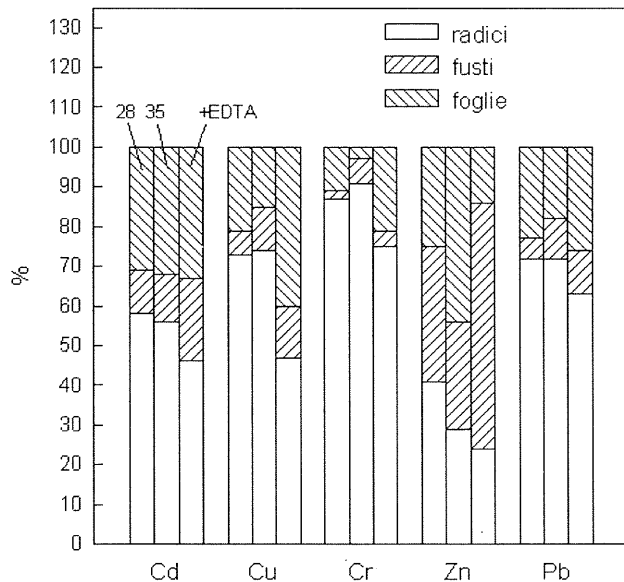


Fig. 6. Distribuzione percentuale degli elementi nelle parti di *H. annuus* cresciuto in un suolo contaminato da più metalli e sottoposto a trattamento con EDTA per 7 giorni a partire dal 28° giorno dalla semina.

Anche nel girasole la somministrazione di EDTA, pur causando un arresto dell'assorbimento, ha determinato una redistribuzione degli elementi con una maggiore traslocazione verso le parti aeree, il cromo risultando ancora l'elemento maggiormente traslocato (Fig. 6).

Il trattamento con EDTA, quindi, ha favorito l'assorbimento dei metalli solamente nella *B. juncea*, mentre nel girasole si è avuto un arresto dell'accumulo dei diversi elementi. Tale decremento nell'assorbimento è probabilmente imputabile agli effetti tossici dei metalli e del chelante sul metabolismo generale della specie e/o all'incapacità della pianta di contrastare gli effetti negativi della produzione di forme attivate dell'ossigeno che, provocando alterazioni nei processi correlati alla ATPasi di membrana ed inibendo il processo fotosintetico netto (Baszynski *et al.*, 1988; Ciscato *et al.*, 1996; Lidon *et al.*, 1993), ha determinato una riduzione nella produzione di biomassa.

Il comportamento osservato nelle due specie potrebbe essere imputato alla diversa capacità di detossificazione delle specie attivate dell'ossigeno, che si accumulano in presenza di quantità tossiche di metalli (Navari-Izzo *et al.*, 1998; Navari-Izzo e Quartacci, 2001). Anche in *Brassica juncea* potrebbe aver funzionato un meccanismo analogo a quello osservato in *R. sativus*, cresciuto sullo stesso suolo inquinato usato nel presente studio, e che ha mostrato buona capacità di accumulo di metalli senza diminuzione significativa di biomassa (Quartacci *et al.*, 2001). In tale pianta il decremento della quantità di glutazione ridotto potrebbe giustificare, oltre al suo utilizzo per contrastare lo stress ossidativo, l'aumento di cinque volte delle fitochelatine da cui vengono sintetizzate (Cobbett, 2000).

E' stato proposto che un sistema perossidasi/fenoli/ascorbato rappresenti un efficiente meccanismo di detossificazione del perossido di idrogeno diffuso nei vacuoli (Takahama e Oniki, 1997). I composti fenolici possono infatti inibire la formazione dei radicali liberi e la propagazione delle reazioni da essi innescate attraverso la chelazione dei metalli (Brown *et al.*, 1998). Essi possono inoltre agire come antiossidanti formando radicali fenossilici in virtù della loro capacità di fungere, in presenza di perossidasi, da donatori primari di elettroni al perossido di idrogeno, accumulatosi nel vacuolo in seguito allo stress ossidativo. I radicali fenossilici possono essere ridotti sia dall'ascorbato che dal radicale monodeidroascorbato, i quali fungono da donatori di elettroni secondari (Navari-Izzo e Quartacci, 2001). Alte concentrazioni di asorbato, come quelle ritrovate in *R. sativus* (Sgherri *et al.*, 2000), possono essere sufficienti a fornire equivalenti riducenti ai radicali fenossilici in modo da giustificare l'aumento dei fenoli osservato in presenza di metalli tossici.

Una interrelazione tra il sistema perossidasi/fenoli/ascorbato del vacuolo e il ciclo NADPH/glutazione/ascorbato del citoplasma nonché la sintesi di fitochelatine dal glutatione (Sgherri *et al.*, 2000; Navari-Izzo e Quaracci, 2001) potrebbe potenziare la rimozione del perossido di idrogeno ed aumentare la tolleranza delle piante cresciute in terreni inquinati da metalli.

Il lavoro è stato finanziato dal MURST (cofinanziamento 1998) e dall'Università di Pisa (fondi di Ateneo 1999).

Bibliografia

- ARUOMA O.I., CUPPET S.L., 1997. *Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts*, AOCS Press, Champaign, IL, 450 pp.
- AUST S.D., MORHEOUSE L.A., THOMAS C.E., 1998. Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radical Biology and Medicine*, 1: 3-25.
- BAKER A.J.M., McGRATH S.P., REEVES R.D., SMITH J.A.C., 1999. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. (N. Terry, G.S. Bañuelos eds.), CRC Press Inc, Boca Raton, FL, USA pp. 85-107.
- BASZYNSKI T., TUKENDORF A., RUSZKOWSKA M., SKORZYNSKA E., MAKSYMIEC W., 1988. Characteristic of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *Journal of Plant Physiology*, 132: 708-713.
- BLAYLOCK M.J., SALT D.E., DUSHENKOV S., ZAKHAROVA O., GUSMAN C., KAPULNIK Y., ENSLEY B.D., RASKIN I., 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science and Technology*, 31: 860-865.
- BROWN J.E., KHODR H., HIDER R.C., RICE-EVANS C.A., 1998. Structural dependence of flavonoid interaction with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330: 1173-1178.
- CISCATO M., VALCKE R., VAN LOVEN K., CLIJSTERS H., NAVARI-IZZO F., 1997. Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* Desf. cultivars with different stress sensitivity. *Physiologia Plantarum*, 100: 901-908.
- COBBETT C.S., 2000. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, 123: 825-832.
- COOPER E.M., SIMS J.T., CUNNINGHAM S.D., HUANG J.W., BERTI W.R., 1999. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *Journal of Environmental Quality*, 28: 1709-1719.
- CUNNINGHAM S.D., OW D.W., 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*, 110: 715-719.
- EBBS S.D., KOCHIAN L.V., 1998. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental Science and Technology*, 32: 802-806.
- EPSTEIN A.L., GUSSMAN C.D., BLAYLOCK M.J., YERMIYAHU U., HUANG J.W., KAPULNICK Y., ORSER C.S., 1999. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant and Soil*, 208: 87-94.
- ESPEN L., RIVETTA A., COCUCCI M., 2000. Meccanismi di tolleranza in risposta al Cd^{2+} in due cultivar di *Brassica juncea*. *Atti del XVIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria*. Catania, 20-22 Settembre.
- HUANG J.W., CHEN J., BERTI W.H., CUNNINGHAM S.D., 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology*, 31: 800-805.

- HUANG J.W., CUNNINGHAM S.D., 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*, 134: 75-84.
- KULLI B., BALMER M., KREBS R., LOTHENBACH B., GEIGER G., SCHULIN R., 1999. The use of nitrilotriacetate on heavy metal uptake of lettuce and ryegrass. *Journal of Environmental Quality*, 28: 1699-1705.
- LAKANEN E., ERVIÖ R., 1971. A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils. *Suomi Maataloustiet Seuran Julk.*, 123: 232-233.
- LIDON F.C., RAMALBO J.C., HENRIQUES F.S., 1993. Copper inhibition of rice photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 142: 12-17.
- McGRATH S.P., 1998. Phytoextraction for soil remediation. In: *Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining* (R.R. Brooks ed.), CAB International, Oxon, UK, pp. 261-287.
- McRAE S.G., 1988. *Practical pedology: studying soils in the field*. Ellis Horwood, Chichester, 369 pp.
- NAVARI-IZZO F., PINZINO C., QUARTACCI M.F., SGHERRI C.L.M., 1999. Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PSII membrane fragments from wheat. *Free Radical Research*, 31: S3-9.
- NAVARI-IZZO F., QUARTACCI M.F., 2001. Phytoremediation of metals: tolerance mechanisms against oxidative stress. *Minerva Biotechnologica*, in the press.
- NAVARI-IZZO F., QUARTACCI M.F., MELFI R., IZZO R., 1993. Lipid composition of plasma membrane isolated from sunflower seedlings grown in water stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 87: 508-514.
- NAVARI-IZZO F., QUARTACCI M.F., PINZINO C., DALLA VECCHIA F., SGHERRI C.L.M., 1998. Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper. *Physiologia Plantarum*, 104: 630-638.
- QUARTACCI M.F., COSI E., NAVARI-IZZO F., 2001. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *Journal of Experimental Botany*, 52: 67-75.
- QUARTACCI M.F., PINZINO C., SGHERRI C.L.M., DALLA VECCHIA F., NAVARI-IZZO F., 2000. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiologia Plantarum*, 108: 87-93.
- QUARTACCI M.F., PINZINO C., SGHERRI C.L.M., NAVARI-IZZO F., 1995. Lipid composition and protein dynamics in thylakoid of two cultivars differently sensitive to drought. *Plant Physiology*, 108: 191-197.
- SALOMONS W., STIGLIANI W.M., *Biogedynamics of pollutants in soils and sediments: Risk assessment of delayed and non-linear responses*. Springer, Berlin, 322 pp.
- SGHERRI C., COSI E., MENEGUZZO S., NAVARI-IZZO F., 2000. Aspetti biochimici della tolleranza al rame in *Raphanus sativus* cv Rimbo. *Atti del XVIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria*. Catania, 20-22 Settembre
- SGHERRI C.L.M., NAVARI-IZZO F., 1995. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit. Oxidative stress and defense mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 93: 25-30.
- TAKAHAMA U., ONIKI T., 1997. A peroxidase/phenolic/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum*, 101: 845-852.

STUDIO DI ALCUNI FATTORI CHE DETERMINANO L'EFFICIENZA DELLA TECNICA DI FITOESTRAZIONE ASSISTITA IN UN SUOLO INQUINATO DA PIOMBO

Sacchi G.A.¹, Rivetta A.¹, Abruzzese A.¹, Lucchini G.¹,
Paganetto A.², Gambale F.², Cocucci M.¹

¹ Dipartimento di Produzione Vegetale, Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2 - 20133 Milano

² Istituto di Cibernetica e Biofisica, CNR-Genova

Introduzione

L'utilizzo delle piante per la bonifica di suoli o acque contenenti inquinati inorganici è da qualche anno al centro di molte ricerche. Questa strategia, definita phytoremediation, è compresa nel novero più ampio di metodologie di bonifica ambientale che prevede l'uso di organismi viventi, conosciute con il termine di bioremediation. I più comuni inquinanti inorganici presenti nei suoli sono metalli pesanti e metalli ossianionici quali Cu, Zn, Mn, Co, Se, Ni, Cr, Cd, Pb, Hg, As. Alcuni di questi sono nutrienti essenziali per le piante.

Tra le diverse tecniche di phytoremediation la fitoestrazione (Salt *et al.*, 1998) sembra essere la più promettente. Essa è basata sull'assorbimento dell'inquinante dal suolo, sulla sua traslocazione al germoglio e quindi sull'accumulo in organi, quasi sempre foglie, di facile raccolta. La biomassa contenente l'inquinante è infine incenerita. Diverse prove condotte su media scala indicano che la fitoestrazione permetterebbe un sensibile abbattimento dei costi di bonifica (-75%) rispetto alle tecnologie tradizionali (Salt *et al.*, 1995). Il limite più evidente della fitoestrazione risiede nei tempi piuttosto elevati (dai 5 ai 7 anni per livelli d'inquinamento medio-alti) e ciò ne circoscrive gli ambiti di applicabilità. Parecchi studi sono oggi dedicati al miglioramento dell'efficienza della fitoestrazione. La natura e la concentrazione dell'inquinante, le caratteristiche chimico-fisiche del suolo e quelle morfologiche e fisiologiche della pianta, sono gli elementi principali che nel loro insieme determinano l'efficienza del processo. Per ogni raccolto l'ammontare totale d'inquinante rimosso è il risultato del prodotto tra la quantità di biomassa raccolta e la concentrazione media dell'inquinante in essa. Il miglioramento di questi due fattori è un obiettivo della ricerca in questo campo.

Alcune piante tollerano e, quindi, accumulano nei loro tessuti concentrazioni elevate di metalli pesanti. Tali specie, definite iperaccumulatrici, concentrano in modo più o meno specifico nelle loro foglie metalli in concentrazioni anche superiori al 5% del peso secco (McGrath, 1997). La maggior parte delle iperaccumulatrici naturali conosciute appartengono ai generi *Thlaspi* (efficienti per Zn, Cu ed in minor misura Cd), *Silene* (per Zn) ed *Alyssum* (per Ni ed in minor misura per Cu). Purtroppo queste iperaccumulatrici sono caratterizzate da una crescita lenta e contenuta soprattutto nei nostri climi. Un certo interesse suscita una specie coltivata soprattutto nel continente asiatico, la *Brassica juncea* o senape indiana, che associa una discreta capacità di accumulo, anche se non paragonabile a quella delle iperaccumulatrici propriamente dette, ad una buona produzione di biomassa.

Il miglioramento genetico, tradizionale o biotecnologico, delle piante costituisce una possibilità di sviluppo della fitoestrazione. La possibilità di incrementare significativamente la biomassa delle iperaccumulatrici è alquanto remota; al contrario quella di migliorare le capacità di accumulo di metalli pesanti in piante di elevata biomassa e normalmente coltivate (oltre a *B. juncea* ad esempio mais, tabacco o girasole) sembra più praticabile. La capacità di accumulo è la risultante dell'assorbimento radicale e della traslocazione del metallo nella parte aerea della pianta e della efficienza dei sistemi metabolici che ne limitano gli effetti tossici a livello cellulare e/o tissutale. Molti aspetti relativi ai meccanismi implicati nell'assorbimento e nella traslocazione dei metalli (Guerinot, 2000; Williams *et al.*, 2000, Lombi *et al.*, 2001) e nei processi metabolici in grado di limitarne gli effetti tossici (Sacchi *et al.*, 1999; Clemens, 2001) sono in via di definizione. Ad esempio la disponibilità dello ione solfato nel suolo, la capacità delle piante di assorbirlo, traslocarlo e ridurlo sino a sintetizzare glutatione e fitochelatine con le quali chelare e quindi inattivare il metallo, sono essenziali per la detossificazione di Cd, Cu e Zn. Studi per la definizione delle basi biochimiche e molecolari di questa sequenza sono in corso nel nostro laboratorio in mais ed in *B. juncea* (Nocito *et al.*, 2000; Espen *et al.*, 2000).

La biodisponibilità dell'inquinante nel suolo costituisce un limite di efficienza della fitoestrazione. Questo è particolarmente evidente per il Pb che nel suolo forma complessi con la materia organica, si adsorbe sulle argille, e precipita in forma di carbonato, idrossido e fosfato (Mc Bridee, 1994); inoltre per questo metallo non si conoscono accumulatrici. Nella vegetazione cresciuta su suoli altamente inquinati i contenuti massimi misurati di Pb sono nell'intervallo di 0,01-0,06% su base di peso secco (Huang and Cunningham, 1996).

La fitoestrazione indotta o chelante assistita (Salt *et al.*, 1998)

potenzialmente può rimuovere alcuni dei limiti della tecnica. Questa consiste nell'uso di piante dotate di eccellente biomassa e non necessariamente efficienti nell'accumulo dell'inquinante. La pianta è coltivata sino al massimo della sua biomassa e solo a questo punto la biodisponibilità del metallo è drasticamente aumentata con l'applicazione al suolo di chelanti solubilizzanti quali ad esempio l'acido etilendiammino tetracetico (EDTA). Il complesso metallo-chelante è assorbito dalle radici e quindi traslocato alle foglie con il flusso traspirazionale. L'elevata traspirazione della pianta, dotata di ampia superficie fogliare, e la contenuta tossicità del metallo complessato, permettono accumuli di quantità interessanti dell'inquinante. Alcuni giorni dopo l'applicazione del chelante, quando generalmente appaiono sulle foglie evidenti sintomi di tossicità, la pianta è raccolta ed avviata all'incenerimento.

La fitoestrazione chelante-assistita si è rivelata efficace soprattutto per il Pb, per il quale sono riportati accumuli nel germoglio che arrivano sino all'1% su base di peso secco (Blaylock *et al.*, 1997) e, seppur in modo meno evidente, per Zn e Cd. Tuttavia, gran parte dei risultati si riferiscono a prove condotte in ambiente controllato (vasi in serra) o in lisimetri in ambienti aperti e soltanto in pochissimi casi a sperimentazioni di pieno campo. Inoltre va sottolineato che i risultati di bioaccumulo più soddisfacenti sono stati ottenuti allevando le piante in soluzioni idroponiche o aggiungendo a suoli non contaminati sali di Pb (nitrati, solfati o cloruri), in condizioni cioè piuttosto lontane da quelle reali.

L'applicazione su larga scala della fitoestrazione chelante-assistita solleva alcuni problemi non trascurabili di impatto ambientale. La solubilizzazione dell'inquinante dovuta al chelante può determinare la sua lisciviazione verso gli strati profondi e quindi verso la falda. Oltre all'inquinante possono essere lisciviati nutrienti essenziali con effetti non trascurabili sulla fertilità del suolo. Infine la persistenza del chelante, che potrebbe anche essere elevata, mantiene l'inquinante biodisponibile per periodi prolungati, limitando la germinazione dei semi e la crescita delle colture successive previste dal programma di bonifica. Questi problemi hanno decretato un progressivo e troppo precoce declino d'interesse nei riguardi della fitoestrazione assistita.

L'analisi più approfondita del ruolo che alcune variabili svolgono nel processo quali tipo di chelante, dose di applicazione e specie vegetale da utilizzare, potrebbero rilanciare l'interesse per la tecnica. In particolare per quanto riguarda la scelta del chelante, l'efficienza nel solubilizzare il Pb, la capacità con cui il chelante complessato con il metallo permea le membrane delle cellule della radice ed è traslocato nello xilema, rappresentano punti essenziali. A partire da queste considerazioni, nell'ambito di un pro-

getto UE Life-Environment (<http://www.phyles.ge.cnr.it>) teso alla costituzione di un impianto pilota di phytoremediation per la bonifica di un suolo inquinato da Pb, la nostra ricerca si è posta come obiettivi preliminari: a) la valutazione dell'efficienza con cui chelanti diversi solubilizzano il Pb nel suolo in esame; b) l'identificazione della combinazione chelante-metallo che determina livelli di Pb più elevati nello xilema di piante di girasole; c) la valutazione per ciascuno dei chelanti esaminati dell'efficienza totale di fitoestrazione del metallo dal suolo.

Materiali e metodi

Caratteristiche del suolo

Il suolo in esame proviene da un sito localizzato nel comune di Arcola (SP) contaminato con Pb in seguito alla deposizione di polveri provenienti da un cumulo di scorie di lavorazione di una adiacente industria metallurgica. Il suolo è stato campionato ed analizzato secondo i "Metodi Ufficiali di Analisi Chimica del Suolo" dopo essere stato essiccato all'aria e setacciato a 2 mm. Caratteristiche principali del suolo: sabbia 345 g kg⁻¹; limo 595 g kg⁻¹; argilla 60 g kg⁻¹; pH (H₂O) 7,5; C-org 11,7 g kg⁻¹; TKN 1,5 g kg⁻¹; C.S.C. 14,1 cmol₍₊₎ kg⁻¹; Mg²⁺ scambiabile 174 mg kg⁻¹; Ca²⁺ scambiabile 2929 mg kg⁻¹; K⁺ scambiabile 62,5 mg kg⁻¹; Na⁺ scambiabile 27,3; Pb totale 350 mg kg⁻¹. I livelli di Pb risultavano omogenei per una profondità di circa 50 cm e questo in seguito alle lavorazioni dovute all'uso agrario del sito.

Efficienza di solubilizzazione del Pb

Venti g di suolo secco erano incubati in 30 ml di soluzione estraente (pH 6.8) contenente dosi crescenti (1, 2,5, 5, o 10 mmol kg⁻¹ suolo secco) di cinque diversi chelanti. I campioni erano mantenuti in agitazione continua in un bagno termostato a 26 °C. A tempi diversi dai campioni erano prelevati 2 ml di sospensione che erano quindi centrifugati a 500 x g per 5 min. Il surnatante così ottenuto era filtrato su nitrocellulosa (Millipore Ø 0,25 µm). Sul filtrato erano determinati, mediante spettrofotometria di assorbimento atomico (AAS), i livelli di Pb. Gli esperimenti sono stati eseguiti tre volte in quadruplo.

Sono stati utilizzati i seguenti chelanti: acido etilendiammino tetracetico [EDTA]; acido (N-N'-di(2-idrossibenil)etilendiammino-N,N'-diacetico monidrocloreuro idrato [HBED]; acido (N-(2-idrossietil)-etilendiammino-triacetico [HEDTA]; acido dietilentriammino penta acetico [DTPA]; acido nitrilotriacetico [NTA].

Assorbimento e traslocazione nello xilema

Piante di girasole erano allevate in camera di crescita (fluenza fotonica $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, fotoperiodo di 16 h di luce) in una soluzione nutritiva (1/4 Hogland) per 21 giorni (stadio di terza foglia completamente distesa). Dopo tale periodo il germoglio era reciso immediatamente sotto il nodo cotiledonare. L'apparato radicale era quindi immerso in 400 ml di una soluzione contenente $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM e uno dei diversi chelanti in concentrazione 1,1 mM. L'ipocotile della pianta era quindi inserito nel foro di una camera a pressione che era poi chiusa ermeticamente. All'interno della camera era applicata una pressione di 0,4 MPa e si raccoglievano le frazioni di essudato xilematico fuoriuscite dalla sezione di taglio ogni 5 min per un totale di 7 ore. Sulle diverse frazioni erano valutati i livelli di Pb, attraverso AAS. Nel solo caso dell'EDTA, i livelli del chelante nel liquido effluo dal fusto sono stati determinati per HPLC in accordo con il metodo descritto da Berges e de Groot (1994). Gli esperimenti sono stati eseguiti due volte in quadruplo.

Prove di fitoestrazione

Piante di girasole sono state cresciute a partire da seme sino allo stadio di tre palchi fogliari in vasi contenenti 300 g di suolo contaminato mantenuto costantemente al 70-80% della sua capacità idrica massima. Si procedeva quindi alla somministrazione al suolo di volumi adeguati di soluzioni di uno dei 5 diversi chelanti in modo che la dose somministrata fosse 1, 2,5, 5 o 10 mmol kg^{-1} suolo. Per i cinque giorni successivi al trattamento, ogni 24 h, sono stati effettuati prelievi (circa 1 ml) della soluzione del suolo utilizzando campionatori a siringa (rhizon, Eijkelkamp, NL) inseriti al centro del vaso ad una profondità di circa 5 cm. Nelle soluzioni così ottenute sono stati determinati i livelli di Pb, mediante AAS e, solo nei casi dell'EDTA e dell'HEDTA, i livelli del chelante per HPLC (Berges e de Groot, 1994). Dopo 5 giorni, quando apparivano evidenti sintomi di tossicità sulle foglie, le piante erano recise al colletto, sezionate in foglie e fusto e quindi essiccate all'aria a 60 °C. Il materiale vegetale così ottenuto era quindi mineralizzato a 150 °C in $\text{HCl} : \text{HNO}_3$ 1:3 (v/v). Il residuo era quindi solubilizzato in 2 ml di HNO_3 20% (v/v) e analizzato per il contenuto in Pb mediante AAS. Gli esperimenti descritti sono stati eseguiti tre volte in quintuplo.

Risultati e discussione

Tra i diversi chelanti analizzati EDTA risultava il più efficiente nella solubilizzazione del Pb presente nel suolo. Risultati solo leggermente

inferiori erano ottenuti per DTPA e HEDTA. Infatti come è possibile osservare in Figura 1 alla dose maggiore di questi composti, già dopo 12 ore di incubazione, si registravano i livelli più elevati di Pb nella fase acquosa della sospensione di suolo: circa 150, 130 e 120 mg l⁻¹ rispettivamente.

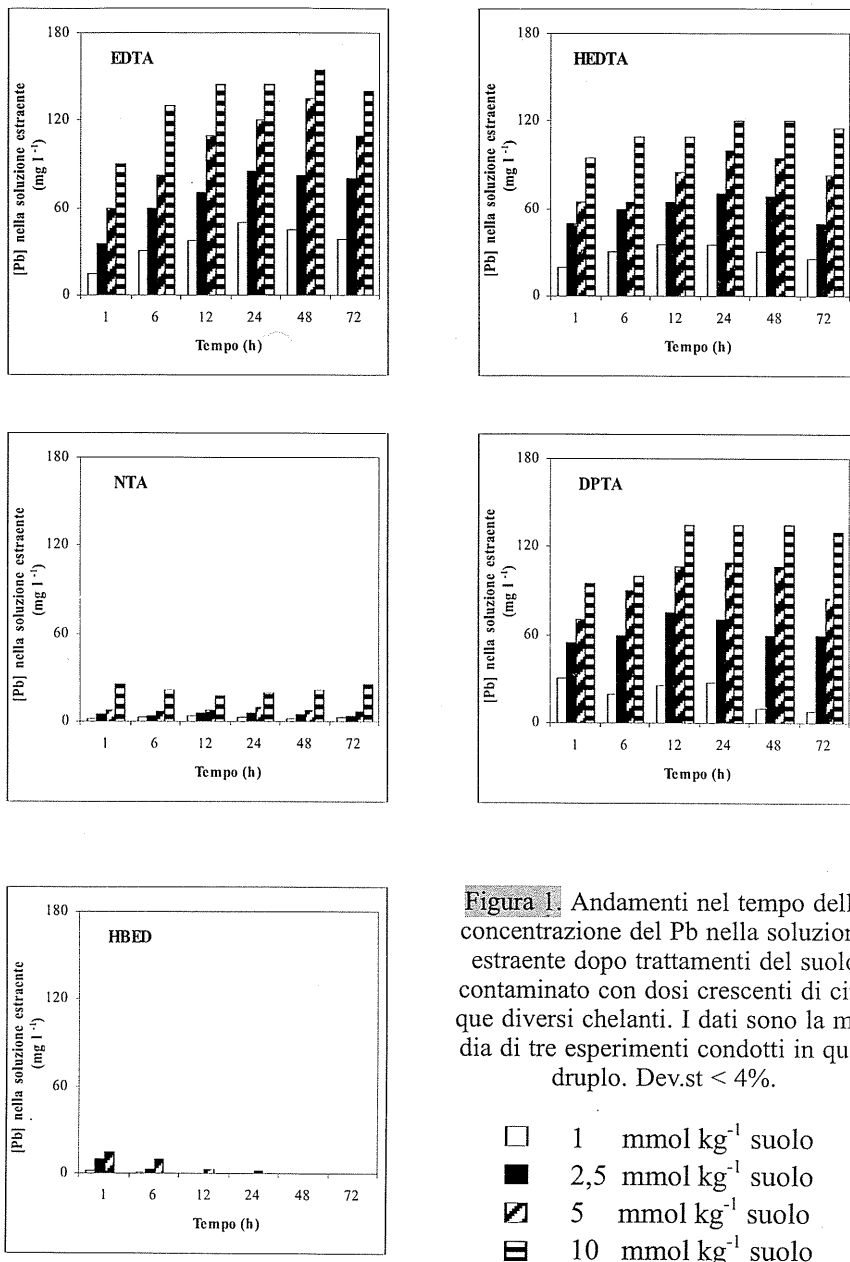


Figura 1. Andamenti nel tempo della concentrazione del Pb nella soluzione estraente dopo trattamenti del suolo contaminato con dosi crescenti di cinque diversi chelanti. I dati sono la media di tre esperimenti condotti in quadruplo. Dev.st < 4%.

- 1 mmol kg⁻¹ suolo
- 2,5 mmol kg⁻¹ suolo
- ▨ 5 mmol kg⁻¹ suolo
- ▩ 10 mmol kg⁻¹ suolo

Tali livelli si mantenevano sostanzialmente immutati per la durata complessiva (3 giorni) della prova. NTA e HBED solubilizzavano quantità di metallo nettamente inferiori; inoltre, nel caso di quest'ultimo chelante, il Pb in un primo momento mobilizzato perdeva progressivamente solubilità. Nel caso dei tre chelanti più efficienti, tra la dose di 5 mmol kg⁻¹ suolo e quella massima si registravano differenze limitate (+20% circa) nei livelli di Pb nella fase solubile. I comportamenti descritti sono analoghi a quelli riportati da Wu *et al.* (1999) che si riferiscono ad un suolo contaminato artificialmente.

La tecnica della camera a pressione permette di valutare l'efficienza con cui sostanze di diversa natura sono assorbite dalle radici e traslocate nello xilema. Tale efficienza, sostanzialmente determinata dalle caratteristiche chimico-fisiche delle molecole in esame (Sicbaldi *et al.*, 1997), può essere espressa dal transpiration stream concentration factor (TSCF) che rappresenta il rapporto tra la concentrazione raggiunta della molecola nello xilema e la sua concentrazione nella soluzione in cui sono immerse le radici (Hsu *et al.*, 1990). L'applicazione di una pressione all'apparato radicale permette di raccogliere in tempi brevi volumi di fluido xilematico sufficienti per scopi analitici; nel nostro caso per la valutazione, attraverso AAS, del contenuto in Pb. La tecnica in sé non fornisce indicazioni quantitative, ma solo qualitative; infatti le concentrazioni reali di sostanze nello xilema e l'entità della loro traslocazione al germoglio dipendono largamente dall'entità della traspirazione, che ovviamente in questo caso non esiste. In assenza di qualsiasi chelante nella soluzione d'incubazione delle radici, nel liquido essudato dal fusto non risultavano livelli determinabili di Pb, indicando che la radice del girasole costituisce una barriera impermeabile al metallo tal quale, e che l'eventuale piccola frazione di esso assorbita non è traslocata allo xilema. Solamente quando il metallo era complessato da uno dei chelanti risultava assorbito e traslocato nello xilema. In questo caso, la concentrazione di Pb nel liquido fluito dal fusto, dopo un picco transiente registrabile nei primi 10 min, si stabilizzava intorno a valori costanti, seppur diversi, per i cinque chelanti, che si mantenevano tali anche per tempi prolungati. Tale concentrazione è stata utilizzata per calcolare i valori di TSCF per il Pb determinati dalla presenza nella soluzione in cui erano immerse le radici di uno dei cinque diversi chelanti. Tra i cinque chelanti analizzati NTA risulta il più efficace, infatti in sua presenza il TSCF del Pb risultava il più elevato seguito da HEDTA ed EDTA, mentre DTPA e soprattutto HBED risultavano meno efficienti (Tab. 1). Si può concludere quindi che le caratteristiche chimico-fisiche del complesso Pb-NTA sono ottimali per l'assorbimento nelle radici e per il caricamento nel liquido xilematico.

Tabella 1. Valori di TSCF per il Pb determinate dall'incubazione di diversi chelanti. I dati sono la media di due esperimenti condotti in quadruplo. Dev.st < 8%.

	Nessuno	EDTA	DTPA	NTA	HBED	HEDTA
TSCFPb	-	0,27	0,12	0,42	0,07	0,21

Quando le radici erano incubate in presenza di concentrazioni pressoché equimolari di Pb ed EDTA l'andamento delle concentrazioni del metallo e del chelante nelle frazioni di fluido xilematico indicano che con ogni probabilità che il Pb è assorbito dalle radici del girasole e traslocato allo xilema solo complessato al chelante (Fig. 2). Per le altre molecole sono in corso prove analoghe.

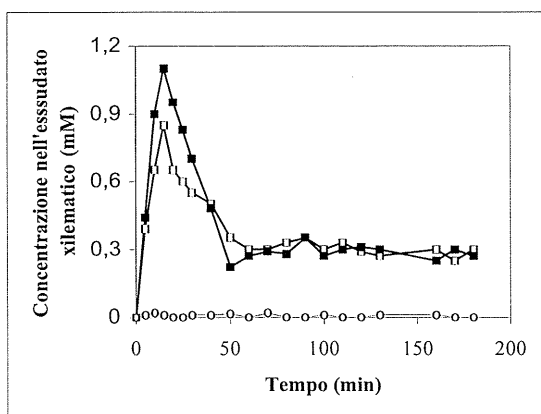


Figura 2. Andamento della concentrazione di Pb (□) e di EDTA (■) nel fluido essudato da fusti di piante di girasole dopo applicazione di pressione alle radici. I risultati sono la media di tre esperimenti in triplicato Dev.st < 5%

La capacità dei cinque chelanti di mobilizzare il piombo nella fase acquosa del suolo è stata valutata anche in prove in vaso in presenza della pianta. In Figura 3 sono riportati i livelli del metallo presenti nella soluzione del suolo nell'arco di tempo intercorso tra il momento di applicazione delle soluzioni di chelante sino alla raccolta delle piante (5 giorni). Anche in questo caso l'EDTA si dimostrava la molecola più efficiente. Per tutti i chelanti, nelle condizioni in vaso, sono necessarie circa 48 ore affinché la concentrazione di Pb solubile si stabilizzi. Nei diversi casi, l'applicazione della dose massima determinava incrementi non proporzionali della concentrazione del metallo solubile rispetto alla dose inferiore; questo era particolarmente evidente per EDTA ed HEDTA. Ciò determinava, alle alte dosi, la presenza nella soluzione del suolo di un considerevole eccesso di chelante. In particolare, i rapporti molari Pb:EDTA e Pb:HEDTA passavano rispettivamente da 0,3 e 0,27 per la dose 5 mmol kg⁻¹ suolo a 0,13 e 0,1 per la dose 10 mmol kg⁻¹ suolo.

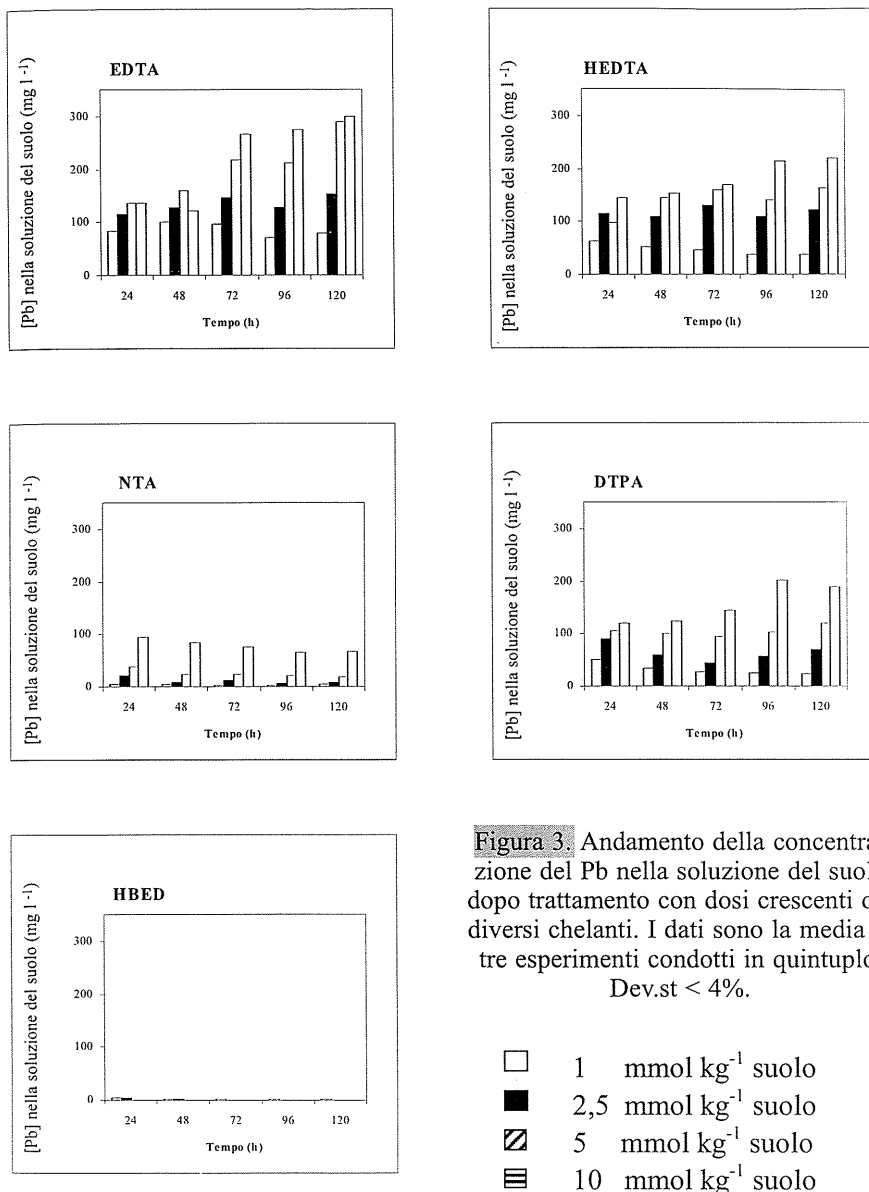
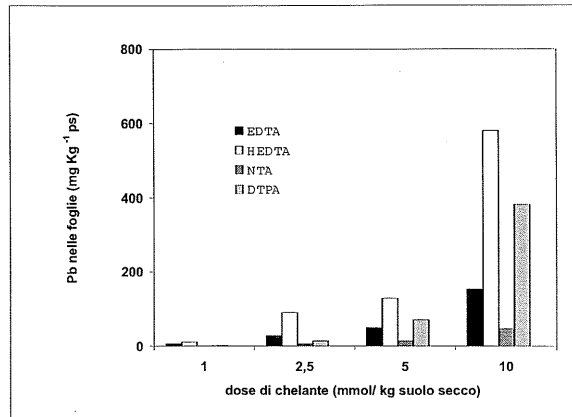


Figura 3. Andamento della concentrazione del Pb nella soluzione del suolo dopo trattamento con dosi crescenti dei diversi chelanti. I dati sono la media di tre esperimenti condotti in quintuplo. Dev.st < 4%.

L'effetto dei trattamenti del suolo con dosi crescenti dei chelanti sull'accumulo di Pb nelle foglie è riportato in Figura 4; in nessun caso i livelli del metallo nei fusti risultavano significativi e quindi non sono riportati. In assenza di qualsiasi trattamento al suolo non si riscontrano livelli dosabili di Pb nelle foglie. HEDTA risultava il chelante più efficiente nel de-

terminare l'accumulo di metallo nella pianta seguito da DTPA ed EDTA. Le differenze erano particolarmente evidenti alla dose più elevata. NTA e HBED determinavano livelli di Pb estremamente bassi.

Figura 4. Concentrazione del Pb nelle foglie di piante di girasole dopo 5 giorni dal trattamento del suolo con dosi crescenti dei diversi chelanti. I dati sono la media di tre esperimenti condotti in quintuplo. Dev.st <6%.



Quando i contenuti in Pb delle foglie (Fig. 4) sono messi in relazione alla concentrazione del metallo solubile nel suolo (Fig. 3) appare evidente come la solubilizzazione non rappresenti il limite determinante per l'accumulo nelle foglie. Infatti, nonostante l'EDTA risulti più efficiente nella solubilizzazione, DTPA e HEDTA determinano gli accumuli maggiori. La dose 5 mmol kg⁻¹ suolo di chelante sembra rappresentare un livello soglia al di sopra del quale gli accumuli di Pb crescono considerevolmente, in modo quasi esponenziale, in funzione della concentrazione del metallo in soluzione. Ciò suggerisce che gli eccessi di chelante agiscano sulla barriera fisiologica all'assorbimento di soluti costituita dalla permeabilità selettiva della membrana delle cellule radicali. E' noto infatti che EDTA, e probabilmente anche HEDTA, sono in grado di sequestrare ioni divalenti, soprattutto Ca²⁺ e Mg²⁺, dalle componenti pectiche delle pareti e dei gruppi polari della frazione lipidica delle membrane cellulari determinando perdita di funzionalità di quest'ultime (Kaszuba and Hunt, 1990; Vassil *et al.*, 1998).

Nelle condizioni sperimentali adottate la concentrazione massima di Pb raggiunta nelle foglie del girasole era circa 600 mg kg⁻¹ peso secco. Ipotizzando un simile accumulo per piante adulte cresciute in campo, per una produzione di biomassa secca valutabile intorno alle 8-10 t ha⁻¹, si può prevedere la rimozione di poco meno di 6 kg ha⁻¹ per ciclo colturale. Questa stima previsionale rappresenta un risultato poco interessante dal punto di vista applicativo poiché, tenuto conto della contaminazione esistente, il raggiungimento di livelli di contaminazione consoni allo standard agricolo e re-

sidenziale del terreno in oggetto richiederebbe tempi largamente superiori ai cento anni. Va inoltre sottolineato che la dose di chelante che occorre somministrare al suolo (10 mmol kg^{-1} suolo) per ottenere tale risultato è alquanto elevata e ciò incide pesantemente sia sui costi, sia sull'entità dei rischi ambientali che il suo utilizzo comporta.

I risultati ottenuti indicano l'esistenza di forti limiti all'applicabilità della tecnica della fitoestrazione chelante-assistita allo stato attuale delle conoscenze. Nello stesso tempo evidenziano che alcuni aspetti dei meccanismi chimico-fisici e fisiologici che ne possano determinare l'efficienza sono ancora poco conosciuti. Il chiarimento di questi aspetti potrebbe essere importante per la messa a punto di interventi migliorativi. In particolare nella sequenza solubilizzazione del metallo, permeazione delle membrane delle cellule radicali, caricamento nello xilema, traslocazione al germoglio ed accumulo nelle foglie, non esiste un chelante univocamente migliore. Ciò sollecita la ricerca di nuovi chelanti, o la messa a punto di trattamenti in grado di implementare l'assorbimento del complesso Pb-chelante nelle radici, processo che si è rilevato essere un punto limite. Un obiettivo importante è sicuramente la messa a punto di protocolli in grado di solubilizzare nel suolo la quota massima di Pb che la pianta è in grado di assorbire ed accumulare nel tempo evitando così problemi di persistenza di chelanti nel suolo e la lisciviazione di inquinanti e nutrienti. Obiettivo che l'abbandono della ricerca di base e la frettolosa applicazione su media scala della tecnica non hanno ancora permesso di perseguire efficacemente.

Bibliografia

- BERGERS P.J.M., DE GROOT A.C. 1994. The analysis of EDTA in water by HPLC. *Wat. Res.* 28: 639-642.
- BLAYLOCK M.J., SALT D.E., DUSHENKOV S., ZAKHAROVA O., GUSSMAN C. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 860-865.
- CLEMENS S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212: 475-486.
- ESPEN L., RIVETTA A., COCUCCI M. 2000. Meccanismi di tolleranza in risposta al Cd^{2+} in due cultivar di *Brassica juncea*. *Atti del VIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria*, 82.
- GUERINOT M. L. 2000. The ZIP family of metal transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465: 190-198.
- HSU F.C., MARXMILLER R.L., YANG, Y.S. 1990. Study of root uptake and xylem translocation of cinmethy and related compounds in detopped soybean roots using a pressure chamber technique. *Plant Physiol.*, 93: 1573-1578.
- HUANG J.W., CUNNINGHAM S.D. 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.*, 134: 75-84.
- KASZUBA M, HUNT G.R.A. 1990. Protection against membrane damage: a H-NMR investigation of the effect of Zn^{2+} and Ca^{2+} on the permeability of phospholipid vesicles. *J. Inorg. Biochem.*, 40: 217-225.
- LOMBI E., ZHAO F.J., MCGRATH S.P., YOUNG S.D., SACCHI G. A. 2001. Physiological evidence for a high-affinity

- cadmium transporter highly expressed in a *Thalpi caerulescens* ecotype. *New Phytol.*, 149: 53-60.
- McBRIDE M.B. 1994. In: *Environmental Chemistry of Soil*. Oxford University Press, New York, N Y, 406.
- McGRATH S.P. 1997. In: *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*. R.R. Brooks (ed). CAB International.
- NOCITO F., PIROVANO L., COCUCCI M., SACCHI G.A. 2000. Sulphate transport activity in maize root exposed to cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* 38, s164.
- SACCHI G.A., RIVETTA A., COCUCCI M. 1999. Assorbimento radicale e bioaccumulo di metalli pesanti nelle piante: problematiche e prospettive. In: *Impatto Ambientale di Metalli Pesanti ed Elementi in Tracce*. (E. Capri, R. Boccelli, S. Loffi, E. Lombi, eds), Pitagora Editrice Bologna, 65-76.
- SALT D.E., BLAYLOCK M., KUMAR N.P.B.A., DUSHENKOV V., ENSLEY B., CHET I., RASKIN I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13: 468-474.
- SALT D.E., SMITH R.D., RASKIN I. 1998. Phytoremediation. *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 49: 463-468.
- SICBALDI F., SACCHI G.A., TREVISAN M., DEL RE A.A.M. 1997. Root uptake and xylem translocation of pesticides from different chemical classes. *Pestic. Sci.* 50: 111-119.
- VASSIL A.D., KAPULNIK Y., RASKIN I., SALT D.E. 1998. The role of EDTA in lead transport and accumulation by indian mustard. *Plant Physiol.*, 117: 447-453.
- WILLIAMS L.E., PITTMAN J.K., HALL J.L. 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 104-126.
- WU J., HSU F.C., CUNNINGHAM S.D. 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation contrast. *Environ. Sci. & Technol.* 33:1898-1904.

MICROORGANISMI DA SITI INDUSTRIALI: SELEZIONE PER RESISTENZA AI METALLI PESANTI, ACCUMULO DI ZINCO E APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE

Anna Rosa Sprocati¹, Carlo Cremisini², Evelina Fantauzzi¹,
Mara Galletti², Stefania Sabelli¹, Lia Segre¹, Fabio Vitali¹

1 Divisione Biotecnologie e Agricoltura, ENEA Casaccia - Roma

2 Divisione Tecnologie e Ingegneria Ambientale, ENEA Casaccia - Roma

Riassunto

I biotopi industriali rappresentano particolari nicchie ecologiche dove i microorganismi, in risposta a condizioni di elevato *stress* ambientale, hanno sviluppato sistemi di adattamento che li rendono interessanti sia per lo studio sulla risposta della cellula, sia per le applicazioni che ne possono derivare. La possibilità di utilizzare microorganismi per processi di *bio-remediation* viene al momento considerata una strategia alternativa ai trattamenti fisico-chimici. Per queste applicazioni, la selezione di consorzi microbici naturali sembra uno strumento molto promettente, in particolare quando la resistenza ai metalli pesanti è associata alla capacità di degradare altri inquinanti. Il presente lavoro si pone l'obiettivo di isolare da siti contaminati bioconsorzi che associno le capacità di resistenza ai metalli con capacità biodegradative di inquinanti organici, per applicazioni in processi di *bioremediation*. La parte di lavoro descritta è rivolta alla capacità di resistenza e accumulo di metalli pesanti. Sette campioni, raccolti da una miniera dismessa di blenda e galena nella zona di Ingurto (Sardegna), sono stati trattati con procedure di arricchimento ottenendo rispettivamente 7 consorzi microbici resistenti ad alte concentrazioni di zinco (massima concentrazione testata 40mM). I ceppi isolati da ogni bioconsorzio sono stati caratterizzati con il sistema Biolog ma solo pochi di questi sono stati identificati. Per ogni consorzio è stata saggiata la capacità di accumulare zinco ottenendo risultati positivi. Il bioconsorzio più efficiente, chiamato *Ingurto 5* ha mostrato un coefficiente d'accumulo $Q=160 \text{ mg Zn /g peso secco}$, a 10 mM Zn, ed è stato scelto per lo studio successivo riguardante la capacità di catturare lo zinco a diverse concentrazioni. I risultati mostrano un diverso coefficiente di accumulo per basse e alte concentrazioni di zinco ($Q \sim 3$ e $Q > 100$). Il meccanismo principale di accumulo, che il bioconsorzio mette in atto, sembra essere metabolismo-dipendente. Parallelamente, è stato sperimentato, in via esplorativa, il trattamento delle acque reflue di un'industria tessile con un bioreattore a letto fluidizzato, su scala di laboratorio, ottenendo un decremento del 70% circa del contenuto di zinco (10 mg/l).

Introduzione

I biotopi industriali rappresentano particolari nicchie ecologiche, sviluppatasi dopo la rivoluzione industriale, dove gli organismi residenti presentano varie modalità di adattamento. In particolare, i microrganismi, in risposta a condizioni di elevato *stress* ambientale, hanno sviluppato, in un lasso di tempo breve dal punto di vista evolutivo, sistemi di adattamento che li rendono interessanti sia per lo studio sulla risposta della cellula, sia per le possibili applicazioni che possono derivare dallo sfruttamento delle particolari capacità metaboliche da essi elaborate. Tali biotopi rappresentano al tempo stesso aree ad elevato rischio ambientale ed un'attraente fonte di materiale di studio, per finalità sia di conoscenza che applicative. Tra le problematiche ambientali di maggior rilievo, la decontaminazione di acque, suoli e sedimenti per via biologica rappresenta uno dei campi di applicazione di maggior interesse. La *bioremediation*, come ogni nuova tecnologia, deve superare barriere significative per affermarsi come consolidata, non ultima la barriera economica. Nel campo della rimozione dei metalli pesanti i processi fisico-chimici sono ben consolidati su larga scala e ben prevedibili. Perché allora scegliere la via biologica per il trattamento dei metalli pesanti? La risposta è contenuta nella capacità dei microrganismi di generare diverse molecole, le quali modificano le caratteristiche chimiche o fisiche del metallo (Eccles, 1999), rendendone possibile la detossificazione o la rimozione. Se il discorso è riferito al suolo, inoltre, i microrganismi sono in grado di rimuovere diversi inquinanti di natura inorganica senza distruggere il suolo, contrariamente a quanto avviene per i processi fisico-chimici. Dal momento che i metalli pesanti sono largamente diffusi nell'ambiente e rappresentano un fattore di inibizione rilevante per la biodegradazione dei composti organici, la selezione di comunità microbiche native, capaci di associare la resistenza a metalli pesanti con capacità biodegradative di contaminanti di natura organica, diventa un'area di indagine strategica. In questo quadro l'impiego di consorzi microbici, più che l'uso di singoli ceppi, sembra essere un mezzo molto promettente per il più vasto spettro di vie metaboliche che le comunità microbiche possono offrire (Menzer and Harvey, 1995, Knackmuss, 1992).

Scopo del lavoro è isolare bioconsorzi nativi, da siti contaminati, che associno le capacità di resistenza ai metalli con capacità biodegradative di inquinanti organici, per processi di *bioremediation*. La parte di lavoro descritta è incentrata sulla capacità di resistenza e di rimozione di metalli pesanti.

Materiali e metodi

Campionamento e selezione di consorzi microbici. Sette campioni sono stati raccolti da acqua (3), sedimenti (3) e suolo (1) di una miniera dismessa di blenda e galena nella zona di Ingurtosu, in Sardegna. Ogni campione è stato inoculato in un terreno di arricchimento per la successiva selezione dei consorzi microbici resistenti allo zinco. La massima concentrazione di zinco utilizzata è stata di 40 mM. Da ogni bioconsorzio, chiamati *Ingurtosu 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10*, sono stati isolati e caratterizzati metabolicamente, con il sistema Biolog 3.5TM, i morfotipi presenti (circa 30).

Terreni di crescita e di arricchimento. Sono stati utilizzati due diversi terreni di crescita:

a) terreno sintetico minerale (MM): 6.06 g/L di Tris, 4.68 g/L di NaCl, 1.49 g/L di KCl, 1.07 g/L di NH₄Cl, 0.43 g/L di Na₂SO₄, 0.2 g/L di MgCl₂*6H₂O, 0.03 g/L di CaCl₂*2H₂O, 0.11 g/L di Na₂HPO₄*2H₂O e 0.005 g/L di Fe(NH₄)citrato. Il pH è stato aggiustato a 7 con HCl 37%. Al terreno sono state aggiunte: **i)** una soluzione in traccia (1 mL/L) contenente: 100 mg/L di ZnSO₄*7 H₂O, 30 mg/L di MnCl₂*4H₂O, 300 mg/L di H₃BO₃, 10 mg/L di CoCl₂* 6 H₂O, 10 mg/L di CuCl₂* 2 H₂O, 20 mg/L di NiCl₂*6 H₂O, 30 mg/L di Na₂MoO₄*H₂O, **ii)** una soluzione di gluconato di potassio 0,5% (w/v) come fonte di carbonio e **iii)** solfato di zinco a diverse concentrazioni: da 1,5 mM a 40 mM durante la fase di selezione; 0,15 mM e 10 mM per gli esperimenti sull'accumulo di zinco. Lo stesso terreno, con aggiunta di agar 15 g/L (Micropoli, Milano Italia), è stato utilizzato per la crescita dei microorganismi su terreno solido. Le piastre Petri sono state incubate a 28-30°C e 60% di umidità relativa.

b) acque reflue di un processo di stampa in corrosione da industria tessile (ZN3): pH 7, zinco 10 mg/L, totale solidi sospesi 0.108 mg/L; COD 1356 mg/L; solfati 294 mg/L, gluconato di potassio 5 g/L aggiunto come fonte di carbonio.

Tutti gli esperimenti di crescita e accumulo di zinco sono stati effettuati in tripla replica. I microorganismi sono stati cresciuti in colture batch da 50 mL in beute Erlen-Meyer ed incubati per 14 giorni a 28-30°C, in agitazione continua. L'inoculo utilizzato è stato del 10 % (v/v).

Accumulo di zinco. La capacità di accumulare zinco, da parte di ogni consorzio selezionato, è stata saggiata in terreno MM contenente solfato di zinco 10 mM. Per il lavoro successivo, condotto con il bioconsorzio *Ingurtosu 5*, sono state utilizzate due diverse concentrazioni di zinco: 0.15 mM e 10

mM. Sono stati monitorati i seguenti parametri: crescita della biomassa, zinco residuo nel mezzo, zinco accumulato dalla biomassa, efficienza di bioaccumulo espressa come $Q = \text{mg Zn/g}$ di biomassa in peso secco.

Saggio di accumulo a basse concentrazioni di zinco dopo crescita in elevate concentrazioni. Tre aliquote gemelle provenienti da una coltura liquida di 2 L, cresciuta in MM + zinco 10 mM, sono state trasferite a tempi di crescita successivi (1, 2, 3 giorni) e dopo opportuno lavaggio, in terreno fresco MM contenente zinco alla concentrazione di 0.15 mM; dopo 1, 3 e 6 giorni di crescita è stata misurata la concentrazione di zinco nel mezzo.

Cinetica di cattura dello zinco in fase di crescita stazionaria. Una coltura di 3 L è stata cresciuta fino all'inizio della fase stazionaria; metà della biomassa è stata quindi trattata con etanolo al 60 % per 1,5 ore (Kurek et al., 1982), al fine di uccidere le cellule, senza danneggiare la parete cellulare. Entrambe le aliquote, trattate con etanolo e non, sono state risospese, dopo opportuno lavaggio, in aliquote di terreno MM fresco contenente zinco alle concentrazioni di 0.15 mM e 10 mM. La cinetica è stata seguita fino a 18 ore e, sulla base dei risultati dei test di vitalità (conta in piastra), un ulteriore campione è stato analizzato a 72 ore.

Trattamento di acque reflue. E' stato allestito un bioreattore a colonna a letto fluidizzato con insufflamento di aria e flusso a ricircolo, alimentato con il refluo ZN3. Le condizioni sperimentali sono di seguito descritte: biomassa (6.8 g/L peso secco), volume della colonna 500 mL, pH 7, temperatura 30°C, velocità di flusso 35 ml/ora. Il bioreattore è rimasto attivo per 11 giorni e sono stati eseguiti prelievi quotidiani.

Determinazione analitica dello zinco. La biomassa è stata raccolta per filtrazione su filtri Millipore 0.45 μm ed essiccata in stufa a 80°C o/n. I filtri sono stati sottoposti a digestione acida con 5 mL di HNO_3 (BDH Aristar 69 %) e 2 mL di H_2O_2 (BDH Analar 30%) in un forno a microonde CEM 81D. Dopo la digestione i campioni sono stati portati ad un volume finale di 10 mL con acqua bidistillata. L'analisi quantitativa dello zinco è stata effettuata mediante l'assorbimento atomico a fiamma utilizzando lo spettrofotometro (Flame-AAS) Perkin Elmer 5100 ZL a 213.9 nm. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'analisi di campioni di colture microbiche, cresciute negli stessi terreni, in assenza di zinco.

Risultati

Da sette campioni trattati con procedure di arricchimento in terreno minerale sono stati selezionati rispettivamente sette consorzi microbici

nativi, resistenti allo zinco (massima concentrazione testata 40 mM). I bioconsorzi sono stati chiamati, in accordo con il sito di origine, *Inгурtosu 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10*. Da ogni bioconsorzio sono stati successivamente isolati i diversi morfotipi presenti (circa 30 in totale) e caratterizzati tramite il metabolismo del carbonio con il sistema Biolog 3.5TM. Solo pochi sono stati identificati e appartengono alle specie *Corynebacterium aquaticum A*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Cryptococcus luteolus*. La maggior parte dei batteri è risultata Gram+ (dati non mostrati).

Tutti i bioconsorzi sono risultati in grado di accumulare zinco con un'elevata efficienza, che varia tra 90 e 160 Q. Il bioconsorzio con la migliore efficienza di accumulo, *Inгурtosu 5*, accumula zinco in quantità equivalente al 16 % del suo peso secco ed è stato scelto per la continuazione del lavoro che ha seguito due direzioni: lo studio del bioconsorzio nel suo complesso e lo studio dei singoli morfotipi isolati da questo. In questo articolo verranno discussi i risultati ottenuti dal lavoro condotto sul bioconsorzio *Inгурtosu 5*, composto da 5 tipi di colonie morfologicamente differenti: 2 specie filamentose Gram+, due bacilliformi Gram+ e un bacilliforme Gram incerto.

L'influenza dello zinco sulla curva di crescita e la capacità di accumulo è stata seguita per entrambe le concentrazioni di metallo, 0.15mM e 10 mM. Nella figura 1 si può notare che in presenza di zinco si riscontra una resa di crescita maggiore, evidente in particolare a 10 mM, e che nessuna curva di crescita presenta la fase *lag*.

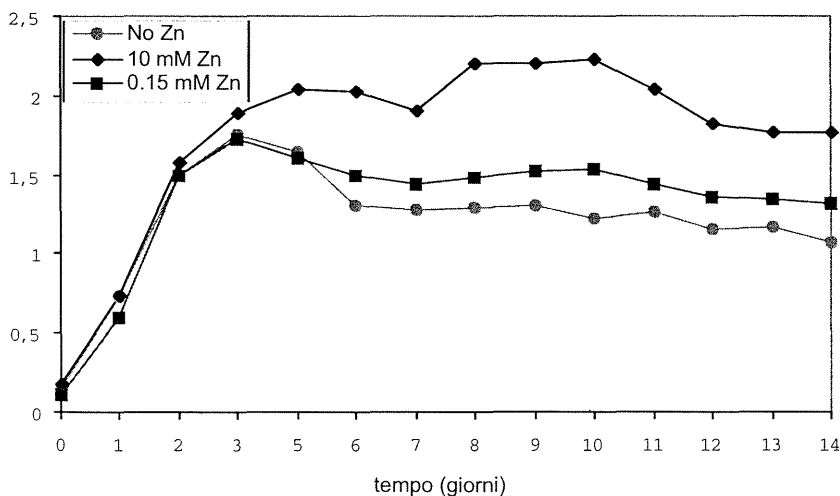


Figura 1. Curva di crescita di *Inгурtosu 5* a differenti concentrazioni di Zn.

La curva di accumulo di zinco (figura 2) mostra che il Q si mantiene basso a basse concentrazioni, circa 3 mg/g p.s., mentre raggiunge valori elevati ad alte concentrazioni, circa 160 mg/g p.s. Inoltre in figura 3 si osserva che in presenza di zinco 10 mM la curva di accumulo, contrariamente a quella di crescita, presenta una fase lag, suggerendo l'ipotesi dell'esistenza, ad alte concentrazioni, di una fase di induzione del processo di bioaccumulo che, in tal caso, risulterebbe dipendere da un meccanismo di natura attiva.

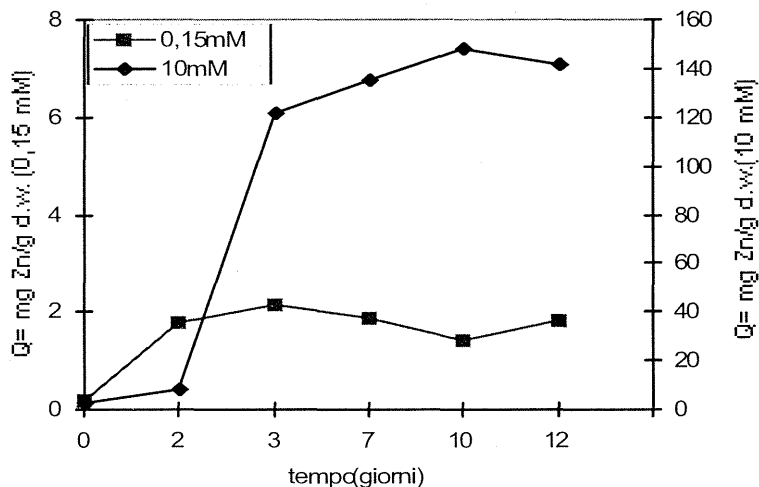


Figura 2. Confronto tra i coefficienti di accumulo a differenti concentrazioni di Zn.

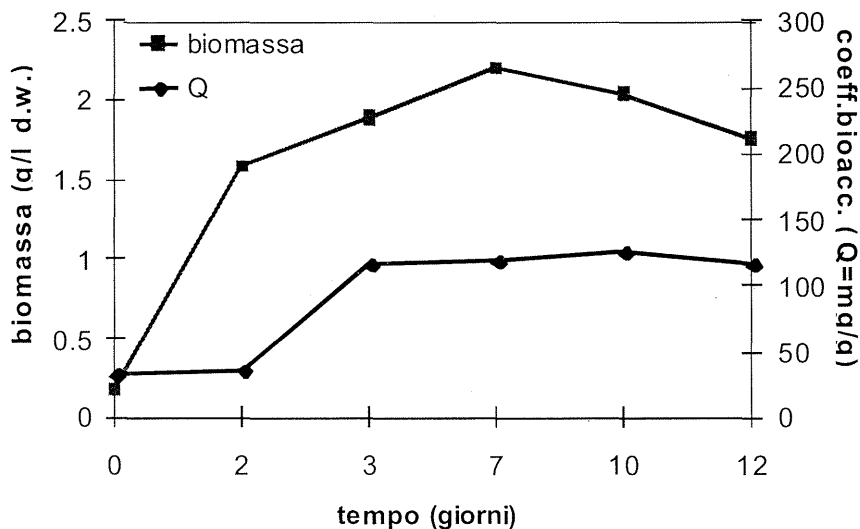


Figura 3. Accumulo di zinco di *Incurtus 5*.

Nella figura 4 è riportato l'abbattimento di zinco in soluzione e si nota che, mentre raggiunge il 70% per 10 mM, per 0.15 mM non si ottengono valori di abbattimento superiori al 30%. Alla luce di questi dati è stato allestito un esperimento per verificare l'ipotesi che il meccanismo di bioaccumulo fosse di natura attiva ed inducibile da alte concentrazioni di zinco (tabella 1). La biomassa cresciuta in MM + 10 mM di zinco, dopo lavaggi, è stata trasferita ad intervalli di crescita successivi: 1, 2 e 3 giorni - fino a quando cioè il meccanismo di accumulo è certamente attivo (confronta figura 3) - in terreno fresco contenente 0.15 mM di zinco. Dopo 1, 3 e 6 giorni di permanenza in MM 0,15 mM di zinco è stata analizzata la concentrazione del metallo in soluzione. I risultati mostrano che non si verifica ulteriore accumulo di zinco, neppure per l'aliquota trasferita dopo 3 giorni di crescita in 10 mM, quando il meccanismo di accumulo è già attivo (figura 3). Si nota invece un lieve rilascio di zinco nel mezzo.

Tab 1. Saggio di accumulo in MM+Zn 0,15 mM dopo crescita in MM+ Zn 10 mM.

Tempo giorni in MM +Zn 0,15 mM	pH	Biomassa g/L (p.s.)	Zn in soluzione (g/L)
Dopo 1 giorni in MM + Zn 10 mM			
1	7,30	0,56	11,00
3	7,69	2,31	16,00
6	7,76	1,52	12,00
Dopo 2 giorni in MM + Zn 10 mM			
1	7,33	1,59	11,00
3	7,72	2,11	13,00
6	7,86	2,53	13,00
Dopo 3 giorni in MM + Zn 10 mM			
1	7,35	1,75	13,00
3	7,78	3,32	21,00
6	7,86	2,51	17,00
controllo	7,0		9,5

vaggi, è stata trasferita ad intervalli di crescita successivi: 1, 2 e 3 giorni - fino a quando cioè il meccanismo di accumulo è certamente attivo (confronta figura 3) - in terreno fresco contenente 0.15 mM di zinco. Dopo 1, 3 e 6 giorni di permanenza in MM 0,15 mM di zinco è stata analizzata la concentrazione del metallo in soluzione. I risultati mostrano che non si verifica ulteriore accumulo di zinco, neppure per l'aliquota trasferita dopo 3 giorni di crescita in 10 mM, quando il meccanismo di accumulo è già attivo (figura 3). Si nota invece un lieve rilascio di zinco nel mezzo.

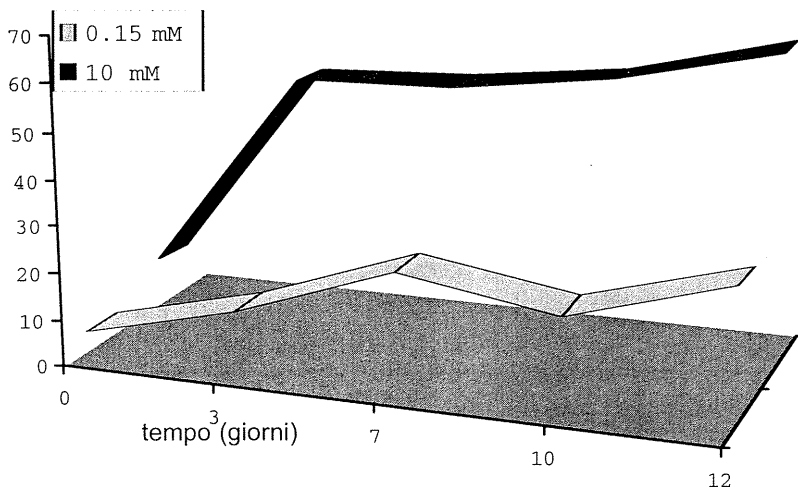


Figura 4. Abbattimento di zinco in soluzione.

Si è stabilito quindi di eseguire una cinetica di accumulo in fase stazionaria, usando sia cellule vive che cellule morte, al fine di verificare se il meccanismo predominante di accumulo fosse indipendente dal metabolismo (bioassorbimento). Come già descritto, le cellule sono state trattate con etanolo al 60%, per 1,5 ore, al fine di provocarne la morte senza incorrere nella rottura della parete cellulare (Kurek *et al.*, 1982). I test di vitalità eseguiti come controllo hanno tuttavia mostrato che il bioconsorzio era, nel suo insieme, resistente al trattamento in etanolo. Infatti le cellule trattate erano in stato di *choc*, ma non erano state uccise. In particolare, le specie filamentose non erano in grado di replicarsi nelle ore seguenti il trattamento, ma, 72 ore dopo, tutti i componenti del bioconsorzio avevano recuperato la capacità di riprodursi, anche se la loro concentrazione era minore rispetto a quella delle cellule non trattate. I risultati dell'esperimento non possono quindi essere riferiti a cellule morte, bensì stressate. I risultati (tabella 2) sembrano mostrare l'esistenza di entrambi i meccanismi, attivo e passivo, anche se quello passivo ha un'efficienza minore ed è più evidente a basse concentrazioni e quando le cellule non sono in buone condizioni. In presenza di alte concentrazioni di zinco i risultati di bioaccumulo migliori sono stati ottenuti con le cellule non trattate, pienamente in grado cioè di controllare i processi metabolici, suggerendo che il principale meccanismo per l'accumulo del metallo nel bioconsorzio è attivo.

Tab. 2. Cinetica di cattura di zinco in fase stazionaria con cellule trattate (e non) con etanolo 60%.

tempo <i>ore</i>	Cellule non trattate		Cellule trattate	
	Zn in soluzione (mg/L)	Zn accumulato $Q = \text{mgZn/g d.w}$	Zn in soluzione (mg/L)	Zn accumulato $Q = \text{mgZn/g d.w}$
0,15 mM Zn				
1,5	9,0	1,09	7,0	1,9
18	8,5	0,85	7,5	2,1
72	3,0	3,60	5,0	2,7
controllo	10,0		10,0	
10 mM Zn				
1,5	561	12,7	566	11,2
18	580	34,8	551	20,3
72	239	107,4	425	75,0
controllo	630		630	

Parallelamente a questi studi, sono stati condotti esperimenti applicativi usando acque reflue di un'industria tessile. L'obiettivo di questa parte del lavoro di confermare su substrati naturali la capacità di accumulo osservata nei terreni sintetici. Il bioconsorzio *Ingurtosu 5* è stato adattato a crescere su reflui tessili, senza necessità di alcuna diluizione o

alcun pretrattamento. E' stato allestito un bioreattore a colonna a letto fluidizzato, su scala di laboratorio (tabella 3). Il massimo decremento del contenuto di zinco è stato di circa il 70% ed è stato registrato già dopo un giorno. Alla fine dell'esperimento il Q della biomassa recuperata era di circa 2 mg/g. Questo significa che, se tutta la biomassa inoculata nel bioreattore (circa 7 g peso secco) fosse stata attiva, tutto lo zinco avrebbe potuto essere accumulato. E' stata registrata, invece, alla fine dell'esperimento, una grande perdita in biomassa per lisi cellulare, probabilmente dovuta a mancanza di condizioni ottimali di ossigenazione. Questo sembrerebbe essere confermato dal bilancio di massa (tabella 3), che non mette in rilievo perdite significative dello zinco complessivo.

Tab. 3. Bilancio di massa del bioreattore a colonna a letto fluidizzato con il consorzio *Ingurtosu 5* vitale.

Tempo	Biomassa	Coefficiente di Bioaccumulo	Zinco nella biomassa	Zinco in soluzione	Zinco in soluzione	Zinco totale
Q						
giorni	g p.s..	mg Zn /g p.s..	mg assoluti	mg/L	mg assoluti	mg assoluti
Inizio	6,8		2,0	10,5	5,3	7,3
fine	2,3 *	2,2	5,1	3,2	1,60	6,7
bilancio	-4,5 *		+3,1	-7,3	-3,7	-0,6

* dopo 11 giorni

Discussione

Selezione per la capacità di accumulo dello zinco. I bioconsorzi selezionati mostrano valori interessanti di efficienza di accumulo, anche rispetto ai dati di letteratura (Vegliò e Beolchini, 1997). Questo è particolarmente vero quando nel mezzo è presente un'elevata concentrazione di zinco. Il bioconsorzio microbico con il miglior coefficiente di accumulo, *Ingurtosu 5*, accumula una quantità di zinco equivalente a circa il 16 % del suo peso secco. Questo risultato aumenta l'interesse applicativo perché è dimostrato che, se il contenuto di metallo nelle ceneri supera il 10%, l'ossido presente può avere un valore commerciale (Baker *et al.*, 1992). I valori di Q osservati nell'esperimento con 10 mM di $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ sono di circa 160 mg Zn /g di biomassa (peso secco) e sono comparabili con i migliori risultati riportati in letteratura, osservati solo per i fanghi attivi (Q=138 per concentrazioni che vanno da 25 a 450 ppm). I valori di letteratura riscontrati per i singoli microorganismi accumulatori sono molto più bassi di quelli dei fanghi attivi; per esempio, specie note per essere buoni accumulatori di zinco, come *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus nigricans*, presentano valori di Q ri-

spettivamente di 17 e 14 per concentrazioni che vanno da 5 a 200 ppm (Vegliò e Beolchini, 1997). Risultati preliminari (non discussi in questo lavoro), riguardanti l'accumulo di zinco da parte dei ceppi isolati dal bioconsorzio *Inгурtosu 5*, mostrano valori di Q di circa 100, a 10 mM, e più elevati per concentrazioni maggiori.

Accumulo di zinco. Gli esperimenti sopra descritti non provano che il meccanismo di accumulo del bioconsorzio preso in esame sia stabilmente inducibile da elevate concentrazioni di zinco. Infatti, quando i microorganismi, dopo crescita in MM + 10 mM di zinco, avendo raggiunto l'usuale valore di Q, sono stati trasferiti in terreno fresco con basse concentrazioni di metallo, il processo di accumulo è stato interrotto. L'unica evidenza che sia operativo anche un debole sistema passivo (bioassorbimento) si è avuta con la cinetica in fase stazionaria, dove le cellule trattate mostrano un leggero assorbimento entro i primi 30 minuti. D'altra parte nella stessa cinetica le cellule non trattate hanno mostrato il maggior valore di Q dopo le prime 18 ore, suggerendo che entrambi i processi - attivo e passivo- coesistono all'interno del bioconsorzio, e che quello passivo è debole ed è più evidente a basse concentrazioni, quando le cellule non sono in condizioni ottimali. Sembra quindi che il fenomeno di accumulo presente nel bioconsorzio comprenda due fasi distinte: prima un meccanismo passivo e successivamente una cattura intracellulare metabolismo-dipendente, che sarebbe in accordo con i dati di letteratura (Nourbakhsh *et al.*, 1994). Il sistema di accumulo metabolismo-dipendente di questo bioconsorzio sembra essere fortemente regolato dalla concentrazione di zinco nel mezzo. Sono necessari ulteriori studi per approfondirne la comprensione.

La resistenza mostrata dal consorzio microbico *Inгурtosu 5* al trattamento con etanolo al 60 %, per lo studio di cinetica in fase stazionaria, suggerisce che questi microorganismi hanno sviluppato sistemi di resistenza degni di approfondimento. Questo ulteriore dato indica inoltre la necessità di verificare anche la resistenza agli antibiotici, parametro particolarmente importante quando lo scopo del lavoro è applicativo.

Conclusioni

Lo zinco favorisce la resa di crescita del consorzio microbico *Inгурtosu 5* nel terreno minerale utilizzato e influenza fortemente anche la morfologia delle colonie: le colonie diventano più piccole e più compatte all'aumentare della concentrazione di zinco nel mezzo, sia per le specie filamentose che non filamentose.

L'efficienza di accumulo dello zinco si mantiene bassa a basse concentrazioni ($Q=2-3$ mg/g peso secco) mentre ad alte concentrazioni cresce, dopo una fase lag, fino a raggiungere valori elevati ($Q>150$ mg/g peso secco). Questi dati di accumulo risultano superiori a quelli trovati in letteratura.

I risultati riguardanti l'accumulo sembrano mostrare nel bioconsorzio l'esistenza di entrambi i processi, attivo e passivo. Il meccanismo principale sembra tuttavia essere metabolismo-dipendente ed il meccanismo passivo risulta più evidente a basse concentrazioni e quando le cellule non sono in condizioni ottimali.

I risultati ottenuti con i reflui dell'industria tessile mostrano la capacità del consorzio microbico di adattarsi a crescere ed accumulare zinco anche in condizioni restrittive. I risultati ottenuti nella prova con il bioreattore a colonna a letto fluidizzato dimostrano che il sistema è promettente per la rimozione dello zinco, ma che la configurazione del bioreattore deve essere ottimizzata, principalmente per l'apporto di ossigeno.

Ulteriori esperimenti verranno condotti al fine di comprendere meglio il meccanismo di accumulo presente nel bioconsorzio e di potenziare la cattura di zinco a basse concentrazioni. E' infatti noto che a basse concentrazioni anche i trattamenti convenzionali incontrano maggiori difficoltà rispetto a situazioni con concentrazioni elevate di metallo.

Sono in corso studi riguardo i seguenti punti: *i*) comprensione del ruolo dei singoli componenti del bioconsorzio nell'accumulo di zinco, al fine di capire in che relazione sono tra di loro e comparare l'efficienza di accumulo del bioconsorzio nel suo complesso e dei suoi singoli componenti; *ii*) identificazione delle singole specie con uso di sistemi integrati (confronto del profilo metabolico con il sistema Biolog, rDNA); *iii*) controllo della capacità del bioconsorzio di associare la resistenza ai metalli pesanti con la biodegradazione di inquinanti di natura organica; *iv*) resistenza ad altri metalli pesanti; *v*) resistenza agli antibiotici.

Bibliografia

- BAKER *et al.* 1992. The potential for the use of metal-accumulating plants for the in situ decontamination of metal polluted soils. *International Symposium on "Soil Decontamination Using Biological Processes"*. Karlsruhe/D 6-9 December.
- ECCLES H. 1999. Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? *Tibtech*, 17:462-465.
- KNACKMUSS H.J. 1992. Potential and limitations of microbes to degrade xenobiotics; *International Symposium on "Soil Decontamination Using Biological Processes"*. Karlsruhe/D 6-9 December.
-

- KUREK E., CZABAN J., BOLLAG J.M. 1982. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. *Applied and Environ. Microbiol.* 43 (5): 1011-1015.
- MENZER R., HARVEY J..1995. Bioremediation efficacy and risk assessment research. *OECD Documents*.
- NOURBAKHS M. et al. 1994. A comparative study of various biosorbents for removal of chromium (VI) ions from industrial waste waters. *Process Biochem*, 29: 1-5.
- VEGLIÒ F., BEOLCHINI F. 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*, 44:301-316.
-

STUDIO DELL'EFFICIENZA DEL MAIS NELLA PHYTOREMEDIATION DI UN SUOLO CONTAMINATO DA METALLI PESANTI

Patrizia Zaccheo, Laura Crippa, Carmen Gigliotti

Dipartimento di Produzione Vegetale - Università degli Studi di Milano
Via Celoria, 2 - 20133 Milano

Introduzione

La phytoremediation rappresenta una tecnica di decontaminazione a basso impatto sull'ambiente, particolarmente adatta al recupero di siti contaminati da metalli pesanti. Infatti, numerose ricerche e sperimentazioni pilota (Ebbs *et al.*, 1997; Salt *et al.*, 1998) hanno dimostrato una buona efficacia di rimozione dei metalli dal suolo per assorbimento radicale e successiva traslocazione alla parte epigea, qualora questi siano presenti nel suolo in forme chimiche solubili o comunque biodisponibili, o lo diventino a seguito di specifici trattamenti (ad es. aggiunta di chelanti di sintesi).

La principale limitazione all'impiego di questa tecnica risiede nei tempi di realizzazione, necessariamente molto più lunghi rispetto a quelli offerti dai metodi alternativi, che restringono l'adozione della phytoremediation alle situazioni a basso rischio o comunque non prioritarie. Infatti, anche impiegando specie iperaccumulatrici, o specie tolleranti i metalli e a forte accrescimento epigeo, i tempi di rimozione dei metalli dal suolo rimangono lunghi, dai 3 ai 20 anni secondo alcuni Autori (McGrath, 1998, Brown *et al.*, 1995). E' possibile tuttavia aumentare l'efficacia del fitorisanamento, riducendo così i tempi di intervento, agendo su alcuni punti chiave del processo. In particolare, la gestione del suolo può essere finalizzata a ottimizzare le proprietà fisiche, chimiche e biologiche del suolo in modo da consentire alle piante di superare la situazione di stress creata dalla presenza degli inquinanti. Oltre ad un attento controllo delle pratiche agronomiche tradizionali (irrigazioni, fertilizzazioni, lavorazioni, ecc.), è possibile intervenire sui meccanismi che regolano la concentrazione degli ioni metallici in soluzione, sia attraverso una modificazione del pH del suolo, sia degli equilibri tra le forme chimiche dei metalli.

La ricerca presentata ha inteso studiare una situazione estrema, caratterizzata da un elevatissimo accumulo di metalli pesanti anche in forma biodisponibile, originata dalla destinazione agronomica del suolo a prato

marcitoio e quindi soggetto per moltissimi anni ad un continuo e massiccio apporto di acque fortemente contaminate.

Nel presente lavoro si è inteso verificare la possibilità di sfruttare piante ad elevata produzione di biomassa (colza, girasole, canapa, mais) per ridurre la quota biodisponibile di metalli pesanti del suolo, attenuando in tal modo anche il potere contaminante del suolo nei confronti delle acque di falda. Allo scopo di consentire una maggior crescita delle piante studiate, si sono valutati inoltre differenti trattamenti ammendanti il suolo.

Materiali e metodi

Il suolo esaminato proviene da un'area agricola della provincia di Milano, caratterizzata da una scarsa qualità dei suoli dovuta all'impiego di acqua irrigua contaminata, come era stato messo in evidenza da una precedente indagine territoriale (Genevini *et al.*, 1995). In particolare, il suolo è stato prelevato nello strato superficiale (0-30 cm) di un appezzamento a marcita, dopo allontanamento della cotica erbosa.

Tab.1 - Caratterizzazione del suolo contaminato

pH (KCl)		6,1
C organico	g kg ⁻¹	40
S.O.	g kg ⁻¹	69
N totale	g kg ⁻¹	3.7
C/N		11
C.S.C.	cmol ₍₊₎ kg	14.6
P Bray	mg kg ⁻¹	78
Sabbia	g kg ⁻¹	780
Limo	g kg ⁻¹	174
Argilla	g kg ⁻¹	46

dotto a prato marcitoio per la presenza di essenze prative adattatesi all'ambiente grazie anche alla peculiarità del sistema colturale (sistemazione del suolo ad ali con scorrimento di acqua in superficie che consente la vegetazione delle piante anche nella

Le principali caratteristiche chimico-fisiche del suolo sono riportate in Tabella 1.

I contenuti in metalli pesanti in forma totale e in forma assimilabile, determinati secondo i Metodi Ufficiali (G.U. n. 248 del 21/10/99) e riportati in Tabella 2, evidenziano un elevatissimo livello di contaminazione, tale da rendere prioritario un intervento di bonifica ricorrendo alla phyto-remediation. Infatti, nonostante le evidenti condizioni sfavorevoli, il sito è tuttora con-

Tab. 2 - Contenuto in metalli pesanti del suolo contaminato

	Totale (mg kg ⁻¹)	Assimilabile (mg kg ⁻¹)	Biodisponibilità (%)
Cd	71,8	37,4	52.0
Cr	684	3,76	0.55
Cu	591	199	33.7
Ni	77,5	16,9	21.8
Pb	718	246	34.3
Zn	10325	5835	56.5

stagione invernale e non richiede risemina); naturalmente i livelli produttivi degli sfalci risultano inferiori a quelli ottenuti nelle aree limitrofe.

Particolarmente preoccupante è il livello raggiunto dal cadmio, nonché la sua elevata biodisponibilità; per tutti i metalli, comunque, si superano ampiamente i limiti previsti dalla normativa nazionale sui Siti Contaminati (D.M. n. 471 del 15 ottobre 1999). E' evidente dall'elevata biodisponibilità di tutti i metalli pesanti, ad eccezione del cromo, come la fonte di inquinanti sia stata l'acqua irrigua, che ha apportato continuamente metalli in forma solubile. Inoltre, l'abbondante dotazione in sostanza organica del suolo contribuisce a spiegare l'elevata mobilità di tutti i metalli, piombo compreso. Probabilmente la componente organica a basso peso molecolare complessa i metalli impedendone la precipitazione in forme inorganiche.

Il risanamento del sito contaminato risulta, tuttavia, molto difficile da realizzare efficientemente (elevata riduzione nel contenuto in metalli pesanti realizzata in tempi brevi) con un semplice intervento di fitoestrazione che si avvalga unicamente dell'introduzione di specie accumulatrici e/o ad elevata produzione di biomassa. Infatti, un primo screening effettuato per identificare la specie vegetale più idonea, ha fornito risultati deludenti, poiché le piante testate o non hanno superato i primi stadi di crescita sul suolo contaminato (*Brassica juncea* L., *Brassica napus* L., *Helianthus annuus* L., *Cannabis sativa* L.), oppure hanno mostrato uno sviluppo ridotto (*Zea mais* L.). Per questo motivo si è ipotizzato di procedere al biorisanamento parallelamente ad un intervento volto a ridurre la quota assimilabile dei metalli, conseguendo in tal modo due obiettivi: la realizzazione di condizioni migliori per lo sviluppo vegetale e la protezione delle acque di falda.

A tal scopo sono stati saggiati alcuni materiali, già impiegati in studi recenti di detossificazione dei suoli o dei sedimenti (Chlopecka e Adriano, 1996; Marschner, 1998). In particolare, si è effettuata una prova di crescita di piante di mais allevate in vaso per 33 giorni sul suolo contaminato e ammendato con fosforite grezza e zeolite naturale, sottoposto a tre diversi tempi di incubazione, secondo il seguente schema sperimentale.

Schema sperimentale

Trattamento		Dose	Preincubazione
		g kg ⁻¹ suolo	giorni
Suolo testimone	0	0	0 14 28
Fosforite grezza	F I	25	0 14 28
Fosforite grezza	F II	50	0 14 28
Zeolite naturale	Z I	25	0 14 28
Zeolite naturale	Z II	50	0 14 28

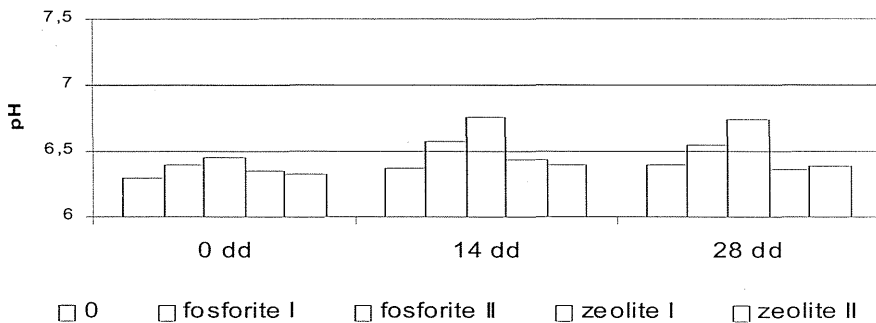
La prova è stata condotta in serra, in vasi contenenti 250 g di suolo; rispettando gli intervalli di incubazione preliminare, i materiali sono stati incorporati al suolo secco successivamente portato al 50% della capacità idrica massima per tutta la durata della preincubazione. Prima di procedere alla semina è stata prelevata un'aliquota di suolo per la determinazione del pH. In ciascun vaso sono stati posti 3 semi di mais e le piantine sono state allevate per 33 giorni, al termine dei quali le parti epigee delle piantine sono state raccolte, pesate, essiccate a 105°C e analizzate per il tenore in metalli pesanti. Le radici sono state separate dal suolo, lavate e pesate.

La prova ha avuto carattere preliminare, prefiggendosi di valutare la migliore combinazione composto/dose/preincubazione da studiare successivamente in prove più articolate; non è stata pertanto effettuata un'analisi statistica dei risultati che, per le produzioni di parte aerea e radici costituiscono le produzioni complessive delle tre piantine per vaso, e per le determinazioni dei metalli pesanti nei vegetali e nel suolo la media di tre repliche analitiche (RSD < 3%).

Risultati

La Figura 1 schematizza la variazione nel pH dei suoli a seguito dei tempi diversi di preincubazione. La fosforite induce un incremento massimo di 0,3 unità di pH, valore raggiunto dopo 14 giorni di preincubazione, mentre la zeolite non sembra influenzare questo parametro.

Fig. 1 - pH del suolo (in H₂O)



In Figura 2 sono riportati i risultati dell'accrescimento fresco e secco delle piante di mais per tutti i trattamenti.

Entrambi gli ammendanti, indipendentemente dai tempi di in-

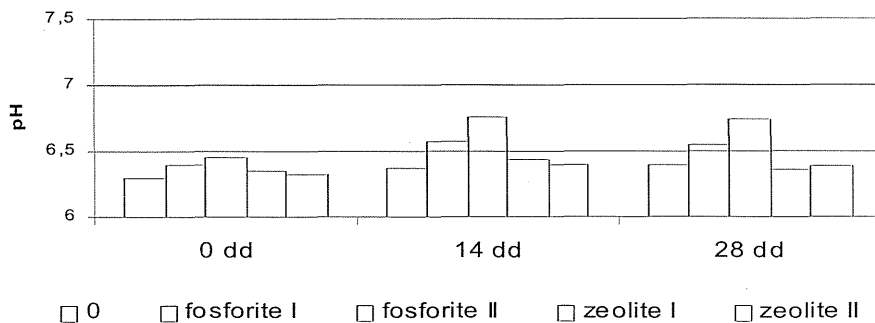
La prova è stata condotta in serra, in vasi contenenti 250 g di suolo; rispettando gli intervalli di incubazione preliminare, i materiali sono stati incorporati al suolo secco successivamente portato al 50% della capacità idrica massima per tutta la durata della preincubazione. Prima di procedere alla semina è stata prelevata un'aliquota di suolo per la determinazione del pH. In ciascun vaso sono stati posti 3 semi di mais e le piantine sono state allevate per 33 giorni, al termine dei quali le parti epigee delle piantine sono state raccolte, pesate, essiccate a 105°C e analizzate per il tenore in metalli pesanti. Le radici sono state separate dal suolo, lavate e pesate.

La prova ha avuto carattere preliminare, prefiggendosi di valutare la migliore combinazione composto/dose/preincubazione da studiare successivamente in prove più articolate; non è stata pertanto effettuata un'analisi statistica dei risultati che, per le produzioni di parte aerea e radici costituiscono le produzioni complessive delle tre piantine per vaso, e per le determinazioni dei metalli pesanti nei vegetali e nel suolo la media di tre repliche analitiche (RSD < 3%).

Risultati

La Figura 1 schematizza la variazione nel pH dei suoli a seguito dei tempi diversi di preincubazione. La fosforite induce un incremento massimo di 0,3 unità di pH, valore raggiunto dopo 14 giorni di preincubazione, mentre la zeolite non sembra influenzare questo parametro.

Fig. 1 - pH del suolo (in H₂O)



In Figura 2 sono riportati i risultati dell'accrescimento fresco e secco delle piante di mais per tutti i trattamenti.

Entrambi gli ammendanti, indipendentemente dai tempi di in-

Fig. 2a - peso fresco parte aerea

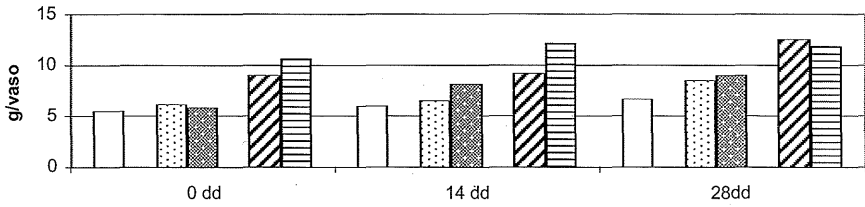


Fig. 2b - peso secco parte aerea

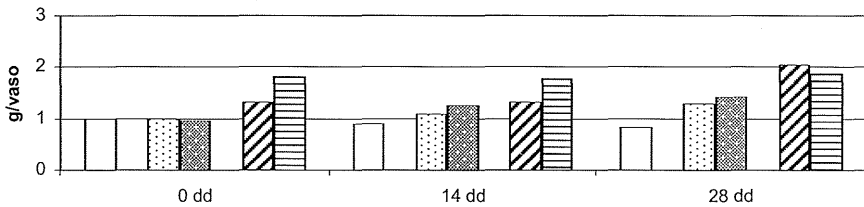


Fig. 2c - peso fresco radici

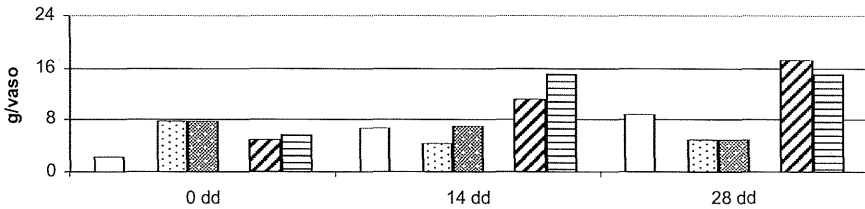
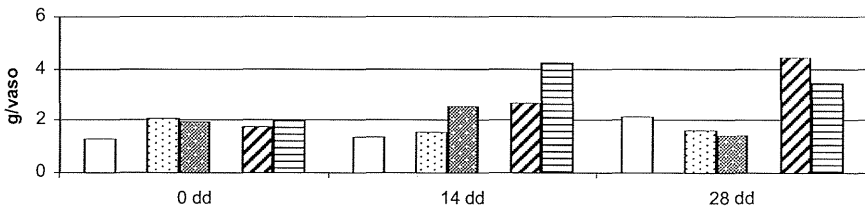


Fig. 2d - peso secco radici



□ 0 ▤ fosforite I ▥ fosforite II ▧ zeolite I ▨ zeolite II

cubazione preliminari, inducono una maggiore crescita delle piante, con un effetto superiore della zeolite. Lo sviluppo radicale sembra risentire in modo controverso dell'apporto di fosforite, mentre è molto marcato l'effetto positivo della zeolite, già al primo dosaggio.

La preincubazione del suolo ha consentito un migliore sviluppo delle piantine di mais, poiché ha permesso agli ammendanti introdotti di esplicare la propria azione detossificante prima della semina. La preincubazione durata più a lungo (28 giorni) aumenta l'effetto positivo di fosforite e zeolite, probabilmente per una maggiore riduzione del livello di metalli bio-disponibili al momento della germinazione dei semi.

La rimozione dei metalli pesanti dal suolo e la traslocazione nella parte epigea delle piantine di mais è riportata in Tabella 3.

Tab. 3 – Concentrazione (mg kg^{-1}) e asportazione ($\mu\text{g}/\text{vaso}$) di metalli pesanti nei tessuti epigei del mais.

	Cd		Zn		Pb		Ni		Cr		Cu	
	mg kg^{-1}	$\mu\text{g}/\text{vaso}$	mg kg^{-1}	$\mu\text{g}/\text{vaso}$	mg kg^{-1}	$\mu\text{g}/\text{vaso}$	mg kg^{-1}	$\mu\text{g}/\text{vaso}$	mg kg^{-1}	$\mu\text{g}/\text{vaso}$	mg kg^{-1}	$\mu\text{g}/\text{vaso}$
0 dd												
0	3,3	3,2	2625	2562	18,0	17,6	5,0	4,9	10,9	10,7	28,9	28,2
F I	1,5	1,5	1197	1180	11,8	11,6	3,7	3,6	7,9	7,8	17,2	16,9
F II	1,4	1,4	1203	1143	12,0	11,4	3,3	3,1	8,5	8,0	17,6	16,7
Z I	3,7	4,9	2561	3399	14,8	19,7	4,8	6,4	10,5	13,9	26,0	34,5
Z II	2,5	4,4	1869	3356	12,7	22,8	4,0	7,2	9,0	16,3	20,4	36,8
14 dd												
0	3,3	3,0	2377	2142	11,4	10,3	4,4	4,0	4,5	4,0	23,3	21,0
F I	1,6	1,3	1194	1287	11,3	12,2	3,1	3,4	6,7	7,2	21,1	22,8
F II	1,6	2,0	1200	1519	13,3	16,8	3,3	4,2	9,5	12,0	21,2	26,9
Z I	3,2	4,3	2063	2735	7,2	9,6	3,7	4,9	5,1	6,7	20,7	27,5
Z II	2,8	5,0	1861	3318	10,1	17,9	3,3	5,9	5,5	9,8	21,8	39,0
28 dd												
0	2,7	2,2	2634	2210	5,1	4,3	3,7	3,1	0,9	0,7	26,0	21,8
F I	1,4	1,8	1177	1532	7,2	9,3	3,1	4,0	1,9	2,5	16,7	21,7
F II	1,8	2,6	1226	1733	7,0	11,2	3,3	4,7	3,3	4,7	17,9	25,2
Z I	3,0	6,2	1793	3659	11,0	24,1	3,5	7,1	1,1	2,3	22,0	44,9
Z II	2,7	5,0	1544	2898	6,7	11,9	3,2	6,0	1,6	3,1	20,7	38,8

La concentrazione di cadmio, zinco e rame nella parte epigea delle piante cresciute sul suolo ammendato con fosforite risulta nettamente inferiore al controllo, mentre la zeolite sembra ridurre in misura minore la concentrazione degli stessi metalli, con un effetto dipendente dalla preincubazione del materiale nel suolo. Piombo e cromo, indipendentemente dalla presenza degli ammendanti, riducono al crescere dei tempi di incubazione, la loro disponibilità per le piante.

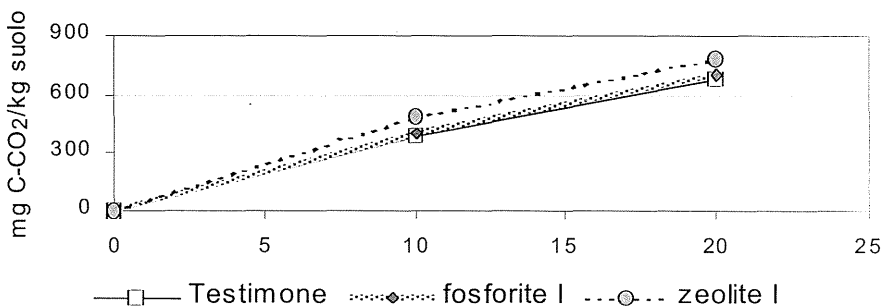
Valutando la quota assoluta estratta dal suolo (Tab. 3) si osserva come il trattamento con zeolite risulti il più efficiente per la rimozione dei metalli dal suolo, in virtù della maggiore biomassa prodotta, che compensa la maggior diluizione dei metalli nei tessuti epigei rispetto a

quanto osservato nel testimone. Contrariamente a quanto osservato per la fosforite, l'effetto positivo della zeolite sembra più marcato alla dose inferiore di somministrazione, conseguentemente ai diversi meccanismi di detossificazione dei due materiali.

Seppur preliminari, questi dati indicano come, in questa situazione di forte compromissione della qualità del suolo, sia più utile agire stimolando la produzione di biomassa, piuttosto che aumentare l'assorbimento di metalli.

L'attività della biomassa microbica, espressa come quantità cumulativa di C-CO₂ emessa dal suolo, riportata in Figura 3, è stata determinata sul trattamento 25 g/kg dopo 14 giorni di incubazione. I dati ottenuti sembrano confermare il miglioramento delle condizioni generali del suolo soprattutto in presenza di zeolite.

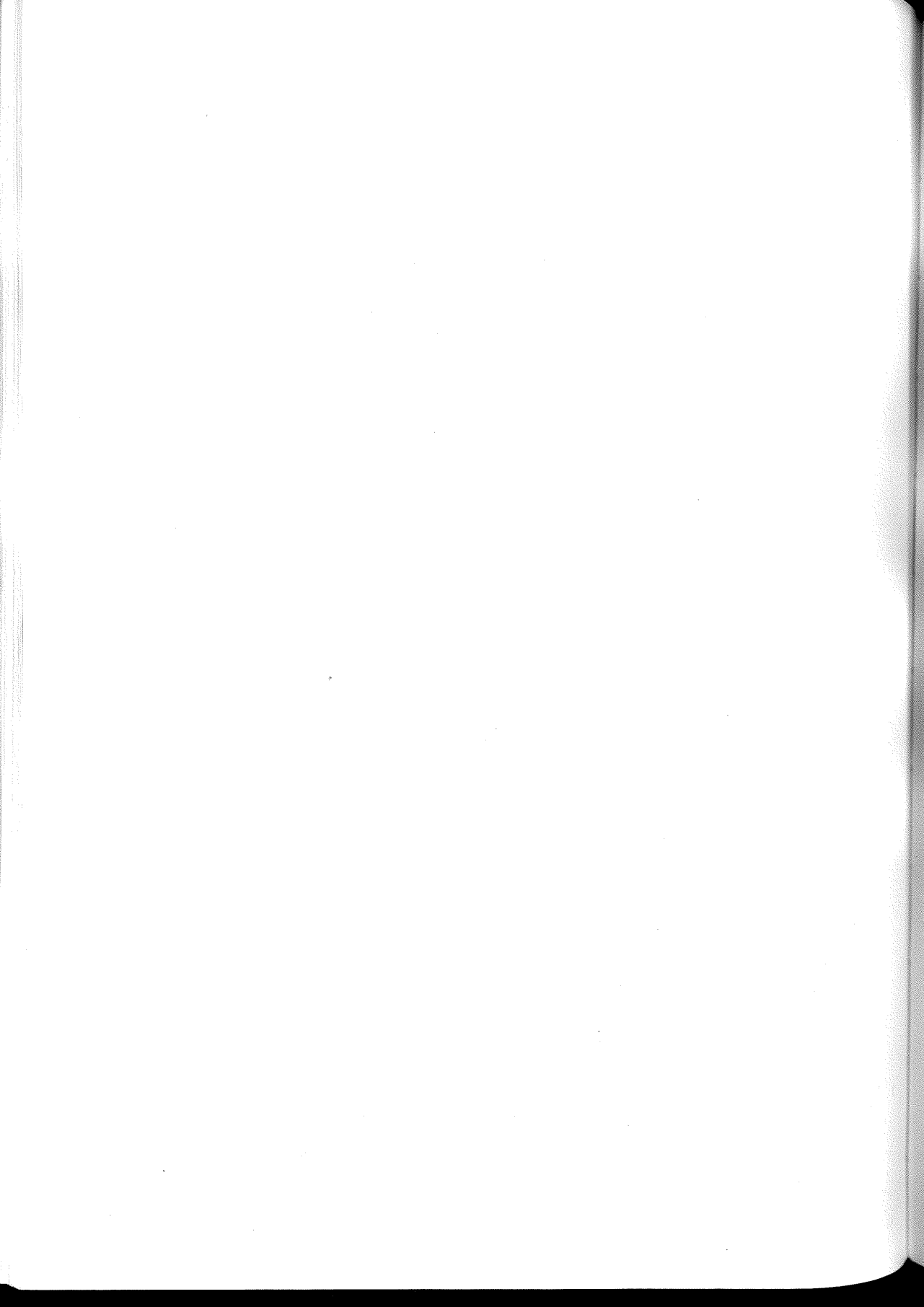
Fig. 3 Attività respiratoria della biomassa del suolo



Conclusioni

Nello studio effettuato si è confermato come un limite nell'applicabilità della phytoremediation consista proprio nell'ambiente sfavorevole nel quale le piante vengono introdotte. In particolare, le prime fasi di crescita e radicazione risultano le più critiche, per una intensa richiesta di nutrienti da parte della parte epigea, soddisfatta da una superficie radicale ridotta, che a causa dell'elevato ritmo di assorbimento può risultare danneggiata da condizioni inospitali del suolo. Inoltre, per un buon esito della fitoestrazione, è necessario che le piante sviluppino un apparato radicale il più esteso possibile, in grado di esplorare tutto il volume di suolo contaminato che si intende bonificare.

L'impiego di composti in grado di mitigare la tossicità dei metalli pesanti, sia mediante insolubilizzazione che attraverso processi di ad-



DALLA TEORIA ALLA PRATICA

Massimo Angelone

ENEA

Pacifico Ruggiero (coordinatore)

Nel nostro Paese la politica ambientale si è sempre sviluppata in periodi di crisi e ha sempre spinto il legislatore e la ricerca ad introdurre norme e regolamenti sempre in situazioni d'emergenza. Ciò non corrisponde ad una logica di pianificazione e non permette quindi di costruire banche dati ambientali nelle quali possono essere inseriti dati in modo continuo e regolare.

Purtroppo il suolo non è ancora considerato in tutte le sue componenti come un bioreattore intorno al quale creare tutta una serie di problemi di risanamento e di bonifica ambientale. Le principali informazioni le abbiamo, infatti sulla qualità dell'aria, che rappresenta il comparto ambientale più omogeneo. Abbiamo anche una legislazione europea che solo da poco tempo si sta attrezzando con norme che possono aiutare anche il consumatore su problematiche verso le quali c'è stata meno attenzione. Il problema principale è quello dell'innovazione e del trasferimento tecnologico che è un problema serio soprattutto là dove si vogliono privilegiare gli interventi in situ ed ex situ che utilizzino tecniche biologiche che hanno costi ridotti (circa 1/3) ma che purtroppo soffrono di una serie di inconvenienti, messi già in luce negli interventi di questa mattina. Quello che manca è soprattutto il passaggio dalla teoria del laboratorio alla teoria di campo, aspetto che andrebbe valutato anche sulla base delle seguenti considerazioni.

La Bioremediation è una tecnica che ha avuto una forte crescita, partendo dagli USA ma che al momento, soffre di una forte stagnazione. Ad esempio, negli USA, nel periodo '90-'93, circa il 10% degli interventi riguardavano la Bioremediation e addirittura il 40% i trattamenti in situ. Già due anni dopo questo dato è sceso al 9% e solo il 4% riguardava il trattamento in situ in quanto il forte sviluppo è stato dato dalla bonifica delle coste dell'Alaska in seguito ai noti fatti della Exxon Valdez che ha portato a risultati eccellenti e, di conseguenza, ad un largo uso di queste tecniche. Successivamente si è osservato un ridotto uso di queste tecniche; la causa non è tuttavia emersa nei lavori presentati in questo convegno ma emerge chiaramente nella letteratura specializzata. Essa è legata al fatto che a distanza di tempo dall'intervento di Bioremediation si è osservato un 'ritorno' dell'inquinante dopo circa 1-2 anni. Su questo

problema farò alcune considerazioni anche perché da esso dipende, a mio parere, il futuro stesso della Bioremediation.

Per quanto il problema della ricomparsa dell'inquinante, esso è legato a fenomeni di 'aging', fenomeni in cui l'inquinante va ad occupare micro e nanopori (ad esempio nei sedimenti), che sono inaccessibili all'agente biologico. Poiché l'utilizzazione dell'inquinante richiede la presenza in fase acquosa, nel tempo, la riduzione dell'inquinante in fase liquida, determina un lento rilascio di questi composti. Inoltre c'è il problema del residuo, inteso come definitiva immobilizzazione del residuo stesso, la dove il residuo abbia reagito con alcuni composti del suolo. Riemerge così il ruolo del suolo come agente catalitico e reattivo che non va considerato come una discarica sulla quale gettare i rifiuti.

Anche la legislazione europea in materia di pesticidi ha accettato il concetto del 'Bound Residues', cioè il residuo che si lega a frazioni umiche e minerali, che scompare dalla fase liquida e viene considerato come un residuo non tossico.

In realtà il problema sui cui ci dobbiamo confrontare è espresso dalla seguente frase: *How clean is clean enough?*

Il problema della decontaminazione è legato anche a quello del rilascio successivo del contaminante. Tuttavia quello che oggi pare importante è il patrimonio microbico del suolo, inteso nella sua ampia accezione, che funzionerebbe come un serbatoio, come un 'sink'.

Nel suolo, una volta createsi le condizioni che favoriscono diminuzioni della concentrazione di una fase liquida, il trasferimento di massa crea un gradiente che rende più disponibile un elemento che in precedenza non lo era. Questa teoria del "sink" è sempre più accettata, in quanto, secondo questa teoria, non esiste nulla (nel suolo) che non si renda prima o poi disponibile. Si tratta solo di capire quale sia la cinetica di rilascio e il tempo di rilascio.

Per tornare a problemi di natura più pratica, occorre considerare ciò che è chiamato progetto d'intervento di Bioremediation. Lo studio di fattibilità è un punto basilare del progetto poiché fornisce tutti gli elementi tecnico-scientifici che possono facilitare gli aspetti decisionali. Anche il capitolo non va trascurato unitamente agli interventi di monitoraggio e controllo, in quanto l'efficacia dell'intervento deve essere verificata attraverso un iter legislativo ben delineato; purtroppo questo iter risulta carente di norme.

Quest'ultima parte è importante in quanto permette di capire quali sono i protocolli che funzionano e quali no. L'EPA stessa ha solo 150 protocolli più una serie di progetti in corso.

E' inoltre difficile attingere a database che permettano di ottenere dati certi sull'utilizzazione di una tecnologia rispetto ad un'altra. La dove ci sono tecnologie sperimentali che funzionano è possibile trasferirle ed importarle, ma la dove non ci sono è opportuno sviluppare la ricerca applicata come già fa l'ENEA. Questa attività necessita di un approccio multidisciplinare coinvolgendo più soggetti, come del resto messo più volte in evidenza dagli interventi che abbiamo ascoltato in questo convegno.

Elvira Rea

Poiché mi occupo di fisiologia vegetale, il mio intervento si occuperà prevalentemente dell'aspetto della Bioremediation legato alla pianta.

Il problema principale da risolvere nel passaggio dalla teoria alla pratica è proprio il controllo delle piante come agenti disinquinanti. Questa è sicuramente una tecnica valida, ma va verificata in campo con studi a larga scala. Infatti, il punto debole può considerarsi il "trasporto" dalla fase di sperimentazione in laboratorio, all'effetto che poi si ottiene in campo. Purtroppo dobbiamo rilevare che esistono molti studi di base ma pochi sono quelli applicativi. Questo avviene perché la ricerca di base permette di conoscere molti aspetti sia biochimici che di assorbimento della pianta. Dobbiamo, infatti, conoscere i processi di traslocazione, utilizzare le piante e indirizzare gli studi verso i fenomeni che favoriscono l'accumulo verso le parti aeree delle piante, e indirizzare gli studi su organi che sono facilmente asportabili, cosa che faciliterebbe il successivo recupero del metallo.

Per quanto riguarda la ricerca da parte del Ministero dell'Agricoltura, non esiste un progetto specifico relativamente a questo problema.

Un'altra informazione che manca è la conoscenza della situazione reale: non si sa quanti e quali siano realmente i siti inquinati in Italia. Inoltre sempre nell'ambito del Ministero dell'Agricoltura non esiste una normativa che indichi quando un sito debba essere considerato inquinato.

Loredana Musumeci

Il mio contributo si riferisce all'esperienza che sto avendo, partecipando alle varie commissioni istituite per la bonifica dei siti contaminati in ambito nazionale in base alla Legge 426/96.

La legge individua 14 siti d'interesse nazionale catalogati per dimensioni, tipologia di inquinanti ed estensione dell'inquinamento. Si è tenuto conto anche del rischio sanitario accettato. Per la quasi totalità dei siti sono state attivate le relative procedure istruttorie. In pratica si sta lavorando su circa sette siti per i quali sta per essere elaborato un progetto preliminare di intervento. Sugli altri si è ancora in ritardo.

Per quanto riguarda l'applicazione di tecnologie di Bioremediation, occorre ricordare che fino ad ora è stata alquanto limitata anche se negli studi preliminari è stata sempre presa in considerazione, soprattutto in relazione alla decontaminazione dei suoli da parte dei composti organici che, come noto, possono essere più facilmente abbattuti con questa tecnologia. Tuttavia la Bioremediation è presa meno in considerazione quando si passa al progetto definitivo; ciò avviene per una serie di motivi.

Il primo è legato al tipo di regolamento cui ci dobbiamo attenere (L. 471/99). Esso prevede un approccio di tipo tabellare con limiti che da molti sono considerati abbastanza restrittivi. Per raggiungere questi valori risulta difficoltosa l'applicazione della tecnologia di Bioremediation, in quanto non consente il raggiungimento della concentrazione limite. Inoltre il tempo eventualmente necessario è estremamente lungo e, di conseguenza, i costi risultano più elevati. Questa è la ragione per cui la Bioremediation non trova una facile applicazione. Inoltre, nel caso in cui non si raggiungesse la concentrazione limite anche per un solo parametro, si passerebbe da una bonifica con ripristino ambientale, che permetterebbe un libero utilizzo del suolo, ad una bonifica con messa in sicurezza. Quest'ultima è legata ad una successiva valutazione del rischio residuo, allo scopo di verificare se esso sia accettabile sia da un punto di vista sanitario che ambientale. In particolare, in quest'ultimo caso, il sito rimane vincolato per i futuri obiettivi, con conseguenze da un punto di vista economico.

Nonostante la Bioremediation abbia costi economici contenuti, richiede tempi molto lunghi e non sempre garantisce il raggiungimento dell'obiettivo richiesto. Di conseguenza questa tecnica non è impiegata in alcun contesto. Sono tuttavia in corso alcuni studi e sperimentazioni come nel sito di Pieve Vergante, sito che ha causato la contaminazione del Lago Maggiore con DDT. In quest'area ci si è limitati ad applicare tecnologie di Bioremediation ai rifiuti stoccati all'interno della discarica, al fine di minimizzare nel tempo i rischi poiché la discarica si trova in prossimità del fiume Toce. Questo tipo d'utilizzo della Bioremediation causa tuttavia un aggravio della spesa che si va a sommare al costo della bonifica, che non prevede il ripristino ambientale, ma solo una bonifica con misure di sicurezza che vincola il sito. Tuttavia, proprio per cercare di ridurre la pericolosità di

questi inquinati, si è voluto introdurre una tecnologia di Bioremediation.

Occorre ricordare che l'applicazione di tecniche di Bioremediation in aree estese si sta dimostrando di difficile applicazione. Ritengo, infatti che, riuscendo a superare i problemi d'ordine giuridico, questa tecnologia potrebbe essere applicata in alcuni specifici casi quali le contaminazioni da idrocarburi, come l'esperienza americana insegna. Occorre inoltre ricordare che nei prossimi anni è prevista la dismissione di un numero elevato di siti di stoccaggio carburanti, molti anche di piccole dimensioni, con probabile elevato inquinamento da idrocarburi. Si pone quindi il problema della loro bonifica che, probabilmente, dovrà essere effettuata ex situ. Inoltre occorre ricordare che, oltre al costo della bonifica, occorrerà affrontare quello dello smaltimento.

Contrariamente a quando accade in altri paesi europei la legislazione italiana non permette la definizione in classi di alcuni parametri. Ciò permetterebbe (come avviene già in alcuni paesi europei), il riutilizzo del suolo bonificato che non sarebbe più considerato un rifiuto ma un prodotto da poter essere riutilizzato in vari contesti in funzione dei valori limite raggiunti. Questo è un suggerimento che potrebbe e dovrebbe esser dato ai ministeri competenti. Si potrebbe anche ipotizzare l'uso di valori anche più restrittivi di quelli previsti dalla legge favorendo così un uso multifunzionale di questi rifiuti.

Paolo Cortesi, Enichem, Centro ricerche Novara

In questo contesto scientifico vorrei rappresentare la posizione dell'industria. Infatti, pur essendo dell'ENICHEM desidero parlare anche come rappresentante e coordinatore di N.I.C.O.L.E. che è un network che rappresenta l'industria. I membri associati sono circa 120 e fra di loro c'è un'ampia rappresentanza d'industrie con il problema dei siti contaminati. Sedici società forniscono servizi; in pratica devono fornire la soluzione industriale per la bonifica dei siti contaminati.

L'approccio al problema della Bioremediation deve essere interdisciplinare, ma questa interdisciplinarietà non deve essere adottata solo per l'aspetto meramente scientifico ma deve comprendere anche gli aspetti pratici di intervento in campo. Contrariamente il progetto non si può ritenere completo poiché deve contenere anche l'aspetto economico e sociale dello sfruttamento dei risultati. Se poi si prendono in considerazione i siti dismessi da recuperare, soprattutto quelli inglobati nel tessuto urbano, occorre prospettare all'eventuale investitore che si appresta a riutilizzare il sito, un ritorno economico. Di conse-

guenza tutto l'approccio alla bonifica del sito non deve guardare solo all'aspetto relativo alla contaminazione ambientale. Occorre creare quelle condizioni affinché chi investe abbia un ritorno economico. Quindi l'obiettivo di NICOLE è quello di trovare una soluzione che sia il giusto compromesso fra i costi economici d'intervento di una bonifica e i vantaggi ambientali.

NICOLE ha scelto come linea guida quella del Risk Assessment e della destinazione d'uso. La scelta di una tecnologia di remediation va quindi selezionata in conformità di una valutazione di rischio che non deve essere generale ma sito specifica. Alcune nazioni europee accettano il principio del Risk Assessment (Germania, Olanda, Inghilterra). Tuttavia l'applicazione pratica di questo principio non è facile perché la popolazione interessata mostra scarsa fiducia.

Infatti, c'è differenza fra il rischio reale e quello percepito dalla popolazione; la strategia di questo network è proprio quella di sviluppare un supporto scientifico al Risk Assessment. Il nostro scopo è di aumentare la validità del concetto di Risk Assessment, dando quindi un forte supporto scientifico e migliorare i mezzi per calcolarlo attraverso misure, modelli, valutazioni che ne sono alla base. Per questo motivo, come industria, vorremmo estendere la collaborazione a tutti coloro che ne sono coinvolti.

Il nostro punto di vista ritiene che non vi siano serie alternative al Risk Assessment. Tuttavia restano come problemi quello della validazione dei modelli, anche se purtroppo, esiste la tendenza da parte dei vari paesi di usare propri modelli, poiché c'è diffidenza nell'usare l'approccio usato dagli altri. Diffidenza esiste anche nel comunicare la valutazione del rischio. Questo tipo di comunicazione dovrebbe essere biunivoca fra industria, pubblico e loro rappresentanti.

Un'altra attività di NICOLE è stata quella di creare consorzi capaci sviluppare progetti alla Key Action 4. Fra i progetti che finanziamo come NICOLE abbiamo quello sui 'fattori di esposizione', e quello sulla 'natural attenuation'. Lo scopo è quello di ottenere un protocollo su come effettuare una 'natural attenuation'.

Un progetto nato da NICOLE che vede ENICHEM come coordinatore, approvato nel V° programma quadro, Key Action 1 sull'acqua, vede quattro 'problem solvers': ENICHEM, ACSO, ICI, che sono tre società chimiche, due società di servizi: AQUATER e VHE ed una serie di istituti di ricerca.

Questa collaborazione può essere citata come esempio di multidisciplinarietà.

Giuseppe Bortone, ENEA

Vorrei focalizzare il mio intervento sui due approcci che in questa sede sono stati argomenti di dibattito: quello della concentrazione limite e quello del Risk Assessment.

L'approccio della legislazione italiana è purtroppo legato al fatto che esistono dei casi evidenti di rischio effettivo in cui occorre agire in termini rapidi ed efficaci. Questo tipo d'approccio è anche legato alla storia dei siti inquinati del nostro Paese. Nonostante vi siano aree molto inquinate, non tutte presentano condizioni di rischio estremo. Per questo si potrebbe proporre, cercando di dare responsabilità anche al legislatore, interventi di bonifica 'soft', in quelle aree dove può essere dimostrato che il rischio non è immediato né evidente. Inoltre, nei meccanismi delle Leggi 426 e 471, esiste la possibilità, da parte del Ministero, di finanziare interventi definiti sperimentali, la dove il contributo del ministero può arrivare a comprendere la totale copertura delle spese.

Si potrebbero così selezionare delle aree dove poter testare questi trattamenti biologici a basso costo. È tuttavia necessario che il legislatore prenda atto che per applicare queste tecnologie occorre abbandonare la filosofia del parametro soglia. D'altra parte anche il mondo scientifico deve assumersi le sue responsabilità e rimettersi in gioco; ad esempio, potrebbe rinunciare ad alcuni aspetti d'approfondimento scientifico, guardando di più all'acquisizione del risultato.

Probabilmente solo attraverso una condivisione di responsabilità fra mondo scientifico e legislativo, si potrà arrivare a sviluppare sul campo queste tecnologie di Bioremediation. Inoltre, si potrebbe accettare l'applicazione di queste tecnologie prendendo in considerazione un modello a 'black blocks'. In questo modo ci si potrebbe limitare alla verifica dell'efficienza del metodo, senza perdersi nei dettagli dei meccanismi e curando il raggiungimento degli obiettivi di risanamento prefissi.

La mia conclusione è che bisogna trovare un punto di incontro, fra l'esigenza del legislatore e quelle del mondo scientifico ed accademico.

Giannantonio Petruzzelli, ENEA

Riprendendo quello che diceva poco fa la Dott.ssa Musumeci, occorre sostenere che la ricerca non deve 'abbattersi' in una fase in cui sem-

bra che la Bioremediation abbia pochi spazi.

Questa, secondo me, è solo una fase particolare che segue la recente introduzione di una normativa nata con limitazioni scientifiche rilevanti. Tuttavia la stessa Legge 471 invita, quando non risulta possibile raggiungere i limiti tabellari, ad usare l'analisi di rischio. Quindi i limiti tabellari si possono superare la dove sia accertato che non esistono problemi o che sia impossibile raggiungere alcun target. Non è giusto quindi lasciarsi influenzare dall'attuale trend di mercato che in Italia favorisce alcune 'tecnologie' e metto questo termine fra virgolette poiché, ad esempio, il trasporto in discarica non può affatto considerarsi una tecnologia. Tuttavia ritengo sbagliato non dare ulteriore impulso alla ricerca che, attraverso studi più approfonditi, potrebbe evidenziare quei meccanismi della Bioremediation che possono portarci da una visione teorica di laboratorio ad una applicazione in campo. Il problema è che spesso la ricerca di laboratorio, una volta applicata in campo, ha mostrato scarsi risultati. Tuttavia esistono margini di miglioramento e sono convinto che l'impiego di tecnologie soft, comprese la natural attenuation, bioremediation, fitoremediation ecc., siano da perseguire.

Vorrei anche dire qualcosa su un argomento più pratico che riguarda il terreno considerato come rifiuto. I problemi nascono dal fatto che non sempre è facile classificare un terreno da bonificare con i codici CER in quanto sono piuttosto vaghi. Tuttavia il Ministero dell'Ambiente, sul problema terre da scavo ha già dato una risposta, affermando che, qualora la concentrazione dei contaminati nei terreni che residuano dagli interventi di bonifica sia inferiore a quelli per l'uso residenziale, esso si può considerare un terreno e non un rifiuto.

Questa interpretazione invita ad un certo ottimismo, in quanto non si parla più di rifiuto. Tuttavia il problema permane per quei terreni i cui valori sono intermedi tra i limiti definiti per uso industriale e quelli del residenziale. In questo caso dovremmo avere dei terreni che potrebbero essere usati almeno nei siti industriali; attualmente però non possono essere utilizzati in questo modo. Nasce quindi l'esigenza di avere dei codici più specifici per i vari casi. Ad esempio, nel caso di un suolo inquinato da metalli pesanti o da idrocarburi, fin quando rimangono nel sito, non possono essere considerati un rifiuto. In questi casi, trattamenti prolungati nel tempo di natura biologica, potrebbero essere utilizzati per arrivare a valori più bassi e/o per un eventuale riutilizzo del suolo, magari tenendo presenti i limiti tabellari attuali o con i limiti, se vogliamo, d'analisi di rischio. Occorre ricordare che dalle tecnologie di bonifica residuano quantità di terreno cospicuo e, spesso, parzialmente decontaminate.

In quest'ambito un'integrazione con tecniche di Bioremediation e di monitoraggio a poco costo potrebbe fornire un'ulteriore spinta per proseguire gli studi in questo settore che sarebbe errato bloccare per l'esigenza di rincorrere valori tabellari.

Pirro Tomaso Perri

La necessità del coinvolgimento delle scienze sociali negli ambiti dei problemi considerati in questo convegno è una cosa evidente. Nel mio intervento vorrei invece dare spazio ad un altro argomento. Infatti sembra che la Bioremediation si sia indirizzata verso un concetto di sostenibilità, un concetto che tuttavia è stato preso in considerazione da un punto di vista ecologico ma non economico. Esiste infatti anche un altro tipo di sostenibilità, che deve tenere conto anche dei così detti Stake Holder, o portatori di interessi, intesi come 'altri' interessi oltre a quelli relativi al ripristino ambientale. Di conseguenza la sostenibilità deve essere valutata anche in relazione alla capacità di questi altri interessi di essere a loro volte più sostenibili. Non bisognerà più parlare d'efficacia in termini di costi ma d'efficienza; di una capacità di creare di più utilizzando di meno. In quest'ambito occorrerà creare uno spazio per una pressione politica che consenta realmente di passare dalla teoria alla pratica.

Gli argomenti trattati oggi hanno evidenziato come il passaggio dalla teoria alla pratica sia difficile essenzialmente perché la materia non è facilmente comprensibile da parte dell'opinione pubblica. A questo proposito occorre ricordare che neanche il protocollo di Kyoto fa cenno alle caratteristiche di bioreattore del suolo. Quello che occorrerebbe appurare è l'effettiva efficienza della Bioremediation rispetto alle altre tecniche o, alla non tecnica. Per esempio una comunità che si deve preoccupare di intervenire e, quindi, di contribuire alla bonifica di un'area può decidere di non far nulla, lasciare quindi le cose come stanno. Spetta quindi alla Bioremediation dimostrare, in termini di confronto, la pertinenza di quanto sia giusto utilizzarla anche solo per un fattore estetico, al solo scopo di migliorare l'ambiente. Tuttavia, il vantaggio ambientale è difficilmente quantificabile. Per esempio, nell'ambiente scientifico, un vantaggio ambientale che tenga a migliorare i parametri chimici o fisici trova comprensione e considerazione, ma per il pubblico, l'illustrazione di dati relativi ad un'attività di Bioremediation non è ben comprensibile. Di conseguenza occorrerà trasformare questi benefici in un ritorno economico.

Pacifico Ruggiero

La prima considerazione che vorrei fare nel tirare le somme di questa tavola rotonda e che i progetti di recupero ambientale richiedono competenze interdisciplinari; serve un'azione concertata non solo negli interventi ma anche nell'ispirazione e negli obiettivi. Per quanto riguarda le competenze, non occorre riferirsi solo a quelle scientifiche, ma anche all'integrazione con coloro che hanno esperienza di processo. La parte ingegneristica si deve quindi confrontare e raccordare con la parte economica se si vuole essere in grado di effettuare un determinato intervento.

Un secondo aspetto che vorrei considerare è quello dell'impossibilità di avere protocolli standard di tecnologie valide per qualunque tipo di intervento. Inoltre occorre ricordare che un sito, di solito, non è contaminato da un solo inquinante ma da un pool e che i contesti ambientali sono diversi da zona a zona. Di conseguenza la parte relativa alla ricerca va incoraggiata sempre di più, come anche l'innovazione scientifica e tecnologica.

Un altro suggerimento che è emerso dal dibattito è quello di sollecitare il Ministero dell'Ambiente nel considerare il suolo come una risorsa. Infatti, anche abbassando i limiti di soglia, è possibile pensare, per utilizzazioni specifiche, al recupero di un suolo. In caso contrario si arriva all'assurdo legislativo che ci obbliga a spendere per la bonifica di un suolo che, successivamente, sarà dichiarato rifiuto e, quindi, non più utilizzabile. In questo caso il problema della soglia di concentrazione si pone in maniera evidente.

Ritengo anche che il Ministero dell'Ambiente dovrebbe organizzare un forum su questo argomento e farsi carico di queste iniziative in quanto ci sono sia le condizioni che l'interesse, come del resto dimostrato dalla partecipazione a questo convegno.

Abbiamo anche la necessità di divulgare le nostre esperienze, anche perché spesso le pubblicazioni scientifiche non trovano spazio per ricerche di questa natura poiché non sono molto rigorose dal punto di vista scientifico. Tuttavia esse contengono una serie di elementi che possono essere utili e applicabili ma che restano chiuse nei nostri cassetti in quanto non abbiamo a disposizione i canali attraverso i quali veicolare queste nostre esperienze.

Credo che, se tutti sono d'accordo, intorno a queste considerazioni si possa preparare un documento.

A chiusura di questa Tavola Rotonda, ringrazio tutti i partecipanti.

Conclusioni del Presidente della SISS

Innanzitutto ringrazio gli organizzatori del convegno per il successo che esso ha avuto. Un successo che si vede sia dalla quantità dei partecipanti che dalla qualità degli interventi.

A conclusione di questo convegno ritengo che occorrerà preparare un documento da portare all'attenzione degli organismi responsabili. La necessità che a mio parere emerge (e qui parlo come chimico agrario) è quella di operare con una certa cautela nell'adoperare tutti i dati che abbiamo a disposizione. Per esempio, a tutt'oggi, continuiamo a parlare di metalli nell'ambiente e nel suolo, espressi come contenuto totale. Questo è chiaramente un assurdo perché in forma totale molti elementi non risultano pericolosi. Ad esempio, ci 'mangiamo' quantità notevoli di solfato di bario quando ci sottoponiamo alle radiografie, ma non riscontriamo fenomeni di tossità nei pazienti, nonostante sia nota la tossicità del bario.

Allo stesso tempo la possibilità di poter disporre di apparecchiature sempre più sofisticate, che permettono di raggiungere limiti di rilevabilità estremamente bassi, non deve portarci a considerare inquinate matrici che in realtà non lo sono. Occorre ricordare che molti elementi sono utili oltre che dannosi. Quindi ci troviamo in una situazione nella quale registriamo accumuli incontrollati di alcuni elementi che, in certi casi, sono anche utili.

Possiamo citare l'esempio relativo al rame che, in alcuni suoli, a causa del suo utilizzo come fungicida, ha raggiunto concentrazioni di quintali per ettaro. Tuttavia abbiamo altre situazioni in cui il rame è presente in concentrazioni molto modeste.

Tutto ciò non è preso in considerazione dal Ministero dell'Ambiente, che fissa concentrazioni limite di rame così basse che impediscono l'uso di certe biomasse. Occorre anche affermare che limiti troppo bassi in alcuni fertilizzanti possono considerarsi frode commerciale a tutti gli effetti.

Bisognerà quindi darsi delle regole e stabilire ciò che è troppo e ciò che è poco. Se, per esempio, consideriamo gli elementi che sono considerati 'utili', possiamo vedere che deficienze nell'alimentazione si hanno per certi elementi. Il grande lavoro effettuato dal prof Santoprete sui prodotti alimentari ha messo in luce che l'alimentazione della popolazione italiana è carente per circa il 50% di cromo. Tuttavia in farmacia si vendono integratori alimentari a base di cromo, di nickel ed altri elementi. Questo evidenzia che il trend futuro è quello di una alimentazione che si baserà sempre più su prodotti chimici, perché molti elementi vengono somministrati in quantità troppo basse rispetto alle necessità reali. Quindi, se da una parte esi-

ste il pericolo dell'accumulo, dall'altra abbiamo un problema di carenza. Il cromo, ad esempio, non è un elemento essenziale alle piante ma lo è per l'uomo; quindi se l'alimentazione risulta carente, occorrerà somministrare quest'elemento. Molti integratori a base di cromo sono prodotti ricchi di cromo. Le aree geografiche in cui la popolazione presenta percentuali inferiori di infarti rispetto alla media generale sono, di solito, quelle in cui è segnalata una maggior presenza di Cr nel terreno. Con questo non voglio dire che il Cr va trattato come elemento solo utile ma non si può considerare come un elemento del tutto dannoso.

Per quanto riguarda il Cu il discorso è ancora più interessante, in quanto esistono in commercio almeno 35 integratori alimentari venduti in farmacia che vengono utilizzati anche dalle gestanti e da tutti coloro che hanno bisogno di integratori vitaminici. Questi prodotti, molto spesso, contengono altri elementi pesanti come Zn, Cu e Ni.

Quanto detto finora ha il solo scopo di ricordare, anche a chi come noi si occupa di questi problemi, di usare un po' di realismo e di equilibrio nel considerare i problemi ambientali. E' indispensabile non distaccarsi dalla natura, proprio in periodo, come l'attuale, caratterizzato purtroppo da un forte inquinamento ambientale. Chi come noi si occupa di questi problemi non si deve prestare ad una specie di caccia alle streghe perché, altrimenti, facciamo il gioco di coloro che trovano più comodo fornirci le stese cose tramite i prodotti farmaceutici piuttosto che attraverso una corretta alimentazione.

Tornando al contributo che noi possiamo dare su molti argomenti bisognerà prevedere qualche grosso progetto di ricerca su questi argomenti. Già ieri in apertura di questo convegno il rappresentante dell'Enea ha rilevato che questo progetto interessa l'Enea stessa, il Ministero dell'Ambiente, della Sanità e, probabilmente quello dell'Agricoltura.

In conclusione vorrei sottolineare l'importanza della l'interdisciplinarietà di questi studi.

Come Presidente della SISS devo sottolineare che la nostra associazione è l'unica società scientifica interdisciplinare del nostro Paese. Nella Bioremediation abbiamo bisogno di un approccio interdisciplinare. Proprio la SISS, avendo una base interdisciplinare, potrà fare molto per l'ambiente, per la produttività agraria, e per la società. In questo modo potrà affrontare il prossimo cinquantennio con degli orizzonti ancora più aperti rispetto a quando è stata fondata.

Ringrazio tutti i presenti per la partecipazione.

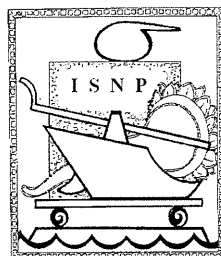
Paolo Sequi



Sessione 4

Poster

ENEA



VARIAZIONE DI PARAMETRI MORFO-FISIOLOGICI DI PIANTE DI ORZO E DI AVENA ALLEVATE IN MICROCOSMI TRATTATI CON METALLI PESANTI

E. Argese¹, E. Delaney², F. Agnoli², F. Faraon¹,
A. Sorgonà², G. Cacco¹

¹ Dipartimento di Scienze Ambientali, Università Ca' Foscari di Venezia

² Dipartimento di Agrochimica ed Agrobiologia, Università degli Studi "Mediterranea" di Reggio Calabria

Premessa

L'utilizzazione delle piante per la rimozione dei metalli pesanti dal suolo appare essere una via promettente per la bonifica di siti contaminati con costi relativamente bassi rispetto alle convenzionali tecniche di disinquinamento. Si stima che il costo per la depurazione di un terreno contaminato sia dell'80-90% inferiore rispetto a quello sostenuto per la rimozione e stoccaggio del suolo (Raskin e Ensley, 2000).

I meccanismi di assorbimento, traslocazione e compartimentazione di metalli pesanti nelle piante stanno alla base dei processi di fitodepurazione. L'efficacia di tali processi risiede principalmente nella capacità della pianta di intercettare i metalli e di assorbirli selettivamente con elevata efficienza. Per questo è essenziale che la pianta disponga: (i) di un apparato radicale in grado di accrescersi velocemente così da esplorare grandi volumi di suolo; (ii) di radici che assorbano selettivamente e con alta efficienza i metalli pesanti. È, inoltre, essenziale che la fisiologia ed il metabolismo della pianta siano in grado di sopportare la tossicità dei metalli pesanti contenendone gli effetti negativi sia sulla crescita dell'apparato radicale sia sull'efficienza di trasporto dei nutrienti. In questo lavoro vengono riportati alcuni risultati preliminari riguardanti l'effetto del cadmio, del rame e dello zinco sull'accrescimento, sullo sviluppo della morfologia radicale e sull'attività di trasporto dei nitrati in piante di orzo ed avena che sembrano possedere una buona tolleranza ai metalli pesanti (Ebbs e Kochian, 1998).

Le piante sono state allevate in substrato solido costituito da vermiculite trattata con soluzione di Hoagland contenente differenti concentrazioni di metalli in modo da realizzare opportune condizioni di equilibrio tra il metallo presente nella soluzione circolante e quello entrato nel com-

plesso di scambio dell'argilla. Quest'approccio permette di avvicinarsi alle condizioni esistenti nel terreno, in cui il complesso di scambio svolge, com'è noto, un ruolo fondamentale nella biodisponibilità dei metalli pesanti.

Materiali e metodi

Trattamento dell'argilla ed allestimento dei microcosmi

Come substrato solido per l'allestimento dei microcosmi è stata utilizzata la vermiculite commerciale (Germisol F, BPB Milano). Al fine di eliminare le eventuali impurezze di metalli e gli aggregati di carbonato di calcio presenti in tale argilla, il substrato argilloso è stato trattato con una soluzione di HCl 0.1 M per 2 h (peso/volume = 1 g/10 ml). Successivamente, l'argilla è stata sottoposta a lavaggi con acqua deionizzata fino a completa eliminazione dell'acido.

L'argilla è stata, quindi, messa in contatto per 20 h con soluzione di Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) modificata sostituendo il nitrato con il cloruro e diluita al 40%, mantenendo lo stesso rapporto peso/volume. Negli esperimenti con metalli pesanti, l'argilla è stata trattata con soluzione nutritiva addizionata con opportune concentrazioni di questi ultimi. Dopo questo pretrattamento, l'argilla è stata rapidamente e ripetutamente lavata con acqua deionizzata, al fine di eliminare i metalli non entrati nel complesso di scambio. Infine è stata sottoposta ad un ultimo lavaggio con soluzione di Hoagland non addizionata con metalli.

I microcosmi di allevamento sono stati allestiti addizionando alla vermiculite così trattata un'eguale quantità in volume di materiale inerte, perlite espansa (Perlite s.r.l., Milano).

Materiale vegetale e crescita delle plantule

Semi di avena (*Avena sativa* L.) e di orzo (*Hordeum disticum* L.) sono stati sterilizzati per 20 minuti in una soluzione all'1% di ipoclorito di sodio e lavati più volte con acqua deionizzata. Dopo averli trasferiti su carta da filtro imbibita con acqua deionizzata, sono stati posti in un germinatoio a 21° C ed al buio. Dopo 36 h, i germinelli sono stati collocati nei microcosmi opportunamente allestiti e trasferiti in una camera di crescita con intensità luminosa di 80 Wm⁻² e temperatura di 21° C.

Dopo sei giorni di crescita, le piante di orzo ed avena sono state tolte dai microcosmi di allevamento e lavate ripetutamente al fine di allontanare i frammenti di substrato argilloso aderenti all'apparato radicale. Una parte è stata utilizzata per gli esperimenti di trasporto del nitrato, men-

tre quella rimanente, dopo essere stata pesata è stata posta in stufa per 24 h alla temperatura di 105°C e utilizzata per la successiva determinazione del contenuto di metalli pesanti.

Determinazione del contenuto di metalli pesanti nelle piante e nell'argilla

Per la determinazione del contenuto di Cd, Cu e Zn nei tessuti vegetali sono stati utilizzati 500 mg di sostanza secca a cui sono stati aggiunti, direttamente nei contenitori di Teflon, 8 ml di HNO₃ (BDH) al 69% e 8 ml di H₂O₂ (Merck) al 30% vol.

Dopo circa due ore sotto cappa, scomparsa l'effervescenza, i contenitori chiusi sono stati messi in digestore a microonde (CEM, MDS, 2000). Un programma di digestione in tre fasi ha permesso di raggiungere gradualmente la temperatura di 120° C e la pressione di 100 psi.

Per quanto riguarda il substrato argilloso, sono stati messi nei contenitori in Teflon circa 100 mg di campione secco. Al campione sono stati aggiunti 5 ml di H₂O Milli Q, 3 ml di acqua regia e 1.5 ml di HF (48%). Dopo un ciclo in digestore a microonde, mantenendo per un'ora la temperatura di 180° C e la pressione di 140 psi, al campione sono stati aggiunti 5ml di una soluzione satura di H₃BO₃ per neutralizzare l'acido fluoridrico non reagito. Il campione è stato posto nuovamente in digestore a microonde per 1 h nelle medesime condizioni del ciclo precedente.

Le soluzioni ottenute nella digestione dei campioni sono quindi state portate a volume (50 ml) con acqua Milli Q, messe in contenitori di polietilene e conservate in frigorifero fino al momento dell'analisi.

Le analisi sono state eseguite utilizzando uno spettrometro di assorbimento atomico (Spectra 250 Plus Varian) fornito di doppio raggio e ricerca automatica della lunghezza d'onda ottimale, equipaggiato con una torretta a 4 lampade a catodo cavo. Lo strumento è stato utilizzato sia nella configurazione a fiamma aria/acetilene, sia in quella a fornetto di grafite pirolitica (mod. GTA-96, Varian).

Tutte le concentrazioni dei metalli pesanti presenti nei campioni, sia vegetali sia di argilla, sono state calcolate riferendosi al peso secco del campione stesso.

Trasporto del nitrato in radici di orzo

Al sesto giorno di crescita, le giovani plantule di orzo sono state trasferite in soluzione di Hoagland contenente KNO₃ in concentrazione 50 µM, mantenuta costantemente aerata ed alla temperatura di 24° C per un pe-

riodo di 24 ore (Cacco *et al.*, 2000). Ai tempi 0, 2, 4, 7 e 24 ore le piante sono state trasferite in bicchieri contenenti 80 ml di soluzione nutritiva addizionata con KNO_3 in concentrazione 100 (M, mantenuta alla temperatura di 24°C mediante bagno termostatico. Da questa soluzione è stato prelevato 1 ml a 0, 10, 20, 40, 60, 80 minuti. Al termine di questo periodo le plantule sono state riposte nell'originaria soluzione di Hoagland per essere riutilizzate nei tempi successivi. La concentrazione di nitrato nelle aliquote così prelevate è stata determinata spettrofotometricamente (Jasco Serie V-500) alla lunghezza d'onda di 210 nm (Goldsmith *et al.*, 1973). La velocità di assorbimento netto del nitrato è stata calcolata dal tratto lineare della curva di consumo del nitrato ed espressa come μmoli di nitrato assorbito per ora e per grammo di peso fresco delle radici. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

Modello matematico descrittivo delle fasi di induzione e di decadimento del trasporto del nitrato

Le fasi di induzione e di decadimento dell'assorbimento netto del nitrato sono state analizzate attraverso il metodo di regressione non lineare usando l'algoritmo di Levenberg – Marquardt e la cui equazione, precedentemente descritta (Cacco *et al.*, 2000), ha la seguente formulazione:

$$V(t) = A_1 \times (k_{\text{ind}}/k_{\text{inh}} - k_{\text{ind}}) \times [\exp(-k_{\text{ind}} \times t) - \exp(-k_{\text{inh}} \times t)] + A_2 \times \exp(-k_{\text{inh}} \times t)$$

dove $V(t)$ è la velocità di assorbimento netto del nitrato (μmoli di nitrato $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ p.f.), t è il tempo (h), k_{ind} e k_{inh} sono, rispettivamente, le costanti di velocità di induzione e di inibizione da feedback (h^{-1}). A_1 e A_2 rappresentano rispettivamente i parametri cinetici relativi alla velocità indotta e costitutiva dell'assorbimento del nitrato.

Analisi morfologica e topologica degli apparati radicali

L'immagine dell'apparato radicale è stata acquisita ed analizzata con il sistema WinRhizo STD 1600 (Instruments Regent Inc., Canada). Per entrambe le specie, i parametri morfologici radicali misurati sono stati la lunghezza totale ed il numero di apici. L'analisi topologica utilizzata per valutare il modello di ramificazione del sistema radicale è stata quella sviluppata da Fitter (1986).

Risultati e discussione

Trattamento del substrato argilloso

La realizzazione di microcosmi costituiti da un substrato di vermiculite permette di superare le semplificazioni e le limitazioni intrinseche ne-

riodo di 24 ore (Cacco *et al.*, 2000). Ai tempi 0, 2, 4, 7 e 24 ore le piante sono state trasferite in bicchieri contenenti 80 ml di soluzione nutritiva addizionata con KNO_3 in concentrazione 100 (M, mantenuta alla temperatura di 24°C mediante bagno termostatico. Da questa soluzione è stato prelevato 1 ml a 0, 10, 20, 40, 60, 80 minuti. Al termine di questo periodo le plantule sono state riposte nell'originaria soluzione di Hoagland per essere riutilizzate nei tempi successivi. La concentrazione di nitrato nelle aliquote così prelevate è stata determinata spettrofotometricamente (Jasco Serie V-500) alla lunghezza d'onda di 210 nm (Goldsmith *et al.*, 1973). La velocità di assorbimento netto del nitrato è stata calcolata dal tratto lineare della curva di consumo del nitrato ed espressa come μmoli di nitrato assorbito per ora e per grammo di peso fresco delle radici. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

Modello matematico descrittivo delle fasi di induzione e di decadimento del trasporto del nitrato

Le fasi di induzione e di decadimento dell'assorbimento netto del nitrato sono state analizzate attraverso il metodo di regressione non lineare usando l'algoritmo di Levenberg – Marquardt e la cui equazione, precedentemente descritta (Cacco *et al.*, 2000), ha la seguente formulazione:

$$V(t) = A_1 \times (k_{\text{ind}}/k_{\text{inh}} - k_{\text{ind}}) \times [\exp(-k_{\text{ind}} \times t) - \exp(-k_{\text{inh}} \times t)] + A_2 \times \exp(-k_{\text{inh}} \times t)$$

dove $V(t)$ è la velocità di assorbimento netto del nitrato (μmoli di nitrato $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ p.f.), t è il tempo (h), k_{ind} e k_{inh} sono, rispettivamente, le costanti di velocità di induzione e di inibizione da feedback (h^{-1}). A_1 e A_2 rappresentano rispettivamente i parametri cinetici relativi alla velocità indotta e costitutiva dell'assorbimento del nitrato.

Analisi morfologica e topologica degli apparati radicali

L'immagine dell'apparato radicale è stata acquisita ed analizzata con il sistema WinRhizo STD 1600 (Instruments Regent Inc., Canada). Per entrambe le specie, i parametri morfologici radicali misurati sono stati la lunghezza totale ed il numero di apici. L'analisi topologica utilizzata per valutare il modello di ramificazione del sistema radicale è stata quella sviluppata da Fitter (1986).

Risultati e discussione

Trattamento del substrato argilloso

La realizzazione di microcosmi costituiti da un substrato di vermiculite permette di superare le semplificazioni e le limitazioni intrinseche ne-

gli studi di fisiologia della nutrizione, che utilizzano soluzioni idroponiche come fonte di nutriliti. L'impiego dell'argilla simula, almeno in prima approssimazione, il complesso di scambio del terreno, realizzando gli equilibri ionici fra suolo e soluzione circolante. In queste condizioni l'apparato radicale, contrariamente a quanto avviene nelle soluzioni idroponiche, dispone di una fonte di nutriliti che vengono lentamente rilasciati dalla matrice argillosa.

Il blando trattamento della vermiculite con HCl 0,1 M permette di solubilizzare i carbonati, minimizzando l'attacco alla struttura dell'argilla come si verifica con soluzione più acida (HCl 0,5 M), che porta tra l'altro ad un significativo abbassamento della CSC, da 46,4 a 31,3 cmoli/kg. Questa riduzione della CSC può essere spiegata con una graduale destrutturazione del reticolo cristallino ad opera dell'acido, che porta al rilascio in soluzione di ioni Mg^{2+} , parte integrante dell'unità strutturale della vermiculite.

Questo è confermato dal fatto che, mentre il rilascio di calcio e di potassio avviene rapidamente (vedi figura 1), quello del magnesio non si stabilizza neanche per tempi di contatto lunghi, supportando l'ipotesi che avvengano fenomeni di destrutturazione dell'argilla.

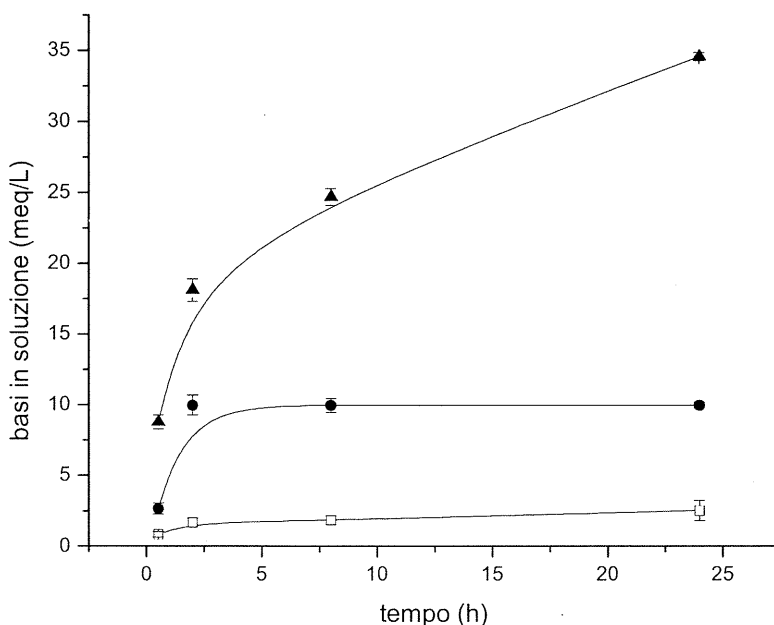


Figura 1: Concentrazione (meq/L) di K^+ (□), Mg^{2+} (▲) e Ca^{2+} (●) in funzione del tempo (h) misurate nella soluzione di HCl 0,1 M messa in contatto con la vermiculite commerciale.

Il trattamento con soluzione di Hoagland a diverse concentrazioni (20%, 40%, 80%, 100%, 160%, 320%) ha permesso di determinare (vedi figura 2) le concentrazioni degli ioni Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ entrati nei siti di scambio alle diverse diluizioni, e questo al fine di individuare la concentrazione della soluzione di Hoagland che satura circa il 50% dei siti presenti nel complesso di scambio. Tale risultato viene raggiunto trattando la vermiculite con soluzione di Hoagland al 40%.

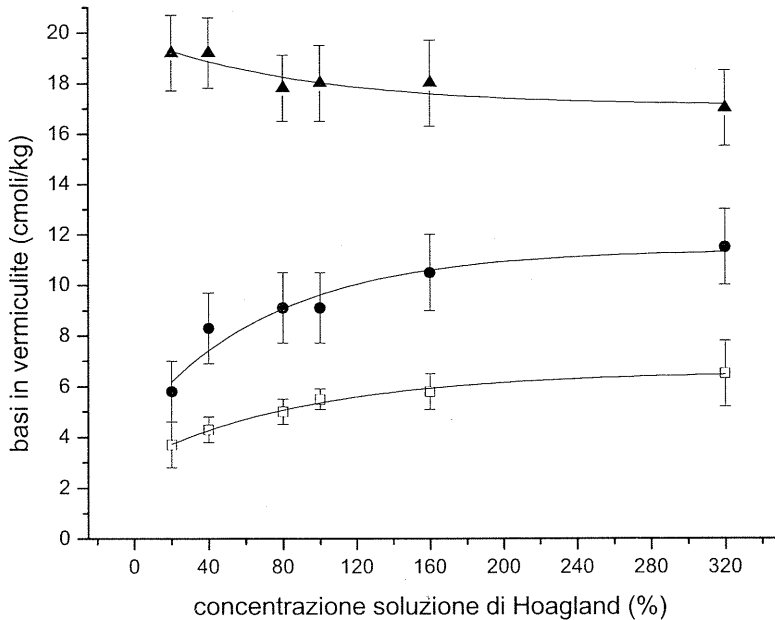


Figura 2: Concentrazione (cmoli/kg) di K^+ (□), Mg^{2+} (▲) e Ca^{2+} (●) in vermiculite messa in contatto con soluzioni di Hoagland a diverse concentrazioni.

Accumulo di metalli pesanti in orzo ed avena

Le modalità di accumulo del metallo nei tessuti vegetali mostrano andamenti differenti in relazione alle specie vegetali ed ai tipi di metallo.

La figura 3 mostra l'andamento dell'accumulo di Cd dopo sei giorni di crescita di avena e orzo in microcosmi trattati con soluzione di Hoagland al 40% addizionata con le seguenti concentrazioni di Cd: 0,032 mM, 0,16 mM, 0,8 mM e 4 mM.

L'andamento dell'accumulo può essere descritto tramite un modello matematico semiempirico del tipo $[\text{Cd}_{\text{tess veg}}] = A * [\text{Cd}_{\text{sub}}] / (B + [\text{Cd}_{\text{sub}}])$ che si adatta ai valori sperimentali ($R^2=0.933$ per avena e $R^2=0.984$ per orzo). I parametri dell'equazione rappresentano rispettivamente: A il massimo

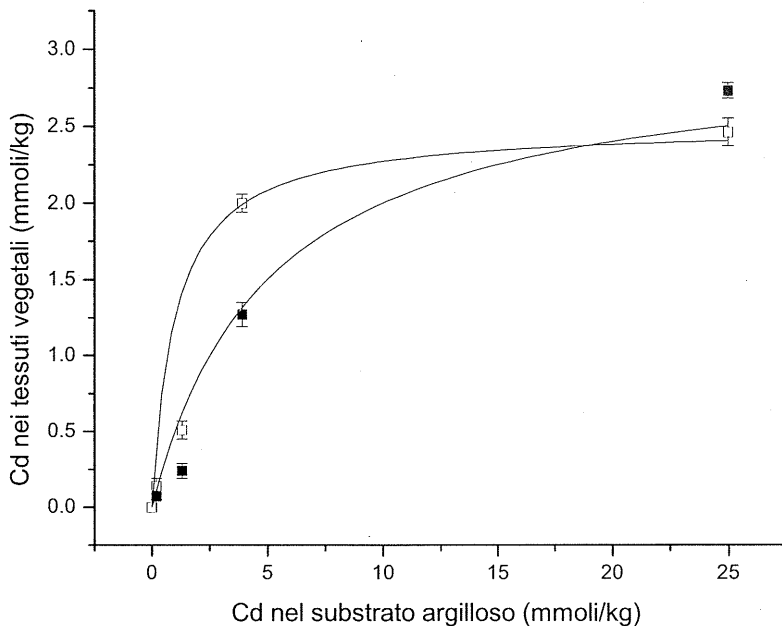


Figura 3: Concentrazione (mmoli/kg) di Cd misurata nei tessuti vegetali di piante di 6 gg di orzo (■) e avena (□) in funzione delle diverse concentrazioni (mmoli/kg) di metallo nel substrato argilloso.

valore di accumulo raggiungibile nel tessuto per un valore infinito di concentrazione nel substrato argilloso e B il valore della concentrazione quando il valore di accumulo massimo viene dimezzato. Il valore di $1/B$ rappresenta una stima dell'affinità del tessuto radicale nei confronti del cadmio. Dai risultati ottenuti si può dedurre che, alle alte concentrazioni, l'orzo possiede una maggiore capacità di accumulo ($A=2.73 \pm 0.04 \text{ mmoli kg}^{-1} \text{ p.s.}$) rispetto all'avena ($A=2.46 \pm 0.02 \text{ mmoli kg}^{-1} \text{ p.s.}$). Al contrario, l'avena sembra possedere una maggiore affinità per il cadmio avendo un valore di $1/B$ ($0.71 \pm 0.06 \text{ mmoli}^{-1} \text{ kg p.s.}$) maggiore rispetto a quello dell'orzo ($0.36 \pm 0.01 \text{ mmoli}^{-1} \text{ kg p.s.}$). Pertanto, a basse concentrazioni di cadmio l'avena accumula più efficientemente dell'orzo, mentre accade il contrario alle alte concentrazioni.

L'effetto dell'esposizione delle piante a concentrazioni crescenti di metalli ed il conseguente accumulo degli stessi si traduce in una diminuzione lineare del peso fresco medio totale. In figura 4 viene riportata la diminuzione percentuale, rispetto al controllo, del peso medio fresco delle piante esposte a differenti concentrazioni di Cd. Si può osservare che all'aumentare della concentrazione di Cd nel tessuto in entrambe le specie si verifica una diminuzione percentuale lineare del peso.

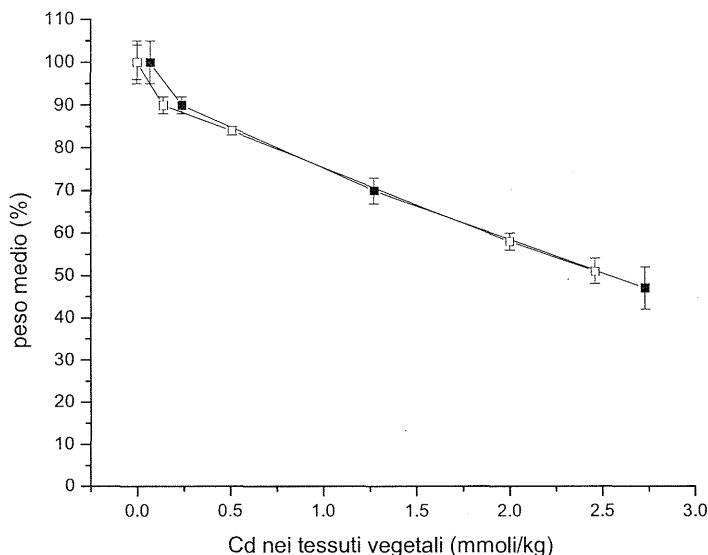


Figura 4: Diminuzione del peso medio percentuale di piante di 6 gg di orzo (■) e avena (□) in funzione della concentrazione (mmoli/kg) di Cd nei relativi tessuti vegetali.

La ragione della caduta di accrescimento in piante esposte al Cd può essere ricondotta a una serie di fattori che condizionano la fisiologia dell'accrescimento; tra questi, l'inibizione della fotosintesi, l'inattivazione enzimatica, la riduzione della traspirazione come conseguenza della chiusura degli stomi, la caduta del potenziale idrico, la diminuzione dell'estensibilità della parete cellulare e l'aumento della senescenza a carico delle foglie (Rodecap *et al.*, 1994; Prasad, 1995; Öncel *et al.*, 2000).

Nelle figure 5 e 6 sono illustrati rispettivamente l'accumulo di Zn nelle due piante e la conseguente variazione del loro peso medio percentuale. Al contrario di quanto emerso nel caso del Cd, l'accumulo di Zn nei tessuti vegetali aumenta all'aumentare della sua concentrazione nel substrato argilloso senza raggiungere un livello di saturazione, con andamenti simili in entrambe le specie. Inoltre, sia in orzo sia in avena, non si rilevano diminuzioni di peso rispetto alle piante non trattate.

Anche nel caso del Cu (figure 7 e 8) nell'intervallo di concentrazioni esplorato l'accumulo aumenta all'aumentare della concentrazione nel substrato argilloso, con la differenza però che i livelli di Cu accumulati da avena risultano maggiori rispetto a quelli accumulati da orzo.

È interessante osservare come l'andamento dell'accumulo non si rispecchi in una maggiore diminuzione percentuale di peso in avena; in-

fatti l'effetto sulla riduzione di peso risulta inferiore o uguale a quello verificato per orzo.

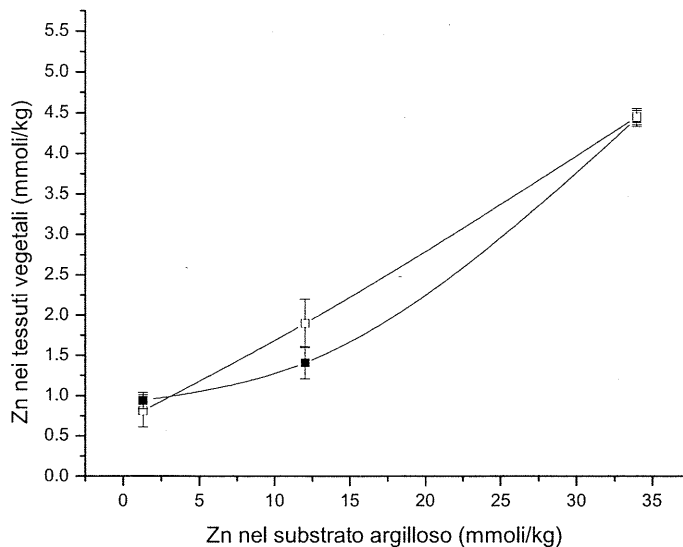


Figura 5: Concentrazione (mmoli/kg) di Zn misurata nei tessuti vegetali di piante di 6 gg di orzo (■) e avena (□) in funzione delle diverse concentrazioni (mmoli/kg) di metallo nel substrato argilloso

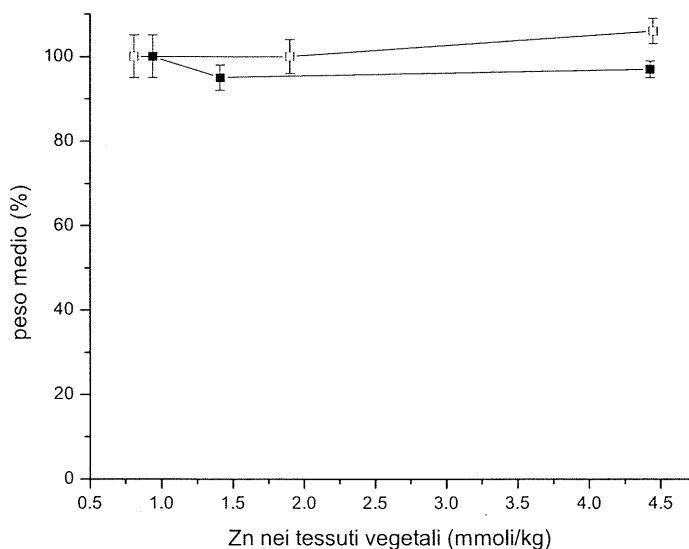


Figura 6: Diminuzione del peso medio percentuale di piante di 6 gg di orzo (■) e avena (□) in funzione della concentrazione (mmoli/kg) di Zn nei relativi tessuti vegetali.

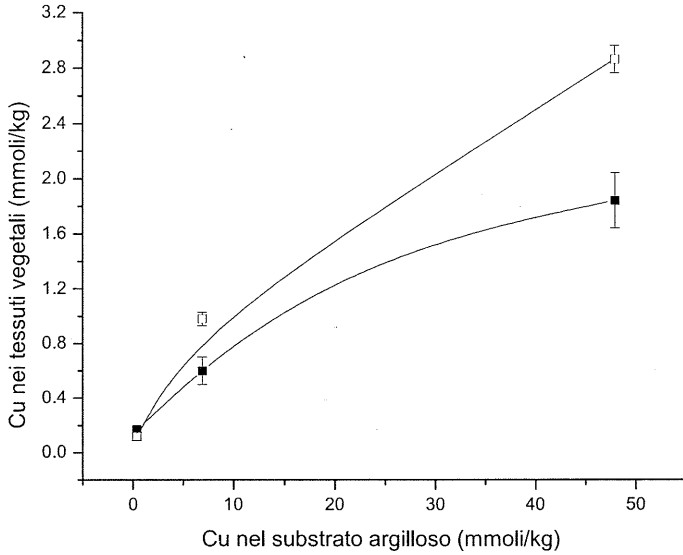


Figura 7: Concentrazione (mmoli/kg) di Cu misurata nei tessuti vegetali di piante di 6 gg di orzo (■) e avena (□) in funzione delle diverse concentrazioni (mmoli/kg) di metallo nel substrato argilloso.

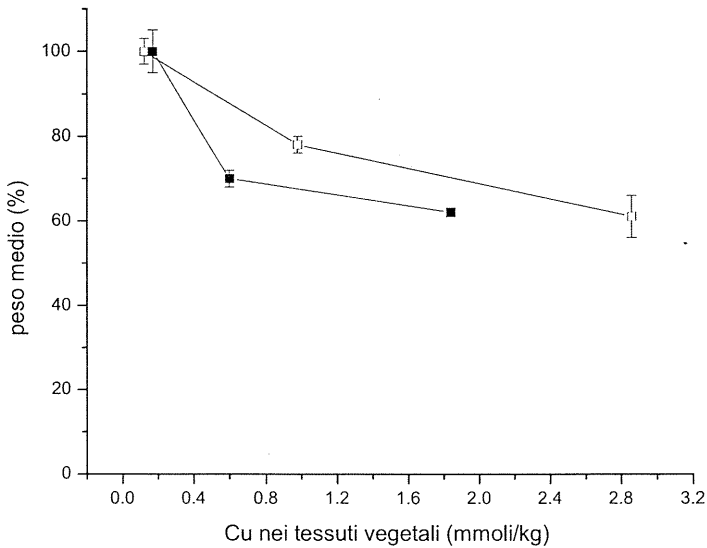


Figura 8: Diminuzione del peso medio percentuale di piante di 6 gg di orzo (■) e avena (□) in funzione della concentrazione (mmoli/kg) di Cu nei relativi tessuti vegetali.

Trasporto dei nitrati in radici di orzo

Per valutare gli effetti indotti a carico della funzionalità degli apparati radicali di orzo, successivamente ai trattamenti con metalli pesanti, è stato condotto un esperimento di trasporto dei nitrati in soluzione idroponica.

Come riportato in letteratura per altre specie, quali mais, frumento, *Arabidopsis sp.* (Ivashikina e Feyziev, 1998; Crawford e Glass, 1998), il trasporto dei nitrati in funzione del tempo anche nel caso di orzo si distingue in due fasi: una di induzione, seguita da una di inibizione da feedback.

In figura 9 si può osservare come il trasporto iniziale di nitrati in questa specie, allevata in loro assenza, viene indotto fino a valori molto elevati quando le plantule vengono esposte a soluzione di Hoagland contenente nitrato in concentrazione 100 μM . In Tabella 1 sono riportati i valori di trasporto del nitrato nella fase iniziale di esposizione al nitrato (trasporto costitutivo) e dopo il massimo raggiungimento del valore di trasporto (trasporto induttivo o full induction).

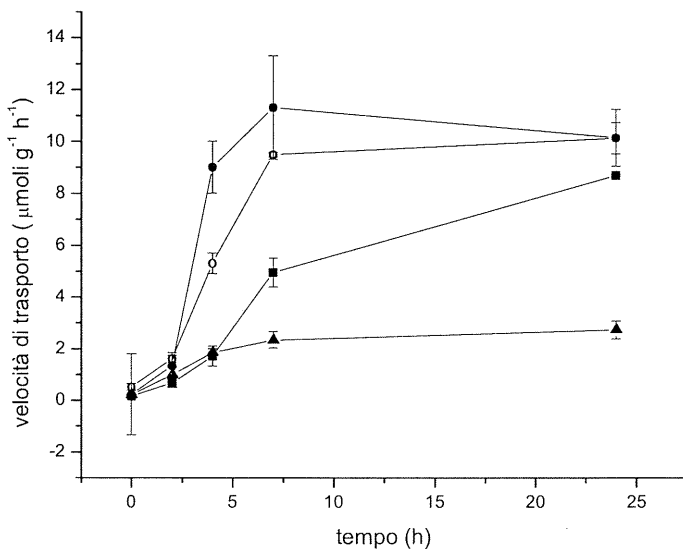


Figura 9: Variazione della velocità ($\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) di assorbimento dei nitrati in funzione del tempo in piante di orzo cresciute in substrato argilloso in assenza (○) ed in presenza di Cd 0.8 mM (■), Cu 0.8 mM (▲) e Zn 0.8 mM (●).

L'incremento percentuale del trasporto nel controllo per effetto dell'induzione risulta del 1400%. Anche i campioni trattati con metalli seguono lo stesso andamento seppure con valori percentuali più modesti; in particolare, per quanto concerne zinco e rame, si osserva che l'incremento

percentuale dovuto all'induzione è, rispettivamente, del 700% e 450%, dunque sensibilmente inferiore rispetto al controllo. L'eccezione è costituita dal cadmio, che mostra un valore percentuale di induzione (1200%) simile a quello del controllo (vedi tabella 1).

Tabella 1: Parametri cinetici di trasporto dei nitrati in piante di orzo di 6 giorni cresciute in substrato argilloso in assenza ed in presenza di Cd 0.8 mM, Cu 0.8 mM e Zn 0.8 mM.

Trattamento	Trasporto indotto (mmoli h ⁻¹ g ⁻¹ p.f.)	Trasporto costitutivo (mmoli h ⁻¹ g ⁻¹ p.f.)	Incremento trasporto %	k _{ind} h ⁻¹	k _{inh} h ⁻¹	Nitrato assorbito in 24 h (mmoli g ⁻¹ p.f.)	R ²
Controllo	10.4 ± 0.9	0.7 ± 0.2	1400	0.19 ± 0.06	2.5 ± 1.2	193	0.965
Cd	9.0 ± 2.2	0.75 ± 0.04	1200	0.15 ± 0.03	1.0 ± 0.4	143	0.909
Cu	3.0 ± 0.2	0.64 ± 0.07	450	0.26 ± 0.04	0.80 ± 0.02	56	0.999
Zn	11.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2	700	0.35 ± 0.21	0.6 ± 0.1	225	0.999

Per quanto riguarda, invece, l'assorbimento netto di nitrato, l'abbattimento più drastico è dato dalla presenza del rame (vedi figura 9): le piante trattate con questo metallo assorbono solo 56 µmoli di nitrato in 24 ore, quasi quattro volte di meno rispetto al controllo (193 µmoli in 24 ore). La gerarchia di abbattimento dell'attività di trasporto dovuta ai metalli pesanti è rame > cadmio > zinco = controllo (vedi tabella 1).

Fatta eccezione per lo zinco, gli altri metalli sono in grado di abbattere drasticamente l'attività di assorbimento dei nitrati. Ciò influisce sicuramente sullo sviluppo che, insieme alla diminuita estensione dell'apparato radicale e alla caduta di assorbimento di nitrato necessario per la crescita della pianta, può limitare il processo di bioaccumulo dei metalli pesanti.

Ulteriori esperimenti sono necessari per la conferma e spiegazione di tali comportamenti.

Analisi morfologica delle radici di piante di avena ed orzo trattate con metalli pesanti

Il trattamento con metalli pesanti si risolve in entrambe le specie con una riduzione sia della lunghezza sia del numero di apici. In particolare risulta evidente (tabella 2) una significativa differenza rispetto al controllo nella lunghezza degli apparati radicali delle piante trattate rispettivamente con il Cu in avena e con Cd e Cu in orzo. In generale, la riduzione della lunghezza radicale segue la gerarchia Cu > Cd > Zn ≥ controllo. Lo stesso andamento si osserva nel caso della riduzione del numero di apici radicali in avena, mentre, nel caso dell'orzo, la gerarchia risulta invertita per Cu e Cd, (Cd > Cu > Zn ≥ controllo).

Tabella 2: Numero di apici e lunghezza (cm) delle radici in piante di orzo e di avena di 6 giorni cresciute in substrato argilloso in assenza ed in presenza di Cd 0.8 mM, Cu 0.8 mM e Zn 0.8 mM.

Specie	Trattamento	Num. Apici	Lunghezza Totale (cm)
Hordeum disticum L.	Controllo	17 ± 4	87 ± 5
	Cu	10 ± 1	11.2 ± 0.6
	Cd	6.8 ± 0.3	37 ± 2
	Zn	14 ± 3	78 ± 5
Avena sativa L.	Controllo	18 ± 1	41 ± 3
	Cu	7 ± 1	5 ± 1
	Cd	9 ± 1	32 ± 4
	Zn	18 ± 2	39 ± 5

Quindi, gli effetti di metalli sull'apparato radicale (lunghezza e numero di apici) risultano differenti a seconda del metallo e della specie vegetale considerata. Tra i metalli utilizzati si differenzia nettamente lo zinco che sembra non avere alcun effetto sulla morfologia radicale, confermando quanto osservato a carico della biomassa totale (figura 6).

L'effetto dei metalli sul numero di apici potrebbe essere collegato alle strategie messe in atto da parte della pianta per il superamento degli stress dovuti alla loro presenza. Infatti, la riduzione del numero di apici potrebbe comportare una diminuzione della capacità di assorbimento con conseguente diminuzione del trasporto dei metalli pesanti nei tessuti vegetali.

Ulteriori esperimenti sono necessari per approfondire questi comportamenti fisiologici che sono alla base della difesa delle piante nei confronti degli stress ambientali.

Conclusioni

La realizzazione di microcosmi, costituiti da un substrato argilloso di vermiculite addizionata di materiale inerte, ha permesso di superare il concetto di coltura idroponica in uso in quasi tutti gli studi di fisiologia vegetale. Infatti l'impiego dell'argilla, che simula il complesso di scambio del terreno, ha permesso di valutare almeno in prima approssimazione gli effetti degli equilibri ionici fra suolo e soluzione circolante sulla morfologia e fisiologia delle piante. Il condizionamento del substrato argilloso con soluzione di Hoagland ha consentito di ottenere un equilibrio dinamico riproducibile tra i cationi presenti nella soluzione nutritiva e quelli nel complesso di

scambio. Dallo studio è emerso che le modalità di accumulo dei metalli nei tessuti vegetali mostrano andamenti differenti in relazione alle specie vegetali ed ai tipi di metallo.

A parità di concentrazione, i metalli più tossici per avena e orzo si sono dimostrati il rame ed il cadmio, al contrario dello zinco che anche alla massima concentrazione utilizzata non ha manifestato evidenti effetti tossici nei confronti delle piante. Negli esperimenti riguardanti l'efficienza di trasporto dei nitrati si è riscontrato che la diminuzione di quest'ultima riflette, nelle varie condizioni sperimentali, la seguente gerarchia di tossicità: Cu>Cd>Zn≥controllo.

I risultati ottenuti, per quanto preliminari, sono compatibili con l'ipotesi che l'efficienza del processo di disinquinamento da metalli pesanti tramite specie vegetali deve risolversi in un compromesso tra sviluppo ed efficienza di assorbimento dell'apparato radicale alle concentrazioni di metalli pesanti presenti nel suolo.

Riferimenti bibliografici

- CACCO G., ATTINÀ E., GELSOMINO A., SIDARI M., 2000, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 313-320.
- CRAWFORD N.M., GLASS D.M., 1998, *Trends in Plant Science*, 10-3, 389-395.
- EBBS S.D., KOCHIAN L.V., 1998, *Environmental Science and Technology*, 32, 802-806.
- FITTER A.H., 1986 *Annals of Botany* 58, 91-101.
- GOLDSMITH J., LIVONI J.P., NORBERG C.L., SEGEL I.H., 1973, *Plant Physiology*, 52, 362-367.
- HOAGLAND D.R., ARNON D.I., 1950, Circ. 347, Berkeley, CA: Agric Exp Stn, Univ of California.
- IVASHNIKA N.V., FEYZIEV Y.M., 1998, *Plant Science*, 131, 25-34.
- LUO Y., RIMMER D., 1994, *Environmental Pollution*, 88, 76-83.
- Mc GRATH S.P., 1997, *Contaminated Soils*, Ed INRA, Paris.
- ÖNCEL I., KELEÇ Y., ÜSTÜN A.S., 2000, *Environmental Pollution*, 107, 345-320.
- PRASAD M.N.V., 1995, *Environmental and Experimental Botany*, 35-4, 525-545.
- RASKIN I., ENSLEY B.D., 2000, *Phytoremediation of Toxic Metals*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- RODECAP K.D., TINGEY D.T., LEE E.H., 1994, *The Journal of Environmental Quality*, 23, 239-246.

IL CODICE TMVOC PER LA SIMULAZIONE NUMERICA DEL TRASPORTO DI COMPOSTI ORGANICI NEL SOTTOSUOLO IN CONDIZIONI MULTIFASE

Alfredo Battistelli¹, Karsten Pruess²

¹ Aquatec SpA (Gruppo ENI), 61047 S. Lorenzo in Campo (PU)

² Earth Sciences Division, LBNL, Berkeley, CA 94720, U.S.A.

Abstract

La capacità di simulare per via numerica il trasporto di contaminanti organici nel sottosuolo è importante per migliorare la comprensione dei processi dai quali dipende la ritenzione dei contaminanti nei suoli, il loro trasporto nelle acque di falda e la degradazione mediata dall'attività di microrganismi. La modellistica numerica trova applicazione pratica nella progettazione e verifica di opzioni progettuali relative alla messa in sicurezza e alla bonifica di siti contaminati. Nel caso dei contaminanti organici, lo strumento modellistico deve essere in grado di simulare il trasporto e la ritenzione nel sottosuolo di miscele organiche in condizioni multifase, a temperatura variabile ed in geometria tridimensionale. Per questo scopo è in corso di sviluppo il codice di calcolo TMVOC, appartenente alla famiglia di simulatori numerici TOUGH2 (Pruess *et al.*, 1999). La principale caratteristica del codice è la trattazione composizionale della termodinamica di una miscela di composti organici, valida alle condizioni di pressione e temperatura incontrate nelle applicazioni di tipo ambientale.

TMVOC è sviluppato in due fasi successive nell'ambito dei progetti di ricerca REPIS (Bonifica di siti industriali contaminati) finanziato dal Fondo Ricerca ENI e PURE (Protection of groundwater resources at industrially contaminated sites) finanziato dalla Commissione Europea (5° Programma Quadro) e dal Fondo Ricerca ENI.

Introduzione

La contaminazione dell'atmosfera, dei suoli, delle acque sotterranee e superficiali ha assunto nei paesi industrializzati livelli decisamente critici, tali da compromettere gli ecosistemi naturali e da rappresentare un rischio reale per la salute umana. Fra i contaminanti, un ruolo particolare è rivestito dai composti organici, principalmente idrocarburi e composti organici clorurati che per livelli di consumo e peculiari caratteristiche rappresentano una delle fonti principali di contaminazione dei suoli e delle acque sot-

terranee. Una visione più attenta alle problematiche ambientali ha favorito l'emissione di normative tendenti da una parte a ridurre il rischio di immissione nell'ambiente di sostanze inquinanti, dall'altra ad esigere interventi di messa in sicurezza e di bonifica dei siti contaminati. Fra le attività che contribuiscono all'inquinamento da prodotti organici, le più indiziate sono la produzione di greggi petroliferi e il loro stoccaggio ed utilizzazione per processi di raffinazione e petrolchimici in genere. Gli interventi su siti contaminati da prodotti organici comprendono operazioni di messa in sicurezza, per arrestare in tempi brevi la trasmissione di inquinanti verso l'esterno, ed interventi di bonifica, tendenti a ripristinare in via definitiva condizioni accettabili di qualità per i suoli e le acque. Per entrambe le tipologie è necessario predisporre dei piani di caratterizzazione dei siti, analizzare la fattibilità tecnica ed economica di diverse opzioni, progettare e realizzare le opere, provvedere alla verifica dei risultati raggiunti mediante attività di monitoraggio. Risulta quindi necessario poter predire gli effetti nel tempo sulle condizioni di qualità del sito di diverse opzioni di intervento per la scelta dell'alternativa migliore e per il suo dimensionamento ottimale.

Una delle tecniche utilizzate per questi scopi è la modellizzazione per via matematica dei processi fisico-chimici che governano la migrazione dei contaminanti attraverso la zona non satura e quindi nelle falde sotterranee. Il codice di calcolo, in generale di tipo numerico, deve simulare in maniera attendibile i processi che determinano la ritenzione e il trasporto dei contaminanti attraverso un mezzo poroso in condizioni di saturazione acquosa parziale o totale. I composti organici hanno caratteristiche peculiari: si presentano a condizioni ambiente in genere in condizioni liquide; hanno solubilità in acqua limitate, tali da determinare la coesistenza della fase liquida organica con le fasi acquosa e gassosa; hanno pressioni di vapore sensibili; sebbene limitata, la solubilità di molti composti organici classificati come tossici o cancerogeni è sufficiente a provocare la contaminazione di elevati volumi di acqua di falda a concentrazioni superiori a quelle ammissibili; la fase liquida organica tende ad essere ritenuta anche per tempi lunghi per effetto delle forze capillari e per la riduzione della permeabilità effettiva a bassi valori della saturazione; i composti organici vengono degradati da microrganismi presenti nel sottosuolo sia in condizioni aerobiche che anaerobiche.

Per le analogie con l'ingegneria di serbatoio petrolifera, in particolare la simulazione del flusso trifase, inizialmente si è tentato di applicare in campo ambientale codici di calcolo sviluppati in quel settore. Le applicazioni ambientali presentano però caratteristiche che richiedono capacità di simulazione apposite. Fra queste citiamo: condizioni al contorno e condizioni di temperatura e pressione molto diverse; necessità di simulare processi

spesso trascurati nelle applicazioni petrolifere, come diffusione molecolare e dispersione idrodinamica, l'adsorbimento, la biodegradazione e la dissoluzione dei composti organici in fase acquosa; la descrizione della termodinamica di soluzioni di acqua, aria e composti organici volatili distribuiti fra le fasi acquosa, gassosa ed oleosa e la capacità di gestire l'apparizione o sparizione di una qualsiasi delle fasi; la necessità di simulare singoli composti ai quali è principalmente connesso il livello di rischio.

Per la simulazione di tali processi, si è puntato su di una formulazione numerica che presentasse caratteristiche adeguate e garanzie di affidabilità testimoniate da esperienze applicative documentate. Si è quindi deciso di sviluppare il codice, denominato TMVOC, nell'ambito dell'architettura numerica nota come TOUGH2 (Pruess *et al.*, 1999) sviluppata a partire dai primi anni ottanta presso il Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL). I programmi della famiglia TOUGH2 sono applicati con successo nei campi della ingegneria di serbatoio geotermica e petrolifera, della idrogeologia della zona non satura, del trasporto di contaminanti in zona satura e non satura, dello stoccaggio di scorie nucleari e dell'intrusione marina in acquiferi costieri (Pruess *ed.*, 1998). Il codice TMVOC è sviluppato nell'ambito di una collaborazione scientifica fra Aquater e LBNL che ha prodotto codici per la simulazione di sistemi geotermici e per la simulazione del flusso trifase non isoterma e in geometria tridimensionale di miscele costituite da acqua, aria e un composto organico volatile (VOC). Quest'ultimo codice, denominato T2VOC (Falta *et al.*, 1995), è utilizzato presso centri di ricerca e società di consulenza per l'interpretazione di risultati di laboratorio, per l'esecuzione di studi teorici e per la valutazione degli effetti indotti da interventi di bonifica di siti contaminati (Pruess *ed.*, 1998). TMVOC è sviluppato introducendo nel codice T2VOC la formulazione composizionale di miscele organiche messa a punto da Adenekan (1992) per un codice prototipo denominato M²NOTS.

La formulazione numerica del codice TMVOC

Con TOUGH2 (Transport Of Unsaturated Groundwater and Heat) si intende sia il codice numerico TOUGH2, sia un'architettura di simulazione a carattere generale, messa a punto per simulare il flusso di massa ed energia nel sottosuolo in condizioni multifase non isoterme. La generalità si fonda sulla considerazione che le equazioni che descrivono il flusso multifase hanno la stessa formulazione matematica, indipendentemente dal numero di componenti e di fasi presenti. La natura e le proprietà di una spe-

cifica miscela entrano in gioco nelle equazioni che descrivono il sistema solo attraverso parametri termodinamici e di trasporto, quali la densità, la viscosità dinamica e l'entalpia. Miscele fluide differenti possono quindi essere simulate ricorrendo alla stessa formulazione matematica del flusso adottando appositi moduli, denominati moduli EOS (Equation Of State), per la simulazione della termodinamica e il calcolo delle loro proprietà. La struttura modulare del codice TOUGH2 è mostrata in Fig. 1.

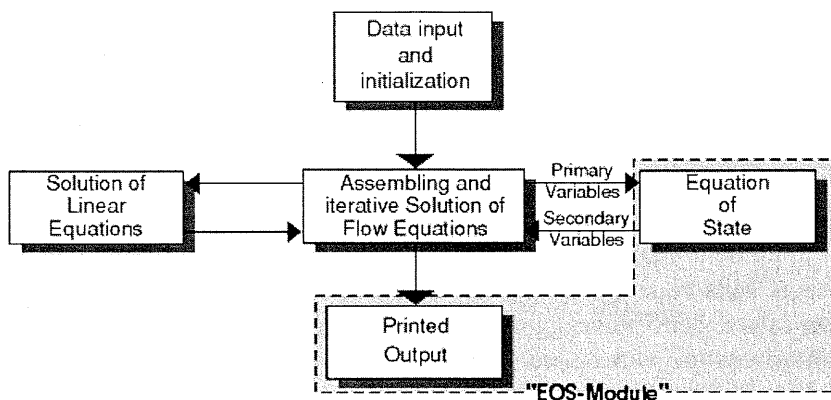


Fig. 1 - Struttura modulare del codice TOUGH2 (Pruess *et al.*, 1999).

Nella versione sviluppata in ambito REPIS, il sistema multifase è composto da NK componenti di massa comprendenti acqua, azoto, ossigeno, anidride carbonica e NK-4 composti organici volatili. I componenti di massa si distribuiscono in condizioni di equilibrio chimico e termodinamico locale fra le fasi fluide presenti, oltre al possibile adsorbimento dei composti organici sul mezzo poroso. Le uniche reazioni chimiche considerate sono le reazioni di biodegradazione. Il trasporto dei componenti avviene per advezione e diffusione molecolare nelle fasi acquosa, gassosa e oleosa, mentre la dispersione meccanica verrà introdotta nella versione successiva del codice. TOUGH2 utilizza per la discretizzazione delle equazioni di conservazione della massa e dell'energia il metodo delle differenze finite integrali IFDM, (Narashiman e Witherspoon, 1976). La metodologia di discretizzazione e le informazioni geometriche utilizzate sono mostrate in Fig. 2; il metodo IFDM consente di utilizzare griglie irregolari, con una flessibilità paragonabile a quella del metodo agli elementi finiti. L'equazione di bilancio del componente generico (per un sistema di NK componenti di massa distribuiti in NPH fasi assume, per il generico elemento n di volume V_n e superficie Γ_n , la seguente forma. (Pruess *et al.*, 1999):

$$\frac{d}{dt} \int_{V_n} M^\kappa dV_n = \int_{\Gamma_n} \mathbf{F}^\kappa \cdot \mathbf{n} d\Gamma_n + \int_{V_n} q^\kappa dV_n \quad (1)$$

Il termine di accumulo della massa per il generico componente $\kappa=1, NK$ è:

$$M^\kappa = \phi \sum_{\beta} S_{\beta} \rho_{\beta} X_{\beta}^{\kappa} \quad (2)$$

nel quale $\beta=1, NPH$ è l'indice relativo alla fase fluida. Il termine di accumulo relativo al bilancio dell'energia termica ($\kappa=NK+1$) è il seguente:

$$M^{NK+1} = (1-\phi) \rho_R C_R T + \phi \sum_{\beta} S_{\beta} \rho_{\beta} u_{\beta} \quad (3)$$

Il flusso di massa advettivo per il componente κ è dato dalla somma dei flussi nelle singole fasi fluide attraverso la superficie dell'elemento:

$$\mathbf{F}^{\kappa} \Big|_{adv} = \sum_{\beta} X_{\beta}^{\kappa} \mathbf{F}_{\beta} \quad (4)$$

Il flusso delle singole fasi è calcolato mediante la versione della equazione di Darcy generalizzata al flusso multifase:

$$\mathbf{F}_{\beta} = \rho_{\beta} \mathbf{u}_{\beta} = -k \frac{k_{r\beta} \rho_{\beta}}{\mu_{\beta}} (\nabla P_{\beta} - \rho_{\beta} \mathbf{g}) \quad (5)$$

In aggiunta al flusso advettivo, TMVOC include la diffusione molecolare multicomponente nelle tre fasi acquosa, gassosa ed oleosa:

$$\mathbf{f}^{(\kappa)} = \sum_{\beta=1}^{NPH} \phi \tau_{\beta} \tau_{\beta} \rho_{\beta} d\beta^{(\kappa)} \nabla X_{\beta}^{(\kappa)} \quad (6)$$

La tortuosità del mezzo poroso e quella dipendente dalla coesistenza di diverse fasi fluide sono stimate secondo l'equazione:

$$\tau_{\beta} \tau_{\beta} = \phi^{1/3} S_{\beta}^{10/3} \quad (7)$$

Il flusso di calore considera le componenti advettiva e conduttiva:

$$\mathbf{F}^{NK+1} = -\lambda \nabla T + \sum_{\beta} h_{\beta} \mathbf{F}_{\beta} \quad (8)$$

Per identificare in maniera univoca lo stato termodinamico di un sistema di NK componenti distribuiti in condizioni di equilibrio termodinamico fra NPH fasi, sono necessari $NK+1$ parametri termodinamici indipendenti, o variabili primarie. In un sistema trifase, sono in principio possibili 7 combinazioni: 3 condizioni monofase, 3 condizioni bifase e la condizione trifase.

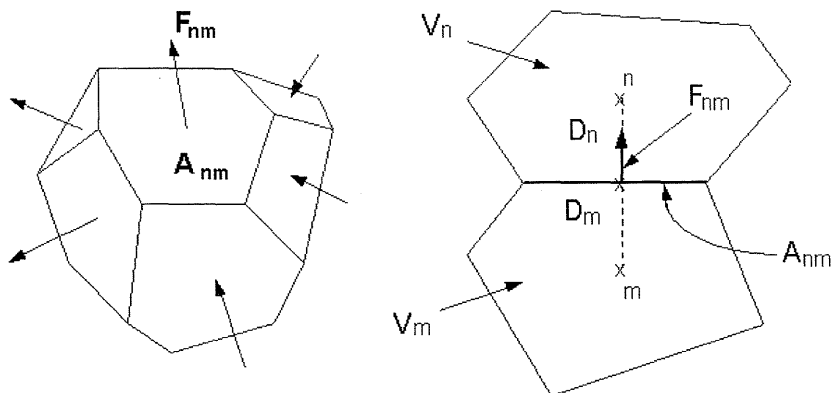


Fig. 2 - Discretizzazione spaziale e dati geometrici utilizzati dal metodo delle differenze finite integrate (Pruess *et al.*, 1999)

Benché sia raro che in un mezzo poroso in condizioni ambientali possa venire a mancare la fase acquosa, per mantenere la generalità della trattazione numerica, TMVOC gestisce tutte e 7 le combinazioni di fase e i passaggi da una combinazione all'altra, secondo lo schema di principio di Fig. 3. I bilanci di massa e quello dell'energia termica vengono assemblati e risolti utilizzando il metodo iterativo di Newton-Raphson. Durante il processo iterativo, in funzione delle variabili principali aggiornate, il modulo EOS deve identificare per ogni elemento lo stato termodinamico, riconoscere l'apparizione o la sparizione di fasi e calcolare le proprietà termodinamiche e di trasporto delle fasi presenti, necessarie all'assemblaggio delle equazioni di bilancio. Il calcolo delle proprietà è demandato a routine che possono essere modificate se diventano disponibili nuovi dati sperimentali o metodologie di calcolo più precise. In particolare, la densità e l'entalpia della fase gassosa, funzione della composizione, sono valutate utilizzando l'equazione di stato in forma cubica di Soave-Redlick-Kwong (SRK) usata in campo petrolifero. Le proprietà dei singoli composti organici sono calcolate con le correlazioni impiegate nel codice di simulazione T2VOC (Falta *et al.*, 1995), mentre per le proprietà delle miscele organiche liquide e gassose vengono usate le equazioni impiegate nel prototipo M2NOTS (Adenekan, 1992).

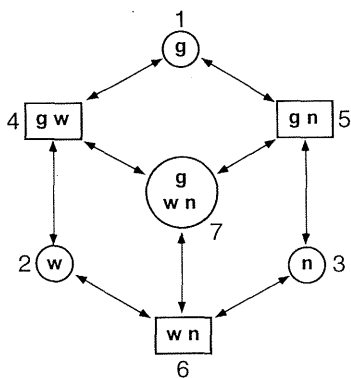


Fig. 3 - Combinazioni di fasi e apparizione/sparizione di fasi simulate dal codice TMVOC. Le lettere w, g ed n indicano rispettivamente le fasi acquosa, gassosa ed oleosa.

Il calcolo delle proprietà è demandato a routine che possono essere modificate se diventano disponibili nuovi dati sperimentali o metodologie di calcolo più precise. In particolare, la densità e l'entalpia della fase gassosa, funzione della composizione, sono valutate utilizzando l'equazione di stato in forma cubica di Soave-Redlick-Kwong (SRK) usata in campo petrolifero. Le proprietà dei singoli composti organici sono calcolate con le correlazioni impiegate nel codice di simulazione T2VOC (Falta *et al.*, 1995), mentre per le proprietà delle miscele organiche liquide e gassose vengono usate le equazioni impiegate nel prototipo M2NOTS (Adenekan, 1992).

Filosofia di sviluppo del simulatore TMVOC

TMVOC è sviluppato mantenendo la compatibilità con l'architettura TOUGH2 V.2.0 (Pruess *et al.*, 1999) in modo da facilitare la manutenzione e l'aggiornamento del codice. Scritto in FORTRAN77, TMVOC è utilizzabile su qualsiasi tipo di piattaforma hardware (mainframe, workstation, PC, Mac). La formulazione numerica basata sul IFDM permette il rispetto rigoroso dei bilanci di massa e la stessa flessibilità della griglia di simulazione del metodo agli elementi finiti. La formulazione numerica del TOUGH2 ha superato i criteri di accettazione dell'Energy Science and Technology Software Center (USA) e della Nuclear Energy Authority europea, e quelli di validazione software richiesti dal DOE per il progetto Yucca Mountain relativo alla realizzazione di un sito di stoccaggio di scorie altamente radioattive. TMVOC è documentato in maniera trasparente ed è prevista la distribuzione commerciale del codice sorgente. La scelta di un «codice aperto», vincente nel campo dei codici tradizionali per idrogeologia, ha già fornito ottimi riscontri con il codice TOUGH2 in quanto stimola la diffusione del codice, il controllo degli errori e lo sviluppo di nuove funzionalità da parte degli utenti. L'interesse della comunità scientifica e del settore industriale verso i codici TOUGH2 è testimoniato da una notevole casistica di utilizzo per studi teorici e applicazioni commerciali.

Potenziamento del simulatore TMVOC nell'ambito del progetto PURE

PURE si rivolge in particolare ai processi di biodegradazione, sia naturale che assistita, di composti organici nelle acque di falda. In questo contesto è previsto il potenziamento di TMVOC mediante:

- accoppiamento con un modulo per la dispersione idrodinamica multi componente, in condizioni multifase ed in geometria tridimensionale;
- introduzione di nuovi componenti di massa per la simulazione numerica di reazioni di biodegradazione in condizioni aerobiche ed anaerobiche (accettori di elettroni, nutrienti, specie batteriche, prodotti di reazione).

A differenza della maggior parte dei simulatori oggi disponibili a livello commerciale, quali RT3D (Clement, 1997) e BIOMOC (Essaid e Bekins, 1997), le reazioni di biodegradazione potranno essere simulate in condizioni sature e non sature, considerando anche la presenza della fase

oleosa. Si stanno valutando due diversi approcci numerici per le reazioni di biodegradazione: il primo, usato ad esempio da RT3D, prevede moduli specifici per diverse classi di problemi fra i quali scegliere quello adatto al caso in esame; il secondo, seguito da BIOMOC, prevede per le reazioni di biodegradazione una struttura generale, basata su Monod multiple, che incorpora fenomeni di inibizione, di competitività e cometabolici, offrendo così il vantaggio di un campo applicativo potenzialmente più vasto.

Conclusioni

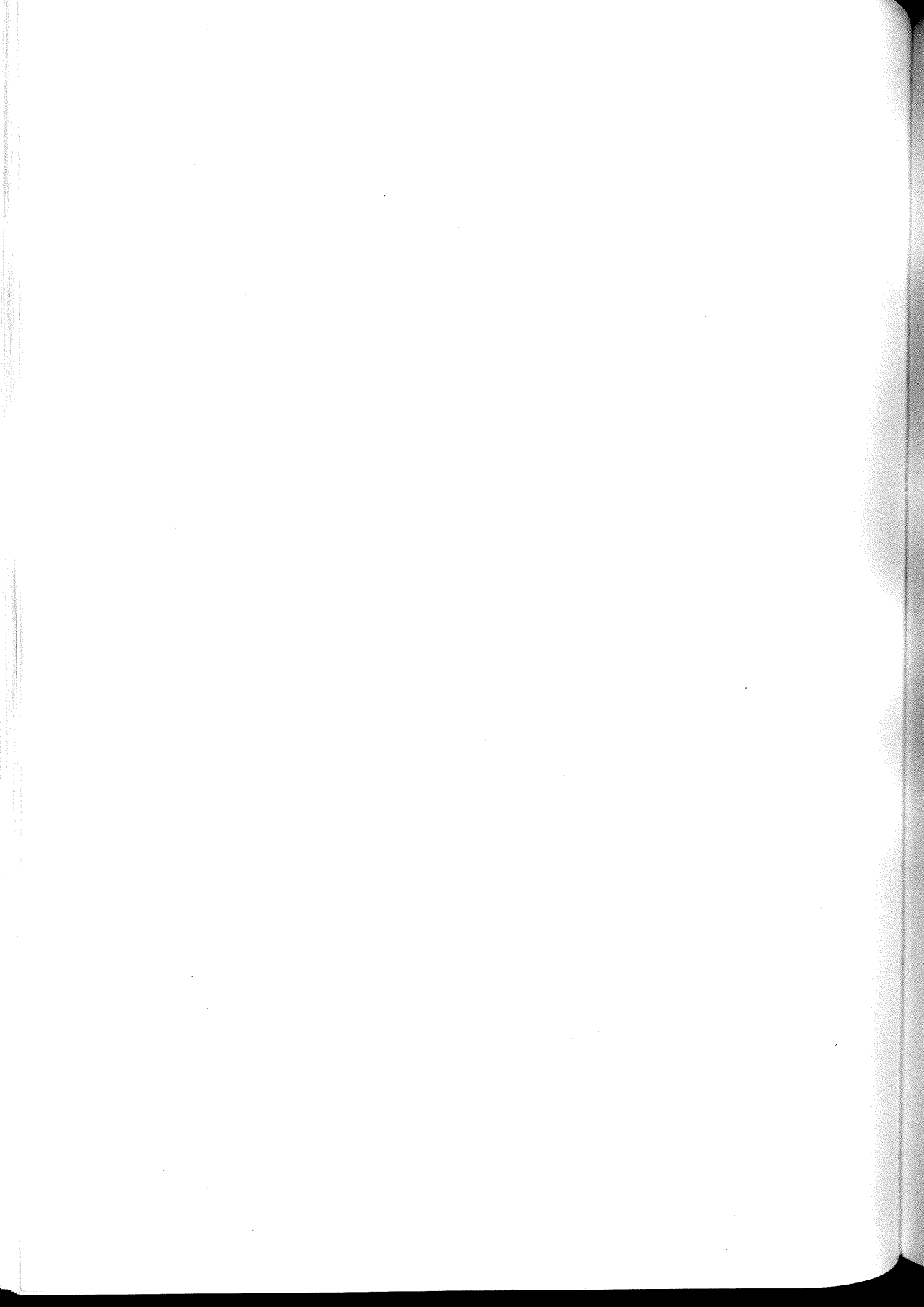
Il codice di simulazione numerica TMVOC, appartenente alla famiglia di codici TOUGH2 basati sul metodo delle differenze finite integrate, è destinato alla simulazione del trasporto di contaminanti organici nel sottosuolo in condizioni multifase, a temperatura variabile ed in geometria tridimensionale. Con l'ipotesi di equilibrio chimico e termodinamico locale, il codice simula la termodinamica di miscele organiche complesse e la ripartizione all'equilibrio dei composti organici fra le fasi acquosa, gassosa ed oleosa. Viene considerato l'adsorbimento dei composti organici sulla matrice del mezzo poroso e la loro biodegradazione operata dall'attività di microorganismi presenti nel sottosuolo. TMVOC è utilizzabile per la progettazione e monitoraggio di opere di messa in sicurezza e bonifica di siti contaminati e in attività di ricerca per simulare le condizioni di applicabilità di tecnologie di bonifica della zona non satura e delle acque di falda.

Nomenclatura

C	calore specifico, J/(kg °C)	t	tempo, s
d	coefficiente di diffusione, m ² /s	T	temperatura, °C
$f^{(\kappa)}$	flusso diffusivo, kg/(m ² s)	u	energia interna specifica, J/kg
$F^{(\kappa)}$	flusso comp.k, kg/(s m ²)	V_n	volume dell'elemento n, m ³
g	accelerazione di gravità, m/s ²	$X^{(\kappa)}$	frazione in massa comp. κ
H	entalpia specifica, J/kg	Γ_n	superficie elemento n, m ²
k	permeabilità, m ²	μ	viscosità dinamica, Pa s
K	conducibilità termica, W/(m °C)	ρ	densità, kg/m ³
$K_{r\beta}$	permeabilità relativa alla fase β	ϕ	porosità
$M^{(\kappa)}$	termine di accumulo, kg/m ³	τ	tortuosità
N	vettore normale unitario		<i>Apici e pedici</i>
P	pressione, Pa	β	indice di fase
$Q^{(\kappa)}$	produzione comp. κ , kg/(s m ³)	κ	indice dei componenti
S	saturazione	R	roccia

Bibliografia

- ADENEKAN A.E., 1992. Numerical modeling of multiphase transport of multicomponent organic contaminants and heat in the subsurface. PhD Thesis, Un. of California, Berkeley.
- CLEMENT T.P., 1997. RT3D (Version 1.0) - A Modular Computer Code for Simulating Reactive Multi-species Transport in 3-Dimensional Groundwater Systems. Pacific Northwest National Laboratory, PNNL-SA-11720.
- ESSAID, H.I., BEKINS, B.A., 1997. BIOMOC. A multispecies solute-transport model with biodegradation: U.S.G.S., Water-Resources Invest. Rep. 97-4022.
- FALTA R.W., PRUESS K., FINSTERLE S., BATTISTELLI A., 1995. T2VOC User's Guide. Lawrence Berkeley National Lab., LBL-36400.
- NARASHIMAN T.N., WITHERSPOON P.A., 1976. An integrated finite difference method for analyzing fluid flow in porous media. *Water Res. Res.*, Vol. 12, No 1, pp. 57-64.
- PRUESS, K. ed., 1998. Proceedings TOUGH Workshop '98. Lawrence Berkeley National Lab., LBNL-41995.
- PRUESS K., OLDENBURG C., MORIDIS G., 1999. TOUGH2 User's Guide, Version 2.0. Lawrence Berkeley National Lab., LBNL-43134.



VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ *Pb*-DECONTAMINANTE DI DUE SPECIE ORNAMENTALI

Carratù G., Carafa A.M., Aprile G.G.

Dipartimento Arboricoltura, Botanica, Patologia vegetale
Facoltà di Agraria – Università di Napoli "Federico II"
Via Università, 100 – 80055 Portici (NA)

Riassunto

Plantule di pittosporo e di oleandro furono allevate in substrato nutritivo con l'aggiunta di 10, 30, 60 e 120 ppm di piombo. Dopo 10 giorni di coltura le piante furono raccolte e sottoposte ad analisi. All'incremento della quantità di piombo nel substrato di coltura corrisponde, in ambedue le specie, un considerevole aumento del piombo nella pianta, in special modo nelle radici.

E' stata valutata l'efficienza di queste specie nei riguardi della fitoestrazione; i nostri risultati suggeriscono che pittosporo ed oleandro possono essere utilizzate per il clean-up dei suoli contaminati.

Parole chiave: fitoestrazione, piombo, pittosporo, oleandro

Summary

EVALUATION OF *Pb* PHYTOEXTRACTION EFFICIENCY BY TWO ORNAMENTAL SHRUBS

Seedlings of pittosporum and oleander were grown in nutrient solution supplemented with 10, 30, 60 and 120 ppm of lead. Plants were harvested after 10 days and lead was analysed. Lead increase in the culture medium causes in both species a considerable lead increase especially in roots. The *Pb* phytoextraction efficiency of these species has been estimated; our results suggest that pittosporum and oleander might be used for the clean-up of lead contaminated soils.

Key words: phytoextraction, lead, pittosporum, oleander

Introduzione

Tutte le piante hanno la capacità di accumulare metalli essenziali per la loro nutrizione prelevandoli dal suolo e dall'acqua; poche specie possono accumulare metalli pesanti che non hanno funzione biologica nota (Salt, D.E. *et al.*, 1995a; Salt D.E. *et al.*, 1998); tuttavia un accumulo eccessivo di metalli pesanti può essere tossico per la maggior parte delle piante (Balsberg-Pahlson A.M., 1989).

La capacità, presentata da alcune piante, di accumulare e nello stesso tempo tollerare, quantità elevate di metalli pesanti, ha fatto sorgere l'idea di utilizzare le specie in questione per la decontaminazione dei suoli. È stato dimostrato che la fitoestrazione è una tecnica semplice ed economica se comparata ai metodi classici di decontaminazione (Ebbs S.D. *et al.*, 1997). Pertanto, specialmente negli ultimi anni, la ricerca di piante in grado di ripulire i suoli contaminati ha subito un notevole incremento. Sebbene lo si rinvenga naturalmente in tutte le piante, il piombo è un elemento non essenziale nel metabolismo vegetale (Xiong Z-T, 1997). Nei suoli, ed in particolare in quelli attraversati da strade con traffico elevato, spesso sono presenti quantità significative di piombo essendo le automobili la principale fonte di contaminazione a causa dell'uso del piombo tetraetile come agente antidetonante per le benzine (Xiong Z-T, 1997). I nostri esperimenti sono stati condotti su pittosporo (*Pitosporum tobira* (Tumb.) Aiton Fil.) e oleandro (*Nerium oleander* L.) due piante ornamentali, per stabilire se esse possono essere utilizzate nella fitodecontaminazione di suoli ricchi di piombo.

Materiali e Metodi

Plantule allo stato cotiledonare di pittosporo e di oleandro furono allevate in soluzione di Hogland (Salt D.E. *et al.*, 1995b) tamponata con 2 mM Mes-KOH (pH 5.1), in condizioni naturali di luce, temperatura e umidità; la soluzione nutritiva fu addizionata con quattro differenti concentrazioni di nitrato di piombo; per ogni trattamento furono utilizzate 10 plantule, ciascun esperimento fu replicato tre volte. Gli esperimenti si svolsero in Aprile, Maggio e Giugno; 10 giorni dopo il trattamento le piante furono raccolte e lavate per 30' con acqua distillata; i campioni furono divisi in radici e germogli, essiccati fino a peso costante in una stufa a 70°C e macinati in un mulino di acciaio inossidabile. Il materiale (500 mg) fu sospeso in 6 ml HNO₃ + 1 ml H₂O₂ e mineralizzato in forno a microonde; gli elementi nutritivi (K, Ca, Fe, Zn) ed il piombo furono analizzati mediante spettrometro di emissione al plasma Liberty 150 Varian. La produzione di biomassa fu determinata misurando la vegetazione prodotta da 20 piante allevate in pieno campo nell'arco di un anno; la biomassa per ettaro fu ottenuta calcolando quante piante coprono un ettaro di terreno considerando la copertura del suolo pari al 100%. Per ottenere i kg di Pb sottratti ad un ettaro di terreno in un anno, abbiamo moltiplicato la biomassa/ha/anno per i ppm di Pb sottratti ad un substrato contenente 120 ppm dell'elemento inquinante (da piante allevate in idroponica).

Risultati e discussioni

In accordo con quanto riportato da Xiog (1998) l'incremento della quantità di piombo nel substrato di coltura (da 10 a 120 ppm) determina in ambedue le specie un considerevole aumento di piombo nelle radici (Fig. 1a-b), aumento che è proporzionato alla quantità di Pb nel substrato; anche nel germoglio (Fig. 1c-d) vi è una correlazione positiva tra quantità di piombo assorbita e quantità di piombo nel substrato anche se i valori sono molto più bassi.

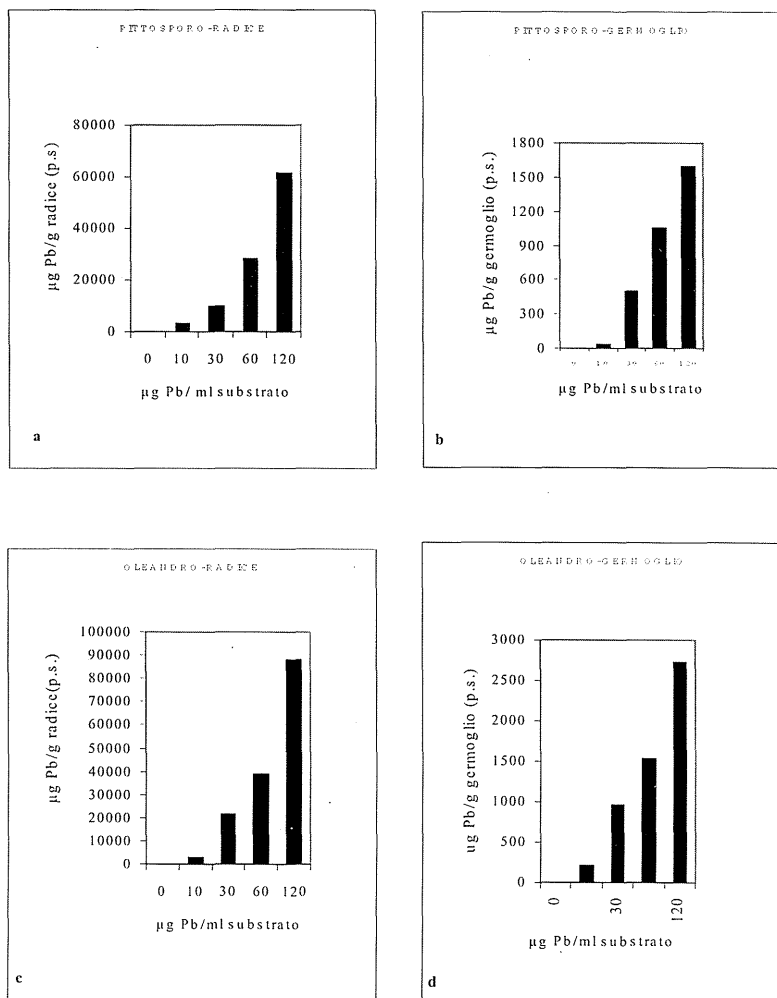


Fig. 1: ppm di Pb sottratti al substrato in 10 giorni dalle radici e dai germogli di oleandro e di pittosporo al substrato di coltura arricchito dell'elemento inquinante. I risultati sono la media di tre repliche.

Infatti nelle radici il coefficiente di bioaccumulo (rapporto tra concentrazione di Pb nel campione e contenuto dello stesso elemento nella soluzione idroponica) va da 308 a 735 in oleandro e da 329 a 512 in pittosporo; viceversa lo stesso nel germoglio non supera il valore di 23 in oleandro e di 14 in pittosporo. Con l'incremento della concentrazione di piombo nel substrato si rileva nella radice un aumento della quantità di ferro ed una diminuzione di Zn, Ca e K (dati non mostrati); tali variazioni non si manifestano nel germoglio molto probabilmente perché il tempo di esposizione ai metalli pesanti non è abbastanza lungo da causare una loro variazione.

Per valutare la capacità delle due specie di operare la decontaminazione dei suoli Pb-contaminati noi abbiamo presunto che la stessa quantità di piombo assorbita dalla plantula in coltura idroponica poteva essere parimenti prelevata da piante coltivate in un suolo con una uguale concentrazione di piombo nella soluzione circolante. Questa trasposizione di dati può essere accettata, considerando che, in conformità con le caratteristiche chimico-fisiche del suolo, in una soluzione circolante con 2500-3000 ppm di Pb, sono disponibili per la pianta soltanto alcune decine di esse (Huang J.V. et Cunningham S.D., 1996).

Sulla base di queste considerazioni, abbiamo calcolato che l'oleandro può assorbire annualmente, da un ettaro di terreno contenente in media 2500-3000 ppm di Pb, al massimo 102Kg di Pb, mentre il pittosporo può assorbirne 32 (Tabella). La quantità di piombo estratto dalle due specie è bassa se comparata ai dati forniti da Huang et Cunningham (1996) sul mais (530 kg di Pb); nondimeno alcune considerazioni ci inducono a credere nella possibilità di utilizzare entrambe le specie per la fitodecontaminazione dei suoli inquinati da piombo:

- 1) pittosporo e oleandro sono piante perenni, esse quindi possono essere utilizzate per molti anni senza gli svantaggi dovuti a ripetute semine;
- 2) la biomassa prodotta nelle aree inquinate da entrambe le specie è paragonabile a quella prodotta nelle aree rurali (Carratù *et al.*, 1998 a e b);
- 3) esse vengono potate più volte durante l'anno; questo fatto determina la rimozione periodica degli elementi inquinanti;
- 4) l'elevato coefficiente di bioaccumulo delle radici dimostra che ambedue le specie sono perfettamente funzionali nella fitostabilizzazione poiché possono immobilizzare gli elementi inquinanti all'interno delle piante, riducendo la loro disponibilità nel suolo.

Bibliografia

- BALSBERG-PAHLSON A.M. (1989). Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air and Soil Pollution* 47: 287-319
- CARRATÙ G., CARAFA A.M., APRILE G.G. (1998a). Studio preliminare sulla fitoestrazione di metalli pesanti da suoli contaminati. 93° Congresso della Società Botanica Italiana. Arcavacata di Rende- Cosenza, 1-3 Ottobre 1998: 118.
- CARRATÙ G., CARAFA A.M., APRILE G.G. (1998b). Fitoestrazione di zinco da terreni contaminati. *V Convegno Nazionale AISETOV - Microelementi e Salute: Ambiente, Biologia e Medicina - Bologna 25-26 Settembre*: 16.
- EBBS S.D., LASAT M.M., BRADY D.J., CORNISH J., GORDON R., KOCHIAN L.V. (1997). Heavy metals in the environment - Phytoextraction of Cadmium and Zinc from a Contaminated Soil. *J. Environ. Qual.* 26: 1424-1430.
- HUANG J.W., CUNNINGHAM S.D. (1996). Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and traslocation. *New Phytol.* 134: 75-84.
- SALT D.E., BLAYLOCK M., KUMAR N.P.B.A., DUSHENKOV V., ENSLEY B.D., CHET I., RASKIN I. (1995a). Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the enviroment using plants. *Biotechnology* 13:468-474.
- SALT D.E., PRINCE R.C., PICKERING I.J., RASKIN I. (1995b): Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* 109: 1427-1433.
- SALT D.E., SMITH R.D., RASKIN I. (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49. 643-668.
- XIONG Z.-T. (1997). Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environmental Pollution* 97: 275-279.
- XIONG Z.-T. (1998). Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica perkinensis* Rupr. *Buil. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 285-291.



ATTIVITÀ PROTETTIVA DELLE SOSTANZE UMICHE PRESENTI NEI COMPOST NEI CONFRONTI DELL'ATTIVITÀ MUTAGENA DEI METALLI PESANTI

Claudio De Simone¹, Antonio De Marco², Claudia D'Ambrosio¹,
Malgorzata Owczarek², Federica Beretta¹

¹ Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo. Sezione di Conservazione del Suolo
Via Casette .1 - 02100 Rieti

² Centro di Genetica Evoluzionistica. CNR. Roma

Introduzione

L'utilizzazione agricola dei compost si va sempre più affermando come una valida alternativa per lo smaltimento dei rifiuti, presentando vantaggi non solo di carattere agronomico, ma anche gestionale ed economico: oltre al recupero di elementi nutritivi e componenti organiche necessarie alla fertilità del suolo, consente il riutilizzo di biomasse spesso di difficile gestione.

D'altra parte, è ben noto come attraverso i compost possano essere apportati al terreno anche dei microinquinanti sia di natura inorganica (metalli pesanti quali mercurio, cadmio, piombo e cromo), che organica (bifenili policlorurati, idrocarburi policiclici aromatici), per molti dei quali è stata documentata la capacità di indurre alterazioni al DNA degli organismi che vivono nel suolo, anche in assenza di effetti tossici che possano fungere da campanello di allarme (Gardner et al., 1991; Genevini et al., 1987; Grover e Kaur, 1999; Harms and Sauerbeck, 1983; West et al., 1988).

Infatti, precedenti esperienze sperimentali, condotte utilizzando dosi di compost fino a 1200 t s.s. ha⁻¹, hanno evidenziato la capacità di alcuni di essi di esercitare una significativa attività genotossica, anche in assenza di fenomeni di tossicità, in piantine di *Vicia faba* cresciute su un suolo sabbioso (De Simone et al., 1999; De Simone et al., 2000).

Muovendosi nell'ambito di tale problematica, il presente lavoro ha avuto come scopo quello di valutare quali fattori influenzassero il potenziale genotossico dei differenti compost. In particolare, l'attenzione è stata posta sul ruolo svolto dalla componente umica di tali biomasse, anche in considerazione delle riconosciute proprietà antimutagene della sostanza organica (De Marco et al., 1995; De Simone et al., 1998; Sato et al., 1987).

Materiali e Metodi

Il modello sperimentale adottato in questo studio è stato ampiamente utilizzato, sia pure con alcune variazioni metodologiche legate agli obiettivi della ricerca, in precedenti pubblicazioni che hanno confermato la sua validità e affidabilità (De Marco *et al.*, 1990; De Simone *et al.*, 1992; Patra *et al.*, 1995; Rieger *et al.*, 1990; Subhadra and Panda, 1994).

In questo lavoro l'attenzione è stata concentrata sulla sola dose di 300 t s.s. ha⁻¹ di compost, poiché apporti superiori erano risultati indurre fenomeni di tossicità nelle piantine di *Vicia faba*, tali da rendere impossibile la conduzione dei tests di genotossicità.

Semi di *Vicia faba* (var. *minor*), derivanti dal medesimo stock e omogenei in grandezza, sono stati posti a germinare in bacinelle di alluminio di 13,5 cm x 11,0 cm (100 semi/bacinella), contenenti ognuna 500 g di un suolo a bassissimo tenore in colloidali organici ed argillosi (Tabella 1). Le analisi dei suoli sono state condotte in accordo con i metodi ufficiali proposti dal M.I.R.A.A.F (1994).

Tabella 1. Principali caratteristiche chimico-fisiche del suolo utilizzato.

Sabbia	89,8 %
Limo	8,7 %
Argilla	1,5 %
CaCO ₃ Totale	15,5 %
pH (H ₂ O)	8,72
pH (KCl)	7,79
Carbonio Organico Totale	0,21 %
Sostanza Organica	0,36 %

vori (De Simone *et al.*, 1999; De Simone *et al.*, 2000; Tittarelli *et al.*, 2000).

Tutti i campioni sono stati addizionati con 120 ml di acqua distillata e mantenuti in camera climatica a 20°C ± 1. Dopo 96 ore le plantule sono state prelevate e gli apici delle radici primarie sono stati fissati in una soluzione di acido acetico glaciale e alcool etilico 3:1 (v/v), trattati con HCL N/1 a 60°C per 8 minuti e colorati con reattivo di Schiff. Si è quindi proceduto al trasferimento degli apici radicali su vetrini portaoggetti ed alla loro definitiva messa a punto per schiacciamento. Infine i vetrini coprioggetto sono stati tolti attraverso il contatto con il ghiaccio secco, in seguito i vetrini portaoggetti sono stati fissati con ripetuti passaggi in histolemon e alcool etilico

Ad ogni campione sono stati aggiunti quantitativi dei differenti quattordici compost pari a 300 t s.s. ha⁻¹. In Tabella 2 sono riportate le tipologie ed i materiali di partenza delle biomasse utilizzate in questo studio. Le procedure di compostaggio così come i rapporti di miscelazione sono stati dettagliatamente descritti in un precedente lavoro (De Simone *et al.*, 1999), mentre le principali caratteristiche chimico-fisiche dei compost sono state riportate in precedenti lavori

95%, resi permanenti con balsamo del Canada (De Marco *et al.*, 1990; De Simone *et al.*, 1992) e sottoposti ad osservazione microscopica. Due campioni sono stati trattati con sola acqua deionizzata ed utilizzati come controlli.

Per ogni punto sperimentale gli effetti genotossici sono stati valutati studiando la frequenza di micronuclei (corpuscoli Feulgen positivi, extranucleari che derivano da cromosomi interi o da loro parti che non hanno regolarmente segregato durante la mitosi) in 20.000 cellule (10 apici radicali, 2000 cellule per ogni apice).

Sulla base dei dati ottenuti, è stato applicato il Coefficiente di Pearson per lo studio della correlazione tra alcuni parametri analitici (contenuto in metalli pesanti e acidi umici) e la frequenza di cellule micronucleate. Inoltre, è stata applicata la Regressione multipla per valutare quali fattori influenzassero il manifestarsi del danno genotossico.

Tabella 2. Tipologie e materiali di partenza dei compost saggiati.

Compost N	Tipologia di compost	Materiali di partenza
1	Compost da indifferenziato	Frazione organica stabilizzata da selezione meccanica di rifiuti solidi urbani
2	Compost da Rifiuti Solidi Urbani	Frazione organica di rifiuti urbani selezionati alla fonte + residui manutenzione verde pubblico
3	Compost da liquami suini	Frazione solida da liquami suini + legno da potatura verde pubblico
4	Compost da indifferenziato	Frazione organica stabilizzata da selezione meccanica di rifiuti solidi urbani
5	Compost da Rifiuti Solidi Urbani selezionati alla fonte	Frazione organica di rifiuti urbani (Carpi) selezionata alla fonte + manutenzione verde pubblico
6	Compost da Rifiuti Solidi Urbani selezionati alla fonte	Frazione organica di rifiuti urbani (Modena) selezionata alla fonte + manutenzione verde ornamentale
7	Compost da fanghi civili di qualità	Fanghi di depurazione civile di elevata qualità (non industriale) + Cippato di legno da manutenzione verde pubblico
8	Compost da residui della lavorazione del pomodoro	Fanghi di depurazione dell'industria del pomodoro, Residui di lavorazione del pomodoro + Cippato di legno da manutenzione verde pubblico
9	Compost da frazione organica da Rifiuti Solidi Urbani selezionati alla fonte	Frazione organica di rifiuti urbani (grandi utenze e utenze domestiche) selezionata alla fonte + Cippato di legno da manutenzione verde pubblico
10	Compost da residui macellazione	Contenuto ruminale + fanghi di depurazione della macellazione + Cippato di legno da manutenzione verde pubblico
11	Compost da reflui oleari	Sanse umide + legno manutenzione verde pubblico
12	Compost da reflui oleari	Sanse umide + legno potatura olivi
13	Compost da impianti civili misti	Fanghi di depurazione da impianti civili e industriali (Ravenna)
14	Compost da residui della lavorazione degli agrumi	Fanghi derivanti dalla lavorazione delle arance e dei limoni (Pastazzo)

Risultati e Discussione

In Figura 1 è riportata la frequenza delle cellule Micronucleate indotte nelle piantine di *Vicia faba* dal trattamento con la dose di 300 t s.s. ha⁻¹ delle diverse biomasse. Dall'analisi dei dati riportati, si evidenzia come l'attività genotossica dei compost sia fortemente influenzata dalla natura dei materiali di partenza. In Tabella 3 è riportata la matrice di Correlazione lineare tra i singoli metalli pesanti e l'induzione di cellule Micronucleate.

Tabella 3. Valori del Coefficiente di Correlazione Lineare di Pearson tra il contenuto in metalli pesanti nei differenti compost (n=14) e la frequenza di cellule Micronucleate (MC%). In parentesi viene, inoltre, riportato il livello di significatività.

	Cadmio	Mercurio	Nichel	Piombo	MC(%)
Cadmio		0.59 (0.03)	0.60(0.02)	0.33(0.26)	0,64(0.01)
Mercurio			0.42(0.14)	0.01(0.96)	0.50(0.07)
Nichel				0.13(0.66)	0.50(0.07)
Piombo					0.61(0.02)
MC (%)					

Cellule Micronucleate (%)

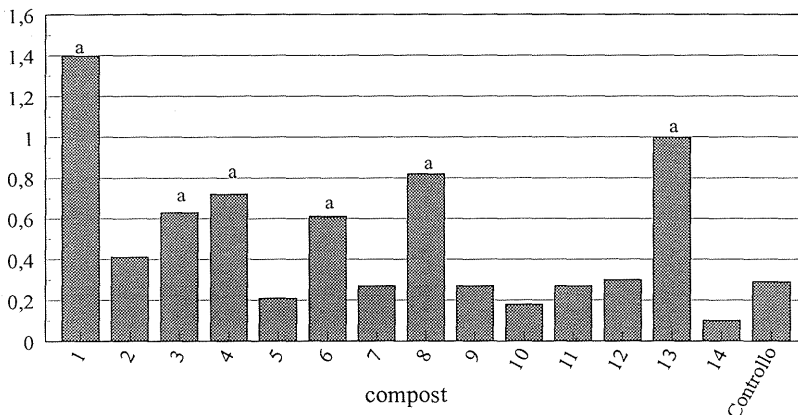


Figura 1. Influenza del trattamento con 300 t s.s. ha⁻¹ dei differenti compost sull'induzione di cellule micronucleate in piantine di *Vicia faba*. Le medie contrassegnate con la lettera a sono risultate significativamente diverse dal controllo quando sottoposte ad analisi della varianza ($p < 0.05$).

Dai dati riportati si evidenzia come, da un lato, non esista un'alta correlazione tra i singoli metalli presenti nelle differenti biomasse, dall'altro, come la frequenza delle cellule micronucleate sembri essere influenzata da tutti i metalli presi in considerazione, come prevedibile sulla base della ben nota genotossicità di questi ultimi. A conferma di tale andamento,

i risultati dell'Analisi di Regressione presentati in Figura 3, mostrano come ben il 68 % della variabilità della frequenza di cellule micronucleate è spiegato dalla attività congiunta dei quattro metalli citati.

Lo studio delle correlazioni (Coefficiente di Pearson) tra il contenuto in sostanze umiche dei 14 compost e la loro capacità di indurre un danno genotossico nelle piantine di *Vicia faba*, ha evidenziato una correlazione inversa altamente significativa ($p < 0.01$) tra questi due parametri (Figura 2).

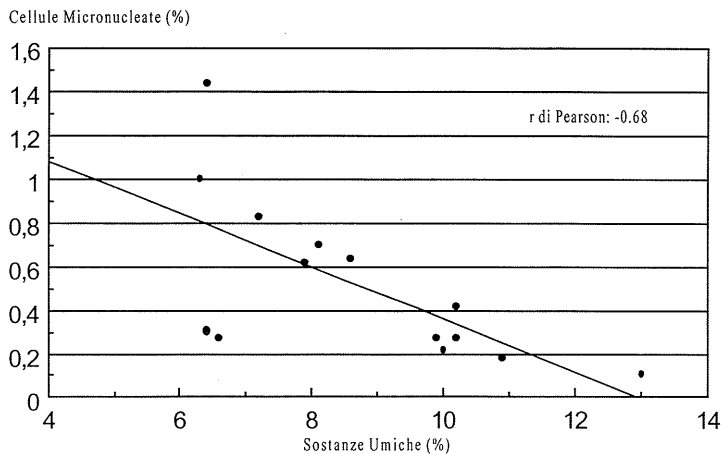


Figura 2. Analisi di Correlazione lineare (r di Pearson) tra il contenuto in acidi umici e fulvici dei differenti compost e l'induzione di cellule micronucleate in piantine di *Vicia faba*.

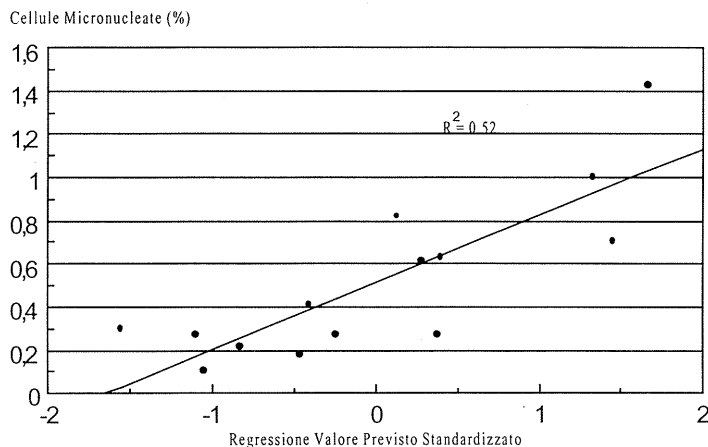


Figura 3. Analisi di regressione multipla tra la frequenza di cellule micronucleate e i valori standardizzati previsti dal modello. Sono state considerate le seguenti variabili: Cd, Hg, Ni e Pb.

Infine, è stata condotta una regressione multipla per chiarire quanta importanza avessero sia il contenuto in metalli pesanti che quello in sostanze umiche nel determinare il potenziale genotossico dei singoli compost. I risultati di tale analisi sono illustrati in Figura 4. L'elevato valore (0.96) del Coefficiente di Regressione Multipla (R) indica come il modello ben si adatti ai dati sperimentali, mentre il valore R^2 (0.92) dimostra come circa il 92 % della variabilità dell'induzione del danno mutageno nelle piante di *Vicia faba* sia spiegata dalle variabili inserite nel modello.

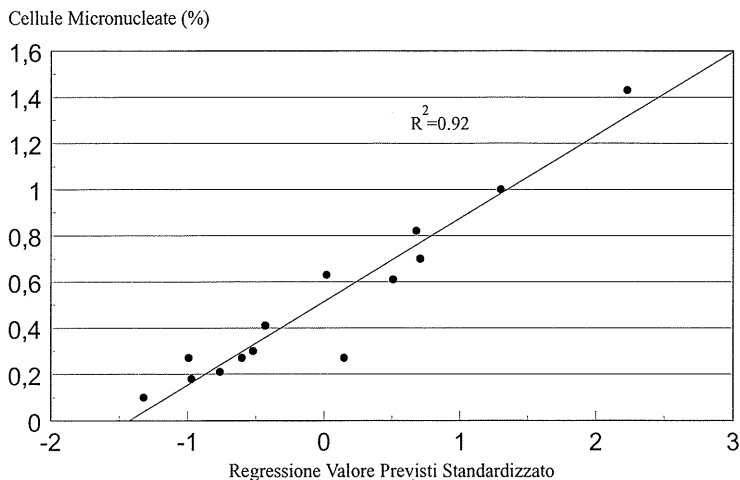


Figura 4. Analisi di regressione multipla tra la frequenza di cellule micronucleate e i valori standardizzati previsti dal modello. Sono state considerate le seguenti variabili indipendenti: Cd, Hg, Ni, Pb e contenuto in sostanze umiche.

Conclusioni

In questi ultimi anni è stata ben documentata la capacità della sostanza organica, in particolare della sua frazione umica, di proteggere i sistemi vegetali dall'attività mutagenica di svariati inquinanti (De Marco *et al.*, 1995; De Simone *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1987).

In accordo con tali osservazioni, nella presente ricerca è stata evidenziata una correlazione inversa altamente significativa tra il danno genotossico indotto dalle differenti biomasse ed il loro tenore in acidi umici e fulvici.

I risultati ottenuti sembrano suggerire, inoltre, che il manifestarsi degli effetti mutageni sia determinato in larga parte dalla interazione

tra il potenziale genotossico di alcune sostanze e l'effetto protettivo esercitato dalle sostanze umiche. In tale contesto appare marginale, sulla base dei dati attualmente in nostro possesso e nelle condizioni sperimentali adottate in questa ricerca, il ruolo svolto dai contaminanti di natura organica nell'influenzare la comparsa del danno mutageno nelle piantine di *Vicia faba*.

In conclusione, quanto emerso da questa ricerca suggerisce la possibilità che, l'apporto di compost di qualità su suoli agrari, possa ridurre il rischio per gli organismi che vivono in suoli ad alto tasso di inquinamento, sia direttamente contrastando l'attività dei molti agenti mutageni presenti, sia indirettamente favorendo lo sviluppo della flora microbica autoctona in grado di degradare i composti organici più recalcitranti.

Bibliografia

- DE MARCO A., BOCCARDI P., DE SIMONE C., PICCOLO A., RAGLIONE M., TESTA A., TRINCA S., 1990. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with herbicides alachlor. *Mutation Res.*, 241: 1.
- DE MARCO A., DE SIMONE C., RAGLIONE M., LORENZONI P., 1995. Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*. *Mutation Res.*, 344: 5-12.
- DE SIMONE C., PICCOLO A., DE MARCO A., D'AMBROSIO C., 1998. Influence of humic acids chemical characteristics on their antimutagenic activity. *Fresenius Environ. Bull.*, 7: 382-387.
- DE SIMONE C., PICCOLO A., DE MARCO A., 1992. Genotoxic effect induced by herbicides atrazine, glyphosate in plants of *Vicia faba* grown in different soils. *The Sci. of the Total Environ.*, 233: 123-124.
- DE SIMONE C., TOMATI U., GALLI E., OWCZAREK M., DE MARCO A., D'AMBROSIO C., ALIANELLO F., CORTELLINI L., 1999. Evaluation of genotoxic activity of eleven compost from different origin. *Fresenius Environ. Bull.*, 9: 683-690.
- DE SIMONE C., TOMATI U., GALLI E., D'AMBROSIO C., OWCZAREK M., DE MARCO A., 2000. Suppression of genotoxic effects by compost humic substances. *10th Meeting of the I.H.S.S.*, Tolosa (Francia).
- GARDNER G.R., YEVICH P.P., HARSBARGER J.C., MALCOLM A.R., 1991. Carcinogenicity of Black Rock Harbor sediment to the eastern oyster and trophic transfer of Black Rock Harbor carcinogens from the blue mussel to the winter flounder. *Environ. Health Perspect.*, 90: 53-66.
- GENEVINI P.L., MEZZANOTTE V., GARBARINO A., 1987. Analytical characterization of compost of different origins: agronomic properties and risk factor. *Waste Management & Research*, 5: 501-511.
- GROVER I.S., KAUR S., 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluents detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Res.*, 426: 183-188.
- HARMS H., SAUERBECK D.R., 1983. Toxic organic compound in town waste material: their origin, concentration and turn-over in waste compost, soils and plants. In: "Environmental effects of organic and inorganic contaminants in sewage sludges", Proc. Workshop Stevenage, D. Reidel Pubbl.
- MIRAAF. 1994. Metodi ufficiali di analisi chimica dei suoli. pp 207.
- PATRA J., SUBHADRA A.V., PANDA B.B., 1995. Cycloheximide and buthionine sulfoximine prevent genotoxic adaptation by cadmium salt against methyl mercuric chloride in embryonic shoot cells of *Hordeum vulgare* L.. *Mutation Res.*, 348: 13-18.
- RIEGER R.A., MICHAELIS A., TAKEHISA S., 1990. Involvement of phytochelatins in NiCl₂-triggered protection against induction of chromatid aberrations by TEM and MH in *Vicia faba* root tips meristems.

Mutation Res., 244: 31-35.

SATO T., OSE Y., NAGASE H., HAYASE K., 1987. Mechanism of the desmutagenic effect of humic acid. *Mutation Res.*, 176: 199-204.

SUBHADRA A.V., PANDA B.B., 1994. Metal-induced genotoxic adaptation in barley (*Hordeum vulgare*) to maleic hydrazide and methyl mercuric chloride. *Mutation Res.*, 321: 93-102.

TITTARELLI F., TRINCHERA A., INTRIGLIOLO F., CALABRETTA M.L., BENEDETTI A., 2000. L'impiego dei residui dell'industria agrumaria nella produzione di compost per agricoltura biologica e convenzionale. *XVIII Convegno Nazionale SICA*. Catania.

WEST W. R., SMITH P. A., BOOTH G. M., LEE M. L., 1988. Isolation and detection of genotoxic components in a black river sediment. *Environ. Sci. Technol.*, 22 : 224-228.

INDAGINI PRELIMINARI SULL'USO DI TECNICHE SEM PER LO STUDIO DI PIANTE ACCUMULATRICI

A. Fornaroli, E. Capri, M. Trevisan¹

Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale-Università Cattolica del Sacro Cuore
Via Emilia Parmense 84-29100 Piacenza

¹ Dipartimento di Scienze Agroambientali e della Produzione vegetale,
Università degli Studi di Perugia

Riassunto

Sono state condotte delle indagini preliminari sull'analisi dell'assorbimento radicale di piante iperaccumulatrici di metalli pesanti e si è misurato l'assorbimento utilizzando la microscopia elettronica associata alla microanalisi. Si sono utilizzate due diversi tipi di piante iperaccumulatrici: *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms-Aich e *Thlaspi caerulescens* J. e C. Presl.

In *T. caerulescens* abbiamo evidenziato una maggiore concentrazione di cadmio rispetto allo zinco. Il piombo è stato trovato a concentrazioni più elevate nei tessuti esterni. *E. crassipes* accumula piombo, cadmio e zinco ma il piombo è assorbito in concentrazioni decisamente più elevate degli altri due metalli presi in considerazione.

Introduzione

In alcune condizioni eccessi di metalli pesanti nei suoli possono rivelarsi tossici per la pianta (Sacchi *et al.*, 1999). Molte piante superiori lungo la loro evoluzione biologica hanno acquisito tolleranza escludendo o accumulando i metalli in comparti biologici non sensibili (es. vacuoli). Alcune di queste, le piante accumulatrici, hanno un così efficiente assorbimento dal suolo da renderle utilizzabili per la fitodepurazione di siti contaminati da metalli pesanti di origine antropica e naturale (Baker e Walker, 1990).

L'attuale ricerca per il riconoscimento e l'utilizzo delle piante accumulatrici si svolge mediante tecniche chimiche, biochimiche e genetiche.

Durante una tesi di laurea sono state condotte indagini preliminari sulla localizzazione anatomica dei metalli nelle radici della pianta mediante tecniche di microscopia elettronica.

INDAGINI PRELIMINARI SULL'USO DI TECNICHE SEM PER LO STUDIO DI PIANTE ACCUMULATRICI

A. Fornaroli, E. Capri, M. Trevisan¹

Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale-Università Cattolica del Sacro Cuore
Via Emilia Parmense 84-29100 Piacenza

¹ Dipartimento di Scienze Agroambientali e della Produzione vegetale,
Università degli Studi di Perugia

Riassunto

Sono state condotte delle indagini preliminari sull'analisi dell'assorbimento radicale di piante iperaccumulatrici di metalli pesanti e si è misurato l'assorbimento utilizzando la microscopia elettronica associata alla microanalisi. Si sono utilizzate due diversi tipi di piante iperaccumulatrici: *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms-Aich e *Thlaspi caerulescens* J. e C. Presl.

In *T. caerulescens* abbiamo evidenziato una maggiore concentrazione di cadmio rispetto allo zinco. Il piombo è stato trovato a concentrazioni più elevate nei tessuti esterni. *E. crassipes* accumula piombo, cadmio e zinco ma il piombo è assorbito in concentrazioni decisamente più elevate degli altri due metalli presi in considerazione.

Introduzione

In alcune condizioni eccessi di metalli pesanti nei suoli possono rivelarsi tossici per la pianta (Sacchi *et al.*, 1999). Molte piante superiori lungo la loro evoluzione biologica hanno acquisito tolleranza escludendo o accumulando i metalli in comparti biologici non sensibili (es. vacuoli). Alcune di queste, le piante accumulatrici, hanno un così efficiente assorbimento dal suolo da renderle utilizzabili per la fitodepurazione di siti contaminati da metalli pesanti di origine antropica e naturale (Baker e Walker, 1990).

L'attuale ricerca per il riconoscimento e l'utilizzo delle piante accumulatrici si svolge mediante tecniche chimiche, biochimiche e genetiche.

Durante una tesi di laurea sono state condotte indagini preliminari sulla localizzazione anatomica dei metalli nelle radici della pianta mediante tecniche di microscopia elettronica.

Materiali e metodi

In questa indagine si è misurato l'assorbimento e l'accumulo di piombo, cadmio e zinco mediante tecniche di analisi qualitative e semi-quantitative quali la microscopia elettronica associata alla microanalisi. Questa tecnica ha il vantaggio di localizzare anatomicamente i comparti più interessati dall'accumulo. Per questo lavoro è stato necessario mettere a punto un sistema di preparazione dei tessuti vegetali in modo tale da renderli adatti ai tipi di analisi che si volevano eseguire. In questa indagine sono state utilizzate due diversi tipi di piante: *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms-Aich. più conosciuta come giacinto d'acqua e *Thlaspi caerulescens* J.e C. Presl (Hooker e Jackson 1946) detta volgarmente erba storna. In particolare *E. crassipes* sembra accumulare nell'apparato radicale (Vesk *et al.*, 1997), *T. caerulescens* sembra accumulare nella biomassa epigea (Lombi *et al.*, 2000).

I campioni preparati per le analisi erano sezioni trasversali di radici cresciute in soluzione nutritiva (piante di riferimento) e radici di piante cresciute in un substrato contenente metalli pesanti (solfato di cadmio, solfato di zinco e nitrato di piombo) per sette e quattordici giorni. I campioni di radici prelevati sono stati liofilizzati ed analizzati al microscopio elettronico a scansione (SEM). La distribuzione dei metalli pesanti nei comparti è stata valutata mediante la microanalisi. Il sistema per le microanalisi utilizzato nella ricerca, è costituito dal microscopio elettronico a scansione Hitachi, dalla sonda rilevatrice Kevex 8.000 e dal computer Kevex model 4.850. I software utilizzati sono stati Kevex Advanced Imaging e Digital image processing system 2,1.

Risultati e discussione

L'analisi al SEM, associata alla microsonda, permette la mappatura ai raggi X, ossia la distribuzione dei metalli (zinco, cadmio e piombo) sulla superficie della radice e lungo le sezioni trasversali della radice (fig. 1 e 2). Attraverso l'analisi grafica delle intensità di emissione è possibile avere una stima semiquantitativa della concentrazione (fig. 3).

I risultati ottenuti per *T. caerulescens* evidenziano una maggiore concentrazione di cadmio rispetto allo zinco, più elevato nello stele e nei tessuti circostanti. Il piombo presenta una maggiore concentrazione nella parte esterna della sezione trasversale della radice rispetto alla parte interna rappresentata dal sistema conduttore.

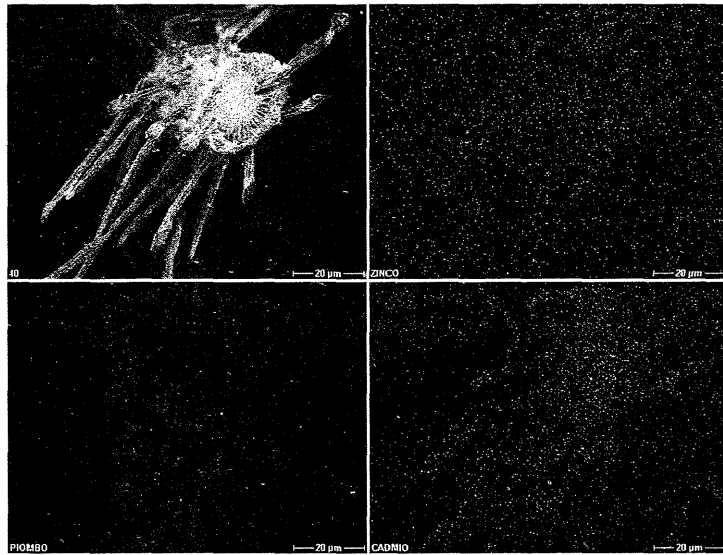


Figura 1 Microfotografia e mappatura ai raggi X di una sezione trasversale di radice di *E. crassipes* dopo una settimana di crescita in soluzione nutritiva contaminata.

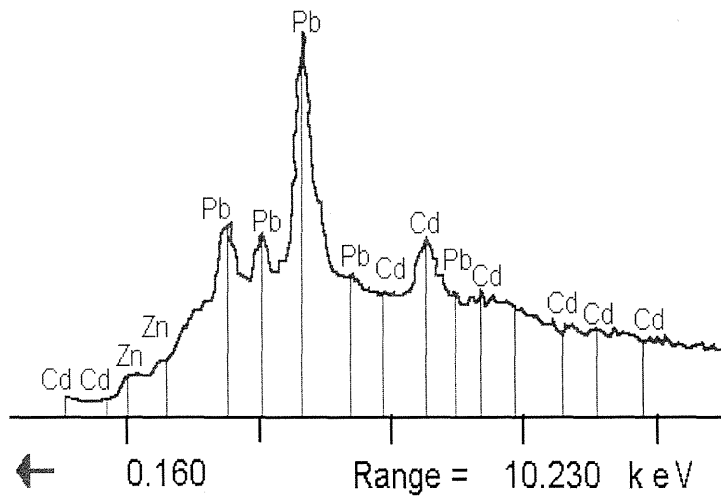


Figura 2 Grafico di intensità relativa riferito alla foto di figura 1.

E. crassipes, conosciuta come accumulatrice di tutti e tre i metalli utilizzati, accumula piombo, cadmio e zinco ma il piombo è assorbito in quantità decisamente più elevate degli altri due metalli presi in considerazione.

Questi dati confermano la capacità delle piante di accumulare metalli pesanti ma soprattutto dimostrano che alla base del diverso comporta-

mento fisiologico delle piante esiste una diversa localizzazione morfologica probabilmente a causa di diversi fattori che intervengono nella traslocazione.

Le tecniche di microscopia elettronica associate alla microanalisi, in particolare i modelli più recenti che permettono l'analisi di campioni indisturbati (low-temperature, freeze drying), rappresentano uno strumento complementare agli studi biochimici di assorbimento e traslocazione dei metalli pesanti nelle piante.

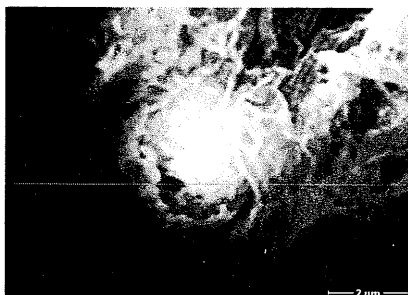
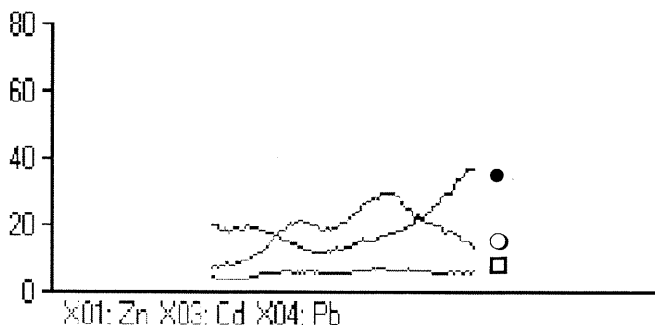


Figura 3 Microfotografia e spettro di intensità di emissione per zinco (□) cadmio (○) e piombo (●) di una sezione trasversale di radice di *T. caerulescens* cresciuta per due settimane nella soluzione nutritiva contaminata.



Bibliografia

- BAKER J.M. and WALKER P.L. (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. A.J. Shaw Ed., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp 156-177.
- HOOKE J.D. and JACKSON B.D. (1946) Index Kewensis, an enumeration of the genera and species of flowering plants from the time of Linnaeus to the year 1885 inclusive together with their authors' names, the works in which they were first published, their native countries and their synonyms. Oxford University press. Vol. I pp 824; Vol II pp. 109 e pp 1068.
- LOMBI E., MCGRATH S.P., TREVISAN M., CAPRI E., CIUCANI G., SACCHI G.A. (2000) Iperaccumulo di cadmio e zinco in popolazioni di *Thlaspi caerulescens* e relative implicazioni in fytoremediation. In *Atti del XVII convegno della Società Italiana di Chimica Agraria*, ed. Patron (in corso di pubblicazione).
- SACCHI G.A., RIVETTA A., COCUCCI M. (1999) Quaderni di tecniche di protezione ambientale a cura di Adriano Zavatti volume 63 "Suoli e rifiuti" ed. Pitagora Editrice Bologna pp 65-76.
- VESK P.A. and ALLAWAY W.G. (1997) Spatial variation of copper and lead concentrations of water hyacinth plants in a wetland receiving urban run-off. *Aquatic Botany* 59, pp 33-44.

UTILIZZAZIONE DI AZOLLA E LEMNA PER LA RIMOZIONE DI N E P DA ACQUE REFLUE

C. Forni, M.A. Nicolai, L. Tancioni

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Via della Ricerca Scientifica, 00133 Roma

Riassunto

L'utilizzazione di macrofite acquatiche è stata suggerita da diversi autori per la fitodepurazione delle acque reflue; *Azolla filiculoides* Lam. e *Lemna minor* L. rappresentano potenziali candidate sulla base del loro tasso di crescita e delle loro piccole dimensioni. Per valutare la capacità di rimozione di N e P da acque reflue, queste piante sono state saggiate in esperimenti condotti usando acque provenienti da un impianto di allevamento ittico della Stazione di Acquacoltura Sperimentale dell'Università di Roma "Tor Vergata". Le piante cresciute per un periodo di due settimane lungo il corso dell'anno avevano buoni tassi di crescita e rimuovevano efficacemente N e P dai terreni di crescita.

Introduzione

L'eutrofizzazione costituisce un processo naturale d'invecchiamento delle acque di laghi e fiumi, che viene accelerato dall'eccesso di nutrienti. La rimozione di questi nutrienti può essere un processo molto costoso e recentemente diversi generi di piante acquatiche sono stati proposti per la rimozione di N e P dalle acque reflue (Araujo, 1987; Vermaat e Hanif M.K., 1998; Korner e Vermaat, 1998). Tra questi generi *Azolla* e *Lemna* rappresentano dei potenziali candidati sulla base del loro tasso di crescita e delle piccole dimensioni.

Azolla è una felce acquatica che costituisce una simbiosi con il cianobatterio N_2 -fissatore *Anabaena azollae* Strasb. (Peters e Meeks, 1989). Nelle cavità fogliari della felce, oltre al cianobatterio, è presente una popolazione batterica, il cui principale componente è *Arthrobacter*. (Forni *et al.*, 1989; Forni *et al.*, 1990). Sulla base del suo habitat e capacità N_2 -fissatrice, tale associazione è utilizzata da secoli come concime verde in particolare nelle risaie (Peters e Meeks, 1989), ed inoltre i dati presenti in letteratura descrivono le buone capacità depuratrici della felce sia per i macronutrienti che per i metalli pesanti (Zhao e Duncan, 1997). *Lemna* è una piccola monocotiledone acquatica utilizzata in studi di tossicità (Bengtsson *et al.*, 1999) e

depurazione (Vermaat *et al.*, 1998). Entrambe le piante si trovano allo stato spontaneo in Italia e formano spesso una associazione.

Materiali e Metodi

Terreni e condizioni di crescita

Le piante crescevano all'aperto durante le varie stagioni in vasche di plastica contenenti 10 litri dei seguenti terreni di coltura: A) terreno minerale di controllo Hoagland diluito al 10% privo di N per *Azolla* (Van Hove *et al.*, 1983) e con 200 ppm di KNO_3 per *Lemna* (Peters e Mayne, 1974); B) acqua reflua da impianti di allevamento ittico della Stazione sperimentale di Acquacoltura del Dipartimento di Biologia dell'Università di Roma 'Tor Vergata' (Tancioni *et al.*, 1998; Forni *et al.*, 2000).

Le vasche erano coperte con un telo ombreggiante per impedire l'eccessiva insolazione nei mesi estivi e da teli di plastica per evitare la diluizione del terreno in seguito a precipitazioni atmosferiche. L'umidità relativa (RH) era circa il 50% (HANNA Instruments).

La densità di inoculo è stata scelta in modo da evitare sia l'inibizione da contatto sia la riduzione della crescita dovuta ad un'eventuale disposizione troppo lassa delle piante stesse. La superficie di copertura iniziale era del 80% circa, corrispondente ad una concentrazione di piante pari a 4 g/l per *Lemna* e 5 g/l per *Azolla*. Ogni settimana, dopo la determinazione della crescita, veniva re-inoculato lo stesso quantitativo di piante. Ogni trattamento era costituito da tre repliche e le vasche erano collocate in modo casuale.

Crescita ed attività enzimatiche

Ogni settimana, per entrambe le piante, venivano determinati il peso fresco, dopo aver sciacquato ed asciugato le piante su carta da filtro. La crescita veniva calcolata come crescita relativa secondo Kondo *et al.* (1989).

Il contenuto di clorofilla veniva determinato su campioni di piante congelate ed omogeneizzate in metanolo assoluto. I campioni venivano centrifugati (800 g per 10') e la concentrazione di clorofilla veniva determinata sulla base dell'assorbanza dei soprannatanti a 665 e 650 nm secondo MacKinney (1941).

L'attività nitrogenasica di *Azolla* veniva determinata mediante il saggio di riduzione dell'acetilene ad etilene (ARA) (Tung e Shen, 1981). Le piante venivano poste in provette di 12 ml contenenti 1 ml di terreno di cre-

scita, 10% acetilene in aria e chiuse con tappi di gomma. I campioni venivano illuminati per 1 ora (PAR 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) a 25° C. L'etilene prodotto veniva misurato mediante un gas cromatografo (Perkin-Elmer 8310), dotato di colonna N-Porapack e rilevatore a ionizzazione di fiamma.

Analisi dei terreni di crescita

Campioni dei terreni di coltura venivano prelevati ogni tre giorni e filtrati. Su tali campioni veniva determinata la concentrazione di azoto (NO_3 , NH_4 e NO_2) e di P (PO_4), utilizzando i kit Spectroquant (Merck).

Analisi statistica

I dati sono la media di tre repliche \pm deviazione standard. L'analisi statistica dei dati comprendeva il T di Student, differenze di $p < 0.05$ venivano considerate significative.

Risultati e Discussione

I due generi crescevano generalmente meglio nel terreno di controllo rispetto all'acqua reflua (Fig. 1). *Lemna* in acque reflue mostrava diminuzioni significative ($p < 0.05$) della crescita in tutte le stagioni, ad eccezione della primavera, mentre la crescita di *Azolla* nelle acque reflue diminuisce significativamente ($p < 0.01$) solo in questa stagione. I tassi di crescita, pur non essendo uniformi durante l'anno, confermavano i dati di letteratura (Peters *et al.*, 1980; Moretti e Siniscalco Gigliano, 1988), con valori di raddoppiamento della biomassa confrontabili con quelli ottenuti in condizioni ottimali.

Le differenze rilevate nelle concentrazioni della clorofilla (Fig. 2) tra le piante cresciute in acque reflue e quelle dei controlli non erano significative, indicando un generale buon adattamento dei due generi alle diverse condizioni di crescita. In inverno si notava una colorazione rosastra delle foglie di *Azolla*, dovuta alla produzione di antociani causata dalle basse temperature.

Ad eccezione dell'autunno, una significativa diminuzione dell'attività nitrogenasica di *Azolla*, veniva rilevata al termine degli esperimenti (primavera 21% rispetto al controllo) (Tab. 1); tale decremento potrebbe essere considerato un indice di stress da carenza di nutrienti, come riportato da Kitoh e Shiomi (1991).

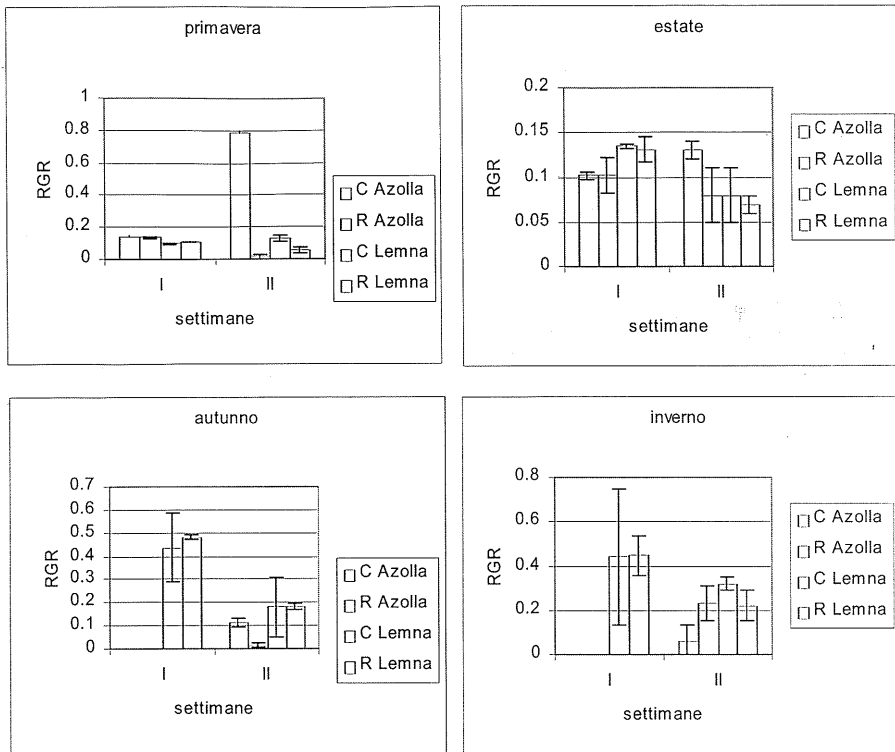


Fig. 1 Crescita relativa (RGR) di *Azolla* e *Lemna* durante gli esperimenti.

Tab. 1 - Attività nitrogenasica (mmoli $C_2H_4/g.$ peso fresco/ora) di *Azolla* durante gli esperimenti stagionali.

Settimane	Stagioni							
	Primavera		Estate		Autunno		Inverno	
	C	R	C	R	C	R	C	R
0	1420 ±160	1420 ±160	2918 ±325	2918±325	166 ±38	166 ±38	293 ±0	293 ±0
I	2260 ±252	1997±159	2716 ±239	1743±531	2051 ±291	1879 ±482	351 ±175	1918±978
II	2157±204	457±20	1430 ±175	593 ±201	2646 ±568	2533 ±327	1899±404	1134±674

La concentrazione di fosfato presente nelle acque reflue variava da 0,8 a 3,8 ppm e risultava inferiore a quella riportata come ottimale nei terreni di crescita per *Azolla* e *Lemna*, come già nelle acque eutrofizzate osservate da Avena et al. (1980). Tuttavia, i valori erano comparabili con quelli riportati da Körner e Vermaat (1998) compresi tra 1.1 a 7.9 ppm.

La percentuale di rimozione del PO_4 variava in funzione delle stagioni ed andava da un minimo del 25% ad un massimo del 100%, valori

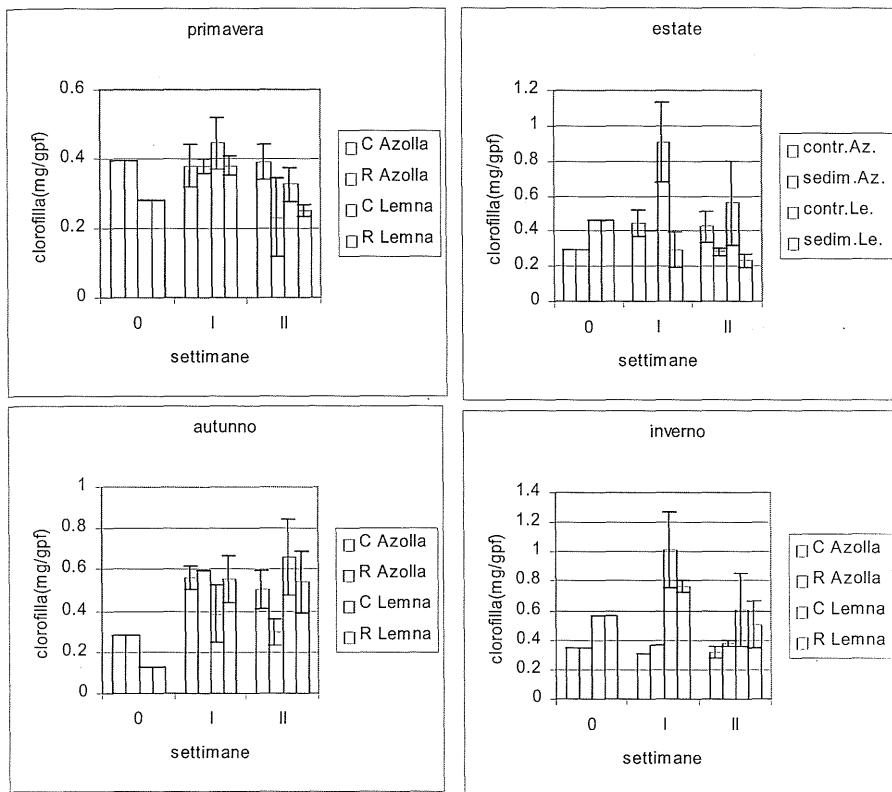


Fig. 2 Concentrazione della clorofilla in *Azolla* e *Lemna*.

Tab. 2 - Rimozione di N e P dai terreni di coltura.

Stagioni	Generi	% di rimozione PO ₄		% di rimozione NO ₃	
		Terreni		Terreni	
		C	R	C	R
Primavera	<i>Azolla</i>	56.9	92.1	-	62.8
	<i>Lemna</i>	65	28.9	55.2	94.6
Estate	<i>Azolla</i>	34.8	97	-	13
	<i>Lemna</i>	98.8	96.2	82.2	46.7
Autunno	<i>Azolla</i>	62.5	100	-	100
	<i>Lemna</i>	56.2	-	100	-
Inverno	<i>Azolla</i>	24.8	35.7	-	100
	<i>Lemna</i>	58.8	85.8	100	100

maggiori in media del 40% rispetto ai dati riportati da altri autori per questo
 ione (Korner e Vermaat, 1998). L'efficienza di rimozione del NO₃ era del
 100% in autunno e inverno (Tab. 2). Sebbene i valori di concentrazione del
 nitrato riscontrati nelle acque reflue siano molto più bassi di quelli del terre-

no di controllo, il tasso di rimozione di questo ione, da parte delle macrofite, era comunque molto buono. La carenza di concentrazioni rilevabili di ammonio nell'acqua reflua, potrebbe essere dovuta in parte alla sua volatilizzazione sotto forma di ammoniaca causata dal pH elevato di tale acqua (Körner e Vermaat, 1998).

In base ai risultati ottenuti si può affermare che, per un periodo di circa due settimane, *Azolla* e *Lemna* sono in grado di rimuovere considerevoli quantitativi di azoto e fosforo da acque reflue di allevamenti ittici, mostrando tassi di crescita accettabili. L'attività depuratrice dei due generi si mantiene durante tutto l'anno, pertanto si può affermare che *Azolla filiculoides* e *Lemna minor* possono essere delle buone candidate per la fitodepurazione alle nostre latitudini. La facilità di rimozione e i bassi costi di mantenimento di un impianto di depurazione basato su questi principi, costituiscono dei vantaggi per l' utilizzo di queste macrofite.

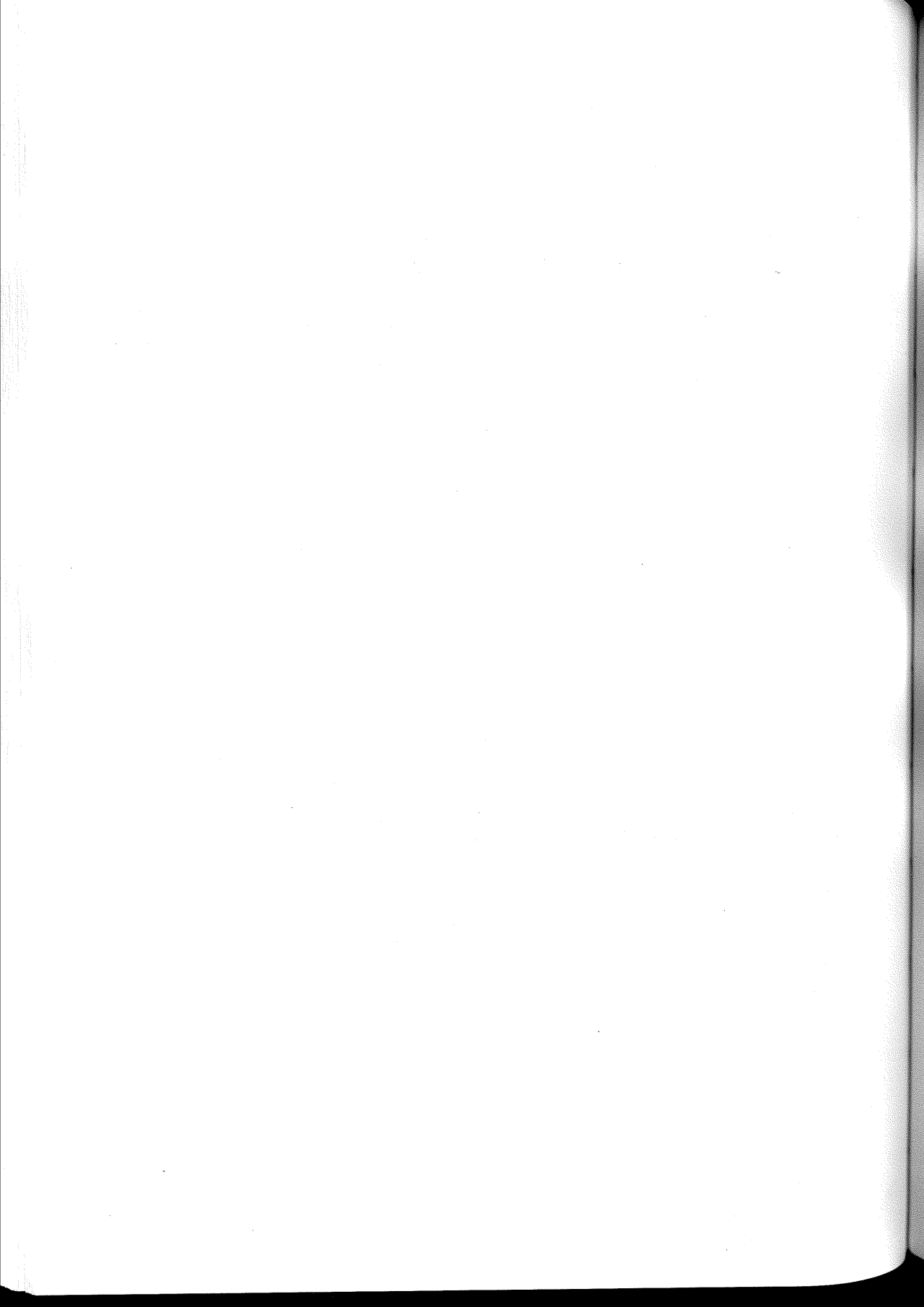
Ringraziamenti

Questa ricerca è stata effettuata con finanziamenti C.N.R. Progetto Finalizzato Biotecnologie

Bibliografia

- ARAÚJO M.C., 1987. Use of water hyacinth in tertiary treatment of domestic sewage. *Water Sci. Technol.*, 19 (10): 11-17.
- AVENA G.C., BLASI C., SCOPPOLA A., 1980. Indagini ecologico-fitogeografiche sulle zone umide interne del Lazio. I: Relazione tra lo stato chimico-fisico delle acque e le comunità macrofittiche della Bonifica Pontina. *Annali di Botanica*, 39: 31-81.
- BENGTSSON B.-E., BONGO J.P., EKLUND B., 1999. Assessment of duckweed *Lemna aequinoctialis* as a toxicological bioassay for tropical environments in developing countries. *Ambio*, 28 (2): 152-155.
- FORNI C., GRILLI CAIOLA M., GENTILI S., 1989. Bacteria in the *Azolla-Anabaena* symbiosis. In: *Nitrogen fixation with Non-Legumes* (F.A. Skinner, R.M. Boddey, I. Fendrik eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.83-88.
- FORNI C., GENTILI S., VAN HOVE C., GRILLI CAIOLA M., 1990. Isolation and characterization of the bacteria living in the sporocarps of *Azolla filiculoides* Lam. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 40, parte II: 235-243.
- FORNI C., CHEN J., TANCIONI L., GRILLI CAIOLA M., 2000. Evaluation of the fern *Azolla* for growth, nitrogen and phosphorus removal from wastewater. *Water Res.*: in press.
- KITOH S., SHIOMI N., 1991. Effect of mineral nutrients and combined nitrogen sources in the medium on growth and nitrogen fixation of *Azolla-Anabaena* association. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37 (3): 419-426.
- KONDO M., KOBAYASHI M., TAKAHASHI E., 1989. Effects of phosphorus and temperature on the growth and nitrogenase activity in *Azolla-Anabaena* association. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35 (2): 217-226.
- KORNER S., VERMAAT J.E., 1998. The relative importance of *Lemna gibba* L., bacteria and algae for nitrogen and phosphorus removal in duckweed-covered domestic wastewater. *Water Res.*, 32: 3651-3661.

- MacKINNEY G., 1941. Adsorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.*, 140: 315-322.
- MORETTI A., SINISCALCO GIGLIANO G., 1988. Influence of light and pH on growth and nitrogenase activity on temperate-grown *Azolla*. *Biol. Fert. Soil*, 6: 131-136.
- PETERS G.A., MAYNE B.C., 1974. The *Azolla-Anabaena* relationship. I Characterization of the association. *Plant Physiology*, 53: 813-819.
- PETERS G.A., MEEKS J.C., 1989. The *Azolla-Anabaena* symbiosis: basic biology. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 193-210.
- TANCIONI L., CATALDI E., CICCOTTI E., FALCUCCI M., HULL V., MILONE N., MONFRINOTTI M., PANELLA S., PIPORNETTI S., SCARDI M., CATAUDELLA S., 1998. Tecniche di fitodepurazione e lagunaggio per il trattamento e il riuso di acque di scarico di un impianto di allevamento di specie ittiche pregiate (storioni). *Biol. Mar. Medit.* 5 (3): 2105-2111.
- TUNG H.F., SHEN T.C., 1981. Studies of the *Azolla pinnata* - *Anabaena azollae* symbiosis. Growth and nitrogen fixation. *New Phytol.*, 87: 743-749.
- VAN HOVE C., DIARA H. F., GODARD P., 1983. *Azolla* en Afrique de l'Quest-in west Africa. Ed. Imp. E. Oleffe, Court-St Etienne, Belgium.
- VERMAAT J.E., KHALID HANIF M., 1998. Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the water fern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. *Water Res.*, 32 (9): 2569-2576.
- ZHAO M., DUNCAN J.R., 1997. Removal and recovery of nickel from aqueous solution and electroplating rinse effluent using *Azolla filiculoides*. *Process Biochemistry*, 33 (3): 249-255.



BIOSENSORI PER BIOREMEDIATION DA ERBICIDI

D. Esposito, P. Giardi, E. Pace, M. Rizzuto, MT. Giardi

IBEV-ICN, CNR, Area della ricerca di Roma, 00016 Monterotondo Scalo

Le feniluree, le triazine, le diazine ed i composti fenolici rappresentano prodotti dell'industria farmaceutica, chimica ed agraria molto importanti. Sono stati sintetizzati dopo la seconda guerra mondiale e utilizzati in grande quantità fino ai giorni nostri, in particolare come erbicidi. Nonostante siano attualmente disponibili erbicidi di nuova generazione, tali composti ancora rappresentano i componenti base per il controllo delle piante infestanti. Costituiscono circa il 40% di tutti gli erbicidi usati attualmente in agricoltura, ammontando a milioni di tonnellate utilizzati in tutto il mondo.

Agiscono inibendo la fotosintesi a livello del trasporto elettronico del fotosistema II (PSII) e ulteriormente bloccando la produzione di ATP e NADPH. Questa inibizione è principalmente dovuta al legame dell'erbicida nel sito QB della proteina D1 del Fotosistema II.

Questi composti sono assorbiti attraverso le radici e quindi trasportati alle foglie via xilema. Alcuni di questi erbicidi sono direttamente assorbiti dalle foglie.

Nel suolo, questi composti sono abbastanza persistenti e sono adsorbiti dai colloidi e da sostanze organiche in funzione della loro abilità di scambio cationico. I composti solubili percolano, principalmente in suoli sabbiosi e in assenza di sostanze organiche. Molti erbicidi rimangono sulla superficie del suolo.

L'uso su vasta scala di tali erbicidi, principalmente triazine, ha portato alla selezione e la diffusione di biotipi resistenti di piante superiori con la conseguente necessità di aumentare le dosi per il controllo delle infestanti. Sebbene l'uso dell'Atrazina sia vietato per legge in vari paesi europei, composti simili, come la simazina (differisce dalla triazina solo per la presenza di un gruppo metilico nella catena laterale) sono attualmente largamente usati.

Questi composti chimici e i loro metaboliti contaminano suoli, acque di falda e di superficie con gravi danni all'ambiente. Un suolo contaminato da erbicidi può costituire un problema per i raccolti coltivati in rota-

zione; per esempio il mais è resistente agli erbicidi triazinici, ma il grano, che spesso è coltivato in rotazione, è sensibile alle triazine e la produttività può essere danneggiata dalla loro presenza (1,2).

La "bioremediation" con organismi fotosintetici può essere un metodo per recuperare suoli e ambienti acquosi contaminati da erbicidi. L'organismo fotosintetico utile a tale scopo dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- essere resistente all'azione dell'erbicida
- permettere la sua traslocazione ed il legame con il sistema enzimatico
- essere in grado di metabolizzare l'erbicida.

Usando mutanti resistenti all'erbicida, le piante devono essere tagliate prima della fioritura per evitare la diffusione di biotipi resistenti (3,4).

Gli organismi fotosintetici sviluppano molti meccanismi di resistenza agli erbicidi. Si possono distinguere organismi naturalmente resistenti e mutanti di specie sensibili. Nei naturalmente resistenti, i meccanismi di resistenza includono una lenta traslocazione nel cloroplasto, un elevato turnover proteico di riparazione, immobilizzazione e detossificazione mediante enzimi endogeni attraverso la coniugazione e/o degradazione; gli enzimi glutatione S-transferasi sono coinvolti nella detossificazione degli erbicidi. Spesso più di un meccanismo è attivo nello stesso tempo. L'uso prolungato in agricoltura di inibitori del PSII, specialmente erbicidi triazinici, ha provocato la comparsa di mutanti da specie sensibili.

Per la bioremediation è consigliabile l'uso di organismi fotosintetici tipo cianobatteri ed alghe e/o piante acquatiche.

Per i suoli sono utili piante superiori di facile riproduzione. Comunque usando mutanti resistenti, le piante devono essere tagliate prima della fioritura per evitare la diffusione di biotipi resistenti.

Nel caso di resistenza all'azione di erbicidi fotosintetici, la base predominante sta in una singola sostituzione nucleotidica nel gene cloroplastico *psbA* codificante la proteina D1, la quale preclude il legame dell'erbicida alla proteina. Comunque, l'insorgere della resistenza in mutanti è stata anche attribuita alle modificazioni nell'attività dell'enzima glutatione (2,5).

I migliori risultati nella "remediation" possono essere ottenuti usando organismi mutanti resistenti agli erbicidi con un incremento dell'attività enzimatica di degradazione dell'erbicida; organismi mutanti con modificazioni aminoacidiche nella proteina bersaglio D1 sono meno efficienti, mentre organismi con una lente traslocazione dell'erbicida non sono utili (4,5).

Di solito analisi enzimatiche e l'uso di traccianti radiattivi sono necessari per rilevare il meccanismo di resistenza degli organismi fotosintetici.

La fluorescenza della clorofilla a è usata di frequente come un potenziale indicatore di stress chimici e ambientali e come metodo di "screening" di piante resistenti. In particolare, questo metodo è caratterizzato da misure non distruttive, semplici, e rapide, sia in laboratorio che in campo.

Gli erbicidi fotosintetici causano cambiamenti nel fenomeno di induzione di fluorescenza; quando l'erbicida si lega al sito QB della proteina D1 il trasporto elettronico è bloccato e non può avvenire la riossidazione del chinone accettore secondario. Quindi, l'induzione di fluorescenza raggiunge più rapidamente il suo valore massimo rispetto al controllo non trattato, di conseguenza l'area sopra la curva di fluorescenza e il valore massimo di fluorescenza è particolarmente ridotta in presenza dell'erbicida. Quindi, questa tecnica potrebbe essere utilizzata per riconoscere rapidamente il sito di azione dell'erbicida a livello della proteina D1.

A tale scopo abbiamo costruito dei biosensori basati sulla misura della fluorescenza del PSII, finalizzati alla scelta dell'organismo fotosintetico adatto per la "remediation" di uno specifico erbicida (6,7). La metodologia del biosensore dovrebbe evitare laboriosi test in campo.

Un biosensore incorpora un elemento biologicamente attivo, capace di rilevare selettivamente e in modo reversibile l'attività di un composto chimico in ogni tipo di campione. Consiste di due elementi: una componente biologica (biomediatore) interfacciato ad un sensore, e da un sistema di trasduzione del segnale chimico o fisico; il sistema di trasduzione del segnale misura variazioni dell'attività del biomediatore che riflettono gli effetti di un inquinante ambientale.

In tale comunicazione presentiamo dati che riguardano l'utilizzo di tali biosensori per la scelta dell'organismo per la decontaminazione da erbicidi triazinici.

Materiali e metodi

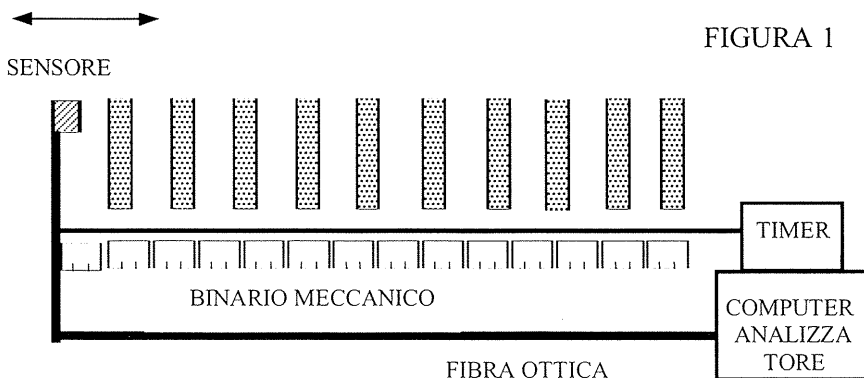
Sono state utilizzate le seguenti specie: *Amaranthus retroflexus*, *Avena sativa*, *Pisum sativum*, *Poa annua*, *Spinacea oleracea*, *Solanum nigrum*, *Senecio vulgaris*, *Triticum durum*, *Vicia faba*, *Zea mays*, e i mutanti resistenti all'atrazina *Amaranthus retroflexus*, *Poa annua*, *Solanum nigrum* e *Senecio vulgaris* ottenuti da piante Wilde-type per selezione in campo dopo trattamento a lungo termine con l'atrazina.

I germogli sono stati fatti crescere in suolo o in vermiculite in contenitori di plastica e innaffiati con soluzione Hoagland. La temperatura nella sera è stata mantenuta a 25° C sotto d una luce di crescita di 450 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Risultati e discussione

Per la determinazione della resistenza agli erbicidi sono necessari due set di analisi: analisi di fluorescenza di piante intatte e di tilacoidi, entrambi trattati con erbicidi. Per questo scopo sono stati costruiti due strumenti.

Il primo strumento è composto di alcune vials in serie, con piantine mantenute in soluzioni contenenti erbicida (figura 1). Le piante sono tenute alla luce per qualche ora. Viene usato un sensore che fornisce la luce di eccitazione e misura il segnale di fluorescenza emesso dalle piante. Una fibra ottica si connette il sensore; quindi un computer analizza i dati. Ogni parte è collegata ad un timer che attiva il sensore di fluorescenza ad intervalli di tempo prestabiliti. La fibra ottica si muove ungo un binario meccanico fatto di 22 interruttori e la fluorescenza viene misurata automaticamente. Il primo e l'ultimo interruttore permettono alla fibra ottica di invertire la direzione del movimento mentre gli altri venti interruttori tengono per 30 secondi la fibra in asse con ciascun organismo per effettuare la misura.



Il parametro F_v/F_m varia in funzione del trattamento della pianta con l'erbicida in vivo, per cui si determinano i seguenti valori di I_{50} per le piante testate.

Possiamo notare dai dati del biosensore che i mutanti resistenti possono facilmente essere selezionati.

Tab. 1. I_{50} : concentrazione di erbicida che causa una inibizione del 50% dell'attività espressa come rapporto di fluorescenza Fv/Fm. Il rapporto è stato calcolato da un grafico che riporta la percentuale di inibizione di fluorescenza in funzione del logaritmo della concentrazione di erbicida per organismo trattato con soluzioni di erbicida sotto un flusso d'aria alla luce per 10 ore.

Piante	I_{50} (μ M)
<i>Avena sativa</i>	2.4 ± 0.06
<i>Amaranthus retroflexus</i>	2.9 ± 0.07
<i>A. retroflexus mutant</i>	>4
<i>Pisum sativum</i>	2.7 ± 0.05
<i>Poa annua</i>	3.0 ± 0.10
<i>Poa annua mutant</i>	>4
<i>Triticum durum</i>	2.1 ± 0.08
<i>Vicia faba</i>	1.9 ± 0.08
<i>Senecio vulgaris</i>	1.8 ± 0.09
<i>S. vulgaris. mutant</i>	>4
<i>Solanum nigrum</i>	2.0 ± 0.10
<i>S. nigrum mutant</i>	>4
<i>Zea mays</i>	>4

d'induzione di fluorescenza.

Questo esperimento rileva il legame degli erbicidi con le tilacoidi. Nel caso di una resistenza a livello della proteina D1, non avviene nessun legame dell'erbicida e la fluorescenza non subisce cambiamenti. Nel caso di una resistenza dovuta al contenuto del sistema enzimatico di degradazione dell'erbicida, l'erbicida può normalmente legarsi alle tilacoidi e la sua presenza riduce l'area della curva di induzione in maniera dipendente dalla concentrazione.

Tra le piante testate non è stata osservata nessuna riduzione dell'area della curva di induzione di fluorescenza nei mutanti di *Poa annua*, ma è stata osservata per i mutanti di *Amaranthus retroflexus* (Tab.2).

Il secondo biosensore usa un dispositivo che fornisce la luce di eccitazione e rileva il segnale di fluorescenza emesso dal biomediatore immobilizzato in una cella dove fluisce la soluzione con l'erbicida. Come per il biosensore precedente, una fibra ottica connette il sensore allo strumento che misura il segnale e lo trasmette al computer che analizza i dati. Ogni parte è collegata ad un timer che attiva il sensore di fluorescenza ad intervalli di tempo prestabiliti. La figura 2 rappresenta uno schema del biosensore ottenuto modificando il precedente tipo di biosensore per la misura della concentrazione di erbicida (6,7).

Le particelle tilacoidali sono state isolate da mutanti riportati in Tab.1 e 50 μ g di clorofilla sono stati immobilizzati in una cella a flusso. Le soluzioni di erbicida a varie concentrazioni vengono fatte fluire nella cella a flusso e viene misurata l'area sopra la curva

Tab. 2. Biomediatore: tilacoidi di *Amaranthus retroflexus*; concentrazione dell'erbicida: 10^{-6} M; tempi di flusso della soluzione di erbicida: 20 min. I dati sono una media di 3 analisi, SE 16% ca.

% di riduzione dell'area di induzione di fluorescenza in presenza di erbicida

	Wild-type	Mutante
Diuron	99	96
Bromoxynil	97	95
Dinoseb	99	93
Atrazina	96	15
Simazina	95	14
Ametryn	99	21
Desmetryn	92	10

In conclusione l'uso dei due biosensori permette la scelta dell'organismo fotosintetico adatto per la "phytoremediation", evitando laboriosi test in campo.

Si ringrazia il progetto strategico CNR-Ambiente e Territorio per il supporto.

Referenze

- 1 A. MATTOO, M.T. GIARDI, A. RASKIND, M. EDELMAN (1999). A review. *Physiol Plant* 107, 454-461.
- 2 B. GEIKEN, J. MASOJÍDEK, M. RIZZUTO, M.L. POMPILI, M.T. GIARDI (1998). *Plant, Cell and Environment*, 21, 1265-1273.
- 3 M.T. GIARDI, D. ESPOSITO, C. LEONARDI, A. MATTOO, A. MARGONELLI, G. ANGELINI. (Brevetto CNR, 112 2000).
- 4 M. KOBLIZEK, J. MASOJÍDEK, J. KOMENDA, T. KUCERA, R. PILLOTON, A. MATTOO, M.T. GIARDI (1998). *Biotechnol. and Bioeng.*, 60, 664-669.
- 5 A. MATTOO, M.T. GIARDI, A. RASKIND, M. EDELMAN (1999). Dynamic metabolism of photosystem II reaction center proteins and pigments. A review. *Physiol. Plant.* 107, 454-461.
- 6 M. KOBLIZEK, J. MASOJÍDEK, J. KOMENDA, T. KUCERA, R. PILLOTON, A. MATTOO, M.T. GIARDI (1998). An ultrasensitive PSII-based biosensor for monitoring a class of photosynthetic herbicides. *Biotechnology and Bioengineering*, 60, 664-669.
- 7 M.T. GIARDI, D. ESPOSITO, C. LEONARDI, A. MATTOO, A. MARGONELLI, G. ANGELINI. Sistema portatile per il monitoraggio ambientale selettivo di erbicidi inquinanti basato sulla applicazione di un biosensore da Fotosistema II (PSII). Italian Patent, 112, 2000.

FITOESTRAZIONE DI METALLI PESANTI: PRIMI RISULTATI SPERIMENTALI

Luca Marchiol, Giuseppe Zerbi

Dipartimento di Produzione Vegetale e Tecnologie Agrarie, Università di Udine,
Polo Scientifico Rizzi
Via delle Scienze 208, 33100 Udine

Introduzione

La contaminazione dei suoli da parte dei metalli pesanti di origine antropica deriva dalle attività industriali, dal traffico, dall'eccessivo impiego di fertilizzanti ed antiparassitari e dall'utilizzo acque irrigue, di compost e di fanghi di depurazione di cattiva qualità (Zaccheo *et al.*, 1999).

A fronte di ciò vi è una carenza di informazioni relativamente allo stato di contaminazione dei terreni. Questo è stato confermato da Abollino *et al.* (1996) che in una meritevole rassegna hanno raccolto una certa mole di dati sull'argomento da diverse fonti: ricercatori ed analisti di Università, Enti di Ricerca e dati di letteratura. A parte le difficoltà interpretative incontrate nella valutazione di dati provenienti da fonti diverse ed ottenuti attraverso procedure differenti, gli autori hanno verificato diversi casi di anomalie nel contenuto in metalli pesanti nei suoli dovute alle cause citate.

Da altre fonti si ricavano dati contraddittori: lavori condotti in Italia volti all'analisi di situazioni specifiche, svolti da Goldberg *et al.* (1975) e da Genevini *et al.* (1995), mettono in luce aspetti preoccupanti dovuti a problematiche locali; per contro, studi dello stesso tipo svolti su un territorio ampio, ad esempio su scala regionale, non rilevano situazioni di rischio evidente (De Luisa *et al.*; 1990).

Nel nostro paese il problema della contaminazione dei suoli e degli interventi di bonifica è stato affrontato in modo organico solo di recente attraverso Il D.M. 25 ottobre 1999, n. 471.

Nel decreto in questione vi è un chiaro indirizzo all'impiego, nei limiti del possibile, di tecniche a basso costo ed a basso impatto ambientale; tra queste è senz'altro compresa la fitoestrazione di contaminanti. La possibilità di impiegare piante coltivate in programmi di disinquinamento di suoli contaminati (*phytoremediation*) è oggetto da qualche anno di numerosi studi.

Esistono in natura specie vegetali caratterizzate dall'essere in grado di sopportare alti livelli di concentrazione delle specie chimiche inquinanti presenti nel suolo e di concentrarle nei propri tessuti. Le possibili spiegazioni a questo accumulo sono state avanzate da diversi autori sulla base di differenti interpretazioni.

Alcuni hanno sostengono che le piante assorbono ed accumulano i metalli pesanti, quasi per caso, senza apparentemente una logica motivazione (Baker e Brooks, 1989). Secondo un'altra interpretazione, la pianta assorbirebbe il metallo per confinarlo e renderlo inerte potendo, in questo modo, continuare a vegetare senza ostacoli; questa è un'ipotesi che si rifà al concetto di metallo-tolleranza. I vegetali sarebbero in grado anche di accumulare le sostanze a loro tossiche in organi o parti che poi verrebbero perse per abscissione (Ernst, 1972; Wild, 1978; Baker, 1981; Farago *et al.*, 1988).

Inizialmente, il termine fitoestrazione è stato riferito solamente all'uso di specie iperaccumulatrici. Tuttavia, la maggior parte delle piante iperaccumulatrici ritrovate in natura alle latitudini europee, pur essendo molto interessanti per l'innata capacità di accumulare notevoli quantità di contaminanti, presentano l'inconveniente di avere una taglia ridotta ed un ritmo di accrescimento molto basso; esse pertanto risultano di difficile gestione e di scarsa utilità pratica. Per questa ragione, le ricerche attuali mirano a trovare delle specie non necessariamente iperaccumulatrici, ma anche semplicemente metallo-tolleranti, che abbiano la prerogativa di produrre una maggiore biomassa epigea (Entry *et al.*, 1996; Pulford, 1995; Riddle-Black, 1995) e che riescano ad esplorare il suolo a profondità maggiori.

La pianta adatta ai diversi tipi di fitodecontaminazione deve, perciò, non solo essere tollerante ed accumulare alti quantitativi di inquinante nelle parti poi asportate, ma anche avere un rapido tasso di crescita e produrre molta biomassa (Chaney, 1998).

La conoscenza del tasso di accumulo espresso in mg di metallo per kg di biomassa per il tasso di crescita è molto utile per stimare il tempo impiegato dal processo di decontaminazione per raggiungere la fine. Spesso servono molti cicli prima di raggiungere il livello voluto di concentrazione del contaminante nel substrato.

Per poter applicare il processo di fitoestrazione su larga scala è necessario conoscere a fondo la specie che si intende impiegare, in particolare servono delle piante efficienti, con buone capacità estrattive ed adatte alle condizioni climatiche e pedologiche più svariate. Queste considerazioni mettono in evidenza la necessità di incentivare la ricerca rivolta a trovare specie utilizzabili in tale ambito, senza esclusione alcuna, ossia indirizzata

anche a specie di interesse agrario. L'eventualità che piante agrarie possano essere impiegate per scopi di disinquinamento è indubbiamente interessante e vantaggiosa viste le conoscenze acquisite relativamente alla loro gestione.

Materiali e metodi

L'attività sperimentale è stata condotta nell'ambito di un progetto di ricerca dal titolo "Sistemi biologici per la decontaminazione di aree degradate da accumulo di metalli pesanti e potenziale di reinsediamento di specie vegetali", finanziato per il biennio 1998-2000 dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica.

Le prove sono state condotte con l'obiettivo di analizzare il comportamento di alcune specie vegetali appartenenti alla famiglia delle brassicacee su un terreno contaminato. Tale substrato proveniva da un fondo agricolo lombardo condotto a marcita per molti decenni sito in provincia di Milano e reperito con la collaborazione del Dipartimento di Produzione Vegetale dell'Università di Milano.

Nella fase di preparazione dell'attività sperimentale sono state condotte delle prove preliminari di allevamento allo scopo di verificare eventuali effetti tossici del substrato sulle piante. Questi si sono manifestati con molta chiarezza e determinavano dopo una germinazione regolare un progressivo avvizzimento delle plantule. Per questo motivo è stato necessario diluire il terreno originario con della sabbia; sono stati ottenuti tre diversi substrati miscelando il suolo alla sabbia in diverse proporzioni (rispettivamente, 1:3, 1:2 e 1:1 peso/peso); le concentrazioni di metalli pesanti presenti nei substrati sono illustrate in tabella 1.

Tabella 1 - Concentrazioni di metalli pesanti presenti nei substrati

Substrato	Cd (mg kg ⁻¹)	Cr (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Ni (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
Controllo	3.51	18.2	37.9	19.6	37.9	66.1
Suolo-sabbia 1:3	19.1	85.0	140	24.0	441	3336
Suolo-sabbia 1:2	25.6	112	192	31.0	589	4451
Suolo-sabbia 1:1	38.6	165	286	46.9	884	6685

Sono stati condotti tre esperimenti in ognuno dei quali sono state allevate per un ciclo di 60 gg. *B. napus* cv. Kabel, *B. juncea* cv. Vittasso, *R. sativus* cv. Rimbo e *B. carinata* cv. BRK13. Le piante venivano allevate in condizioni di luminosità controllate ed irrigate ogni due giorni con solu-

zione nutritiva per l'apporto dei nutrienti minerali. Era presente la tesi di controllo costituita da normale terreno agrario proveniente dalla azienda sperimentale dell'Università di Udine.

Al termine del ciclo di allevamento sono state eseguite delle osservazioni in vivo relative alla osservazione degli scambi gassosi e allo stato nutrizionale delle foglie. Successivamente, dopo prelievi distruttivi di biomassa sono stati ricavati i pesi delle frazioni e l'area fogliare per pianta. Infine, dopo avere eseguito la mineralizzazione dei campioni vegetali, questi sono stati analizzati mediante uno spettrometro di massa al plasma ICP/OES Perkin Elmer 3000 presso l'Istituto per la Nutrizione delle Piante-sezione di Gorizia.

Risultati e Discussione

Il terreno di controllo ha dimostrato di rientrare nei limiti previsti per gli elementi considerati dal D.M. 471/1999, fatta eccezione per il Cd che supera del 75% il limite imposto dalla normativa.

Le concentrazioni di metalli pesanti rilevate nelle miscele suolo-sabbia si sono rivelate più elevate del limite tabellare inferiore per Cd, Cu, Pb e Zn; il Cr ha superato tale limite solamente nel caso del substrato 1:1. Infine, il limite tabellare superiore (usi commerciali-industriali) è stato superato dal Cd e dallo Zn in tutte le diluizioni.

Lo stato nutrizionale delle foglie nelle piante allevate sui substrati contaminati è stato ricavato per mezzo di un rilevatore portatile Spad Minolta basato sull'assorbimento della clorofilla; i risultati di queste osservazioni hanno evidenziato una alterazione del livello di nutrizione azotata, a sua volta correlato alla presenza di adeguati livelli di complessi proteici ed enzimatici nelle foglie. In tutte le specie studiate nei tre esperimenti, l'effetto del substrato ha determinato una diminuzione significativa di questo parametro rispetto alla tesi di controllo (figura 1).

In accordo con quanto messo in luce da Kurpa e Baszynski (1995) le curve di risposta dell'assimilazione fotosintetica in condizioni di concentrazioni crescenti di CO₂ (dati non presentati) hanno indicato che gli effetti depressivi dei metalli pesanti sulla fotosintesi sono essenzialmente di tipo non stomatico; in particolare, questi consistono nell'influenza negativa sulla efficienza di rigenerazione della RuBP-carbossilasi e nella sostituzione dell'elemento di coordinazione - magnesio - presente nella molecola della clorofilla.

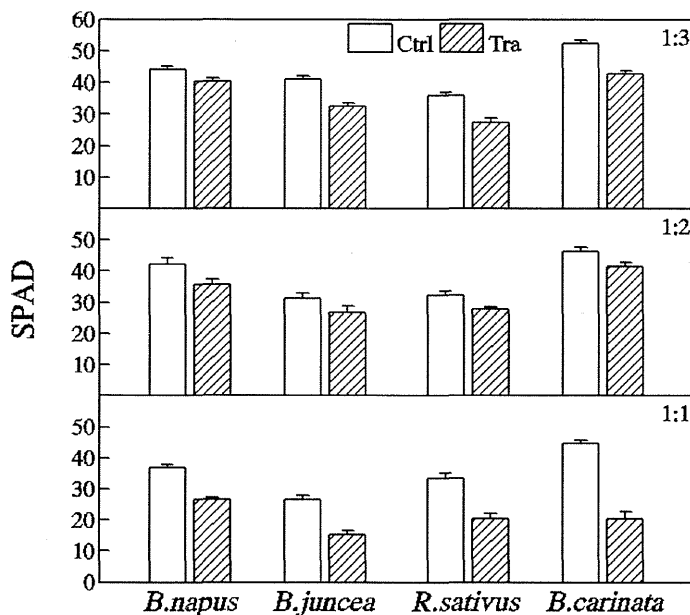


Figura 1 - Letture SPAD su foglie in piante di *B. napus*, *B. juncea*, *R. sativus* e *B. carinata* allevate nell'esperimento 1 (ctrl vs. suolo-sabbia 1:3), 2 (ctrl vs. suolo-sabbia 1:2) e 3 (ctrl vs. suolo-sabbia 1:1).

Al di là delle osservazioni sugli effetti negativi dei metalli pesanti sul metabolismo vegetale, peraltro ampiamente noti, per poter valutare in termini complessivi il comportamento di *B. napus*, *B. juncea*, *R. sativus* e *B. carinata* e ricavare delle indicazioni sul loro possibile impiego in fitoestrazione, è necessario fare riferimento alla produzione di biomassa. Questa è stata distinta a sua volta in due frazioni: epigea e totale. Le motivazioni di questa distinzione discendono dal possibile piano di lavoro previsto in un intervento di fitoestrazione. Considerando che al termine del ciclo colturale utile la biomassa epigea prodotta deve essere asportata, è molto utile conoscere i livelli produttivi delle diverse specie, associati naturalmente all'efficienza estrattiva in termini di concentrazione dei diversi metalli nella parte aerea.

Le osservazioni sui pesi delle frazioni vegetali delle specie studiate nell'esperimento con il massimo livello di concentrazione dei metalli pesanti nel substrato di allevamento mancano dei dati di *B. juncea* e *B. carinata*; queste specie, evidentemente inadatte alle condizioni sperimentali imposte, dopo un iniziale sviluppo esse hanno sofferto una rilevante mortalità e pertanto sono state escluse dalle successive osservazioni.

Il dato relativo al contenuto percentuale di sostanza secca della biomassa epigea (figura 2), per la sua natura di valore aggregato, compren-

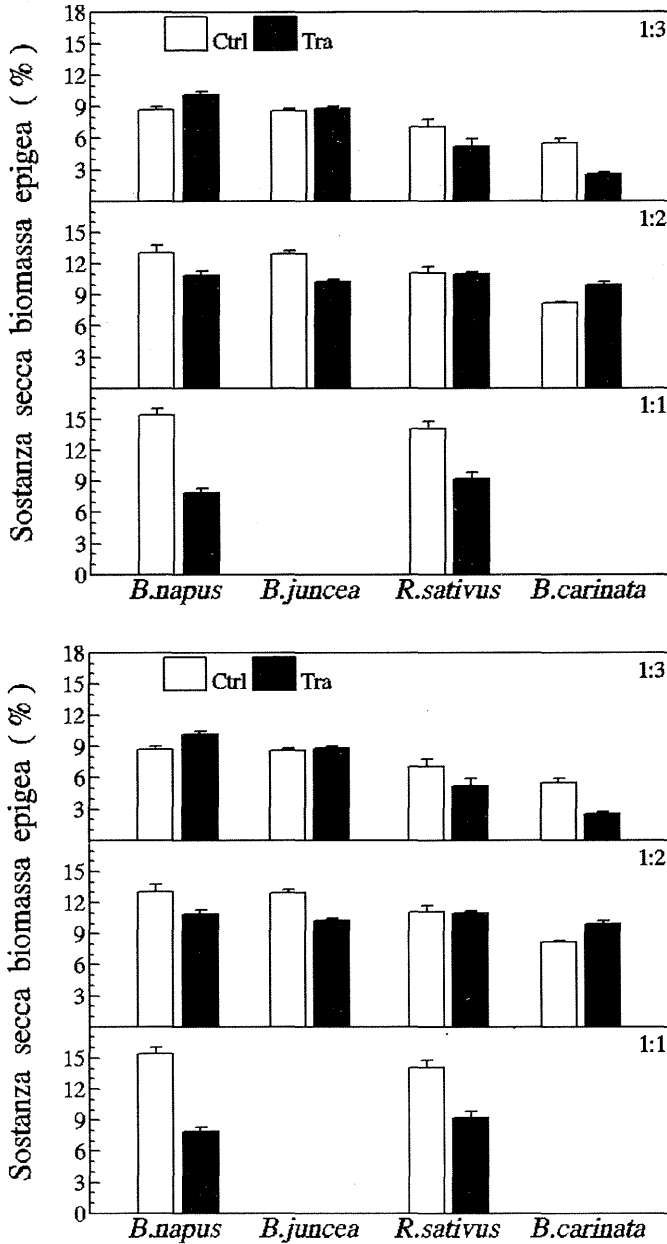


Figura 2 e 3 - Sostanza secca percentuale della biomassa epigea totale di *B. napus*, *B. juncea*, *R. sativus* e *B. carinata* allevate nell'esperimento 1 (ctrl vs. suolo-sabbia 1:3), 2 (ctrl vs. suolo-sabbia 1:2) e 3 (ctrl vs. suolo-sabbia 1:1).

de quanto rilevato nelle singole frazioni. Nel primo esperimento *R. sativus* e *B. carinata* risentono negativamente del trattamento imposto, per *B. napus* si rileva una risposta opposta mentre *B. juncea* si dimostra indifferente. I dati ricavati dalle variabili misurate nella seconda prova indicano un effetto negativo indotto dal substrato di allevamento in *B. napus* e *B. juncea*; le altre specie hanno risposto al trattamento in modo diverso. Infine, alle concentrazioni più elevate di contaminanti si manifestano con chiarezza nelle specie superstiti gli effetti della tossicità del substrato.

Per quanto riguarda il valore percentuale di sostanza secca riferita alla biomassa totale delle piante (figura 3), è stato possibile verificare che *B. juncea* e *R. sativus*, nel primo esperimento, non risultano disturbati dal trattamento, mentre le altre specie hanno dimostrato un comportamento opposto. Per questo motivo le osservazioni statistiche non hanno rilevato la significatività del fattore trattamento. Nella prova seguente (substrato 1:2) *B. napus* e *B. juncea* manifestano un decremento significativo rispetto al controllo, rispettivamente del 18.4% e 22.7% ; al contrario *B. carinata* non risente del trattamento imposto ed anzi ha sviluppato una percentuale di sostanza secca nella biomassa totale superiore del 24.2% rispetto al corrispondente controllo.

Infine nell'esperimento conclusivo *B. napus* (-47.8%) e *R. sativus* (-34.4%) hanno subito l'effetto negativo dei metalli pesanti manifestando un sensibile decremento del contenuto percentuale di sostanza secca rispetto alla tesi di controllo.

Partendo dai dati di concentrazione dei metalli pesanti nelle diverse frazioni e dai loro pesi, è stato possibile calcolare i valori di concentrazione media di ogni elemento per la biomassa epigea e totale delle quattro specie in osservazione.

Vengono riportati i dati relativi alle condizioni di contaminazione più elevata (figure 4 e 5); in *B. napus* e *R. sativus*, specie risultate tolleranti in queste condizioni, Cd, Ni e Zn sono presenti in concentrazioni simili nella biomassa epigea e totale; al contrario, le piante non hanno dimostrato la stessa efficienza nei confronti del Cr, Cu e Pb.

Dalle concentrazioni dei singoli metalli nella biomassa epigea e totale è stato ricavato il contenuto assoluto degli elementi nella pianta in entrambi i casi.

Il coefficiente di fitoestrazione riferito alla biomassa epigea è risultato apprezzabile per Cd e Zn; infatti per questi metalli si verifica la maggiore traslocazione dall'apparato radicale verso la parte epigea delle piante (i

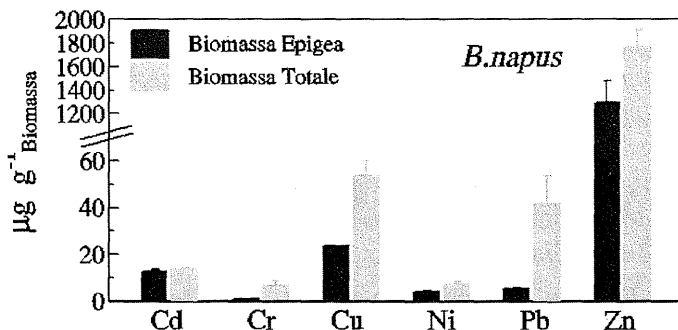


Figura 4 - Concentrazioni di metalli pesanti rilevate nella biomassa epigea e totale in piante di *B. napus* allevate nell'esperimento 3 (ctrl vs. suolo-sabbia 1:1).

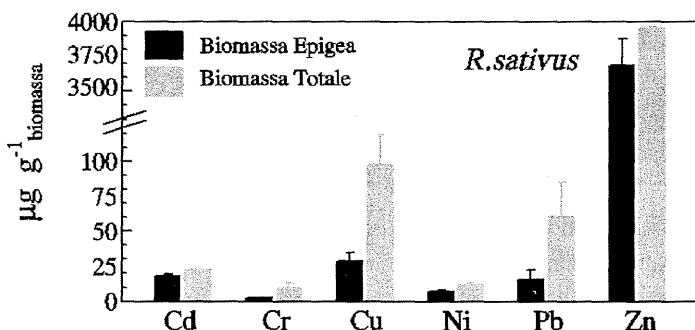


Figura 5 - Concentrazioni di metalli pesanti rilevate nella biomassa epigea e totale in piante di *R. sativus* allevate nell'esperimento 3 (ctrl vs. suolo-sabbia 1:1).

valori più elevati raggiunti sono rispettivamente del 80% in e 78% entrambi in *B. napus*); questo se da un lato contribuisce allo stato di alterazione metabolica generale della pianta (in particolare per il cadmio rispetto allo zinco anche a concentrazioni molto basse), dall'altro costituisce un motivo di interesse se inteso in termini di fitoestrazione del metallo. Diversamente per Pb tale rapporto è sempre al di sotto del 30% nelle specie studiate.

Resta inteso che la valutazione critica di queste considerazioni non può prescindere anche dalla ponderazione delle diverse variabili in gioco negli equilibri chimici delle diverse forme nelle quali il metallo è presente nel suolo, e che a loro volta ne determinano la biodisponibilità.

Conclusioni

L'analisi complessiva dei risultati ottenuti nello studio suggerisce, in sintesi, la seguente scala di efficienza di fitoestrazione: *R. sativus* > *B. napus* >> *B. juncea*, *B. carinata*.

Questo risultato è sorprendente per *B. juncea* che la letteratura recente indica come specie dalle grosse potenzialità applicative (Kumar *et al.*, 1995; Ebbs e Kochian, 1997; Salt *et al.*, 1997).

In effetti, per questa specie l'attitudine alla accumulazione dei metalli inizialmente è emersa; tuttavia nelle condizioni di contaminazione maggiore, evidentemente gli effetti combinati dei diversi metalli hanno determinato uno stato generale della pianta talmente precario da non consentirle di sopravvivere. In *B. carinata* nelle condizioni più blande di contaminazione la concentrazione dei metalli nella biomassa totale era generalmente più bassa rispetto alle altre specie.

La tolleranza dimostrata da *B. napus* e *R. sativus* anche alle condizioni più drastiche porta a concludere che queste specie sono risultate complessivamente le migliori. Da un confronto diretto tra queste basato sull'indice di tolleranza (calcolato sulla percentuale di sostanza secca accumulata nella biomassa epigea e totale rispetto alla tesi di controllo) si ricava che in *R. sativus* è emerso il comportamento migliore.

Queste conclusioni vanno evidentemente valutate tenendo debitamente conto anche del comportamento in relazione ai diversi metalli, e soprattutto della quantità effettiva di metallo estratta dalle piante.

Per avere un riferimento pratico, i dati ottenuti dagli esperimenti sono stati elaborati impostando una semplice modellizzazione. Supponendo di avere un terreno avente una concentrazione di Cd di 19 mg kg⁻¹ (situazione corrispondente alle condizioni sperimentali della prima prova eseguita) e di voler raggiungere il limite più elevato imposto dal DM 471 per i suoli a destinazione industriale pari a 15 mg kg⁻¹, si è ricavata la quantità effettiva di metallo presente in un profilo di 30 cm di un suolo di medio impasto. Conoscendo il valore di concentrazione del Cd rilevato in *B. napus* nelle prove sperimentali è stato possibile determinare in quanto tempo una coltura ideale, in grado di produrre almeno 50 t di biomassa fresca all'anno, è in grado di ridurre entro i limiti tabellari la concentrazione di Cd.

Il risultato non è stato confortante, infatti secondo questi calcoli sarebbero necessarie alcune centinaia d'anni. Ciò è certamente poco accettabile.

Tuttavia, dato che questo calcolo è derivato prendendo in considerazione la concentrazione di Cd rilevata in *B. napus* nei nostri esperimenti, vi sono diversi aspetti che meritano di essere puntualizzati.

Prima di tutto, è necessario ricordare che i dati di concentrazione di Cd rilevati nelle piante osservate negli esperimenti sono certamente stati influenzati dalla contemporanea presenza nei substrati degli altri 5 metalli; pertanto si può supporre che in assenza di questi l'accumulo di Cd avrebbe potuto essere superiore.

In secondo luogo il ciclo di allevamento delle piante è stato di soli 60 g. Per questo motivo non è possibile affermare che le piante abbiano raggiunto il livello massimo possibile di concentrazione, pertanto non si può escludere che l'efficienza avrebbe potuto essere maggiore, influenzando positivamente sul fattore tempo.

Le brassicacee osservate non rientrano nella definizione di piante iperaccumulatrici anche se possiedono una certa attitudine alla accumulazione dei metalli pesanti. Pertanto, paragonare direttamente in termini di efficienza di fitoestrazione i valori delle vere iperaccumulatrici - *Thlaspi* ed *Alyssum* - con quelli di altre piante che non possiedono questa innata prerogativa, risulta improprio.

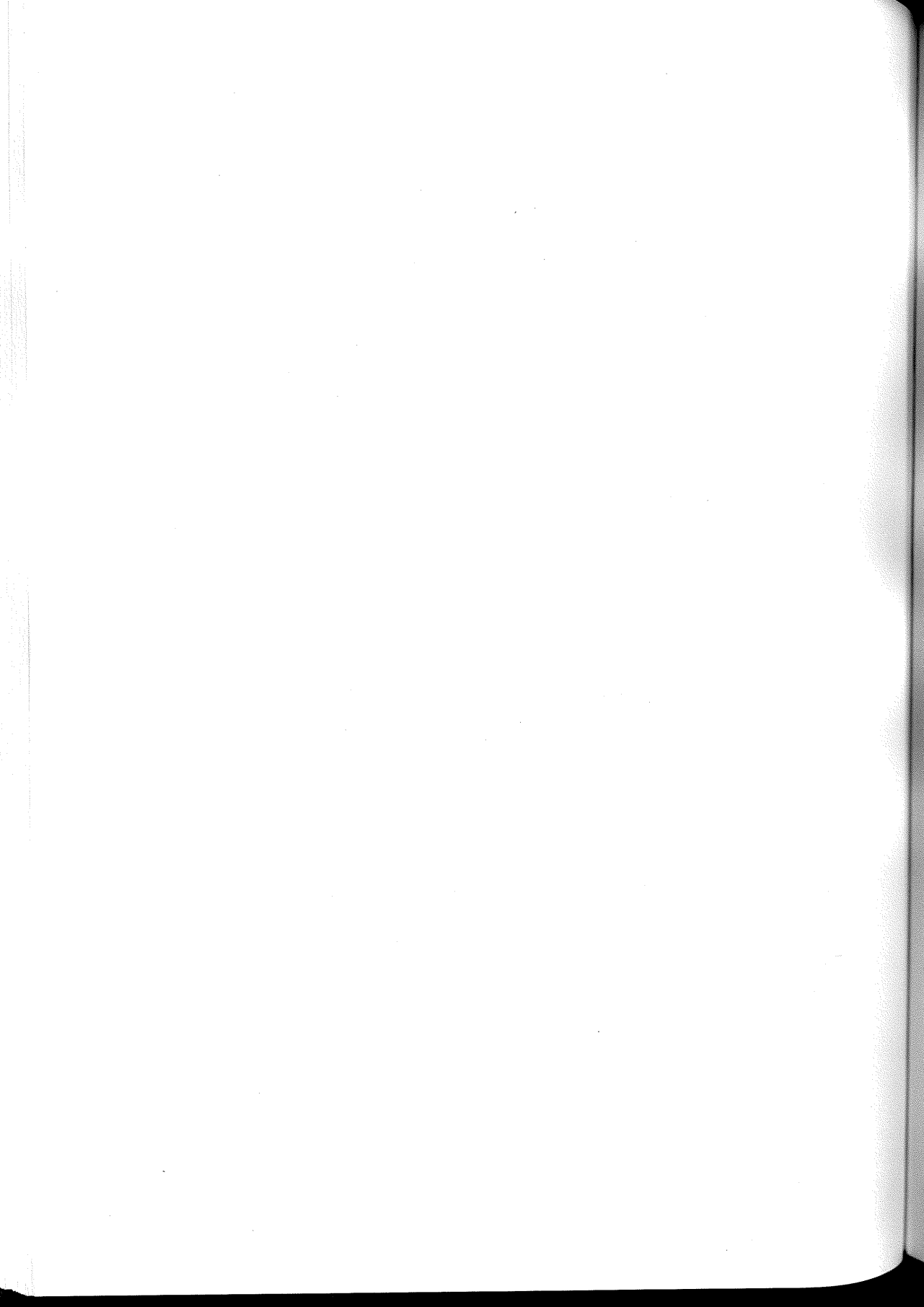
Infine, le osservazioni sperimentali sono state condotte su piante allevate con un ordinario livello di nutrizione minerale ed affatto sostenute dalle specifiche pratiche accessorie in grado di modificare il processo di accumulazione dei metalli come l'aggiunta di chelanti e la modifica del pH del suolo (Chaney, 1998). E' ragionevole ritenere che anche questi fattori avrebbero interagito positivamente sull'efficienza del processo di fitoestrazione.

Tutti questi aspetti devono essere meglio chiariti e sono per questo oggetto attualmente di ricerche presso diversi laboratori e stazioni sperimentali nel mondo. E' opinione comune che lo sviluppo di più approfondite conoscenze sulla fitoestrazione potrà fornire risultati applicativi interessanti nella messa a punto di nuove tecniche di intervento a basso impatto per il risanamento ambientale.

Bibliografia

- ABOLLINO, O., R. BARBERIS E P. BOSCHETTI. 1996. Concentrazioni di metalli pesanti in terreni non inquinati. Parte 2 - rassegna delle concentrazioni di fondo in terreni italiani. *Ingegneria Ambientale*, vol XXV, 11-12, 621-630.
-

- BAKER, A.J.M. 1981. Accumulation and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3, 643-654.
- BAKER, A.J.M., R.R. BROOKS. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- CHANEY, R.L., Y.M. LI, J.S. ANGLE, A.J.M. BAKER, R.D. REEVES, S.L. BROWN, F.A. HOMER, M. MALIK, M. CHIN. 1998. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems. Approaches and Progress. pp. In: G.S. Banuelos e N. Terry (eds.) *Chapter in Proc. Symposium on Phytoremediation, Int. Conf. Biogeochemistry of Trace Elements* (June 23-26, 1997, Berkeley, CA).
- DE LUISA, A., BELLI, D., MICHELUTTI, G., NAZZI, P., S. MENEGON. 1990. Valutazione dell'attitudine dei suoli della pianura friulana alla somministrazione di compost. *L'informatore Agrario*. 31: 14-22.
- EBBS, D. S., L.V. KOCHIAN. 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica specie: implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.*, 26: 776-778.
- ENTRY, J.A., N.C. VANCE, M.A. HAMILTON, D. ZABOWSKI, L.S. WATRUD, D.C. ADRIANO. 1996. Phytoremediation of soil contaminated with low concentrations of radionuclides. *Water, Air and Soil Pollution*, 88: 167-176.
- ERNST, W.H.O. 1972. Echophysiological studies in heavy metals plant in South Central Africa. *Kirkia* 8, 125-145.
- FARAGO, M.E., M.M. COLE. 1988. Nickel and plants. In: Siegel, H. E A. Siegel editors, *Metal Ions in Biological Systems*, Vol.23, *Nickel and its Role in Biology*. New York, Marcel Dekker, pp. 47-90.
- GABRIELLI, R., C. MATTINONI, O. VERGANO. 1991. Accumulation mechanism and heavy metal tolerance of a nickel hyper-accumulator. *Journal of Plant Nutrition* 14, 1067-1080.
- GENEVINI, P.L., F. SOMMARIVA, D. DEL FABBRO. 1995. Distribuzione dei metalli in traccia nel comprensorio della Roggia Certosa (Mi). *Acqua Aria*, 1: 91-100.
- GOLDBERG, F.L., FARINI, A., VIGANÒ P., P. BELLINI. 1975. Contaminazione di metalli in terreni e colture di alcune aziende agricole del Comprensorio della Vettabbia Alta (Milano). *L'agricoltura Italiana*, 104: 175-206.
- KUMAR, P.B.A.N., V. DUSHENKOV, H. MOTTO, I. RUSKIN. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.*, 29: 1232-38.
- KURPA, Z., T. BASZYNSKI. 1995. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus – direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 17, 177-190.
- PULFORD, I. 1995. Uptake of heavy metals from contaminated soil by trees. *Abstract Book of the Fourteenth Annual Symposium on Current Topics in Plant Biochemistry, Physiology and Molecular Biology*, University of Missouri, p. 49-50.
- RIDDLE-BLACK, D. 1995. Heavy metal uptake by Salix and Populus species from sewage sludge amended soil. *Abstract Book of the Fourteenth Annual Symposium on Current Topics in Plant Biochemistry, Physiology and Molecular Biology*, University of Missouri, p. 51-52.
- SALT, D.E., I.J. PICKERING R.C. PRINCE, D. GLEBA, S. DUSHENKOV, R.D. SMITH, I. RASKIN. 1997. Metal accumulation by aquacultured seedlings of Indian Mustard. *Environmental Science and Technology*, 3, 1636-1644.
- WILD, H. 1978. The vegetation of heavy metal and other toxic soils. In: Weger, M.J.A. editors. *Biogeography and Ecology of Southern Africa*. Junk, Hague, pp. 1301-1332.
- ZACCHEO, P., C. ASTORI, L.F. GOLDBERG. 1999. Il fitorisamento come mezzo di recupero di suoli inquinati da metalli pesanti. *Genio Rurale*. 10: 8-12.



MODELLI SPERIMENTALI DI BIOREMEDIATION: PIANTE ACQUATICHE E ANTIBIOTICI DI USO VETERINARIO

Luciana Migliore¹, Cinzia Forni¹, Salvatore Cozzolino²

¹ Università Tor Vergata - Dipartimento di Biologia, Via della Ricerca Scientifica - 00133 Roma

² Università Federico II - Orto Botanico, Via Foria 223 - 80139 Napoli

Riassunto

Per valutare la possibilità di abbattere la contaminazione da farmaci antimicrobici, sono stati messi a punto modelli di laboratorio per fitodepurazione di due classi di composti quali *sulfamidici* e *derivati dei chinolonici*, comunemente utilizzati rispettivamente in zootecnia e acquacoltura intensiva. Scopo di questo lavoro è stato determinare se le piante acquatiche *Azolla* e *Lythrum* potessero essere utilizzate come sistema di bioremediation. Sono stati utilizzati un sulfamidico: Sulfadimetossina, S (*Azolla*), e un chinolonico: Flumequina, F (*Lythrum*) per avere indicazioni sull'effetto tossico e i tassi di accumulo dei farmaci nella matrice vegetale. I risultati delle prove su queste piante confermano il rischio connesso con questo tipo di contaminazione, in relazione alla tossicità diretta verso le piante stesse; tuttavia, la resistenza ad alte concentrazioni di farmaco e la capacità di accumulo a livelli rilevabili e/o di degradazione, permette di ipotizzare per queste piante un ruolo come strumento di *bioremediation*: il loro utilizzo nella fitodepurazione dei reflui potrebbe essere un rimedio alla diffusione dei farmaci nell'ambiente.

Introduzione

La pressione ambientale delle attività zootecniche, inclusa l'acquacoltura è andata aumentando negli anni con la progressiva sostituzione degli allevamenti cosiddetti "naturali" o estensivi, con quelli intensivi. Negli allevamenti intensivi, sia a scopo profilattico sia terapeutico, vengono utilizzate elevate quantità di farmaci per preparare "mangimi medicati" che servono per il trattamento contemporaneo di malattie batteriche su un gran numero di animali. Spesso solo una piccola percentuale di farmaco è assorbita dopo somministrazione orale, e parti consistenti vengono eliminate con le feci: di conseguenza i reflui animali oltre al carico organico possono contenere farmaci in forma attiva. Per l'abbattimento del carico organico i reflui vengono lagunati per un periodo compatibile all'abbattimento dei nutrienti

(in Italia 180 giorni): passato questo tempo le acque possono essere utilizzate per la fertirrigazione o scaricate direttamente negli ecosistemi acquatici. Se le acque contengono ancora farmaci possono essere fonte di contaminazione ambientale. Per valutare la possibilità di abbattere questo poco considerato tipo di inquinanti tramite *bioremediation*, sono stati messi a punto modelli di laboratorio utilizzando due classi di composti quali *sulfamidici* e *derivati dei chinolonici*, comunemente utilizzati rispettivamente in zootecnia e acquacoltura intensiva. Entrambi i composti sono alquanto persistenti e mantengono attività e tossicità nel refluo.

Scopo di questo lavoro è stato determinare se alcune piante acquatiche possano essere utilizzate come sistema di fitodepurazione per i farmaci durante il periodo di lagunaggio: la rimozione da parte delle piante potrebbe ridurre il rischio di contaminazione dovuto allo smaltimento dei reflui lagunati. Il punto di partenza di questo lavoro è stato determinare se *Azolla* e *Lythrum* sono in grado di sopravvivere per tempi prolungati in condizioni di contaminazione e di rimuovere il farmaco dal mezzo. I farmaci utilizzati sono stati un **sulfamidico**: Sulfadimetossina, S (su *Azolla*), e un **chinolonico**: Flumequina, F (su *Lythrum*).

Materiali e Metodi

Piante di *Azolla filiculoides* Lam. e *Lythrum salicaria* L. provenienti dall'Orto Botanico di Napoli, sono state fatte crescere per cinque settimane rispettivamente in presenza di 0 – 50 – 150 – 300 – 450 mg.l⁻¹ di Sulfadimetossina, e di 0 – 50 – 100 – 500 – 1000 µg l⁻¹ di Flumequina. Alla fine del periodo di esperimento è stata valutata la biomassa (come peso totale o dimensioni/numero delle organi delle piante) e la concentrazione di farmaco accumulata. Le determinazioni chimiche sono state effettuate in HPLC secondo il metodo di Migliore *et al.*, 2001 in UV-visibile per la Sulfa-dimetossina e in Fluorimetria secondo il metodo di Migliore *et al.*, 2000 per la Flumequina.

Risultati e Discussione

Azolla filiculoides sopravvive per cinque settimane in presenza di elevate quantità di Sulfadimetossina: alla fine dell'esperimento il peso finale è significativamente più basso rispetto ai controlli a tutte le concentra-

zioni saggiate (Tab. 1). In presenza di farmaco la pianta è in grado di accumulare da 58,35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a 160,86 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 150 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, e da 992,45 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a 2012,09 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 450 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Anche *Lythrum salicaria* sopravvive per cinque settimane in presenza di elevate quantità di Flumequina: alla fine dell'esperimento la lunghezza delle radici e il numero di foglie sono significativamente modificati rispetto ai controlli a tutte le concentrazioni saggiate (Tab. 2). In presenza di farmaco la pianta è in grado di accumulare da 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, e da 0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 8,7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 450 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tabella 1. Peso fresco di piante di *Azolla* all'inizio e dopo 5 settimane di esperimento e valore del T di Student per il confronto tra controlli e trattati; le differenze significative sono in grassetto.

Peso delle piante (g)	Trattamento ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)				
	Controllo	50	150	300	450
<i>Inoculo</i>	9,01	9,01	9,01	9,01	9,01
<i>Fine esperimento</i>	24,37	7,78	7,07	7,36	7,60
<i>Confronto controllo trattato (T di Student)</i>		12.91	11.87	11.05	10.64

Tabella 2. Peso fresco di piante di *Lythrum* all'inizio e dopo 5 settimane di esperimento. Il confronto tra Controlli e Trattati è stato effettuato con Anova: con * sono indicati i gruppi significativamente differenti.

	Trattamento ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)				
	Controllo	50	100	500	1000
<i>Radice principale (mm)</i>	6,29	7,03	6,88	6,90	6,85
<i>Foglie (numero)</i>	4,59	6,87*	5,64*	5,43*	5,53*

Pertanto i risultati delle prove su queste piante dimostrano la loro capacità di crescere in presenza di elevate concentrazioni di farmaci antimicrobici, confermando il rischio connesso con questo tipo di contaminazione, in relazione alla tossicità diretta verso le piante stesse. Associata a questa resistenza ai farmaci c'è la capacità di assorbire e accumulare farmaci come Sulfadimetossina e Flumequina dal terreno di crescita. L'assunzione è dell'ordine dei ppm ed è paragonabile a quella rilevata in altre piante (Migliore *et al.*, 1995, 1996, 1997, 1998, 2000).

La resistenza ad alte concentrazioni di farmaco e la capacità di accumulo a livelli rilevabili e/o di degradazione, permette dunque di ipotizzare per queste piante un ruolo come strumento di *bioremediation*: il loro utilizzo nella fitodepurazione dei reflui potrebbe costituire una barriera per arginare la diffusione dei farmaci nell'ambiente e ridurre i rischi associati a tale tipo di contaminazione.

In conclusione, elevate quantità di farmaci antimicrobici possono essere rimossi da *Azolla* e *Lythrum* in sistemi sperimentali di fitodepurazione. Questo modello, basato sulla elevata capacità di assunzione/degradazione di queste piante costituisce un interessante punto di partenza per sistemi di decontaminazione dei reflui zootecnici. Le piante potrebbero funzionare da "filtri biologici" in cui rilevare e intrappolare i farmaci: ciò permetterebbe 1. la riduzione dei tempi di lagunaggio dei reflui e 2. il possibile riciclo dei farmaci assorbiti utilizzando le piante fitodepuratrici come "mangime medicato".

Bibliografia

- MIGLIORE L., BRAMBILLA G., COZZOLINO S., GAUDIO L., 1995. Effects on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). *Agricult. Ecosyst. Envir.*, 52: 103-110.
- MIGLIORE L., BRAMBILLA G., CASORIA P., CIVITAREALE C., COZZOLINO S., GAUDIO L., 1996. Effect of Sulphadimethoxine on barley (*Hordem distichum* L., Poaceae, Liliopsida) in laboratory terrestrial models. *Agricult. Ecosyst. Envir.*, 60: 121-128.
- MIGLIORE L., CIVITAREALE C., BRAMBILLA G., COZZOLINO S., CASORIA P., GAUDIO L., 1997. Effect of Sulphadimethoxine on cosmopolitan weeds (*Amaranthus retroflexus* L., *Plantago major* L. and *Rumex acetosella* L.). *Agricult. Ecosyst. Envir.*, 65: 163-168.
- MIGLIORE L., CIVITAREALE C., COZZOLINO S., CASORIA P., BRAMBILLA G., GAUDIO L., 1998. Laboratory models to evaluate phytotoxicity of Sulphadimethoxine on terrestrial plants. *Chemosphere*, 37: 2957-2961.
- MIGLIORE L., COZZOLINO S., FIORI M., 2000. Phytotoxicity to and uptake of Flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, *Lythrum salicaria* L. *Chemosphere*, 40: 741-750.
- MIGLIORE L., CASONE A., FIORI M., FORNI C., 2001. Sulphadimethoxine and *Azolla filiculoides* Lam.: Part II. Drug uptake and degradation, model for drug bioremediation. *Water Res.*, in press.

*STIMA DELLA TOSSICITÀ AMBIENTALE DEI RESIDUI
DI ATTIVITÀ MINERARIA (ESTRAZIONE DI PIRITE).
CONTRIBUTI CONOSCITIVI PER LE ATTIVITÀ DI
BONIFICA E BIOREMEDIATION. STUDI PRELIMINARI*

S. Nocciolini, A. Costa, E. Lorenzoni, L. Spadafina, M.R. Vacri

Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana
Dipartimento Provinciale di Grosseto. Via Fiume, n° 35 - 58100 Grosseto

Parole chiave: Pirite, test ecotossicologici, fitotossicità, Medicago, Daphnia magna.

Introduzione

Le procedure di risanamento di un sito inquinato possono essere condotte sia in maniera tradizionale, cioè mediante rimozione meccanica o copertura-sepolitura delle sostanze pericolose (capping), che attraverso quelle alternative, in cui si fa ricorso all'attività di specifici organismi (solitamente batteri o organismi vegetali), capaci di trasformare o accumulare determinate sostanze pericolose o indesiderabili (bioremediation).

Una corretta progettazione e pianificazione delle procedure di bonifica e recupero di aree inquinate parte, in ogni caso, da una approfondita analisi degli elementi e dei fattori di rischio per l'ambiente e la collettività.

In ambito della ricerca ambientale è ormai ben consolidato, e comune convincimento, della importanza che sempre più stanno assumendo i test ecotossicologici per lo studio degli effetti di determinate sostanze e lo stato di integrità delle varie matrici ambientali.

Data la peculiarità delle procedure di bioremediation, nelle quali sono gli organismi stessi i protagonisti del recupero ambientale, appare assai eloquente la rilevanza che i test tossicologici dovrebbero assumere in detti processi (Hund e Traunspurger, 1994; Keddy *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1997).

Test tossicologici realizzati su una matrice ambientale, come ad esempio il suolo, possono fornire delle chiare indicazioni sul livello di contaminazione o inquinamento dell'area in esame, consentendo di andare oltre i consueti approcci quali/quantitativi delle sostanze tossiche; ciò appare par-

ticolaramente utile in quelle condizioni in cui la natura dei contaminanti è particolarmente eterogenea, ignota, o comunque complessa. In queste circostanze i test biologici appaiono pertanto metodi di studio insostituibili per la comprensione e la stima della tossicità della matrice. I test possono rispondere efficacemente all'azione sinergica delle varie componenti tossiche coinvolte, sia che si tratti di sostanze note o meno.

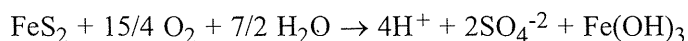
La scelta di appropriati organismi, rappresentativi dei vari comparti ambientali e livelli trofici e delle diverse sensibilità e modalità di risposta tossicologica, possono formare una valida batteria di organismi-test, capace sia di contribuire ad una completa ed esauriente comprensione della pericolosità dello scenario, che di fornire chiare indicazioni di base per la scelta degli organismi da impiegare per la bioremediation.

Nella presente relazione, vengono esposti i risultati delle ricerche, peraltro ancora in corso, condotte sui residui dell'attività estrattiva-mineraria della pirite. Queste distese di residui appaiono privi di qualsiasi accenno di ripresa di vita vegetale, nonostante che tali materiali vi giacciono ormai da molti anni.

L'indagine mira a determinare la natura e l'entità ecotossicologica di tale materiale mediante test condotti su *Daphnia magna* (organismo rappresentativo dell'ambiente acquatico) e test di germinazione sui semi di *Medicago* (organismo rappresentativo del comparto suolo). I molteplici fattori tossicologici messi in gioco e caratteristici della matrice, danno spunto ad interessanti considerazioni d'ordine metodologico ed ecotossicologico e forniscono importanti informazioni per la progettazione delle opere di bonifica.

Pirite e rischi ambientali

L'attività estrattiva della pirite, storicamente presente e fiorente nelle "Colline Metallifere" del sud della Toscana, è ormai cessata da diversi anni. In prossimità di alcuni di questi siti minerari, sono ancora presenti i tipici cumuli di materiale sterile ed ex bacini di decantazione contenenti fanghi residui della separazione della pirite dal resto della frazione minerale. La pericolosità ambientale di questa tipologia di siti produttivi è ben nota (EPA, 1995) e risiede fondamentalmente nell'elevata acidità che si determina conseguentemente ai processi ossidativi della pirite:



Da questi ambienti drenano le note acque acide, Acid Mine Drainage (AMD), il cui pH solitamente è compreso tra valori di 2 e 4; sono comunque noti casi di pH inferiori e addirittura negativi (Nordstrom *et al.*, 2000). Queste acque trattengono disciolti elevati quantitativi di metalli e in condizioni ambientali ossidative, come ad esempio nei corsi d'acqua, si possono formare tipici flocculati e precipitati di idrossido di ferro, comunemente noti come "yellow-boy" e "yellow-orange", che si depositano sul fondo caratterizzando tali ambienti (Singer e Stumm, 1970; Moses *et al.*, 1987). Alla formazione di questi prodotti di ossidazione possono concorrere anche processi microbiologici a carico di batteri autotrofi (Ingledeu, 1982; Ehrlich, 1990; Bechard *et al.*, 1993). Queste formazioni possono contenere metalli e sostanze tossiche (Rose *et al.*, 1979; Norton *et al.*, 1991; Soucek *et al.*, 2000).

Sia per le grandi quantità di materiale minerale estratto, che per i noti fenomeni di incremento di acidità, questi ambienti possono liberare e rendere mobili molteplici componenti metalliche.

La pericolosità ambientale di queste aree minerarie, e soprattutto dei suoi residui, si è mostrata nella sua ampia e totale potenzialità, in occasione dell'incidente avvenuto nel 1998 presso l'impianto minerario spagnolo di Aznalcollar (Grimalt e MacPherson, 1999).

Materiali e metodi

Scopo dell'indagine è la stima della tossicità ambientale di parte dei residui, contenuti in un ex bacino di decantazione, derivanti dalla separazione, per flottazione, della pirite dal resto del materiale minerale sterile.

Previa disidratazione a temperatura ambiente del campione, si è provveduto alla estrazione di un eluato, similmente alle procedure per il test di cessione (IRSA, 1986), mediante agitazione continua per 24 ore del campione suddetto e acqua deionizzata (Milli Q) nel rapporto 1:20 (massa/volume). Al termine si è provveduto alla separazione della frazione liquida mediante filtrazione, ottenendo così la soluzione (Sol. A) su cui condurre una serie di test ecotossicologici.

A causa delle citate caratteristiche del materiale, gli eluati ottenuti mostrano valori di pH particolarmente bassi e comunque compresi tra 2,2 e 2,5. Una acidità così marcata, può indubbiamente essere un fattore di tossicità, sia autonomamente che in maniera associata all'azione dei metalli contenuti nella matrice che essa stessa rende disponibili. In considerazione di ciò, i test sono stati condotti, oltre che sul prodotto di eluizione tal quale (Sol. A), anche sui suoi derivati ottenuti per modifica dell'acidità, mediante

aggiunta di NaOH (a volume pressoché costante), sino a valori di pH 4,4 (Sol. B) e 6,2 (Sol. C). Come prevedibile, tale operazione ha portato alla precipitazione di parte dei metalli, principalmente Ferro, Arsenico, Rame e Alluminio, che sono stati anch'essi separati mediante filtrazione. Sulle tre soluzioni risultanti sono state effettuate le analisi chimiche delle componenti metalliche mediante Spettrometria ad Emissione Atomica (ICP-AES) ad eccezione del mercurio che è stato determinato mediante Spettrometria in Assorbimento Atomico (AA), con la tecnica dei vapori freddi previa riduzione a mercurio metallico con cloruro stannoso.

Al fine di raggiungere una esaustiva visione della tossicità della matrice in osservazione, i test tossicologici sono stati condotti con un preciso disegno sperimentale che, sebbene risulti già ampio e articolato, tuttavia si svilupperà ulteriormente.

Sulle tre soluzioni sono stati eseguiti i test di germinazione su semi di erba medica (*Medicago* sp.), articolati in tre repliche di 12 semi ciascuna. L'esposizione è avvenuta per tre giorni, al buio e a 22 °C, in piastre di Petri da 90 mm contenenti carta da filtro imbevuta con 4,5 mL della soluzione test o di controllo, quest'ultima costituita da acqua deionizzata portata a pH $7 \pm 0,1$. Nel caso delle (Sol.A) e (Sol.B), come controllo di riferimento (K) si è aggiunto acqua deionizzata alle loro medesime condizioni di pH (2,4 e 4,4), in modo da discernere gli effetti dovuti dalla sola acidità, da quelli derivanti da altri fattori. Analogamente, al fine di valutare e distinguere il contributo tossicologico dei metalli dalle "altre" eventuali componenti, è stato aggiunto in ulteriori repliche delle tre soluzioni, un agente chelante (EDTA) per una concentrazione di 200 μ M. Anche in questo caso le prove sono state estese a soluzioni controllo con analoghe concentrazioni di EDTA.

Infine si è provveduto, mediante esposizione dei semi a diluizioni crescenti della (Sol.A) e trasformazione in Probit delle relative risposte biologiche (Finney,1971), alla stima della ED₅₀ (Diluizione Efficace), cioè la diluizione capace di dare un effetto tossico pari al 50% del controllo.

In tutte le prove come endpoint si è utilizzato la germinazione del seme (El-Ghazal *et al.* 1986) e l'allungamento radicale (Baudo *et al.* 1999). I due valori possono essere integrati per calcolare l'indice di germinazione percentuale (IG%) (IRSA, 1983) così definito:

$$IG\% = 100 (G_T \times L_T) / (G_C \times L_C)$$

dove con G_T e G_C sono indicati rispettivamente il numero dei semi germinati nel test e nel controllo e con L_T e L_C invece la lunghezza della radichetta nel test e nel controllo.

Analogo approccio sperimentale è stato sviluppato per i test di tossicità acuta su *Daphnia magna* a 24 ore di esposizione (OECD, 1984). In questo caso come endpoint è stato utilizzato l'immobilità del crostaceo e, sebbene non si sia determinato nel dettaglio alcun valore di ED₅₀, tuttavia, le osservazioni tossicologiche sono state allargate alle diluizioni progressive condotte su tutte e tre le soluzioni (Sol.A), (Sol.B), (Sol.C).

Risultati e discussione

Nella Tabella 1 sono riportati le concentrazioni dei metalli determinati sulle tre soluzioni oggetto di indagine ecotossicologica.

Tabella 1 - Concentrazione, espresse in mg/L, degli elementi delle soluzioni A, B, C sottoposte a test tossicologici.

Elemento	Soluzione A pH 2,4	Soluzione B pH 4,4	Soluzione C pH 6,2
Al	25,04	6,12	< 0,02
As	0,10	< 0,02	< 0,02
Ba	0,035	0,060	0,060
Cd	0,030	0,012	0,010
Co	0,77	0,68	0,63
Cr	0,050	< 0,005	< 0,005
Cu	0,550	0,380	< 0,005
Fe	642,70	286,90	223,90
Hg µg/L	*< 0,05	*< 0,05	*< 0,05
Mn	9,02	9,16	9,24
Ni	0,06	0,05	0,07
Pb	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Sb	0,010	< 0,005	< 0,005
Se	0,06	0,05	0,02
Ti	0,007	< 0,005	< 0,005
V	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Zn	1,49	1,43	1,13

*La concentrazione del mercurio è espressa come µg/L.

I dati ottenuti, mostrano la presenza degli elementi caratterizzanti la mineralogia di questi ambienti e tra i quali vale la pena segnalare il Cobalto, il Manganese e lo Zinco che persistono anche dopo l'innalzamento del pH.

Sebbene la naturale acidità della matrice svolga un ruolo preponderante, tuttavia risulta importante estendere la conoscenza delle altre componenti tossicologiche, quali ad esempio i metalli o altre eventuali sostanze coadiuvanti la separazione per flottazione della pirite dal resto del ma-

teriale sterile. La evidente fitotossicità della matrice in studio, ha orientato la scelta non tanto su un organismo-test sensibile, quanto piuttosto uno di una certa valenza ecologica, come appunto l'erba medica, pianta diffusa sul territorio, importante per la fertilizzazione naturale del suolo e con capacità di tollerare e legare alcuni metalli (Gardea-Torresdey *et al.* 1996a e 1996b). Test condotti su Medicago hanno mostrato una media sensibilità nei confronti del (Cr VI) attestando valori di EC_{50} , per l'endpoint (IG%), di 10 mg/L (Baudo *et al.*,g 1999).

Nella figura 1 e 2 sono riportati graficamente i risultati dei test tossicologici delle tre soluzioni condotti su *Medicago*. A valori inferiori dell'Indice di Germinazione (IG%) corrispondono condizioni di tossicità superiori e viceversa. Sebbene risultasse ovvia e prevedibile la completa assenza di germinazione alle condizioni di pH 2,4 della (Sol.A), tuttavia, dal diagramma di Figura 1 si può osservare come anche le soluzioni (Sol.B) e (Sol.C) mostrino una marcata tossicità, che sembrerebbe non risiedere nella sola acidità. Infatti, dalle risultanze della soluzione di controllo a pH 4,4, appare evidente il modesto contributo tossicologico (IG% circa 80%) derivante da queste concentrazioni idrogenioniche. La soluzione C, nonostante la riduzione per precipitazione di alcune componenti metalliche e le condizioni di pH (6,2), mostra ancora una elevata tossicità con valori di (IG%) di 13,1 (Figura 1 e 2).

TEST DI GERMINAZIONE "*Medicago*"

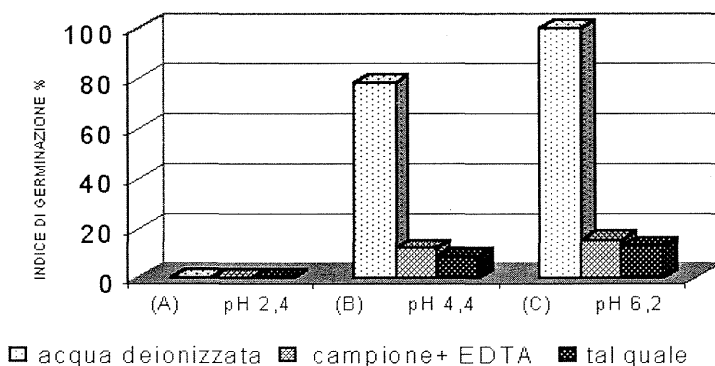


Figura n°1 – Risultati dei test condotti su *Medicago* al variare del pH e all'aggiunta dell'EDTA alla concentrazione di 200 μ M.

Anche l'aggiunta dell'agente chelante si è mostrata incapace di ridurre la tossicità del materiale in maniera evidente e significativa (Figura 1). Ciò porterebbe ad escludere, o perlomeno diminuire, il ruolo dei metalli

quali componenti tossici della matrice in esame e a porre invece attenzione su altre componenti di natura diversa, come ad esempio eventuali sostanze, coadiuvanti la flottazione (amylxantati), aggiunte durante i processi industriali di separazione della pirite. Questa ipotesi trova conferme in un'altra ricerca condotta sullo stesso materiale, in cui si ipotizza l'azione tossica del amilxantato sul grado di germinazione dei semi di varie specie (Gaggi, 1997).

L'analisi tossicologica del materiale di eluizione mostra una fitotossicità residua anche ad elevate diluizioni del materiale (Figura 2). Più dettagliatamente, i risultati hanno attestato valori di EC50 per diluizioni di circa 1:18 (Diluizione Efficace = 18), sia per IG% che per LR. Tale dato, se rapportato alla diluizione a cui è stato sottoposto sperimentalmente il campione originario, fornisce chiare e interessanti indicazioni riguardo la sua ancor più elevata fitotossicità e pericolosità ambientale.

TEST DI GERMINAZIONE "Medicago" (Indice di Germinazione e Lunghezza Radice)

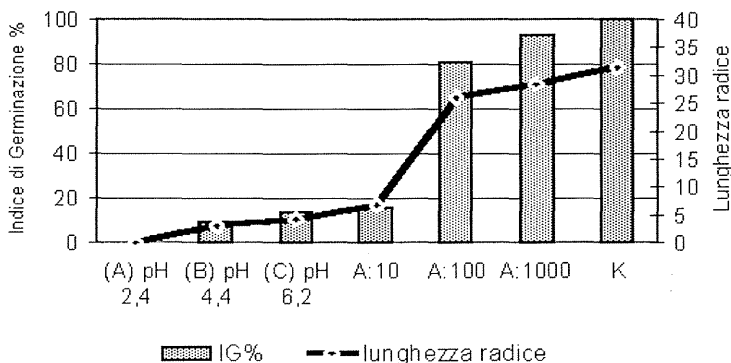


Figura n°2 - Indice di Germinazione % e lunghezza della radice.

Vale infine far presente, che una attenta analisi di distribuzione dei dati, consente di ipotizzare le modalità di azione tossicologica delle sostanze coinvolte. Nella Figura 3 vengono raffrontati i dati tra numero semi germinati e relativa lunghezza media delle radice, relativamente a tutte le già descritte prove sperimentali condotte su *Medicago*.

Come facilmente osservabile, i risultati si raggruppano in due aree distinte del grafico. Nella parte destra, delimitata dalla parte tratteggiata, sono distribuiti i dati sia del controllo che delle soluzioni più diluite di (Sol. A); questa è un'area ove la germinazione è alta e le differenziazioni sono misurabili sostanzialmente nella lunghezza della radice. A sinistra, tra la

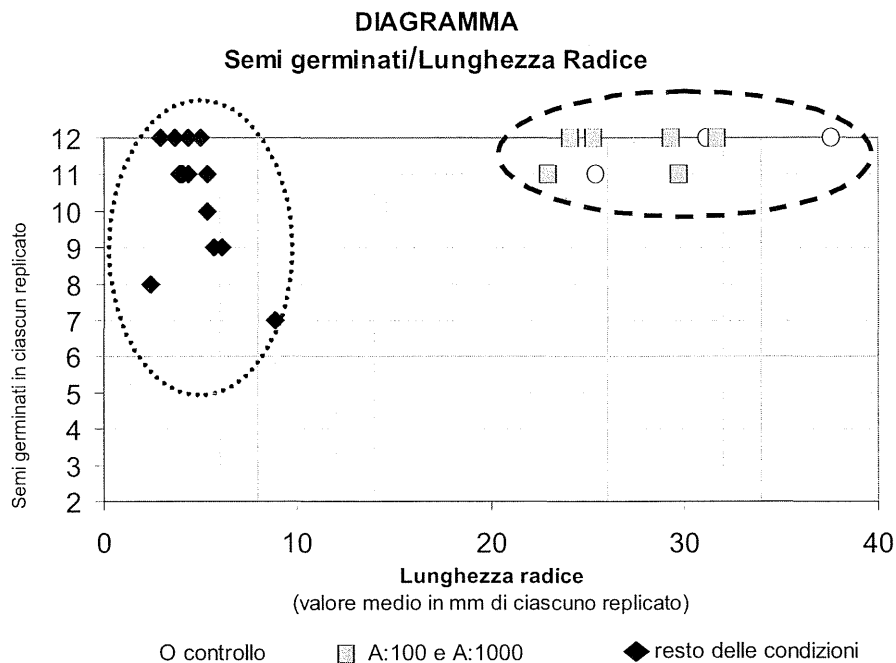


Figura n° 3 – Test di germinazione su *Medicago*. Analisi della dispersione dei dati tra numero semi germinati e lunghezza media radice. Nella raffigurazione sono assenti i dati della soluzione A tal quale, che ovviamente sarebbe localizzata all'origine degli assi.

delimitazione punteggiata, risiedono il resto delle condizioni sperimentali, soluzioni (A), (B), (C) e (A:10), trattate o meno con EDTA. In questa area sussistono le condizioni ambientali più acide e quelle di concentrazioni di sostanze tossicologicamente efficaci, che si manifestano con una generale bassa lunghezza radicale e differenziandosi tuttavia anche nel livello di germinazione. Un'analisi di questo tipo ben rappresenta le complessità da analizzare in un ambiente da bonificare, in cui le componenti pericolose sono quasi sempre varie e con modalità d'azione tossicologiche diverse e interagenti.

Le indagini della matrice sono state allargate mediante test di tossicità acuta, a 24 ore, su *Daphnia magna* (OECD, 1984). Nella Figura 4 sono esposti graficamente i risultati delle soluzioni (A), (B) e (C) alle varie diluizioni sperimentali, da cui emerge una elevata sensibilità del crostaceo al prodotto di eluizione.

Anche in questo caso la tossicità del materiale non può essere attribuita alla sola concentrazione idrogenionica, ma anche alle altre componenti dal momento che anche la soluzione C (pH 6,2), evidenzia il 100% de-

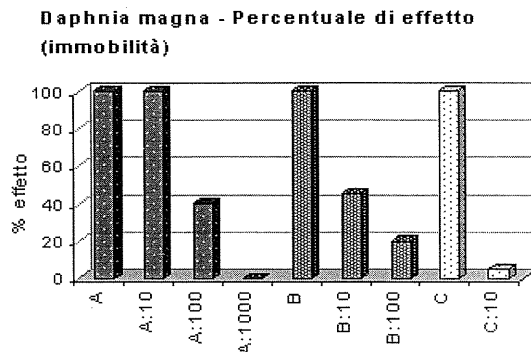


Figura n° 4 – Risultati tossicologici su *Daphnia magna*.

gli effetti sul crostaceo e la soluzione B diluita 100 volte mostra ancora effetti dell'ordine del 20%. I risultati tossicologici su *Daphnia* sottolineano chiaramente i pericoli a cui soggiacciono gli ecosistemi acquatici, direttamente o indirettamente connessi con queste aree minerarie.

Conclusioni

I fanghi residui delle attività minerario-estrattive della pirite sono materiali pericolosi per l'ambiente. Ai fattori tossicologici tipici di queste matrici, quali l'acidità e il tenore in metalli dovrebbe essere aggiunto quello derivante dagli eventuali coadiuvanti la flottazione. L'argomento necessiterebbe chiaramente un adeguato approfondimento.

Sebbene i dati siano ancora preliminari e certamente dovranno essere allargati ad altre specie di organismi, i risultati descritti concorrono alla comprensione della pericolosità della matrice esaminata e sono significativi degli ampi contributi che possono derivare dagli strumenti e procedure d'indagine impiegate. La conoscenza della pericolosità va oltre la percezione "quali-quantitativa" degli elementi e diventa consapevolezza del potenziale tossico della matrice nei confronti delle attività biologiche e pertanto parametro fondamentale per la progettazione di procedure di bioremediation.

Bibliografia

- BAUDO, R., BELTRAMI, M., BARBERO, P., ROSSI, D. 1999 – Test di germinazione e allungamento radicale. *Acqua & Aria*, febbraio 1999, 69-85.
- BECHARD, G., RAJAN, S., GOULD, W.D. 1993 - Characterization of a microbiological process for the treatment of acidic drainage, in Torma, A.E., Apel, M.I., e Brierley, C.L. eds. *Biohydrometallurgical Technologies: The Minerals, Metals and Materials Society*, 277-286.

- CHANG, L.W., MEIER, J.R., SMITH, M.K. 1997 - Application of Plant and Earthworm to Evaluate Remediation of a Lead-Contaminated Soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32 (2), 166-171.
- EHRlich, H.L., 1990 - *Geomicrobiology* (2nd). New York, Marcel Dekker, Inc., 646 p.
- EL-GHAZAL, R.A.K., RIEMER, D.N. 1986 - Germination suppression by extracts of aquatic plants. *J. Aquat. Plant Manage.*, 24, 76-79.
- EPA, 1995 - *Managing Environmental Problems at Inactive and Abandoned Metals Mine Sites*, EPA/625/R-95/007.
- FINNEY, D.J. 1971 - *Probit Analysis*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- GAGGI, C. 1997 - Fitotossicità dell'amilxantato di potassio. *S.It.E. Atti*, 18, 365-367.
- GARDEA-TORRESDEY, J.L., TIEMANN, K.J. GONZALEZ, J.H. HENNING, J.A., TOWNSEND, M.S., 1996 a - Ability of Silica-Immobilized *Medicago sativa* (Alfalfa) to Remove Copper Ions from Solution, *J. of Haz. Mat.*, 48, 181-190.
- GARDEA-TORRESDEY, J.L., TIEMANN, K.J. GONZALEZ, J.H. HENNING, J.A., TOWNSEND, M.S., 1996 b - Removal of Nickel Ions from Aqueous Solution by Biomass and Silica-Immobilized Biomass of *Medicago sativa* (Alfalfa), *J. of Haz. Mat.*, 49, 205-216.
- GRIMALT, J.O., MacPHERSON, E., eds. 1999 - The Environmental impact of mine tailing acid in Aznalcollar (South-West Spain), *Sci. Total Environ.*, 242 (1-3), 337 pp.
- HUND, K., E., TRAUNPURGER 1994 - Ecotox-evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere*, 29 (2), 371-390.
- INGLEDEW, W.J., 1982 - Thiobacillus ferrooxidans. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochimica et Biophysica Acta*, 683, 89-117.
- IRSA, 1983 - Analisi della fitotossicità della sostanza organica in decomposizione mediante biosaggio *Lepidium sativum*. In Metodi analitici per i fanghi, Parametri biochimici e biologici. *Quaderni IRSA*, 64, 8.2-8.3.
- IRSA, 1986 - Metodi analitici per i fanghi. Parametri chimici - fisici. Quaderni IRSA, Vol. 3, App. II.
- KEDDY, C.J., GREENE, J.C., BONNELL, M.A. 1995 - Review of whole-organism bioassay: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 30 (3), 221- 251.
- MOSES, C.O., NORDSTROM, D.K., HERMAN, J.S., MILLS, A.L., 1987 - Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51, 1561-1571.
- NORDSTROM, D.K., ALPERS, C.N., PTACEK, C.J., BLOWES, D.W. 2000 - Negative pH and Extremely Acidic Mine Waters from Iron Mountain, California. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 254-258.
- NORTON, G.A., RICHARDSON, R.G., MARKUSZEWSKI, R., LEVINE, A.D., 1991 - Precipitation of jarosite compounds as a method for removing impurities from acidic wastes from chemical coal cleaning: *Environmental Science and Technology*, 25, 449-455.
- OECD, 1984 - *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. *OECD Guideline for testing of chemicals*, 202.
- ROSE, A.W., HAWKES, H.E., WEBB, J.S., 1979 - *Geochemistry in Mineral Exploration*. New York, Academic Press, 657 p.
- SINGER, P.C., STUMM, W., 1970, - Acidic mine drainage; The rate-determining step. *Science*, 167, 1121-1123.
- SOUCEK, D.J., CHERRY, D.S., TRENT, G.C., 2000 - Relative acute toxicity of acid mine drainage water column and sediments to *Daphnia magna* in the Puckett's Creek Watershed, Virginia, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 38 (3), 305-310.

- CHANG, L.W., MEIER, J.R., SMITH, M.K. 1997 – Application of Plant and Earthworm to Evaluate Remediation of a Lead-Contaminated Soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32 (2), 166-171.
- EHRlich, H.L., 1990 - *Geomicrobiology* (2nd). New York, Marcel Dekker, Inc., 646 p.
- EL-GHAZAL, R.A.K., RIEMER, D.N. 1986 – Germination suppression by extracts of aquatic plants. *J. Aquat. Plant Manage.*, 24, 76-79.
- EPA, 1995 - *Managing Environmental Problems at Inactive and Abandoned Metals Mine Sites*, EPA/625/R-95/007.
- FINNEY, D.J. 1971 – *Probit Analysis*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- GAGGI, C. 1997 – Fitotossicità dell'amilxantato di potassio. *S.It.E. Atti*, 18, 365-367.
- GARDEA-TORRESDEY, J.L., TIEMANN, K.J. GONZALEZ, J.H. HENNING, J.A., TOWNSEND, M.S., 1996 a - Ability of Silica-Immobilized *Medicago sativa* (Alfalfa) to Remove Copper Ions from Solution, *J. of Haz. Mat.*, 48, 181-190.
- GARDEA-TORRESDEY, J.L., TIEMANN, K.J. GONZALEZ, J.H. HENNING, J.A., TOWNSEND, M.S., 1996 b - Removal of Nickel Ions from Aqueous Solution by Biomass and Silica-Immobilized Biomass of *Medicago sativa* (Alfalfa), *J. of Haz. Mat.*, 49, 205-216.
- GRIMALT, J.O., MacPHERSON, E., eds. 1999 – The Environmental impact of mine tailing accident in Aznalcollar (South-West Spain), *Sci. Total Environ.*, 242 (1-3), 337 pp.
- HUND, K., E., TRAUNPURGER 1994 – Ecotox-evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere*, 29 (2), 371-390.
- INGLEDEW, W.J., 1982 - *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochimica et Biophysica Acta*, 683, 89-117.
- IRSA, 1983 – Analisi della fitotossicità della sostanza organica in decomposizione mediante biosaggio *Lepidium sativum*. In Metodi analitici per i fanghi, Parametri biochimici e biologici. *Quaderni IRSA*, 64, 8.2 –8.3.
- IRSA, 1986 – Metodi analitici per i fanghi. Parametri chimici – fisici. *Quaderni IRSA*, Vol. 3, App. II.
- KEDDY, C.J., GREENE, J.C., BONNELL, M.A. 1995 – Review of whole-organism bioassay: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 30 (3), 221- 251.
- MOSES, C.O., NORDSTROM, D.K., HERMAN, J.S., MILLS, A.L., 1987 - Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51, 1561-1571.
- NORDSTROM, D.K., ALPERS, C.N., PTACEK, C.J., BLOWES, D.W. 2000 - Negative pH and Extremely Acidic Mine Waters from Iron Mountain, California. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 254-258.
- NORTON, G.A., RICHARDSON, R.G., MARKUSZEWSKI, R., LEVINE, A.D., 1991 - Precipitation of jarosite compounds as a method for removing impurities from acidic wastes from chemical coal cleaning: *Environmental Science and Technology*, 25, 449-455.
- OECD, 1984 – *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. *OECD Guideline for testing of chemicals*, 202.
- ROSE, A.W., HAWKES, H.E., WEBB, J.S., 1979 - *Geochemistry in Mineral Exploration*. New York, Academic Press, 657 p.
- SINGER, P.C., STUMM, W., 1970, - Acidic mine drainage; The rate-determining step. *Science*, 167, 1121-1123.
- SOUCEK, D.J., CHERRY, D.S., TRENT, G.C., 2000 - Relative acute toxicity of acid mine drainage water column and sediments to *Daphnia magna* in the Puckett's Creek Watershed, Virginia, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 38 (3), 305-310.

POSSIBILE RECUPERO BIOLOGICO DI UN SUOLO D'ALTURA PRECEDENTEMENTE ADIBITO A STAZZO

Letizia Pompili¹, Fabio Tittarelli¹, Flavia Pinzari¹, Anna Benedetti¹,
Silvia Baccella²

¹ Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

² Parco Scientifico e Tecnologico, L'Aquila

Riassunto

Si è voluta verificare la possibilità di effettuare un recupero biologico di aree montane circoscritte adibite allo stazionamento notturno estivo di greggi di ovini, generalmente denominati "stazzi". Gli stazzi non più utilizzati sono ricoperti da uno spesso strato di deiezioni ovine compattate dal precedente calpestio degli animali. Ciò rende il terreno asfittico, dunque favorevole ad una crescita anomala di microrganismi patogeni (es. *Clostridium* spp.) sia per l'uomo che per il bestiame da pascolo. Lo studio degli stazzi abbandonati si propone di seguirne l'evoluzione nel tempo, le potenzialità di ripristino naturale e gli eventuali interventi compatibili che possano accelerare i naturali processi di mineralizzazione del materiale organico presente in eccesso. Sugli stazzi abbandonati s'innescano dapprima processi degradativi e fenomeni d'erosione dovuti ad un'iniziale assenza di vegetazione, ed in seguito successioni di fitocenosi nitrofile che rendono l'area esteticamente molto difforme dalla copertura erbosa naturale. L'area esaminata è stata sottoposta ad un intervento di recupero delle condizioni originali del suolo consistente in: 1) fresatura delle zone adibite a stazzi per garantire la riossigenazione del terreno e creare dunque un ambiente ostile ai clostridi e favorevole alla moltiplicazione degli attinobatteri autoctoni; 2) inoculo degli ex stazzi con colture liquide di starter umificanti e sanitizzanti (attinobatteri). Lo stazzo originario è stato suddiviso in quattro settori: uno è stato lasciato alle condizioni originarie di degradazione, due sono stati inoculati con 30 litri di coltura microbica (miscela di tredici ceppi di attinobatteri), uno dei quali contemporaneamente sottoposto a fresatura ed uno no, ed infine uno è stato sottoposto esclusivamente a fresatura.

I campioni di suolo sono stati caratterizzati per mezzo dello studio delle caratteristiche qualitative e quantitative della sostanza organica: carbonio totale, labile, umificato. L'eutrofizzazione del suolo dello stazzo è apparsa ridotta rispetto ai valori trovati nella stessa area prima del trattamento con attinobatteri e fresatura, sia per quanto riguarda il carbonio organico, sia per le forme assimilabili dell'azoto. Anche il rapporto C_{org}/N è ridotto negli orizzonti più superficiali dei quattro settori, mentre è in pratica invariato il valore del rapporto C_{org}/N relativo agli orizzonti più profondi.

Parole chiave: Biorecupero, stazzi, pascoli montani, erosione del suolo, fertilità biologica.

Introduzione

Le greggi di ovini nel periodo estivo pascolano di giorno e sono raccolte in recinti durante la notte. I recinti (stazzi), che hanno una superficie di circa 250 m², sono spostati ogni anno dai pastori. Il terreno interessato dalla recinzione viene compattato dagli animali e ricoperto da uno strato uniforme di deiezioni sottoposte, a loro volta, ad un continuo calpestio. Uno stazzo abbandonato è un fazzoletto di terra non più utilizzabile come pascolo né come stazzo per l'anno successivo: le fitocenosi che crescono in un recinto abbandonato sono nitrofile e la successione che segue impiega naturalmente più di 10 anni per acquisire le caratteristiche dell'area circostante non interessata dalla recinzione (Biondi, 1999). Per alcuni anni inoltre lo stazzo abbandonato non può essere riutilizzato per lo stazionamento del bestiame poiché le condizioni di asfissia nei primi orizzonti di suolo sembrano favorire lo sviluppo di microrganismi patogeni (Pagliai e Grasselli, 1997), come alcune specie di *Clostridium*. Il suolo dello stazzo è inoltre interessato, soprattutto nei primi mesi dopo l'abbandono, da fenomeni d'erosione, dovuti ad un'iniziale assenza di vegetazione e ad una differente capacità d'assorbimento dell'acqua piovana. E' frequente, in caso di forti piogge, assistere al distacco d'ampie zolle di terreno all'interno dello stazzo e ad un successivo dilavamento del suolo così esposto.

Da queste considerazioni è nato il progetto di studiare il suolo degli stazzi abbandonati per seguirne l'evoluzione nel tempo, le potenzialità di ripristino naturale e gli eventuali interventi compatibili che possano accelerare i processi di mineralizzazione del materiale organico presente in eccesso. In questo lavoro sono confrontati un suolo di controllo, limitrofo ma non interessato dalla recinzione, il suolo di uno stazzo abbandonato e lo stesso suolo dopo un mese da un intervento di recupero. Lo scopo è di fornire una descrizione chimica e biochimica del fenomeno, cercando di proporre un metodo biologico di recupero di un suolo degradato da questo peculiare processo di "eutrofizzazione".

Area di studio

Lo studio è stato condotto in località Fonte della Vetica, Campo Imperatore, sul massiccio del Gran Sasso d'Italia in Abruzzo (Castel Del Monte- L'Aquila) su un ex stazzo utilizzato nell'estate del 1997 e poi abbandonato nel mese di Settembre, situato presso il campo sperimentale del Corpo Forestale dello Stato, ad un'altitudine di 1550 m s.l.m. ed in un'area con pendenza del 7-8%.

Il primo campionamento, effettuato nel Giugno 1998, ha interessato uno stazzo quadrato di 16 m di lato abbandonato da otto mesi, ed un'area della stessa ampiezza limitrofa e non interessata dalla recinzione. Sia nello stazzo che nell'area di controllo sono stati aperti 3 profili dai quali sono stati prelevati campioni di suolo secondo gli orizzonti osservabili in campo. Dal suolo di controllo sono state prelevate due serie di campioni alle profondità di (0-8) cm e (8-40) cm rispettivamente. Dal suolo interno allo stazzo sono state invece prelevate 3 serie di campioni, alle profondità di (0-6) cm, (6-15) cm e (15-30) cm: il primo orizzonte al momento del campionamento è apparso come uno strato di deiezioni ovine mescolato ai residui della cotica erbosa presente inizialmente nello stazzo ed ai primissimi centimetri del suolo originario.

Il trattamento è stato effettuato a Luglio del 1998: lo stazzo è stato suddiviso in quattro settori sui quali si è intervenuti in modo diverso, come di seguito descritto. Dopo 28 giorni dal trattamento si è effettuato il secondo campionamento aprendo un unico profilo per ognuno dei settori dello stazzo: è stata prelevata una serie di campioni, alle profondità rispettivamente di (0-15) cm e (15-30) cm nei settori fresati e (0-6) cm, (6-15) cm e (15-30) cm nei settori non fresati. I prelievi dei campioni di suolo sono stati effettuati secondo gli orizzonti osservabili in campo, tenendo presente che i settori fresati possiedono l'orizzonte (0-15) cm in meno, a causa del rimescolamento dei due orizzonti (0-6) cm e (6-15) cm presenti sugli altri due settori.

Le caratteristiche dell'orizzonte a profondità (6-15) cm del suolo interno allo stazzo sono apparse, da una prima osservazione in campo (relativamente a colore, consistenza, scheletro) confrontabili con quelle dell'orizzonte superficiale del suolo di controllo, allo stesso modo degli orizzonti (8-40) cm del controllo esterno e (15-30) cm dello stazzo prima e dopo il trattamento.

Materiali e metodi

Per ogni settore è stato effettuato un campionamento fino a 30 cm di profondità. Ciascun campione è stato seccato all'aria e setacciato a mano (<2 mm). Le principali caratteristiche chimico-fisiche dei suoli sono riportate nella Tabella 1. La ritenzione idrica dei terreni è stata misurata, su campioni setacciati, per mezzo dell'apparato di Richards (cella a pressione) (Richards e Fireman, 1943).

L'azoto totale è stato analizzato sui campioni vagliati con un

Nitrogen Analyzer LECO FP 228 (Bremner e Tabatabai, 1971). L'azoto assimilabile è stato misurato per estrazione in KCl 1 M (1:10) e successiva lettura degli estratti per mezzo di un analizzatore a flusso continuo (Autoanalyzer Technicon II) secondo il metodo di Wall *et al.* (1975) per NH_4^+ e di Kampshake *et al.* (1967) per NO_3^- ; i valori sono riportati come totali ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$).

Il contenuto in carbonio organico totale (C_{org}) è stato ottenuto secondo il metodo di Springer e Klee (1954), come riportato da Sequi e De Nobili (2000). Il carbonio estraibile (C_{ext}) ed il carbonio degli acidi umici e fulvici ($C_{(\text{ha}+\text{fa})}$) sono stati separati e purificati secondo Ciavatta *et al.* (1990).

Tabella 1: Principali parametri fisici e chimici dei suoli.

Campione	Orizzonte	Ritenzione Idrica -33kPa	pH	N	N assimilabile
		(1)	(2)	(3)	(4)
Controllo esterno	(0-8)cm	44	7,78	0,81	170
Stazzo	(0-6)cm	67	7,45	1,43	547
	(6-15)cm	41	7,62	0,80	501
Settore A	(0-6)cm	64	7,69	1,29	340
	(6-15)cm	49	7,65	0,94	181
Settore B	(0-15)cm	48	7,64	0,91	361
Settore C	(0-6)cm	63	7,71	1,24	318
	(6-15)cm	47	7,76	0,76	217
Settore D	(0-15)cm	44	7,77	0,67	237

(1) % di H_2O per 100 g di suolo secco in stufa a 105°C ; (2) reazione in H_2O (1:2,5); (3) % azoto totale; (4) ppm ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$).

Il carbonio della biomassa microbica (C_{mic}) è stato misurato con il metodo della fumigazione- estrazione secondo Vance *et al.* (1987), su campioni di terreno seccati all'aria e quindi condizionati attraverso un'incubazione di 10 giorni in contenitori aperti di vetro, con umidità (corrispondente alla ritenzione idrica dei campioni a -33 KPa) e temperatura (30°C) costanti. L'incubazione è stata impiegata allo scopo di riportare l'attività microbica, nei limiti sperimentali (Stotzky *et al.*, 1962), al massimo livello ipotizzabile in campo (condizioni potenziali). I valori medi di C_{mic} sono riportati in mg C/kg di suolo, riferito al peso del terreno seccato in stufa a 105°C (Anderson, 1994).

Il rapporto [$C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$] è stato utilizzato come indice della percentuale di biomassa microbica rispetto al contenuto in carbonio organico totale (Anderson e Domsch, 1989).

I valori riportati nelle tabelle sono la media dei valori ottenuti analizzando separatamente i campioni prelevati da ciascun profilo esaminato.

Tutti i risultati (Tabelle 1, 2 e 3) sono riferiti al peso del terreno seccato in stufa a 105°C per 24 ore; ogni misura analitica è stata effettuata in doppio.

Tabella 2: Parametri qualitativi e quantitativi della sostanza organica.

Campione	Orizzonte	C _{org}	C _{ext}	C _(ha+fa)	C _{ext/Corg}	C _{(ha+fa)/C_{org}}
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Controllo esterno	(0-8)cm	8,37	4,43	2,97	0,53	0,36
Stazzo	(0-6)cm	21,07	12,20	8,42	0,58	0,40
	(6-15)cm	7,90	4,90	3,13	0,62	0,40
Settore A	(0-6)cm	15,29	9,84	6,23	0,64	0,41
	(6-15)cm	9,25	6,27	4,13	0,68	0,45
Settore B	(0-15)cm	9,14	5,78	3,85	0,63	0,42
Settore C	(0-6)cm	15,22	9,34	6,09	0,61	0,40
	(6-15)cm	7,75	4,85	3,23	0,63	0,42
Settore D	(0-15)cm	7,32	4,76	2,81	0,65	0,38

(1) % Carbonio Organico Totale; (2) % Carbonio Estraiabile; (3) % Carbonio della frazione umica + fulvica; (4) rapporto di estraibilità del carbonio organico; (5) rapporto di umificazione del carbonio organico.

Tabella 3: Parametri microbiologici e biochimici.

Campione	Orizzonte	C _{mic}	C _{mic/Corg}	C _{org/N}
		(1)	(2)	(3)
Controllo esterno	(0-8)cm	867	1,06	10,46
Stazzo	(0-6)cm	6521	3,17	14,73
	(6-15)cm	628	0,74	9,87
Settore A	(0-6)cm	4468	2,92	11,84
	(6-15)cm	1104	1,19	9,83
Settore B	(0-15)cm	1031	1,13	10,06
Settore C	(0-6)cm	nd	nd	12,27
	(6-15)cm	1052	1,36	10,16
Settore D	(0-15)cm	779	1,06	10,87

(1) mg C/kg di suolo, carbonio della biomassa microbica; (2) percentuale di carbonio microbico (C_{mic}) rispetto al carbonio organico totale (C_{org}); (3) rapporto tra carbonio organico totale (C_{org}) azoto totale (N). (nd) valore non determinato.

Intervento di recupero

La zona sperimentale scelta, è stata suddivisa in 4 parcelle: il primo settore (A) è rimasto intatto e usato come controllo per seguire nel tempo l'evoluzione del suolo dello stazzo; il secondo (B) è stato fresato per rompere lo strato superficiale di deiezioni compatte ed ovviare alle condizioni di anossia sviluppatasi con il fenomeno di compattamento delle deiezioni; il terzo (C) è stato inoculato con una miscela di attinomiceti, in grado

di svolgere azione sanitizzante con la produzione di sostanze ad azione antibiotica che inibiscono le vie metaboliche di alcuni ceppi batterici appartenenti al genere *Clostridium*; il quarto (D) è stato sia inoculato che fresato.

- A. NINF, settore non inoculato e non fresato;
- B. NIF, settore non inoculato e fresato;
- C. INF, settore inoculato e non fresato;
- D. IF, settore inoculato e fresato.

L'inoculo utilizzato per l'intervento di recupero risulta composto da una miscela microbica di 14 ceppi di attinobatteri in coltura liquida su terreno TCA ed è stato preparato con le modalità di seguito riportate. Le parcelle C e D dello stazzo, sono state inoculate con 30 l di tale coltura microbica, servendosi di un irroratore agricolo per un totale all'incirca di 3 l/m³ e con una concentrazione microbica di circa 10⁸ UFC/ml. I valori delle analisi microbiologiche effettuate e riportate in Tabella 4 si riferiscono esclusivamente alla situazione dello stazzo precedentemente al trattamento, rappresentando, dunque, una fotografia della particolare situazione in cui uno stazzo maturo si trova dopo otto mesi dall'abbandono.

Tabella 4: Analisi microbiologiche effettuate sui campioni di suolo prima dell'intervento di recupero.

Campione	Orizzonte	Attinobatteri (UCF/g) (*)	Clostridi (UCF/g) (*)	Coliformi totali (UCF/g) (*)
Controllo esterno	(0-8)cm	2*10 ⁶	20	150
Stazzo	(0-6)cm	6*10 ⁶	1360	18400
	(6-15)cm	2*10 ⁶	30	180

(*) unità formanti colonie per grammo di terreno.

Isolamento e mantenimento dei ceppi di attinobatteri

I ceppi di attinobatteri utilizzati sono stati isolati da lettiera ovina matura di diversa provenienza. I campioni di lettiera sono stati essiccati all'aria per 48 ore, per favorire la selezione dei microrganismi sporigeni. Un grammo di ciascun campione è stato diluito in H₂O distillata sterile con aggiunta di Tween 20 per favorire la dispersione delle spore. La sospensione è stata quindi incubata a 45°C per 16 ore e, successivamente, aliquote della stessa sono state spatolate su terreno SCA (Sodium Caseinate Agar: Caseinato di Sodio 0,2 g/l, K₂HPO₄ 0,5 g/l, MgSO₄ 0,2 g/l, FeCl₃ 0,01 g/l, Agar 15 g/l, pH 6,5), e le piastre incubate a temperatura ambiente per 5-7 giorni. Le colonie di attinobatteri sono quindi state ripassate più volte su terreno solido al fine di ottenere dei ceppi puri. Le colture pure sono state mantenute in R2 solid medium (Hopwood *et al.*, 1985) e, come spore, in glicerolo (40%) (Hopwood *et al.*, 1985).

Preparazione dell'inoculo

Gli inoculi colturali liquidi da versare sullo stazzo, sono stati preparati utilizzando un terreno di crescita selettivo per attinobatteri, TCA, (K_2HPO_4 0,50 g/l, $FeCl_3$ 0,01 g/l, $MgSO_4$ 0,2 g/l, asparagina 2 g/l, Na caseinato 0,5 g/l) ed incubando massivamente le colture pure dei ceppi in beute da 1 l in shaker (agitazione 200 rpm) a 37°C per 24 ore. Le colture pure sono state riunite in un unico inoculo immediatamente prima del loro trasferimento sulla lettiera. La carica microbica dell'inoculo era di 10^8 ufc/ml.

Analisi microbiologiche

a) Conta dei clostridi

La determinazione della carica clostridiale è stata eseguita sottoponendo 10 grammi di campione di suolo a diluizione e successiva termizzazione (80°C per 10'). Aliquote di opportune diluizioni sono state seminate per inclusione su terreno selettivo Perfringens Agar Base SFP con aggiunta di Egg Yolk Emulsion (PAB, Manuale Oxoid 2000). Le piastre, incubate in anaerobiosi (sistema Anaerogen) a 37°C per 24 ore, sono state successivamente sottoposte a conta delle colonie.

b) Conta degli attinobatteri

Per la determinazione del numero degli attinobatteri sono stati prelevati 2 grammi di suolo per ciascun campione, e sospesi in acqua distillata sterile in rapporto 1:10 e termizzati a 45°C per 16 ore. Successivamente aliquote opportunamente diluite venivano seminate su terreno SCA e le piastre incubate a temperatura ambiente per 5 giorni ed infine sottoposte a conta.

c) Conta dei coliformi totali

Per la determinazione dei coliformi totali, 10 grammi di campione di suolo è stato sospeso in soluzione fisiologica e successivamente aliquote opportunamente diluite sono state inoculate su terreno selettivo Violet Red Bile Agar (Oxoid). Le piastre ottenute sono state sottoposte a conta delle colonie violette dopo un'incubazione di 24 ore a 37°C.

Risultati e discussione

La discussione dei risultati riguarda sia il confronto tra tutti gli orizzonti più superficiali del controllo e dello stazzo prima e dopo il trattamento d'intervento, sia l'orizzonte superficiale del controllo con quello sottostante lo strato di deiezioni dello stazzo prima del trattamento. Si deve con-

siderare inoltre che due dei quattro settori in cui è stato suddiviso lo stazzo, sono stati sottoposti a fresatura meccanica e ciò ha provocato un rimescolamento dei due orizzonti così ben distinguibili nello stazzo maturo. Dal punto di vista delle analisi chimico- biologiche ciò ha portato ad una serie di risultati interessanti nel confronto con gli altri valori trovati.

Reazione in pH e ritenzione idrica

Dopo aver subito uno spostamento verso valori di pH (H_2O) subalcalini (7,45) imputabile alla produzione di acidi organici liberati dalla degradazione delle sostanze organiche, rispetto al controllo esterno (7,78), la reazione del suolo si riassetta su valori di pH maggiori già evidenti nel settore A lasciato come controllo (7,69), ma ancor di più nel settore inoculato con attinobatteri e fresato D (7,77) (Tabella 1).

La capacità di ritenzione idrica di un terreno dipende dalla qualità e quantità della sostanza organica presente: l'orizzonte superficiale interno allo stazzo presenta valori maggiori di ritenzione idrica (Tabella 1) rispetto all'orizzonte sottostante, il quale è invece confrontabile con l'orizzonte del terreno di controllo. Ciò è in accordo con i contenuti in carbonio organico (Tabella 2), molto più elevati nell'orizzonte superficiale interno allo stazzo e confrontabili nell'orizzonte inferiore ed in quello superficiale esterno allo stazzo. Il medesimo andamento si ritrova nei settori non fresati dello stazzo dopo l'intervento di recupero. Al contrario i valori di ritenzione idrica dei settori fresati, e soprattutto quello del settore contemporaneamente inoculato, appaiono confrontabili con quello del controllo esterno allo stazzo.

Contenuto in azoto

La stabilità di un ecosistema naturale ed il tipo di biocenosi in esso presente, dipendono dal rapporto C_{org}/N che varia in funzione della velocità di "turnover" dell'azoto e del carbonio nel suolo. Nell'orizzonte superficiale all'interno dello stazzo, il valore del rapporto C_{org}/N è maggiore che nel controllo (valore medio 14,73), a causa dell'apporto di materiale celulosico con le deiezioni ovine e dei residui radicali della cortica erbosa successivamente inglobata nel nuovo orizzonte organico. Il contenuto totale di azoto è comunque anch'esso più elevato nell'orizzonte superficiale dello stazzo (valore medio 1,44) rispetto al controllo (valore medio 0,81). La concentrazione di azoto dello strato di deiezioni nello stazzo dopo l'intervento di recupero, subisce una lieve riduzione nei settori non sottoposti a fresatura, A e C, (Tabella 1), con corrispondente aumento nell'orizzonte sottostante. Molto evidente, invece la diminuzione della concentrazione di azoto nei settori fresati B e D (0,91 e 0,67 rispettivamente). Notevolmente ridotte le forme assimilabili dell'azoto in tutta l'area dello stazzo, indipendentemente

dall'intervento effettuato. Nell'orizzonte superficiale del suolo dello stazzo dopo il trattamento, il valore del rapporto $C_{org}N$ è praticamente identico al valore relativo al controllo esterno, ad eccezione che i due settori non fresati che pure mostrano una riduzione del valore che comunque rientra nel range di suoli adibiti a pascolo.

Sostanza organica

Il carbonio organico totale (C_{org}) è maggiore nell'orizzonte superficiale del suolo dello stazzo (Tabella 2) mentre si osserva nell'orizzonte più profondo un contenuto di carbonio totale confrontabile con quanto evidenziato dall'orizzonte superficiale del suolo di controllo e con gli orizzonti superficiali dei settori fresati dello stazzo dopo il trattamento e quelli profondi dei settori non fresati. Stesso andamento è stato osservato per le altre forme di carbonio esaminate (C_{ext} e $C_{(ha+fa)}$; Tabella 2), ad eccezione del settore A di controllo i cui valori delle diverse forme del carbonio mostrano una traslocazione del C_{ext} verso l'orizzonte (6-15) cm. Il suolo dello stazzo è stato perciò interessato da un'apposizione di materiale organico localizzata nei primi (0-6) cm di profondità, la quale ha subito delle modificazioni (ad esempio la sostanza organica umificata rispetto al contenuto totale ha subito un incremento a causa dei normali processi di umificazione nel tempo). L'estraibilità della sostanza organica, espressa come rapporto fra il carbonio estratto e il carbonio totale (Tabella 2), differisce fra gli orizzonti di diversa profondità (maggiore estraibilità del carbonio organico degli orizzonti più profondi) e tale dato si ritrova anche nei quattro settori dopo il trattamento; non sono invece emerse differenze fra lo stazzo ed il controllo, nonostante il materiale organico nell'orizzonte superficiale dello stazzo abbia caratteristiche chimiche peculiari e naturalmente differenti dalla sostanza organica del suolo naturale. Praticamente inalterata resta la frazione di sostanza organica umificata rispetto al totale in tre dei quattro settori trattati, mentre risulta confrontabile il valore relativo al settore D (0,38) rispetto al controllo esterno.

Biomassa microbica

Il carbonio della biomassa microbica è maggiore nell'orizzonte superficiale del suolo dello stazzo rispetto al suolo di controllo (Tabella 3). I valori di C_{mic} del terreno di controllo sono comunque elevati (valori medi: 866 mg C/kg suolo per l'orizzonte superficiale) ed in accordo con quanto riportato in letteratura (Powlson, 1994) per i suoli adibiti a pascolo. Nel suolo dello stazzo si osservano valori medi di C_{mic} di 6521 mg C/kg suolo e 628 mg C/kg suolo per gli orizzonti superficiale e profondo rispettivamente. La differenza quantitativa in biomassa microbica fra l'orizzonte (0-6) cm e l'orizzonte (6-15) cm è di un fattore 10. Si osserva cioè un rapido crollo della

presenza di microrganismi subito sotto lo strato compatto di deiezioni ovine. La situazione del suolo sottoposto al trattamento mostra una forte riduzione della biomassa microbica già nel settore A lasciato come controllo e ancor di più nei settori inoculati o fresati, fino ad arrivare ad un valore, relativo al settore D inoculato e fresato, del tutto confrontabile con la situazione del controllo esterno allo stazzo. Nel caso invece dei valori del rapporto C_{mic}/C_{org} che rappresenta la biomassa microbica come percentuale del carbonio organico totale e che quindi restituisce una indicazione del grado di utilizzo del substrato da parte della comunità, gli orizzonti superficiali del suolo interno allo stazzo e del controllo presentano differenze significative (3,17 % nello stazzo e 1,06% nel controllo); anche in questo caso i valori del suolo dopo trattamento sono ripristinati alla situazione originaria del controllo fuori stazzo, specialmente nel settore D. Dai valori di C_{mic}/C_{org} il suolo ricco in deiezioni ovine sembra ospitare una comunità microbica adeguata al substrato presente, ma l'intervento di recupero fa apparire ridotta tale biomassa, considerando l'areaazione del suolo che ha creato condizioni di intollerabilità per i clostridi sviluppatasi e l'inoculo di attinobatteri in grado di produrre antibiotici specifici che agiscono sul metabolismo dei clostridi e permettono il lento restaurarsi delle originarie biocenosi del suolo dello stazzo.

Conclusioni e prospettive

Il confronto delle caratteristiche chimiche e biochimiche del suolo di uno stazzo abbandonato da un mese, con il suolo di controllo, ha permesso di evidenziare il tipo di modifiche cui è incorso il primo a causa dell'apposizione delle deiezioni ovine durante tutto il tempo di utilizzo dello stazzo, ed a causa del compattamento causato dal calpestio operato dal bestiame stesso. Allo stesso modo ha permesso di osservare le variazioni subite dallo stesso suolo dopo essere stato sottoposto al trattamento di recupero biologico. Dallo studio del contenuto in sostanza organica è emerso che le deiezioni ovine si accumulano nei primi (0-6) cm del suolo dello stazzo, mescolandosi con i resti radicali della cotica erbosa presente in origine (e presente nel suolo di controllo) a formare un orizzonte ricco in carbonio organico ed in azoto ma caratterizzato, nel complesso, da un C_{org}/N più alto dell'orizzonte organico del suolo di controllo. La situazione osservata dopo l'intervento rispecchia in parte la medesima situazione, specialmente nei settori non fresati, mentre mostra un ripristino delle condizioni già osservate nel suolo di controllo, nei settori fresati.

Lo studio delle caratteristiche dell'orizzonte sottostante nello

stazzo ha reso evidente l'assenza di migrazioni significative di sostanza organica dall'orizzonte sovrastante ed un crollo netto della biomassa microbica rispetto allo stesso. La situazione si ripete nel settore A di controllo dello stazzo dopo il trattamento, mentre c'è una situazione intermedia nel settore B fresato; anche per questo parametro la situazione del settore D è quella che permette un ripristino delle condizioni del suolo di controllo. Lo strato compatto di deiezioni nello stazzo non comporta un arricchimento in carbonio organico degli strati più profondi ma rilascia azoto assimilabile che è presente in concentrazioni maggiori lungo tutto il profilo, rispetto al suolo di controllo.

Ovviamente è necessario verificare la capacità dell'inoculo effettuato di agire nei confronti della biomassa responsabile dell'eutrofizzazione senza però alterare in modo permanente le caratteristiche delle comunità microbiche native del suolo con copertura a pascolo. Il presente studio si pone dunque come un'analisi preliminare per un successivo studio di sostenibilità degli interventi sopra citati e si propone un'ulteriore serie di analisi microbiologiche atte a confermare l'efficienza dell'intervento di recupero effettuato.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare il Dr. P. Imperiale del Parco Scientifico e Tecnologico d'Abruzzo, per l'aiuto operativo nelle fasi di trattamento dello stazzo, l'Azienda Foreste Demaniali dello Stato di Castel del Monte (AQ) per aver messo a disposizione lo stazzo sperimentale ed il Dr. A. Biondi dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma per l'aiuto nelle fasi di campionamento ed analisi dell'area di studio.

Riferimenti bibliografici

- ANDERSON T.H. (1994) Physiological analysis of microbial communities in soil: application and limitations. In: *Beyond the Biomass*. British Society of Soil Science (BSSS). Wiley-Sayce (Ritz, Dighton, Giller Eds) pp.67-76.
- ANDERSON T.H., DOMSCH K.H. (1989) Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soil. *Soil Biol. Biochem.* 21: 471-479.
- BIONDI E. (a cura di) (1999) Ricerche di geobotanica ed ecologia vegetale di Campo Imperatore. Collana del Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga "Le Orme". Vol.1- *Braun-Blanquetia* 16: 21-32.
- BREMNER J.M., TABATABAI M.A. (1971) Use of automated combustion techniques for total carbon, total nitrogen, and total sulfur analysis of soils. In: *Instrumental methods for analysis of soils and plant tissue*. SSSA, Madison, WI (Walsh Ed.) pp. 1-15.
- CIAVATTA C., GOVI M., VITTORI ANTISARI L., SEQUI P. (1990) Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *J. of Chromatog.* 509: 141-146.
- HOPWOOD D.A., BIBB M.J., CHATER K.F., KIESER T., BRUTON C.J., KIESER H.M., LYDIATE D.J., SMITH C.P.,

- WARD J.M., SCHREMPF H. (1985) *Genetic manipulation of Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Nortwich.
- KAMPSHAK L.J., S.A. HANNAH, J.M. COMEN, (1967) Automated analysis for nitrate by hidrazine reduction. *Water Resourc. Res.* 1: 205-216.
- PAGLIAI M., GRASSELLI O. (1997) Valutazione del compattamento di suoli sottoposti a pascolo attraverso indagini micromorfologiche. In: Morselli L. (a cura di) *Rapporto 1997 del Progetto di Monitoraggio Ambientale della Tenuta Presidenziale di Castelporziano*. Univ. Studi di Bologna/Ministero dell'Ambiente. ENEA (Unità Comunicazione e Informazione) Ed.
- PINZARI F., POMPILI L., TITTARELLI F., BACCELLA S., BENEDETTI A. (2000) Caratterizzazione chimica e microbiologica del suolo di uno stazzo per lo stazionamento degli ovini (Gran Sasso - AQ). In: *Atti del 10° Congresso Nazionale Società Italiana di Ecologia: Il ruolo degli Ecologi nella realtà ambientale del 2000*. Dip. Di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente. Univ. Studi di Pisa Ed.
- POWLSON D.S. (1994) The soil microbial biomass: before, beyond and back. In: *Beyond the Biomass*. British Society of Soil Science (BSSS). Wiley-Sayce (Ritz, Dighton, Giller Eds) pp. 3-20.
- RICHARDS L.A., M. FIREMAN (1943) Pressure plate apparatus for measuring moisture sorption and transmission by soils. *Soil Sci.* 56: 395-404.
- SEQUI P., DE NOBILI M. (2000) Cap.VII - Carbonio Organico. In: P. Violante (Ed.) *Metodi di analisi chimica del suolo*, Collana diretta da P. Sequi Osservatorio Nazionale Pedologico, Ministero delle Politiche Agricole. Franco Angeli Ed.
- STOTZKY G., GOOS R.D., TIMONIN M.I. (1962) Microbial changes occurring in soil as a result of storage. *Plant and Soil*, 16: 1-18.
- VANCE E.D., BROOKES P.C., JENKINSON D.S. (1987) An extraction method for measuring microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703-707.
- WALL L.L., C.W. GEHRKE, J.E. NEUNER, R.D. LATHEY, P.R. REXNORD, (1975) Cereal protein nitrogen: evaluation and comparison of four different methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58: 811-817.

- WARD J.M., SCHREMPF H. (1985) *Genetic manipulation of Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Nortwich.
- KAMPSHAKE L.J., S.A. HANNAH, J.M. COMEN. (1967) Automated analysis for nitrate by hidrazine reduction. *Water Resour. Res.* 1: 205-216.
- PAGLIAI M., GRASSELLI O. (1997) Valutazione del compattamento di suoli sottoposti a pascolo attraverso indagini micromorfologiche. In: Morselli L. (a cura di) *Rapporto 1997 del Progetto di Monitoraggio Ambientale della Tenuta Presidenziale di Castelporziano*. Univ. Studi di Bologna/Ministero dell'Ambiente. ENEA (Unità Comunicazione e Informazione) Ed.
- PINZARI F., POMPILI L., TITTARELLI F., BACCELLA S., BENEDETTI A. (2000) Caratterizzazione chimica e microbiologica del suolo di uno stazzo per lo stazionamento degli ovini (Gran Sasso - AQ). In: *Atti del 10° Congresso Nazionale Società Italiana di Ecologia: Il ruolo degli Ecologi nella realtà ambientale del 2000*. Dip. Di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente. Univ. Studi di Pisa Ed.
- POWLSON D.S. (1994) The soil microbial biomass: before, beyond and back. In: *Beyond the Biomass*. British Society of Soil Science (BSSS). Wiley-Sayce (Ritz, Dighton, Giller Eds) pp. 3-20.
- RICHARDS L.A., M. FIREMAN (1943) Pressure plate apparatus for measuring moisture sorption and transmission by soils. *Soil Sci.* 56: 395-404.
- SEQUI P., DE NOBILI M. (2000) Cap. VII - Carbonio Organico. In: P. Violante (Ed.) *Metodi di analisi chimica del suolo*, Collana diretta da P. Sequi Osservatorio Nazionale Pedologico, Ministero delle Politiche Agricole. Franco Angeli Ed.
- STOTZKY G., GOOS R.D., TIMONIN M.I. (1962) Microbial changes occurring in soil as a result of storage. *Plant and Soil*, 16: 1-18.
- VANCE E.D., BROOKES P.C., JENKINSON D.S. (1987) An extraction method for measuring microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703-707.
- WALL L.L., C.W. GEHRKE, J.E. NEUNER, R.D. LATHEY, P.R. REXNORD. (1975) Cereal protein nitrogen: evaluation and comparison of four different methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58: 811-817.

FITOSTRAZIONE MEDIANTE BRASSICA NAPUS (COLZA): CAPACITÀ' DI ASSORBIMENTO NEI CONFRONTI DI CADMIO E ZINCO

Gabriella Rossi, Adele Figliolia, Silvia Socciarelli

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Riassunto

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare le capacità di fitoaccumulo di *B. napus* nei confronti di cadmio e zinco. La prova è stata allestita in vaso, in ambiente controllato, su un suolo inquinato tramite aggiunta di compost arricchito con cadmio e zinco in dose rispettivamente di 100 e 600 mg kg⁻¹ di suolo. I metalli sono stati aggiunti sia singolarmente che combinati tra loro. Dai risultati conseguiti è emerso che la *B. napus* ha una buona capacità di fitoestrazione dei metalli considerati. La quota asportata dalla parte epigea varia da 38 µg/pianta a 206 µg/pianta nel caso dello zinco e da 0,3 µg/pianta a 41 µg/pianta nel caso del cadmio, in funzione della tesi considerata.

Introduzione

Recentemente ha assunto sempre maggiore interesse la possibilità di utilizzare tecniche di fitodecontaminazione come metodo di controllo del livello dei metalli pesanti in terreni a diversa destinazione d'uso. Tra queste, la fitoestrazione rappresenta una notevole opportunità anche dal punto di vista economico sia per le ampie dimensioni ambientali dei problemi associati ai suoli ad elevato contenuto in metalli pesanti, sia per i vantaggi offerti dalle moderne tecnologie basate sull'uso delle piante. Detti metalli possono giungere al suolo anche attraverso l'uso agricolo di biomasse di rifiuto caratterizzate da un elevato contenuto di sostanza organica ed elementi nutritivi, la cui utilizzazione costituisce una pratica irrinunciabile nell'ottica della realizzazione di una agricoltura sostenibile. Da precedenti ricerche è emerso come l'utilizzazione in agricoltura di diverse tipologie di biomasse di rifiuto e di scarto (fanghi di depurazione, compost da RSU, reflui zootecnici, etc.) a scopi fertilizzanti possa causare, nel medio periodo, un aumento della concentrazione di metalli pesanti nel suolo e/o una redistribuzione degli equilibri chimici di tali elementi verso le forme maggiormente assimilabili dalle colture, con rischio di impatto ambientale in caso di somministra-

zioni prolungate nel tempo (Chaney, 1974; Figliolia *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 2000). L'ampliamento delle conoscenze circa la possibilità di utilizzare tecniche di fitodecontaminazione per contenere o ridurre la concentrazione dei metalli pesanti nei suoli agricoli può costituire un interessante obiettivo da perseguire per una gestione sempre più integrata delle risorse ambientali nel rispetto dell'ecosistema (Chaney *et al.*, 1997). Vengono comunemente definite "iperaccumulatrici" piante in grado di assimilare e traslocare detti metalli nei loro tessuti in un intervallo di concentrazione compreso tra 1000-10000 mg/kg; tra queste la *Thlaspi caerulescens*, appartenente alla famiglia delle Brassicacee, è conosciuta per la sua capacità di iperaccumulare cadmio e zinco (Brooks, 1998). Tali specie però presentano in genere scarsa produzione di biomassa vegetale, lenti cicli vegetativi e difficile reperibilità. Per questi motivi, l'attenzione della ricerca nel campo della fitodecontaminazione si sta spostando verso l'individuazione di piante di interesse agrario che presentino caratteristiche di tolleranza ed accumulo nei confronti di diversi metalli pesanti ed elevata produzione di biomassa vegetale. In tal senso dall'esame della letteratura emerge che le specie maggiormente studiate appartengono al genere delle Brassicacee (Ebbs e Kochian, 1997).

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare le capacità di accumulo, traslocazione e asportazione di cadmio e zinco nei diversi tessuti vegetali in piante di *Brassica napus* (colza) allo stadio vegetativo della levata.

Materiali e metodi

La prova è stata allestita in vaso, in ambiente controllato, presso il campo sperimentale Celimontano dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma. La caratterizzazione chimico-fisica del suolo utilizzato per l'esperienza è stata eseguita secondo i *Metodi di analisi chimica del suolo* (2000) ed i *Metodi di analisi fisica del suolo* (2000). L'inquinamento del terreno è stato effettuato tramite somministrazione di compost da RSU arricchito con cadmio e/o zinco in dosi rispettivamente di 100 e 600 mg per chilo di suolo. Sono state considerate cinque tesi: suolo non trattato (T); suolo + compost (T+C); suolo + compost arricchito in cadmio (Cd 100); suolo + compost arricchito in zinco (Zn 600); suolo + compost arricchito contemporaneamente con Cd e Zn nelle stesse dosi di cui sopra (Cd+Zn). Ogni tesi è stata ripetuta in triplo seguendo uno schema a randomizzazione completa. Dopo un mese dalla somministrazione del compost al suolo, è stata effettuata la semina della *Brassica napus* L. cv. Sponsor, i cui semi sono

stati cortesemente forniti dalla ditta F.lli Moretti, Signa (FI). Durante le normali pratiche irrigue sono stati utilizzati gli stessi volumi di adacquamento per tutte le tesi, evitando il percolamento dei vasi. A cinque settimane dalla semina, in corrispondenza dello stadio vegetativo della levata, sono state prelevate le piante, separandole in radici, fusti e foglie. Le diverse parti vegetali sono state successivamente seccate a 60°C e macinate. Le concentrazioni del cadmio e dello zinco nei vegetali sono state determinate a seguito di mineralizzazione in acido nitrico e lettura degli estratti mediante spettrometria al plasma (I.C.P.). I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il test delle minime differenze significative con un livello di probabilità pari al 95% ($p \leq 0,05$).

Risultati e discussione

Il terreno utilizzato per l'esperienza è caratterizzato da tessitura franco-sabbiosa, pH subalcalino, capacità di scambio cationico media ed un buon contenuto in sostanza organica (tabella n.1).

Le differenze nelle concentrazioni di cadmio (tabella n.2) e zinco (tabella n.3), riscontrate in ciascuna delle porzioni vegetali analizzate, sono risultate significative tra tutte le tesi. Nel controllo (T), la maggiore concentrazione di cadmio è stata rilevata nelle radici di *B. napus* (84%), circa l'11% nei fusti ed il 5% nelle foglie (tabella n.2). Nel caso dello zinco, il 48% è stato accumulato nelle radici e la rimanente parte distribuita in modo pressoché uguale tra fusti e foglie (tabella n.3).

Le piante allevate in presenza di compost non arricchito (T+C), hanno accumulato quantità totali di cadmio e zinco inferiori rispetto al testimone (T). Il cadmio, però, trasloca in modo evidente dalle radici verso le foglie nelle quali si accumula circa il 37% del metallo (figura n.1). Il comportamento dello zinco resta invece invariato con una tendenza alla diminuzione delle concentrazioni nei fusti e ad un aumento nelle foglie, sempre rispetto al testimone (figura n.2).

Tabella n.1. Principali caratteristiche fisico-chimiche del suolo (valori riferiti a peso secco a 105°C).

Parametro	Valore	Unità di misura
sabbia	638	g kg ⁻¹
limo	332	g kg ⁻¹
argilla	30	g kg ⁻¹
Tessitura (USDA)	FS	
pH (1:2,5 in H ₂ O)	7,53	unità di pH
C tot.	28,2	g kg ⁻¹
Sost. Org.	48,5	g kg ⁻¹
P ass. mg kg ⁻¹	72,0	mg kg ⁻¹
N tot.	0,98	g kg ⁻¹
C.S.C.	18,4	meq 100g ⁻¹
Cd tot.	4,04	mg kg ⁻¹
Cd DTPA	0,27	mg kg ⁻¹
Zn tot.	201,2	mg kg ⁻¹
Zn DTPA	37,24	mg kg ⁻¹

Tabella n.2. Contenuto in cadmio nelle diverse sezioni vegetali ($\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ s.s.).

Tesi	Radici	Fusti	Foglie
T	4,90 b	0,65 b	0,28 a
T+C	2,28 a	0,20 a	1,44 b
Cd 100	87,47 d	26,26 d	74,92 c
Cd+Zn	66,35 c	22,34 c	90,33 d
errore std.	0,175	0,086	0,111

Tabella n.3. Contenuto in zinco nelle diverse sezioni vegetali ($\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ s.s.).

Tesi	Radici	Fusti	Foglie
T	106,47 b	58,55 b	56,08 b
T+C	76,75 a	37,82 a	47,00 a
Zn 600	260,01 d	285,50 d	299,28 c
Cd+Zn	239,80 c	140,40 c	303,07 d
errore std.	0,467	0,277	0,266

La capacità di *B. napus* di accumulare cadmio e zinco e traslocarli verso i fusti e le foglie si manifesta in modo evidente in tutte le tesi trattate con compost arricchito con i due metalli pesanti (Cd 100; Zn 600; Cd+Zn).

Considerando la dinamica dei metalli singolarmente, la tesi inquinata con solo cadmio (Cd 100) presenta le maggiori quantità dell'elemento nelle radici e nelle foglie (tabella n. 2 e figura n. 1), tuttavia è da notare che circa il 54% del cadmio assorbito dalla pianta si accumula nelle parte aerea (fusto+foglie). Nel caso dello zinco (Zn 600) tale percentuale sale al 69%, presentando una distribuzione quasi uniforme tra le diverse parti della pianta, con una tendenza all'aumento delle concentrazioni passando dalle radici, ai fusti, alle foglie (tabella n. 3 e figura n. 2).

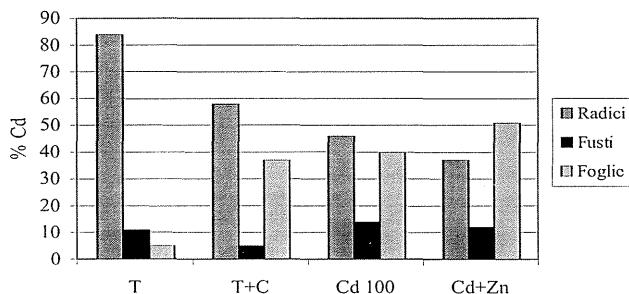


Figura n.1
Distribuzione percentuale del contenuto in cadmio nei tessuti vegetali della *B. napus*.

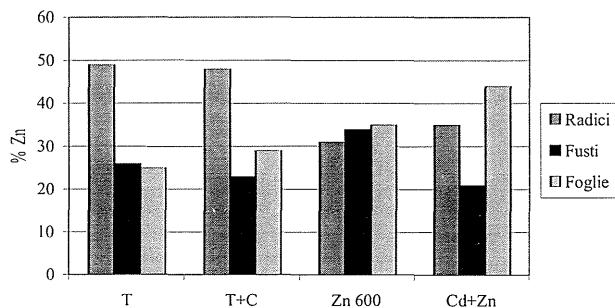


Figura n. 2
Distribuzione percentuale del contenuto in zinco nei tessuti vegetali della *B. napus*.

La tesi trattata con cadmio e zinco simultaneamente (Cd+Zn), mostra, rispetto a quelle inquinate con un singolo metallo (Cd 100 e Zn 600), differenze significative sia nelle concentrazioni sia nelle ripartizioni dei metalli nelle diverse sezioni vegetali. In particolare si osserva, per entrambi i

metalli, una diminuzione della quantità totale assorbita dalla pianta, lasciando supporre fenomeni di antagonismo reciproco (Salt *et al.*, 1995); inoltre detta tesi presenta un prevalente accumulo di cadmio nelle foglie rispetto alle radici ed un decremento delle concentrazioni di zinco nelle radici e soprattutto nei fusti.

La sola determinazione delle concentrazioni dei metalli pesanti non è sufficiente per valutare l'idoneità di una specie vegetale a fitoestrarre i metalli pesanti dal suolo, perché non tiene conto della biomassa vegetale prodotta e quindi delle quantità di ogni singolo metallo asportate dalla pianta e, in particolare di quelle traslocate nella parte aerea. Dall'analisi della tabella n. 4 si evidenzia che dopo cinque settimane di crescita, la *B. napus* ha asportato nella parte aerea una quantità di cadmio pari a 0,3 µg/pianta nel suolo testimone (T). In presenza di compost non arricchito (T+C), tale asportazione raggiunge gli 0,6 µg/pianta (78% circa sul totale asportato). In presenza di compost arricchito col singolo metallo (Cd 100) tale quota arriva a circa 41 µg/pianta a fronte di una asportazione dell'intera pianta pari a 45 µg/pianta.

Tabella n.4 Valori delle asportazioni in Cd (µg/pianta s.s.).

Tesi	Radici	Fusti	Foglie
T	0,343 a	0,174 a	0,109 a
T+C	0,171 a	0,147 a	0,478 a
Cd 100	4,421 c	7,826 c	32,963 c
Cd + Zn	2,396 b	4,535 b	26,558 b
errore std.	0,088	0,119	0,721

Tabella n.5 Valori delle asportazioni in Zn (µg/pianta s.s.).

Tesi	Radici	Fusti	Foglie
T	7,453 b	15,691 b	22,265 b
T+C	5,756 a	8,585 a	15,555 a
Zn 600	16,755 d	77,370 d	128,692 d
Cd + Zn	8,659 c	28,501 c	89,102 c
errore std.	0,301	1,012	2,185

Per quanto riguarda lo zinco (tabella n. 5), sia in T che in T+C le maggiori asportazioni sono a carico di fusti più foglie di *B. napus* (80% circa sul totale asportato). In presenza di arricchimento (Zn 600) la quantità asportata è stata pari a circa 223 µg/pianta di cui 206 µg/pianta nella parte epigea (93% sul totale asportato).

Nella tesi in cui erano contemporaneamente presenti i due metalli (Cd+Zn) le asportazioni sono risultate globalmente inferiori rispetto alle tesi Cd 100 e Zn 600, e pari a circa 33 µg/pianta per il cadmio e ad 126 µg/pianta per lo zinco, confermando l'esistenza di fenomeni di inibizione reciproca. E' comunque da rilevare, come anche in questo caso, circa il 90% del cadmio e dello zinco asportati si accumulano preferenzialmente nella porzione aerea della *B. napus*.

Conclusioni

Da quanto emerso nel presente studio si può concludere che la *B. napus* ha una buona capacità di fitoaccumulo nei confronti del cadmio e dello

zinco, già dopo cinque settimane di crescita. Si è evidenziato, inoltre, l'effetto positivo della somministrazione di compost nel promuovere la traslocazione di detti metalli, in particolare del cadmio, verso la parte aerea della pianta.

La parte epigea della *B. napus* risulta essere quella che asporta le quote maggiori di Cd e Zn rispetto a quella ipogea. Tale tendenza appare confermata sia nei confronti dei metalli considerati singolarmente, sia, seppur in minore quantità, nella tesi in cui essi sono presenti contemporaneamente.

Queste risultati, unitamente alla elevata produzione di biomassa vegetale, alle note tecniche colturali, alla facilità di raccolta ed all'utilizzazione industriale non alimentare (es. produzione di olii industriali), aumentano l'interesse verso l'uso di *B. napus* in tecniche di fitodecontaminazione dei suoli. Un possibile approfondimento dell'indagine sarà quello di confrontare gli effetti di diverse tipologie biomasse di rifiuto o più in generale, di fertilizzanti, sulla frazione assimilabile dei metalli pesanti nel suolo e, conseguentemente, sulla asportazione di questi da parte della *B. napus*. Infatti l'ottimizzazione delle tecniche di fitodecontaminazione può richiedere l'adozione di pratiche agricole idonee ad aumentare la biodisponibilità dei metalli pesanti nel suolo e quindi il loro assorbimento da parte della pianta.

Ringraziamenti

Si ringraziano la dott.ssa Rita Aromolo, il dott. Bruno Pennelli ed il sig. Renato Maturilli per la preziosa collaborazione.

Bibliografia

- BROOKS R.R. 1998. Phytochemistry of Hyperaccumulators. In: *Plants that Hyperaccumulate Heavy metals. Their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining*. R.R. Brooks eds CAB International UK, pp. 42-45.
- CHANEY R. L. 1974 Recommendations for management of potentially toxic elements in agricultural and municipal wastes. In: *Factors involved in land application of agricultural and municipal wastes*. Agric. Res. Serv., U. S. Dept. Agr., Betsville, MD, pp. 97.
- CHANEY R. L., MALIK M., LI Y.M., BROWN S.L., ANGLE J.S., BAKER A.J. M.. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinions in Biotechnology*, 8: 279-284.
- EBBS S. D., KOCHIAN L. V. 1997. Toxicity of Zinc and Copper to Brassica species: implications for Phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26:776-781.
- FIGLIOLIA A., MANGIONE D., IZZA C., LEITA L., BRAGATO G., DE NOBILI M. 1995. Effect of sewage sludge on heavy metals accumulation in soil and wheat (*Triticum aestivum* L.) In: *Contaminated Soils: Third International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*. Paris, May 15-19, (Ed. Prost R.). Colloque n° 85. INRA Editions.
- Metodi di analisi chimica del suolo. 2000 Violante P. coord., Franco Angeli eds.
- Metodi di analisi fisica del suolo. 2000 Pagliai M. coord., Franco Angeli eds.
- ROSSI G., SOCCIARELLI S., FIGLIOLIA A., 2000. Different sewage sludge forms fertilisation: effects on heavy metal distribution in medium-term amended soil. *Third International Symposium of Soil mineral-organic matter-microorganism interactions and ecosystem health (ISMOM)*. Napoli, 22-26 Maggio.
- SALT D.E., M. BLAYLOCK, P.B.A. NANDA-KUMAR, V. DUSHENKOV, B.D. ENSLEY, I. CHET, I. RASKIN 1995. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic elements from the environment using plants. *Bio-technology*: 13:468-475.

DETOSSIFICAZIONE DI SUOLI INQUINATI DA IDROCARBURI: UN CASO STUDIO

Flavia Saccomandi, Liliana Gianfreda

Dipartimento di Scienze Chimico-Agrarie, Università degli Studi di Napoli "Federico II"
Via Università, 100 - 80055 Portici

Introduzione

Il risanamento di aree pesantemente contaminate è diventata la sfida moderna per tutte le comunità scientifiche. In quest'ambito la Comunità Europea ha finanziato un progetto di ricerca dal titolo: "*Improving in situ biodegradation at light NAPLs contaminated sites: Removing constraints with extensive measures*" che mira all'individuazione del metodo di bonifica più adatto per la decontaminazione da NAPL di un'area industriale dismessa.

I NAPLs (*Non Aqueous Phase Liquids* = liquidi in fase non acquosa) contengono principalmente n-alcani, BTEX (benzene, toluene, etilbenzene e xilene), PAH (policiclici aromatici) e fenoli che, a contatto con acqua o aria, si presentano come una fase separata ed immiscibile. Questi composti idrofobici, tossici sia per la salute degli uomini che per gli animali e le piante, rappresentano una fonte di inquinamento permanente, essendo essi poco o nulla biodisponibili (Birman and Alexander, 1996). Per la rimozione dei NAPLs sono state sviluppate diverse tecnologie, la cui applicabilità dipende sia dalle caratteristiche sito-specifiche ed idrogeologiche del sito, ma anche dalla natura e dalla distribuzione dei contaminanti (Newell *et al.*, 1995). Tra le tecniche più promettenti, ma non ancora completamente sviluppate, vi è la degradazione mediante agenti biologici.

La biodegradazione è un processo in cui microrganismi quali batteri, funghi e attinomiceti trasformano molecole tossiche in prodotti meno tossici per ottenere energia e nutrimento. La biodegradazione dei NAPL può avvenire, in opportune condizioni, sia nel suolo che nelle acque di falda, riducendo così l'entità della contaminazione (Efroymson and Alexander, 1994; Yerushalmi and Guiot, 1998).

La trasformazione dei NAPL ad opera di microrganismi sia aerobi che anaerobi può condurre alla completa mineralizzazione degli inquinanti. In altri casi si può avere la formazione di intermedi che possono essere più o meno tossici del composto di partenza. Ad esempio, il catecolo prodotto nella trasformazione di svariati inquinanti aromatici è intermedio co-

mune a molte vie metaboliche (Cerniglia, 1992). Esso, se non ulteriormente trasformato può essere secreto dalla cellula microbica nell'ambiente esterno e risultare tossico per la sopravvivenza di altre specie microbiche.

Nel presente lavoro si riportano i risultati di uno studio volto a valutare le potenzialità di sistemi biologici per il recupero di un sito fortemente inquinato da NAPL. Scopo principale del lavoro è stato quello di verificare la presenza di flora microbica autoctona ancora attiva e la sua capacità di adattamento a condizioni di stress.

Materiali e metodi

Il sito oggetto di studio, è situato nelle vicinanze della cittadina di Altenburg in Turingia, ex Germania Orientale, ad una altitudine di 180 m. Il sito inquinato ha un'estensione di 0.4 Km². La ricerca è stata focalizzata su un'area di minor estensione (0.0125 Km²), ma ben rappresentativa della distribuzione e della concentrazione degli inquinanti.

Campioni di suoli sono stati prelevati ad una profondità compresa tra i 7 e 9 m mediante una ram-drilling, chiusi in sacchetti idonei, conservati al buio e al fresco. Il trasporto dei campioni dal sito al laboratorio è avvenuto in contenitori a 4 °C.

Il conteggio vitale dei microrganismi è stato effettuato sui vari campioni su terreno solido. Aliquote di sospensione suolo opportunamente diluite sono state seminate su terreni selettivi per funghi batteri e attinomiceti.

Il titolo della sospensione originale è stato calcolato, tenendo presente il numero di colonie cresciute e la diluizione usata.

Per i microrganismi aerobici, 1 g di suolo è stato diluito in serie di 10 in tampone fosfato a pH 7, un'aliquota della sospensione pari a 0.050 ml è stata seminata, in opportune condizioni di sterilità su piastre Petri agarizzate con terreni selettivi per i diversi organismi. Funghi: malt extract (20 g/L), agar (20 g/L) e rifamicina (15 mg/L); Batteri: nutrient broth (13 g/L), agar (20 g/L); Attinomiceti: soluzione di Waksman (glucosio 10 g/L, NaCl 5 g/L, peptone 5 g/L, estratto di carne 3 g/L), agar (20 g/L), miscela antibiotica (nistadina 50 mg/L, polimixina 5 mg/L, anfotericina B 4 mg/L).

Per i microrganismi aerobi facoltativi, 1 g di suolo è stato diluito in serie di 10 in tampone fosfato pH 7; 1 ml di ogni sospensione è stato pipettato sulle piastre Petri sul quale sono stati aggiunti 20 ml di terreno selettivo alla temperatura di 47°C circa. Le piastre sono state moderatamente agitate per consentire una distribuzione omogenea dei microrganismi.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplo. La crescita di microrganismi in condizione di stress è stata valutata incubando in beuta 10 g di suolo in un sistema bifasico, contenente 100 ml di mineral salt media generico e 50 ml di una miscela organica composta da decano, dodecano, tredecano e esadecano al 25% in volume addizionati di 20 µg di naftalene per 24 h a 25 °C. La misura delle cellule vitali è stata determinata per grammo di suolo secco. I risultati sono stati espressi in CFU (Colony Forming Units).

Risultati e discussione

Il sito studiato ha avuto una lunga storia di inquinamento. Infatti, per più di trecento anni, è stato oggetto di diverse fonti di contaminazione, derivanti dalla miniera di carbone del 1675, fino alle più recenti raffinerie del 1930. Durante la Seconda Guerra mondiale, in seguito a pesanti bombardamenti gli impianti sono stati quasi totalmente distrutti, con il conseguente sversamento di circa 100.000 tonnellate di combustibile nelle aree circostanti. Poiché nessun intervento specifico di bonifica è stato intrapreso, il sito a tutt'oggi presenta un forte inquinamento da NAPL.

Studi chimico fisici hanno dimostrato una distribuzione dei contaminanti su tutto il sito e lungo tutto il profilo fino a raggiungere l'acquifero e di conseguenza la falda (tra i 5 e i 9 m dalla superficie). A tale profondità, inoltre, è stato riscontrato il più alto livello di contaminazione da idrocarburi, compreso tra i 3200 e i 9100 mg/kg, mentre per i BTEX e i fenoli il grado di contaminazione è risultato di minore entità (Tabella 1.). Tutto ciò ha portato a concentrare le indagini di tipo biologico su campioni di suolo nella zona acquifera, ad una profondità compresa tra i 7 e 9 m.

Il primo scopo del lavoro è stato quello di verificare la presenza di microrganismi ancora attivi, capaci di esprimersi in condizioni ottimali di crescita. Le indagini sono state condotte sui 13 campioni di suolo prelevati e distribuiti entro un'area circoscritta del sito ed ad una profondità variabile tra i 7 e 9 m. I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di flora microbica ancora attiva con una variabilità compresa fra 10^2 e 10^6 CFU/g (Figura 1). In

Tabella 1. Contenuto di inquinanti nei campioni analizzati.

Campioni	Oli Minerali mg/kg	BTEX mg/kg	Fenoli mg/kg
emc/1	4200	8937	138.5
emc/3	4300	0	1146.9
emc/4	91	0	219.1
emc/6	442	n.a.	0.087
emc/7	1183	n.a.	117.9
emc/11	4900	25.6	247.4
emc/17	n.d.	0.9	n.d.
emc/23	3200	9305	294.3
emc/24	n.d.	n.d.	n.d.

particolare, è stata verificata una predominanza di specie batteriche e una variabilità sia nel numero che nelle specie rispetto alle popolazioni di funghi e di attinomiceti (Tabella 2.). Tali risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura (Alexander, 1994). Infatti, è stato ampiamente dimostrato che specie microbiche sono capaci di sopravvivere, sebbene allo stato di quiescenza, anche in condizioni fortemente sfavorevoli alla loro sopravvivenza. Le suddette specie, quando messe in opportune condizioni di crescita, riescono ad esprimersi in forma vitale.

Tabella 2. Morfologia delle colonie espresse dai campioni analizzati.

Colonie	Morfologia	Campioni
SB ₁	Giallo pallido, bordo sfrangiato	emc/1; emc/6
SB ₂	Giallo pallido, bordo liscio	emc/1
SB ₃	Grigia radialmente striata	emc/1
SB ₄	Grigia dentata	emc/1
SB ₅	Gialla dentata, radialmente striata	emc/1
SB ₆	Gialla ondulata, radialmente striata	emc/1; emc/17
SB ₇	Trasparente radialmente striata	emc/3
SB ₈	Bianca radialmente striata, bordo liscio	emc/3
SB ₉	Gialla dentata, superficie papillare	emc/6
SB ₁₀	Gialla, bordo liscio	emc/6
SB ₁₁	Gialla dentate	emc/6
SB ₁₂	Arancione, bordo liscio	emc/17
SB ₁₃	Bianca ondulata	emc/17
SB ₁₄	Bianca, bordo liscio	emc/17
SB ₁₅	Grigia, bordo liscio	emc/24
SF ₁	Marrone	emc/17
SF ₂	Bianca	emc/23
SA ₁	Trasparente radialmente striata, bordo lombato	emc/17
SA ₂	Giallo pallido, dentate, ondulata	emc/17
SA ₃	Giallo pallido, bordo liscio	emc/17
SA ₄	Giallo pallido radialmente striata, bordo lombato	emc/23

SB = Soil Bacterium; SF = Soil Fungus; SA = Soil Actinomycetes

Successivamente si è valutata la potenzialità e capacità delle suddette specie microbiche ad esprimersi in presenza di substrati simili a quelli presenti nel sito inquinato, ma in condizioni meno stressate, e, quindi, in presenza degli opportuni fattori nutritivi. A tale scopo sono state condotte indagini utilizzando come fonti di carbonio alcuni inquinanti modello, scelti fra quelli più abbondanti nel sito inquinato. In particolare è stata utilizzata una miscela di 4 idrocarburi alifatici (decano, dodecano, tetradecano, esadecano) in uguali proporzioni (25:25:25:25 v:v) contenente naftalene, come composto rappresentativo dei policiclici aromatici.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una crescita selettiva dei

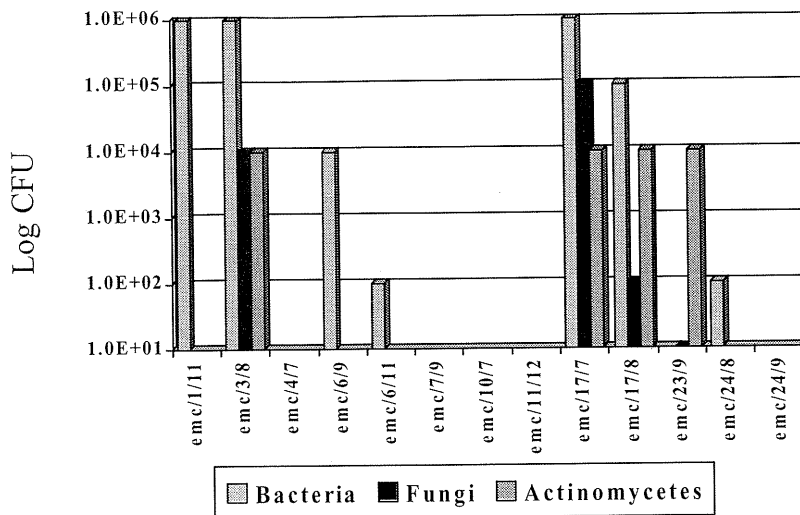
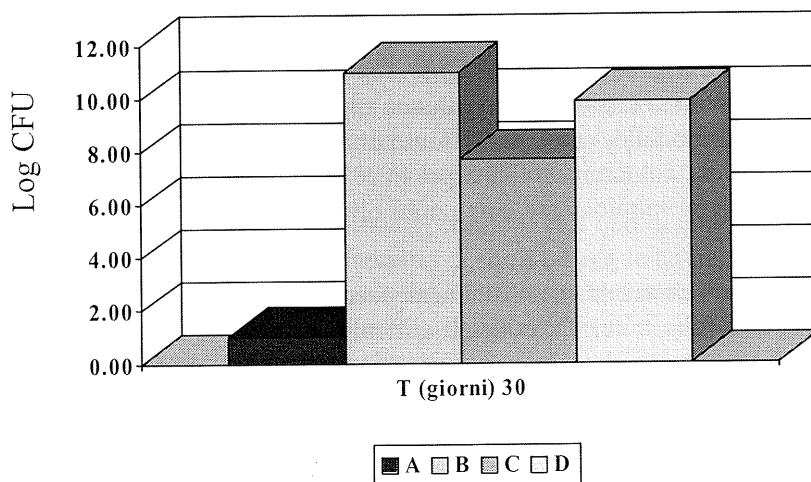


Figura 1. Crescita differenziata dei microrganismi nei campioni analizzati



Sistema A : Suolo+ MSM
 Sistema B : Suolo + MSM + NAPL
 Sistema C : Suolo + MSM + Naftalene
 Siatema D : Suolo + MSM + NAPL +

Figura 2 Crescita di microflora autoctona in presenza di inquinanti

microrganismi dipendente dalla fonte di carbonio utilizzata. La crescita di microrganismi, misurata nelle suddette condizioni sperimentali indica sia la presenza nel sito di una microflora autoctona ma anche la sua capacità di svilupparsi a spese di fonti di carbonio costituite dagli inquinanti presenti nel suolo. (Figura 2).

Una possibile tecnica microbiologica per il ripristino di un sito inquinato è quella di intervenire con inoculi eventualmente sito-specifici, per aumentare le potenzialità della flora microbica autoctona. A tale scopo, si stanno conducendo indagini per la preparazione di un opportuno inoculo, da utilizzare come agente detossificante in situ.

Risultati preliminari in condizioni di laboratori hanno mostrato la capacità di crescita di solo poche colonie ma con elevata capacità degradativi. Questi primi risultati dello studio sembrano promettenti e ci permetteranno di valutare la capacità di degradazione delle singole specie e dei consorzi in presenza di inquinanti.

Conclusioni

I risultati ottenuti nel presente lavoro hanno evidenziato, in condizioni di laboratorio, una buona e diversificata crescita microbica a partire da campioni provenienti da un suolo fortemente inquinato da NAPL.

Inoltre, è stata anche valutata una crescita specifica in sistemi con inquinanti modello, come unica fonte di carbonio, ciò induce a ritenere che la microflora autoctona studiata possiede una grande potenzialità di detossificare sistemi inquinati, se condizioni ottimali di crescita le consentono di esprimersi.

I risultati sebbene inizialmente incoraggianti sembrano tuttavia ancora poco attuabili, in quanto, notevoli difficoltà ancora esistono per trasferire in situ tutti i parametri che consentono di ottimizzare la crescita in laboratorio.

Bibliografia

- ALEXANDER M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*, Academic Press, San Diego, pp 139.
- BIRMAN, I.; ALEXANDER, M., *Appl. Microb. Biotech.* 1996, 45: 267-272
- CERNIGLIA, C.E. 1992 *Biodegradation* 3: 351-368.
- EFROYMSON, R.A.; ALEXANDER, M. 1994 *Environ. Toxic. Chem.* 13: 405-411.
- NEWELL, C.J.; ACREE, S.D.; ROSS, R.R.; HULING, S.G., 1995 *EPA Grand Water Issue*, 1-28.
- YERUSHALMI, L.; GUIOT, S.R. 1998 *Appl. Microb. Biotech.* 49: 475-481.
-

LA LACCASI: UN POSSIBILE AGENTE DISINQUINANTE?

Filomena Sannino, Liliana Gianfreda

Dipartimento di Scienze Chimico-Agrarie, Università degli Studi di Napoli "Federico II"
Via Università 100, 80055 Portici (NA)

Introduzione

Il crescente impiego di prodotti chimici in agricoltura per il controllo di erbe infestanti, insetti e malattie delle piante, nonché l'immissione volontaria o accidentale di composti organici di sintesi nell'ambiente, hanno causato un diffuso inquinamento del suolo, con riflessi fortemente negativi sulla produzione agricola, a causa dell'accumulo di sostanze ad alto potenziale tossico. Risulta quindi, di importanza fondamentale, lo sviluppo di metodologie efficaci, a basso costo e facilmente attuabili per la rimozione e/o l'abbattimento di inquinanti presenti nei sistemi naturali contaminati (Klibanov *et al.*, 1980).

Tra le diverse strategie di intervento, la "Bioremediation", che si basa sull'utilizzazione di agenti biologici quali microrganismi ed enzimi può rappresentare un'alternativa efficace e di semplice attuabilità per la rimozione di sostanze tossiche dall'ambiente. Molteplici fattori ambientali possono limitare l'efficacia di tale metodologia, e solo l'ottimizzazione di tali fattori può consentire la completa trasformazione dell'inquinante in prodotti di natura più semplice e completamente non tossici.

Numerosi studi sono stati condotti sull'uso di enzimi ossido-riduttivi nei processi di disinquinamento di suoli ed acque contaminate da sostanze di natura fenolica (Filazzola *et al.*, 1999; Gianfreda *et al.*, 1999). La trasformazione di tali sostanze, mediata dall'uso di enzimi ossido-riduttivi, porta alla formazione di sostanze complesse di natura polimerica, facilmente rimovibili dai sistemi acquosi, o di sostanze legate alle componenti umiche del suolo. Essa, quindi, può rappresentare un utile mezzo di detossificazione ambientale.

Scopo del presente lavoro è stato determinare le potenzialità di una laccasi isolata da *Cerrena unicolor* nella rimozione di molecole inquinanti di natura fenolica, caratterizzate da diversa provenienza. In particolare, oggetto di studio sono stati un sistema acquoso-, rappresentato dalle acque reflue, provenienti dalla produzione dell'olio di oliva (OMWW), ricche di sostanze di natura fenolica, che, per il loro potenziale inquinante, rappre-

sentano uno dei principali problemi di smaltimento per tutti i paesi del Mediterraneo-, e un sistema terrestre-, quale un suolo inquinato da erbicidi. Poichè le prove sono state condotte in vitro, sono stati utilizzati "sistemi modello" semplificati che potessero simulare i due sistemi naturali. Per il sistema acquoso, è stata adoperata una miscela equimolecolare di quattro fenoli (catecolo, metilcatecolo, tirosolo e idrossitirosolo) normalmente presenti in concentrazioni elevate nelle OMWW (Capasso *et al.*, 1995; 1997).

Per il sistema suolo, sono state invece utilizzate alcune componenti colloidali del suolo, matrici inorganiche ed organiche di tipo sintetico, rese via via più complesse per la contemporanea presenza di montmorillonite, acidi umici e specie idrolitiche dell'alluminio, ed è stata valutata la capacità della laccasi di trasformare il 2,4-diclorofenolo (2,4-DCP), un derivato diretto dell'erbicida acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), prodotto per rimozione del gruppo acetile e frequentemente presente nel suolo, in presenza dei suddetti colloidali.

Materiali e Metodi

E' stata utilizzata una laccasi isolata e purificata dal ceppo fungino *Cerrena unicolor* (Gianfreda *et al.*; 1998). L'attività enzimatica è stata determinata mediante saggio colorimetrico, utilizzando un substrato sintetico, l'acido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-solfonico) (ABTS), che, dopo ossidazione genera un radicale catione (ABTS⁺) in grado di assorbire alla lunghezza d'onda di 420 nm. Le condizioni standard sono state: ABTS 3 mM, tampone Glicina-HCl 100 mM pH 3.5 e temperatura 25°C (Gianfreda *et al.*, 1998).

Nelle prove con il sistema acquoso, i substrati fenolici oggetto di studio sono stati: catecolo (C), metilcatecolo (M), tirosolo (T) e idrossitirosolo (I) (Figura 1).

Le prove sono state condotte sui quattro composti fenolici da soli o in miscela (binaria, ternaria, quaternaria), ad una concentrazione totale finale di 0.27 mM (corrispondente ad una concentrazione di 0.0675 mM per ciascuna molecola) in un volume di 2.5ml in tampone citrato-fosfato 100 mM pH 6.0, contenente 0.1 Unità ml⁻¹ di laccasi, e incubati per 20 min a 25°C. Dopo incubazione, sia dai campioni che dai controlli, sono state prelevate aliquote per misurare le attività enzimatiche residue. Altre aliquote, dopo centrifugazione, sono state analizzate all'HPLC per determinare la concentrazione dei fenoli. Le molecole fenoliche sono state analizzate all'HPLC in fase inversa, utilizzando uno strumento Varian Mat provvisto di detector

UV 280 nm, una colonna Spheri-5 ODS (5 μm , 4.6x220 mm) e una precolumna Spheri-5 Rp300 (7 mm, 4.6x30mm). L'eluizione isocratica è stata eseguita ad un flusso di 1 ml⁻¹ e con una fase mobile composta da acqua e acetonitrile (80:20, v:v).

Nelle prove con il sistema suolo è stato utilizzato come substrato il 2,4-diclorofenolo (2,4-DCP) (Fig. 1). I colloidi del suolo scelti sono stati: due acidi umici (HA1) e (HA2) provenienti rispettivamente da lignite e da carbone ossidato, (Piccolo, 1993) e due complessi organo-minerali (OH-Al-umato-montmorillonite) (C1) e (C2), preparati per aggiunta di una montmorillonite di Crook (Wyoming, USA) (100 mg), di una soluzione di AlCl₃ (0.3 mmoli), e di un acido umico (5 mg), HA1 e HA2, rispettivamente per C1 e C2 (Violante *et al.*, 1999).

I complessi organo-minerali così ottenuti, sono stati dializzati fino a completa eliminazione dei cloruri, congelati e liofilizzati.

Nelle prove di trasformazione enzimatica del 2,4-DCP in presenza di colloidi, miscele contenenti 50 mg di complessi organo-minerali, 2.5 mg di HA1 o di HA2, e 0.27 mM di 2,4-DCP sono state incubate con 0.1 U ml⁻¹ di laccasi in 2.5 ml di tampone citrato-fosfato pH 6.0 per 24 h a 25°C. Dopo centrifugazione a 10000 g per 30 min, i surnatanti sono stati analizzati per determinare il 2,4-DCP residuo, mediante analisi HPLC, e l'attività laccasica residua, utilizzando le condizioni standard precedentemente descritte.

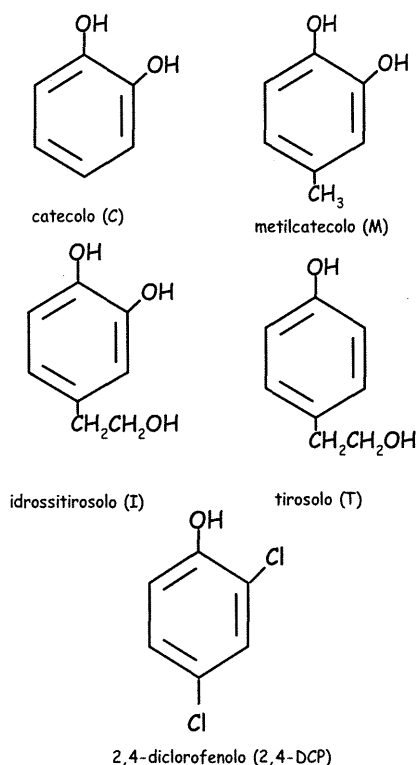


Figura 1. Struttura dei substrati fenolici.

Risultati e Discussione

Sistema acquoso

I risultati ottenuti hanno mostrato che l'enzima possiede in generale buone capacità ossidative verso i quattro substrati fenolici, con parti-

colare riguardo verso il catecolo, con il quale è stato registrato una rimozione pari al 42%. Il processo di trasformazione è risultato influenzato non solo dalla stereochimica dei substrati (posizione e natura dei sostituenti), ma anche dalla copresenza nella miscela di reazione degli altri substrati fenolici. Nelle miscele binarie, la trasformazione dell'idrossi tirosolo è raddoppiata sia in presenza del metilcatecolo che del tirosolo, mentre con il catecolo è stato registrato un aumento nella rimozione di 2.4 volte (Figura 2).

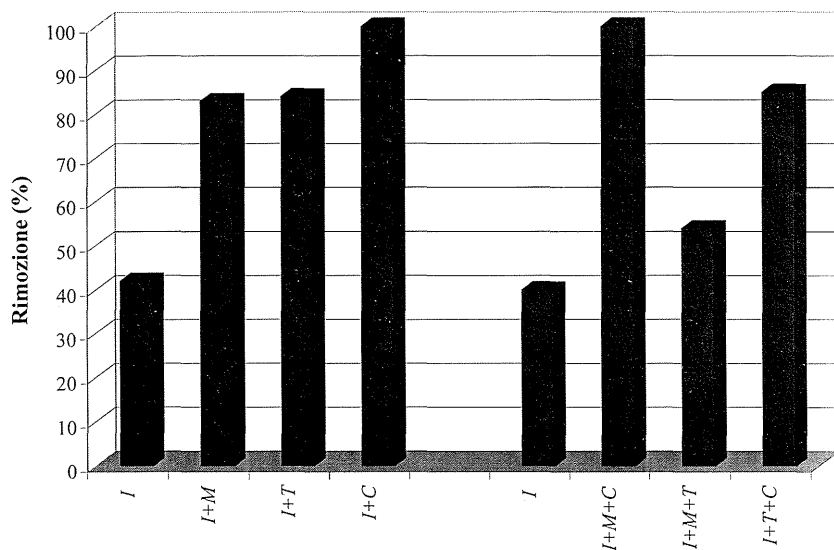


Figura 2. Rimozione (%) dell'idrossitirosolo da solo e in miscela binaria e ternaria.

La rimozione del tirosolo è risultata pressochè costante in presenza di metilcatecolo e idrossitirosolo, mentre l'incremento maggiore è stato osservato quando in miscela era presente il catecolo, il cui effetto positivo è stato registrato non solo nelle miscele binarie, ma anche nelle miscele ternarie e quaternarie (Figura 3). I risultati ottenuti da prove condotte in miscela quaternaria (Figura 4) hanno mostrato che la trasformazione dei substrati fenolici è generalmente aumentata e l'incremento osservato è risultato dipendente dal tipo di molecola.

Infatti, la rimozione del catecolo si è raddoppiata, mentre quella del metilcatecolo e dell'idrossitirosolo è aumentata di 3.5 volte.

I cromatogrammi relativi alle suddette prove hanno mostrato la presenza di picchi diversi a seconda della miscela di partenza, indicativi della formazione di prodotti intermedi differenziati, il cui isolamento e identificazione sono attualmente in corso.

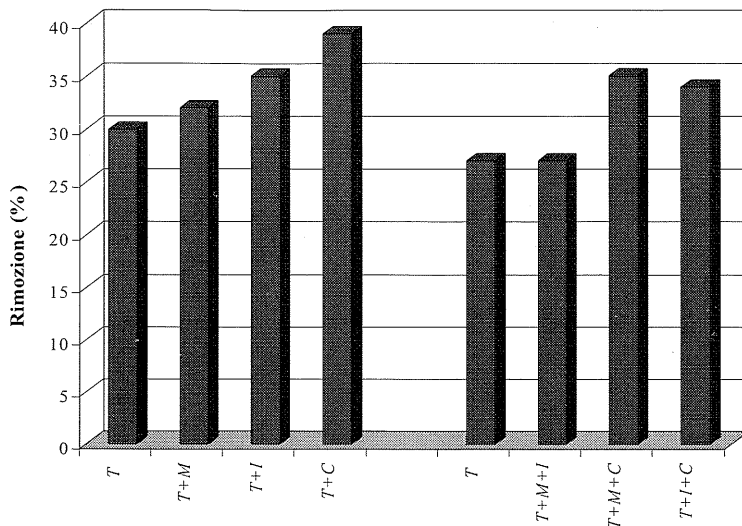


Figura 3. Rimozione (%) del tirosolo da solo e in miscela binaria e ternaria.

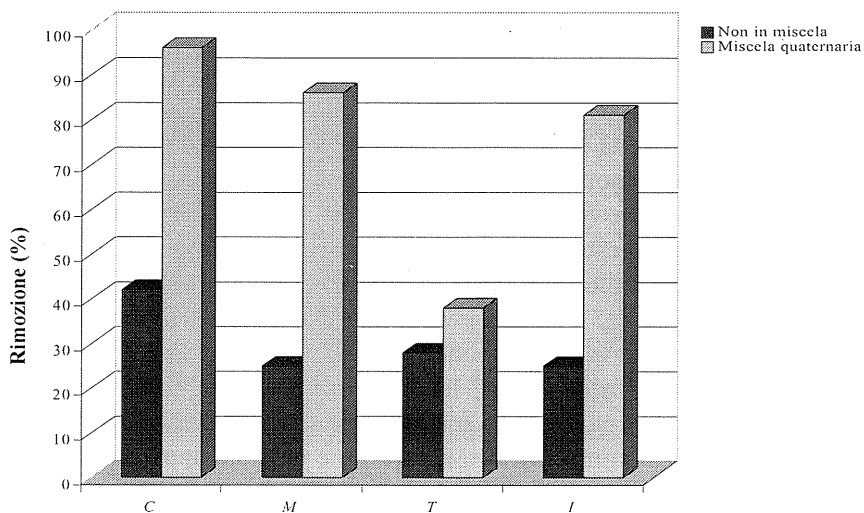


Figura 4. Rimozione (%) dei quattro substrati fenolici in miscela quaternaria.

Tentativi di identificazione dei prodotti derivati dalla reazione di substrati fenolici in presenza di polifenolossidasi sono stati compiuti da diversi autori. Analisi di spettrometria di massa dei prodotti di reazione tra perossidasi e 2,4-DCP hanno portato all'identificazione di vari prodotti intermedi, simili a diossine e dibenzofurani (Maloney *et al.*, 1988). Naidja *et al.*, (1998) hanno definito i prodotti di reazione formati tra catecolo e tirosinasi con il termine composti "catecolo-melanina".

In corrispondenza della trasformazione dei substrati fenolici è stata solitamente registrata una diminuzione dell'attività laccasica. Inoltre, è stata misurata una apparente complementarità tra l'attività enzimatica residua e la rimozione del composto fenolico. Per spiegare l'apparente corrispondenza riscontrata, possono essere formulate alcune ipotesi. L'enzima potrebbe essere plausibilmente inibito per una influenza diretta dei substrati fenolici o dei prodotti polimerici derivanti dalla reazione. Klivanov *et al.*, (1983) hanno infatti dimostrato che un enzima perossidasi subisce un fenomeno di disattivazione durante la trasformazione di diversi fenoli. Per spiegare questo fenomeno è stata proposta l'esistenza di interazioni tra il sito attivo dell'enzima e i fenossi radicali. In alternativa, si potrebbe ipotizzare l'incorporazione e/o l'adsorbimento delle molecole di laccasi entro i polimeri di neoformazione, durante il corso della reazione. Man mano che i prodotti polimerici cominciano a precipitare, le molecole enzimatiche possono essere adsorbite nei polimeri o essere intrappolate dentro flocculati di particelle solide con una risultante perdita dell'efficienza catalitica (Gianfreda *et al.*, 1998; Filazzola *et al.*, 1999).

Sistema suolo

In Figura 5a sono riportati i risultati della rimozione (%) del 2,4-DCP in presenza di laccasi e di alcuni colloidali del suolo (HA1, HA2, C1, C2). I valori di attività enzimatica residua, misurati nei surnatanti degli stessi campioni, sono riportati in Figura 5b. I risultati ottenuti mostrano che il 2,4-DCP da solo non viene rimosso (adsorbito) né dagli acidi umici, né dai due complessi. La presenza di laccasi, invece, ha determinato una consistente rimozione del fenolo (60%) che in presenza dei colloidali è risultata più o meno incrementata (+33%) in presenza di C2, rispetto al controllo. In corrispondenza di tale elevata rimozione è stato osservato il valore più basso di attività enzimatica residua (5%). In presenza di entrambi gli acidi umici e laccasi è stato registrato un aumento nella rimozione del 2,4-DCP di circa il 9%, se confrontato con il relativo controllo, e nessuna apparente corrispondenza è stata osservata per i dati relativi alle attività enzimatiche residue.

L'insieme dei risultati ottenuti sono di difficile interpretazione poiché i loro valori derivano da diversi fenomeni che possono realizzarsi simultaneamente quando nella miscela di reazione sono presenti un substrato, una molecola enzimatica e delle matrici colloidali. In particolare si possono verificare i suddetti fenomeni:

- adsorbimento del 2,4-DCP o delle molecole enzimatiche sulle superfici dei colloidali;
- competizione tra i composti e l'enzima per i siti di adsorbimento sulle matrici;

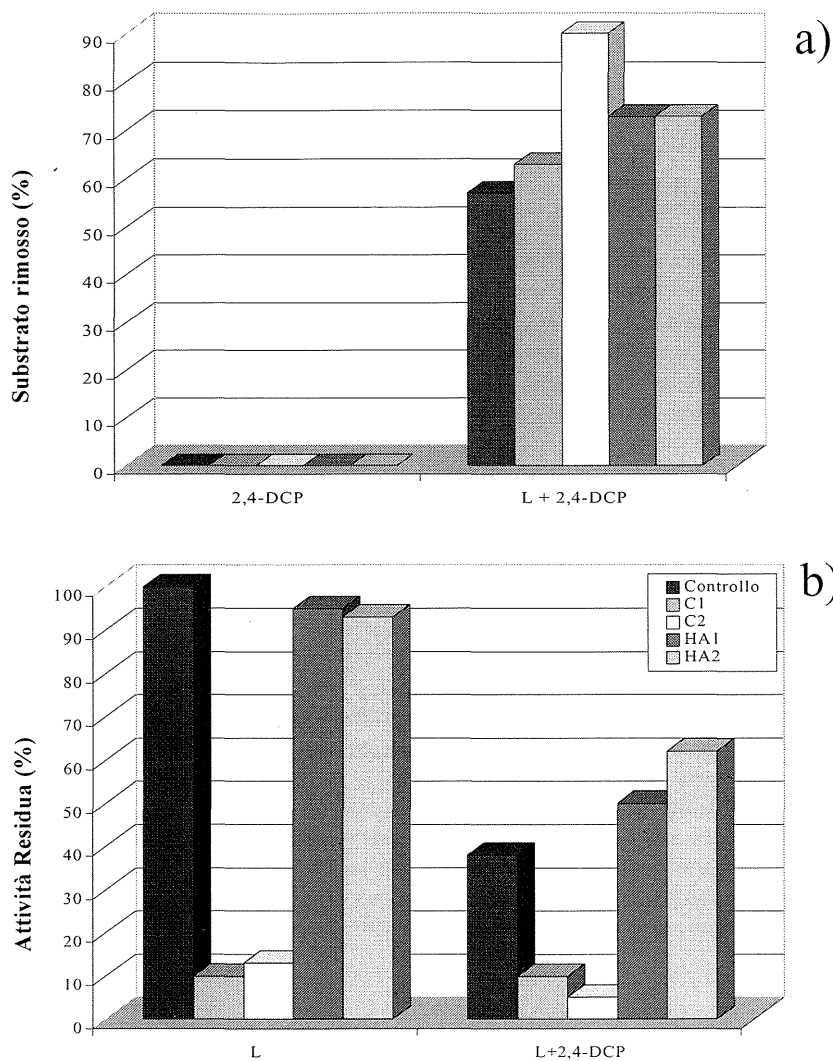


Figura 5. Effetto di HA1, HA2, C1 e C2 sulla rimozione del 2,4-DCP (a). Attività laccasica residua (L) dei surnatanti delle miscele 2,4-DCP-colloide (b).

- azione dell'enzima libero e/o adsorbito sul substrato libero e/o adsorbito;
- rimozione progressiva delle molecole enzimatiche libere dalla soluzione ed intrappolamento nei polimeri fenolici formati.

In conclusione, i risultati riportati nel suddetto lavoro indicano che l'enzima laccasi può rappresentare un efficace agente per la detossificazione di sistemi inquinati da sostanze fenoliche. Tuttavia, particolare atten-

zione deve essere rivolta alla complessità del sistema in cui essa opera, poiché vari fattori (co-presenza di molecole diverse e/o di colloidali del suolo) possono influenzare notevolmente la sua efficienza catalitica.

Bibliografia

- CAPASSO R., EVIDENTE A., SCHIVO L., ORRU G., MARCIALIS M.A., CRISTINZIO G., 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.*, 79: 393-398.
- CAPASSO R., 1997. The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Current Topics in Phytochemistry*, 1: 145-155.
- FILAZZOLA M.T., SANNINO F., RAO M.A., GIANFREDA L., 1999. Effect of various pollutants and soil-like constituents on laccase from *Cerrena unicolor*. *J. Environ. Qual.*, 28: 1929-1938.
- GIANFREDA L., SANNINO F., FILAZZOLA M.T., LEONOWICZ A., 1998. Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 4: 13-23.
- GIANFREDA L., FENG XU, BOLLAG J.-M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3: 1-25.
- MALONEY S. W., MANEM J., MALLEVIALLE J., FLESSINGER F., 1988. Transformation of trace organic compounds in drinking water by enzymatic oxidative coupling. *Environmental Sci. Technol.*, 20: 249-253.
- NAIDJA A., HUANG P.M., BOLLAG J.-M., 1998. Comparison of reaction products from the transformation of catechol catalyzed by bimessite or tyrosinase. *Soil Sci. Am. J.*, 62: 188-195.
- KLIBANOV A.M., ALBERTI B.N., MORRIS E.D., FELSHIN L.M., 1980. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *J. Appl. Biochem.*, 2: 414-421.
- KLIBANOV A. M., TU T, SCOTT K.P., 1983. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science*, 221: 259-261.
- PICCOLO A., 1993. Metodi chimici e spettroscopici per lo studio della reattività della sostanza organica dei suoli. In: *Ciclo della sostanza organica del suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici e selvicolturali*. (P. Nannipieri ed.), Patron Editore, Bologna, Italy, pp. 245-303.
- VIOLANTE A., ARIENZO M., SANNINO F., COLOMBO C., PICCOLO A., GIANFREDA L., 1999. Formation and characterization of OH-Al-humate-montmorillonite complexes. *Organic Geochemistry*, 30: 461-468.

EFFETTO DELLE POLIAMMINE SULL'ACCUMULO E LA TRASLOCAZIONE DEL PIOMBO IN MAIS: INTERESSANTI PROSPETTIVE PER STRATEGIE DI FITORIMEDIO

M. de Agazio¹, E. Rea², A. Fruggerio², M. Zacchini¹

¹ Istituto di Biochimica ed Ecofisiologia Vegetali-CNR. Monterotondo Scalo, Roma

² Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Riassunto

Esperimenti a breve e lungo periodo sono stati condotti rispettivamente su piantine di 3 giorni o su piante di 18 giorni e callo di mais, sottoposti a trattamenti con piombo e/o spermina. L'analisi dei contenuti endogeni di poliammine, mediante cromatografia su strato sottile (TLC), e del piombo, mediante spettroscopia ICP, ha evidenziato che le piante, in seguito a trattamento con spermina, mostrano un più elevato livello di poliammine ed una maggiore capacità sia di accumulare piombo nell'apparato radicale (molto più marcata nelle piantine di 3 giorni che nelle piante di 18 giorni) sia di traslocarlo nella parte aerea in piante di 18 giorni.

Introduzione

L'esposizione delle piante ai metalli pesanti causa inibizione della crescita o morte delle piante in seguito ad alterazioni della permeabilità della membrana cellulare che conduce ad una perdita di ioni ed alla distruzione di pigmenti. Spesso i metalli pesanti agiscono come efficienti generatori di specie tossiche dell'ossigeno quali $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 le quali possono reagire producendo il radicale idrossilico $\text{HO}\cdot$. L'intensificata produzione di ROS (reactive oxygen species) presenta un forte potenziale distruttivo poiché essi danneggiano le principali classi di componenti cellulari: proteine, acidi nucleici e lipidi. Molte specie vegetali hanno sviluppato strategie di tolleranza all'eccessiva presenza di metalli pesanti nel suolo quali la capacità di impedirne l'assorbimento (esclusione) o di neutralizzarne gli effetti tossici mediante diversi meccanismi. Essi consistono nel legame del metallo con la parete cellulare, nella sua compartimentalizzazione in vacuoli, nel potenziamento del meccanismo attivo di efflusso o nell'induzione di maggiori livelli di sostanze chelanti quali complessi proteici (metallotioneine e fitochelatine),

complessi organici (citrati) e complessi inorganici (solfuri). La capacità delle piante di sviluppare strategie per accumulare alte concentrazioni di metalli pesanti è nota in determinate specie vegetali conosciute come iperaccumulatrici (Baker, 1987). Recentemente ha ricevuto notevole attenzione l'idea di usare queste piante per il disinquinamento dei suoli contaminati da metalli pesanti permettendo lo sviluppo di una tecnica (phytoremediation) alternativa ai tradizionali metodi notoriamente più costosi e distruttivi (Cunningham e Ow, 1996). Uno dei limiti a tutt'oggi incontrati per l'applicazione di questa tecnica è rappresentato dalla difficoltà con cui i metalli pesanti vengono traslocati dall'apparato radicale alla parte aerea. Per questa ragione l'attività di ricerca in questo settore è in gran parte rivolta all'identificazione di piccole molecole organiche coinvolte nella formazione di complessi con i metalli al fine di migliorare l'efficienza traslocativa delle piante. Alcuni aspetti della biochimica e della fisiologia delle poliammine inducono ad ipotizzare un loro possibile ruolo nei processi di adsorbimento, assorbimento e traslocazione dei metalli pesanti da parte dei vegetali. Le poliammine, infatti, sono note per il loro coinvolgimento nei processi di lignificazione della parete cellulare (de Agazio *et al.*, 1992) ed i cambiamenti dei loro contenuti cellulari potrebbero quindi modificare la capacità adsorbente della parete stessa. Inoltre le proprietà delle poliammine di legarsi ai fosfolipidi di membrana potrebbe influenzare la permeabilità del plasmalemma interferendo con l'assorbimento dei cationi (de Agazio *et al.*, 1988). Infine l'incremento del contenuto endogeno di poliammine in risposta allo stress ossidativo (Ye *et al.*, 1988), quale quello indotto dai metalli pesanti, potrebbe far pensare ad un meccanismo di detossificazione, anche in considerazione della struttura chimica di queste ammine alifatiche che appare adeguata alla formazione di un complesso con i metalli pesanti (Lovass, 1997). Nel presente lavoro si è iniziato uno studio per verificare se il trattamento con poliammine esogene stimoli l'efficienza estrattiva di piantine appena germinate e calli di mais nonché quella estrattiva e traslocativa di piante di mais di 18 giorni nei confronti del piombo, la cui presenza eccessiva nei suoli e nelle acque, risultante dalle attività minerarie e fusorie, ed in quanto elemento essenziale di combustibili, esplosivi etc., rappresenta un problema ambientale di grandi dimensioni.

Materiali e metodi

Materiale vegetale e trattamento sperimentale

Semi di mais (*Zea mays* L., cv. Samodek, DeKalb Italia), erano lavati in acqua corrente per alcune ore e messi a germinare a 28°C al buio per tre giorni, su carta da filtro imbevuta con CaSO₄ 0.5 mM. Quindi le piantine,

selezionate per lunghezza della radice primaria (2.5 cm), erano utilizzate per trattamenti di breve e di lungo periodo. Nel trattamento a breve periodo le piantine erano trasferite in una soluzione di CaSO_4 0.5 mM \pm spermina 2 mM e mantenute al buio 28°C per 18 ore. Trascorso tale periodo le piantine erano trasferite in una soluzione di CaSO_4 0.5 mM \pm $\text{Pb}(\text{Cl})_2$ 30 μM per 24 ore. Al termine dell'esperimento le radici primarie di ogni tesi erano tagliate e suddivise in due stocks; uno stock era lavato per 30 minuti con una soluzione di CaCl_2 5 mM pH 4.5 (desorption), portato a secco in stufa a 70°C e sottoposto ad analisi del contenuto in piombo mentre l'altro stock era processato per l'analisi del contenuto in poliammine libere. Negli esperimenti di lungo periodo le piantine di mais di tre giorni erano trasferite in serra in substrato inerte (agriperlite) e fertilizzate quotidianamente con soluzione nutritiva (soluzione Hoagland a metà concentrazione) con l'aggiunta o meno di spermina 2 mM e/o $\text{Pb}(\text{Cl})_2$ 100 μM per 15 giorni. Al termine della prova le piante erano divise in due gruppi, separate in radici, culmo, prima foglia e seconda + terza foglia, e sottoposte all'analisi del contenuto in piombo e poliammine libere. Colture di callo di mais erano ottenute da embrioni immaturi della stessa cv., coltivati su substrato solido (N6, agar 0.8%), come altrove riportato (Zacchini *et al.*, 1997), pre-trattate con o senza spermina 3 mM per 7 giorni in camera di crescita a 28°C al buio e quindi trasferite su substrato fresco contenente o meno spermina 2 mM e/o $\text{Pb}(\text{Cl})_2$ 30 μM per 14 giorni. Al termine dell'esperimento i calli di ogni tesi erano separati in due stocks e sottoposti all'analisi del contenuto in piombo e poliammine libere.

Analisi del contenuto in poliammine libere

I campioni erano omogenizzati in mortaio in presenza di azoto liquido con 5 volumi di una soluzione al 5% (v/v) di HClO_4 . L'omogenato era tenuto per 1 ora a 4°C e quindi centrifugato a 15000g per 10 minuti. Le ammine libere contenute nel supernatante erano derivatizzate con dansilcloruro e separate in TLC in accordo con Goren *et al.* (1982). Le lastrine erano sviluppate con CHCl_3 -trietilammina (4:1, v/v) e le concentrazioni delle ammine erano ottenute tramite lettura densitometrica (Shimadzu CS9000 Flying-Spot Scanner con lettore di fluorescenza).

Analisi del contenuto in piombo

I campioni seccati in stufa erano inceneriti in muffola (450°C) e disciolti in acido nitrico al 65% (1:20, v/v); la determinazione del contenuto in piombo era ottenuta mediante spettroscopia al plasma (ICP).

Analisi dell'area fogliare e della fluorescenza della clorofilla

L'area fogliare relativa a ciascuna pianta analizzata era deter-

minata, su foglie distaccate, mediante Leaf Area Meter (LIcor). L'analisi della fluorescenza della clorofilla era condotta sulla porzione mediana dell'ultima foglia espansa adattata al buio per 30 minuti e quindi illuminata con impulso di luce a 650 nm. La fluorescenza emessa era rilevata mediante Plant Efficiency Analysis (PEA, Hansatech).

Analisi statistica

Gli esperimenti riportati sono stati condotti in doppio dando risultati riproducibili. I dati riportati nelle tabelle si riferiscono ad un singolo esperimento con tre repliche, e sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA); le medie sono state comparate mediante Tukey's test.

Risultati e discussione

Negli esperimenti di breve periodo (tabella I) la radice primaria di piantine di mais pre-trattate per 18 ore con spermina 2 mM mostrava un incremento del contenuto totale di poliammine ed in particolare di putrescina e spermina rispettivamente 3 e 12 volte maggiore del controllo. Successivamente le piantine erano sottoposte ad un trattamento di 24 ore con cloruro di piombo 30 μ M ed un aumento di 2,5 volte dei livelli del metallo era osservato in radici di piantine pre-trattate con spermina rispetto ai controlli.

Tabella I. Contenuto di poliammine (nmol/gr p.f.) e di piombo (mg/Kg p.s.) in radici di piantine di mais di 3 giorni pretrattati con o senza spermina (SPM) 2 mM per 18 ore (t_0) e trasferite in una soluzione contenente o no 30 μ M di cloruro di piombo per 24 ore (t_{24}).

TRATTAMENTI		PUTRESCINA	SPERMIDINA	SPERMINA	PIOMBO
CONTROLLO	(t_0)	342 d	129 bc	143 b	n.r.
SPM	(t_0)	1092 a	222 a	1759 a	n.r.
CONTROLLO	(t_{24})	356 d	107 c	83 c	n.r.
PIOMBO	(t_{24})	268 e	80 d	63 c	79 b
PRETRAT. SPM	(t_{24})	412 c	137 b	164 b	n.r.
PRETRAT. SPM+Pb	(t_{24})	574 b	148 b	147 b	190 a

Nelle colonne a lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti (Tukey's test $P=0.05$); n.r.= non rilevabile

L'aumento di putrescina che si osserva dopo trattamento con spermina può essere spiegato o come un effetto dello stress indotto dalla spermina come tale o dai suoi prodotti di degradazione oppure come risultato della via metabolica inversa al pathway biosintetico che dalla putrescina porta alla spermina (de Agazio *et al.*, 1995).

Esperimenti di lungo periodo erano effettuati con calli di mais e piante cresciute in serra. Nei calli di mais (tabella II) l'aggiunta di spermina 3 mM al mezzo di coltura dopo la sterilizzazione induceva dopo 7 giorni un aumento del contenuto di putrescina e spermina rispettivamente di 3 e 20 volte in confronto ai contenuti dei calli non trattati. I calli trattati e non trattati erano quindi trasferiti su substrato fresco con l'aggiunta o meno, dopo sterilizzazione, di cloruro di piombo 30 μM e/o spermina 3 mM. L'ulteriore aggiunta di spermina aveva lo scopo di verificare se sostenendo livelli elevati di putrescina e spermina per tutta la durata dell'esperimento si amplificasse la capacità di assorbire piombo da parte dei calli. Dopo 14 giorni il contenuto di piombo era 1,5 volte più alto nei pre-trattati con spermina rispetto ai controlli mentre era circa 3 volte maggiore dei controlli in presenza costante di spermina.

Tabella II. Contenuto di poliammine (nmol/gr p.f.) e di piombo (mg/kg p.s.) in callo di mais pretrattato con o senza spermina (SPM) 3 mM per 7 giorni (t_0) e trasferito in substrato fresco contenente o no spermina (SPM) 3 mM e/o 30 μM di cloruro di piombo (Pb) per 14 giorni (t_{14}).

TRATTAMENTI		PUTRESCINA	SPERMIDINA	SPERMINA	PIOMBO
CONTROLLO	(t_0)	106 d	67 d	62 c	n.r.
SPM	(t_0)	351 c	42 e	1234 a	n.r.
CONTROLLO	(t_{14})	127 d	97 bc	79 c	n.r.
PIOMBO	(t_{14})	134 d	65 d	158 b	32 c
PRETRAT. SPM	(t_{14})	637 b	217 a	141 b	n.r.
PRETRAT.SPM+Pb	(t_{14})	375 c	153 b	128 b	47 b
PRETRAT.SPM+SPM	(t_{14})	1304 a	126 b	1269 a	n.r.
PRETRAT.SPM+SPM+Pb	(t_{14})	1344 a	90 c	1201 a	88 a

Nelle colonne a lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti (Tukey's test $P=0.05$); n.r.= non rilevabile

Un altro esperimento di lungo periodo (tabella III) è stato effettuato su piantine coltivate in serra su substrato inerte (agriperte) con lo scopo di analizzare non solo l'effetto della spermina sull'assorbimento ma anche sulla traslocazione del piombo alla parte aerea della pianta. In analogia con gli esperimenti precedentemente riportati (tabelle I e II) il trattamento con spermina induceva un aumento del contenuto endogeno di poliammine ed in particolare di putrescina in misura più o meno accentuata nei diversi organi analizzati e di spermina solo nella radice. A questo aumento di poliammine corrispondeva un aumento del contenuto totale di piombo assorbito dalla pianta trattata con spermina; tuttavia solo le foglie mostravano livelli più alti di piombo indicando che la quantità in più assorbita era stata tutta traslocata dalle radici alla parte aerea. Parallelamente sulle piante relative all'esperimento riportato in tabella III sono stati valutati alcuni parametri relativi alla crescita ed allo stato fisiologico (tabella IV). L'analisi di tali para-

metri ha evidenziato che il trattamento con piombo non determinava nessuna alterazione rispetto al controllo mentre il trattamento con spermina causava significative riduzioni dell'area fogliare, dell'altezza delle piante, del peso dell'apparato radicale e della fluorescenza della clorofilla.

Tabella III. Contenuto di poliammine (nmol/gr p.f.) e di piombo (mg/kg p.s.) in vari organi (FG= foglia) di piante di mais di 18 gg. trattate o no dopo 3 gg. dalla semina con spermina (SPM) 2 mM \pm 100 μ M di cloruro di piombo (Pb)

TESI	ORGANO	PUTRESCINA	SPERMIDINA	SPERMINA	PIOMBO
CONTROLLO	RADICE	150 g	212 b	84 de	n.r.
CONTROLLO	CULMO	100 h	180 bc	110 d	n.r.
CONTROLLO	1aFG	314 e	314 a	178 c	n.r.
CONTROLLO	2 a + 3 a FG	324 e	280 a	108 d	n.r.
SPM	RADICE	799 a	137 d	273 b	n.r.
SPM	CULMO	582 b	175 bc	111 d	n.r.
SPM	1aFG	321 e	141 d	82 de	n.r.
SPM	2 a + 3 a FG	398 d	146 d	73 e	n.r.
PIOMBO	RADICE	71 i	110 de	26 g	677 a
PIOMBO	CULMO	40 l	94 e	52 f	70 f
PIOMBO	1aFG	102 h	97 e	48 f	234 c
PIOMBO	2 a + 3 a FG	188 fg	124 d	46 f	120 e
SPM+Pb	RADICE	837 a	168 cd	406 a	692 a
SPM+Pb	CULMO	213 f	127 d	82 de	87 f
SPM+Pb	1aFG	390 d	148 d	65 ef	302 b
SPM+Pb	2 a + 3 a FG	484 c	174 bc	81 de	171 d

Nelle colonne a lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti (Tukey's test $P=0.05$); n.r.= non rilevabile

Tabella IV. Valutazione dell'area fogliare (cm²), dell'altezza (cm), del peso dell'apparato radicale (gr) e della fluorescenza della clorofilla (Fv/Fm) in piante di mais di 18 gg. trattate o no, dopo 3 gg. dalla semina, con spermina (SPM) 2 mM \pm 100 μ M di cloruro di piombo (Pb).

TESI	AREA FOGLIARE	ALTEZZA PIANTE	PESO RADICI	FLUORESCENZA CLOROFILLA
CONTROLLO	177,94 a	28,7 a	4,173 a	0.732 a
SPM	149,49 b	22,3 b	3,151 bc	0.650 b
PIOMBO	198,07 a	29,4 a	3,706 ab	0.682 ab
SPM+Pb	143,17 b	24,6 b	2,856 c	0.484 c

Nelle colonne a lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti (Tukey's test $P=0.05$)

Per quest'ultimo parametro, che descrive lo stato di efficienza dei pigmenti fotosintetici, si osservava un sinergismo negativo tra la spermina ed il piombo indicando per le piante esposte a tale trattamento un evidente stato di stress. L'analisi di questi parametri mette in evidenza che la spermina esogena pur stimolando la capacità della pianta di assorbire il piombo tut-

tavia provocando una diminuzione della produzione di biomassa fa sì che la quantità totale di piombo accumulato per pianta sia minore di quella delle piante esposte al solo trattamento con piombo.

Conclusioni

La spermina, quindi, presenta una capacità di stimolazione dell'assorbimento del piombo sia in piantine di 3 giorni sia in colture di callo di mais con alte percentuali di accumulo del metallo rispetto al controllo. Un tale livello di stimolazione non è stato ottenuto negli esperimenti condotti su piante in uno stadio di crescita più avanzato, dove però l'aggiunta di spermina alla soluzione di crescita provoca un aumento della quantità di piombo presente nella parte aerea di circa il 32% rispetto al controllo, indicando un effetto della spermina sulla traslocazione del metallo dall'apparato radicale alle foglie. Questo dato acquista particolare rilievo in un'ottica di applicazione di tali conoscenze nel settore del possibile utilizzo delle piante nel disinquinamento dei suoli contaminati da metalli pesanti, anche se sarà necessario in futuro trovare le condizioni ottimali per riprodurre, anche su piante in piena crescita, gli effetti stimolanti sull'assorbimento radicale osservati nelle giovani piantine. Un altro *limiting step* in una prospettiva di fitorimediazione è l'effetto depressivo da parte della spermina sulla quantità di biomassa prodotta per pianta, che al momento appare superabile solo aumentando l'investimento di piante per superficie. In futuro le ricerche dovranno chiarire quale degli aspetti relativi alla biochimica e fisiologia delle poliammine sia coinvolto nei fenomeni di accumulo e traslocazione di piombo nelle piante. A questo scopo potrà essere utile neutralizzare gli effetti tossici dovuti ai prodotti di degradazione delle poliammine, ottenere piante ad elevato contenuto endogeno di poliammine attraverso tecniche biotecnologiche, mettere in evidenza l'eventuale formazione di un complesso metallo-poliammina.

Bibliografia

- BAKER A.J.M., 1987. Metal tolerance. *New Phytologist*, 106: 93-111.
- BOGGS R., DONOHUE J., 1975. Spermine-Copper(II) perchlorate. *Acta Cryst.*, 31: 320-322.
- CUNNINGHAM S.D., OW D.W., 1996. Promise and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.*, 110: 715-719.
- de AGAZIO M., ZACCHINI M., FEDERICO R., GREGO S., 1995. Putrescine accumulation in maize roots treated with spermidine: evidence for spermidine to putrescine conversion. *Plant Science*, 111: 181-185.
- GALSTON A.W., KAUR-SAWHNEY R., 1987. Polyamines as endogenous growth regulators In: *Plant hormones and their role in plant growth and development* (P.J. Davis Ed.). M. Nijhoff Pub., pp.280-295.
-

- GOREN R., PALAVAN N., FLORES H., GALSTON A.W., 1982, Changes in polyamine titer in etiolated pea-seedlings following red-light treatment. *Plant Cell Physiol.*, 23: 19-26.
- LOVASS E., 1997, Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv. in Pharmacology*, 38: 119-149.
- ZACCHINI M., MAROTTA A., de AGAZIO M., 1997, Tolerance to salt stress in maize callus lines with different polyamine content. *Plant Cell Reports*, 17: 119-122.
-

INTERAZIONI TRA FUNGHI MICORRIZICI E METALLI PESANTI: PROSPETTIVE NEL BIORISANAMENTO

Silvia Perotto^{1,3}, Elena Martino¹, Paola Bonfante^{1,2}

1 Centro di Studio sulla Micologia del Terreno, C.N.R.

2 Dipartimento di Biologia vegetale, Università di Torino
Viale Mattioli 25, 10125, Torino

3 Istituto di Meteorologia e Oceanografia, I.U.N.
Via De Gasperi 5, 80133 Napoli

Riassunto

I funghi micorrizici rappresentano un'interfaccia tra piante e suolo in quanto mediano l'acquisizione di elementi dal suolo e il loro trasferimento alle radici delle piante ospiti. Per questo motivo, l'interesse per questi funghi simbiotici è andato crescendo in diversi settori delle biotecnologie agro-ambientali. I funghi micorrizici proteggono la loro pianta ospite dagli effetti tossici dei metalli pesanti, facilitando pertanto la ricolonizzazione di siti contaminati. Nonostante il documentato effetto di protezione, i meccanismi biomolecolari che regolano le interazioni tra metalli pesanti e funghi micorrizici sono per lo più sconosciuti. La loro comprensione è un importante prerequisito per un utilizzo ottimale di queste componenti biotiche del suolo come strumenti di recupero ambientale.

***Parole chiave:** funghi micorrizici, metalli pesanti, biorisanamento, inquinamento del suolo*

Introduzione

Suoli e acque contaminati da metalli tossici sollevano problemi ambientali e di salute per l'uomo che richiedono soluzioni efficaci a costi accessibili. Come risultato dell'inquinamento ambientale, derivante sia dalle pratiche agronomiche che da attività industriali ed estrattive, un elevato numero di metalli pesanti ed altri inquinanti si depositano nei suoli (Greszta, 1988) dove permangono per lunghi periodi. Gli ecosistemi sono disturbati sotto l'impatto dell'inquinamento da metalli pesanti in quanto vengono alterate le attività enzimatiche di numerosi organismi viventi, e in particolare le funzioni vitali delle piante e della microflora del suolo. Poiché i metalli pesanti non possono essere degradati, strategie volte alla riduzione della loro tossicità devono prevederne la rimozione dal suolo, oppure la immobilizzazione in forme non tossiche.

Diverse strategie possono essere utilizzate per il recupero di suoli inquinati da metalli pesanti e radionuclidi. Lo strato superficiale di suolo può essere rimosso fisicamente ed essere trattato *ex situ* per via chimica o con l'ausilio di microrganismi (Salt *et al.* 1995), una tecnica economicamente costosa e ad elevato impatto sull'ambiente. Il biorisanamento *in situ* è una strategia preferibile per il minor costo e il minor impatto ambientale, ed è basato sull'utilizzo di piante e microrganismi che devono innanzitutto essere in grado di crescere su suoli inquinati tollerando le elevate concentrazioni di metalli ivi presenti.

Le piante sono tuttora l'oggetto di studio principale per la rimozione dei metalli pesanti dal suolo (fitoestrazione) o per la loro immobilizzazione in forme insolubili (fitostabilizzazione). Non bisogna però dimenticare che l'assorbimento di elementi dal suolo da parte dei vegetali è profondamente influenzato dall'attività di una popolazione microbica strettamente associata alle radici, la comunità rizosferica. Componente importante di questa comunità sono i funghi micorrizici.

I funghi micorrizici: una connessione diretta tra suolo e radici

I funghi micorrizici formano un'intima associazione con il 90% circa delle specie vegetali terrestri, e coinvolgono per lo meno 6.000 specie fungine appartenenti ai gruppi degli Zigomiceti, degli Ascomiceti e dei Basidiomiceti (Smith and Read, 1997). Nonostante l'estrema biodiversità degli organismi coinvolti, sono stati descritti pochi tipi di micorrize. La loro classificazione in endomicorrize ed ectomicorrize dipende dalla posizione tassonomica dei partner simbiotici e dal fatto che il fungo formi o meno delle strutture che penetrano all'interno delle cellule vegetali. Un'ulteriore suddivisione delle endomicorrize prende in considerazione il processo di colonizzazione e le strategie nutrizionali del simbionte fungino, e porta alla distinzione tra micorrize arbuscolari, micorrize ericoidi e micorrize delle orchidee (Bonfante e Perotto, 1995; Perotto *et al.*, 1995).

A causa della loro fine struttura ifale, i funghi micorrizici sono in grado di colonizzare estesi volumi di suolo in modo capillare, stabilizzandone la struttura e assistendo le piante nell'acquisizione di elementi nutritivi mediante meccanismi di scambio (Harrison, 1997; Smith e Read 1997). Grazie all'intima interazione cellulare tra funghi e radici, con la presenza di strutture che facilitano il passaggio di acqua e nutrienti alla pianta, questi microrganismi stabiliscono un ponte diretto tra il suolo e la radice. E' verosimile che essi possano pertanto svolgere un ruolo importante nel me-

diare l'assorbimento di metalli essenziali e non essenziali da parte della pianta (Marschner 1995).

Un prerequisito per il biorisanamento *in situ* di siti contaminati da metalli pesanti (dove con questo termine si include anche se impropriamente l'alluminio) è la loro ricolonizzazione da parte di specie vegetali per permettere la formazione di un ecosistema sostenibile. I funghi micorrizici sono essenziali in questo processo per il loro ruolo fondamentale nell'acquisizione di nutrienti, e in generale per il loro effetto positivo sulla salute generale della pianta (Smith e Read, 1997). E' però importante conoscere il livello di tolleranza dei funghi micorrizici ai metalli pesanti presenti nel suolo, come anche il ruolo dei funghi micorrizici nel determinare l'acquisizione di metalli pesanti dal suolo e il loro potenziale trasferimento alle parti epigee della pianta.

In questa presentazione saranno discussi i risultati di ricerche recenti sui funghi micorrizici in relazione alla loro interazione con i metalli pesanti. Non saranno discussi i funghi arbuscolari in quanto la loro natura di biotrofi obbligati pone serie limitazioni alla ricerca in questo campo.

Ceppi micorrizici in ambienti inquinati: selezione o adattamento?

Un eccesso di metalli pesanti ha pesanti ripercussioni sulle comunità microbiche del suolo, sebbene i funghi siano tra gli organismi più tolleranti a questa forma di inquinamento (Jordan e Lechevalier, 1975; Nordgren *et al.*, 1983). In generale, concentrazioni tossiche di metalli pesanti riducono l'abbondanza e la biodiversità fungina selezionando ceppi tolleranti (Gadd, 1993). Questa tendenza è stata riscontrata anche nelle popolazioni di funghi micorrizici (Wainwright e Gadd, 1997). Articoli recenti indicano che ceppi di funghi ecto- ed endomicorrizici tolleranti ad elevate concentrazioni di metalli pesanti vengono selezionati in suoli contaminati. In particolare, popolazioni del fungo ectomicorrizico *Suillus luteus* provenienti da siti non contaminati e da siti inquinati da zinco, cadmio e rame sono state confrontate tra loro da Colpaert *et al.* (2000). La tolleranza *in vitro* dei ceppi di *S. luteus* provenienti dai siti inquinati a Zn e Cd, valutata come biomassa e diametro della colonia fungina, si è rivelata significativamente superiore a quella dei ceppi isolati da suoli non inquinati (Colpaert *et al.*, 2000). Una situazione simile è stata anche riscontrata per il fungo micorrizico ericoide *Oidiodendron maius* (Figura 1), dove isolati provenienti da suoli fortemente inquinati da Cd, Zn e Al si sono dimostrati in generale più tolleranti a questi elementi rispetto a ceppi fungini provenienti da aree non inquinate (vedi anche Lacourt *et al.*, 2000; Martino *et al.*, 2000a).

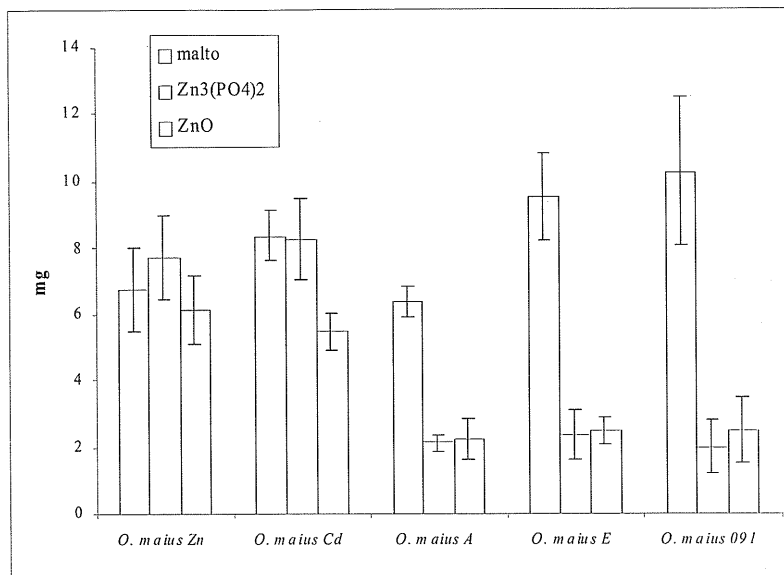


Figura 1. Grafico della crescita di alcuni ceppi del fungo micorrizico ericoide *Oidiodendro maius* in assenza e in presenza di composti insolubili dello zinco. I ceppi *O. maius Zn* e *Cd* provengono da un sito altamente inquinato da metalli pesanti, mentre gli altri ceppi derivano da suoli non inquinati. Il grafico mostra come i ceppi da suoli inquinati abbiano una crescita significativamente superiore agli altri ceppi in presenza di composti contenenti zinco.

Sulla base di queste osservazioni non è però possibile concludere se la maggiore tolleranza osservata nei ceppi isolati da siti contaminati sia il prodotto di un adattamento fisiologico a queste condizioni, o se si tratti di un fenomeno di selezione ambientale nei confronti di ceppi naturalmente tolleranti. In effetti, ceppi fungini in grado di crescere *in vitro* in presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti possono essere isolati anche da ambienti non contaminati (Tomsett, 1993). Per i funghi micorrizici ericoidei, la presenza di ceppi metallo-tolleranti in suoli non inquinati è stata in effetti riscontrata da diversi autori (Bradley *et al.*, 1981; Lacourt *et al.*, 2000).

Interazioni tra funghi micorrizici e metalli pesanti

Ci sono fondamentalmente due strategie che un qualsiasi organismo, compresi i funghi, può adottare per proteggersi dagli effetti nocivi dei metalli pesanti. L'**esclusione** ha come scopo quello di limitare l'ingresso di ioni metallici nel citoplasma, e si basa sull'immobilizzazione del metallo all'esterno della cellula, oppure sulla riduzione del suo assorbimento attraverso

la membrana plasmatica. Se presente, la parete cellulare rappresenta un importante sito per l'immobilizzazione extracellulare. Il **sequestro** interviene invece per ridurre la concentrazione citoplasmatica di ioni metallici, e può prevedere come meccanismi sia la produzione di composti chelanti intracellulari sia la compartimentazione nel vacuolo (Gadd, 1993; Leyval *et al.*, 1997)

Nei funghi, il sito principale in grado di legare i metalli a livello extracellulare è la parete cellulare (Gadd, 1993), e l'interazione tra questo comparto e gli ioni metallici è un fenomeno rapido e passivo chiamato adsorbimento (Morley *et al.*, 1996). Le pareti fungine sono complesse strutture tridimensionali formate da macromolecole organiche che comprendono principalmente la chitina, il chitosano e i glucani, come anche proteine, lipidi e pigmenti (Peberdy, 1990). Queste componenti strutturali contengono diversi gruppi funzionali in grado di legare in maniera più o meno efficiente gli ioni metallici. Poiché la composizione della parete cellulare, e di conseguenza i potenziali siti di legame, varia a seconda del gruppo tassonomico (Wessels e Sietsma, 1981), la capacità di adsorbimento per i metalli potrebbe essere molto diversa a seconda della specie fungina.

Molti autori hanno suggerito che l'adsorbimento dei metalli alla parete dei funghi micorrizici costituisca un importante meccanismo che riduce il passaggio di ioni metallici alla pianta ospite (e.g. vedi Bradley *et al.*, 1981; Galli *et al.*, 1994; Leyval *et al.*, 1997). Nel micelio del fungo ectomicorrizico *Paxillus involutus* l'accumulo di cadmio a livello della parete cellulare è stato dimostrato mediante l'analisi della cinetica di rilascio di radioisotopi (Blaudez *et al.*, 2000), ma percentuali significative di questo metallo sono state ritrovate anche nel citoplasma e nel vacuolo. Un accumulo di cadmio è stato rivelato mediante tecniche di microanalisi nella parete delle ife di *Pisolithus arrhizus* (Turnau *et al.*, 1994), come anche nella parete cellulare fungina in micorrize formate da *Hebeloma crustuliniforme* (Frey *et al.*, 2000). In quest'ultimo caso, sembra esserci una distribuzione differenziale dei metalli nelle diverse strutture formate sulla radice dal fungo, in quanto il cadmio si ritrova quasi esclusivamente nel reticolo di Hartig, un intreccio di ife che si insinua tra le cellule corticali. Al contrario, lo zinco viene accumulato di preferenza nelle pareti del mantello fungino che circonda la radice, come anche nel citoplasma (Frey *et al.*, 2000). Bradley *et al.* (1981) hanno ipotizzato che anche nelle micorrize ericoidi la protezione della pianta nei confronti dei metalli sia dovuto al fatto che il simbionte fungino *Hymenoscyphus ericae* mostra un'elevata affinità per i cationi metallici.

I funghi sono in grado di interagire con i metalli presenti nell'ambiente secernendo un ampio spettro di metaboliti che possono modificare la biodisponibilità (Gadd, 1993). I funghi micorrizici possono secer-

nere diversi acidi organici e siderofori che modificano la solubilità di metalli presenti nella rizosfera (e.g. Lapeyrie *et al.*, 1987; Haselwandter, 1995). Nei vegetali, il rilascio di acidi organici è correlabile con un aumento della tolleranza all'alluminio (De la Fuente *et al.*, 1997; Jones, 1998). E' verosimile che una situazione simile sia anche presente per i funghi micorrizici, ma questa possibilità non è stata sinora verificata.

I funghi micorrizici sono in grado di solubilizzare composti metallici inorganici insolubili grazie alla produzione di acidi organici (Martino *et al.*, in preparazione). In questo studio, tutti i ceppi micorrizici ericoidi testati su terreno solido contenente ossido o fosfato di zinco hanno infatti portato alla formazione di un alone di solubilizzazione, sebbene ceppi di *Oidiodendron maius* isolati da terreni non inquinati si siano dimostrati più efficienti nella solubilizzazione rispetto a ceppi provenienti da suoli fortemente inquinati.

Oltre agli acidi organici, la presenza di metalli nel terreno di coltura causa un drammatico cambiamento nel rilascio di proteine nel mezzo di crescita (Martino *et al.*, 2000b). Nella specie micorrizica ericoide *O. maius* si è visto che la presenza di zinco porta alla comparsa di numerose bande proteiche di natura essenzialmente basica (Figura 2).

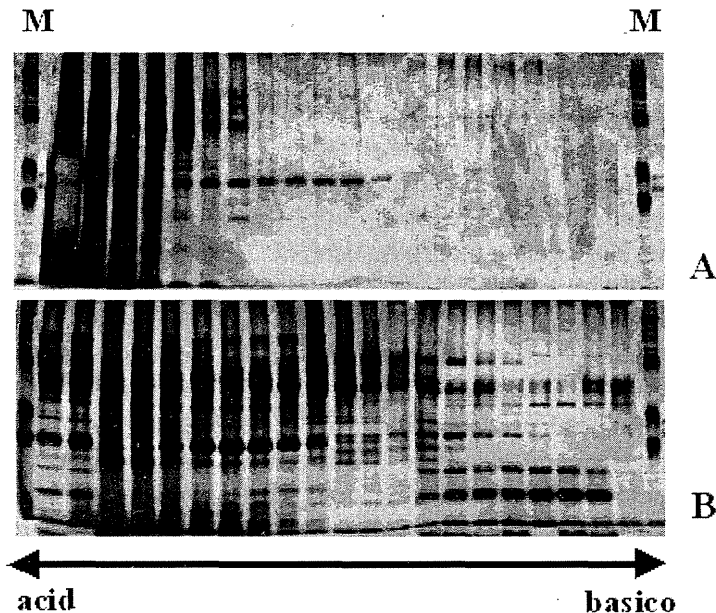


Figura 2. SDS-PAGE delle frazioni ottenute dopo isolettrofocalizzazione del terreno di coltura del ceppo *Oidiodendron maius* Zn cresciuto in assenza di metallo (A) e in presenza di zinco solfato 10 mM (B). Le bande proteiche sono concentrate in corrispondenza delle frazioni acide in assenza di metallo, mentre la distribuzione delle bande proteiche risulta spostata verso le frazioni basiche in presenza del metallo.

La natura e il ruolo di queste proteine secrete rimane ancora per lo più sconosciuto, anche se la sequenza N-terminale ottenuta per alcune componenti suggerisce un loro ruolo nella risposta del fungo allo stress ossidativo (E. Martino, risultati non pubblicati).

Detossificazione intracellulare dei metalli pesanti

La cellula risponde ad un aumento della concentrazione intracellulare di ioni metallici con la produzione di polipeptidi metallo-chelanti, che possono appartenere alle due classi distinte delle metallotioneine e dei γ -glutamyl-peptidi. Sebbene entrambe contengano diverse cisteine, queste due classi di molecole non sono correlate in quanto le metallotioneine sono codificate da geni, mentre i γ -glutamyl-peptidi sono prodotti attraverso una via enzimatica (Rauser, 1999; Cobbett, 2000). Entrambe queste classi di composti sono stati ritrovati nei funghi, ma mancano tuttora informazioni sulla loro possibile presenza nei funghi micorrizici. Proteine citosoliche in grado di legare rame sono state identificate in ceppi metallo-tolleranti delle specie ectomicorriziche *Laccaria laccata* e *P. involutus* esposte alla presenza di rame (Howe *et al.*, 1997), ma la loro natura non è stata chiarita.

La compartimentazione intracellulare dei metalli è stata dimostrata finora solamente per i funghi ectomicorrizici, dove la presenza di granuli di polifosfato nel vacuolo è stata messa in correlazione con l'accumulo di Al e Cd (Kottke e Martin, 1994; Martin *et al.*, 1994; Väre, 1990). Anche se una redistribuzione di metalli può aver luogo durante la fissazione chimica del materiale biologico secondo tecniche convenzionali, l'accumulo di cadmio nel vacuolo è stato confermato da Frey *et al.* (2000) utilizzando materiale fissato mediante congelamento rapido ad alta pressione (*high pressure-freeze substitution*).

I funghi micorrizici proteggono le piante ospiti dagli effetti tossici dei metalli pesanti

Molti esperimenti dimostrano che piante micorrizzate sopportano meglio gli effetti tossici di elevate concentrazioni di metalli pesanti rispetto a controlli non inoculati con il simbionte fungino (vedi riferimenti in Leyval *et al.*, 1997). Per esempio, piante che formano micorrize ericoidi erano in grado di colonizzare ambienti fortemente inquinati, laddove piante non

micorrizzate non erano in grado di crescere (Bradley *et al.*, 1981; Denny e Ridge, 1995). Un ruolo fondamentale è stato attribuito da questi autori al fungo simbionte. Anche per i funghi ectomicorrizici è stato possibile dimostrare che essi sono in grado di alleviare gli effetti tossici di metalli pesanti quali Al, Ni, Zn, Cd and Cu (Cumming e Weinstein, 1990; Schier e McQuattie, 1996; Brown e Wilkins, 1995; Jentschke *et al.*, 1999). Nonostante questo indubbio ruolo protettivo che i funghi micorrizici generalmente mostrano nei confronti della pianta, i meccanismi coinvolti rimangono poco chiari (Jentschke e Godbold, 2000). Infatti, non si sa se questi funghi proteggano la pianta aumentando le sue difese verso gli inquinanti, o se essi riducano il trasferimento di metalli ai tessuti vegetali. Dati di letteratura sembrano indicare che i funghi micorrizici riducono il trasferimento dei metalli dalle radici al fusto e alle foglie delle piante ospiti (vedi Leyval *et al.*, 1997). D'altro canto, Jentschke e Godbold (2000) mettono in discussione molte conclusioni in tal senso tratte sulla base di esperimenti che misurano la concentrazione di metalli pesanti nella parte epigea, in quanto una minore concentrazione di metalli può essere il risultato di una diluizione dovuta alla maggiore produzione di biomassa indotta dall'associazione micorrizica. Una rivalutazione dei dati di letteratura indica che i funghi ectomicorrizici spesso non hanno particolare influenza sul trasferimento dei metalli alle parti epigee, e in alcuni casi la quantità di metallo traslocato aumenta rispetto al controllo non micorrizzato (Jentschke e Godbold, 2000). L'accumulo dei metalli nelle parti aeree della pianta e l'effetto di protezione da parte del fungo micorrizico sembrano dipendere fondamentalmente dal tipo di organismi associati in simbiosi e dal tipo di metallo considerato.

La simbiosi micorrizica: un approccio integrato nel biorisanamento?

Indipendentemente dai meccanismi coinvolti, i funghi micorrizici contribuiscono ad alleviare la tossicità dei metalli nella pianta ospite. Per questo motivo essi costituiscono importanti fattori biotici nella riforestazione/rivegetazione di aree inquinate, che costituisce un obiettivo primario nel recupero ambientale (Donnelly e Fletcher, 1994). Come già accennato, a seconda della specie fungina coinvolta nell'associazione micorrizica e del metallo il trasferimento di questo elemento alle parti aeree della pianta può essere ridotto, inalterato, o addirittura aumentato (Jentschke e Godbold, 2000), suggerendo pertanto che la micorrizzazione possa essere utilizzata sia in tecniche di fitoestrazione che di fitostabilizzazione.

Per impedire il passaggio dei metalli pesanti alla catena ali-

mentare, piante utilizzate nella fitostabilizzazione dovrebbero essere in grado di immobilizzare metalli tossici a livello delle radici, limitando il loro movimento al fusto e alle foglie. Si ritiene che il micelio fungino sia una barriera importante che impedisce l'assorbimento di metalli da parte della radice (vedi Leyval *et al.*, 1997). Per esempio, l'abbondanza di micelio extraradicale in diversi funghi ectomicorrizici associati a radici di *Pinus sylvestris* è stata messa in correlazione con la loro abilità di immobilizzare il cadmio (Colpaert e Van Assche, 1993). Questi dati, insieme con l'osservazione che l'effetto di protezione dipende in larga misura dalla specie fungina (Denny e Wilkins, 1987; Jentschke *et al.*, 1999; Van Tichelen *et al.*, 1999) suggeriscono che la selezione di funghi in grado di legare alte concentrazioni di metalli possa costituire una tappa fondamentale nella messa a punto di strategie di fitorimediazione.

La fitoestrazione prevede l'utilizzo di piante in grado di accumulare elevate quantità di metalli pesanti. Molta attenzione è stata dedicata a piante iperaccumulatrici quali *Thlaspi caerulescens*, *T. ochroleucum*, *Brassica juncea*, *Cardaminopsis halleri*, *Alyssum spp* (e.g. Pence *et al.*, 2000), che non formano generalmente associazioni micorriziche. La scarsa produzione di biomassa e la lenta crescita di queste piante ha recentemente spostato l'attenzione sull'utilizzo di piante in grado di crescere più velocemente, e con maggiore produzione di biomassa, quali *Zea mays*, *Solanum tuberosum*, *Salix* e *Populus spp* (e.g. Rugh *et al.*, 1998). Queste specie sono normalmente associate a funghi micorrizici, e la selezione di inoculi fungini idonei potrebbe fornire un sistema integrato per la decontaminazione di siti inquinati. La solubilizzazione di metalli fosfati da parte di funghi micorrizici è ben documentata (Lapeyrie *et al.*, 1987; Lapeyrie *et al.*, 1991), e la secrezione di acidi organici quali l'acido citrico sembra essere il meccanismo chiave di questa attività di solubilizzazione. Ceppi fungini micorrizici con un'elevata capacità di solubilizzare composti metallici insolubili potrebbero aumentare l'efficienza della fitoestrazione, anche se il possibile utilizzo di questa strategia non è stato finora verificato. In ogni caso, ulteriori conoscenze sul ruolo specifico dell'associazione micorrizica nell'interazione delle piante con i metalli pesanti sono necessarie per fornire una base di partenza importante nello sviluppo di strategie integrate di biorisanamento.

Ringraziamenti

La ricerca descritta nel lavoro è stata finanziata dal CNR, Progetto Finalizzato Biotecnologie (Sottoprogetto 2), dal progetto MIPA n.145e dal MURST.

Riferimenti bibliografici

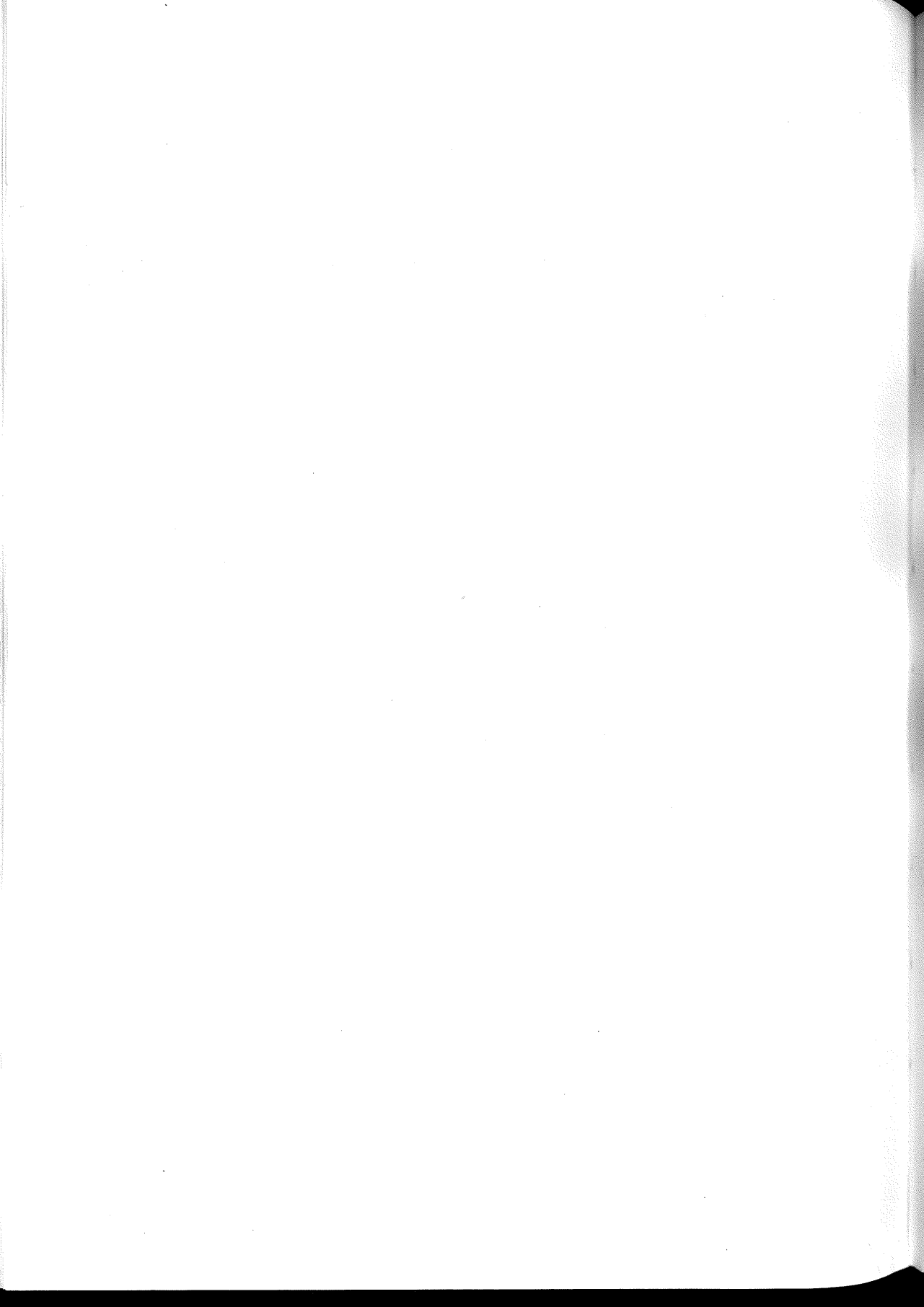
- BLAUDEZ D., BOTTON B., CHALOT M. 2000. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, 146: 1109-1117.
- BONFANTE P., PEROTTO S. 1995. Tansley Review: The strategies of arbuscular mycorrhizal fungi during infection of the host plant. *New Phytologist*, 82: 3-21
- BRADLEY R., BURT A.J., READ D.J. 1981. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature*, 292: 335-7.
- BROWN M.T., WILKINS D.A. 1985. Zinc tolerance of mycorrhizal betula. *New Phytologist*, 99: 101-106
- COBBETT C.S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion Plant Biology*, 3:211-6.
- COLPAERT J.V., VAN ASSCHE J.A. 1993. The effect of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist*, 123: 325-33.
- COLPAERT J.V., VANDENKOORNHUYSE R., ADRIAENSEN K., VANGRONSVELD J. 2000. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytologist*, 147: 367-379.
- CUMMING J., WEINSTEIN L. 1990. Aluminium-mycorrhizal interactions in the physiology of pitch pine seedlings. *Plant and Soil*, 125: 7-18
- DE LA FUENTE J.M., RAMIREZ-RODRIGUEZ V., CABRERA-PONCE J.L., HERRERA-ESTRELLA L. 1997. Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*, 276: 1566-1568.
- DENNY H.J., RIDGE I. 1995. Fungal slime and its role in the mycorrhiza amelioration of zinc toxicity to higher plants. *New Phytologist*, 130: 251-7.
- DENNY H.J., WILKINS D.A. 1987. Zinc tolerance in *Betula* ssp. IV. The mechanisms of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity. *New Phytologist*, 106, 545-553.
- DONNELLY P.K., FLETCHER J.S. 1994. Potential use of mycorrhizal fungi as bioremediation agents. *American Chemical Society Symposium Series*, 563: 93-9.
- FREY B., ZIEROLD K., BRUNNER I. 2000. Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic zinc sequestration in the fungal mantle of *Picea abies*-*Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhizas. *Plant, Cell and Environment*, 23: 1257-1265.
- GADD G.M. 2000. Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion Biotechnology*, 11: 271-9.
- GADD G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124: 25-60.
- GALLI U., SCHUEPP H., BRUNOLD C. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, 92: 364-68.
- GRESZTA J. 1988. The effect of dusts from electro-filters of different industrial works on forest ecosystems. *Scientific Papers Krakow Agriculture Academy*, 18: 3-21.
- HARRISON M.J. 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends Plant Science*, 2: 54-9.
- HASELWANDTER K. 1995. Mycorrhizal Fungi: Siderophore Production. *Critical Reviews Biotechnology*, 15: 287-91.
- HOWE R., EVANS R.L., KETTERIDGE S.W. 1997. Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 135: 123-131
- JENTSCHKE G., WINTER S., GODBOLD D.L. 1999. Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. *Tree Physiology*, 19: 23-30
- JENTSCHKE G., GODBOLD D.L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum*, 109: 107-116.
- JONES D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil*, 205: 25-44.
- JONES M.D., HUTCHINSON T.C. 1988. Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus*

- or *Scleroderma flavidum*. II. Uptake of nickel, calcium, magnesium, phosphorus and iron. *New Phytologist*, 108: 461-70.
- JORDAN M.J., LECHEVALIER M.P. 1975. Effects of zinc-smelter emission on forest soil microflora. *Canadian Journal of Microbiology*, 21: 1855-65.
- KOTTKE I., MARTIN F. 1994. Demonstration of aluminium in polyphosphate of *Laccaria amethystea* (Bolt. ex Hooker) Murr. by means of electron energy loss spectroscopy. *Journal of Microscopy*, 174: 225-32.
- LACOURT I., D'ANGELO S., GIRLANDA M., TURNAU K., BONFANTE P., PEROTTO S. 2000. Genetic polymorphism and metal sensitivity of *Oidiodendron maius* strains isolated from polluted soils. *Annals of Microbiology*, 50: 157-166.
- LAPEYRIE F., CHILVERS G.A., BEHM C.A. 1987. Oxalic acid synthesis by the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist*, 106: 139-46.
- LAPEYRIE F., RANGER J., VAIRELLES D. 1991. Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. *Canadian Journal Botany*, 69: 342-46.
- LEYVAL C., TURNAU K., HASELWANDTER K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7: 139-53.
- MARSCHNER H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London
- MARTIN F., RUBINI P., COTE R., KOTTKE I. 1994. Aluminium polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: a ^{27}Al -nuclear magnetic resonance study. *Planta*, 194: 241-6.
- MARTINO E., TURNAU K., GIRLANDA M., BONFANTE P., PEROTTO S. 2000a. Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of heavy metals. *Mycological Research*, 104: 338-44.
- MARTINO E., COISSON J.D., LACOURT I., FAVARON F., BONFANTE P., PEROTTO S. 2000b. Influence of heavy metals on production and activity of pectinolytic enzymes in ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 104: 825-833.
- MORLEY G.F., SAYER J.A., WILKINSON S.C., GHARIEB M.M., GADD G.M. 1996. Sequestration, mobilization and transformation of metals and metalloids. In *Fungi and Environmental Change* (J.C. Frankland, N. Magan, G.M. Gadd eds), University Press, Cambridge, pp. 235-256.
- NORDGREN A., BÅÅTH E., SÖDERSTRÖM B. 1983. Microfungi and microbial activity along a heavy metal gradient. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1829-37.
- PEBERDY J.F. 1990. Fungal cell walls – a review. In *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* (P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey, L.E. Copping eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 5-30.
- PENCE N.S., LARSEN P.B., EBBS S.D., LETHAM D.L., LASAT M.M., GARVIN D.F., EIDE D., KOCHIAN L.V. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings National Academy of Science USA*, 97: 4956-60.
- PEROTTO S., PERETTO R., FACCIO A., SCHUBERT A., BETTINI V., VARMA A., BONFANTE P. 1995. Ericoid mycorrhizae: cellular and molecular bases of their interactions with the host plant. *Canadian Journal of Botany*, 73, suppl 1: s557-s568.
- RAUSER W.E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochemistry Biophysics*, 31: 19-48.
- RUGH C.L., SENECOFF J.F., MEAGHER R.B., MERKLE S.A. 1998. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology*, 16: 925-928.
- SALT D.E., BLAYLOCK M., KUMAR N.P.B.A., DUSHENKOV V., ENSLEY B.D., CHET I., RUSKIN I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environments using plants. *BioTechnology*, 13: 468-474.
- SCHIER G., McQUATTIE C. 1996. Response of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings to nutrient supply and aluminium: Growth and mineral nutrition. *Canadian Journal Forestry Research*, 26: 2145-2152.
- SMITH S.E., READ D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. II ed. Academic Press, London.





Contributi dei soci



ASPETTI TECNICO ECONOMICI DELL'INQUINAMENTO DA GAS SERRA (PROTOCOLLO DI KYOTO: RICICLO DELLA SOSTANZA ORGANICA E CONTROLLO DELLE EMISSIONI)

Pirro-Tomaso Perri

Scuola Superiore di Studi Universitari e di Perfezionamento S. Anna, Pisa
Consulente presso la Food and Agriculture Organization of the United Nations*

Ai fini dell'odierna serie di seminari scientifici e data la varia natura del pubblico intervenuto, presenterò gli aspetti economici connessi alle emissioni di gas serra in atmosfera riducendo i formalismi economici al minimo indispensabile.

In via puramente esemplificativa, le emissioni di gas serra in atmosfera possono essere generalmente considerate come emissioni di sostanze inquinanti nell'ambiente. Il che equivale a dire che non se ne può fare a meno. La società moderna, infatti, ad eccezione di qualche ambientalista integralista, si è ormai rassegnata alla necessità di dover inquinare per poter svolgere le proprie attività. E' però ormai consolidata l'idea che ciò non possa essere fatto indiscriminatamente. Parte del lavoro degli economisti dell'ambiente consiste proprio nell'identificare il miglior livello di inquinamento possibile, mettendo opportunamente a confronto i pro ed i contro connessi alle attività inquinanti. Si cerca cioè di identificare quella soglia di inquinamento oltre la quale i danni dovuti all'inquinamento stesso superano i benefici ad esso connessi. Naturalmente, nulla garantisce che tale soglia di "inquinamento ottimale" sia poi il livello di inquinamento effettivamente generato dall'attività dell'uomo, tutt'altro. Ecco allora che l'economista ambientale si interroga su come fare sì che il livello di inquinamento effettivo ed il livello di inquinamento ottimale coincidano. Al fine di evidenziare quanto tale intento possa essere ambizioso, il caso delle emissioni di gas serra da parte del settore agricolo è particolarmente opportuno.

Consideriamo il caso di una azienda agricola che coltiva riso e che di conseguenza emette gas serra. Tale azienda, nello svolgere la sua attività produttiva, genera un beneficio, la produzione di riso, ed un danno, l'inquinamento dovuto alle emissioni di gas serra. Come intuibile, la produzione di riso si spingerà fino ad un livello tale per cui il costo di una unità ag-giuntiva di prodotto supererà il guadagno che da questa unità aggiuntiva si può trarre, non consentendo cioè ulteriori margini di profitto.

Lavoro presentato al seminario scientifico sul riciclo delle biomasse in agricoltura (Giornata di Studio dell'Osservatorio Nazionale Operante per i Fertilizzanti). RICICLA, Rimini, 11 novembre 2000

*The opinions expressed in the article are those of the author and they may not necessarily reflect those of the Food and Agriculture Organization of the United Nations

Un semplice grafico (I) ci consentirà di capire meglio il senso delle mie parole. Considerando la quantità di riso prodotta sull'asse orizzontale ed il profitto ad essa associato su quello verticale, quanto appena detto significa che all'aumentare della produzione è associato un

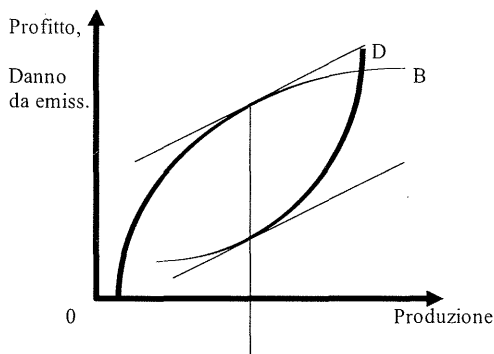


Fig. I

lo svolgere la sua attività produttiva, non genera soltanto benefici, ma anche danni: l'inquinamento dovuto alle emissioni di gas serra che l'attività produttiva inevitabilmente genera. Ad ogni livello di produzione si può allora associare un certo livello di emissioni inquinanti ed un certo livello di danno, dovuto all'inquinamento stesso. Tale danno però, dato l'accumulo in atmosfera dei gas serra, tende ad aumentare sempre di più ad ogni unità aggiuntiva di emissioni inquinanti. Essendo le emissioni inquinanti direttamente connesse

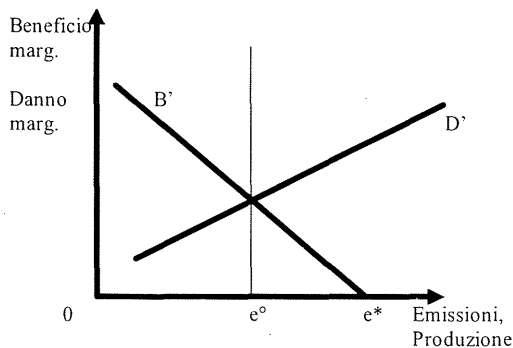


Fig. II

al livello di produzione, il danno ad esse connesse può essere rappresentato dalla seguente curva (B) sul grafico I. A differenza del profitto esso è marginalmente crescente e sul grafico II potrà essere rappresentato dalla curva D'.

Il "beneficio marginale" connesso alla attività produttiva si dice allora essere "decescente" e potrà essere facilmente rappresentato dalla curva B' del grafico II. La nostra azienda agricola però, nello svolgere la sua attività produttiva, non genera soltanto benefici, ma anche danni: l'inquinamento dovuto alle emissioni di gas serra che l'attività produttiva inevitabilmente genera. Ad ogni livello di produzione si può allora associare un certo livello di emissioni inquinanti ed un certo livello di danno, dovuto all'inquinamento stesso. Tale danno però, dato l'accumulo in atmosfera dei gas serra, tende ad aumentare sempre di più ad ogni unità aggiuntiva di emissioni inquinanti. Essendo le emissioni inquinanti direttamente connesse

al livello di produzione, il danno ad esse connesse può essere rappresentato dalla seguente curva (B) sul grafico I. A differenza del profitto esso è marginalmente crescente e sul grafico II potrà essere rappresentato dalla curva D'.

Abbiamo già sottolineato che ad ogni livello di produzione è associato un livello di emissioni inquinanti. Se per semplicità ammettiamo che ad ogni unità di produzione corrisponde una unità di emissioni inquinanti, nel grafico II possiamo considerare il livello di emissioni inquinanti sull'asse orizzontale. In tale gra-

fico, osservando l'andamento delle curve del beneficio marginale e del danno marginale, si può intuire che il livello di emissioni inquinanti socialmente ottimale debba essere e^* . Infatti, per un livello e^* di emissioni inquinanti si verifica l'uguaglianza fra il beneficio marginale ed il danno marginale ad esse associati. Ma tale livello di emissioni inquinanti non rappresenta il livello effettivo di emissioni generato dalla nostra azienda agricola, cui converrà produrre fino a che il suo margine di profitto risulti nullo e cioè fino ad un livello di emissioni inquinanti pari ad e^0 . Questo accade perché l'azienda non subisce né direttamente, né esclusivamente i danni dovuti all'inquinamento. Anzi, essendo l'inquinamento da gas serra un fenomeno globale, si può affermare che l'azienda trasferisce la totalità dei danni prodotti dalla sua attività sulla società, generando una cosiddetta "esternalità negativa"¹.

Abbiamo già accennato al fatto che è interesse dell'economista ambientale definire dei meccanismi di regolamentazione che portino il livello di emissioni inquinanti effettivo a coincidere con il livello di emissioni inquinanti ottimale; senza dovere necessariamente ricorrere a misure coercitive. Queste ultime sono spesso inapplicabili ed il caso di una azienda agricola, che nel produrre genera emissioni di gas serra, è emblematico in tal senso. Infatti, la nostra azienda agricola non è certo la sola ad operare sul territorio e data la numerosità delle aziende agricole, nonché la complessità delle relazioni causa-effetto fra l'attività agricola stessa e l'inquinamento da gas serra, e considerando che l'inquinamento da gas serra rilevabile in atmosfera non è certo solamente dovuto al settore agricolo, non è possibile definire le responsabilità individuali delle singole aziende agricole per l'inquinamento da gas serra rilevato. In via generale infatti, proprio per l'impossibilità di definire responsabilità individuali, l'inquinamento da parte del settore agricolo si definisce "da fonte non localizzata"². Il fatto che nello specifico ci si stia riferendo all'inquinamento da gas serra non fa altro che esacerbare le difficoltà.

Molto semplicisticamente, si potrebbe pensare di far pagare l'azienda agricola per i danni causati dall'inquinamento da gas serra o per l'uso che essa fa di una risorsa produttiva; l'atmosfera. Purtroppo però, per i motivi appena sottolineati, il cosiddetto principio dell'inquinatore pagatore non può essere applicato nel caso dell'inquinamento da fonte agricola, soprattutto se si tratta di inquinamento da gas serra. Infatti, il danno dovuto all'inquinamento da gas serra è un danno diffuso ed è, per questa sua natura, non riconducibile, neanche in parte, a ben identificate aziende agricole, affinché esse paghino la loro parte. Non solo, nemmeno si può pensare di far pagare l'azienda agricola per l'uso che essa della risorsa atmosfera. Infatti, l'atmosfera è tipicamente non posseduta da alcuno.

Per quanto banale, questa osservazione ci consente però di evidenziare gli aspetti salienti delle problematiche connesse all'inquinamento

da gas serra. Come già accennato, questo tipo di inquinamento è per sua natura globale ed i problemi ad esso associati sono conseguenza proprio del fatto che essi si verificano in un contesto in cui non vi sono diritti di proprietà. Non appartenendo ad alcuno l'atmosfera è di fatto considerata come una risorsa da poter utilizzare liberamente e la letteratura economica ha evidenziato come si tenda ad abusare delle risorse utilizzabili liberamente. A tale riguardo, è opportuno distinguere fra risorse che chiameremo di "libero uso" e risorse di "proprietà comune". Naturalmente, sono proprio le risorse di libero uso che tendono ad essere sfruttate a dismisura. Questo rischio è invece meno pressante nel caso di risorse di proprietà comune. Infatti, la gestione comune delle risorse tende ad essere più equilibrata e può evitare che si verifichino le esternalità negative cui abbiamo precedentemente accennato. Tecnicamente, la risorsa atmosfera è una risorsa di libero uso, ma se si definiscono accordi internazionali, quali il Protocollo di Kyoto, che mirano a definire dei limiti all'abuso di tali risorse non si fa altro che trasformarle in risorse di proprietà comune e pertanto meglio gestibili. Ma naturalmente, ciò non significa avere risolto il problema.

Una caratteristica rilevante delle risorse di proprietà comune, e quindi dell'atmosfera dal Protocollo di Kyoto in poi, è quella di essere dei "beni pubblici". I beni pubblici sono definibili come beni non conflittuali e non escludibili. Infatti, l'uso che una persona fa di un bene pubblico, dell'atmosfera ad esempio, non riduce le possibilità di utilizzo da parte di un'altra persona (non conflittualità); non solo, tenendo sempre a mente l'atmosfera come esempio, è tecnicamente impossibile impedire che un bene pubblico venga utilizzato (non escludibilità). Ecco allora perché la regolamentazione di una risorsa come l'atmosfera deve avvenire attraverso la stipulazione di accordi internazionali quali il protocollo di Kyoto. Infatti, date le sue caratteristiche di bene pubblico, nessuna nazione avrebbe interesse ad agire autonomamente al fine di tutelare l'atmosfera e soprattutto, anche se lo facesse, non servirebbe a nulla se le altre non facessero altrettanto. Non solo, una volta stipulato un accordo internazionale di tutela di una risorsa ad uso libero (e quindi trasformatola in risorsa di proprietà comune) è necessario che siano previste sanzioni applicabili e credibili, affinché non convenga assolutamente ad alcuno venire meno agli accordi presi. Purtroppo, è proprio da questo punto di vista che il Protocollo di Kyoto è alquanto fallace.

A prescindere dai suoi contenuti tecnici, che comunque possono lasciare spazio a molti dibattiti, il Protocollo di Kyoto è un accordo internazionale estremamente valido. Con esso viene dettagliatamente regolamentata una materia alquanto complessa, soprattutto nei suoi aspetti politici, ed in esso concretamente si definiscono dei meccanismi che, se rispettati, non sorprendentemente consentirebbero di raggiungere gli, altrimenti, ambi-

ziosi traguardi. Purtroppo però, il Protocollo di Kyoto è semplicemente un "accordo fra gentiluomini", che necessita essere ratificato, e, notoriamente, i governi, pur promettendolo, non si comportano affatto da gentiluomini. Infatti, come riportato dallo stesso Segretariato delle Nazioni Unite per i Cambiamenti Climatici, ad oggi, degli 84 paesi firmatari del Protocollo di Kyoto soltanto 30 hanno già ratificato l'accordo. Non solo, i termini per la sua ratifica erano addirittura previsti in una prima istanza entro il marzo 1999 e comunque nessuno dei paesi maggiormente industrializzati lo ha ratificato. Paesi come gli Stati Uniti e quelli costituenti l'Unione Europea (sia a livello unitario che dei singoli stati membri), pur operandosi per produrre al Segretariato delle Nazioni Unite appena menzionato documenti quali l'inventario delle fonti antropogeniche di emissioni di gas serra, di fatto, non ratificandolo, snobbano i contenuti del Protocollo di Kyoto.

Fatta questa osservazione, vediamo quali sono i contenuti salienti del Protocollo di Kyoto. Esso ha come preciso intento la riduzione delle possibilità di cambiamenti climatici globali indotti dalle attività umane, agendo soprattutto sulle cause principali di tali cambiamenti e quindi sulle emissioni antropogeniche di gas serra. Nel suo genere è fra i più completi e precisi accordi internazionali di indirizzo sulle politiche di riduzione e controllo degli effetti delle attività umane sull'ambiente. Esso impegna i paesi (più precisamente "le Parti") che lo ratificano ad una riduzione globale delle emissioni antropogeniche di gas serra di almeno il 5% rispetto al livello del 1990 e ciò entro il 2012. Si badi però che la riduzione individuale è differente a seconda del paese e che nessuna riduzione è prevista per la Federazione russa, la Nuova Zelanda e l'Ucraina, mentre la Norvegia, l'Australia e la Nuova Zelanda possono addirittura aumentare le loro emissioni. I settori di attività che devono essere interessati a livello prioritario dalla riduzione delle emissioni sono ripartiti in categorie: l'energia; i processi industriali; l'agricoltura; i rifiuti. Ognuna di esse comprende un certo numero di sottocategorie e nella fattispecie del settore agricolo si distingue fra la fermentazione enterica, la gestione delle deiezioni, la coltivazione del riso, i suoli agricoli, l'incendio controllato delle savane e la bruciatura dei residui agricoli.

Caratteristica fondamentale del Protocollo di Kyoto è l'incitamento affinché il raggiungimento degli obiettivi appena illustrati si realizzi in un clima di collaborazione e cooperazione internazionale. Infatti, si sottolinea come i limiti imposti alle emissioni di gas serra possano essere perseguiti individualmente o congiuntamente. Questo concetto da origine al cosiddetto principio della *joint implementation*. Essa è prevista come strumento, al fine di consentire ad un gruppo di paesi, di cooperare per attuare congiuntamente gli obblighi definiti dal protocollo. E' questo, peraltro, il caso

dell'Unione Europea, che dovrà complessivamente rispettare l'obbligo di riduzione dell'8% delle emissioni, ma al suo interno gli obblighi saranno diversi da paese a paese, in relazione a criteri che verranno consensualmente definiti a livello comunitario. Per l'Italia la riduzione richiesta è del 10%, diminuibile al 7% nel caso della CO₂ per la prevista espansione dei terreni forestali. Insieme alla *joint implementation* vengono stabiliti altri due strumenti attuativi: la *emission trading* ed il *clean development mechanism*. La *emission trading* prevede che i paesi elencati nell'allegato I, che poi sono i paesi più sviluppati, possano fra di loro trasferire o acquisire unità di riduzione delle emissioni. Il *clean development mechanism* prevede che le Parti incluse nell'allegato I assistano quelle non incluse, i paesi meno sviluppati, nel raggiungere uno sviluppo sostenibile, nell'interesse di perseguire gli obiettivi della Convenzione.

Nel Protocollo inoltre si menzionano, facendo riferimento agli studi dell'IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), tutte le misure tecnico-organizzativo-istituzionali da adottarsi al fine di raggiungere gli obiettivi prefissati e soprattutto si definiscono le metodologie cui fare riferimento per istituire un inventario nazionale delle fonti di emissioni antropogeniche e di assorbimento di gas serra. Per quanto concerne la sua validità, ho già espresso le mie positive opinioni, ma ho anche sottolineato come i suoi contenuti tecnici, appunto le misure tecnico-organizzativo-istituzionali appena accennate, possano lasciare spazio ad ampi dibattiti. Al fine di concentrarci su argomenti particolarmente pertinenti ai temi della giornata odierna, desidero fare anche richiamo ad alcune osservazioni fatte dal Prof. Sequi a riguardo della scarsa importanza attribuita al suolo dal Protocollo di Kyoto.

L'intenzione generale del Protocollo di Kyoto è volta a spingere le Parti ad implementare o ulteriormente elaborare politiche e misure di intervento che, coerentemente con le caratteristiche di ogni singola Parte, limitino, entro i margini della sostenibilità, l'influenza delle attività umane sul clima, facendo riferimento nello specifico ai gas serra, ed il settore agricolo è chiaramente indicato fra le fonti di emissione di gas serra. Nello specifico si fa riferimento "alla promozione di forme di agricoltura sostenibile che tengano in considerazione gli effetti sui cambiamenti climatici". Ecco allora come il fine generale viene riferito direttamente al settore agricolo, che poi, più degli altri settori, è interessato, anche indirettamente, dagli indirizzi di azione disposti dal Protocollo, essendo, fra l'altro, l'unico settore di produzione (fra quelli previsti nel protocollo di Kyoto) a cui è associabile un apprezzabile quantitativo di assorbimenti, oltre che di emissioni, di gas serra. Le emissioni del settore agricolo sono poi distinte in categorie, fra cui si ricomprende anche quella dei suoli agricoli.

Nonostante ciò, sembra ci si dimentichi proprio del ruolo che il suolo svolge in quanto ad assorbimento dei gas serra. Infatti, il protocollo di Kyoto individua fra le politiche e le misure da adottare, al fine di ridurre in modo sostenibile le emissioni di gas serra, la "protezione e l'incentivazione degli assorbimenti e delle riserve di gas serra", non prevede però esplicitamente, fra i settori interessati dalle sue disposizioni, i cambiamenti nell'uso del suolo. Eppure, l'importanza di una esplicita considerazione di tale settore si fa evidente se si considera che esso è assorbitore netto di gas serra.

Non solo: come mai non si fa clamore in alcuno dei documenti tecnici di corredo al Protocollo di Kyoto dell'utilità di una restituzione di sostanza organica al suolo? Che è poi a cardine del ciclo di assorbimento-emissione dell'anidride carbonica da parte del suolo. Semplici calcoli di prima considerazione del problema ci consentono di affermare che la diminuzione di un semplice 0,1% di C nel suolo (corrispondente a $5 \cdot 10^3$ kg di C, ossia $1,83 \cdot 10^4$ kg di CO_2 emessa per ettaro) equivale, a livello dei suoli agricoli nazionali, alla emissione di $2,75 \cdot 10^{11}$ kg di CO_2 . Emissioni di gas serra di tale natura non vengono però inventariate. Se ciò avvenisse, si noterebbe che una inversione della tendenza alla riduzione della sostanza organica nei suoli, e quindi la definizione di politiche di tutela del settore agricolo volte alla restituzione della sostanza organica ai suoli, certo contribuirebbe in senso positivo ai fini dell'assorbimento anziché dell'emissione di gas serra.

Note

1 Con il termine "esternalità" si intendono gli effetti che, al di fuori delle transazioni di mercato, l'attività produttiva di un soggetto genera sul benessere di un altro soggetto. Se tali effetti diminuiscono il benessere di quest'ultimo, l'esternalità sarà detta negativa. Ma può accadere anche viceversa e l'esternalità sarà detta positiva.

2 Con il termine "inquinamento da fonte non localizzata" ci si riferisce a quella parte di inquinamento che, per motivi tecnici (complessità delle relazioni causa-effetto fra attività produttiva ed inquinamento generato) o economici (numero delle fonti inquinanti), non è riconducibile a fonti inquinanti distinguibili ed identificabili individualmente.



IL RICICLO DELLE CENERI

Fabio Tittarelli

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante

Via della Navicella, 2-4 00184 Roma

Introduzione

La pratica del riciclaggio, nelle società moderne, costituisce il modo più opportuno di gestione dei rifiuti, in quanto consente di trasformare un prodotto di scarto (che rappresenta una voce di costo) in uno commerciabile, garantendo nello stesso tempo la chiusura dei cicli biogeochimici degli elementi nutritivi attraverso il ritorno al suolo di ciò che nel suolo è stato prodotto (Sequi *et al.*, 1996). Oltre ai residui organici, un'altra problematica inerente alla gestione dei rifiuti è quella relativa allo smaltimento delle ceneri. Esistono diverse tipologie di ceneri che si differenziano sostanzialmente sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali da cui derivano. Attualmente le ceneri che possono essere riciclate attraverso un processo di compostaggio per la produzione di un ammendante ai sensi della normativa 748/84 sui fertilizzanti sono le "ceneri di combustione di sanse esauste e di scarti vegetali" (punto 16 "Rifiuti compostabili" lettera n dell'Allegato 1, suballegato 1 del Decreto del Ministero dell'Ambiente del 5 febbraio 1998 "Individuazione dei rifiuti non pericolosi sottoposti alle procedure semplificate di recupero ai sensi degli articoli 31 e 33 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22"). Una seconda tipologia di ceneri è costituita dalle ceneri da CDR (combustibile derivato da rifiuti). La produzione di combustibile derivato da rifiuti (CDR) rappresenta l'attività di recupero prevista per i rifiuti solidi urbani ed assimilati ad esclusione delle frazioni derivanti da raccolta differenziata (punto 14 "Rifiuti recuperabili da RSU e da rifiuti speciali non pericolosi assimilati per la produzione di CDR", Allegato 1, suballegato 1 del Decreto del Ministero dell'Ambiente del 5 febbraio 1998 "Individuazione dei rifiuti non pericolosi sottoposti alle procedure semplificate di recupero ai sensi degli articoli 31 e 33 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22"). Nella produzione di CDR è ammesso, per una percentuale massima del 50% in peso, l'impiego di rifiuti dichiarati assimilati agli effetti di tale recupero costituiti da: plastiche non clorurate, poliaccoppiati, gomme sintetiche non clorurate, resine e fibre artificiali e sintetiche con contenuto di cloro minore di 0,5% in massa e pneumatici fuori uso.

Un terza tipologia di ceneri è data dalle ceneri di carbone che in Italia vengono prodotte per combustione nelle centrali termoelettriche dell'ENEL in una quantità stimata di 750.000 t/anno. Allo stato attuale le ceneri trovano collocazione principalmente nell'industria delle costruzioni, anche se numerose ricerche sono state realizzate per studiarne la possibile utilizzazione in campo agronomico. In particolare sono stati valutati l'effetto nutritivo dell'aggiunta di ceneri al terreno (apporto di microelementi), il suo effetto correttivo sul pH nei terreni acidi, oppure l'effetto ammendante attraverso il miglioramento delle caratteristiche fisiche nei terreni mal strutturati (Page *et al.*, 1979; Adriano *et al.*, 1980; Petruzzelli *et al.*, 1987; Varallo, 1991; Brodie *et al.*, 1996; Tripathy e Sahu, 1997). Le principali limitazioni nell'uso delle ceneri volanti di carbone in agricoltura sono legate all'alto grado di alcalinità ed al contenuto di metalli pesanti. Sono stati recentemente effettuati anche numerosi studi sulla possibilità di aggiungere le ceneri di carbone a fanghi di depurazione (Wong e Lai, 1996; Wong *et al.*, 1997) o per co-compostare la lettiera proveniente da allevamento avicolo.

L'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante, in collaborazione con l'ENEL - Polo Termico di Brindisi, prima della pubblicazione del Decreto del Ministero dell'Ambiente sopra menzionato, ha effettuato delle ricerche sulle potenzialità di riciclo delle ceneri volanti di carbone come matrice nel processo di compostaggio (Tittarelli *et al.*, 1998a; Tittarelli *et al.*, 1998b).

L'obiettivo principale dei lavori realizzati è stato quello di valutare la qualità di un compost prodotto mediante l'aggiunta, all'inizio del processo di compostaggio, di ceneri di carbone. Tale valutazione è stata effettuata mediante confronto con un compost ottenuto utilizzando le stesse matrici organiche senza l'aggiunta di ceneri.

Come è noto, i parametri qualitativi per la valutazione di un compost dipendono dalla destinazione d'uso del prodotto finale, ma il livello di stabilità della sostanza organica in esso contenuta e l'assenza di eventuali effetti stressanti sul sistema suolo nel suo complesso, consentono di valutare la qualità agronomica ed ambientale del prodotto ottenuto.

Si è fatto ricorso, pertanto, a parametri chimici e chimico-fisici di caratterizzazione della stabilità della sostanza organica ed a parametri microbiologici, quali indicatori di un'eventuale perturbazione del sistema suolo in seguito all'ammendamento. Poiché durante il processo di compostaggio la sostanza organica è soggetta a trasformazioni metaboliche complesse che portano alla formazione di composti organici stabili, caratterizzati dalla presenza di una frazione umo-simile, la determinazione della quantità e qualità di queste sostanze, mediante l'utilizzazione di parametri di umificazione

e di opportune tecniche termoanalitiche, consente una valutazione della qualità del compost.

Per quanto riguarda i parametri microbiologici, sono stati considerati il contenuto in carbonio della biomassa microbica, la respirazione microbica ed il quoziente metabolico (qCO_2). Quest'ultimo parametro, che esprime la CO_2 sviluppata per unità di biomassa (respirazione specifica della biomassa) si è dimostrato un valido indicatore di stress ambientale (Nannipieri *et al.*, 1997). In condizioni controllate di temperatura, umidità del suolo e disponibilità di substrato il quoziente metabolico aumenta se i microorganismi sono stressati da agenti inquinanti (Leita *et al.*, 1995). Sono state date differenti interpretazioni per spiegare l'andamento di questo parametro. Una delle ipotesi è che gli stress ambientali possano spingere la biomassa microbica del suolo a convogliare più energia nel proprio mantenimento piuttosto che nella crescita, tanto che una maggiore quantità di carbonio assimilato dalla biomassa viene respirato come CO_2 (Killham e Firestone, 1984).

Materiali e metodi

Ceneri volanti di carbone. Le ceneri volanti di carbone (CFA) utilizzate in questo lavoro costituiscono il prodotto di combustione di carbone sudafricano proveniente dalla centrale termoelettrica ENEL di Brindisi. Le principali caratteristiche chimico-fisiche delle ceneri sono riportate in Tabella I.

Tabella I. Principali caratteristiche chimico - fisiche delle ceneri volanti di carbone

	Si	Al	Ca	Fe	Mg	K	S
g kg ⁻¹	200.0	161.8	52.9	31.3	8.6	5.2	0.11
	B (sol)	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn	pH
mg kg ⁻¹	5.7	0.5	63.3	155.9	75.5	112	11.3

Compost. In questo studio sono stati considerati due compost (C1 e C2), prodotti dall'ENEL - Polo Termico di Brindisi. I materiali di partenza, con le relative quantità percentuali, sono: sanse di olive (50% in C1 ed in C2), residui di potatura (30% in C1 e 20% in C2) e residui organici dei mercati ortofrutticoli (20% in C1 e C2). La composizione della miscela iniziale del compost C2 differisce da quella del compost C1 per l'aggiunta del 10% in peso di ceneri all'inizio del processo di compostaggio.

In laboratorio, una terza tipologia di compost ($C_{lab 1}$) è stata preparata mediante l'aggiunta del 10% in peso di CFA al compost C1, alla fine del processo di compostaggio. A questo campione sono state applicate le sole tecniche termoanalitiche.

I campioni sono stati seccati in stufa a 40°C, macinati, vagliati a 0.5 mm e conservati per le successive analisi.

Estrazione, frazionamento e determinazione del carbonio organico. La sostanza organica è stata estratta mediante dibattimento di 2 g di campione con 100 ml di una soluzione 0.1 N NaOH/Na₄P₂O₇ per 48 ore a 65°C. L'estratto è stato quindi successivamente frazionato per acidificazione e purificazione su colonna cromatografica di polivinilpirrolidone secondo il metodo proposto da Sequi et al. (1986) e modificato da Ciavatta et al. (1990).

Il carbonio organico totale (TOC%) è stato determinato, su 80 mg di campione, mediante il metodo di ossidazione in ambiente acido con K₂Cr₂O₇ 2N (Springer and Klee, 1954). La determinazione del carbonio organico estraibile (TEC%) e del carbonio degli acidi umici e fulvici (C_{HA+FA}%) è stata effettuata su un'aliquota degli estratti seguendo la medesima procedura di ossidazione.

Il grado di umificazione (DH%) e l'indice di umificazione (HI) dei compost sono stati calcolati, secondo Ciavatta et al. (1990), mediante le seguenti formule:

$$DH\% = C_{HA+FA} / 100 / TEC \quad HI = NH / C_{HA+FA}$$

dove NH = TEC - C_{HA+FA} rappresenta il carbonio non umificato.

Il residuo alla calcinazione è stato determinato per combustione in muffola a 650°C, fino al raggiungimento della costanza di peso.

Analisi Termica. Le tecniche termoanalitiche sfruttano le proprietà chimiche e fisiche di una sostanza o di una miscela in funzione della temperatura. Le tecniche utilizzate nel seguente lavoro sono le seguenti:

calorimetria a Scansione differenziale (DSC), che misura l'energia richiesta per ristabilire l'equilibrio termico tra il campione e la sostanza di riferimento, permettendo la misura del calore fornito in funzione della temperatura in una reazione o trasformazione termicamente controllata;

termogravimetria (TG), che registra il peso del campione, nel corso di una scansione termica in ambiente controllato, in funzione della temperatura o del tempo.

La DSC e la TG sono state condotte con un analizzatore termico differenziale simultaneo Netzsch STA 409, dotato di testa di misura DSC a flusso di calore e termocoppia in Pt/PtRh, nelle seguenti condizioni: atmosfera di aria, velocità di scansione pari a 10°C/min, crogioli di allumina, caolinite calcinata come sostanza di riferimento termicamente inerte, quantità di campione circa 35 mg.

Respirazione. La mineralizzazione del carbonio organico dei compost C1 e C2 è stata seguita mediante il metodo statico di Isermeyer (1952), standardizzato per la respirazione del suolo, parzialmente modificato. A 25 g di terreno Rutulo (R) secco all'aria e vagliato a 2 mm, è stata aggiunta una quantità di compost C1 (R-C1) e C2 (R-C2) corrispondente a 10 g di C per kg di suolo. Le principali caratteristiche del terreno Rutulo sono riportate in Tabella II. La determinazione della CO₂ evoluta è stata effettuata, dopo incubazione a temperatura ed umidità controllate, a tempi prestabiliti (1, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 22, 28, 35, 45 e 59 giorni). La respirazione relativa al solo terreno Rutulo è stata utilizzata come controllo.

Tabella II. Analisi fisico - chimiche del terreno Rutulo

Descrizione	Unità di misura	Valori
scheletro	%	assente
sabbia	%	47.1
limo	%	25.1
argilla	%	27.8
tessitura	-	franco-argillosa
reazione (1: 2.5)	-	6.9
azoto totale	%	0.2
TOC	%	2.1
CSC	meq/ 100 g	31.78
Ca	meq/ 100 g	21.47
Mg	meq/ 100 g	6.45
Na	meq/ 100 g	0.74
K	meq/ 100 g	3.58

Biomassa microbica. Il carbonio della biomassa (C_b) è stato determinato con il metodo della fumigazione-estrazione (Anderson e Domsch, 1978; Vance et al., 1987) sui campioni provenienti dalla prova allestita per la stima della respirazione. La determinazione è stata effettuata al 59° giorno di incubazione corrispondente al raggiungimento delle condizioni di equilibrio del sistema. Durante la fumigazione è stato utilizzato CHCl₃, esente da CH₃CH₂OH, per un periodo di 18 ore in assenza di luce.

Il C_b dei campioni fumigati e non, è stato estratto dibattendo con una soluzione di K₂SO₄ 0.5 M, in rapporto di estrazione di 1:4, in agitatore a scosse a 150 scosse × min⁻¹ per 1 ora. Il carbonio organico negli estratti così ottenuti è stato determinato effettuando l'ossidazione con K₂Cr₂O₇ (Vance et al., 1987).

Quoziente metabolico. E' stato calcolato il quoziente metabolico q(CO₂), cioè la respirazione specifica per unità di biomassa microbica (Anderson e Domsch, 1990) secondo la seguente formula:

$$q(\text{CO}_2) = \text{mg}(\text{C-CO}_2 \text{ basale}) \times \text{kg}(\text{suolo secco a } 105^\circ\text{C})^{-1} \times [\text{mg}(\text{C}_b) \times \text{kg}(\text{suolo secco a } 105^\circ\text{C})^{-1}]^{-1}$$

Resultati e Discussione

Le analisi chimico-fisiche dei due compost prodotti sono riportati in Tabella III e confrontati con i limiti in metalli pesanti previsti dalla legge 748/84 sui fertilizzanti. Per entrambe le tipologie di ammendante prodotte, il contenuto in elementi potenzialmente tossici è minore rispetto ai limiti restrittivi imposti dalla normativa.

Tabella III. Principali parametri chimico - fisici dei compost C1 e C2 e limiti di legge (valori riferiti alla sostanza secca a 105°C)

Parametro	C1	C2	legge 748/84
pH	7.6	7.8	8.5
ceneri (%)	21.5	40.9	-
C org. totale (%)	41.1	31.9	> 25
N totale (%)	2.02	1.29	-
P ₂ O ₅	0.28	0.47	-
K ₂ O (%)	1.03	0.61	-
C/N	20.3	24.7	< 25
C degli acidi unici e fluvici(%)	17.1	10.9	>7
Cadmio totale (mg/kg)	< 0.5	< 0.5	1.5
Mercurio totale (mg/kg)	< 0.5	< 0.5	1.5
Rame totale (mg/kg)	19.8	27.5	150
Zinco totale (mg/kg)	30.0	27.7	500
Nichel totale (mg/kg)	9.0	17.7	50
Piombo totale (mg/kg)	1.2	6.0	140
Cromo (VI) (mg/kg)	n.r.*	n.r.*	0.5

* n.r.= non rilevabile

Il residuo alla calcinazione, TOC, TEC, C_{HA+FA}, grado di umificazione ed indice di umificazione del compost C1 e C2, sono riportati in Tabella IV.

Tabella IV. Residuo della calcinazione, TOC, TEC, C_(HA+FA), grado di umificazione (DH) e indice di umificazione (HI) dei compost

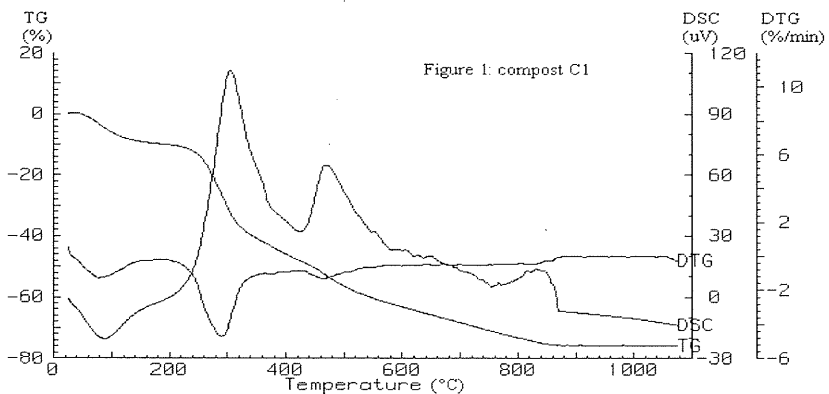
Compost	Residuo alla calcinazione	TOC %	TEC %	C _(HA+FA) %	DH %	HI %
C1	21.5	41.1	24.7	17.1	69.2	0.44
C2	40.9	31.9	15.7	10.9	69.4	0.44

I residui alla calcinazione dei compost C1 e C2 sono significativamente differenti (rispettivamente 21.5% e 40.9%); ciò è dovuto alla dif-

ferente composizione delle matrici nella miscela iniziale dei due prodotti, essendo stati aggiunti all'inizio del processo di compostaggio del compost C2, ceneri di carbone in quantità pari al 10% in peso. La riduzione della massa e del volume del cumulo di compost durante la degradazione aerobica della sostanza organica ha determinato un aumento della concentrazione della componente inorganica. Conseguentemente il carbonio organico totale (TOC) è maggiore in C1 (41.1%) che in C2 (31.9%). Per quanto riguarda i parametri di umificazione, il DH e HI mostrano, per le due tipologie di compost, valori comparabili che, secondo Ciavatta et al. (1990), sono indicativi di sostanza organica umificata e stabilizzata (HI = 0-0.5; DH > 60%)

D'altra parte un'analisi comparata dei termogrammi relativi ai campioni C1 e C2 ha messo in evidenza le differenze nella stabilità della sostanza organica.

Entrambi i compost sono caratterizzati da una curva della DSC con un picco endotermico intorno ai 97°C, tipico di una reazione di disidratazione e due picchi esotermici rispettivamente nel intervallo di temperatura di 305-312°C ed a 467°C, corrispondenti a due differenti frazioni organiche aventi differente stabilità termica. L'intensità relativa dei picchi è un indice di differente complessità strutturale ed è caratteristica di sostanza organica umificata (Mitchell and Birnie, 1970; Dell'Abate *et al.*, 1997). Il confronto delle curve DSC per C1 e C2, riportate rispettivamente in Fig. 1 e 2, mostra in C2 una esoterma più intensa a 467 °C che a 312 °C, mentre si registra un comportamento termico opposto in C1. Questo andamento della DSC rivela un maggiore stabilità della sostanza organica in C2 piuttosto che nel compost C1. Queste reazioni esotermiche sono associate a due distinte perdite di peso, registrate sulle curve TG, che indicano le dimensioni di ciascuna frazione della sostanza organica. Nel compost C1 la frazione meno stabile contribuisce per il 63% alla somma delle perdite di peso che si verificano nelle due reazioni esotermiche, mentre in C2 questo contributo si riduce al 48%.



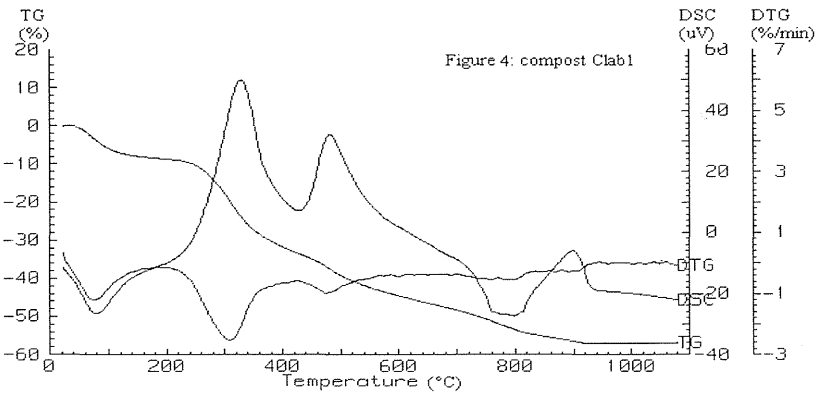
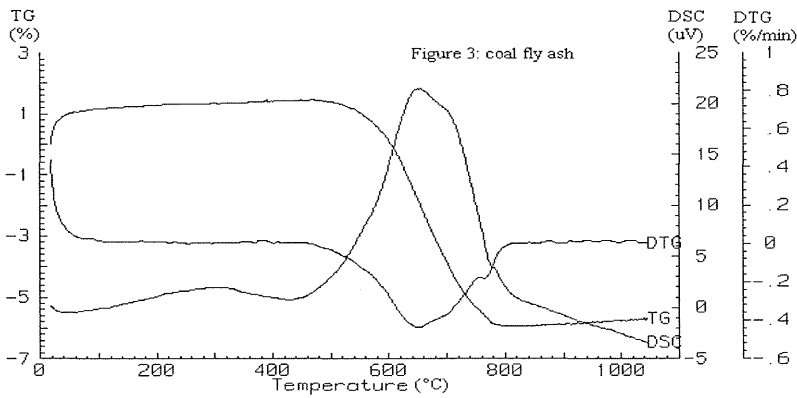
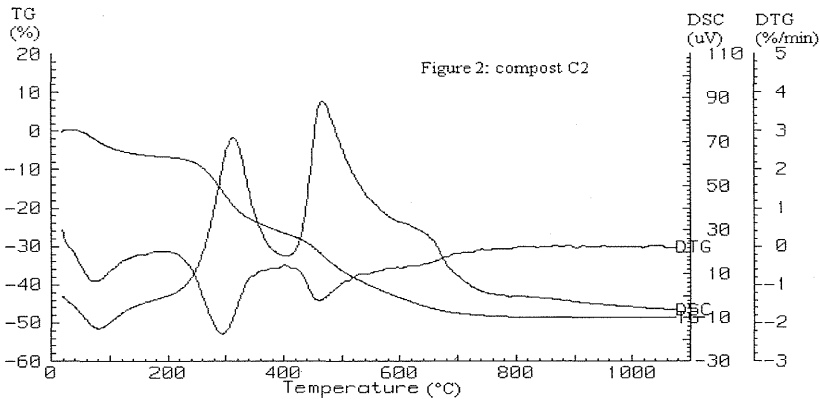


Fig. 1, 2, 3, 4. Termogrammi relativi rispettivamente al compost C1, C2, alle ceneri di carbone ed al compost C_{lab 1}

La curva DSC del campione di cenere volante del carbone ha mostrato una reazione esotermica nell'intervallo di temperatura di 440-840°C (Fig.3), caratterizzato da un massimo a 651°C dovuto all'ossidazione

del carbone grafittico. La perdita di peso del campione, ottenuto dai dati della TG, è stata calcolata pari al 6% del peso tal quale del campione di ceneri. Le cinetiche di reazione del campione CFA, lente fino al raggiungimento dei 560°C e la modesta quantità di calore prodotta (dedotta dall'area sottesa al picco), non consentono di considerare il comportamento termico del C2 come semplice somma degli effetti termici dei campioni C1 e CFA. La stabilità termica del campione C2 è probabilmente dovuta ad un'interazione fra i materiali organici ed inorganici posti a compostare.

Per verificare questa ipotesi è stata valutata la stabilità termica di un compost, quando le ceneri volanti sono addizionate alla fine del processo di compostaggio ($C_{lab 1}$). Le curve DSC mostrano chiaramente che i termogrammi di C1 (Fig.1) e di $C_{lab 1}$ (Fig.4) sono quasi sovrapposti. Le ceneri volanti di carbone addizionate alla fine del processo di compostaggio non sembrano determinare la stabilizzazione della sostanza organica.

I parametri microbiologici relativi alla dimensione ed all'attività della biomassa microbica sono riportati in Tabella V.

Tabella V. Parametri microbiologici

Campioni	C-CO ₂ totale mg C (kg s.s.) ⁻¹	C-CO ₂ basale mg C (kg s.s.) ⁻¹	C biomassa mg C (kg s.s.) ⁻¹	qCO ₂ (C-CO ₂ basale/C biom)
R	1409	10.9	158	0.069
R-C1	3134	21.8	362	0.060
R-C2	3317	17.7	325	0.054

Le tesi relative al terreno ammendato con i compost C1 e C2 evidenziano il medesimo andamento nella mineralizzazione della sostanza organica; non si riscontrano pertanto sostanziali differenze nell'attività metabolica della biomassa microbica del suolo in termini di degradabilità ed appetibilità dei compost oggetto di studio (Figura 5).

Il valore del carbonio della biomassa del terreno (Rutulo) risulta pari a 158 mg/kg di terreno secco. Nelle due tesi R-C1 e R-C2 i valori riscontrati sono rispettivamente 362 mg/kg e 325 mg/kg, evidenziando un paragonabile accrescimento della biomassa microbica nei due sistemi.

Il quoziente metabolico qCO₂, normalizzando i dati relativi alla respirazione ed al contenuto della biomassa microbica, ci consente di esprimere un giudizio sull'eventuale alterazione del sistema analizzato. I valori del quoziente metabolico ottenuti per i sistemi R-C1 e R-C2 ci confermano che l'aggiunta di ceneri all'inizio del processo di compostaggio non comporta alcun effetto perturbante una volta che il prodotto finito viene utilizzato come ammendante (Tabella V).

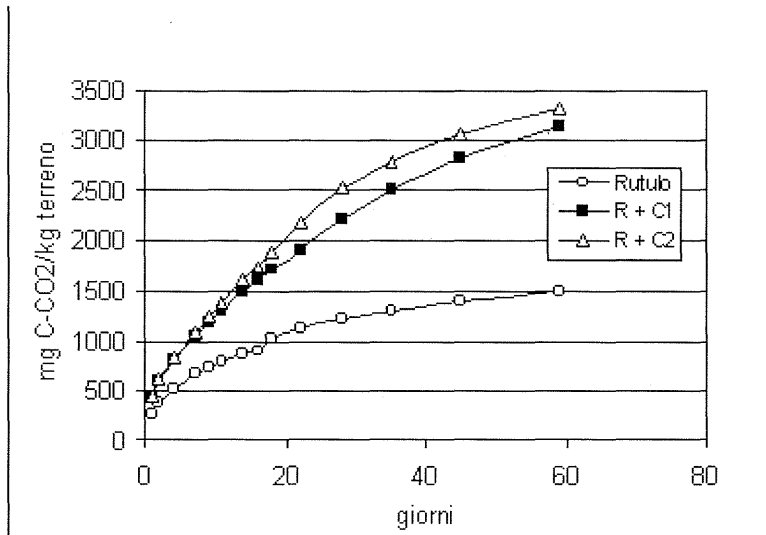


Fig. 5. Curve cumulative del C-CO₂ sviluppato per mineralizzazione

Conclusioni

Le analisi chimiche e microbiologiche effettuate sui campioni di compost C1 e C2 e sul terreno ammendato con i due prodotti in esame hanno messo in evidenza una sostanziale identità delle loro caratteristiche qualitative. Mentre però i parametri chimici dell'umificazione mostrano che le trasformazioni che avvengono a carico della sostanza organica durante il processo di compostaggio non sono influenzate dalla presenza di ceneri di carbone nella miscela di partenza, le tecniche termoanalitiche hanno evidenziato una maggiore stabilità termica in C2 rispetto a C1. Le analisi effettuate su di una terza tipologia di compost ($C_{lab 1}$) hanno dimostrato l'importanza dell'aggiunta di CFA all'inizio del processo di compostaggio ed è stata ipotizzata la formazione di complessi fra i composti umificati ed i metalli presenti nelle ceneri per spiegare tale comportamento termoanalitico.

I parametri microbiologici misurati per valutare eventuali effetti stressanti di un ammendamento con il compost C2 sul sistema suolo nel suo complesso, non hanno evidenziato differenze rispetto alla tipologia di compost ottenuta senza aggiunta di cenere di carbone.

Secondo queste prove preliminari, le ceneri volanti di carbone, nonostante l'elevato grado di alcalinità ed il contenuto in metalli pesanti, non costituirebbero un impedimento alla produzione di un compost di qualità qualora vengano impiegate in quantità pari al 10% in peso della miscela ed

all'inizio del processo di compostaggio. Ulteriori approfondimenti si ritengono necessari per valutare le interazioni delle ceneri con la sostanza organica ed il suo effetto sulla disponibilità dei metalli pesanti.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare le mie colleghe Dr.ssa Maria Teresa Dell'Abate e Dr.ssa Alessandra Trincherà che hanno reso possibile la realizzazione delle ricerche oggetto di questo lavoro ed il Dr. Giuseppe Varallo che ha fornito i compost.

Bibliografia

- ADRIANO D.C., PAGE A.L., ELSEEWI A.A., CHANG A.C., STRAUGHAN I. (1980). Utilization and disposal of fly ash and other coal residues in terrestrial ecosystems: a review. *J. Environ. Qual.* 9(3), 333-344.
- ANDERSON J.P.E. e DOMSCH K. H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215-221.
- ANDERSON T.H., DOMSCH K.H. (1990). Application of eco-physiological quotient (qCO₇ and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories. *Soil Biol. Biochem.* 10, 251-255.
- BRODIE H.L., CARR L.E., CHRISTIANA G.A., UDINSKEY J.R. (1996). Manufacture of artificial soil by composting coal fly ash and bottom ash with poultry litter. In: *The Science of Composting*. (De Bertoldi M., Sequi P., Lemmes B., Papi T. Eds.) Glasgow UK, Blackie Academic & Professional, part I, pp. 603-611.
- CIAVATTA C., GOVI M., VITTORI ANTISARI L. & SEQUI P. (1990). Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *Journal of Chromatography* 509, 141-146.
- Decreto del Ministero dell'Ambiente del 5 febbraio 1998 "Individuazione dei rifiuti non pericolosi sottoposti alle procedure semplificate di recupero ai sensi degli articoli 31 e 33 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22". *Supplemento Ordinario alla G.U. n.88 del 16 aprile 1998*.
- DELL'ABATE M.T., CANALI S., TRINCHERA A., BENEDETTI A., & SEQUI P. (1997) Thermal analysis in the evaluation of compost stability: A comparison with humification parameters. Nutrient cycling in agroecosystems (in press).
- KILLHAM K. and FIRESTONE M (1984) Salt stress control of intracellular solutes in streptomyces indigenous to saline soils. *Applied Environmental Microbiology* 47, 301-306
- ISERMAYER H. (1952). Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate in *Boden. Z. Pflanzenernäh. Bodenkd.* 56, 26-38.
- LEITA L., De NOBILI M., MUHIBACKOVA G., MONDINI C., MARCHIOL L. and ZERBI G. (1995). Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biology and Fertility of Soils* 19, 103-108.
- MITCHELL B.D., BIRNIE A.C. (1970) In *Differential Thermal Analysis*. Mackenzie R.C. (ed.). London, Academic Press. Vol. 1. 673-704.
- NANNIPIERI P., BADALUCCO L., LANDI L., and PIETRAMELLARA G. (1997). Measurement in assessing the risk of chemicals to the soil ecosystem. In: *Ecotoxicology: Responses, Biomarkers and Risk Assessment*,

- an OECD workshop (J.T. Zelikoff, Ed.), SOS Publications, Fair Heaven, NJ 07704, U.S.A., pp. 507-534.
- PAGE A.L., ELSESEWI A.A., STRAUGHAN I. (1979). Physical and chemical properties of fly ash from coal-fired power plants with reference to environmental impacts. *Residue rev.* 71, 83-120.
- PETRUZZELLI G., LUBRANO L., CERVELLI S. (1987). Water, Air and Soil Pollution 32, 389-395.
- SEQUI P., M. De NOBILI, L. LEITA e G. CERCIGNANI. (1986). A new index of humification. *Agrochimica*, 30:175-179.
- SEQUI P., BENEDETTI A., CANALI S., TITTARELLI F. (1996). Il ruolo del compostaggio nell'agricoltura sostenibile. *Acqua-Aria*, 3, pp. 305-309.
- SPRINGER U., KLEE J. (1954), "Prüfung der Leistungsfähigkeit von einigen wichtigeren Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs mittels Chromschwefelsäure sowie Vorschlag einer neuen Schnellmethode". *Z. Pflanzenernähr. Dang. Bodenk* 64: 1.
- STEVENSON F.J. (1994) In Humic Chemistry – Genesis, Composition, Reactions. 2nd Edition John Wiley & Sons Inc.; 378-404.
- TITTARELLI F., DELL'ABATE M.T., PIAZZA P., VARALLO G (1998a). Effect of fly ash addition on organic matter stabilisation of composts. *Proceedings of 16th World Congress of Soil Science*, Symposium 40, Montpellier 20-26 August 1998, CD-ROM.
- TITTARELLI F., MICCIULLA O., TRINCHERA A., VARALLO G. (1998b) Le ceneri volanti di carbone nel processo di compostaggio: effetti sulla stabilità della sostanza organica e sui parametri microbiologici del suolo. *Atti del XVI Convegno Nazionale S.I.C.A.*, SBR Edizioni; 365-375.
- TRIPATHY A. and SAHU R.K. (1997). Effect of fly ash on growth and yield of wheat. *Journal of Environmental Biology* 18(2), 131-135.
- VANCE E.D. BROOKES P.C., JENKINSON D.S., (1987). An extraction method for measuring microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem* 19, 703-707.
- VARALLO G. (1991). In Riciclo di Biomasse di rifiuto e di scarto e fertilizzazione organica del suolo. Realtà e prospettive, vantaggi e rischi per l'agricoltura e l'ambiente. A cura di N. Senesi e T.M. Miano. Patron Editore, Bologna, pp. 287-292.
- WONG J.W.C. FANG M., Li G.X., WONG M.H. (1997). Feasibility of using coal ash residues as co-composting materials for sewage sludge. *Environmental Technology* 18(5), 563-568.
- WONG J.W.C. and LAI K.M. (1996) Effect of an artificial soil mix from coal fly ash and sewage sludge on soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 23(4), 420-424.

NON POSSIAMO MANGIARCI LA TERRA



I.L.S.A. produce CONCIMI ORGANICI, CONCIMI ORGANOMINERALI e MICROELEMENTI COMPLESSATI con AMMINOACIDI in grado di nutrire, curare e biostimolare tutte le colture; prodotti EVOLUTI, EFFICIENTI e CONVENIENTI, frutto di ricerche e sperimentazioni continue, in grado di garantire un'alta efficienza salvaguardando nel contempo la conservazione dell'ambiente e la sicurezza dell'operatore. I.L.S.A. produce per gli agricoltori che coltivano oggi con la consapevolezza che, "su questa Terra", dovranno coltivare anche i loro figli.



BIOPROTEINE E FERTILIZZANTI

36071 ARZIGNANO (VI)

Tel. 0444/452020 r.a. - Fax 0444/671596

E Mail: ilsa@ilsaspa.it - <http://www.ilsaspa.it>