



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Geoingegneria e Tecnologie Ambientali

Ciclo XXVIII

Sistemi di fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti con specie
ad elevata produzione di biomassa in ambiente mediterraneo

ICAR/03 - INGEGNERIA SANITARIA - AMBIENTALE

Presentata da:	Marta Canu
Coordinatore Dottorato	Prof. Ing. Aldo Muntoni
Tutor	Prof. Ing. Alessandra Carucci
Cotutor	Prof. Ing. Giovanna Cappai

Esame finale anno accademico 2015 – 2016
Tesi discussa nella sessione d'esame marzo – aprile 2017

Abstract

In Sardinia there are several areas at high metal contamination and, among the most polluted ones, we can find the mining sites. Soil mining remediation is indisputable, but usually very expensive. Among several heavy metal remediation techniques currently available, phytoremediation is considered to be a low-impact technology and less expensive than classical ones.

The main objective of this work was investigating about the possibility of using autochthonous species, both bush and leguminous, for heavy metal contaminated soil phytoremediation in a xeric climate.

Atriplex halimus shrub was tested in this research work. This plant, which is a perennial, autochthonous saltbush, can produce remarkable aerial biomass amounts, and can grow in very restrictive pedo-climatic conditions. *Atriplex halimus* growth, survival and metal accumulation in aerial and radical tissues were evaluated through different tests, performed at pot scale, on a soil contaminated by mining activity. Clonal differences were also investigated. Furthermore, amendments were tested to improve the soil characteristics and identify a cheap and effective cultivation system, capable of increasing plant survival and biomass yield. Different methods were evaluated to reduce the times required for plant production before plantation. Plant cultivation by stem cutting were also studied.

Medicago polymorpha, a leguminous and Nitrogen fixing species, was tested to reduce amendments during a cultivation crop cycle. Its survival and adaptability in heavy metal contaminated soil was evaluated. This plant grows spontaneously in Mediterranean areas and it was never studied for phytoremediation before the present work.

The research work showed that *Atriplex halimus* can be considered effective for phytoremediation of Sardinian soils contaminated by mining activity. The plants grown in soils contaminated by heavy metals showed in fact a good adaptability, a significant growth and a high metal concentration level in the tissues. Moreover, this work opens up the possibility of using *Medicago polymorpha* species in phytoremediation activities due to its germination ability and plant survival observed in heavy metal polluted soils.

SOMMARIO

Abstract	1
Introduzione	5
1 CONTAMINAZIONE DA METALLI PESANTI	8
1.1 Contaminazione da metalli pesanti nel suolo	8
1.2 Contaminazione da Cadmio, Piombo e Zinco	10
1.2.1 Cadmio	10
1.2.2 Piombo	11
1.2.3 Zinco	12
1.3 Aree contaminate da metalli in Sardegna	13
1.3.1 L'area mineraria di Campo Pisano	13
1.3.2 L'area di Santa Gilla (CA)	14
2 FITORISANAMENTO	16
2.1 Tecniche di bonifica di matrici contaminate da metalli pesanti	16
2.2 Il Fitorisanamento	18
2.2.1 Metalli pesanti nelle specie vegetali superiori	20
2.2.2 Fitoestrazione	23
2.2.3 Fitostabilizzazione	24
2.2.4 Altre tecniche di fitorisanamento	25
2.2.5 Fitorisanamento assistito	26
2.3 Efficienza di estrazione dei metalli nelle attività di fitostabilizzazione e di fitoestrazione	27
2.4 Attuali applicazioni e prospettive del fitorisanamento	29
2.5 Destino finale delle biomasse ottenute da fitorisanamento: attuale situazione tecnica e normativa e prospettive future	31
2.5.1 Produzione di biocombustibili	34
3 MATERIALI E METODI	37
3.1 Piano sperimentale e obiettivi	37
3.1.1 Schema sperimentale	38
3.1.2 Obiettivi specifici	38
3.2 Materiale vegetale	40
3.2.1 <i>Atriplex halimus</i>	40
3.2.2 <i>Medicago polymorpha</i>	43
3.3 Substrati	46
3.3.1 Campo Pisano	47
3.3.2 Terriccio commerciale	47
3.3.3 Compost	48
3.3.4 Materiali inerti	48
3.3.5 Suolo agricolo	48
3.4 Sperimentazioni con <i>Atriplex halimus</i>	49
3.4.1 A1 - Studio della specie <i>Atriplex halimus</i> per il possibile uso nel fitorisanamento di siti minerari dismessi della Sardegna	49

3.4.2	A2 - Radicazione di talee di <i>Atriplex halimus</i> su suolo contaminato da metalli pesanti per valutarne la capacità di insediamento in attività di fitorisanamento	52
3.4.3	A3 - Studio dell'adattamento di giovani piante della specie <i>Atriplex halimus</i> su substrato contaminato da metalli pesanti per il loro uso in fitorisanamento	54
3.4.4	A4 - Studi preliminari sulla selezione clonale della specie <i>Atriplex halimus</i> per l'uso in attività di fitorisanamento di metalli pesanti con elevata produzione di biomassa	57
3.5	Sperimentazioni con <i>Medicago polymorpha</i>	64
3.5.1	M1 - Studi preliminari sull'utilizzo della specie <i>Medicago polymorpha</i> per attività di fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti in Sardegna	64
3.5.2	M2 - Studi sulla germinazione e l'adattamento della specie <i>Medicago polymorpha</i> su suoli contaminati da metalli pesanti in Sardegna	66
3.6	Caratterizzazione delle piante	69
3.6.1	Germinazione e sopravvivenza	69
3.6.2	Accrescimenti e biomasse	70
3.6.3	Analisi del contenuto totale dei metalli	71
3.6.4	C, N totale	72
3.6.5	Contenuto di clorofilla	72
3.7	Caratterizzazione dei substrati	74
3.7.1	pH	74
3.7.2	Analisi del contenuto totale dei metalli	75
3.7.3	Analisi delle frazioni biodisponibili dei metalli	76
3.7.4	Analisi del contenuto di Carbonio totale ed azoto totale	76
3.7.5	Fosforo biodisponibile	77
3.7.6	CSC	77
3.8	Analisi statistica	78
4	RISULTATI	80
4.1	A1 - Studio della specie <i>Atriplex halimus</i> per il possibile uso nel fitorisanamento di siti minerari dismessi della Sardegna	80
4.1.1	Introduzione	80
4.1.2	Caratteristiche dei substrati	81
4.1.3	Adattamento e sopravvivenza	83
4.1.4	Accrescimenti e biomassa	83
4.1.5	Accumulo di metalli	89
4.1.6	Conclusioni	97
4.2	A2 - Radicazione di talee di <i>Atriplex halimus</i> su suolo contaminato da metalli pesanti per valutarne la capacità di insediamento in attività di fitorisanamento	98
4.2.1	Introduzione	98
4.2.2	Caratteristiche dei substrati	99
4.2.3	Adattamento e sopravvivenza	100
4.2.4	Accrescimenti e biomassa	102
4.2.5	Clorofilla e carotenoidi	106
4.2.6	Accumulo di metalli	108
4.2.7	Conclusioni	112
4.3	A3 - Studio dell'adattamento di giovani piante della specie <i>Atriplex halimus</i> su substrato contaminato da metalli pesanti per il loro uso in fitorisanamento	113

4.3.1	Introduzione	113
4.3.2	Caratteristiche dei substrati	114
4.3.3	Adattamento e sopravvivenza	114
4.3.4	Accrescimenti e biomassa	115
4.3.5	Accumulo di metalli	119
4.3.6	Conclusioni	127
4.4	A4 - Studi preliminari sulla selezione clonale della specie <i>Atriplex halimus</i> per l'uso in attività di fitorisanamento di metalli pesanti con elevata produzione di biomassa	129
4.4.1	Introduzione	129
4.4.2	Caratteristiche dei substrati	130
4.4.3	Adattamento e Sopravvivenza	131
4.4.4	Accrescimenti e produzione di biomassa	135
4.4.5	Accumulo di metalli	141
4.4.6	Conclusioni	153
4.5	M1 - Studi preliminari sull'utilizzo della specie <i>Medicago polymorpha</i> per attività di fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti in sardegna	155
4.5.1	Introduzione	155
4.5.2	Caratteristiche dei substrati	156
4.5.3	Germinazione e Sopravvivenza	157
4.5.4	Accrescimenti e biomassa	158
4.5.5	Contenuti di azoto nei substrati e nei tessuti vegetali	160
4.5.6	Clorofilla e carotenoidi	161
4.5.7	Accumulo di metalli	163
4.5.8	Conclusioni	164
4.6	M2 - Studi sulla germinazione e l'adattamento della specie <i>Medicago polymorpha</i> su suoli contaminati da metalli pesanti in Sardegna	165
4.6.1	Introduzione	165
4.6.2	Caratteristiche dei substrati	166
4.6.3	Germinazione e Sopravvivenza	166
4.6.4	Produzione di biomassa	168
4.6.5	Conclusioni	170
5	CONCLUSIONI	171
5.1	Specie <i>Atriplex halimus</i>	171
5.2	<i>Medicago polymorpha</i>	177
5.3	Considerazioni conclusive	178
	Bibliografia	180

Introduzione

In molte aree del mondo, inclusa l'Europa, i metalli rappresentano uno tra i problemi ambientali più importanti (Akinyele e Shokunbi, 2015; EEA, 2014) e, il danno causato a livello ambientale dalla presenza di questi contaminanti, è aggravato dalla loro persistenza e immutabilità.

In Sardegna sono presenti estese aree ad elevata contaminazione da metalli, e tra quelle maggiormente colpite si possono individuare le aree interessate dalla passata attività estrattiva.

Le tecniche ingegneristiche convenzionali per il recupero di suoli contaminati, oltre ad avere costi proibitivi e generare elevate quantità di residui addizionali che devono essere a loro volta smaltiti (Ali *et al.*, 2013), possono alterare irreversibilmente le proprietà fisico-chimiche e microbiologiche dei suoli (Conesa *et al.*, 2012).

Per superare i problemi generati dai trattamenti dei suoli con tecniche convenzionali e utilizzare le indicazioni contenute nella normativa di riferimento, nelle ultime due decadi, sono state studiate tecniche biologiche, *in situ*, considerate ambientalmente compatibili e a basso costo: l'insieme di queste tecniche è chiamato "fitorisanamento" (Alkorta *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2013; Stephenson e. Black 2014; Conesa *et al.*, 2012; Mench *et al.*, 2010).

Il fitorisanamento di suoli contaminati da metalli può essere affrontato mediante due tecniche: fitoestrazione e fitostabilizzazione (Wong, 2003).

Un'attenta selezione delle specie e l'ottimizzazione della loro crescita sono dei fattori chiave della riuscita del fitorisanamento in suoli contaminati e in diverse condizioni pedoclimatiche (Kidd *et al.*, 2015). Le piante oltre che alla presenza di contaminanti, a seconda dei casi, devono resistere a deficit idrico e di nutrienti, all'acidità o salinità del substrato, alla presenza di attacchi parassitari o fungini, *etc.* Il successo del fitorisanamento dipende da un'attenta implementazione di pratiche agronomiche come per esempio la selezione della specie, rotazione, intercropping, densità di impianto, fertilizzazione e irrigazione, controllo dei parassiti (ITRC, 2009; Kidd *et al.*, 2015).

In clima arido e semiarido in particolare, la scelta delle specie vegetali, sia in attività di fitoestrazione che di fitostabilizzazione, deve tenere conto, oltre che dei problemi ambientali di un suolo contaminato, anche della scarsità idrica e spesso anche della salinità del suolo (Mendez e Maier, 2008).

Una opzione considerata rilevante, è che le piante utilizzate in attività di fitoestrazione possano avere un'ulteriore utilità economica, attraverso un concetto integrato di fitorisanamento, in cui l'attività di risanamento è accoppiata alla produzione di energia dalla biomassa e al recupero dei metall(oid)i (Kidd *et al.*, 2015; van der Ent *et al.*, 2013).

Per ottenere profitti da diverse attività di fitorisanamento possono essere utilizzate sia specie vegetali iperaccumulatrici (generalmente a bassa produzione di biomassa) che specie non iperaccumulatrici ad elevata produzione di biomassa. In quest'ultimo caso potrebbe essere la produzione di biomassa a determinare la redditività del processo, principalmente grazie all'energia da essa ottenibile (Jiang *et al.* 2015).

L'attività di ricerca sviluppata nel presente lavoro, ha come obiettivo generale indagare la possibilità di utilizzare specie autoctone legnose e specie leguminose per attività di fitorisanamento di suoli

contaminati da elevate concentrazioni di metalli pesanti in clima xerico. A tale scopo sono state studiate diverse possibilità di coltivazione, al fine di ottenere un miglior compromesso economico-produttivo e ambientale.

La specie vegetale legnosa e ad elevata produzione di biomassa scelta è *Atriplex halimus*, per la capacità di sopravvivenza che mostra in ambienti contaminati da metalli pesanti e per l'adattamento a climi xerici, che corrispondono a quelli prevalenti in diverse aree della Sardegna.

La specie leguminosa scelta è *Medicago polymorpha*, per la quale, nel presente lavoro, sono state studiate la capacità di sopravvivenza e adattamento su substrati contaminati da metalli pesanti. Tali caratteristiche non erano ancora note, per l'assenza di precedenti studi in applicazioni di fitorisanamento. Questa specie, è stata scelta perché oltre ad essere una leguminosa azotofissatrice che ben si adatta al clima della Sardegna, è una specie autoriseminante, che non necessita interventi di semina ogni anno.

La scelta di specie autoctone legnose è derivata dalla idea di utilizzare piante capaci di adattarsi alle estreme condizioni ambientali e alla scarsità idrica tipica delle aree mediterranee, ma caratterizzate anche da elevata produzione di biomassa e capaci di assorbire ed accumulare nei loro tessuti elevate quantità di metalli. Quest'ultimo aspetto consente di valorizzare l'aspetto economico produttivo in quanto rende praticabile un possibile sfruttamento delle biomasse ai fini energetici.

Per questo motivo, attraverso diverse sperimentazioni su scala di laboratorio, piante della specie *Atriplex halimus* sono state fatte crescere su substrati contaminati e sono state studiate le capacità di sopravvivenza, di adattamento, produzione di biomassa e accumulo di metalli pesanti nei tessuti.

Allo stesso tempo, ai fini di ottimizzare il sistema di coltivazione di specie legnose autoctone su suoli contaminati, sono stati studiati sistemi ammendanti che potrebbero consentire di migliorare lo sviluppo della coltivazione con tecniche a basso costo, migliorando la sopravvivenza delle piante e incrementando la quantità di biomassa ottenibile. E' necessario a tal fine considerare, come si è detto, che i suoli minerari sono molto poveri in sostanze nutritive e materia organica ed il loro ammendamento è indispensabile affinché possano ospitare qualsiasi coltivazione. La riuscita di una coltivazione ad elevata produzione di biomassa, anche in attività di fitorisanamento non può prescindere dalla presenza di una buona dotazione di materia organica e di macroelementi nel terreno, primo fra tutti l'azoto. Ammendare però grandi quantità di suoli minerari per realizzare coltivazioni di fitorisanamento, richiede elevatissimi costi.

A tal fine sono state studiate diverse combinazioni di substrati che potessero consentire una migliore performance produttiva della specie, limitando allo stesso tempo i costi di impianto e di produzione. Per quanto riguarda la dotazione di materia organica e azoto, sono state studiate diverse combinazioni di substrati contenenti compost da frazione organica di residui urbani. Il compost costituisce un ammendante abbondante sul mercato e a basso prezzo.

Inoltre, sempre con l'obiettivo di diminuire i costi dell'attività di fitorisanamento utilizzando la specie *Atriplex halimus*, sono state studiate delle soluzioni che consentissero di ridurre sia i tempi di produzione delle piante e di impianto nel primo periodo, sia l'utilizzo di ammendanti durante il ciclo produttivo. Per valutare la riduzione dei tempi di produzione delle piante sono state testate diverse

soluzioni di impianto. Le piante sono state coltivate sui substrati sperimentali inizialmente sotto forma di piante di due anni, come giovani plantule dell'età di 2 e 3 mesi e sotto forma di talee.

L'utilizzo di leguminose in fitorisanamento è derivata dalla capacità fissativa dell'azoto di queste specie. Lo scopo della ricerca è dunque stato valutare la loro capacità di migliorare le disponibilità di azoto nel terreno, riducendo allo stesso tempo i costi di distribuzione e di incorporazione di fertilizzanti azotati. In questo modo, le specie leguminose potrebbero essere in grado di supportare lo sviluppo delle specie legnose.

Una parte del lavoro è stata perciò dedicata allo studio della capacità di sopravvivenza e adattamento su substrati contaminati da metalli pesanti della specie *Medicago polymorpha*, finora inesplorata a tal fine. Questa specie, è stata scelta perché oltre ad essere una leguminosa azotofissatrice che ben si adatta a climi xerici della Sardegna, è una specie autoriseminante, che non necessita interventi di semina ogni anno.

Le attività sperimentali sono state condotte su scala di laboratorio ed articolate in sei fasi distinte. Il substrato contaminato utilizzato è stato prelevato dalla discarica di sterili minerali di Campo Pisano. Il materiale vegetale è stato prelevato da diverse aree del sud Sardegna.

Il presente lavoro è articolato in 5 capitoli, i cui contenuti sono brevemente riassunti di seguito.

Nel capitolo 1, "Contaminazione da metalli pesanti", viene introdotto l'argomento della contaminazione da metalli e le principali problematiche ambientali e sanitarie ad essa relazionate. Nello stesso capitolo viene inoltre esposta la situazione attualmente presente in Sardegna riguardo questo tipo di contaminazione e, a tal proposito, viene approfondita la tematica delle aree minerarie del Sulcis Iglesiente e della Laguna di Santa Gilla.

Nel capitolo 2 viene affrontato il tema del risanamento dei suoli contaminati da metalli mediante l'utilizzo di piante: il fitorisanamento. In questo capitolo viene dunque presentato lo stato della conoscenza in materia e vengono descritte le principali tecniche attualmente utilizzabili, le possibili applicazioni e le prospettive future per l'applicabilità del fitorisanamento di suoli contaminati da metalli.

Nel capitolo 3 "Materiali e Metodi", vengono presentate le attività sperimentali svolte nell'intero lavoro di tesi. Nella parte iniziale vengono espone le motivazioni e gli obiettivi del lavoro di ricerca e successivamente vengono mostrate le attività sperimentali realizzate in ciascuna delle sei distinte fasi. In tale capitolo vengono presentate le specie vegetali utilizzate per realizzare le sperimentazioni, *Atriplex halimus* e *Medicago polymorpha*, le loro caratteristiche botaniche e i loro attuali utilizzi e potenzialità. Sono inoltre descritti i materiali utilizzati per la preparazione dei substrati sperimentali e le modalità di analisi chimiche e fisiche che sono state applicate alle matrici (suoli e piante) trattate nell'intero lavoro.

Nel capitolo 4 "Risultati", sono presentati e discussi i risultati ottenuti in ciascuna delle 6 fasi sperimentali.

Il Capitolo 5 "Conclusioni", raccoglie una discussione generale dei risultati ottenuti dall'intero lavoro sperimentale. A tale scopo viene presentata una visione dell'insieme delle diverse fasi sperimentali e, sulla base dei principali risultati ottenuti, sono espone le potenzialità applicative delle specie vegetali studiate e delle tecniche testate, emerse dal lavoro di ricerca.

CAPITOLO 1

CONTAMINAZIONE DA METALLI PESANTI

La contaminazione del suolo da metalli pesanti può essere considerata uno dei problemi ambientali più rilevanti in molte aree del mondo. Nei paesi sviluppati (Akinyele e Shokunbi, 2015) e in particolare in Europa (EEA, 2014), i metalli pesanti sono annoverati tra principali contaminanti del suolo e tra i principali contaminanti alimentari (Akinyele e Shokunbi, 2015), rappresentando un rilevante fattore di rischio per la salute umana.

Le sorgenti primarie di contaminazione da metalli sono la combustione di fonti fossili, l'attività mineraria e di trasformazione di matrici metallifere, la deposizione di fumi da attività di produzione di energia, i rifiuti urbani, i fertilizzanti, i pesticidi e i liquami (Garbisu e Alkorta, 2001).

1.1 Contaminazione da metalli pesanti nel suolo

Per quanto riguarda l'utilizzo della definizione di "metalli pesanti", questo è generalmente legato al concetto di contaminazione, di potenziale tossicità o ecotossicità ed è riferito normalmente a elementi che presentano una densità compresa tra 3,5 e 7 g cm⁻³ (Duffus, 2002), che usualmente si comportano come cationi, che presentano diversi stati di ossidazione, bassa solubilità dei loro idrati e alta affinità per i solfuri (Riffaldi e Levi - Minzi, 1989).

Secondo un'altra definizione comunemente utilizzata in letteratura, rientrano tra i metalli pesanti gli elementi che presentano numero atomico > 20, sono dunque inclusi i metalli di transizione, alcuni metalloidi, lantanidi e attinidi (Vamerali *et al.*, 2010).

Molte fra le caratteristiche sopra elencate, sono comuni anche ad altri elementi che hanno carattere metalloidico, per tale ragione la definizione "metallo pesante", risulta secondo alcuni autori imprecisa e non ha un preciso significato biologico (Riffaldi e Levi - Minzi, 1989).

I metall(oid)i sono elementi che si possono trovare naturalmente in un suolo e includono cromo (Cr), manganese (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), nickel (Ni), rame (Cu), zinco (Zn), molibdeno (Mo), cadmio (Cd), piombo (Pb), selenio (Se) e arsenico (As).

Alcuni fra questi (per esempio Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Mo), sono nutrienti essenziali per le piante (DalCorso *et al.*, 2013), mentre altri, come Cd, Pb e Hg, non svolgono alcuna funzione biologica (Tangahu *et al.*, 2011).

Nelle aree urbane, i principali responsabili della contaminazione da metalli (Zn, Cd, Hg, Pb) sono il traffico automobilistico e la risospensione delle particelle del suolo, soprattutto nelle aree industrializzate (Ordóñez *et al.*, 2003).

1.1.1.1 FONTI

Il traffico veicolare e gli interventi sulle strade, costituiscono una fonte continua di contaminazione delle acque superficiali e sotterranee. La contaminazione stradale è originata dall'usura del motore e

dei freni (Cd, Cu, Ni), dai lubrificanti (Cd, Cu, Zn), dai gas di scarico (Pb) e dall'abrasione dei pneumatici (Zn) (Padmavathiamma e Li, 2007). E' stato dimostrato che, per esempio, che il contenuto di metalli sulla superficie del suolo, nelle piante e in alcuni artropodi, decresce all'aumentare della distanza dalla strada, tale fenomeno può essere apprezzabile fino ad una distanza di circa 300 m (Viard *et al.*, 2004).

Oltre alle attività umane delle aree urbane industrializzate, anche le pratiche agrarie possono costituire fonte di contaminazione. In passato per esempio, l'uso di fitosanitari ha comportato una notevole distribuzione di metalli nei suoli agrari e si stima che oltre il 10% di fungicidi e insetticidi apportasse Cu, Hg, Mn, Pb e Zn (Riffaldi e Levi - Minzi, 1989).

Sempre per quanto riguarda le pratiche agricole, la distribuzione di liquami come fertilizzanti organici può rappresentare un problema, soprattutto quando questi contengono notevoli quantità di Cu e Zn. Tali elementi infatti, sono normalmente somministrati nella dieta alimentare e sono assorbiti solo in basse percentuali (5 %), per cui la restante parte viene rilasciata nelle deiezioni (Riffaldi e Levi - Minzi, 1989). Anche alcuni fertilizzanti chimici possono produrre contaminazione da metalli, fra questi si segnalano in particolare i perfosfati (Riffaldi e Levi - Minzi, 1989).

In alcuni casi invece, la fertilizzazione con fosfati, può supportare la formazione di composti stabili del Pb e ridurre così la mobilità nel suolo. Secondo quanto suggerito dal *US Environmental Protection Agency* (Shahid *et al.*, 2014), infatti, proprio tale pratica è da ritenersi uno dei migliori metodi per immobilizzare il Pb nei suoli contaminati.

Una delle principali fonti di contaminazione da metalli, è indubbiamente l'attività di estrazione mineraria. In particolare è la frazione residua che deriva dal processo di estrazione a costituire la principale fonte di contaminazione. Questi residui sono caratterizzati da un'elevata presenza di particelle appartenenti alla frazione limosa e sabbiosa, scarso contenuto di nutrienti biologici (quali N, P, K) e di materia organica, (Mendez e Maier, 2008).

Il pH dei residui minerali può variare notevolmente, da molto acido ad alcalino, a seconda del contenuto di carbonati e della potenziale acidità della matrice (Mendez e Maier, 2008).

Un basso pH, di per sé biotossico, aumenta la biodisponibilità dei metalli, incrementandone la tossicità. L'insieme di questi fattori causa una scarsa attività microbica del terreno e rende difficoltosa la crescita della vegetazione.

A causa delle suddette caratteristiche, i residui di attività minerarie dismesse, non messi in sicurezza, restano per lungo tempo senza copertura vegetale e possono costituire un'importante fonte contaminante. In queste condizioni infatti i metalli possono diffondersi nell'ambiente mediante il trasporto eolico e mediante il trasporto idrico dovuto a fenomeni di percolazione o di scorrimento superficiale.

1.1.1.2 EFFETTI SULL'AMBIENTE

L'assorbimento da parte delle piante e la traslocazione nei propri tessuti di contaminanti inorganici come i metalli, sali e radionuclidi, dipende dallo stato redox, dalla speciazione chimica in cui si trovano nel suolo, nei sedimenti o nelle acque sotterranee, oltre che dalla specie vegetale (ITRC, 2009).

La variazione dello stato di ossidazione dei metalli può variarne solubilità in acqua. Quando la solubilità è elevata i metalli possono essere rimossi per lisciviazione mentre una bassa solubilità ne determina la precipitazione che, a sua volta, causa una riduzione della biodisponibilità e dunque della tossicità (Garbisu e Alkorta, 2001).

Secondo Petruzzelli *et al.* (2015) il rischio ambientale e umano relativo ai metalli, dipende strettamente dalla biodisponibilità.

Tra i metalli facilmente biodisponibili si possono includere As, Cd, Cu, Ni, Se e Zn; fra quelli considerati moderatamente biodisponibili si annoverano Co, Fe e Mn; mentre Cr, Pb e U, presentano una scarsa biodisponibilità (ITRC, 2009).

Sebbene molti metalli sono essenziali per la vita perché costituiscono dei co-fattori essenziali nella struttura di metalloproteine ed enzimi, altri sono tossici sia nei confronti di organismi superiori che di microorganismi (Garbisu e Alkorta, 2001).

La tossicità dei metalli per gli organismi viventi è legata a meccanismi di tipo ossidativo e/o genotossico, attraverso tre diverse modalità: producendo specie reattive a causa di autossidazione e di reazioni del tipo Fenton (Fe, Cu); bloccando i gruppi funzionali essenziali nelle biomolecole (Cd, Hg); spostando i metalli ionici essenziali dalle biomolecole (Alkorta *et al.*, 2004).

I metalli possono seguire numerose vie di diffusione nell'ambiente ed entrare nella catena alimentare. Quando presente nel suolo infatti, un metallo può essere assorbito dall'apparato radicale delle piante, trasportato nelle parti eduli e utilizzato direttamente dal consumatore primario (uomo o animale), oppure dal consumatore secondario (uomo), quando questi si nutre di prodotti animali consumatori primari (Riffaldi e Levi-Minzi, 1989).

Per quanto riguarda il contenuto di contaminanti negli alimenti, ai fini della tutela della salute pubblica, il Regolamento CE N. 1881/2006 indica i tenori massimi di Cadmio, Mercurio, Piombo e Stagno, che si possono riscontrare in diversi prodotti di origine agricola, vegetali e animali, sia freschi che trasformati. Secondo questo regolamento, i prodotti il cui contenuto di contaminanti superi il tenore massimo indicato, non devono essere commercializzati come tali, né dopo miscelazione con altri prodotti alimentari, né essere impiegati come ingredienti di altri alimenti.

1.2 Contaminazione da Cadmio, Piombo e Zinco

Di particolare interesse per il seguito del presente lavoro è la contaminazione dovuta ad un'elevata presenza di cadmio (Cd), Piombo (Pb) e Zinco (Zn). Per tale ragione la tossicità di tali elementi viene trattata in maniera distinta nei prossimi paragrafi.

1.2.1 CADMIO

Il Cadmio (Cd^{2+}) ha peso atomico $112,41 \text{ g mol}^{-1}$ e densità pari a $8,64 \text{ g cm}^{-3}$, punto di fusione a $320,9 \text{ °C}$ e punto di ebollizione a 765 °C si presenta di colore azzurro-bianco, (European Union, 2007). Questo elemento rappresenta uno fra i metalli più tossici che possono entrare nella catena alimentare (Neilson e Rajakaruna, 2015).

Il cadmio è un elemento non molto abbondante nella crosta terrestre e la sua presenza spesso è associata a quella di Zn (Clemens, 2006) Cu e Pb (ECHA, 2013). La presenza di Cd nell'ambiente, oltre che da fonti naturali, ha origine nelle emissioni derivanti da attività mineraria e industrie metallurgiche, combustione di materie fossili, incenerimento di rifiuti o un loro inappropriato trattamento (ECHA, 2013). In Europa vengono prodotte annualmente 5800 tonnellate di Cd all'anno e, le maggiori fonti di contaminazione ambientale sono la distribuzione di fertilizzanti, la produzione di ferro e acciaio e la combustione di petrolio (European Union, 2007).

Il cadmio presenta una mobilità molto più elevata di altri metalli come per esempio piombo, arsenico e mercurio (Clemens, 2006) e aumenta significativamente a $\text{pH} < 6.5$.

Il pH del suolo è un importante parametro che controlla la speciazione e la distribuzione delle specie chimiche del Cd. A pH elevati ($\text{pH} > 7$) tende ad essere assorbito e complessato rispetto a quanto avviene a pH basso.

Il cadmio è considerato un elemento molto tossico per la salute umana, è cancerogeno, mutageno e dannoso per la riproduzione.

L'assorbimento di Cd da parte della popolazione umana può avvenire principalmente mediante l'inalazione di aria contaminata, l'assunzione di cibo e acqua contaminati e, in misura minore, per esposizione della pelle a polveri o liquidi contaminati da questo elemento (European Union, 2007) e per inalazione attiva o passiva di fumo da tabacco (WHO, 2010).

Gli effetti del Cd sulla salute umana si evidenziano principalmente a danno dei reni, dove viene inizialmente accumulato, con una permanenza media di 10 - 35 anni e induce danni irreversibili alla funzionalità di questi organi (WHO, 2010). Elevati assorbimenti di Cd possono indurre disturbi nel metabolismo del calcio, a danno delle ossa, inducendo osteoporosi, indebolimento del tessuto osseo, fino a sfociare nella sindrome Itai-itai come osservato in un'area mineraria del Giappone contaminata da Cd (WHO, 2010).

1.2.2 PIOMBO

Il Piombo (Pb) ha numero atomico 82, massa atomica 207.2 e peso specifico 11.34 g cm^{-3} , è un metallo bluastrò-grigio argenteo con punto di fusione a 327.5 °C e punto di ebollizione a 1740 °C . In natura esistono 4 isotopi con peso atomico 208, 206, 207 e 204 (in ordine di abbondanza decrescente). Il livello naturale di questo metallo nei suoli è compreso fra 50 e 400 ppm ma, le attività di estrazione mineraria, di fusione e di raffinazione, hanno causato un incremento dei livelli di piombo nell'ambiente, soprattutto in prossimità delle aree minerarie e dei siti di trattamento (EPA, Lead). Quando il Pb è rilasciato in atmosfera da fonti industriali o da autoveicoli, può essere trasportato per lunghe distanze prima di essere depositato a terra, dove si unisce alle particelle del suolo. Il Pb e i suoi composti inoltre, sono presenti in molti prodotti ad uso domestico, come pitture, ceramiche, tubature, benzina, batterie e cosmetici.

Nonostante le sue molteplici applicazioni nelle attività umane, il Pb può essere tossico per gli organismi viventi e non costituisce un elemento essenziale (Vamerli *et al.*, 2010), in quanto non utilizzato naturalmente in processi metabolici.

La mobilità del Pb dal suolo alle acque sotterranee, dipende dal composto e dalle caratteristiche del suolo, molti sali inorganici del Pb^{2+} per esempio, fatta eccezione per i nitrati, i cloruri e i clorati, hanno bassa solubilità in acqua. I composti del Pb predominanti nel suolo sono i fosfati, carbonati, (idr)ossidi e solfuri e le loro proprietà cambiano a seconda del pH. Si può dire in generale che, la mobilità del Pb aumenta al diminuire del pH e, quando questo è superiore a 6 i composti del Pb si trovano in forma insolubile (Magdziak *et al.*, 2015).

L'EPA (*US Environmental Protection Agency*), pone particolare attenzione alla contaminazione da Pb per la specie umana. Il Pb infatti è particolarmente dannoso nei confronti dei bambini in quanto il loro corpo in sviluppo, assorbe più piombo di quanto non faccia un corpo adulto e, il loro sistema nervoso e il cervello sono più sensibili ai danni da questo elemento. Negli adulti, la tossicità del Pb si può mostrare con danni all'apparato cardiovascolare, come ipertensione, disfunzioni renali e problemi riproduttivi (EPA, Lead).

1.2.3 ZINCO

Lo zinco rappresenta uno fra gli elementi più comuni della crosta terrestre, ha numero atomico 30, peso atomico 65.38, punto di fusione a 419.5 °C, punto di ebollizione a 907 °C e nella forma metallica si presenta di colore bianco-bluastrò.

Elevate quantità di zinco sono immesse nelle matrici ambientali mediante attività minerarie, produzione di acciaio, combustione di carbone o di rifiuti. Queste attività possono incrementare i livelli di atmosferici di zinco, che può in seguito depositarsi nel suolo e nelle acque. Le acque inoltre, possono essere contaminate da zinco mediante la ricezione di reflui di attività industriali, chimiche e manifatturiere.

Lo zinco è necessario nella dieta umana, in quanto costituente di molti enzimi, svolge un importante ruolo nella sintesi proteica e nella divisione cellulare. Secondo la FAO/WHO (2002), l'ingestione di Zn per un uomo adulto non deve superare 45 mg giorno⁻¹ e per i bambini 23 - 28 mg giorno⁻¹.

Tali quantità, che normalmente sono difficili da raggiungere con una dieta normale, possono essere superate in caso di alimentazioni basate su alcuni tipi di pesci (in cui tale metallo si accumula), mediante l'assunzione di acque provenienti da fonti contaminate e/o mediante l'uso di utensili da cucina galvanizzati.

Lo zinco è assunto dal corpo umano mediante il sistema digerente ma, in casi di esposizione a fumi o polveri minerarie contenenti questo metallo, può penetrare attraverso le vie respiratorie e in misura limitata attraverso la pelle. In seguito all'assunzione lo Zn viene stoccato nel corpo e il contenuto aumenta rapidamente nel sangue e nelle ossa e, normalmente, viene eliminato attraverso le urine e le feci (ATSDR, 2005). La tossicità da Zn si manifesta con problemi all'apparato digerente e con febbre e letargia, mentre nel lungo periodo, elevate assunzioni di zinco possono interagire con il metabolismo di altri microelementi come per esempio il rame (FAO/WHO, 2002).

1.3 Aree contaminate da metalli in Sardegna

In Sardegna sono presenti estese aree ad elevata contaminazione da metalli, in particolare laddove in passato vi è stata un'intensa attività estrattiva. L'isola è stata infatti interessata per lungo tempo dalla produzione di minerali e la gestione delle attività da parte dell'industria estrattiva ha lasciato in eredità importanti fenomeni di degrado ambientale.

Le aree maggiormente interessate dall'attività mineraria si estendono a Sud Ovest della Sardegna, nel territorio del Sulcis - Iglesiente - Guspinese. Queste aree sono attualmente comprese fra i SIN (Siti di bonifica di Interesse nazionale) definiti dal D.M. 468 del 2001 e individuate con il nome di "Sito di Interesse Nazionale del Sulcis Iglesiente Guspinese". Quest'ultimo comprende anche le aree industriali di Portovesme, di Assemini e di Sarroch e la sua perimetrazione è stata adottata dalla Regione Autonoma della Sardegna (RAS) nel 2011 (D.R. 27/13, 2011).

Al fine di attuare le bonifiche e di individuare nuovi siti contaminati, la RAS ha predisposto un documento di pianificazione degli interventi di risanamento ambientale: il Piano Regionale di bonifica dei siti inquinati della Sardegna (D.R. 45/34, 2003). Tale documento si occupa di aree contaminate di diversa tipologia, inclusi i SIN, ed è attualmente sottoposto al processo di Valutazione Ambientale Strategica (VAS).

Sulla base del Piano Regionale di bonifica dei siti inquinati della Sardegna, è stato creato uno strumento di pianificazione dedicato alle aree minerarie dismesse: il piano di bonifica delle aree minerarie dismesse del Sulcis Iglesiente Guspinese. Questo documento, si pone come obiettivi definire e realizzare le iniziative necessarie a superare l'emergenza e a realizzare opere di bonifica o messa in sicurezza.

Nei territori interessati dalle attività minerarie sono spesso evidenti scenari riconducibili alle attività di ricerca, di coltivazione dei minerali e di trattamento mineralurgico.

Fra i residui dell'attività estrattiva, sono quelli a granulometria sabbioso - limosa che producono il maggior impatto sulle matrici ambientali. Queste frazioni derivano dalle operazioni di arricchimento del minerale attraverso processi di trattamento come l'idrogravimetria e la flottazione.

Di particolare interesse per il presente lavoro di ricerca sono due aree particolarmente gravate dalla passata attività mineraria: quella di Campo Pisano, dalla quale è stato prelevato il substrato contaminato utilizzato per svolgere le sperimentazioni, descritta nel paragrafo 0. e quella della Laguna di Santa Gilla, dalla quale è stato prelevato parte del materiale vegetale utilizzato nelle sperimentazioni, descritta nel paragrafo 1.3.2. In quest'ultima l'attività mineraria e industriale, ha determinato forti impatti ambientali malgrado la distanza dalle aree di estrazione.

1.3.1 L'AREA MINERARIA DI CAMPO PISANO

L'area mineraria di Campo Pisano (CI), si trova nel bacino idrografico del Rio san Giorgio, presso Iglesias. Questo bacino si estende per circa 35 km² e il fiume trasporta le acque nella palude di Sa Masa e nell'arenile di Fontanamare. Nella valle di San Giorgio sono presenti numerose miniere,

scavi, bacini di sterili e abbancamenti di fini. L'area risulta notevolmente compromessa a causa della dispersione di fini di trattamento.

La miniera di Campo Pisano, insieme a quella di San Giovanni e di Monteponi, tra il XIX ed il XX secolo, ha costituito uno fra i maggiori centri estrattivi di metalli in Europa.

L'area mineraria di Campo Pisano è caratterizzata dalla presenza di dolomie e calcari di vario tipo, a ridosso di un'intercalazione arenaceo-scistoso-carbonatica. Il giacimento di piombo e zinco relativo a questa miniera venne dichiarato "scoperto" il 28 Settembre del 1870 e la concessione mineraria fu affidata alla Società di Monteponi per una superficie totale di 333 ettari (Marcello *et al.*, 1965). La miniera di Campo Pisano è stata un importante centro minerario fino agli anni '70 e nell'impianto di trattamento venivano convogliati anche i minerali provenienti dalle miniere di Masua, San Giovanni e Monteponi.

Attualmente nell'area di Campo Pisano sono presenti un esteso bacino di decantazione, il pozzo di estrazione e gli impianti di trattamento del minerale, alcune strutture minerarie e la vecchia laveria. Il sito di Campo Pisano si estende per circa 200 ettari ed è gestito dalla società Igea Spa. Una grande problematica è rappresentata attualmente dal bacino di raccolta degli sterili, dove tutt'ora si raggiungono concentrazioni di Cd, Pb e Zn molto elevate e, a causa dell'enorme superficie da risanare, è difficile realizzare interventi di bonifica esclusivamente attraverso l'applicazione di sistemi convenzionali.

1.3.2 L'AREA DI SANTA GILLA (CA)

La laguna di Santa Gilla rappresenta una fra le più importanti aree umide della Sardegna, si trova nella costa sud della Sardegna, nei pressi della città di Cagliari. La Laguna ha un'ampiezza di circa 15 km², una profondità media di 1m e, nel canale che collega la laguna con il mare, può raggiungere i 3 m di profondità.

Nella laguna confluiscono diversi fiumi, fra i quali i più importanti sono il Flumini Mannu e il Rio Cixerri. L'area e la morfologia del bacino hanno subito notevoli variazioni nel tempo. Nella prima metà del 1900, nel settore nord-orientale della laguna, che si presentava bassa e paludosa, sono state realizzate ampie colmate, finalizzate alla costruzione dell'aeroporto di Elmas. Importanti trasformazioni sono state realizzate anche nell'area chiamata peschiera di Santa Gilla e nel settore nord-orientale della zona, in cui è stato realizzato il porto canale (Arpas, 2006).

Le attività di natura antropica, in maniera diretta o indiretta, hanno determinato importanti fenomeni di contaminazione. A seguito della crescita demografica e dello sviluppo industriale dell'area circostante, nella laguna sono state scaricate quantità ingenti di reflui di origine domestica e industriale. Tra la metà degli anni 60 e la metà degli anni 80, il margine ovest è stato interessato dal riversamento di reflui non trattati provenienti dal polo chimico industriale, mentre la parte est, negli stessi anni è stata interessata da scarichi non trattati provenienti dall'area urbana di Cagliari (Degetto *et al.*, 1997).

La parte a nord della laguna è stata interessata principalmente dalla presenza di Pb e Zn, presumibilmente di origine mineraria (Degetto *et al.*, 1997). Il Rio Cixerri infatti riceve acque di

drenaggio di alcune miniere dismesse del Sulcis Iglesiente e nelle sue acque sono state rilevate elevate concentrazioni di metalli (Cidu e Frau, 2009).

Nella laguna, a causa dei livelli di contaminazione riscontrati, nel 1974, fu vietata l'attività di pesca (Arpas 2006) e negli anni ottanta fu realizzata un'opera di bonifica mediante la quale vennero asportati sedimenti inquinati da metalli pesanti nel settore occidentale.

Venne inoltre creato un sistema di canali, al fine di impedire l'afflusso di scarichi urbani ed industriali e che, allo stesso tempo, favoriscono il ricambio delle acque più interne con quelle del mare.

Secondo uno studio condotto dall'Arpas (2006), nei sedimenti della laguna di Santa Gilla, esistono diverse aree con contenuti anomali di mercurio, piombo e zinco. Secondo questi autori, i dati rilevati, non mostrano variazioni rispetto a quelli ottenuti da indagini pregresse, né per quanto riguarda l'area di distribuzione né per quanto riguarda i livelli di concentrazione dei metalli totali.

Frontalini *et al.* (2009) riportano la presenza di elevate concentrazioni di metalli nei sedimenti nella laguna. Gli studi condotti nell'area hanno messo in evidenza elevate concentrazioni di Hg, Cd, Ni, Pb, Cr e As che superano i limiti imposti dalla normativa relativa a standard di qualità delle acque e dei sedimenti. Le concentrazioni più elevate sono state riscontrate soprattutto nella parte più interna della laguna, di fronte alle aree a maggiore presenza di attività industriale.

Questo ecosistema è attualmente incluso nella Rete Natura 2000 e sottoposto a diverse misure di tutela quali: art 142 del DPR 448/76 (Zone Umide), Oasi permanente di protezione faunistica, Zona di protezione speciale (ZPS) sito di interesse comunitario (SIC), Important bird area (IBA).

CAPITOLO 2

FITORISANAMENTO

2.1 Tecniche di bonifica di matrici contaminate da metalli pesanti

La bonifica dei siti contaminati è disciplinata in Italia dal Decreto Legislativo n.152 del 2006. Con la bonifica (art 240, comma 1, lettera p) si intende "l'insieme degli interventi atti ad eliminare le fonti di inquinamento e le sostanze inquinanti o a ridurre le concentrazioni delle stesse presenti nel suolo, nel sottosuolo e nelle acque sotterranee ad un livello uguale o inferiore ai valori delle concentrazioni soglia di rischio (CSR).

L'intervento su un suolo contaminato può essere realizzato in funzione di distinti obiettivi ed in tal senso si possono distinguere:

- interventi di bonifica
- interventi di messa in sicurezza permanente,

In particolare, mentre la bonifica di un sito inquinato è finalizzata ad eliminare l'inquinamento o a ricondurre le concentrazioni delle sostanze inquinanti entro i valori soglia di contaminazione (CSC), gli interventi di messa in sicurezza sono finalizzati alla rimozione e all'isolamento delle fonti inquinanti, e al contenimento della diffusione degli inquinanti per impedirne il contatto con l'uomo e con i recettori ambientali circostanti.

Il Decreto 152/2006 specifica anche il concetto di ripristino e ripristino ambientale (art 240, comma 1, lettera q) con cui sono intesi "gli interventi di riqualificazione ambientale e paesaggistica, anche costituenti complemento degli interventi di bonifica o messa in sicurezza permanente, che consentono di recuperare il sito alla effettiva e definitiva fruibilità per la destinazione d'uso conforme agli strumenti urbanistici".

Lo stesso decreto indirizza l'operatore a scegliere la tecnica da applicare tra quelle contenute nell'Allegato 3 alla parte quarta del decreto (art 242), dove sono contenuti "i criteri per la selezione e l'esecuzione degli interventi di bonifica e ripristino ambientale, di messa in sicurezza operativa o permanente, nonché per l'individuazione delle migliori tecniche di intervento a costi sostenibili (B.A.T.N.E.E.C. - *Best Available Technology Not Entailing Excessive Costs*)".

L'allegato 3 del D.Lgs: 152/2006 fa capo alla normativa Europea, come per esempio la Direttiva 2008/1/EC, in cui è contenuta una guida per la selezione della tecnica più adatta, che va applicata in accordo con i criteri di compatibilità ambientale e con l'esistenza di conoscenze scientifiche. Le linee guida contenute nella direttiva dotano l'operatore di strumenti per scegliere la migliore tecnologia di risanamento per il sito, in considerazione delle variabili economiche, ambientali e sociali.

Le tecniche di risanamento dei suoli possono essere distinte in base alla localizzazione del processo fra:

- trattamenti in situ;
- trattamenti ex situ;

Nelle tecniche in situ, il suolo da trattare non viene estratto dal luogo. Le tecniche sono definite ex situ quando il materiale contaminato viene estratto e può essere trattato nello stesso luogo di escavazione (on site) mediante l'utilizzo di mezzi di trattamento mobili, oppure trasportato in altro luogo affinché subisca un trattamento (*off site*). La normativa tende a favorire l'utilizzo delle tecniche on-site, che implica che il trattamento dei suoli resti vicino alla fonte contaminante per quanto possibile (Conesa *et al.*, 2012). Per quanto riguarda la legge italiana, (D.Lgs 152/2006) nell'allegato 3, è per esempio specificato di "privilegiare le tecniche di bonifica tendenti a trattare e riutilizzare il suolo nel sito, trattamento in-situ ed on-site del suolo contaminato, con conseguente riduzione dei rischi derivanti dal trasporto e messa a discarica di terreno inquinato.

Le tecniche di bonifica possono essere classificate in base ai processi utilizzati per il risanamento dei siti e si possono così distinguere :

- trattamenti chimico-fisici;
- trattamenti termici;
- trattamenti biologici;

Per quanto riguarda il risanamento di suoli contaminati da metalli pesanti, occorre considerare che si tratta di contaminanti che non possono essere degradati biologicamente, la degradazione implicherebbe infatti il cambio della struttura nucleare (Alkorta *et al.*, 2004) ma può essere modificato lo stato fisico-chimico con lo scopo di ridurre la mobilità ambientale.

Tra le tecniche convenzionali, i metodi applicabili in caso di contaminazione da metalli pesanti includono la vetrificazione *in situ*, incenerimento dei suoli, scavo e deposizione in discarica, *soil washing*, *soil flushing*, solidificazione e stabilizzazione mediante elettrocinesi (Ali *et al.*, 2013).

Generalmente queste tecniche convenzionali presentano il limite di essere molto costose (Ali *et al.*, 2013). Conesa *et al.* (2012) per esempio, riportano che il costo dell'applicazione della tecnica del *soil washing* è intorno a 25-40 euro t⁻¹, la stabilizzazione dei suoli può avere un costo di 40-50 euro t⁻¹ mentre con lo scavo e successivo confinamento (dig and dump) i costi salgono a 60-90 euro t⁻¹.

Le tecniche ingegneristiche convenzionali per il recupero di suoli contaminati oltre ad avere costi proibitivi e generare elevate quantità di residui addizionali che devono essere a loro volta smaltiti, possono alterare irreversibilmente le proprietà fisico- chimiche e microbiologiche dei suoli (Ali *et al.*, 2013). Possono infatti originare suoli non (ri)utilizzabili per scopi agricoli o per la produzione di biomassa vegetale, poichè modificando drasticamente l'attività biologica e le proprietà fisiche dei suoli, vengono alterati i fattori che costituiscono la base della loro fertilità (Conesa *et al.*, 2012).

La scelta della metodologia più appropriata è funzione della natura dell'inquinante, delle caratteristiche del terreno e della distribuzione dell'inquinante tra le varie fasi. Non trascurabile sotto questo aspetto il fattore economico e i presunti tempi di bonifica.

Non esiste attualmente una norma di standardizzazione delle tecniche di risanamento dei suoli contaminati mentre, secondo Conesa *et al.*(2012), la standardizzazione di queste tecniche è un fattore chiave nello sviluppo dei prodotti commerciali e dei servizi realizzabili.

Per superare i problemi generati dai trattamenti dei suoli con tecniche convenzionali e utilizzare le indicazioni contenute nella normativa di riferimento, nelle ultime due decadi, sono state studiate tecniche biologiche, *in situ*, considerate ambientalmente compatibili e a basso costo: l'insieme di queste tecniche è chiamato "fitorisanamento" (Alkorta *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2013; Stephenson e. Black 2014; Conesa *et al.*, 2012; Mench *et al.*, 2010).

2.2 Il Fitorisanamento

Con il termine Phytoremediation si intendono le tecnologie che utilizzano le piante e la comunità microbica ad esse associate, ammendanti e tecniche agronomiche, al fine di rimuovere, contenere, neutralizzare la tossicità di contaminanti ambientali (Cunningham e Ow, 1996).

Il fitorisanamento è una tecnologia a basso costo rispetto ad altre tecniche (Ali *et al.*, 2013; Conesa *et al.*, 2012) e può essere realizzata per esempio in siti in cui non sono applicabili le tecniche convenzionali (Garbisu e Alkorta, 2003). Secondo Stephenson e. Black (2014) il costo dell'applicazione del fitorisanamento è tipicamente 10 volte inferiore di quello richiesto nell'applicazione di tecniche convenzionali. È considerata una tecnologia a basso impatto ambientale e le piante contrastano l'effetto dei contaminanti senza ledere l'orizzonte superficiale del suolo, che può conservare la sua utilità e fertilità, a differenza invece di quanto avviene quando vengono utilizzate alcune tecniche convenzionali di risanamento come il *soil washing* o i trattamenti termici (Conesa *et al.*, 2012). Sotto questo aspetto il fitorisanamento si può considerare particolarmente adatto a migliorare le caratteristiche fisico-chimiche e biologiche dei suoli contaminati (Amer *et al.*, 2013).

Nell'ambito del fitorisanamento è molto usato il termine "fitotecnologie" ("*phytotechnologies*"). L'EPA (US- *Environmental Protection Agency*) sottolinea la differenza fra fitotecnologie e fitorisanamento, evidenziando che tra le le fitotecnologie sono incluse anche le strategie di contenimento, in addizione a quelle di (fito) risanamento (ITRC, 2009). L'EPA (ITRC, 2009), puntualizza inoltre che, tra gli obiettivi delle strategie di risanamento sono inclusi la prevenzione, il recupero e /o il riuso del sito.

Conesa *et al.* (2012) usano indistintamente i termini fitotecnologie ("*phytotechnologies*") e "fitorisanamento", nel definire la tecnologia che include la rimozione dei contaminanti, la loro estrazione da soluzioni acquose, la trasformazione e l'immobilizzazione mediante le piante.

Un'altro concetto utilizzato nell'ambito del fitorisanamento è quello del *phytomanagement*. Con questo termine si riunisce l'insieme delle tecniche di fitorisanamento senza fare una distinzione fra i processi coinvolti e si indica in generale la tecnica o la manipolazione del sistema suolo-pianta con lo scopo di controllare i flussi di contaminanti nell'ambiente (Conesa *et al.*, 2012).

Il fitorisanamento si applica sfruttando diverse capacità di azione delle piante, in associazione con l'attività microbica presente a livello radicale. Può essere applicato in caso di contaminanti organici

come gli idrocarburi (BTEX), idrocarburi policiclici aromatici (IPA), petrolio greggio, solventi clorurati (TCE, PCE). Il fitorisanamento può anche essere destinato a contaminanti inorganici come sali, metalli pesanti, metalloidi e materiale radioattivo. Le tecnologie possono essere applicate *in situ* o *ex situ*. A seconda del principio di azione del fitorisanamento si possono usare diverse tecniche, tra le quali sono incluse fitoestrazione (o fitoaccumulo), fitofiltrazione, fitostabilizzazione, fitovolatilizzazione e fitodegradazione (Alkorta *et al.* 2004).

Il fitorisanamento di suoli contaminati da metalli può essere affrontato fondamentalmente mediante due tecniche: fitoestrazione o fitostabilizzazione (Wong, 2003).

Nelle ultime due decadi, sono andate aumentando le definizioni che riguardano il fitorisanamento, introdotte come conseguenza del progresso scientifico. Conesa *et al.* (2012) per esempio elucidano il significato dei diversi termini, anche in funzione della necessità di creare chiarezza nel mondo professionale non specializzato sul tema. Gli autori infatti, ritengono che l'esistenza di confusione su questi termini possa ostacolare il mercato di queste tecniche di risanamento.

Da un punto di vista economico, il fitorisanamento può avere un triplice scopo: contenere i rischi (fitostabilizzazione), fitoestrarre metalli con un interessante valore di mercato (come Ni, Tl e Au), migliorare la qualità dei suoli attraverso la fitoestrazione per coltivarvi successivamente colture ad elevato valore (Ali *et al.*, 2013).

Un'attenta selezione delle specie e l'ottimizzazione della loro crescita sono dei fattori chiave della riuscita del fitorisanamento in suoli contaminati e in diverse condizioni pedoclimatiche (Kidd *et al.*, 2015). Le piante oltre che alla presenza di contaminanti, a seconda dei casi, devono resistere a deficit idrico e di nutrienti, all'acidità o salinità del substrato, alla presenza di attacchi parassitari o funghi, *etc.* Il successo del fitorisanamento dipende da un'attenta implementazione di pratiche agronomiche come per esempio la selezione della specie, rotazione, intercropping, densità di impianto, fertilizzazione e irrigazione, controllo dei parassiti (ITRC, 2009; Kidd *et al.*, 2015).

In clima arido e semiarido in particolare, la scelta delle specie vegetali, sia in attività di fitoestrazione che di fitostabilizzazione, deve tenere conto, oltre che dei problemi ambientali di un suolo contaminato, anche della scarsità idrica e spesso anche della salinità del suolo (Mendez e Maier, 2008).

La selezione delle piante, dipende anche dall'opzione di risanamento che si intende realizzare (Kidd *et al.*, 2015). Per esempio in caso di fitoestrazione sono adatte piante accumulatrici, mentre nel caso si intenda realizzare fitostabilizzazione o fitoesclusione, piante in cui è limitato il trasporto nella parte aerea (Mendez e Maier, 2008) o piante coltivabili (Kidd *et al.*, 2015).

Il fitorisanamento è riconosciuta come una pratica capace di migliorare la struttura del suolo e la sua qualità, può supportare l'incremento della biodiversità, migliorare la qualità delle acque sotterranee, incrementare lo stoccaggio di carbonio; limitare l'erosione del suolo *etc.*, (Kidd *et al.* 2015).

Questa tecnica inoltre potrebbe supportare la produzione di energie rinnovabili a supporto del raggiungimento degli obiettivi Europei (Kidd *et al.* 2015.).

Nel caso della contaminazione da metalli pesanti possono essere applicati due distinti approcci: la fitostabilizzazione o la fitoestrazione e verranno discusse separatamente nei paragrafi 2.2.2 e . 2.2.3, mentre le altre principali modalità del fitorisanamento verranno esposte nel paragrafo 2.2.4.

2.2.1 METALLI PESANTI NELLE SPECIE VEGETALI SUPERIORI

I metalli pesanti e i metalloidi che si possono annoverare tra i contaminanti più comuni sono As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Mo, Zn, Tl, Sb (Vamerali *et al.*, 2009). Solo alcuni, come Zn, Cu, Mn, Ni, and Co, sono micronutrienti necessari allo sviluppo vegetale. Altri invece, come As, Cd, Cr, Pb, Hg, non svolgono alcuna funzione fisiologica (Ali *et al.*, 2013).

I metalli, che si ricorda, a differenza di altri contaminanti non possono essere degradati, possono avere effetti dannosi sui sistemi biologici e spesso vi si accumulano. Possono creare effetti negativi sui sistemi biologici anche se presenti in bassissime concentrazioni. Nelle piante, possono alterare lo sviluppo, la capacità di creare copertura vegetale e avere un impatto negativo sulla microflora del suolo (Tangahu *et al.*, 2011). Nell'ambito del fitorisanamento, la fitotossicità e altri fattori di stress biotico e abiotico possono limitare notevolmente l'impianto e la produttività delle specie vegetali (Kidd *et al.*, 2015). Tipicamente si possono riscontrare nelle piante le seguenti concentrazioni di metalli e metalloidi (van der Ent *et al.*, 2013): Ni (1.5), Zn (50), Cd (0.05), Pb (1), Cu (10), Co (0.2), Cr (1.5), Mn (200), Tl (0.02), As (0.1) e Se (0.02) ($\mu\text{g/g}$).

Esistono specie particolarmente adattate a crescere in suoli ricchi di metalli che sono definite Metallofite. Tra loro si possono distinguere quelle che assorbono i metalli e li concentrano nelle radici (*metal excluders*), quelle che accumulano metalli nelle parti aeree (*metal indicators*) e quelle che concentrano nei propri tessuti aerei una quantità di metalli più elevata di quella presente nel suolo o nelle specie non accumulatrici (*metal hyperaccumulators*) (Ali *et al.*, 2013).

Molti metalli sono cofattori enzimatici e sono coinvolti in importanti processi metabolici. Il Mn e il Cu per esempio sono fondamentali per l'attività fotosintetica, altri come lo Zn sono coinvolti nella trascrizione del DNA, il Ni nell'idrolisi dell'Urea in Biossido di Carbonio e Ammoniaca, Co e Zn nella formazione dei noduli delle leguminose e sono quindi importanti per svolgere azotofissazione (Vamerali *et al.*, 2009).

Le interazioni che possono intercorrere fra i metalli e i macronutrienti per quanto riguarda l'assorbimento e il trasporto, dipendono dalle concentrazioni in cui si trovano nel suolo. Per esempio il Cu può ridurre l'assorbimento di Cd e Ni, allo stesso tempo l'assorbimento di Cu può essere inibito dalla presenza di Cr, Cd e Ni, mentre il Nichel può competere con Cu, Zn, Co, e Fe (Vamerali *et al.*, 2009), *etc.*

La fitotossicità è spesso associata ai metalli non essenziali come per esempio As, Cd, Cr e Pb. Questi metalli, ad eccezione del Cr, non sono essenziali per gli esseri umani e possono entrare nella catena alimentare tramite diversi alimenti. As, Co, Cu, Cr, Pb, Hg non sono facilmente trasferiti nella biomassa vegetale aerea (Amer *et al.*, 2013; Kumar *et al.* 1995; Tangahu *et al.*, 2011; Vamerali *et al.*, 2009), ma bensì accumulati principalmente in cellule radicali mentre Cd, Ni, e Zn mostrano una discreta mobilità (Trakal *et al.*, 2015).

Un metallo molto tossico per le piante e per la salute umana è il mercurio. Le piante terrestri sono generalmente poco sensibili ai danni dovuti ai composti del mercurio mentre nella forma metallica danneggia l'attività fotosintetica e il metabolismo ossidativo perchè interferisce con il trasporto

elettronico nei cloroplasti e nei mitocondri. Il mercurio inoltre, inibisce l'attività delle acquaporine e riduce l'assorbimento idrico da parte delle piante (Tangahu *et al.*, 2011). Un'altro fra i metalli più tossici è l'Arsenico e alcuni suoi composti sono stati utilizzati in passato con funzione di erbicidi. L'As risulta generalmente fitotossico a concentrazioni $<$ di 20 mg kg^{-1} nell'intera pianta. Esistono però specie come *Pteris vittata* L. capaci di accumulare concentrazioni $>$ di 1000 mg kg^{-1} nella sola parte aerea (Tangahu *et al.*, 2011; Vamerali *et al.*, 2009).

2.2.1.1 CADMIO

Il Cd, è un elemento non essenziale per le piante ed è considerato uno fra i metalli pesanti più pericolosi. Ha un'elevata mobilità nei sistemi biologici e presenta un rischio elevato per la salute umana. Ad accentuare il rischio, concorre l'elevata facilità con cui le piante estraggono questo contaminante dal suolo, che così può essere più facilmente trasferito nella catena alimentare umana e animale (Anjum *et al.*, 2014; Nedjimi e Daoud, 2008).

Il Cd è assorbito facilmente dalle piante fino a livelli tossici, ma non è ancora stata chiarita quale possa essere la sua funzione fisiologica (Anjum *et al.*, 2014). El Bakatoushi *et al.* (2015), riportano per esempio che la fitotossicità del Cadmio è correlata ai disturbi dell'assorbimento di macro e microelementi.

Il Cd può provocare nelle piante complesse modificazioni a livello genetico, biochimico e fisiologico. La fitotossicità di questo elemento si mostra con ridotto sviluppo dei tessuti e degli organi vegetali, clorosi fogliare e necrosi delle foglie e delle radici (El Bakatoushi *et al.*, 2015). Tra le modificazioni indotte nelle piante dal Cadmio, si riscontra la generazione di stress ossidativi, danni sulla nutrizione minerale, sul metabolismo clorofilliano, sulla composizione delle membrane lipidiche e sullo stato idrico (Nedjimi e Daoud, 2008). L'effetto del Cadmio sullo stress idrico è indicato da Lefèvre *et al.*, (2010) con l'aumento della resistenza stomatica ed una scarsa traspirazione. I fenomeni di stress dovuti al Cd, si possono mostrare con l'aumento del contenuto di prolina e di acido abscissico (Lefèvre *et al.*, 2010).

Nedjimi e Daoud (2008) riportano che per il Cd sono considerate concentrazioni normali (stimate in tessuti fogliari) quelle comprese fra $0.05\text{--}0.2 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (peso secco), mentre le concentrazioni da 5-10 fino a $30 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ si possono considerare eccessive o tossiche.

Molte piante sono sensibili a basse concentrazioni di Cd, che secondo Anjum *et al.* (2014), sono comprese tra 5 e 10 mg kg^{-1} di peso secco nelle foglie, mentre le specie definite Cd-iperaccumulatrici possono tollerare concentrazioni maggiori di $100 \text{ } \mu\text{g Cd g}^{-1}$ nelle parti aeree (Anjum *et al.*, 2014; Nedjimi e Daoud, 2008; Vamerali *et al.*, 2009).

2.2.1.2 PIOMBO

Il Pb è un elemento tossico per le piante, gli animali e i microorganismi, anche se i suoi effetti sono limitati generalmente alle aree molto contaminate (Tangahu *et al.*, 2011) grazie alla sua limitata mobilità. Nelle piante, il meccanismo molecolare riguardo l'assorbimento e l'omeostasi del Pb è poco conosciuto (Fahr *et al.*, 2015). Tra i principali effetti negativi che il Pb esercita nelle piante vi

è l' antagonismo nell'assorbimento del Fe e l'inibizione dell'attività di alcuni enzimi come le ureasi (Vamerali *et al.*, 2009).

L'esposizione a contaminazione da Pb oltre a indurre nelle piante la riduzione dei contenuti di clorofilla a e di clorofilla b, può ridurre anche il contenuto di carotenoidi, che svolgono funzione protettiva nei confronti delle membrane fotosintetiche (Ribeiro de Souza *et al.*, 2012). Attraverso la riduzione dell'attività fotosintetica, il Pb danneggia i processi di crescita vegetale (Ribeiro de Souza *et al.*, 2012). la riduzione dell'allungamento radicale, della biomassa e un'accelerazione del processo di senescenza fogliare (El Bakatoushi *et al.*, 2015). La tolleranza da parte delle piante nei confronti del Pb, potrebbe essere mediata da alcune proteine della famiglia delle ATPasi coinvolte nel sequestro e confinamento del metallo nei vacuoli (Fahr *et al.*, 2015).

Nei tessuti vegetali la concentrazione soglia di tossicità per il Pb, è di 10-20 mg kg⁻¹ (peso secco di piante) secondo quanto riportato da Vamerali *et al.* (2009). Esistono diverse specie definite iperaccumulatrici di Pb, come per esempio: *Thlaspi rotundifolium* subsp. *Cepaeifolium*, *Thlaspi caerulescens*, *Alyssum wulfenianum*; *Arrhenatherum elatius*, *Festuca ovina*. In queste specie la letteratura riporta una soglia di accumulo superiore a 1000 mg kg⁻¹ di Pb nei tessuti aerei (Vamerali *et al.*, 2009).

2.2.1.3 ZINCO

Lo Zinco è un metallo essenziale per il metabolismo delle piante superiori. E' un costituente delle membrane cellulari ed è coinvolto nell'attivazione degli enzimi dove è presente come cofattore. Svolge un ruolo funzionale anche nella trascrizione del DNA, nella fase riproduttiva e, influisce indirettamente sulla quantità e qualità della produzione. E' importante nel conferire resistenza ai fattori di stress biotici e abiotici, oltre a contribuire alla nodulazione e all'azotofissazione delle leguminose.

Lo Zn (insieme al Cu) è coinvolto nella formazione di fiori e semi e nella crescita delle piante, e si mostra particolarmente importante quando la sua biodisponibilità è molto bassa (Vamerali *et al.*, 2009).

Quando presente in elevate concentrazioni nei suoli, lo Zinco può causare fenomeni di tossicità in molte piante. Può infatti generare clorosi fogliare, sbilancio nutritivo e inibizione della fotosintesi (Cambrollé *et al.*, 2012). Tutti questi sintomi possono concorrere a danneggiare lo sviluppo delle piante (Cambrollé *et al.*, 2012). Molte specie mostrano notevole tolleranza ad elevate concentrazioni di Zn nei suoli e/o sono capaci di accumularne elevate quantità nei tessuti.

Per lo Zn, la soglia di tossicità indicata equivale alla concentrazione di 150–200 mg kg⁻¹ per peso secco di piante (Vamerali *et al.*, 2009). Tra le specie che hanno mostrato il maggiore accumulo di Zn e che sono definite iperaccumulatrici di questo metallo, sono annoverate *Thlaspi* spp. e *Cardaminopsis* spp e la loro soglia di accumulo è risultata superiore a 10000 mg kg⁻¹ nei tessuti aerei (Vamerali *et al.*, 2009).

2.2.2 FITOESTRAZIONE

La fitoestrazione consiste nell'utilizzo di piante per l'assorbimento dei contaminanti dal suolo o dall'acqua mediante le radici, traslocazione e accumulo nelle parti della pianta che possono facilmente essere asportate (Kumar *et al.*, 1995). Le parti asportabili possono essere principalmente aeree (Ali *et al.*, 2013; ITRC 2009), o in alcuni casi può trattarsi anche di radici o tuberi (Kumar *et al.*, 1995; Mench *et al.*, 2010). La fitoestrazione può essere considerata anche come sinonimo di fitorimozione (Conesa *et al.*, 2012) e di fitoaccumulo (ITRC 2009).

L'intero meccanismo della fitoestrazione di metalli pesanti si basa sui seguenti aspetti: mobilizzazione dei metalli nel suolo, assorbimento degli ioni da parte delle radici, traslocazione dalle radici ai tessuti aerei, sequestro nei tessuti e tolleranza (Ali *et al.*, 2013).

In questa tecnologia i metalli sono trasportati nelle parti aeree, che sono poi raccolte per eliminare i contaminanti dal terreno (Chaney *et al.*, 2007; Mendez e Maier; 2008). La traslocazione dei metalli nei fusti è un processo biochimico cruciale ed è vantaggioso nel caso in cui si voglia trarre beneficio economico dalla fitoestrazione (Ali *et al.*, 2013). La capacità potenziale di realizzare fitoestrazione da parte di una specie vegetale è determinata da due fattori: la concentrazione dei metalli nelle parti asportabile e la biomassa di queste parti.

Esistono due diversi approcci nei confronti della fitoestrazione: l'uso di iperaccumulatrici e l'uso di specie ad elevata produzione di biomassa con moderata- alta capacità di accumulo di metalli (nelle parti asportabili). Secondo Kumar *et al.* (1995) l'utilizzo di piante capaci di accumulare metalli per rimuoverli da suoli contaminati ha molti vantaggi, come per esempio il basso costo, la generazione di un residuo di piante ricche di metalli riciclabili, l'applicabilità a un ampio range di metalli e radionuclidi, oltre ad arrecare il minimo disturbo ambientale e l'accettazione da parte del pubblico. Tra il problema posto, già agli inizi degli studi sulla fitoestrazione da Kumar *et al.* (1995) vi è il fatto che la maggior parte delle specie accumulatrici identificate hanno un lento accrescimento o producono una bassa quantità di biomassa. Per questo motivo è necessario identificare piante coltivabili capaci di accumulare metalli e contemporaneamente produrre elevate quantità di biomassa in risposta a pratiche agronomiche stabilite (Kumar *et al.*, 1995).

Lo sviluppo della fitoestrazione ha portato nuove questioni sul suo uso, come i successivi trattamenti sulla biomassa, l'accumulo di contaminanti nella catena alimentare o l'uso di piante transgeniche (Conesa *et al.*, 2012).

La riuscita della fitoestrazione, in cui la rimozione dei contaminanti deve essere portata fino a livelli di legge, non è consigliabile su suoli con moderata o elevata contaminazione da metalli pesanti quando è richiesto un tempo inaccettabile per la rimozione e, secondo questo principio dunque la sua efficacia è da escludere in molte aree minerarie (Conesa *et al.*, 2012). Secondo Ali *et al.*, (2013) invece, si prevede che la fitoestrazione diventi nel futuro una attività commerciale redditizia nel campo della phytoremediation e del phytomining di metalli pesanti.

L'efficienza della fitoestrazione di metalli pesanti dipende da diversi fattori, come per esempio la biodisponibilità dei metalli (Hernández-Allica *et al.*, 2008), oltre che dalle proprietà del suolo e dal comportamento delle specie vegetali (Ali *et al.*, 2013). Per facilitare l'assorbimento di alcuni metalli come il Pb per esempio, per il quale non sono state identificate specie iperaccumulatrici, è stato

implementata per esempio la tecnica della fitoestrazione assistita mediante chelanti (Conesa *et al.*, 2012, ITRC 2009).

Le piante idonee per la fitoestrazione dovrebbero possedere le seguenti caratteristiche (Ali *et al.*, 2013; Alkorta *et al.*, 2004):

- rapido accrescimento,
- produzione di elevate quantità di biomassa aerea,
- elevato sviluppo radicale,
- elevato accumulo di specifici metalli,
- traslocazione dei metalli accumulati dalle radici ai fusti,
- tolleranza agli effetti tossici dovuti a specifici metalli pesanti,
- buon adattamento alle condizioni climatiche e ambientali,
- resistenza ai patogeni e agli insetti, facile coltivazione e raccolta,
- repellere gli erbivori per evitare contaminazioni nella catena alimentare.

Una opzione considerata rilevante è che le piante utilizzate in attività di fitoestrazione possano avere un'ulteriore utilità economica, attraverso la produzione di biomassa e recupero di metalli (Kidd *et al.*, 2015; van der Ent *et al.*, 2013).

2.2.3 FITOSTABILIZZAZIONE

La fitostabilizzazione, o fitoimmobilizzazione, consiste nell'uso di specifiche piante per la stabilizzazione dei contaminanti nei suoli (Ali *et al.*, 2013) ed in particolare, si concentra sulla formazione di una copertura vegetale grazie alla quale i metalli sono immobilizzati nella rizosfera, senza che vengano accumulati nelle parti aeree (Mendez e Maier, 2008). In questo modo viene ridotta la biodisponibilità dei metalli nell'ambiente, per prevenire la loro migrazione nelle acque sotterranee e il loro ingresso nella catena alimentare (Ali *et al.*, 2013) grazie alla riduzione dell'esposizione da parte degli animali al pascolo, della fauna selvatica e degli esseri umani (Mendez e Maier, 2008).

Le piante possono immobilizzare i metalli pesanti nei suoli mediante l'assorbimento delle radici, la precipitazione, la complessazione e la riduzione della valenza nella rizosfera. La tossicità dei metalli e la loro mobilità infatti, dipende dallo stato di ossidazione e, le piante, mediante l'escrezione di essudati radicali, (enzimi riducenti o ossidanti) possono trasformare metalli dannosi ad uno stato relativamente meno tossico (Ali *et al.*, 2013).

Il rivestimento del suolo attuato dalle piante può avere la funzione di ridurre la dispersione eolica dei contaminanti e, l'espansione radicale può aiutare a prevenire l'erosione idrica e il trasporto dei contaminanti nelle acque e nei sedimenti (Conesa *et al.*, 2007). Nel caso in cui si voglia realizzare fitostabilizzazione è necessario scegliere specie vegetali che siano capaci di realizzare una formazione vegetale stabile e duratura e che non accumulino contaminanti nei propri tessuti (Eissa, 2015). Per quanto riguarda la selezione delle specie, può essere convenientemente realizzata tra quelle che hanno colonizzato spontaneamente siti minerari (Conesa *et al.*, 2007). Mendez e Maier

(2008) indicano che le specie adatte alla fitostabilizzazione dovrebbero essere quelle in cui la capacità di concentrare metalli presenti un rapporto <1 tra le parti aeree e le radici. In climi aridi e semiaridi, la fitostabilizzazione di aree minerarie implica l'uso di specie tolleranti all'aridità e ai sali, oltre che ai metalli, a lungo termine (Clemente *et al.*, 2012; Mendez e Maier, 2008).

La biomassa prodotta da queste specie, grazie alla scarsa traslocazione di metalli nelle parti edibili, potrebbe essere utilizzata per esempio a scopo foraggero (Eissa, 2015). Secondo Ali *et al.*, 2015 la fitostabilizzazione non è una soluzione permanente a causa del fatto che i contaminanti restano nella matrice e l'attività si limita a limitarne la mobilità e, attualmente, è utilizzata come strategia di contenimento di contaminanti potenzialmente tossici.

2.2.4 ALTRE TECNICHE DI FITORISANAMENTO

Il fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti, secondo quanto esposto anteriormente può essere attuato mediante le tecniche di fitostabilizzazione o di fitoestrazione, ma le fitotecnologie sono applicabili anche secondo altre modalità.

La tecnica chiamata fitofiltrazione opera, attraverso le piante, nella rimozione dei contaminanti dalle acque superficiali, (Alkorta *et al.*, 2004) e dalle acque reflue (Ali *et al.*, 2013). A seconda delle parti della pianta principalmente interessate nell'azione di risanamento, si può parlare distintamente di rizofiltrazione (uso delle radici), caulofiltrazione (uso dei fusti), blastofiltrazione (uso di giovani piante) (Alkorta *et al.*, 2004). Nel caso della fitofiltrazione, i contaminanti vengono adsorbiti o assorbiti ed in questo modo per esempio viene limitata la loro mobilità verso le acque sotterranee (Ali *et al.*, 2013).

Un'altra tecnica, la fitodegradazione o fitotrasformazione, può essere applicata ai contaminanti organici e consiste nella degradazione dei contaminanti, mediante le piante (Alkorta *et al.*, 2004). In questi casi le piante operano la trasformazione attraverso enzimi come dealogenasi o ossigenasi, indipendentemente dall'attività di microorganismi (Ali *et al.*, 2013). L'utilizzo della fitodegradazione è possibile grazie alla capacità di alcune piante di accumulare grandi quantità di contaminanti organici per poi "detossificarli" mediante attività metaboliche (Ali *et al.*, 2013).

Si può parlare di rizodegradazione nel caso di fitorisanamento assistito da microorganismi in cui la degradazione di contaminanti è attuata nella rizosfera (Gerhardt *et al.* 2009). La rizosfera è l'ambiente influenzato dalle piante che si estende per circa 1 mm intorno alle radici (Ali *et al.*, 2013). In questo ambiente avviene la complessa interazione tra radici, essudati radicali, suolo e microorganismi e i contaminanti vengono trasformati in composti non tossici o meno tossici (Gerhardt *et al.* 2009). Il contenuto di microorganismi è 10-100 volte più elevato nel suolo della rizosfera che in suoli in cui è assente la vegetazione (Gerhardt *et al.* 2009). Inoltre, secondo quanto riportato da Gerhardt *et al.* (2009), il costo della rizoremediation per tonnellata di suolo, è molto basso (10-50 \$ t^{-1}) se comparato per esempio con quello di alcune tecniche convenzionali come la deposizione in discarica o l'incenerimento (200-1500 \$ t^{-1}).

I contaminanti organici possono anche essere estratti dal suolo attraverso le piante e rilasciati come tali in atmosfera, si parla di questo caso di fitovolatilizzazione. Questo processo può essere attuato

nel caso di piccole molecole che passando inalterate lungo il sistema di evapotraspirazione (Gerhardt *et al.* 2009).

2.2.5 FITORISANAMENTO ASSISTITO

L'applicazione del fitorisanamento nei suoli delle aree minerarie può essere limitata dall'elevata concentrazione di metalli, generalmente fitotossica per le piante e, dalla scarsa presenza di nutrienti, che può indurre un lento accrescimento e limitare lo sviluppo del manto vegetale (Pérez Esteban, 2014). In particolare, in climi aridi e semiaridi, la riuscita di un processo di rivegetazione necessita dell'aggiunta di ammendanti organici oltre che dell'irrigazione (Mendez e Maier, 2008).

L'applicazione di residui organici con la funzione di ammendanti può migliorare la fertilità dei suoli, consentire la sopravvivenza e la crescita delle piante (Pérez Esteban, 2014). L'incorporazione di residui organici come compost, letame, fanghi di depurazione o biosolidi, è una pratica comune per supportare la (ri)vegetazione di suoli contaminati e consente allo stesso tempo di recuperare questi residui in modo redditizio (Kidd *et al.*, 2015). Anche la normativa italiana (D.Lgs 152/2006) suggerisce di "privilegiare negli interventi di bonifica e ripristino ambientale l'impiego di materiali organici di adeguata qualità provenienti da attività di recupero di rifiuti urbani".

L'aggiunta di compost ai suoli contaminati può incrementare il contenuto di biomassa microbica, l'attività batterica e fungina e migliorare le qualità del suolo, per esempio attraverso l'aumento della disponibilità di Fosforo e Potassio (Clemente *et al.*, 2012). Il contenuto di materia organica nei suoli può condizionare la biodisponibilità dei metalli (Hernández-Allica *et al.*, 2008) attraverso la loro complessazione può infatti ridurla, oppure incrementarla quando i complessi che si formano sono solubili (Vamerali *et al.*, 2009).

Nell'attuare tecniche di fitorisanamento, si è osservato che un fattore molto importante da considerare è la mobilità degli elementi nel suolo (Ali *et al.* 2013) e quando è limitata, può rendere inapplicabile il processo di fitoestrazione (Hernández-Allica *et al.*, 2008).

Alcuni studi riportano che, in seguito all'applicazione di ammendanti organici, la solubilità dei metalli è rimasta inalterata (Martinez-Fernandez and Walker, 2012; Clemente *et al.*, 2012), mentre in altri casi, con l'utilizzo di compost è stata osservata una riduzione della biodisponibilità dei metalli (Bacchetta *et al.*, 2012; Pérez Esteban *et al.*, 2013; Pérez Esteban *et al.*, 2014).

Diversi autori riportano un aumento della produzione di biomassa grazie all'aggiunta di ammendanti organici su matrici contaminate da metalli pesanti (Eissa, 2015; Martinez-Fernandez e Walker, 2012; Novo *et al.*, 2013; Pérez Esteban *et al.*, 2013).

L'aumento della biomassa può incrementare l'accumulo di metalli nei tessuti (Novo *et al.*, 2013) e se avviene principalmente nelle parti aeree può risultare vantaggioso per la fitoestrazione, mentre se è maggiore nelle radici può ritenersi una condizione adatta alla fitostabilizzazione (Pérez Esteban *et al.*, 2014).

La fitoestrazione può essere mediante l'utilizzo di chelanti (Ali *et al.* 2013). Al fine di risolvere il problema della biodisponibilità dei contaminanti mediante l'applicazione di ammendanti, diversi autori hanno esplorato l'uso di chelanti come EDTA (acido etilendiamminotetracetico) in presenza

di contaminanti inorganici, o di surfattanti in caso di contaminanti inorganici (Stephenson e Black, 2014). L'uso di chelanti sintetici è in molti casi impraticabile, perchè, può causare una grave percolazione dei metalli, oltre ad essere molto costoso (Stephenson e Black, 2014). Per esempio, il costo dell'applicazione di EDTA, riportato da Chaney *et al.* (2007) per accumulare 10 g di Pb per kg di peso secco (in parti aeree di *Brassica juncea*) è pari a 30000 \$ per ha.

L'organizzazione dello schema di un'attività di fitorisanamento, deve tenere conto della scelta delle specie idonee, delle condizioni ambientali e della fertilità del suolo. Molte specie selezionate come importanti candidate per fitorisanamento sono però state studiate in monocoltura, la quale risulta una pratica agronomica lesiva per la produzione della biomassa e la fertilità del terreno e che oltre ad altri fattori negativi facilita la proliferazione di insetti dannosi (Kidd *et al.*, 2015). Con il fine di migliorare la performance produttiva di un'attività di fitorisanamento, oltre alla distribuzione di ammendanti nel suolo per migliorare la fertilità e favorire l'impianto delle specie vegetali, è necessario l'utilizzo di pratiche agronomiche come la rotazione e la consociazione delle colture (ITRC 2009; Kidd *et al.* 2015). In questo senso è ritenuta molto importante la possibilità di utilizzare leguminose, che mediante azotofissazione possono incrementare il contenuto di azoto nel terreno e tra le candidate si possono incontrare per esempio *Lotus spp.*, *Lupinus spp.*, *Medicago arabica*, *Ornithopus compressus*, *Trifolium spp.* (Bidar *et al.*, 2009; Fumagalli *et al.*, 2014; Kidd *et al.*, 2015; Mench *et al.*, 2010). Le specie vegetali che hanno funzione di incrementare il contenuto di azoto nel suolo, possono essere coltivate in consociazione (incrementano la copertura vegetale insieme ad altre specie presenti) o in rotazione (alternate periodicamente ad altre specie). L'utilizzo di specie azotofissatrici può permettere di controllare l'erosione e la percolazione dei contaminanti e consentire la riduzione dell'apporto di fertilizzanti chimici (Fumagalli *et al.*, 2014).

2.3 Efficienza di estrazione dei metalli nelle attività di fitostabilizzazione e di fitoestrazione

La capacità delle piante nell'estrarre i metalli dal suolo e traslocarli nei propri tessuti può essere valutata attraverso diversi parametri.

Per esempio, attraverso il fattore di bioconcentrazione (BF), viene misurato il rapporto fra la concentrazione totale di metallo nei tessuti, (parte aerea o radici) e quella contenuta nella matrice (Conesa *et al.*, 2007), totale o solubile (Mench *et al.*, 2010). Un altro parametro è il fattore di accumulo (AF), con il quale si misura il rapporto fra il contenuto totale di metallo nei tessuti e il contenuto totale nella matrice (Mench *et al.*, 2010). Il fattore di traslocazione (TF), (chiamato anche fattore di accumulo da Conesa *et al.*, 2007) invece, consente di rapportare la concentrazione totale di metallo presente nelle parti aeree con quella presente nelle radici (Mench *et al.*, 2010). Tutti questi indicatori, BF, AF e TF possono essere espressi anche in termini percentuali (Ali *et al.*, 2013).

Le specie vegetali che si sono particolarmente adattate a vivere su suoli contaminati vengono definite metallofite. Queste, possono a loro volta essere distinte in tre tipologie: metallo esclusori,

metallo indicatori e metallo iperaccumulatori (Ali *et al.*, 2013). I metallo esclusori hanno la tendenza ad accumulare i metalli nelle radici, e limitare invece il trasporto nelle parti aeree (Ali *et al.*, 2013). Per questo motivo sono consigliabili in attività di fitostabilizzazione (Ali *et al.*, 2013; Mench *et al.*, 2010; Mendez e Maier, 2008) mentre hanno scarse potenzialità per svolgere fitoestrazione.

Le specie candidate per svolgere fitostabilizzazione devono mostrarsi come metallo esclusori, perchè per esempio per esempio hanno un BCF e un TF <1 (Mench *et al.*, 2010; Mendez e Maier, 2008), al fine di minimizzare la traslocazione nelle parti aeree e la diffusione nella catena alimentare. Diversi autori, definiscono le specie che hanno testato, come adatte a realizzare fitostabilizzazione principalmente in funzione di questa caratteristica, unita all'abilità delle piante di crescere nei suoli contaminati (Mendez e Maier; 2008; Eissa, 2015; Pérez-Esteban *et al.*, 2014).

Pérez-Esteban *et al.* (2013) ritengono che sia più utile determinare il contenuto totale di metallo estratto dal suolo e accumulato nei tessuti e, calcolando poi il numero di cicli necessari per realizzare fitorisanamento si può decretare se sia più ragionevole realizzare fitostabilizzazione o fitoestrazione.

Perchè si possa realizzare fitoestrazione, le piante devono essere capaci di accumulare elevate concentrazioni di metalli nelle parti asportabili (per esempio i fusti), e raggiungere una soddisfacente quantità di biomassa (Kidd *et al.*, 2015). La fitoestrazione dipende dall'accumulo annuale di metalli nella biomassa aerea che può poi essere rimossa a supporto del risanamento del suolo ed eventualmente con l'obiettivo di realizzare phytomining (Chaney *et al.*, 2007).

Tra le specie adatte per la fitoestrazione, le iperaccumulatrici sono soggette a particolare attenzione poichè includono quelle piante che posseggono la capacità di accumulare grandi quantità di metalli nei propri tessuti (Alkorta *et al.*, 2004; Kidd *et al.*, 2015; Mench *et al.*, 2010; Hernández-Allica *et al.*, 2008; ITRC 2009) ma non esiste uno standard scientifico per la loro definizione (Ali *et al.*, 2013). Le specie utilizzabili possono essere native di siti contaminati, coltivate o geneticamente trattate (Mench *et al.*, 2010).

Si conoscono specie iperaccumulatrici per elementi come nickel, zinco, cadmio, manganese, arsenico e selenio mentre non sono certe quelle per piombo, rame, cobalto, cromo e tallio e, van der Ent *et al.* (2013) intendono chiarire ulteriormente quando una specie presenta le caratteristiche di iperaccumulatrice o meno. Secondo questi autori infatti, non è sufficiente considerare i limiti di accumulo di metalli nei tessuti conosciuti in letteratura, ma è necessario valutare accuratamente i diversi casi. Non possono essere invece definite iperaccumulatrici quelle decretate tali perchè assorbono una elevata quantità di metalli in condizioni artificiali, come per esempio utilizzando sali, in suoli sperimentali o in soluzioni nutrienti (Van der Ent *et al.* 2013). van der Ent *et al.*, (2013) mettono in discussione l'utilizzo del BF come criterio principale. Considerano infatti che è molto difficoltoso stabilire la capacità di accumulo delle radici di molte piante come per esempio gli alberi, inoltre nella fase di analisi dei metalli, è molto difficile eliminare quelli presenti nella superficie delle radici che appartengono invece alla matrice del suolo.

Diversi autori concordano con il fatto che possano essere riconosciute come iperaccumulatrici quelle specie che vivono in habitat naturali, in cui le concentrazioni di metalli nelle foglie superano

i seguenti limiti: 100 per Cd, Se e Tl; 300 per Co, Cr e Cu; 1000 per As, Ni e Pb; 3000 per Zn e 10,000 per Mn (μg di metallo per g di tessuto fogliare secco) (Ali *et al.*, 2013; Pollard *et al.*, 2014; van der Ent *et al.*, 2013). Questi valori sono mediamente 3 volte più grandi di quelli contenuti normalmente nelle piante che crescono in suoli metalliferi (Ali *et al.*, 2013) e potrebbero essere ulteriormente supportati da altri come un $\text{BF} > 1$, $\text{TF} > 1$, estrema metallo tolleranza (van der Ent *et al.*, 2013).

Nonostante il grande interesse nei confronti le iperaccumulatrici per svolgere fitoestrazione, occorre tenere in considerazione il limite dovuto alla scarsa produzione di biomassa che molte di queste specie mostrano (Ali *et al.*, 2013; Kidd *et al.*, 2011) e il numero di piante attualmente riconosciute tra le iperaccumulatrici è piuttosto basso (Van der ent *et al.*, 2013). Per questo motivo, per svolgere fitoestrazione, sono attualmente studiate molte specie ad elevata produzione di biomassa (annue o perenni) come valida alternativa alle specie iperaccumulatrici (Kidd *et al.*, 2015). Infatti, le specie che mostrano un moderato-alto fattore di bioconcentrazione di metalli insieme ad una buona produzione di biomassa, possono raggiungere un notevole accumulo di metalli nelle parti aeree (Kidd *et al.*, 2015). Piante che producono un'elevata quantità di biomassa e che accumulano moderati livelli di metalli nei loro tessuti, sono consigliate per svolgere fitorisanamento, proprio perchè la bassa concentrazione di contaminanti nei tessuti può essere compensata dall'elevata quantità di biomassa aerea (Van Oosten e Maggio, 2015).

2.4 Attuali applicazioni e prospettive del fitorisanamento

Il fitorisanamento è visto spesso come uno strumento promettente per il risanamento di siti contaminati, grazie alla sua sostenibilità ambientale, accettazione da parte del pubblico e bassi costi rispetto ad altre tecniche, nonostante ciò, secondo Conesa *et al.* (2012) è scarso il successo avuto nell' applicazione in operazioni commerciali.

Secondo Stephenson e Black (2014) in grandi mercati come America e Europa, lo sviluppo commerciale del fitorisanamento è stato condizionato dal differente approccio che hanno mostrato nei confronti della ricerca scientifica su questa tecnologia. In America, le sovvenzioni da parte di organizzazioni come l'EPA (*Environmental Protection Agency*) e il *Department of Defence*, hanno incoraggiato applicazioni basate sulla ricerca, focalizzate su scenari di contaminazione reali (Stephenson e Black, 2014) con il risultato di un successo commerciale del fitorisanamento, grazie alla repentina nascita di attività imprenditoriali legate agli istituti di ricerca.

In ogni caso, il fitorisanamento non ha raggiunto il potenziale previsto come tecnologia commerciale (Stephenson e Black 2014), infatti anche se prima del 2000, negli USA, il mercato del fitorisanamento è andato aumentando (nel 2005 ha raggiunto \$100–150 milioni) il trend è stato ben lontano da quello ipotizzato (235–400 milioni di \$ nel 2005).

Secondo Stephenson e Black (2014) in Europa invece, l'approccio basato sulla ricerca di base, come COST Action 837, ha avuto come risultato quello di limitare lo sviluppo di progetti commerciali di fitorisanamento.

La prassi di suddividere i progetti di fitorisanamento in due categorie, fitostabilizzazione e fitoestrazione può evolvere se si all'introduce l'associazione con una possibile produzione economica, in cui il fitorisanamento, non viene attuato al solo scopo di risanare il suolo, ma anche per generare benefici economici attraverso la produzione per esempio di energia, pascolo, prodotti biofortificati, *etc.*, (Conesa et al., 2012). Secondo Conesa *et al.* (2012), è necessario rivalutare l'orientamento della ricerca per applicare maggiormente questo concetto. Il "Phytomanagement" cerca di risolvere una delle principali limitazioni del fitorisanamento, ovvero la mancanza di proventi economici, mediante approcci basati sull'analisi costi benefici o sulla produzione di biomassa con elevato valore economico (Stephenson e Black, 2014).

Nell'ambito del phytomanagement per esempio, si può menzionare in Europa la possibilità di realizzare attività (commerciale) di phytomining, in cui l'estrazione di Nichel risulta meno costosa con questo metodo rispetto a quello tradizionale (Ali *et al.*, 2013). Bani *et al.*, (2015), per esempio ritengono molto redditizio in Albania il recupero di Nichel, da fitorisanamento attuato con la specie *Alyssum murale*, anche in considerazione della bassa necessità economica di input. Con il phytomanagement si può combinare la fitostabilizzazione con l'incremento del valore (tangibile) ottenibile dalle superfici (attraverso l'incremento di legno, prodotti foraggeri e bioenergie), o può essere usato per incrementare il valore ecologico, intangibile, di un territorio (Stephenson e Black, 2014). Attraverso per esempio la creazione di corridoi naturali, come quello realizzato nella valle del Guadamar, nel Sud Est della Spagna (Domínguez et al., 2008), si combina il recupero di suoli e la creazione di una fascia di vegetazione continua tra il Parco Nazionale del Doñana e le montagne della Sierra Morena. Questo programma di risanamento di suoli, che con i suoi 55 km² è uno fra i più grandi in Europa, facilita la migrazione degli animali. e consente di migliorare la biodiversità dell'area, interessata in passato da un grave evento di contaminazione da materiale minerario (Aznácollar, Andalucía).

L'applicazione del fitorisanamento presenta diverse limitazioni come per esempio (Ali *et al.*, 2013):

- il tempo richiesto per raggiungere il risanamento di una matrice contaminata,
- l'efficienza del fitorisanamento di molte specie iperaccumulatrici è spesso limitata da un lento accrescimento e bassa produzione di biomassa,
- difficoltà a mobilitare gli elementi nel suolo,
- applicabilità a siti con lieve o moderato livello di contaminazione a causa della scarsa durata delle piante in suoli ad elevata contaminazione,
- rischio di contaminazione della catena alimentare.

La durata di un intervento di fitorisanamento, che corrisponde al tempo necessario per portare la concentrazione di un elemento inquinante entro i limiti di legge, può essere stimata secondo la seguente equazione (Marchiol, 2004) :

$$\frac{M \times (Me)_{suolo}^{T_2-T_1}}{B \times B_f \times (Me)_{suolo}^{T_2}}$$

Dove

T: tempo in mesi/anni

M (t): massa di suolo esplorata

B (t anno⁻¹): biomassa prodotta

BF(adimensionale): fattore di bioconcentrazione

(Me)^{T1}_{suolo} (mg metallo kg⁻¹ suolo): concentrazione finale ovvero obiettivo della bonifica

(Me)^{T2}_{suolo} (mg metallo kg⁻¹ suolo): concentrazione iniziale nel suolo contaminato

L'applicabilità del fitorisanamento su scala reale è stata valutata attraverso diversi esperimenti su scala di campo e in diversi casi sono state sperimentate specie autoctone di aree contaminate o che non sono normalmente coltivate a scopo agrario (Bacchetta et al. 2012; Bani et al., 2010, Pietrosanti et al., 2012). Per valutare la possibilità di realizzare fitoestrazione sono stati realizzati studi sperimentali di questo tipo, utilizzando oltre a specie iperaccumulatrici (Bani et al., 2010), specie agrarie erbacee scelte per l'accumulo di metalli ottenibile grazie all'elevata produzione di biomassa (Tlustoš et al., 2005; Bidar et al, 2009; Farrag et al., 2012; Nehnevajova et al., 2005; Marchiol et al., 2008) o specie arboree e arbustive come salice, pioppo, Atriplex (Marmioli et al, 2011; French et al, 2006; Dominguez et al., 2008; Pottier et al., 2015; Eissa et al, 2015; Clemente et al, 2012; Mleczek et al., 2010; Pietrosanti et al., 2012; Vamerali et al., 2009).

La pratica del fitorisanamento trova ancora diversi ostacoli nella realtà Europea e il progetto Greenland, un consorzio costituito da Università, istituti di ricerca e piccole e medie imprese, ha avuto come obiettivo complessivo quello di aumentarne le possibilità di successo di questa tecnologia di ripristino ambientale (Renella, 2012). Con questo progetto infatti è stata testata in campo l'applicabilità di numerosi pratiche (Kidd *et al.*, 2015).

Su scala reale, in Italia si può citare il lavoro riportato da Macci *et al.* (2013) realizzato utilizzando le specie *Populus nigra*, *Paulownia tomentosa* e *Cytisus scoparius* su un'area industriale contaminata da metalli e idrocarburi in Toscana.

2.5 Destino finale delle biomasse ottenute da fitorisanamento: attuale situazione tecnica e normativa e prospettive future

Il fitorisanamento pone un'importante questione: la gestione delle piante in seguito al loro utilizzo in processi di fitoestrazione di metalli. Se il processo di fitoestrazione è stato efficiente, la biomassa raccolta è classificabile come pericolosa e deve essere trattata di conseguenza (Mench *et.al*, 2010).

Le piante che contengono elevate concentrazioni di contaminanti devono essere smaltite in maniera appropriata e a tal fine sono disponibili diversi metodi come l'incenerimento, la diretta deposizione in discarica, estrazione di ceneri e di liquidi (Van Oosten e Maggio, 2015). Fra queste, attualmente l'incenerimento è la tecnica più accettata perchè risulta un processo tecnicamente realizzabile e conveniente economicamente (Van Oosten e Maggio, 2015). I caso di processi di combustione, dopo l'incenerimento delle piante, il materiale ottenuto può essere depositato in discarica, oppure, se

economicamente vantaggioso, potrebbe essere processato per il recupero di metalli preziosi o semipreziosi, attuando quella che viene chiamata "phytomining" (Ali *et al.*, 2013).

Se si considerasse il risanamento di un'area contaminata dalla prospettiva/punto di vista ambientale sarebbe auspicabile il raggiungimento dei migliori standard ambientali senza tener conto dei potenziali costi, ma questo imporrebbe l'erogazione di consistenti finanziamenti pubblici (Jiang *et al.*, 2015). Secondo Dhir e Srivastava (2012), il fattore chiave che attualmente inibisce un'implementazione del fitorisanamento a livello commerciale, è proprio la necessità di dover trattare le grandi quantità di biomassa che possono essere prodotte durante il processo. Questa stessa biomassa potrebbe però essere destinata alla produzione energetica mediante diversi processi.

A tale scopo diversi studi si propongono di valutare la possibilità di realizzare contemporaneamente il risanamento ambientale della matrice e la produzione di biomassa per il recupero finale di energia. Per valutare la reale fattibilità di questa duplice attività è necessario valutare gli aspetti normativi, Europei ed Italiani.

Per quanto riguarda la normativa Europea, la direttiva 2009/28/CE si occupa della promozione dell'uso dell'energia da fonti rinnovabili e, fra queste, si incontrano le biomasse destinate al recupero energetico.

La direttiva 2009/28/CE è recepita dalla normativa italiana mediante il Decreto Legislativo del 3 marzo 2011, n. 28 e fissa i criteri di sostenibilità per i biocarburanti e i bioliquidi per l'Italia.

Questa norma (art.2) definisce anche i seguenti concetti:

a) «energia da fonti rinnovabili»: *energia proveniente da fonti rinnovabili non fossili, vale a dire energia eolica, solare, aerotermica, geotermica, idrottermica e oceanica, idraulica, biomassa, gas di discarica, gas residuati dai processi di depurazione e biogas;*

e) «biomassa»: *la frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali), dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, comprese la pesca e l'acquacoltura, gli sfalci e le potature provenienti dal verde pubblico e privato, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani;*

h) «bioliquidi»: *combustibili liquidi per scopi energetici diversi dal trasporto, compresi l'elettricità, il riscaldamento ed il raffreddamento, prodotti dalla biomassa;*

i) «biocarburanti»: *carburanti liquidi o gassosi per i trasporti ricavati dalla biomassa;*

Per quanto riguarda il rispetto della sostenibilità di queste produzioni, la Direttiva 2009/28/CE premette per che la produzione dei biocarburanti dovrebbe essere promossa in maniera da incoraggiare una maggiore produttività agricola e l'utilizzo dei terreni degradati. Inoltre evidenzia che occorre sorvegliare l'impatto della coltivazione della biomassa, dovuto ad esempio a modifiche della destinazione dei terreni, incluso lo spostamento, l'introduzione di specie esotiche invasive ed altri effetti sulla biodiversità, e gli effetti sulla produzione alimentare e sulla prosperità locale. La Direttiva 2009/28/CE sottolinea che la domanda globale di materie prime agricole è in crescita e che questa domanda potrà essere parzialmente soddisfatta aumentando la superficie dei terreni agricoli. Uno dei modi per aumentare la superficie dei terreni disponibili per le coltivazioni consiste nel ripristino di terreni gravemente degradati o fortemente contaminati che, allo stato attuale, non

possono essere utilizzati per scopi agricoli. Aggiunge inoltre che il regime di sostenibilità dovrebbe promuovere l'utilizzo di terreni degradati ripristinati anche perchè la promozione dei biocarburanti e dei bioliquidi contribuirà alla crescita della domanda di materie prime agricole.

A supporto della Direttiva 2009/28/CE, è stata introdotta la direttiva 1513/2015, che ha modificato la direttiva 2008/98/CE relativa ai rifiuti, mediante l'introduzione delle seguenti voci:

w) “biocarburanti e bioliquidi a basso rischio di cambiamento indiretto di destinazione dei terreni”: *biocarburanti e bioliquidi le cui materie prime sono state prodotte nell'ambito di sistemi che riducono la delocalizzazione della produzione a scopi diversi dalla fabbricazione di biocarburanti e bioliquidi e che sono stati prodotti conformemente ai criteri di sostenibilità per i biocarburanti e i bioliquidi.*

La direttiva 1513/2015 non è ancora stata recepita dalla legislazione Italiana e, ad occuparsi di questi prodotti è il DLgs.vo 28/2011 quando dichiara che "i biocarburanti e i bioliquidi devono rispettare i criteri di sostenibilità" e, quando rimanda a quanto disposto dall' art. 17 della Direttiva 28/2009 CE.

Nella Direttiva 28/2009 CE si può osservare un'importante appoggio alla produzione sostenibile di biocarburanti quando espone le modalità di esecuzione del calcolo dell'impatto dei gas a effetto serra dei biocarburanti, dei bioliquidi e dei carburanti fossili di riferimento. Si può notare per esempio, che identifica un premio di 29 g di CO₂eq/MJ da attribuire in presenza di elementi che dimostrano che il terreno in questione (per la produzione di biocarburanti e bioliquidi) rientra in una delle seguenti categorie:

- i) terreno pesantemente degradato, compresi i terreni precedentemente utilizzati per scopi agricoli;
- ii) terreno fortemente contaminato.

La stessa direttiva definisce che:

- a) per «terreni pesantemente degradati» s'intendono terreni che sono da tempo fortemente salini o il cui tenore di materie organiche è particolarmente basso e la cui erosione è particolarmente forte;
- b) per «terreni fortemente contaminati» s'intendono terreni il cui livello di contaminazione è tale da renderli inadatti alla produzione di alimenti o mangimi.

Da una valutazione delle normative sopra esposte, si può desumere la possibilità offerta dalla normativa Europea, dell'utilizzo di terreni contaminati per la produzione di bioliquidi.

Si potrebbe invece osservare l'esistenza di un vuoto normativo in Italia, che impedisce di identificare come "biomassa" il prodotto vegetale ottenibile da attività di fitorisanamento. Il materiale vegetale è attualmente definibile come un rifiuto (allegato D. Lgs 152/2006) proveniente dalle operazioni di bonifica di terreni e deve essere trattato di conseguenza.

Nonostante ciò la ricerca sulla produzione di energia da biomassa ottenibile da processi di fitorisanamento ha avuto un notevole sviluppo negli ultimi anni e verrà discussa nel paragrafo successivo.

2.5.1 PRODUZIONE DI BIOCOMBUSTIBILI

Si intende con bioenergia, l'energia derivata dalla biomassa (IPCC, 2011) ovvero il materiale di origine biologica ottenuta a partire da piante e animali. La biomassa da destinare a fini energetici può derivare da residui agricoli, colture da biomassa dedicate, biomassa forestale ottenuta da silvicoltura, letame, rifiuti di tipo organico (IPCC, 2011; Beringer *et al.*, 2011). Le coltivazioni di biomasse per la produzione di energia possono essere di tipo forestale o agrario e possono essere coltivate in aree agricole o in aree marginali (IPCC, 2011). Tra queste sono da preferire le specie rapido accrescimento, come il salice coltivato in SRC (acronimo di *short rotation coppice* ovvero ceduo a turno breve) e il miscanto.

Le tecnologie per la produzione di energia includono diversi processi come: combustione, CHP, co-combustione, produzione di biocarburanti a partire da coltivazioni zuccherine o oleaginose (etanolo e biodiesel), produzione di biocarburanti a partire da materiale lignocellulosico (Syngas), processi di digestione anaerobica per la produzione di biogas (IPCC, 2011).

Non esiste uno specifico elenco, a livello normativo, che indichi quali specie possono essere individuate come colture energetiche. Molta attenzione è stata riposta sulla produzione di energia da conversione lignocellulosica su specie legnose a rapido accrescimento come pioppo e salice e su specie erbacee come miscanto e panico (Beringer *et al.*, 2011) e sono proprio queste, insieme all'eucaliptus ad essere considerate le migliori candidate fra le coltivazioni energetiche (Searle *et al.*, 2014). Fra le specie candidate per la produzione di biocarburanti alcune sono riconosciute invasive in USA, fra queste si possono menzionare per esempio Miscanto, panico, *Sorghum halepense*, *Arundo donax* e *Phalaris arundinacea* (IPCC, 2011).

Una importante caratteristica da considerare è la variabilità della produzione a seconda della regione e della coltura, inoltre, la valutazione della produzione di biomassa delle singole colture deve tenere conto, fra gli altri fattori, della disponibilità idrica (ICCP).

Esistono diversi studi dedicati alla valutazione della redditività di coltivazioni energetiche e alle implicazioni ambientali che possono comportare.

Secondo Searle *et al.* (2014) per esempio, sono proprio le coltivazioni energetiche ad essere considerate le migliori candidate, fra le opzioni possibili, nel supportare l'aumento della domanda di energie da biomassa e si prevede che nel futuro la produttività media di queste coltivazioni potrebbe essere di 18 t ha⁻¹ (10,5-22,9 t ha⁻¹). A titolo di esempio la produzione media di Miscanto (*Miscanthus giganteus*) può raggiungere nei suoli poveri o marginali produzioni tra 5 e 13 t ha⁻¹ y⁻¹ (materia secca), mentre in suoli coltivabili con sufficienti precipitazioni o irrigazione i valori vanno da 7 a 44 t ha⁻¹ y⁻¹ Searle *et al.* (2014). Un'altra coltura come il Panico (*Panicum virgatum* L.), può avere produzioni volte basse (1-2 t ha⁻¹ y⁻¹) principalmente in suoli poco drenati e con precipitazioni inadeguate, mentre in altre condizioni, come climi caldi e adeguate condizioni idriche, può raggiungere elevate produzioni di biomassa (35 t ha⁻¹ y⁻¹ di materia secca) (Searle *et al.* (2014).

Per quanto riguarda la produzione delle principali colture energetiche legnose, quella di pioppo, tanto in SRC quanto in fustaia, è piuttosto variabile a seconda del genotipo (da molto bassa a 24 t ha⁻¹ y⁻¹), quella dell'Eucaliptus è mediamente di 10-17 t ha⁻¹ y⁻¹, quella del salice di 5-10 t ha⁻¹ y⁻¹ (Searle *et al.*, 2014).

Per quanto riguarda la coltivazione del salice, si tratta ancora di un'attività emergente, nonostante questa e altre colture da SRC (acronimo del termine *Short Rotation Coppice*) siano considerate molto importanti per la produzione futura di energia in Europa (Langeveld *et al.* 2012). In Svezia per esempio, il salice è commercializzato per la produzione di elettricità e riscaldamento dagli inizi dei 1990 e le coltivazioni occupano circa 14000 ha, ovvero lo 0,5 % delle superfici arabili/coltivabili (Langeveld *et al.* 2012).

Spesso i risultati sperimentali di produzione di biomassa sovrastimano quelli che si ottengono successivamente su scala reale (Mola-Yudego *et al.*, 2015), per esempio, per quanto riguarda il salice, nelle coltivazioni commerciali il raccolto osservato presentava valori di 2.6-4,2 t ha⁻¹ anno⁻¹ mentre nelle parcelle sperimentali i valori medi erano pari a 7.7 t ha⁻¹ anno⁻¹.

La coltivazione di piante da biomassa a fini energetici può competere con l'uso delle aree agricole e negli ultimi anni è stata esplorata la possibilità di produrre tali biomasse sulle aree degradate e/o contaminate, non utilizzabili per la produzione alimentare o foraggera.

Fra i primi studi esistenti, realizzati su campo sperimentale, vi è quello di French *et al.* (2006) che esplora la possibilità di produrre biomasse legnose in aree degradate/contaminate (brownfield) con le specie *Salix* spp., *Populus* spp, *Alnus* spp., *Betula* spp., *Larix* spp., nel nord ovest dell'Inghilterra. In questo studio la biomassa prodotta ha mostrato risultati variabili per tutte le specie, compresi fra 2-9 t ha⁻¹ anno⁻¹e, in Uk si considera che il ritorno economico da biomassa legnosa si ha quando la produzione supera 8-10 t/ha annue (French *et al.* 2006).

Mleczeck *et al.* (2010) hanno valutato la possibilità di produrre biomassa a scopo energetico da salice, contemporaneamente al fitorisanamento di metalli pesanti. Gli studi sono risultati promettenti per alcuni taxa e, confermando quanto riportato da Meers *et al* (2007); Landberg e Greger (1996); Watson *et al.*, (2003), suggeriscono allo stesso tempo la necessità di un'attenta selezione clonale a causa della significativa variabilità esistente fra i taxa testati, sia nella produzione di biomassa che nell'accumulo di metalli.

Lo studio di Schreurs *et al.* (2011) si propone di valutare la capacità produttiva di coltivazioni energetiche sia legnose che erbacee su suoli considerati marginali come quelli contaminati da Cd nell'area del Campine in Belgio. A tal fine, questi autori hanno analizzato salice (legnosa) e tabacco da destinare alla termovalorizzazione, insieme a colture erbacee come mais e colza (*Brassica napus*) per produrre insilato. Secondo questi autori, evitare di realizzare coltivazioni energetiche su suoli agricoli incontaminati, aumenta la sostenibilità ambientale della produzione di biomassa e la possibilità di aumentare le terre coltivabili nel futuro.

Nell'ottica dell'uso produttivo delle aree marginali, Falasca *et al.* (2014) hanno valutato l'idoneità agroecologica di aree aride e saline per la produzione di biomassa lignocellulosica, mediante le specie *Atriplex halimus* e *A. nummularia*. Hanno identificato aree per la coltivazione di queste specie a fini energetici, senza che possa esistere competizione con quelle designate per la produzione alimentare. *A. nummularia* è fra le piante identificate dal *Carbon Emission Trading Scheme* delle Nazioni Unite, per supportare la lotta contro i gas serra e sequestrare carbonio atmosferico nel suolo. Secondo i risultati ottenuti da Falasca *et al.* (2014), l'implementazione di colture di *A.*

halimus e *A. nummularia* potrebbe consentire la produzione di bioenergie o biocombustibili di seconda generazione in aree aride.

Il fitorisanamento può essere implementato come un processo produttivo per il recupero di energia e anche di metalli (phytomining) e, in questo caso, risultano rilevanti altri fattori, come l'elevata produzione di biomassa e i contaminanti in essa contenuti (Jiang. *et al* 2015).

Tra gli studi realizzati con lo scopo di valutare l'esistenza di un possibile ritorno economico dal fitorisanamento, quello di Jiang. *et al.* (2015) propone un concetto integrato di fitorisanamento, in cui l'attività di risanamento è accoppiata alla produzione di energia dalla biomassa e al recupero dei metall(oid)i. A tal proposito gli autori riportano che su scala europea, il costo medio per m³ di un'attività di fitorisanamento on site è di 122 Euro, (Jiang *et al* 2015). Gli autori hanno confrontato i profitti ottenibili da diverse attività di fitorisanamento utilizzando sia specie iperaccumulatrici (bassa produzione di biomassa) che specie ad elevata produzione di biomassa. osservando che, è la produzione di biomassa a determinare la redditività del processo principalmente grazie all'energia da essa ottenibile.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Piano sperimentale e obiettivi

L'attività di ricerca ha come obiettivo generale indagare la possibilità di utilizzare specie autoctone legnose e specie leguminose per attività di fitorisanamento di suoli contaminati da elevate concentrazioni di metalli pesanti in clima xerico, studiando diverse possibilità di coltivazione, al fine di ottenere un miglior compromesso economico-produttivo e ambientale.

La specie legnosa scelta è *Atriplex halimus*, in quanto, come già esposto nella parte introduttiva, è caratterizzata da elevata produzione di biomassa, notevole capacità di sopravvivenza in ambienti contaminati da metalli pesanti e adattamento a climi xerici, prevalenti in diverse aree della Sardegna.

La specie leguminosa scelta è *Medicago polymorpha*, per la quale, nel presente lavoro, sono state studiate la capacità di sopravvivenza e adattamento su substrati contaminati da metalli pesanti. Tali caratteristiche non erano ancora note, per l'assenza di precedenti studi in applicazioni di fitorisanamento. Questa specie, è stata scelta perchè oltre ad essere una leguminosa azotofissatrice che ben si adatta al clima della Sardegna, è una specie autoriseminante, che non necessita interventi di semina ogni anno.

Nei seguenti paragrafi vengono descritti in dettaglio il piano sperimentale adottato e gli obiettivi specifici perseguiti nell'ambito delle attività sperimentali.

3.1.1 SCHEMA SPERIMENTALE

L'attività sperimentale è stata condotta su scala di laboratorio. Il piano sperimentale è stato articolato in 6 fasi, schematicamente riassunte nella tabella 3. 1.

Tabella.3.1. Schematizzazione del piano sperimentale.

Fase	Specie Utilizzata	Tipologia Impianto	Tipologia Substrato	Codice sperimentazione
1	<i>Atriplex halimus</i>	Piante di 2 anni in vaso	Controllo (B) Campo Pisano (CP) Campo Pisano + Inerti (CP+I)	A1
2	<i>Atriplex halimus</i>	Talee su substrato	Controllo (B) Campo Pisano (CP) Campo Pisano + Inerti (CP+I) Campo Pisano + Compost e Inerti (CP+A)	A2
3	<i>Atriplex halimus</i>	Piante di 2 mesi su substrato	Controllo (B) Campo Pisano (CP) Campo Pisano + Compost e Inerti (CP+A)	A3
4	<i>Atriplex halimus</i>	Cloni di 3 mesi su substrato	Controllo (B*) Campo Pisano (CP) Campo Pisano + Compost e Inerti (CP+A)	A4
5	<i>Medicago polymorpha</i>	Germinazione di semi in vaso	Controllo (U) Campo Pisano (CP)	M1
6	<i>Medicago polymorpha</i>	Germinazione di semi in vaso	Controllo (U) Campo Pisano (CP) Campo Pisano + Compost e Inerti (CP+A)	M2

3.1.2 OBIETTIVI SPECIFICI

Obiettivo 1. Valutare la possibilità di utilizzo della specie *Atriplex halimus* per il fitorisanamento di suoli ad elevata contaminazione da metalli in Sardegna.

Per sviluppare questo obiettivo, attraverso le sperimentazioni A1, A2, A3, A4, sono state studiate le capacità di sopravvivenza, di adattamento, produzione di biomassa e accumulo di metalli nei tessuti da parte della specie, cresciuta su substrati contaminati.

Obiettivo 2. Testare la potenzialità di produzione di biomassa aerea della specie *Atriplex halimus* mediante una selezione clonale, nell'ottica di una coltivazione mirata al fitorisanamento.

Attraverso la sperimentazione A4, si è voluta esplorare la possibilità di selezionare la specie, confrontando le potenzialità per fitorisanamento e produzione di biomassa da parte di diversi cloni. Attualmente infatti, a differenza di altre specie legnose, per *Atriplex halimus* non si conoscono studi finalizzati alla selezione clonale a scopo di fitorisanamento.

Obiettivo 3. Studiare diverse combinazioni di substrati che possano consentire di raggiungere una migliore performance produttiva della specie in ambito di fitorisanamento.

Attraverso le sperimentazioni A1, A2, A3, A4, M2, sono state studiate diverse combinazioni di substrati con il fine di migliorare le condizioni fisico-chimiche dei suoli. I substrati contaminati sono stati ammendati con compost da frazione organica di rifiuti urbani e con materiale inerte. Quest'ultimo è stato introdotto con lo scopo di diluire il substrato contaminato e migliorarne le caratteristiche fisiche (struttura e porosità). Il compost, quale ammendante a basso prezzo, consente inoltre di soddisfare l'obiettivo 4.

Obiettivo 4. Limitare i costi di impianto e di produzione contemporaneamente all'ottenimento di elevati standard di fitorisanamento per la specie *Atriplex halimus*.

Dopo aver constatato la capacità della specie *Atriplex halimus* ad adattarsi a vivere su suoli contaminati utilizzando piante di due anni (sperimentazione A1), mediante le sperimentazioni A2, A3, A4, è stata valutata la possibilità di ridurre i tempi di produzione delle piante mediante propagazione agamica (per talea). A tal riguardo, si ricorda che tale forma di moltiplicazione è preferita a quella gamica (per seme) laddove si vogliano riprodurre specifiche caratteristiche genetiche e fenotipiche. Allo stesso tempo, mediante l'utilizzo di ammendanti a basso costo, si è voluta migliorare la produttività della specie.

Si sono testate le seguenti soluzioni di impianto:

- Le piante sono state ottenute facendo radicare talee direttamente su suolo contaminato (sperimentazione A2).

L'impianto di una specie legnosa mediante talee, può consentire una notevole riduzione dei costi nella prima fase di allevamento. Con questa soluzione infatti, la produzione di piante sarebbe limitata alla raccolta di talee a partire da piante madri generalmente allevate in campo a tale scopo dall'azienda di produzione. Allo stesso tempo, questa soluzione può essere utilizzata su aree o appezzamenti nei quali risulta difficoltoso un intervento di coltivazione di piante complete.

- Le piante sono state coltivate sui substrati sperimentali sotto forma di giovani piante dell'età di 2 e 3 mesi (sperimentazioni A3 e A4).

Mediante questa soluzione, le piante di *Atriplex halimus* sono ottenute con un processo di taleaggio in idonee condizioni produttive (impianto di radicazione). Una volta prodotte le barbatelle, queste vengono immediatamente disposte su substrato contaminato, senza che vi sia una fase intermedia di accrescimento e adattamento in altre condizioni, escludendo dunque la fase di vivaio.

Obiettivo 5. Valutare la possibilità di utilizzare la specie *Medicago polymorpha* nel fitorisanamento di suoli contaminati da metalli.

Come verrà esposto più in dettaglio nel presente capitolo, l'utilizzo di leguminose in processi di fitorisanamento consente di soddisfare la duplice esigenza di fornire azoto al terreno e proteggere il

suolo con una copertura vegetali. La loro capacità di migliorare le disponibilità di azoto nel terreno consente allo stesso tempo la riduzione dei costi di distribuzione e incorporazione di fertilizzanti azotati, anche in accordo con l'obiettivo 3.

Attraverso le sperimentazioni M1 e M2 sono stati approfonditi i seguenti aspetti:

- Si è studiata la capacità di germinazione, sopravvivenza e adattamento di *Medicago polymorpha*, nella prima fase di sviluppo, in suoli ad elevata contaminazione da metalli (sperimentazione M1).
- Si è valutata la capacità di *Medicago polymorpha* nell'incrementare il contenuto di azoto in un substrato contaminato da metalli (sperimentazione M1).
- Appurata la capacità di *Medicago polymorpha* di germinare su substrato sperimentale contaminato (sperimentazione M1), con la sperimentazione M2 è stata approfondita l'indagine sulla germinazione. Nella stessa sperimentazione M2, si è studiata la capacità di sopravvivenza e sviluppo fino a fioritura della specie, su substrato contaminato da metalli, anche in presenza di ammendanti.

3.2 Materiale vegetale

Lo studio su fitorisanamento oggetto di questo lavoro, è stato realizzato esplorando due distinte specie vegetali: *Atriplex halimus* e *Medicago polymorpha*. Entrambe le specie crescono spontaneamente in clima mediterraneo, comprese diverse aree della Sardegna e mostrano una elevata adattabilità a climi secchi. La specie *Atriplex halimus* è un arbusto legnoso che può produrre elevate quantità di biomassa anche in ambienti difficili ed è già stata studiata per fitorisanamento mentre *Medicago polymorpha* è una leguminosa annua autoriseminante non ancora esplorata a tal fine.

3.2.1 ATRIPLEX HALIMUS

Atriplex halimus L. è un arbusto perenne a carattere alofilo e xerofilo. Al genere *Atriplex* appartengono circa 200 specie e costituisce il più ampio e il più diversificato della famiglia delle *Chenopodiaceae* (Mulas e Mulas, 2004). Attualmente la famiglia botanica delle *Chenopodiaceae* è stata inclusa in quella delle *Amaranthaceae*. Tra queste, le specie del genere *Atriplex* sono caratterizzate da un'elevata produttività di biomassa, elevata tolleranza all'aridità e alla salinità, elevata efficienza d'uso della radiazione solare e dell'acqua (Falasca *et al.*, 2014).

A. halimus cresce spontaneamente in aree semiaride e aride dell'Eurasia, dalla costa Atlantica, nel bacino Mediterraneo, fino al Medio Oriente, vegeta in suoli salini e degradati dove spesso costituisce la specie dominante (Walker *et al.*, 2014).

La specie è utilizzata ampiamente nella lotta alla desertificazione e per la produzione di foraggi in aree semiaride e aride. Le specie del genere *Atriplex* infatti, oltre a resistere all'aridità e alla salinità, si caratterizzano per produrre foraggi ricchi di proteine e carotene, grazie ad un'abbondante biomassa fogliare che possono mantenere attiva durante i periodi sfavorevoli dell'anno (Mulas e

Mulas, 2004; Falasca *et al.*, 2014). Per queste caratteristiche è stata introdotta a scopo principalmente foraggero, in nord Africa e nell'Asia occidentale, in Cile, Argentina, Nuova Zelanda, U.S.A. (Mulas e Mulas, 2004; Walker *et al.*, 2014).

Esistono due sottospecie di *A. halimus*: *A. halimus halimus*, diploide ($2n = 2x = 18$) e *A. halimus schweinfurthii*, tetraploide ($2n=4x= 36$) (Walker *et al.*, 2014). La subsp. *halimus* si estende dalle zone semiaride a quelle umide e in siti poco salini (Mulas e Mulas, 2004; Walker *et al.*, 2014) ed è molto comune lungo le coste del Bacino Mediterraneo. La subsp. *schweinfurthii* è diffusa nelle zone ad elevate aridità e salinità (Walker *et al.*, 2014) fino ad aree desertiche, ma solo lungo depressioni in presenza di acqua (Mulas e Mulas, 2004). Le due sottospecie differiscono anche per l'*habitus*, più eretto in *halimus* e più ramificato in *schweinfurthii*.

Le piante di *A. halimus* possono superare l'altezza di 3 m, sono sempreverdi, anche se durante un periodo molto caldo e asciutto, per esempio in estate in clima mediterraneo, possono temporaneamente perdere molte foglie (Walker *et al.*, 2014). I rami possono presentare portamento strisciante e, con la loro espansione, ricoprono il suolo per un diametro anche di 3 metri (Manousaki e Kalogerakis, 2009).

A. halimus utilizza la via fotosintetica C_4 per fissare la CO_2 e le foglie hanno anatomia di tipo Kranz. La fissazione di CO_2 che avviene durante una fotosintesi di tipo C_4 , richiede basse quantità di O_2 , di acqua e di nutrienti e questo consente anche il minimo consumo di tessuti durante il processo (Falasca *et al.*, 2014).

Nella superficie delle foglie sono presenti peli e tricomi vescicolari, in cui vengono accumulati i sali, relazionati alla tolleranza delle piante allo stress (Walker *et al.*, 2014). Quando le vescicole si rompono, i sali vengono distribuiti sulle foglie, supportando la riflessione della radiazione solare.

A. halimus ha impollinazione anemofila e si riproduce principalmente per seme, grazie al trasporto da parte di animali, vento o acqua (Walker *et al.*, 2014). La specie si riproduce facilmente anche per via vegetativa attraverso lo sviluppo di radici dai fusti. E' considerata monoica, in quanto nella stessa pianta possono coesistere sia i fiori femminili (alla base dell'infiorescenza) che quelli maschili (all'apice dell'infiorescenza), anche se possono verificarsi diverse eccezioni a seconda delle condizioni ambientali e genetiche (Walker *et al.*, 2014). La fioritura avviene in infiorescenze paniculiformi, tra maggio e dicembre in clima mediterraneo.

Molte specie appartenenti al genere *Atriplex* e la specie *Atriplex halimus*, oltre che per scopi foraggeri e recupero di suoli degradati in zone semiaride e aride, sono attualmente studiate con la finalità di produrre biomassa a scopi energetici e per attività di fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti.

Per quanto riguarda la produzione di biomassa di *Atriplex halimus*, esistono diverse indicazioni.

La produzione di biomassa riportata varia in funzione della disponibilità di acqua e spesso è espressa in funzione dell'efficienza d'uso dell'acqua o della pluviometria e dell'apporto irriguo. Grazie all'elevata efficienza d'uso dell'acqua infatti, sono riportate per esempio produzioni di biomassa secca pari a $10-20 \text{ kg ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$ per mm di pioggia (Mulas e Mulas, 2004; Falasca *et al.*, 2014). In Australia coltivazioni di *Atriplex* irrigate con 500 mm di acqua annui, hanno superato 5 tonnellate di materia secca $\text{ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$. (Falasca *et al.*, 2014).

In caso di elevata salinità del suolo, i migliori risultati nella produzione di biomassa si attestano intorno a 15-20 ton ha⁻¹ annui⁻¹ e si possono ottenere a concentrazioni di sali inferiori a 300 mM equivalenti L⁻¹ di NaCl (Falasca *et al.*, 2014). I risultati sperimentali di coltivazioni di *Atriplex* in aree non irrigate risultano comunque più modesti rispetto a quelle irrigate (Falasca *et al.*, 2014).

Secondo Walker *et al.* (2014) la specie *A. halimus* può raggiungere una produzione di 10 tonnellate ha⁻¹ in assenza di inputs.

I resti di potatura di branche legnose sono un importante fonte energetica e secondo Falasca *et al.*, (2014) può essere considerevole la produzione di energia da legno ottenibile da piante del genere *Atriplex*. Walker *et al.* (2014) indicano per la specie un potere calorifico della biomassa secca pari a 17,2 kJ g⁻¹ per i fusti e 12,8 kJ g⁻¹ per le foglie, simili a quelli di altri materiali come per esempio paglia di riso, canna da zucchero e mais.

Diverse specie appartenenti al genere *Atriplex* sono state studiate per il recupero di aree degradate e/o anche considerando la prospettiva del loro utilizzo per fitorisanamento (Andrades-Moreno *et al.*, 2013; Eissa e Ahmed, 2016; Lutts *et al.*, 2004; Kachout *et al.*, 2012; Mendez e Maier, 2008; Moreira *et al.*, 2011; Vickerman *et al.* 2002) grazie all'elevato adattamento e al carattere alofilo e xerofilo.

Atriplex halimus cresce spontaneamente in aree minerarie del Nord Africa e del Sud Europa (Pérez-Esteban *et al.*, 2013), come quella de La Unión-Cartagena nel sud della Spagna (Clemente *et al.*, 2012; Lefèvre *et al.*, 2009; Martinez Fernandez e Walker, 2014; Parraga-Aguado *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2014).

La specie è stata studiata per fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti e /o in ambienti aridi e semiaridi (Clemente *et al.*, 2012; Frutos *et al.*, 2017; Lefèvre *et al.*, 2009; Mancilla-Leytón *et al.*, 2016; Manousaki e Kalogerakis, 2009; Martinez Fernandez e Walker, 2014; Nedjimi e Daoud, 2008; Parraga-Aguado *et al.*, 2014; Pérez-Esteban *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2014) e ha dato risposte incoraggianti. Per quanto riguarda la capacità di accumulare metalli, anche se in elevate quantità, la specie è indicata da vari autori per attività di fitostabilizzazione anziché di fitoestrazione (Clemente *et al.*, 2012; Laffont-Schwob *et al.*, 2011; Martinez Fernandez e Walker, 2014; Nedjimi e Daoud, 2008; Pérez-Esteban *et al.*, 2013).

In questo lavoro *Atriplex halimus* è stata la specie vegetale principale testata per l' utilizzo in attività di fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti, nella prospettiva di produrre elevate quantità di biomassa, tenendo conto delle limitazioni ambientali di climi xerici. La specie è stata scelta per le caratteristiche di elevata adattabilità a suoli degradati e contaminati, insieme alla capacità di produrre una buona quantità di biomassa legnosa in ambienti climatici e pedologici difficili e per i risultati incoraggianti riscontrati in letteratura.

Il materiale vegetale utilizzato nelle sperimentazioni, è stato ottenuto mediante propagazione agamica a partire da materiale che cresceva spontaneo e che è stato selezionato in aree contaminate e non. Fa eccezione la sperimentazione A1, nella quale le piante, seppur originate per via agamica, hanno origine geografica sconosciuta in quanto prelevate da un vivaio. La propagazione per via agamica consente di ottenere in breve tempo nuove piante che presentano le stesse caratteristiche genetiche della pianta da cui sono state ottenute. Le piante di origine (piante madri) vengono

generalmente scelte per peculiari caratteristiche fenotipiche e produttive che si intende riprodurre nei cloni.

3.2.2 *MEDICAGO POLYMORPHA*

La specie *Medicago Polymorpha* (medica polimorfa) è una leguminosa annuale molto diffusa nei pascoli mediterranei. In Sardegna vegeta spontaneamente ed è possibile incontrarla ad altitudini comprese fra 0 e 1000 m s.l.m e ad intervalli igrometrici di 500 - 1100 mm annui (Ovalle *et al.*, 2001).

Appartiene al genere *Medicago* e alla famiglia *Fabaceae*. Questa famiglia rappresenta una delle più numerose tra le piante superiori, comprendendo circa 20000 specie, raggruppate in 674 generi (Safronova *et al.*, 2011). Vi appartengono molte specie utilizzate a fine alimentare umano come pisello, fave, soia, cece, lenticchia, *etc.* Molte sono coltivate per l'alimentazione animale, come in particolare quelle appartenenti ai generi *Medicago*, *Trifolium*, *Vicia*. La peculiare caratteristica che distingue la famiglia delle fabacee è la loro capacità di fissare azoto atmosferico (N₂) grazie alla simbiosi tra le piante e i batteri del suolo comunemente chiamati "rizobi" (Sheaffer e Seguin, 2003; Safronova *et al.*, 2011). I microrganismi, che appartengono ai generi *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*, penetrano le radici e formano dei noduli: le strutture nelle quali avviene l'azotofissazione. I rizobi riducono l'azoto atmosferico, non assimilabile dalle piante, ad NH₃ che costituisce una forma assimilabile. Le piante forniscono ai rizobi composti del carbonio derivanti dalla fissazione fotosintetica. La quantità di N₂ fissata dalle leguminose può variare fra 15 e 390 kg di N anno⁻¹ ha⁻¹ a seconda della specie e delle condizioni biotiche e abiotiche (Sheaffer e Seguin, 2003). Una ottimale riserva di azoto nel terreno è fondamentale per la riuscita delle coltivazioni. Per la loro capacità di azotofissazione, le leguminose sono utilizzate in rotazione con le altre specie, in particolare con quelle depauperanti. Un'altra tecnica che consente di incrementare il contenuto di azoto nel terreno grazie alle leguminose, è la loro coltivazione in consociazione temporanea con altre colture. La consociazione o la rotazione delle colture con le leguminose può consentire l'aumento della produttività (Sheaffer e Seguin, 2003; Del Pozo e Ovalle, 2012) e il miglioramento delle caratteristiche agronomiche e microbiche de suolo (Safronova *et al.*, 2011) ed è per questo ampiamente utilizzata a scopo agronomico.

Per queste caratteristiche, l'utilizzo di leguminose è stato esplorato anche in diverse ricerche al fine della loro applicazione in attività di fitorisanamento.

Anjum *et al.* (2014) per esempio hanno approfondito la risposta di *Vigna radiata* L. su substrato contaminato da Cadmio, rilevando una elevata capacità adattativa della specie a questo contaminante, una diminuzione di biomassa all'aumentare della concentrazione di contaminante nel substrato ed una elevata allocazione di Cd sulle parti aeree rispetto alle radici.

Anche nel caso in cui il contaminante era il mercurio, *Vigna radiata* L. ha dimostrato una elevata capacità di traslocazione del metallo nella parte aerea (Mondal *et al.*, 2015).

Un'altra leguminosa molto comune come *Trifolium pratense* L., è stata studiata insieme ad altre specie, come bioindicatore del livello di contaminazione da metalli (Cu, Mn, Zn, Pb, Cr, Pd) in suoli urbani (Malizia *et al.*, 2012), facendo rilevare un'elevata correlazione tra la concentrazione di

contaminante nel suolo e quella nei tessuti vegetali. In questo studio, la concentrazione di metalli che è stata rilevata in primavera, in estate e in autunno, è sempre maggiore nelle radici rispetto alle foglie, tranne che per il Pb in primavera, quando viene rilevato l'inverso.

Ali *et al.*, (2012) hanno valutato la possibilità di utilizzare *Trifolium alexandrinum* per il fitorisanamento di suoli contaminati da Cd, Pb, Cu e Zn. Realizzando uno studio in vasi contenenti substrati con un singolo contaminante, hanno riscontrato una maggiore concentrazione di Cd, Cu e Pb nelle radici di *Trifolium alexandrinum* rispetto alla parte aerea, mentre le concentrazioni di Zn non differivano in radici e foglie.

L'utilizzo di leguminose in attività di fitorisanamento è stato esplorato con la finalità di svolgere la funzione di colture da consociazione (intercrop) per il mais (*Zea mays* L.), che invece costituiva la coltura principale, su un suolo contaminato da Cadmio (Li *et al.*, 2009). In questo studio, in presenza delle leguminose *Vigna unguiculata* L., *Cicer arietinum* L., *Medicago sativa* L., sono stati evidenziati sia l'aumento della capacità di estrazione di Cadmio da parte della coltura principale (mais) che la sua elevata produzione di biomassa. In particolare, quando in intercrop era presente *Medicago sativa* L., non si osservavano differenze nella produzione di biomassa rispetto al mais in monocoltura, ad evidenziare assenza di competizione fra le colture coltivate in consociazione.

Il ruolo delle leguminose in rotazione con altre colture, è stato testato per fitorisanamento, alternando (su campo sperimentale) lupino bianco (*Lupinus albus* L.) e canapa industriale (Fumagalli *et al.*, 2014). In questo studio la canapa ha funzione di coltura estiva fitoestraente mentre il lupino, in rotazione, ricopre il suolo in inverno. Gli autori indicano la specie come adatta a svolgere copertura vegetale d'inverno, al fine di limitare l'erosione idrica ed eolica. Allo stesso tempo, la coltivazione di lupino bianco può consentire di evitare l'utilizzo di ammendanti chimici per la coltura successiva grazie alla capacità di incrementare l'attività microbica e di migliorare la qualità del suolo (Fumagalli *et al.*, 2014).

Bidar *et al.*, (2009) hanno testato, su suolo contaminato da Cd, Pb e Zn, la specie perennante *Trifolium repens*, rilevando variazioni stagionali e annuali nel bioaccumulo di metalli e un'allocazione maggiore nelle radici rispetto alla parte aerea. Bidar *et al.*, (2009) indicano *Trifolium repens* come specie adatta a svolgere copertura vegetale e fitostabilizzazione su suoli contaminati da Cd, Pb e Zn.

In Sardegna, popolazioni naturali di diverse leguminose provenienti dall'area mineraria di Iglesias, sono state studiate per il recupero di suoli contaminati da metalli pesanti, in associazione con rizobi e rizobatteri promotori di crescita (PGPR), dando risultati incoraggianti a proseguire le ricerche, secondo quanto riportano Bullitta *et al.* (2009) e Safronova *et al.* (2012). Nello studio descritto da Safronova *et al.* (2012) semi di popolazioni naturali di leguminose foraggere delle specie *Astragalus hamosus* L., *Lotus edulis* L., *Lotus ornithopodioides* L., *Medicago ciliaris* L. and *Scorpiurus muricatus* L., raccolte nell' area mineraria di Campo Pisano (Iglesias, Sardegna sud occidentale), sono state studiate in coltura idroponica per verificare la tolleranza a zinco, cadmio e piombo. Nello stesso studio sono state selezionate le specie *Lotus edulis* L., *Lotus ornithopodioides* L., *Medicago ciliaris* L. e testate in vaso su substrato contaminato proveniente dalla stessa area di

raccolta dei semi, al fine di valutare le potenzialità per il recupero di suoli contaminati da metalli pesanti di queste specie, in associazione con PGPR.

La specie utilizzata in questa sperimentazione, *Medicago polymorpha*, ha numero cromosomico pari a $2n = 14$, è una specie autogama ed è originaria del bacino mediterraneo e delle adiacenti regioni aride e semiaride (Paredes *et al.*, 2002).

La medica polimorfa è stata studiata principalmente allo scopo di alimentazione animale, nella costituzione o miglioramento del pascolo, o per la produzione di foraggio principalmente in regime asciutto. Infatti, l'uso di miscele di leguminose annue, può migliorare la produzione dei pascoli, la qualità e la persistenza dei pascoli mediterranei (Del Pozo e Ovalle, 2012). Negli ultimi decenni è stato ampio l'interesse, da parte del mondo scientifico, verso l'utilizzo di questa specie per il miglioramento dei pascoli mediterranei associato al controllo dell'erosione dei suoli, e come coltura da cover crop nella pratica dell'inerbimento dei vigneti (Fara *et al.*, 1997; Ovalle *et al.*, 2010; Convisar, 2012; Del Pozo e Ovalle, 2012).

La specie si caratterizza per lasciare sul terreno, a fine ciclo produttivo, quindi all'inizio dell'estate, un elevato numero di semi che germinano nel successivo autunno, insieme ai cosiddetti "semi duri". Si tratta di semi non distinguibili visivamente da quelli germinabili, ma a differenza di questi presentano una elevata impermeabilità all'acqua (ERSAT, 1997). I semi duri sono quelli che germineranno negli anni successivi alla deposizione e, per questo motivo, si dice che vanno a costituire la "banca di seme". Questa banca di seme, che aumenta di anno in anno, fa sì che questa specie non debba essere riseminata ogni anno e viene così definita "autoriseminante". In questo modo viene garantita la capacità germinativa della specie anche dopo annate sfavorevoli. Per la varietà Anglona è riportata una elevata produzione di seme (oltre $1000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$) con una durezza del seme tra l'80 ed il 90% (ERSAT, 1997). Grazie alla quantità di seme che può produrre, la medica polimorfa, può garantire, senza ulteriori lavorazioni, la ricostituzione del pascolo nelle annate successive a quella d'impianto (ERSAT, 1997).

La semina di medica polimorfa in Sardegna avviene normalmente nei mesi di ottobre-novembre, ma può essere protratta fino a dicembre. Le basse temperature costituiscono uno fra i principali elementi, in condizioni naturali ottimali, che rallenta i tempi di germinazione, sviluppo dei cotiledoni, sviluppo vegetativo delle piante e fioritura.

In lavori sperimentali in campo condotti da Sitzia *et al.* (1999) su ecotipo Anglona, con semina a fine ottobre, si hanno dati di insediamento medio di 279 ± 82 plantule m^2 , ad un mese circa dalla semina. Il ciclo annuale della medica polimorfa si completa normalmente in 7-8 mesi (ERSAT, 1997), termina dopo la fioritura, quando la pianta dissecca all'inizio dell'estate. Da quel momento lascia sul terreno una cotica di stoppie capaci di riparare il suolo alle prime piogge tardo estive - autunnali. Con le prime piogge i semi germinano e può riformarsi una cotica verde. Le produzioni biomassa secca, in sperimentazioni realizzate nel sud della Sardegna, riportate da Vargiu *et al.* (2000), sono pari a $5 \text{ t ha}^{-1} \text{ anno}$.

Trattandosi di una leguminosa, si formano i noduli radicali della simbiosi rizobica e, a partire da quel momento si attiva la fissazione nel suolo dell'azoto atmosferico che, in medica polimorfa può giungere fino a 200 kg/ha . La capacità di vegetare in climi xerici in assenza di irrigazione con una

buona produzione di biomassa, insieme all'importanza dell'azotofissazione e del rivestimento del suolo a controllare l'erosione, fanno di questa specie una buona candidata ad accompagnare le specie legnose in coltivazioni di fitorisanamento.

Del Pozo e Ovalle (2012) riportano l'esistenza di una relazione molto stretta tra la biomassa aerea secca prodotta da diverse leguminose, tra cui *Medicago polymorpha*, e la quantità di N₂ fissato nel suolo di pascoli del Cile. Questa quantità può ammontare a 18-20 kg per ogni tonnellata di biomassa aerea secca prodotta.

I semi utilizzati nella sperimentazione provengono dalla stazione sperimentale Agris-DIRVE, San Michele, Ussana. La varietà è quella chiamata "Pratosardo" ed è stata selezionata in Sardegna a partire da ecotipi autoctoni. Durante il periodo in cui sono state realizzate le sperimentazioni, l'ecotipo si trovava in fase di accertamento dei requisiti varietali, al fine della sua iscrizione al registro delle varietà dei prodotti sementieri. Attualmente l'ecotipo può essere definito "varietà" poiché risulta iscritta al registro delle varietà dei prodotti sementieri come leguminosa da foraggio, con codice SIAN n.15017 (DM 17/02/2016).

3.3 Substrati

Nell'ambito delle attività sperimentali effettuate le diverse fasi sperimentali hanno previsto l'utilizzo di substrati a composizione diversa, oltre che di diverse specie vegetale e di variazioni agronomiche inerenti l'impianto. Nell'ottica di una duratura e ottimale attività di fitorisanamento è fondamentale la ricerca del substrato ottimale per ospitare le specie vegetali. Quando poi, nella prospettiva del fitorisanamento, vi è la ricerca di un'abbondante produzione di biomassa vegetale, come nel lavoro di questa tesi, è imprescindibile migliorare la fertilità del substrato. Le sue caratteristiche devono essere tali da coadiuvare la crescita della biomassa aerea e l'espansione radicale, dalle prime fasi di adattamento della pianta a quelle del suo sviluppo e produzione. Le caratteristiche del suolo devono essere determinate in funzione del destino produttivo e/o funzionale della coltivazione che si vuole impiantare su di esso.

Nelle sperimentazioni A1, A2, A3, A4 e M2, l'adattamento e lo sviluppo delle piante per fitorisanamento sono stati testati su substrati sperimentali contaminati ammendati. La risposta delle piante su substrati contaminati ammendati, è stata sempre confrontata con quella su un substrato non contaminato di riferimento, considerato ottimale per la crescita delle piante e con quello contaminato puro (di Campo Pisano). Nella sperimentazione M1, la specie *Medicago polymorpha* non è stata testata su suolo contaminato ammendato perché lo scopo della sperimentazione era realizzare un primo test di valutazione di sopravvivenza ad elevate concentrazioni di metalli per questa specie, mai testata in precedenza per fitorisanamento. Nei substrati contaminati ammendati, gli ammendanti utilizzati sono stati sabbia, ghiaia e compost, facilmente reperibili sul mercato e a basso costo. Nelle sperimentazioni A1, A2, A3, A4, il substrato non contaminato era costituito da una miscela di terriccio commerciale, sabbia e ghiaia nelle proporzioni 1:1:1 (in volume).

Nelle sperimentazioni M1 e M2, il substrato non contaminato era un suolo agricolo proveniente dall'azienda sperimentale Agris di Ussana (Cagliari).

A seguire vengono descritti i materiali con cui sono stati realizzati i substrati nelle diverse sperimentazioni, mentre la composizione dei substrati verrà descritta dettagliatamente, per ciascuna sperimentazione, nel paragrafo 3.5.

3.3.1 CAMPO PISANO

La matrice contaminata utilizzata nelle sperimentazioni di questo lavoro, proviene dalla superficie del bacino di decantazione di Campo Pisano, antico centro minerario per l'estrazione di Piombo e Zinco vicino Iglesias, in Sardegna. La matrice Campo Pisano è stata utilizzata per costituire i substrati sperimentali contaminati nelle diverse prove, sia in purezza (CP) che in associazione con ammendanti (CP+A, dove A indica l'uso sia di inerti che compost e CP+I, in cui I indica l'uso di soli inerti).

Ad eccezione della sola fase 1 della sperimentazione, i materiali utilizzati nel corso delle attività sperimentali sono stati prelevati all'interno di un campo pilota, secondo quanto descritto da Bacchetta et al. (2012). Più precisamente, il substrato è stata prelevato dai primi 20 cm della superficie del bacino campo pilota destinato a testare il suolo privo di ammendanti, eliminando previamente lo strato superficiale di 2-5 cm, al fine di rimuovere la materia organica eventualmente presente, infine pretrattato secondo quanto descritto nel paragrafo che descrive la preparazione del campione suolo. Il materiale utilizzato nella sperimentazione A1 è stato invece prelevato in prossimità della diga di contenimento ai margini del bacino sterili (N 39° 17.746', E 8° 31.909').

Il materiale tal quale tende a formare una struttura molto compatta che rende difficoltosa l'aerazione il drenaggio e l'espansione radicale (Canu, Cappai, Carucci, 2013) a causa della sua tessitura molto fine. Questa caratteristica, insieme allo scarso contenuto di nutrienti rende la matrice di Campo Pisano non adatta a supportare la crescita ottimale di biomassa vegetale. Per migliorare le sue caratteristiche pedologiche e la sua fertilità si è ritenuto necessario implementare un ottimale composizione di ammendanti attraverso la creazione dei diversi substrati sperimentali che sono stati testati nell'intero lavoro.

3.3.2 TERRICCIO COMMERCIALE

Per la creazione dei substrati non contaminati delle sperimentazioni A1, A2, A3 e A4 (substrato B o Bianco) è stato utilizzato un terriccio commerciale per giardinaggio e orticoltura (GRAMOFLO), costituito da una base di torba di sfagni. Questo terriccio è composto per il 68% di materia organica, ha pH subacido (5,1), contiene il 34% di Carbonio totale e lo 0,2% di Azoto totale.

A causa dell'elevato contenuto di torba, il terriccio e, quindi, il substrato non contaminato, si presenta tendenzialmente acido, mentre la specie *Atriplex halimus*, alofila, vegeta prevalentemente in substrati che hanno pH da neutro ad alcalino. L'uso di terriccio commerciale di matrice simile a quello qui utilizzato, è comune a sperimentazioni sulla specie *Atriplex halimus*, anche per fitorisanamento (Manousaki e Kalogerakis, 2009).

Per realizzare il substrato non contaminato della sperimentazione A4, al terriccio commerciale Gramoflor si è voluto prima correggere il pH, mediante l'aggiunta di ossido di calcio in modo da diminuire la sua acidità e adattare meglio il substrato alla specie vegetale ospite. In questo caso,

prima di essere miscelato con sabbia e ghiaia, il terriccio è stato irrorato e omogeneizzato con ossido di calcio disciolto in acqua per aumentare così il suo pH. Tale substrato verrà indicato con la sigla B*, per evidenziare la modifica sul pH rispetto al substrato B.

Il quantitativo di ossido di calcio distribuito è stato scelto in seguito a vari step di prova che hanno permesso di individuare quello ottimale per raggiungere un pH sub-basico, prossimo a quello degli altri substrati sperimentali di A4. Il composto che è stato così ottenuto era molto umido e, per poter miscelare in maniera ottimale i materiali di creazione dei substrati, è stato tenuto a riposo per i tre giorni successivi.

3.3.3 COMPOST

L'ammendante organico che è stato introdotto nei substrati contaminati è compost ottenuto dalla stabilizzazione della frazione organica dei rifiuti urbani, prodotto nello stabilimento di trattamento di rifiuti di Macchiareddu (Cagliari). La funzione del compost, nella miscela dei substrati contaminati è principalmente quella di apportare una prima quota di nutrienti e di materia organica, giacchè normalmente scarseggiano in una matrice di origine mineraria. La presenza di nutrienti è fondamentale per lo sviluppo delle piante e la materia organica svolge anche un ruolo fondamentale nel migliorare le caratteristiche fisiche dei suoli.

3.3.4 MATERIALI INERTI

I materiali inerti presenti nei substrati delle sperimentazioni A1, A2, A3, A4, M2, provengono dalla ditta Nuova CEMAR GRANULATI. Sono state utilizzate sabbia e ghiaia, che hanno diametri compresi fra 0-2 mm e 2-4 mm rispettivamente. La funzione dei materiali inerti, è quella di simulare la presenza delle frazioni di sabbia e ghiaia, normalmente presente nei suoli coltivati, al fine di implementare nel substrato la creazione di una tessitura e una struttura il più possibile simile a quella di un suolo agricolo. La funzione di questi materiali è principalmente quella di separare fisicamente le particelle della matrice di Campo Pisano, che tendono naturalmente a compattarsi. Il materiale scelto ha la funzione di agire fisicamente e non chimicamente con il substrato e quello utilizzato nella sperimentazione è certificato dalla ditta di produzione.

3.3.5 SUOLO AGRICOLO

Il substrato non contaminato nelle sperimentazioni M1 e M2 è costituito da suolo agricolo proveniente dall'azienda sperimentale Agris di Ussana (Cagliari). Il suolo è stato prelevato in un area in cui, nell'annata agraria precedente, era stata coltivata la specie *Medicago polymorpha*. La scelta è stata fondata sul presupposto che quel suolo si presentasse ottimale per la specie vegetale, perchè, fra le altre caratteristiche che ne determinavano una buona fertilità, vi era la presenza di batteri azotofissatori lasciati dalle piante coltivate in precedenza. Dopo il prelievo, per ottenere la frazione fine, il suolo agricolo è stato essiccato all'aria e setacciato in tumbler, (diametro < 2 mm). Queste attività sono state svolte nella stessa stazione sperimentale di prelievo, per evitare contaminazioni con eventuali matrici contaminate in questa prima fase. Il terreno ottenuto in questo modo è stato utilizzato tal quale, a costituire il substrato Ussana nelle sperimentazioni M1 e M2.

3.4 Sperimentazioni con *Atriplex halimus*

3.4.1 A1 - STUDIO DELLA SPECIE *ATRIPLEX HALIMUS* PER IL POSSIBILE USO NEL FITORISANAMENTO DI SITI MINERARI DISMESSI DELLA SARDEGNA

L'obiettivo principale di questo studio è stato valutare la possibilità di utilizzare la specie *Atriplex halimus* nel risanamento di suoli minerari di Campo Pisano (Iglesias, Sardegna). Lo studio è stato realizzato in vaso, utilizzando piante allevate precedentemente in vivaio. Per realizzare questa sperimentazione, piante di *Atriplex halimus* giunte da vivaio, sono state trapiantate in vasi contenenti diversi substrati sperimentali, ammendati e non e, nell'arco di 4 mesi sono stati valutati sopravvivenza, accrescimento e produzione di biomassa e presenza di metalli nei tessuti.

Le piante di *Atriplex halimus* che sono state utilizzate in questa sperimentazione sono state fornite dal vivaio forestale di Campulongu (Oristano, Sardegna) di proprietà dell'Ente Foreste Sardegna. Prima della sperimentazione vegetavano in piccoli vasi di plastica e quando utilizzate avevano due anni di età. Queste piante sono state a loro volta ottenute da talee create da piante madri cresciute spontaneamente lungo il perimetro dello stagno di Santa Giusta (Oristano). Durante la permanenza in vivaio, le piante sono state allevate in vaso e sono state sottoposte a diverse potature per controllarne lo sviluppo. Al momento di inizio della sperimentazione qui presentata, mostravano una dimensione molto più piccola di quella tipica di esemplari cresciuti in ambiente naturale o in una coltivazione. I talli si presentavano inoltre molto lignificati. Prima della sperimentazione è stata fatta una valutazione fitopatologica delle piante, che ha consentito di determinare l'assenza di parassiti e in generale una buona condizione sanitaria.

Per realizzare questa sperimentazione sono stati preparati 3 distinti substrati sperimentali: B, CP e CP+A (cfr Tabella 3.1).

Il substrato B è stato utilizzato come bianco. È costituito da un insieme di terreno per giardinaggio e orticoltura (GRAMOFLOR), sabbia e ghiaia, nelle proporzioni 1:1:1 (in volume), ottimale per la crescita delle piante. Le caratteristiche delle matrici utilizzate sono state descritte nel paragrafo 3.3. Il substrato CP è interamente costituito dalla matrice contaminata del bacino di decantazione dell'area mineraria di Campo Pisano secondo quanto descritto nel paragrafo 3.3.1.

Il substrato CP+I è costituito dal suolo di Campo Pisano, a cui sono state aggiunte sabbia e ghiaia nelle stesse proporzioni applicate al substrato B. Lo scopo dell'introduzione di ammendanti inerti è quello di verificare se il miglioramento della struttura di un suolo di questo tipo può essere un fattore positivo in un progetto di coltivazione di fitorisanamento. Al fine di migliorare la struttura, in studi di questo tipo, si introduce generalmente materia organica mentre, in questo caso, la scelta di utilizzare materiale inerte ha la finalità di ridurre altre variabili che possono influenzare i risultati. I substrati così preparati, sono stati distribuiti in 30 vasi di plastica, a base circolare e di 6 L di volume. Ogni vaso è stato riempito con 5 L di substrato di uno tra i substrati B, CP, CP+I (10 vasi per ogni tipologia di substrato). Nel fondo di ogni vaso è stato depositato previamente uno spessore di 3 cm di ghiaia con funzioni di drenaggio. In ciascun vaso, contenente il substrato sperimentale, è

stata posizionata una pianta di *Atriplex halimus*. 10 piante sono state perciò trapiantate su substrato B, 10 su CP e 10 su CP+I. L'insieme dei 10 vasi contenenti le piante è distribuito a seconda del substrato B, CP o CP+I, sarà d'ora in avanti definito "gruppo" e verrà distinto sulla base del substrato.

Le piante sono state distribuite nei tre gruppi (B, CP, CP+I) in maniera casuale e, quando sono state tolte dai vasi originali, sono state prelevate insieme al proprio substrato, e in questo stesso modo trapiantate nei vasi di sperimentazione. Nella figura 3. 1 si mostrano le piante provenienti dal vivaio e la fase di trapianto nei vasi sperimentali.



Figura 3.1. Piante nei vasi come provenienti dal vivaio (a); fase di trapianto nei vasi sperimentali (b).

Prima del trapianto nei substrati sperimentali è stata effettuata una selezione delle piante al fine di garantire una certa omogeneità fra il materiale vegetale di partenza. In particolare sono state mantenute quelle che avrebbero potuto garantire un'adeguata quantità di materiale per le analisi chimiche successive.

Durante l'operazione di trapianto si è cercato di non danneggiare le radici e, riportando il suolo originale nei nuovi vasi, si è voluto riprodurre il tipico procedimento che si realizza all'impianto di specie arboree e arbustive in campo. Le piante così preparate, sono state allevate in ambiente aperto, tra la metà di giugno e la fine di ottobre, presso il Dipartimento DICAAR dell'Università di Cagliari. La figura 3. 2 mostra la disposizione delle piante nei gruppi sperimentali B, CP e CP+I.

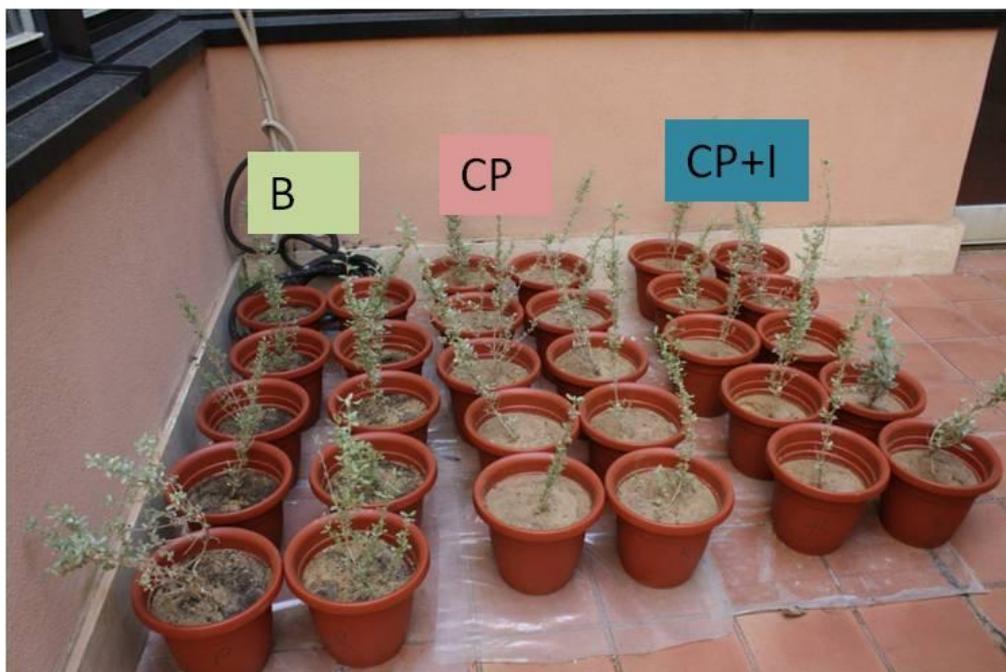


Figura 3.2. Gruppi di piante B, CP e CP+I.

Durante la fase sperimentale, ciascun vaso veniva irrigato ogni 2-3 giorni con 150-200 mL di acqua di rete, tenendo conto delle condizioni meteorologiche ed evitando la perdita d'acqua per percolazione. Ad ogni irrigazione infatti, la distribuzione dell'acqua veniva realizzata manualmente, avendo cura che venisse assorbita dal substrato senza che si verificassero fuoriuscite dal fondo del vaso. Le temperature medie della zona nel periodo dell'esperimento, sono state di 16°C (minima) e 30 °C (massima), con un fotoperiodo medio di 10,5 ore.

Durante il periodo sperimentale è stato realizzato il monitoraggio dell'accrescimento e accumulo metalli mediante la raccolta periodica di 2 piante per gruppo. I primi tre campionamenti sono stati realizzati ogni 15 giorni a partire dal trapianto, mentre il quarto ed ultimo campionamento è stato effettuato dopo ulteriori 90 giorni. Allo stesso modo nello stesso giorno del trapianto, è stata stabilita la condizione "zero" del materiale oggetto di valutazione, applicando il procedimento di analisi a 2 piante arrivate dal vivaio.

Sulle piante campionate, sono stati monitorati gli accrescimenti mediante la lunghezza dell'apparato radicale e aereo e mediante il peso della biomassa. A tal fine, sugli individui sacrificati, la componenti aerea veniva separata da quella radicale, le parti venivano lavate con acqua di rete, risciacquate con acqua distillata e asciugate con carta avendo cura di non alterare il materiale. A seguire, venivano separate le foglie dai fusti per pesare il materiale prima verde e poi secco (72 ore in stufa a 45°C). Il materiale è stato infine macinato con un macinino elettrico e conservato. Per ogni pianta, è stato analizzato il contenuto totale di metalli pesanti (Cd, Pb, Zn) in foglie, fusti e radici.

3.4.2 A2 - RADICAZIONE DI TALEE DI *ATRIPLEX HALIMUS* SU SUOLO CONTAMINATO DA METALLI PESANTI PER VALUTARNE LA CAPACITÀ DI INSEDIAMENTO IN ATTIVITÀ DI FITORISANAMENTO

In questo studio *Atriplex halimus* è stata propagata per via agamica tramite talee, che sono state fatte radicare direttamente su suolo contaminato da metalli pesanti, con l'obiettivo principale di valutare la possibilità di realizzare interventi di fitorisanamento attuando una metodica a basso costo in fase di impianto. Le talee, realizzate a partire da una sola pianta madre sono state messe a dimora nel marzo 2014, presso il dipartimento DICAAR dell'Università di Cagliari e dopo 8 settimane è stato valutato lo stato delle piante.

Lo scopo principale di questa sperimentazione era osservare la capacità di radicazione e sopravvivenza di talee di *A. halimus* su suoli minerari. Si è voluto migliorare la fertilità del substrato contaminato con l'aggiunta di ammendanti e valutare come questi potessero influire sulla sopravvivenza e sulla prima fase di sviluppo delle piante, così coltivate. Si è voluto quindi verificare se la presenza di ammendante potesse apportare dei benefici alla struttura del suolo, favorire la radicazione e lo sviluppo di biomassa aerea.

A tal fine, a partire da piante spontanee, sono state realizzate talee e sono state poste a radicare sui substrati sperimentali. Le talee sono state prodotte da una pianta madre che vegetava spontaneamente nell'area della sezione di Ingegneria Idraulica del Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e Architettura (DICAAR) a Cagliari.

Per realizzare la prova, sono stati riempiti 4 vasi con 27 L di substrato ciascuno. I vasi avevano una superficie di 0,40 x 0,60 m e profondità pari a 0,15 m. Prima del riempimento con il substrato, sul fondo di ciascun vaso sono stati distribuiti 3 litri di ghiaia, con scopo di drenaggio.

Le risposte delle piante sono state confrontate su quattro diversi substrati: B, CP, CP+CI, CP+I (cfr Tabella 3.1).

Il substrato B, ovvero il bianco di riferimento, rappresenta il terreno ottimale per la crescita delle piante, molto utilizzato in floricoltura e vivaismo. Era costituito da una miscela di terriccio (GRAMOFLOR), sabbia e ghiaia (commercializzata da NUOVA CEM.AR GRANULATI), nelle proporzioni 1:1:1 (in volume, per un totale di 27 L). Il substrato CP era costituito esclusivamente dal suolo di Campo Pisano, previa miscelazione e omogeneizzazione, per un totale di 27 L.

Il substrato CP+CI era composto da materiale di Campo Pisano più compost, sabbia e ghiaia nelle seguenti proporzioni: 25: 8: 33: 33 % in volume (27 L di volume totale). Più precisamente sono stati miscelati: 6,8 L di Campo Pisano e 2,2 di compost (per un totale di 9 L), 9 L di sabbia, 9 L di ghiaia.

In ogni substrato sono state messe a dimora 35 talee legnose, della lunghezza di 20 cm circa, inserite alla profondità di 5 cm e posizionate a 45 gradi rispetto alla superficie del substrato. Le talee distavano fra loro circa 10 cm lungo la fila e 8 cm tra le file. Le talee piantate presentavano molti abbozzi radicali, comuni nelle zone basali e mediali dei rami lignificati della specie *Atriplex halimus*. Nella figura 3. 3 è possibile osservare la sequenza di creazione delle talee e la loro disposizione nei vasi all'impianto.



Figura 3.3. Raccolta, preparazione delle talee e vasi al momento dell'impianto.

La sperimentazione è iniziata durante la prima metà del mese di marzo 2014 e si è conclusa dopo 8 settimane. Al termine della sperimentazione, è stata valutata la sopravvivenza delle talee e, da ogni substrato è stato prelevato un campione di 5 piante. Su questo campione sono state valutate la sopravvivenza, la crescita radicale e della biomassa aerea, il contenuto di clorofilla e carotenoidi e la concentrazione finale di metalli contaminanti nei tessuti aerei.

3.4.3 A3 - STUDIO DELL'ADATTAMENTO DI GIOVANI PIANTE DELLA SPECIE *ATRIPLEX HALIMUS* SU SUBSTRATO CONTAMINATO DA METALLI PESANTI PER IL LORO USO IN FITORISANAMENTO

L'obiettivo di questa sperimentazione era valutare la possibilità di disporre piante giovanissime di *Atriplex halimus* su suolo contaminato, eliminando la fase di accrescimento intermedio in vivaio e riducendo così i costi relativi a questa prima fase.

La sperimentazione è stata realizzata in due distinte fasi di lavoro: quella di creazione di giovani piantine (barbatelle) e quella di crescita sui substrati sperimentali.

Nella prima fase sono state create le piante di *Atriplex halimus*, mediante il processo di taleaggio, mentre nella seconda fase le giovani piante sono state testate su diversi substrati (cfr Tabella 3.1); più precisamente, è stato utilizzato suolo contaminato, puro (CP) e ammendato (CP+A). La risposta delle piante è stata confrontata con quella ottenuta su substrato non contaminato (B).

Le barbatelle sono state create mediante talee ottenute da piante madri (figura 3. 4) che crescevano spontaneamente lungo il perimetro della Laguna di Santa Gilla (Cagliari) in corrispondenza dei punti ad elevata contaminazione da metalli (ARPAS, 2006; Frontalini *et al.*, 2009).

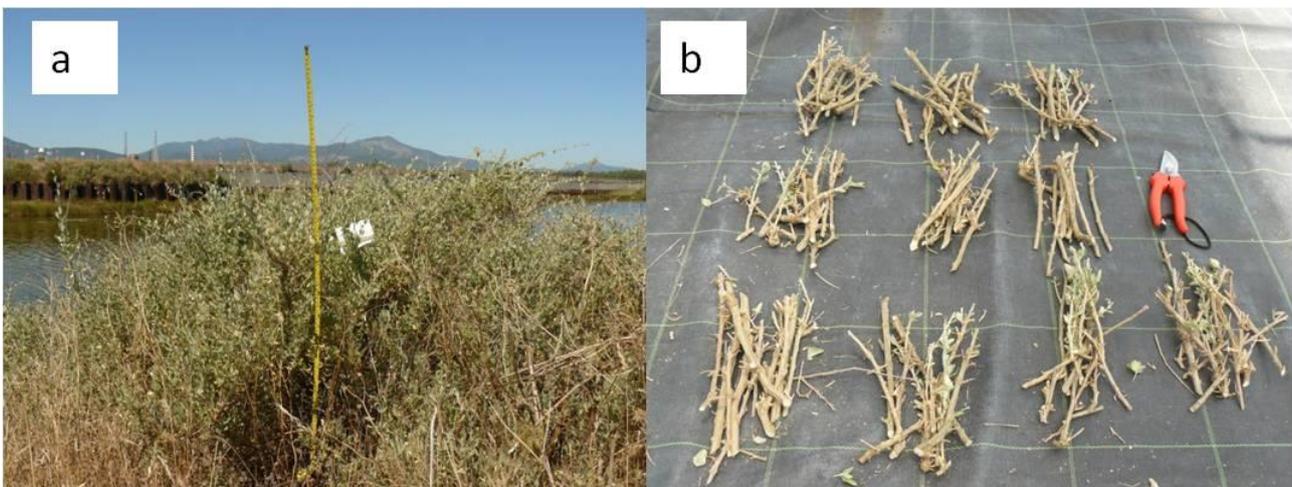


Figura 3.4. Piante madri nel loro ambiente naturale (a) e processamento delle talee (b).

Nella figura 3. 5. sono riportati i punti valutati per il prelievo delle piante e, fra questi, D4, E3, F3 corrispondono a quelli di prelievo e sono stati scelti in accordo con i dati riportati da ARPAS (2006) e Frontalini *et al.*(2009). Nella tabella 3. 3 è possibile osservare il valore delle concentrazioni di metalli riportate da Arpas (2006) in corrispondenza dei punti di prelievo delle piante madri.

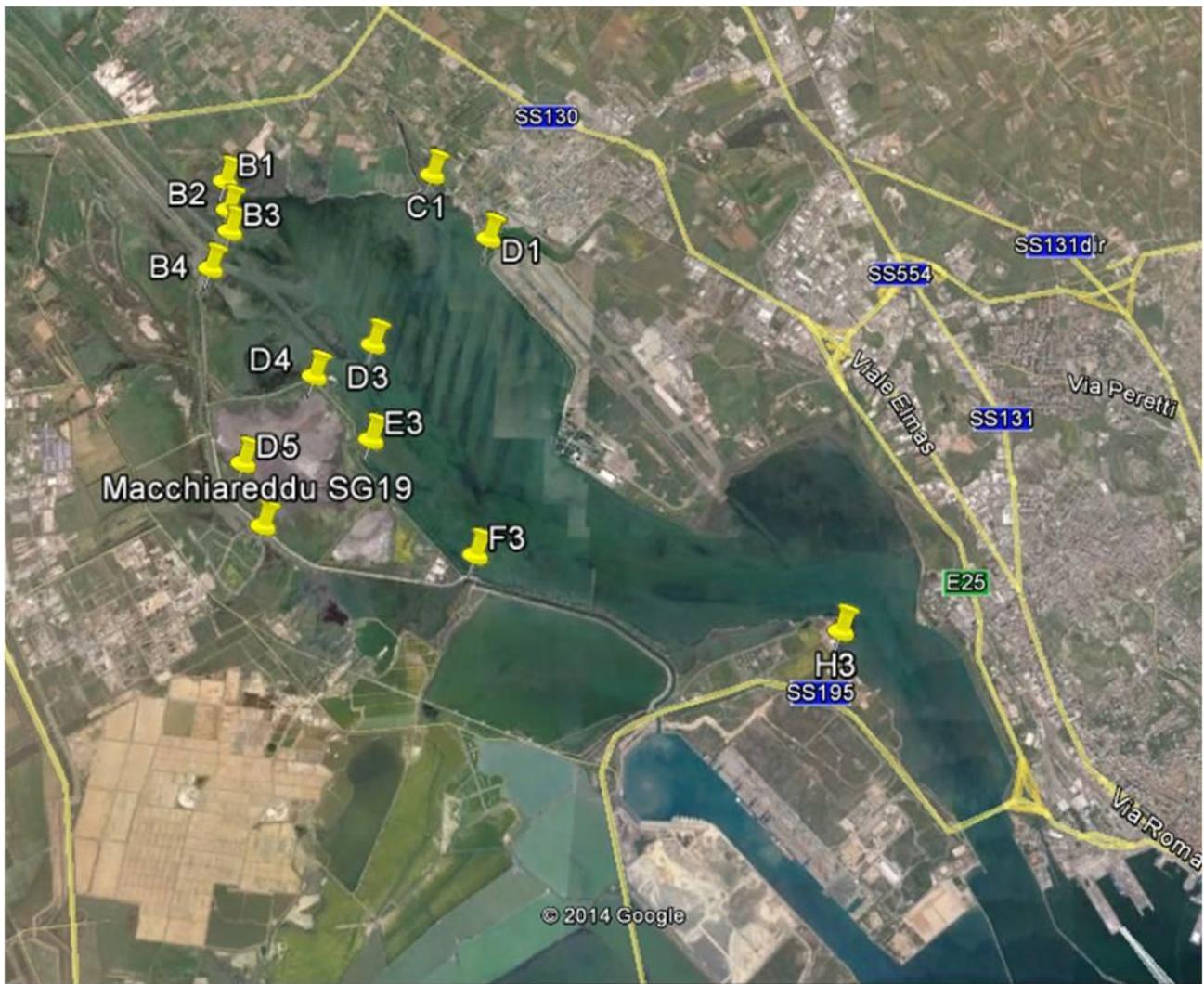


Figura 3.5. Aree contaminate da metalli e accessibili per il prelievo nella Laguna di Santa Gilla

Tabella 3.2. Valori delle concentrazioni di Pb e Zn (ARPAS 2006) nei punti di prelievo delle piante e confronto con i valori di Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC) previsti dal D.Lgs 152/2006, All.5, Tab.1, Parte V, per Siti ad uso Verde pubblico e privato e residenziale.

Campionamento ARPAS 2006	Profondità di prelievo 0-20 m Pb (mg kg ⁻¹)	Profondità di prelievo 0-20 m Zn (mg kg ⁻¹)	Profondità di prelievo 0,30-0,50 m Pb (mg kg ⁻¹)	CSC Pb (mg kg ⁻¹)	CSC Zn (mg kg ⁻¹)
D4	122,37	194,89	292,96	100	150
E3	141,16	228,23	269,65	100	150
F3	202,03	183,51	175,16	100	150

Da ogni pianta madre (3 piante madre) è stato prelevato un campione affinché si potesse caratterizzare il materiale vegetale di origine, per quanto riguarda il contenuto di metalli pesanti eventualmente presenti.

Il materiale prelevato in campo è stato poi trasportato e trattato nelle serre dell'Istituto Agrario "Duca degli Abruzzi" di Elmas (CA). Il processo di radicazione delle talee si è realizzato in 30 giorni, su substrato di perlite (figura 3. 6), su banco con impianto di irrigazione nebulizzata. Lo scopo della radicazione su substrato di perlite, che è un materiale inerte, leggero, capace di assorbire elevate quantità d'acqua, oltre che economico, è principalmente quello di favorire l'espansione radicale. La radicazione su perlite permette anche di ottenere plantule con apparato radicale sgombro da contaminanti che potrebbero influire sulla successiva fase sperimentale. Il taleaggio è avvenuto nei giorni 19 e 20 giugno del 2014 e, ad un mese di distanza le barbatelle, che presentavano ormai un apparato radicale ed aereo sviluppato, sono state prelevate dalla perlite, trasportate presso il dipartimento DICAAR dell'Università di Cagliari e disposte sui substrati sperimentali, B, CP, CP+A (figura 3. 6). Prima della messa a dimora sui substrati sperimentali, è stata fatta una accurata valutazione fitopatologica delle piante, che ha consentito di determinare l'assenza di parassiti e in generale una buona condizione sanitaria.

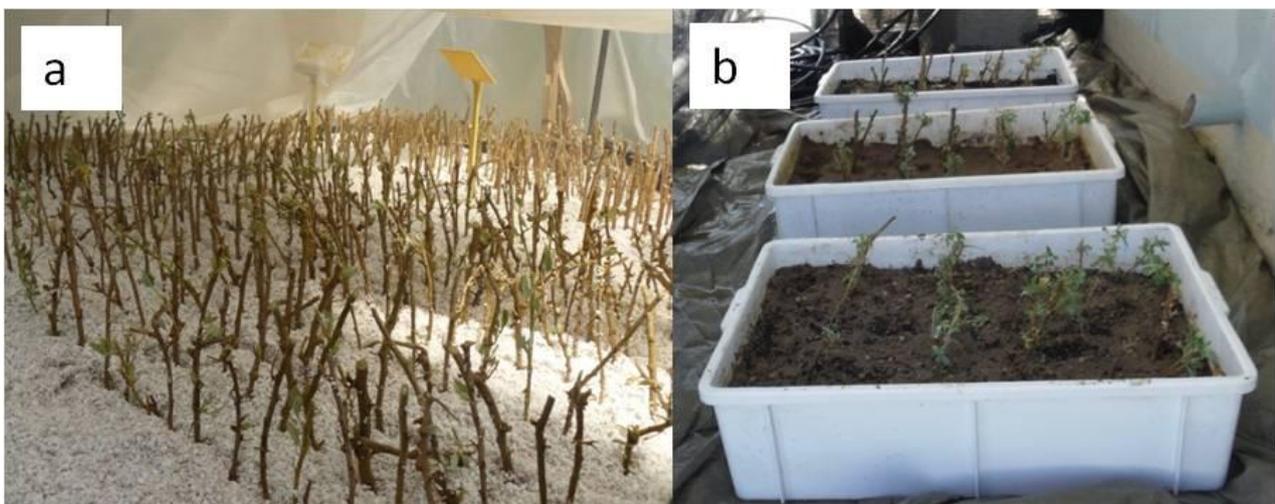


Figura 3.6. Radicazione delle talee in serra (a) e impianto sui substrati sperimentali (b).

Alla fase sperimentale sui substrati sono state destinate 60 piantine, suddivise in 3 gruppi da 20 piante ciascuno. I tre gruppi (B, CP, CP+A) differiscono fra loro per il tipo di substrato sperimentale. Il substrato B, non contaminato, è un terreno ottimale per la crescita delle piante, molto utilizzato in floricoltura e vivaismo, rappresenta il bianco di riferimento. E' costituito da una miscela di terriccio (GRAMOFLOR), sabbia e ghiaia (commercializzata da NUOVA CEM.AR GRANULATI), nelle proporzioni 1:1:1 (in volume, per un totale di 27 L). Il substrato CP è costituito interamente dalla matrice proveniente da Campo Pisano miscelazione e omogeneizzazione, per un totale di 27 L.

Nel substrato CP+A la matrice di Campo Pisano è stata miscelata a compost, sabbia e ghiaia. Più precisamente sono stati miscelati: 6,8 L di Campo Pisano e 2,2 di compost (per un totale di 9 L), 9 L di sabbia, 9 L di ghiaia (le proporzioni corrispondono a 25: 8: 33: 33 % in volume) fino a raggiungere 27 L di volume totale.

Le piante hanno vegetato sui substrati B, CP, CP+A durante 3 mesi. In questo periodo il materiale vegetale è stato prelevato a 30-60-90 giorni, sacrificando 2-3 piante per gruppo. Ad ogni campionamento sono stati valutati: sopravvivenza, sviluppo della biomassa aerea e radicale, concentrazione di metalli contaminanti nei tessuti.

Lo stesso procedimento di analisi è stato applicato ad un campione di piante prelevate dalla serra nello stesso giorno del trapianto delle altre in modo da stabilire la condizione "zero" del materiale oggetto di valutazione. Gli esemplari estratti per le analisi sono stati lavati prima in acqua di rete e poi in acqua distillata. In seguito, dopo tamponamento con carta, sono stati separati i fusti, la parte aerea e le radici, pesati come campione fresco e riposti in stufa per consentire successivamente la valutazione della biomassa secca. Il materiale, è stato macinato con macinino elettrico, omogeneizzato per substrato di provenienza ed infine conservato per le analisi successive.

3.4.4 A4 - STUDI PRELIMINARI SULLA SELEZIONE CLONALE DELLA SPECIE *ATRIPLEX HALIMUS* PER L'USO IN ATTIVITÀ DI FITORISANAMENTO DI METALLI PESANTI CON ELEVATA PRODUZIONE DI BIOMASSA

Nella presente attività sperimentale, è stata osservata la capacità di adattamento e di sviluppo su suoli contaminati e l'accumulo di metalli, da parte di 6 cloni della specie *Atriplex halimus*, durante 5 mesi.

Sebbene la specie *Atriplex halimus* sia studiata in attività di fitorisanamento, attualmente non esistono studi di selezione clonale con l'obiettivo di confrontare le risposte adattative di diversi cloni alla crescita su substrati contaminati. Per altre specie legnose riproducibili per selezione clonale, come salice, pioppo e eucaliptus, diversi studi hanno confrontato fra loro cloni selezionati al fine del loro utilizzo per attività di fitorisanamento.

Nell'ottica di una produzione di filiera e di un'organizzazione produttiva mirata infatti, la selezione clonale potrebbe consentire di realizzare un sistema di coltivazione con obiettivi produttivi definiti, sia per quanto riguarda la produzione di biomassa che per quanto riguarda l'accumulo di metalli nei tessuti.

Per poter svolgere l'attività sperimentale di crescita di piante nei substrati contaminati, è stato prima necessario realizzare i cloni. L'intero lavoro è stato così suddiviso in due fasi:

Nella prima fase sono state realizzate sei linee clonali, mediante propagazione agamica, a partire da piante spontanee (d'ora in poi definite "piante madri"). In questo modo, attraverso il processo di taleaggio, sono state create le piante (barbatelle) che sono state utilizzate nella fase successiva.

Nella seconda fase, le barbatelle sono state trasportate presso il dipartimento DICAAR dell'Università di Cagliari, dove sono state trapiantate su substrati contaminati e il loro comportamento è stato osservato per 150 giorni.

I principali obiettivi di questa sperimentazione sono stati valutare se esistono differenze adattative, produttive e nell'assorbimento di metalli fra i diversi cloni. Nello specifico, nella prima fase gli obiettivi sono stati: valutare la sopravvivenza e capacità di propagazione delle talee create da piante madri ed osservare le caratteristiche delle barbatelle. Nella seconda fase gli obiettivi sono stati: osservare l'adattamento, l'accrescimento di ciascun clone su substrati contaminati e la capacità dei diversi cloni di accumulare Cadmio, Piombo e Zinco nei tessuti vegetali.

Nella fase di produzione delle piantine, le talee di *Atriplex halimus* sono state prelevate da tre Pianta Madre che vegetavano su una matrice contaminata e da tre Pianta Madre che vegetavano su una matrice non contaminata. Entrambi gli ambienti di prelievo hanno elevata salinità e saranno indicati nella sperimentazione con C (matrice contaminata) e NC (matrice non contaminata).

Le piante C, sono state prelevate nell'area dello stagno di Santa Gilla nei pressi di alcuni punti ad elevata contaminazione del sedimento, secondo quanto indicato negli studi ARPAS del 2006 e Frontalini *et al.*, 2009. Anche l'area di provenienza NC è stata scelta in accordo con quanto riportato da Frontalini *et al.*, (2009). Una volta determinati i punti di prelievo, le piante sono state scelte in funzione del loro elevato sviluppo aereo e dell'ottimale stato fitosanitario. Le piante scelte in ambiente contaminato saranno indicate come C1, C2, C3 mentre le piante provenienti da area non contaminata, saranno definite NC1, NC2, NC3. Le coordinate geografiche dei punti di prelievo delle 6 piante sono indicate nella tabella 3. 3, mentre nelle Figure 3. 7 e 3. 8 si possono osservare su mappa le aree di raccolta.

Tabella 3.3. Coordinate geografiche dei punti di prelievo delle piante.

Piante Santa Gilla	Coordinate geografiche	Piante Flumini di Quartu	Coordinate geografiche
C1	N 039°14038'	NC1	N 039°11957'
	E 009°02359'		E 009°19553'
C2	N 039°14034'	NC2	N 039°11887'
	E 009°01888'		E 009°19427'
C3	N 039°14245'	NC3	N 039°12359'
	E 009°01104'		E 009°18691'



Figura 3.7. Aree di raccolta delle piante C1, C2, C3 nella Laguna di Santa Gilla.

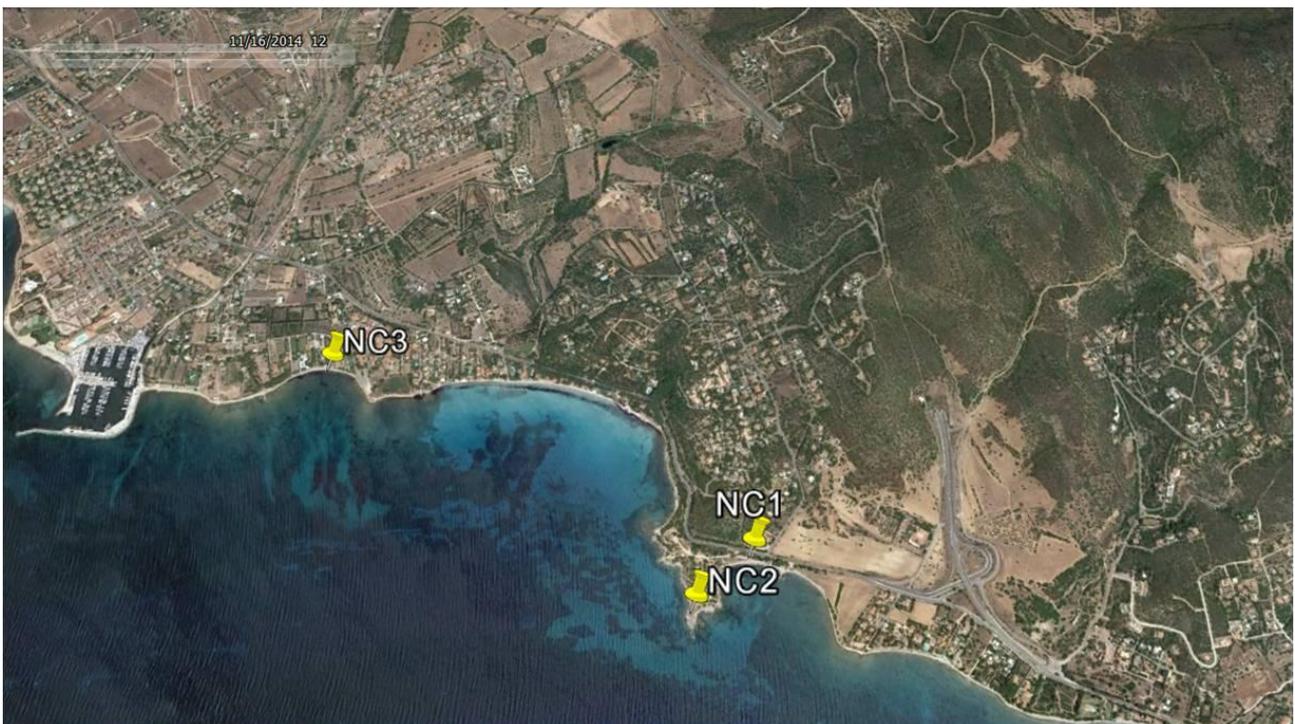


Figura 3.8. Aree di raccolta delle piante NC1, NC2, NC3 nell'area di Flumini di Quartu.

Da ogni Pianta Madre sono state create 100 talee che sono state lasciate a radicare per otto settimane. Il processo di creazione delle talee e di radicazione si è svolto presso l'Istituto Agrario

"Duca degli Abruzzi" di Elmas ed è avvenuto in serra, su un substrato di perlite con impianto di irrigazione nebulizzata, su banco. Nella figura 3. 9 si può osservare la fase di raccolta del materiale e creazione delle talee, mentre nella figura 3. 10 è mostrata la fase di radicazione in serra.



Figura 3.9. Fasi della raccolta del materiale spontaneo (una pianta) e formazione di talee (un clone).



Figura 3.10. Radicazione in serra.

In questa fase, la perlite è stata scelta come substrato di radicazione, perché rappresenta un substrato chimicamente inerte, garantisce un ottimo drenaggio dell'acqua e continuo scambio gassoso, il supporto meccanico, l'espansione dell'apparato radicale, senza trascurare il fatto che si tratta di un materiale a basso costo.

Dopo otto settimane dall'impianto delle talee, la fase di radicazione è stata ritenuta terminata, in quanto le talee possedevano le caratteristiche fisiologiche per essere definite piantine. Più precisamente, le piantine originate dalla stessa pianta madre sono i suoi "cloni" e, in questa prima fase della sperimentazione sono stati ottenuti i cloni C1, C2, C3, NC1, NC2, NC3. Le piantine sono state prelevate dalla perlite ed è stata subito effettuata una prima valutazione della sopravvivenza e dello stato di radicazione (Figura 3. 11), attraverso i seguenti parametri:

- Quante talee su 100 si presentavano vive, quante tra queste si presentavano radicate e non;
- Quante talee su 100 si presentavano morte, quante tra queste si presentavano radicate e non.



Figura 3.11. Prelievo delle piantine dalla perlite e valutazione di un clone.

Nello stesso giorno del prelievo dalla perlite, le piantine sono state trasferite con estrema attenzione nei substrati sperimentali, cercando di evitare eventuali stress che potessero nuocere alla successiva fase di crescita delle piante. Durante questa fase sulle piante veniva distribuita acqua nebulizzata per evitarne la disidratazione, che poteva verificarsi durante i lunghi tempi richiesti dal trapianto.

La sperimentazione è stata realizzata in vaso, disponendo sia le piante C che le piante NC su 3 differenti substrati (2 vasi per substrato). Sono stati utilizzati 6 vasi e in ogni vaso (con base 90 x 40 cm) sono state disposte 45 piante. Nella figura 3. 12 è possibile osservare la prima fase dell'impianto sui substrati sperimentali.

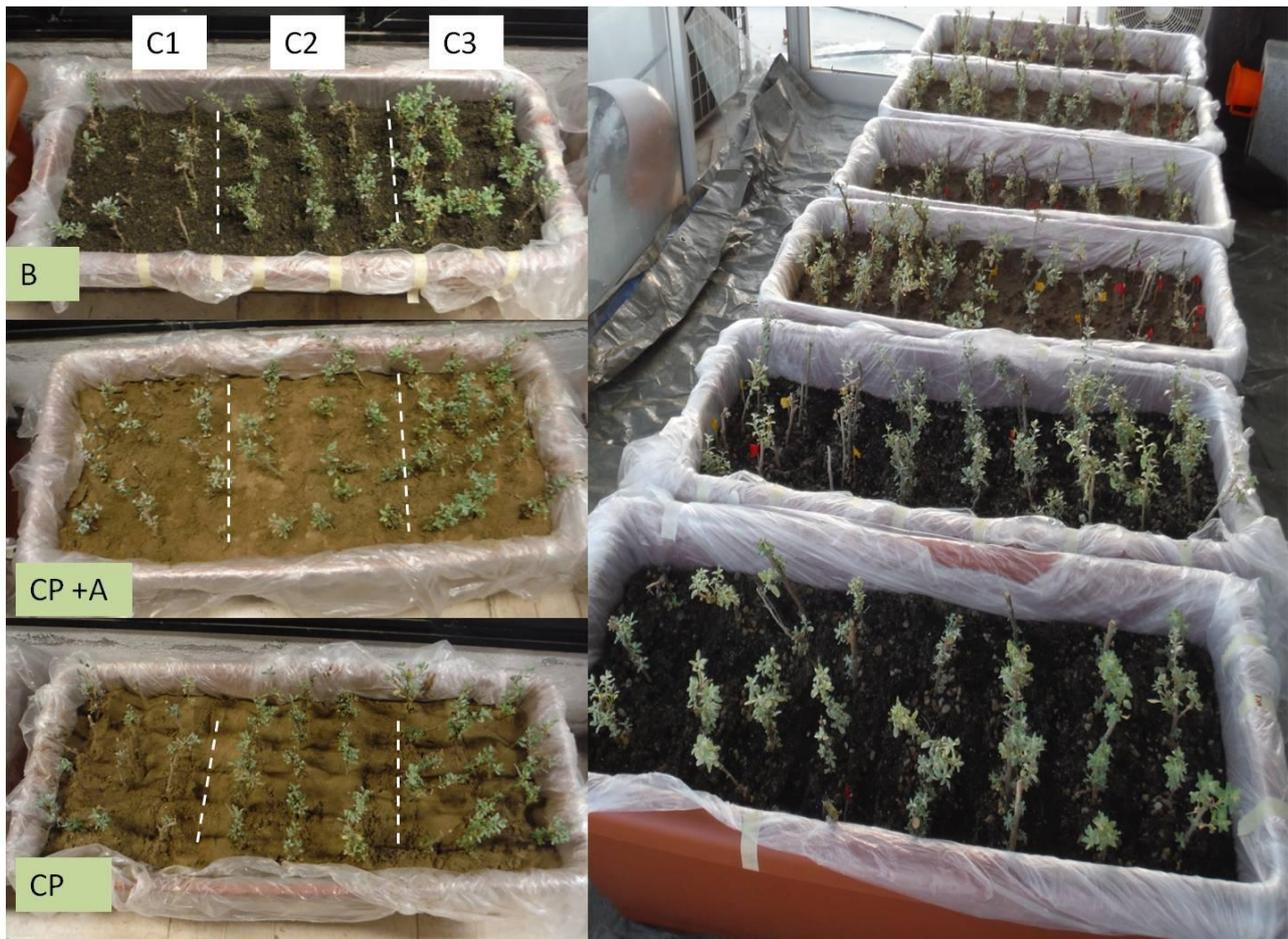


Figura 3.12. Piante nei vasi all'inizio della sperimentazione sui substrati sperimentali.

I substrati sperimentali in cui sono state disposte le piante saranno di seguito indicati come B*, CP e CP+A (Cfr Tabella 3.1) e ogni vaso è stato riempito con 35 L di ogni singolo substrato. Per ogni vaso sono stati utilizzati solo i primi 20 cm mentre la parte sottostante è stata riempita con strati di polistirolo a stabilizzare la struttura. Prima che vi si disponessero i substrati, il fondo di ogni vaso è stato rivestito con un telo impermeabilizzante e, alla base del substrato è stato steso uno strato di 5 L di ghiaia a scopo di drenaggio.

Il substrato B*, rappresenta un substrato ottimale per la crescita delle piante di *Atriplex halimus*. È costituito da una miscela di terriccio (GRAMOFLOR), sabbia e ghiaia (commercializzata da NUOVA CEM.AR GRANULATI), nelle proporzioni 1:1:1 (in volume, per un totale di 35 L per vaso). In questa sperimentazione il pH del substrato è stato adattato alla specie ospite secondo quanto descritto nel paragrafo 3.2. Il substrato CP era costituito esclusivamente dal suolo di Campo Pisano, previa miscelazione e omogeneizzazione. Il substrato CP+C è costituito dalla matrice di Campo Pisano miscelata a compost, sabbia e ghiaia descritti nel paragrafo 3.3. In ogni vaso sono presenti le seguenti proporzioni: 21 L di Campo Pisano, 7 L di compost, 3,5 L di sabbia, 3,5 L di ghiaia.

Prima del loro trapianto nei substrati B*, CP, CP+A, le piante sono state selezionate mantenendo quelle che mostravano il migliore stato sanitario. Da ogni gruppo di cloni sono state prelevate cinque piante che potessero rappresentare le condizioni dell'intero gruppo e si è proceduto a stabilire la condizione 'zero' del materiale oggetto di valutazione. A tal fine è stato attribuito un punteggio allo stato di radicazione e di germogliazione delle piante in esame, secondo quanto descritto nel paragrafo 3.6.2.

In ogni vaso sperimentale sono stati disposti 3 cloni, in numero di 15 piante per ogni clone (45 piante per vaso). E' necessario sottolineare che il gruppo NC3 non presentava ottimali condizioni fitosanitarie e si aveva a disposizione un numero esiguo di individui, per cui sono state trapiantate 5 piante per ogni substrato.

3.5 Sperimentazioni con *Medicago polymorpha*

3.5.1 M1 - STUDI PRELIMINARI SULL'UTILIZZO DELLA SPECIE *MEDICAGO POLYMORPHA* PER ATTIVITÀ DI FITORISANAMENTO DI SUOLI CONTAMINATI DA METALLI PESANTI IN SARDEGNA

La sperimentazione qui riportata costituisce il primo lavoro realizzato per valutare la possibilità di utilizzare la leguminosa autoctona isolana *Medicago polymorpha* per fitorisanamento in suoli contaminati di origine mineraria.

Lo scopo del lavoro è testare la capacità di germinazione e sopravvivenza e l'adattamento nella prima fase di sviluppo della specie a suoli ad elevata contaminazione da metalli pesanti.

A tal fine semi di *Medicago polymorpha*, ecotipo pratosardo, sono stati fatti germinare in suolo contaminato di Campo Pisano e in un suolo agricolo non contaminato (Ussana), in vaso e, le piante sono state lasciate a vegetare negli stessi substrati di germinazione per 2 mesi presso il dipartimento DICAAR dell'Università di Cagliari.

I semi a disposizione provengono dalla stazione sperimentale Agris-DIRVE, San Michele di Ussana (CA) e l'ecotipo utilizzato è stato selezionato in questa stazione sperimentale. Prima della presente sperimentazione è stata realizzata una prova sperimentale su un substrato agricolo che si è dimostrato non idoneo. Infatti, seppur presentandosi in campo come un ottimo suolo, a causa dell'elevato contenuto in argilla, quando è stato pretrattato e confinato in vaso si è verificata un'eccessiva compattazione del substrato che ha impedito la germinazione dei semi.

Nella sperimentazione qui descritta è stato utilizzato un terreno meno plastico del precedente, in quanto meno argilloso, prelevato dall'azienda sperimentale Agris-DIRVE, San Michele, Ussana, descritto nel paragrafo 3. 4.

Per realizzare questa sperimentazione sono stati utilizzati due substrati (cfr Tabella 3.1): contaminato (CP) e non contaminato (U).

Il substrato CP proviene dal bacino di decantazione dell'area mineraria di Campo Pisano (Iglesias), pretrattato, è descritto nel paragrafo 3. 3. Il substrato di sperimentazione non contaminato è quello dell'azienda sperimentale di San Michele di Ussana, descritto nel paragrafo 3. 3.

Allo scopo, 20 vasi di plastica (8 x 8 x 9 cm) sono stati riempiti con i substrati. In particolare 10 vasi contenevano il substrato di Campo Pisano e 10 contenevano il substrato U. Sul fondo di ogni vaso è stato posizionato uno strato di ghiaia con funzione drenante.

In ogni vaso sono stati disposti 5 semi di *Medicago polymorpha*. Al momento della semina, si ha avuto cura di posizionare tutti i semi alla stessa profondità (circa 1 cm) e di innaffiare per la prima imbibizione del substrato. Nella Figura 3. 13 si può osservare il dettaglio della disposizione dei semi sul substrato prima che venissero coperti dallo strato di substrato superiore.

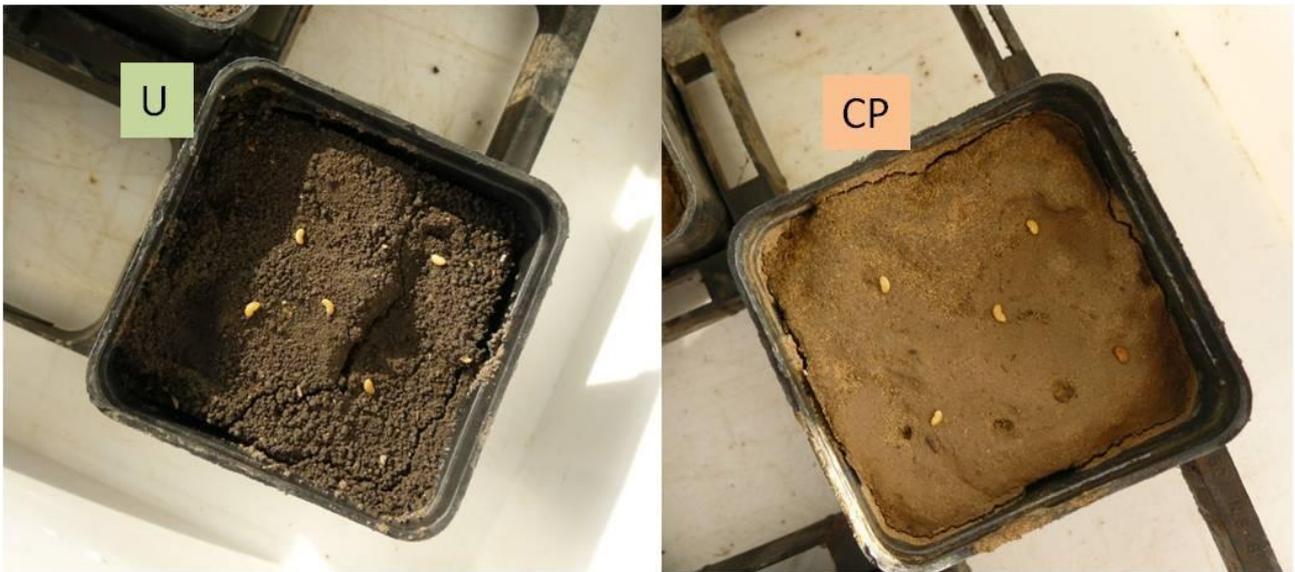


Figura 3.13. Semi di medica polimorfa disposti sul letto di semina.

I vasi, così pronti, alla fine di gennaio 2014 sono stati posti in ambiente coperto, con luminosità naturale e qui lasciati per 2 mesi (Figura 3. 14). Durante tutto il periodo, i vasi sono stati irrigati per 2-3 volte a settimana secondo necessità, avendo cura che non si verificassero fuoriuscite di liquido dal fondo del vaso.

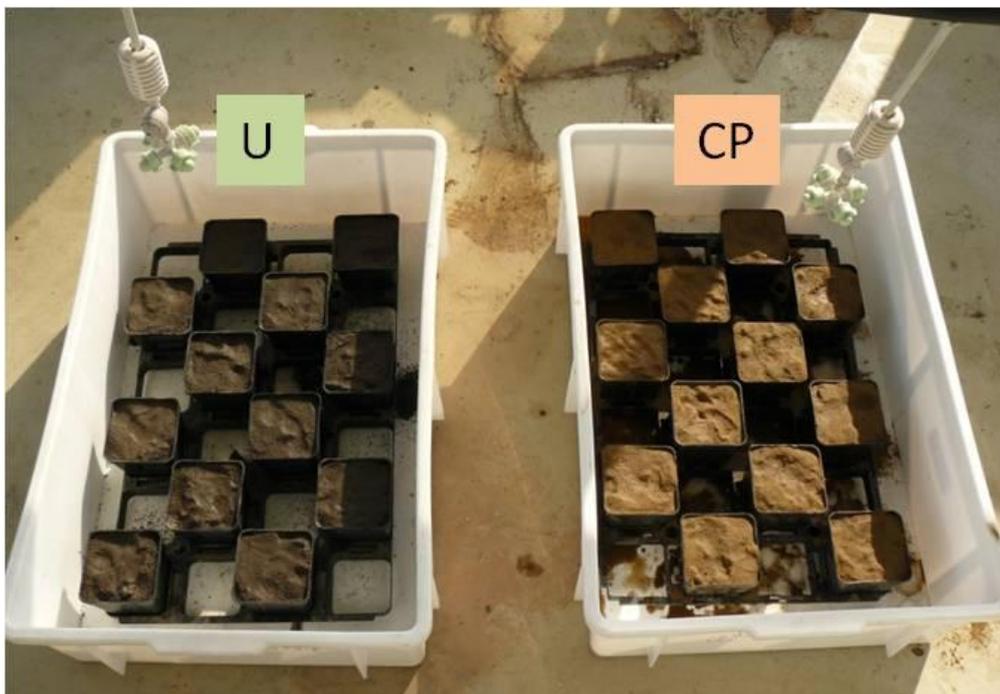


Figura 3.14 Vasi contenenti semi di medica polimorfa all'inizio della sperimentazione M1.

Al termine della sperimentazione sulle piante sono state valutate: la capacità di germinazione, la sopravvivenza, lo sviluppo di biomassa aerea e radicale.

E' stato analizzato il contenuto di azoto nel substrato sia prima della prova che al suo termine, per capire se si potesse presentare un aumento. Infatti, la possibilità di usare questa leguminosa è legata allo svolgimento, oltre che di una funzione di copertura del terreno, anche di quella di incorporare azoto con l'attività di azotofissazione.

Sulla biomassa vegetale è stata analizzata la presenza di metalli, per capire se la specie, possa anche coadiuvare la stabilizzazione dei metalli, attraverso la loro incorporazione nei tessuti, all'interno di attività di fitorisanamento.

3.5.2 M2 - STUDI SULLA GERMINAZIONE E L'ADATTAMENTO DELLA SPECIE *MEDICAGO POLYMORPHA* SU SUOLI CONTAMINATI DA METALLI PESANTI IN SARDEGNA

Sulla base dei risultati ottenuti nella sperimentazione M1, in quella M2 si è voluta approfondire ulteriormente la conoscenza sulla leguminosa autoctona isolana *Medicago polymorpha* al fine della sua introduzione in attività di fitorisanamento di suoli ad elevata contaminazione da metalli pesanti. A questo scopo, è stata testata la sua capacità di germinazione, sopravvivenza e sviluppo fino a fioritura, su substrato contaminato puro (CP) e contaminato ammendato (CP+A). L'adattamento su questi substrati è stato confrontato con quello su suolo agricolo ottimale (U).

Il substrato CP, è costituito esclusivamente dalla matrice di Campo Pisano, previamente miscelato e omogeneizzato. Il substrato CP+A è costituito dalla matrice di Campo Pisano miscelata a compost, sabbia e ghiaia (descritti nel paragrafo 3.2.) e in ogni vaso si ritrovano le seguenti proporzioni in volume: 3:1:1 rispettivamente di Campo Pisano, compost, inerti (50% sabbia e 50% ghiaia).

Il substrato non contaminato (U) proviene dall'azienda sperimentale Agris-DIRVE, San Michele, di Ussana (descritto nel paragrafo 3.3) e rappresenta un suolo agricolo ottimale per la medica polimorfa.

Per realizzare questa sperimentazione semi di *Medicago polymorpha* sono stati fatti germinare nei tre substrati contenuti in *plateaux* di polistirolo appositi per la semina. Questa fase è stata realizzata nella serra ubicata nell'Istituto Agrario Duca degli Abruzzi di Elmas (CA). Per quanto riguarda la fase di germinazione, sono stati messi a dimora 50 semi di *Medicago polymorpha*, ecotipo Pratosardo, su ogni substrato (figura 3. 15), in numero di 1 seme per ogni spazio ospitante.



Figura 3.15. Plateaux di germinazione, distinti fra i substrati U, CP, CP+A.

Durante 1 mese sono stati rilevati i tempi e le percentuali di germinazione su ogni substrato, al fine di cogliere se i substrati potessero indurre differenze in questa fase.

Considerata conclusa la germinazione, si è lasciato che le plantule si adattassero ai substrati per un altro mese, dopo del quale sono state trasportate presso il dipartimento DICAAR dell'Università di Cagliari. Qui sono state prelevate 10 piante da ogni substrato e trasferite in vasi di plastica contenenti lo stesso tipo di substrato in cui è avvenuta la germinazione.

In ogni vaso (8 x 8 x 9 cm) è stata messa a dimora una pianta e sono così stati creati 30 vasi (10 U, 10 CP, 10CP+A). Prima della messa a dimora è stato valutato lo stato fitosanitario delle piante e per valutarne lo sviluppo sono state rilevate le lunghezze radicali e della parte aerea (condizione "zero"). Nella Figura 3. 16. è mostrato lo stato delle piante al momento finale del periodo in plateaux di germinazione e la valutazione prima del trapianto in vaso.

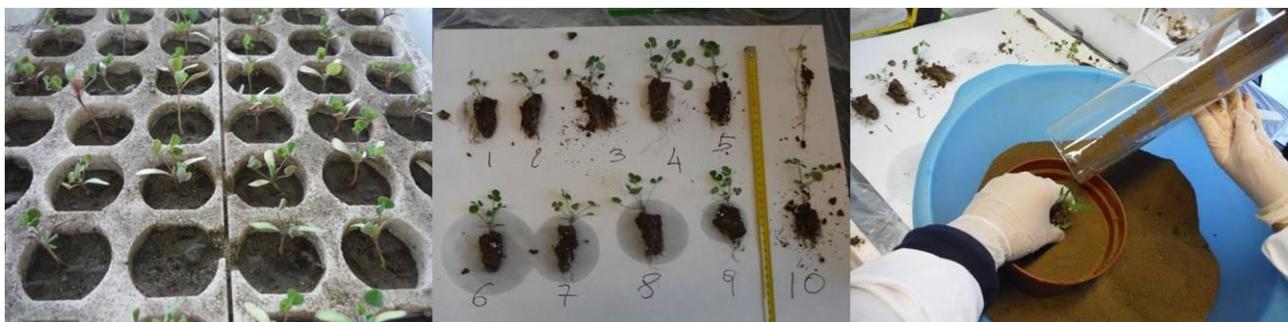


Figura 3.16. Trasferimento da plateaux a vasi e valutazione prima del trapianto.

Il trapianto è avvenuto nel marzo 2015 (13/03/2015). Le piante in vaso sono dunque state poste in ambiente protetto, in condizioni di temperatura e fotoperiodo naturali e qui lasciate fino a raggiungere la fioritura. La sperimentazione si è conclusa nel maggio 2015 (13/05/2015). Le condizioni di lavoro scelte obbligano a seguire il ciclo vitale ambientale delle specie. Si ricorda infatti che la semina di *M. polymorpha* in queste condizioni, può avvenire solo in periodo autunno-invernale ed il suo sviluppo si arresta a temperature tardo primaverili-estive.

Durante tutto il periodo, i vasi sono stati irrigati per 2-3 volte a settimana secondo necessità, avendo cura che non si verificassero fuoriuscite di liquido dal fondo del vaso.

Al termine della sperimentazione sulle piante sono state valutate: la sopravvivenza, il numero di piante che giungeva a fioritura in ogni substrato e lo sviluppo di biomassa aerea e radicale.

3.6 Caratterizzazione delle piante

Le indicazioni quantitative e qualitative sulle piante, sono state ottenute, nelle diverse sperimentazioni, attraverso la valutazione della sopravvivenza, accrescimenti e biomasse, contenuto di metalli nei tessuti, clorofilla nelle foglie, contenuto totale di Carbonio e di Azoto.

3.6.1 GERMINAZIONE E SOPRAVVIVENZA

Per tutte le sperimentazioni è stato effettuato il calcolo della sopravvivenza. Nelle sperimentazioni M1 ed M2, impiantate per seme, è stato realizzato anche il calcolo della germinazione.

Il calcolo della germinazione è stato effettuato secondo la relazione seguente:

$$piante (\%) = \frac{\text{plantule al momento } t_{gf}}{\text{numero di semi piantati al momento } t_s} \cdot 100$$

Dove:

t_s = momento della semina

t_{gf} = momento finale della germinazione

La germinazione rappresenta il numero di semi che effettivamente sono germinati, ovvero che, mediante l'emissione dei primi due cotiledoni hanno formato le plantule.

La germinazione è stata considerata terminata al tempo t_{gf} , quando nell'intervallo di tempo pari ad una settimana, non si sono osservate ulteriori germinazioni (dopo 3 settimane dalla semina in M1 e dopo 4 settimane in M2).

I metodi ufficiali di analisi per le sementi sono regolati in Italia dal Decreto Ministeriale del 22 dicembre 1992 e, relativamente alla durata della prova, per le specie appartenenti al genere *Medicago*, la prima conta deve avvenire dopo 4 giorni dalla semina, mentre quella finale dopo 10 (secondo quanto specificato nell'allegato IA del DM 22 dicembre 1992).

Il tale normativa, che specifica sia la durata della prova che i substrati di coltivazione, non è inclusa la specie *Medicago polymorpha* e inoltre i substrati di coltivazione sono differenti da quelli utilizzati nelle sperimentazioni M1 e M2.

Si è quindi scelto di procedere valutando la germinazione, a cadenza settimanale, fino ad individuare il momento finale (t_{gf}) come sopra definito.

Nelle stesse sperimentazioni, i campionamenti intermedi tra t_s e t_{gf} , hanno permesso di studiare l'andamento nel tempo della germinazione di *Medicago polymorpha*.

La valutazione della sopravvivenza delle piante veniva calcolata contando il numero di piante vive rispetto al numero di quelle presenti al momento iniziale e il dato è riportato in percentuale. Laddove sono stati realizzati più campionamenti, al fine di non viziare il dato, veniva considerato come numero iniziale di riferimento quello delle piante presenti al termine del campionamento precedente. In questo modo, venivano sottratte dal calcolo le piante sacrificate a scopo sperimentale nel precedente campionamento.

Nelle sperimentazioni che non hanno comportato sacrifici di piante, il calcolo della sopravvivenza al momento finale della sperimentazione è stato realizzato secondo quanto descritto di seguito:

$$\text{Piante sopravvissute (\%)} = \frac{\text{Piante vive al tempo } t_f}{\text{Talee o piante al tempo } t_0} \cdot 100$$

dove:

t_0 =tempo sperimentale iniziale, che corrisponde all'impianto.

t_f =tempo finale della sperimentazione.

Nelle sperimentazioni che, durante la fase di crescita, hanno comportato un sacrificio di piante, il calcolo della sopravvivenza relativa alle fasi intermedie della sperimentazione (tempo t_n), è stato realizzato secondo la seguente formula:

$$\text{Piante sopravvissute (\%)} = \frac{\text{Piante vive al tempo } t_n}{\text{Piante al tempo } t_0 - n \text{ piante sacrificate nell'intervallo}(t_0 - t_{n-1})} \cdot 100$$

Dove:

Questa formula consente di valutare la percentuale di piante sopravvissute durante il periodo intercorso dall'inizio della sperimentazione fino al tempo t_n .

Dove:

t_0 =tempo sperimentale iniziale, che corrisponde all'impianto

t_n = tempo di campionamento in una fase intermedia della sperimentazione (per esempio 30, 60, 90 giorni);

t_{n-1} = tempo di campionamento precedente a t_n .

3.6.2 ACCRESCIMENTI E BIOMASSE

Ad ogni campionamento è stata valutata la dimensione delle piante in peso e in lunghezza.

Laddove sono stati realizzati processi di taleaggio, alle giovani piante ottenute da talea sono state attribuite delle valutazioni qualitative, con lo scopo di definire la bontà del germogliamento e della radicazione. In questi casi, ad ogni pianta oggetto di campionamento è stato attribuito un punteggio che qualifica lo stato di radicazione e di germogliazione. La qualità è stata misurata, secondo una scala da 1 a 5 in cui 5 rappresenta lo stato ottimale.

A tutte le piante sono stati misurati lunghezza dell'apparato radicale e della parte aerea.

Nei casi di misura e di peso di piante appena ottenute da taleaggio, sono stati presi in considerazione i germogli e le radici sviluppatasi a partire dalla talea iniziale. Nella sperimentazione A2 si è voluta dettagliare anche la dimensione del fusto della talea di partenza.

Il dettaglio dei criteri adottati nelle valutazioni qualitative e quantitative è riportato nella tabella 3.5.

Tabella 3.4. Attribuzione punteggio al germogliamento/radicazione e criteri di misura delle piante

Valutazione qualitativa					
Qualità	Molto scarsa	Scarsa	Media	Buona	Ottima
Punteggio	1	2	3	4	5
Caratteristiche delle Radici	Radici appena accennate o assenti	Radici presenti ma in scarsa quantità, poco sviluppate e/o sofferenti	Radici sviluppate, poco allungate e/o non ben fascicolate	Radici presenti in buon numero, di aspetto sano, ben sviluppate e fascicolate	Radici in numero elevato, lunghe, con ottimo sviluppo.
Caratteristiche dei germogli	Germogli appena abbozzati o assenti	Germogli presenti ma in scarsa quantità, poco sviluppati e/o sofferenti	Germogli sviluppati, poco allungati e/o non con ampia chioma	Germogli presenti in buon numero, di aspetto sano, ben sviluppati e allungati	Germogli costituenti una chioma con ottimo sviluppo.
Valutazione quantitativa					
Parte della pianta	Criterio di valutazione				
Radici	Lunghezza: misura dal punto di attacco superiore delle radici (colletto) fino all'estremità della radice più lunga Biomassa: peso del materiale presente dal colletto all'estremità delle radici.				
Nuove radici	Biomassa: peso di tutte le nuove radici che si dipartono visibilmente dal fusto-talea di origine.				
Germogli	Lunghezza: misura dal punto di attacco più basso sul fusto fino all'estremità del germoglio più lungo Biomassa: peso di tutti i germogli.				
Parte aerea	Lunghezza: misura dal colletto all'apice più estremo dei germogli. Biomassa: peso del materiale dal colletto all'apice più estremo dei germogli.				

Per quanto riguarda la valutazione delle biomasse di piante in fase avanzata, in ogni soggetto sono state separate le componenti aeree da quelle radicali, è stato pesato il materiale fresco e poi quello secco ottenuto dopo un essiccamento in stufa a 70°C per 48 ore, sufficiente ad ottenere un peso costante. Il materiale è stato infine macinato con un macinino elettrico e conservato.

3.6.3 ANALISI DEL CONTENUTO TOTALE DEI METALLI

La determinazione del contenuto totale di metalli estraibili in acqua regia è stata realizzata utilizzando il metodo XI.1 del D.M. 13/09/1999.

Con questo metodo, il campione viene pretrattato con perossido di idrogeno e mineralizzato con acqua regia. La digestione dei campioni è stata eseguita su piastra riscaldante.

L'analisi è effettuata su un campione secco e macinato pari o inferiore ad 1 g, acidificato con alcune gocce di acido nitrico (HNO₃) previa umidificazione con alcune gocce di acqua distillata (H₂O).

Le soluzioni, addizionate con 9 mL di acido cloridrico (HCl 37%) e 3 mL di acido nitrico (HNO₃ 65%) venivano posizionate su piastra riscaldata a 150°C circa per due ore e coperte con un vetrino di orologio.

Al termine di questo tempo la digestione si ritiene ultimata e le soluzioni acide si lasciano evaporare fino quasi a secchezza e viene aggiunta qualche goccia di acqua distillata. Quando la sospensione è raffreddata a temperatura ambiente, viene filtrata accuratamente e raccolta in un matraccio tarato da 50 ml, dove è portata a volume con acqua distillata.

La concentrazione dei metalli pesanti nella fase liquida è stata rilevata utilizzando l'ICP/OES (Perking Elmer Optima DV 7000), ovvero mediante spettroscopia di emissione al plasma.

3.6.4 C, N TOTALE

Il contenuto totale di Carbonio e di Azoto è stato determinato tramite "flash combustion" con l'analizzatore elementare LECO CHN 1000, applicando il Metodo VII.1 del D.M., 13/09/1999.

L'analizzatore elementare CHN consente di determinare la concentrazione di Carbonio, Idrogeno e Azoto nel campione di riferimento (suolo o pianta) di quantità inferiore ad 1 g, posto all'interno di una piccola capsula di stagno.

Il questo strumento avviene una combustione rapida e completa del campione, all'interno di un forno a temperatura molto elevata (circa 950°C) in eccesso di ossigeno, con la conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti gassosi. I gas, prima raccolti e omogeneizzati in un contenitore detto Ballast, sono poi inviati ad un primo rivelatore ad infrarosso per la misura del Carbonio e dell'Idrogeno a partire rispettivamente da CO₂ e H₂O presenti. Un'aliquota dei gas di combustione è condotta da un flusso di elio e fatta passare attraverso un catalizzatore di rame caldo dove viene rimosso l'ossigeno. Gli ossidi di azoto sono quindi convertiti in N₂ e il contenuto di azoto viene misurato da un rivelatore a conducibilità termica.

Il contenuto di C, H e N è espresso in percentuale in peso del campione.

Con questa analisi i tempi di determinazione sono molto brevi, nella fase strumentale occorrono infatti circa 4 minuti per campione.

3.6.5 CONTENUTO DI CLOROFILLA

L'attività fotosintetica si svolge attraverso dei pigmenti: la clorofilla e i carotenoidi. Esistono due tipi principali di clorofilla: la clorofilla a e la clorofilla b. Un altro gruppo di pigmenti molto importante, a supporto e protezione dell'attività fotosintetica, è quello dei carotenoidi.

Il contenuto di clorofille e carotenoidi, così come il rapporto fra le loro concentrazioni, è un valido indicatore dello stato sanitario delle piante. Un elevato contenuto di carotenoidi può indicare uno stato di stress o di senescenza.

Il procedimento analitico per la loro determinazione consiste in una prima fase di estrazione dei pigmenti per mezzo di un solvente idrofilico come il metanolo, l'etanolo, il dietil etere o l'acetone. L'estrazione da parte del solvente deve essere supportata da un'efficiente rottura della membrana che protegge i pigmenti. Il rilievo dei quantitativi di pigmenti avviene infine attraverso un'analisi spettrofotometrica dell'estratto. Al momento dell'analisi spettrofotometrica, alle diverse concentrazioni di solvente si avranno diversi spettri di emissione ed attraverso opportuni calcoli riportati per esempio da Licthentaler (1987) o Wintermans e De Monts (1965), è possibile calcolare il contenuto di clorofilla e carotenoidi in soluzione.

Nel lavoro svolto il calcolo del contenuto dei pigmenti è stato realizzato utilizzando il metodo Licthentaler (1987) utilizzando come estraente etanolo (96%).

La metodologia inizia con una prima fase di estrazione dei pigmenti dal materiale vegetale utilizzando come solvente etanolo al 96%. La procedura è opportunamente preceduta dal condizionamento della vetreria con etanolo al 96% per evitare contaminazioni che possano inficiare l'analisi.

Il materiale vegetale da sottoporre ad analisi, consiste in foglie o parti di foglie e veniva prelevato casualmente evitando però quelle più vecchie, che possono essere naturalmente soggette alla fase di senescenza. Una volta prelevato il materiale vegetale, questo veniva lavato con acqua deionizzata, tamponato delicatamente per evitare una perdita di materiale, tagliato in piccoli pezzi e omogeneizzato in modo da ottenere un campione ottimale. Tutto questo procedimento deve essere effettuato in tempi molto rapidi, in presenza di scarsa luminosità e dove possibile mantenendo il materiale al buio, per evitare il deterioramento dei pigmenti.

Per realizzare la fase di estrazione dei pigmenti, il procedimento utilizzato consisteva nel trasferire 0,02-0,05 g di campione fresco pretrattato come sopra, in una beuta da 50 ml con tappo a vite e nell'introdurvi 8,0 ml di etanolo al 96%. Il campione veniva lasciato in agitazione per almeno 12 ore al buio ad una temperatura di 20°C mirando alla completa triturazione del materiale durante il processo di agitazione. Quando tutti i pigmenti si ritenevano estratti dalle foglie e si riscontrava una totale perdita della loro colorazione, la fase di estrazione si poteva definire ottimale e quindi conclusa.

Per realizzare la fase successiva, da ogni beuta veniva prelevata una quantità sufficiente di soluzione (3,0 ml circa), disposta in portacampioni di plastica e centrifugata. Si estraeva quindi il surnatante che veniva analizzato allo spettrofotometro HITACHI U-2000 Spectrophotometer. Per ogni campione veniva rilevata l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 470, 648.6 e 664.2 nm.

Per ogni gruppo di piante venivano analizzati 2 o 3 campioni.

Ottenuti i valori di assorbanza, il contenuto di pigmenti è stato calcolato con le seguenti formule di Licthentaler (1987):

$$C_a = 13,36A_{664,2} - 5,19A_{648,6}$$

$$C_b = 27,43A_{648,6} - 8,12A_{664,2}$$

$$C_{a+b} = 5,24A_{664,2} + 22,24A_{648,6}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 2,13C_a - 97,64 C_b}{209}$$

In queste formule Ca indica la concentrazione di Clorofilla a, Cb quella di clorofilla b, Cx+c quella di carotenoidi. Le concentrazioni risultanti per ciascun pigmento sono espresse in µg/ml. È stata infine fatta una valutazione del rapporto fra contenuti in carotenoidi e quello di clorofille.

3.7 Caratterizzazione dei substrati

Le informazioni qualitative dei substrati, sono state ottenute, nelle diverse sperimentazioni, attraverso la valutazione di diversi parametri quali: pH, CSC, contenuto totale dei metalli, frazione biodisponibile dei metalli, contenuto totale di Carbonio e di Azoto, fosforo biodisponibile.

I campioni solidi di substrato minerario e compost, dopo il loro prelievo sono stati essiccati, setacciati, quartati e conservati secondo le indicazioni del metodo II.1 del D.M. 13/09/1999.

L'essiccazione dei substrati prelevati a Campo Pisano è avvenuta in stufa a 40°C a causa dell'elevata quantità di materiale e della sua umidità iniziale, mentre per il compost e il suolo agricolo è stata sufficiente l'essiccazione all'aria. Per creare dei campioni adatti alle analisi, dopo l'essiccazione si procede con la setacciatura e si ottiene così la "terra fine".

Con "terra fine" si intende quella di diametro \leq a 2 mm. Successivamente si valuta se questa frazione possa essere utilizzata tal quale per le analisi o debba essere ulteriormente macinata finemente ($<0,2$ mm). I substrati minerari e il suolo agricolo sono stati macinati con mulino di agata, mentre per il compost è stata sufficiente la macinazione con mulino elettrico.

Infine si effettua la quartatura, con lo scopo di ottenere un'aliquota di campione il più possibile rappresentativo di un lotto iniziale .

Il materiale così ottenuto veniva conservato per le analisi.

La caratterizzazione dei substrati è stata ottenuta utilizzando i metodi ufficiali di analisi chimica del suolo per l'Italia (D.M. 13/09/1999) e le normative UNI. Per ogni materiale, in ogni analisi, sono stati analizzati tre campioni.

3.7.1 PH

La determinazione del pH dei substrati utilizzati è stata conseguita applicando il metodo III.1 del D.M. 13/09/1999 e il metodo UNI EN 15933 del 2012. I valori ottenuti, si considera che non rispecchino fedelmente il valore dei pH in campo, ma siano indicativi del grado di reazione del sistema considerato.

Con il metodo III.1 del D.M. 13/09/1999, il pH è determinato per via potenziometrica su sospensioni di suolo-CaCl₂. Prima di ogni serie di analisi è stata effettuata la taratura del sistema di misura, attraverso l'uso di una soluzione tampone con pH vicino a quello del campione da analizzare.

Per realizzare ogni analisi, sono stati disposti 10 g di campione di terra fine in un contenitore da 50 mL, sono stati aggiunti 25 mL di CaCl₂ e il campione è stato lasciato in agitazione per due ore. Terminata l'agitazione, la sospensione è stata tenuta a riposo per alcuni minuti per favorire la

sedimentazione del materiale, ed infine l'elettrodo è stato introdotto nel surnatante per rilevare il pH.

Nella sperimentazione A4, la rilevazione del pH nel Compost è stata realizzata applicando la metodica UNI EN 15933 del 2012 perchè il rilievo del pH con la metodica precedentemente utilizzata non è risultata idonea per questo materiale.

Con la metodica III.1 del D.M. 13/09/1999 infatti, la soluzione di CaCl_2 veniva assorbita in elevata quantità dal materiale, impedendo la formazione di un surnatante sufficiente ad ospitare l'elettrodo.

La norma UNI EN 15933 del 2012 definisce un metodo per la determinazione del pH nell'intervallo da pH 2 a pH 12 in sospensione di fango, rifiuti organici trattati o suolo, sia in acqua (pH- H_2O) che in soluzione 0,01 mol/l di cloruro di calcio (pH- CaCl_2). La norma si applica ai fanghi, rifiuti organici trattati e campioni di suolo freschi o asciutti (UNI EN, 2012).

Per effettuare la misura sono stati posizionati 5 ml di compost all'interno di un contenitore, vi è stata aggiunta dell'acqua per un volume pari a 5 volte quella del campione e la soluzione è stata tenuta in agitazione per 10 minuti. La sospensione è rimasta a riposo per circa un'ora per favorire la sedimentazione e la stabilizzazione del materiale. Infine è stato introdotto l'elettrodo nel surnatante e rilevato il pH.

3.7.2 ANALISI DEL CONTENUTO TOTALE DEI METALLI

La determinazione del contenuto totale di metalli estraibili in acqua regia è stata realizzata utilizzando il metodo XI.1 del D.M. 13/09/1999.

Con questo metodo, il campione viene pretrattato con perossido di idrogeno e mineralizzato con acqua regia. La digestione dei campioni è stata eseguita su piastra riscaldante.

Ogni analisi è stata effettuata su 1 g di campione secco e macinato di terra fine, in un becker da 250 mL, acidificato con alcune gocce di acido nitrico (HNO_3) previa umidificazione con alcune gocce di acqua distillata (H_2O).

Ad ogni campione sono stati addizionati 20 mL di H_2O_2 su piastra a 60°C . Il perossido di idrogeno è stato distribuito in aliquote successive di 5 mL per evitare la formazione di grandi quantità di schiuma. Questa è stata controllata con piccole agitazioni manuali, o se eccessiva, con l'uso di piccole quantità di un agente antischiuma il 2 ottanolo. Ogni campione è stato mantenuto su piastra fino a che il volume si è ridotto a circa 3 mL. Le soluzioni così ottenute sono state lasciate completamente raffreddare a temperatura ambiente e successivamente sono state addizionate con 9 mL di acido cloridrico (HCl 37%) e 3 mL di acido nitrico (HNO_3 65%). I campioni sono stati quindi posizionati su piastra riscaldata a 150°C circa per due ore e coperti con un vetrino di orologio.

Al termine di questo tempo, ritenuta ultimata la digestione, ogni becker è stato liberato dai vetrini di orologio e le soluzioni acide sono state lasciate evaporare fino quasi a secchezza e infine, è stata aggiunta qualche goccia di acqua distillata. Una volta raffreddata ogni sospensione, la stessa è stata filtrata accuratamente e raccolta in un matraccio tarato da 100 ml ed infine portata a volume con acqua distillata.

La concentrazione dei metalli pesanti nella fase liquida è stata rilevata utilizzando l'ICP/OES (Perking Elmer Optima DV 7000), ovvero mediante spettroscopia di emissione di plasma.

3.7.3 ANALISI DELLE FRAZIONI BIODISPONIBILI DEI METALLI

Per questa analisi è stata utilizzata la metodica indicata da Barbaferi *et al.* (1996).

In questa metodica l'estrazione dei metalli avviene attraverso tre fasi successive e permette di separare i metalli contenuti nel terreno nelle seguenti forme: la frazione lisciviabile, la frazione scambiabile, la frazione assorbita o complessata.

L'analisi si effettua su 2 g di campione secco, macinato fine.

Nella prima fase si procede con l'estrazione della frazione lisciviabile che corrisponde a quella prontamente solubile, costituita da metalli in forma cationica, complessi solubili, estraibili con acqua. Durante questa fase, il campione viene messo a contatto con acqua distillata (nel rapporto suolo:acqua pari a 1:5) per un tempo di circa 2 ore in agitazione. Il campione viene poi centrifugato in maniera tale da separare la frazione solida da quella liquida.

La frazione liquida viene prelevata, filtrata, portata a volume in matracci di 50 ml con acqua distillata all'1% di acido nitrico (Soluzione 1) e conservata a 4°C per la determinazione della concentrazione di metalli (frazione lisciviabile).

Nella fase successiva si procede all'estrazione della frazione scambiabile dei metalli, ovvero quella costituita dai cationi legati alle superfici di scambio nei suoli.

A tale scopo con il residuo solido viene ripetuto il processo descritto per la produzione della soluzione 1, ma utilizzando come agente estraente una soluzione KNO₃ 1M. In questa soluzione, il rapporto suolo: KNO₃ è pari a 1:5 e al termine del procedimento (agitazione, centrifugazione, estrazione del surnatante, filtrazione, diluizione, acidificazione) si ottiene la soluzione 2.

La frazione di suolo pretrattata per ottenere le soluzioni 1 e 2 è infine utilizzata per l'estrazione della frazione adsorbita e/o complessata. La frazione di metalli adsorbita e complessata riguarda quell'insieme di cationi che attraverso interazioni elettrostatiche o legami covalenti, si legano a ossidi metallici, idrossidi, alluminosilicati amorfi, sostanze umiche. Per ottenere la soluzione 3, si procede aggiungendo 10 mL di una soluzione di EDTA 1% al suolo pretrattato. Dopo l'agitazione per 2 ore, centrifugazione, prelievo del surnatante, quest'ultimo è diluito (50 mL), acidificato con HNO₃ e infine conservato per l'analisi.

Infine, la concentrazione di metalli nelle Soluzioni 1, 2, 3 viene rilevata utilizzando uno spettrometro di emissione ottica al plasma (ICP-OES, Perkin Elmer Optima DV 7000).

3.7.4 ANALISI DEL CONTENUTO DI CARBONIO TOTALE ED AZOTO TOTALE

Il contenuto totale di Carbonio e di Azoto è stato determinato tramite "flash combustion" con l'analizzatore elementare LECO CHN 1000, applicando il Metodo VII.1 del D.M., 13/09/1999.

L'analizzatore elementare CHN consente di determinare la concentrazione di Carbonio, Idrogeno e Azoto nel campione di riferimento (suolo o pianta) di quantità inferiore ad 1 g, posto all'interno di una piccola capsula di stagno.

Il questo strumento avviene una combustione rapida e completa del campione, all'interno di un forno a temperatura molto elevata (circa 950°C) in eccesso di ossigeno, con la conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti gassosi. I gas, prima raccolti e omogeneizzati in un contenitore detto Ballast, sono poi inviati ad un primo rivelatore ad infrarosso per la misura del Carbonio e dell'Idrogeno a partire rispettivamente da CO₂ e H₂O presenti. Un'aliquota dei gas di combustione è condotta da un flusso di elio e fatta passare attraverso un catalizzatore di rame caldo dove viene rimosso l'ossigeno. Gli ossidi di azoto sono quindi convertiti in N₂ e il contenuto di azoto viene misurato da un rivelatore a conducibilità termica.

Il contenuto di C, H e N è espresso in percentuale in peso del campione.

Con questa analisi i tempi di determinazione sono molto brevi, nella fase strumentale occorrono infatti circa 4 minuti per campione.

3.7.5 FOSFORO BIODISPONIBILE

Il contenuto di fosforo assimilabile nei substrati è stato determinato applicando il Metodo XV.3 (metodo Olsen) del D.M. 13/09/1999 e le sue rettifiche (D.M del 25/03/2002).

Per la preparazione dei campioni venivano trasferiti 2 g di campione di terra fine in matraccio conico di Erlenmeyer e venivano aggiunti 40 ml di soluzione (0,5 moli x L⁻¹) di sodio bicarbonato a pH 8,5. Il campione veniva tenuto in agitazione per 30 minuti al termine della quale era stata filtrata accuratamente.

Veniva prelevata un'aliquota della soluzione limpida (filtrata) di fosforo che contenesse almeno 2 µg di fosforo e trasferita in un matraccio tarato da 50 mL. Si aggiungevano 5 gocce di soluzione di p-nitrofenolo fino a far colorare di giallo la soluzione e, goccia a goccia, una quantità di soluzione (2,5 moli x L⁻¹) di acido solforico sufficiente a far virare la soluzione da giallo a bianco. Le gocce di acido solforico venivano fatte scorrere lungo le pareti interne del matraccio tarato per evitare il rapido sviluppo di CO₂ e conseguenti perdite della soluzione.

Il campione veniva diluito con H₂O (deionizzata) fino a raggiungere un volume pari a circa 25 mL di soluzione e, infine, si aggiungevano 8 mL di un reagente solfomolibdico (Miscela). Il tutto veniva portato a volume con H₂O (deionizzata) e dopo 10 minuti si effettuava la lettura allo spettrofotometro (HITACHI U-2000 Spectrophotometer), alla lunghezza d'onda di 882 nm, contro un bianco di riferimento.

3.7.6 CSC

La Capacità di Scambio Cationico è stata determinata applicando il Metodo XIII.2 del D.M. 13/09/1999, con bario cloruro e trietanolammina. Con questo metodo il campione di suolo viene

monosaturato con Bario attraverso ripetuti trattamenti con soluzione di bario cloruro. Al campione Bario-saturato viene poi aggiunta più volte una quantità definita di una soluzione di magnesio solfato con titolo noto. In questo modo può avvenire la reazione di formazione di bario solfato insolubile e, quindi, lo scambio completo Ba/Mg. Il magnesio in eccesso (in soluzione) viene infine determinato per titolazione complessometrica. Si calcola quindi la quantità di magnesio adsorbito, (che corrisponde alla quantità di bario scambiato) e si determina il valore della capacità di scambio cationico.

Il procedimento analitico iniziava trasferendo 2 g di campione di terra fine in un tubo da centrifuga da 50 mL e addizionandovi 25 mL della soluzione di bario cloruro ($\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) tamponata a pH 8,2. Il tubo, sigillato, veniva posto in agitazione per 1 ora.

Terminata l'agitazione, il campione veniva centrifugato (per 3 minuti a $3000 \text{ giri minuto}^{-1}$) per separare la frazione solida da quella liquida e, una volta ottenuta la separazione, il surnatante veniva eliminato. Con la frazione solida rimasta, il trattamento descritto veniva ripetuto per altre due volte. Terminati i trattamenti con Bario Cloruro, il solido separato veniva lavato con 25 mL di acqua distillata ed ancora centrifugato. Dopo aver scartato il surnatante e aggiunto 25 mL di soluzione (5 cmoli L^{-1}) di magnesio solfato, il campione veniva un'altra volta posto in agitazione per 2 ore e poi centrifugato.

Ultimata la centrifugazione venivano prelevati 10 mL di surnatante (soluzione limpida) e trasferiti in una beuta da 250 mL. Venivano aggiunti 100 mL d'acqua distillata, 10 mL di soluzione tampone di ammonio cloruro ed una punta di spatola di indicatore.

Per realizzare l'ultima fase, in cui avveniva la titolazione complessometrica, la soluzione contenente il campione ed il bianco di riferimento venivano titolati con una soluzione 2,5 cmoli di EDTA fino a raggiungere la colorazione azzurra.

La capacità di scambio cationico (CSC) è espressa in centimoli per kg di suolo (cmol/kg) o in millequivalenti/100 g di suolo con una cifra decimale. I due valori sono numericamente uguali.

si precisa che, in questo lavoro, il substrato di Campo Pisano puro, previamente al trattamento con Bario Cloruro, è stato lavato due volte con 25 mL di soluzione di ammonio acetato (1 mole L^{-1} , a pH 7) secondo quanto descritto nel metodo XIII.1 del DM 13/09/1999 per eliminare un eventuale eccesso di Mg presente nel substrato.

3.8 Analisi statistica

I dati ottenuti durante le sperimentazioni, relativamente alla crescita delle piante e all'accumulo di metalli nelle stesse, sono stati sottoposti ad analisi statistica.

Relativamente alle crescita delle piante, in ciascuna sperimentazione, per ogni campionamento, sono stati confrontati fra loro i parametri relativi alla biomassa, per verificare la presenza di differenze statisticamente significative indotte dal substrato. Per ogni substrato si è inoltre verificato come i suddetti parametri variavano nel tempo confrontando i dati relativi ai diversi campionamenti. Relativamente all'accumulo di metalli nelle piante si è valutato il contenuto di Cd, Pb e Zn nei tessuti vegetali. In ciascuna sperimentazione, ad ogni campionamento, sono stati confrontati fra loro

i contenuti di ciascun metallo nelle piante per verificare la presenza di differenze statisticamente significative indotte dal substrato. Per ciascun substrato e per ciascun metallo si è inoltre verificato se le variazioni nel tempo dei contenuti di metallo nei tessuti, risultassero significative.

Nella sperimentazione A4, le analisi relative all'accrescimento e all'accumulo di metalli nelle piante, sono state effettuate sui diversi cloni al fine di verificare l'esistenza di differenze significative tra di loro.

I confronti fra i dati sono stati realizzati applicando il test ANOVA (Analysis of Variance) ogni qualvolta sono risultate verificate le assunzioni per la sua applicabilità, ovvero la normalità nella distribuzione dei dati e l'omoschedasticità delle varianze. Laddove si è applicato il test ANOVA si è approfondita l'analisi con il test di Tukey.

Ogni qualvolta non sono risultate verificate le assunzioni per l'ANOVA, il confronto fra i dati è stato condotto mediante il test di Kruskal-Wallis.

Nel caso in cui è stato necessario effettuare un confronto fra due sole medie, e i suddetti metodi non erano dunque applicabili, l'analisi è stata eseguita mediante un test t di Student.

Nelle suddette analisi sono state assunte le seguenti ipotesi statistiche:

- Ipotesi nulla: le medie provengono dalla stessa popolazione, ovvero non esistono differenze fra i gruppi riguardo al parametro considerato.
- Ipotesi alternativa: le medie provengono da popolazioni differenti, ovvero esistono differenze fra i gruppi riguardo al parametro considerato.

Il livello di significatività applicato alle analisi è 0,05 ($p= 0,05$).

Nei casi in cui è voluta studiare la variazione congiunta di due serie di dati, è stata eseguita l'analisi mediante il coefficiente di correlazione di Pearson o di Spearman (r) a seconda rispettivamente che i dati presentassero una distribuzione normale o no.

Il livello di significatività applicato alle analisi di correlazione è 0,05 ($p= 0,05$). I dati sono stati analizzati con l'ausilio del software OriginPr

CAPITOLO 4

RISULTATI

Nel presente capitolo verranno esposti i risultati ottenuti durante il lavoro di dottorato. Per ciascuna sperimentazione verrà esposto un breve richiamo al protocollo sperimentale, già descritto nel capitolo 3 e saranno presentati i risultati riguardo la sopravvivenza, lo sviluppo di biomassa e l'accumulo di metalli. Nelle sperimentazioni A2 e M1 inoltre, saranno esposti i dati ottenuti dall'analisi del contenuto di pigmenti fotosintetici delle piante.

L'ordine di esposizione delle sperimentazioni si ripete secondo lo schema presentato nel capitolo 3.

4.1 A1 - Studio della specie *Atriplex halimus* per il possibile uso nel fitorisanamento di siti minerari dismessi della Sardegna

4.1.1 INTRODUZIONE

4.1.1.1 OBIETTIVI

L'obiettivo principale di questo studio è stato valutare la possibilità di utilizzare la specie *Atriplex halimus* nel risanamento di suoli minerari in Sardegna.

A tale scopo sono state studiate le capacità di sopravvivenza, di adattamento, produzione di biomassa e accumulo di metalli nei tessuti da parte della specie, cresciuta su substrati contaminati provenienti da un'area mineraria dismessa della Sardegna.

Un altro obiettivo di questa sperimentazione è stato studiare diverse combinazioni di substrati che possano consentire di migliorare la performance produttiva della specie in interventi di fitorisanamento di suoli ad elevata contaminazione da metalli.

A tale scopo, uno dei gruppi di piante della sperimentazione è stato fatto crescere su substrato contaminato ammendato con materiale inerte. Quest'ultimo è stato introdotto con il fine specifico di diluire il substrato contaminato e migliorarne le caratteristiche fisiche.

4.1.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

Lo studio è stato realizzato in vaso, utilizzando piante di due anni di età, allevate precedentemente in vivaio. Sono stati utilizzati tre substrati indicati come CP, CP+I e B.

Il substrato CP è interamente costituito dalla matrice contaminata del bacino di decantazione dell'area mineraria di Campo Pisano, mentre CP+I è costituito dalla stessa matrice di Campo Pisano miscelata con ammendanti inerti. Le stesse attività sperimentali che hanno interessato CP e CP+I

sono state realizzate anche su un substrato sperimentale di confronto definito Bianco (B), non contaminato.

Per ciascuna tipologia di substrato sono stati riempiti 10 vasi, ed in ciascuno è stata posizionata una pianta di *Atriplex halimus*. L'insieme dei 10 vasi contenenti le piante e caratterizzati da uno specifico substrato CP, CP+I o B, sarà d'ora in avanti definito "gruppo" e verrà distinto sulla base del substrato.

Nell'arco di 4 mesi, nelle piante cresciute sui substrati sperimentali, sono stati valutati la sopravvivenza, l'accrescimento, la produzione di biomassa e l'accumulo di metalli nei tessuti. L'analisi della sopravvivenza ha riguardato l'intero set di piante. Gli altri parametri sono stati valutati attraverso un monitoraggio periodico, basato sulla raccolta di 2 piante per gruppo. I primi tre campionamenti sono stati realizzati ogni 15 giorni a partire dal trapianto, mentre il quarto ed ultimo campionamento è stato effettuato dopo ulteriori 90 giorni.

Per valutare la presenza di metalli, è stata stabilita la condizione "zero" delle piante, sottoponendo ad analisi chimica un campione costituito da 2 piante arrivate dal vivaio.

Sulle piante campionate, sono stati monitorati gli accrescimenti mediante la lunghezza dell'apparato radicale e aereo e mediante il peso della biomassa. Per ogni pianta, è stato analizzato il contenuto totale di metalli pesanti (Cd, Pb, Zn) in foglie, fusti e radici.

4.1.2 CARATTERISTICHE DEI SUBSTRATI

Mediante le metodiche descritte nel capitolo 3, i substrati sperimentali sono stati caratterizzati per quanto riguarda il contenuto di metalli totali. In Tab 4.1 sono descritte le concentrazioni di Cd, Pb e Zn contenute nella frazione fine (<2 mm) e viene riportato un confronto con le Concentrazioni soglia di contaminazione (CSC) previste dal D.Lgs 152/2006.

Tabella 4.1 Concentrazioni di metalli totali nei substrati sperimentali all'inizio della sperimentazione (frazione fine <2 mm) e confronto con i valori di Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC) previsti dal D.Lgs 152/2006, All.5, Tab.1, Parte V, per Siti ad uso Verde pubblico e privato e residenziale (a) e per siti ad uso commerciale e industriale (b).

Elemento	Bianco [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano+ Inerti [mg kg ⁻¹]	CSC (a) [mg kg ⁻¹]	CSC (b) [mg kg ⁻¹]
Cd	*Nd	74,4±0,8	65,4±4,8	2	15
Pb	14,5±2,1	3622,4±252,3	3243,6±195,4	100	1000
Zn	74,3±2,4	13283,4±962,4	11812,9±905,6	150	1500

*Nd=valore inferiore alla soglia di rilevabilità strumentale (0,002 mg L⁻¹ nell'estratto).

I contenuti di metalli totali riscontrati all'inizio della sperimentazione, come si può osservare nella tabella 4.1, sono nettamente superiori alle concentrazioni soglia di contaminazione previste dal

D.Lgs 152/2006 e sono comparabili con quelli osservati sul bacino di Campo Pisano da precedenti studi (Cao *et al.*, 2009; Bacchetta *et al.* 2012; Bacchetta *et al.* 2015).

Al termine della sperimentazione, al fine di valutare se vi erano state variazioni importanti nella composizione dei substrati, è stata ripetuta l'analisi del contenuto totale di Cd, Pb e Zn. L'analisi è stata effettuata sui substrati dai quali sono state estratte le piante sacrificate per l'ultimo campionamento e i risultati analitici sono mostrati in tab.4.2.

Tabella 4.2. Concentrazione contaminanti nei substrati sperimentali al termine della sperimentazione (frazione fine <2 mm) e confronto con i valori di Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC) previsti dal D.Lgs 152/2006, All.5, Tab.1, Parte V, per Siti ad uso Verde pubblico e privato e residenziale (a) e per siti ad uso commerciale e industriale (b).

Elemento	Bianco [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano+ Inerti [mg kg ⁻¹]	CSC (a) [mg kg ⁻¹]	CSC (b) [mg kg ⁻¹]
Cd	*Nd	77±7	49±1,4	2	15
Pb	4,3±0,8	3500,5±416,8	2444±46,6	100	1000
Zn	53±2,6	11485±898	9152,5±116,6	150	1500

*Nd=valore inferiore alla soglia di rilevabilità strumentale (0,002 mg L⁻¹ nell'estratto).

Se si confronta il contenuto iniziale dei metalli presenti nei substrati (cfr tab. 4.1) con quello alla fine della sperimentazione (cfr tab. 4.2), si osserva che nel substrato CP non si rilevano variazioni sostanziali nella concentrazione di Cd, Pb e Zn, mentre nel substrato CP+I, è stata rilevata una riduzione percentuale intorno al 23 % per tutti questi metalli.

Il dato ottenuto non permette di evidenziare variazioni sostanziali attribuibili all'estrazione da parte delle piante. La riduzione osservata sul substrato CP+I, potrebbe essere attribuita a percolazione avvenuta in presenza di pioggia. Benché durante il periodo sperimentale si abbia avuto cura di irrigare evitando le perdite per percolazione, le piante erano disposte in ambiente naturale non protetto ed erano quindi esposte agli agenti meteorici. L'ammendante introdotto dunque potrebbe aver aumentato il drenaggio rispetto al substrato non ammendato.

I risultati ottenuti sono in linea con quanto ci si aspetta in questa fase della sperimentazione, i brevi tempi di permanenza delle piante nel substrato infatti non permettono un'apprezzabile riduzione dei contaminanti dovuta alla fitoestrazione. In presenza di elevati valori di metalli, nel breve e medio termine e con un solo ciclo di crescita di *Atriplex halimus*, non è infatti possibile ottenere riduzioni apprezzabili nelle concentrazioni di contaminanti nel substrato (Pérez Esteban *et al.*, 2013).

4.1.3 ADATTAMENTO E SOPRAVVIVENZA

Durante il periodo sperimentale è stata monitorata la sopravvivenza delle piante ed è stato tenuto sotto controllo visivamente lo stato sanitario. Lo scopo di queste osservazioni era in primo luogo verificare se le piante erano in grado di sopravvivere sui substrati contaminati e come questi influissero sul loro stato sanitario. Sugli stessi parametri inoltre si è voluto verificare se potesse influire la presenza di ammendante inorganico.

Al termine della sperimentazione, dopo 135 giorni dal trapianto, la sopravvivenza è stata elevata (90%) ed uguale in tutti i substrati.

Per ciascun gruppo, durante i primi 45 giorni della sperimentazione, si è verificata la morte di un individuo sui 10 iniziali, imputabile probabilmente allo stress idrico. In generale la fase di adattamento dopo il trapianto, in climi caldo-aridi è da considerarsi critica per la sopravvivenza delle piante. La prima fase del periodo sperimentale si è svolta in un periodo in cui erano elevate le temperature dell'aria e in seguito al rilievo delle morti è stata aumentata la somministrazione idrica, come forma di soccorso per i giorni più caldi.

I risultati di sopravvivenza ottenuti sono in linea con quanto ottenuto per questa specie da Martínez Fernández e Walker (2012) dopo 30 giorni dal trapianto su suoli minerari, sia puri che ammendati con materiale inorganico (CaO + MgO).

Relativamente allo stato sanitario delle piante, durante tutta la sperimentazione, il controllo visivo non ha evidenziato segnali di stress quali clorosi o fenomeni di senescenza come quelli riscontrati da Frutos *et al.* (2017) in piante di *A. halimus*, su substrato minerario non ammendato, dopo 95 giorni dal trapianto. Nelle piante della presente sperimentazione inoltre, non è stata rilevata la presenza di parassiti.

Si può dunque affermare che le piante non hanno mostrato effetti visibili dovuti alla tossicità del substrato in accordo con Manousaki e Kalogerakis (2009) e Tapia *et al.* (2011) che, hanno testato la specie rispettivamente, su substrati contaminati con soluzioni di Cd e Pb per 10 settimane, e su substrato di corteccia di pino irrorato con Cd per 70 giorni.

Per i suddetti parametri, sopravvivenza e stato sanitario, non si sono rilevate differenze indotte dalla presenza di ammendante inorganico.

Quanto osservato conferma l'elevata tolleranza alla presenza di metalli e la capacità di sopravvivere in ambienti tossici ed estremi delle specie alofite (Van Oosten e Maggio, 2015).

4.1.4 ACCRESCIMENTI E BIOMASSA

Al fine di valutare la capacità della specie *Atriplex halimus* di crescere sui substrati contaminati sperimentali, è stato studiato l'accrescimento della parte aerea e radicale.

La crescita della parte aerea è stata valutata attraverso il rilievo dell'altezza e del peso della biomassa, differenziata in foglie e fusti. La biomassa fogliare è costituita dai tessuti verdi e include i nuovi germogli, mentre i fusti sono costituiti dai tessuti lignificati e/o in visibile processo di lignificazione.

La crescita dell'apparato radicale è stata valutata attraverso la misura della lunghezza delle radici e del loro peso.

Per quanto riguarda le lunghezze, ad ogni campionamento è stata rilevata l'altezza sull'intero numero di piante a disposizione, mentre il rilievo della lunghezza radicale è stato possibile solo sulle piante sacrificate. In figura 4.1 è possibile osservare l'accrescimento in lunghezza dell'apparato aereo (4.1 A) e di quello radicale (4.1 B), per tutti i substrati sperimentali.

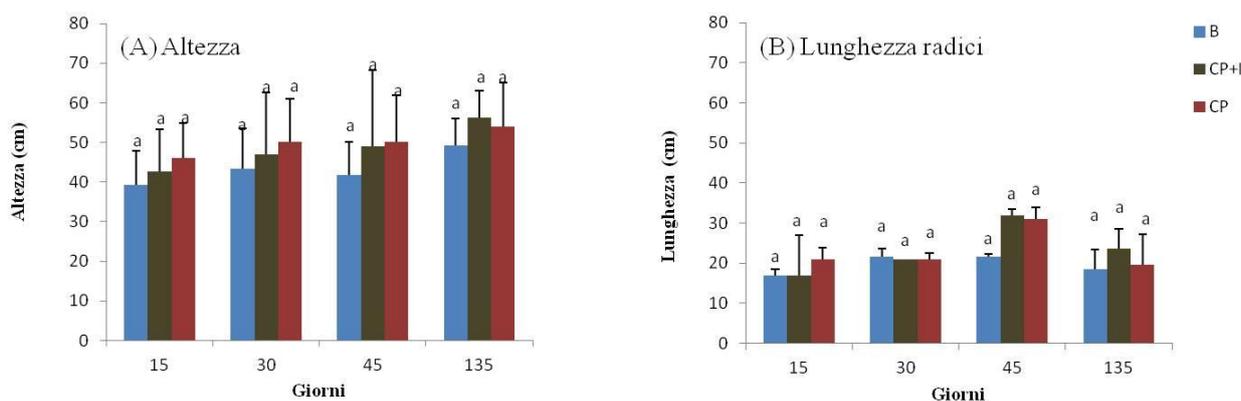


Figura 4.1. Altezze della parte aerea (A) e lunghezza degli apparati radicali (B), valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative.

Per quanto riguarda la valutazione della parte aerea (cfr fig. 4.1 A), durante l'intero periodo sperimentale, per ogni substrato, non si rileva un accrescimento in altezza significativo. Per tale parametro inoltre, non sono rilevabili differenze significative indotte dai substrati.

Per quanto riguarda la lunghezza dell'apparato radicale, analogamente a quanto avvenuto per la parte aerea, durante l'intero periodo sperimentale per ogni substrato non è stato rilevato un accrescimento significativo delle radici e non sono rilevabili differenze significative indotte dai substrati.

Per quanto riguarda la parte epigea i dati ottenuti si differenziano da quanto osservato da Lefèvre *et al.* (2009) che, per la specie in esame, in coltura idroponica, in presenza di Cd hanno riscontrato una minore altezza rispetto alla soluzione di controllo non contaminata da Cd. Tale effetto, secondo gli autori è dovuto all'inibizione dell'allungamento degli internodi causata dall'esposizione al metallo. Per quanto riguarda la crescita di *Atriplex halimus* in substrato contaminato da Cd, Tapia *et al.*, 2011 invece, non hanno riscontrato differenze significative nelle altezze, indotte da questo contaminante.

È necessario precisare che durante la sperimentazione, alla misura dell'altezza è stata osservata una certa variabilità nel portamento delle piante. Alcune mostravano infatti portamento eretto, mentre altre un portamento tendenzialmente prostrato. Questa caratteristica è diventata più marcata con lo sviluppo del palco aereo. In Figura 4.2 è possibile osservare i due principali tipi di portamento osservato.



Figura 4.2. Portamento prostrato (A) e portamento eretto (B).

Una certa variabilità fenotipica, sia per quanto riguarda il portamento (prostrato, compatto o eretto) sia per quanto riguarda l'altezza delle piante è stata già osservata in Sardegna per la specie *Atriplex halimus* (Dessena e Mulas 2012a).

Per quanto riguarda la parte ipogea, i risultati ottenuti nella presente sperimentazione sono in linea con quelli ottenuti da Lefèvre *et al.* (2009) che, dopo 24 giorni di accrescimento di *A. halimus* in coltura idroponica, non hanno rilevato differenze fra le piante cresciute in soluzione contaminata da Cd e in soluzione di controllo (non contaminata).

Si intende precisare che, nonostante l'accrescimento radicale non sia stato quantitativamente stimabile, la cospicua presenza di nuove radici era ben visibile ad ogni campionamento come mostrato in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**



Figura 4.3. Sviluppo delle biomasse radicali dopo 45 giorni dal trapianto.

Il recupero dell'intera struttura radicale, nelle condizioni sperimentali utilizzate, è risultato alquanto difficile. In particolare, i tessuti più nuovi si sono mostrati molto fragili e con tendenza a spezzarsi nell'estrazione, diventando così quasi del tutto irrecuperabili. La perdita di queste parti potrebbe aver influenzato il risultato delle misure di lunghezza delle radici.

Per quanto riguarda la biomassa, ad ogni campionamento, è stato valutato il peso secco sulle piante sacrificate. Nella Figura 4.4 è possibile osservare lo sviluppo della biomassa aerea avvenuto su ciascun substrato durante il periodo sperimentale.

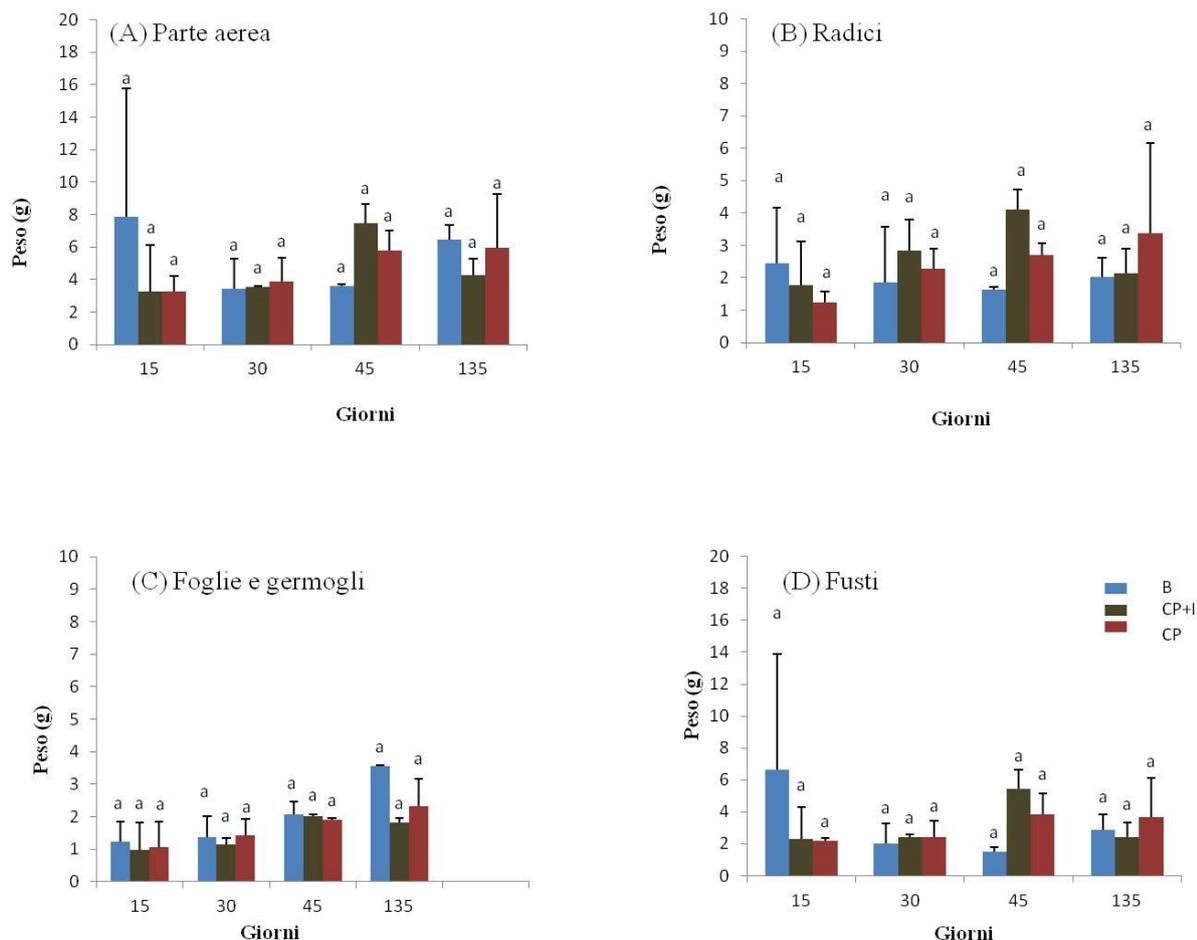


Figura 4.4. Biomassa secca nella parte aerea (A), nelle radici (B), in foglie e germogli (C) e nei fusti (D), valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative.

Durante tutto il periodo sperimentale, i valori della biomassa secca dell'intera parte aerea (fig. 4.4 A) e della parte radicale (fig. 4.4 B) rilevati per ogni singolo substrato, non hanno mostrato variazioni statisticamente significative. Per tali parametri inoltre, non sono rilevabili differenze significative indotte dai substrati.

Osservando più in dettaglio quanto avvenuto nella parte aerea si può rilevare che, per quanto riguarda la biomassa dei tessuti legnosi (fig. 4.4 D), non si evidenzia nessuna crescita nel tempo. Per quanto riguarda invece i tessuti verdi (foglie e germogli) vi è stato un incremento di biomassa (fig. 4.4 C). Tale osservazione è valida solo da un punto di vista qualitativo in quanto l'elevata variabilità dei campioni non permette di confermare questa osservazione da un punto di vista quantitativo. L'aumento di biomassa, nei tessuti verdi, risulta evidente anche osservando il peso della biomassa verde fresca riportato in figura 4.5. I risultati ottenuti si discostano da quanto osservato da Tapia *et al.* (2011) che, dopo 70 giorni di accrescimento di *Atriplex halimus* su

substrato contaminato da Cd, hanno riscontrato un accrescimento in biomassa dell'intera parte aerea.

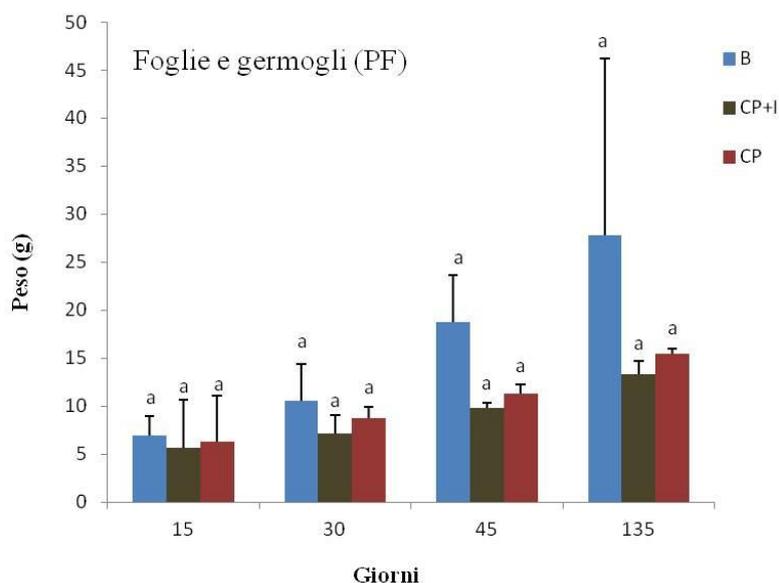


Figura 4.5. Biomassa fresca in foglie e germogli, valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative.

In entrambe le valutazioni riguardanti la biomassa aerea (peso fresco e peso secco), si osserva una maggiore produzione di biomassa verde sul substrato B, non contaminato (fig. 4.4 e fig. 4.5). In particolare per la biomassa verde fresca, tale comportamento indica un maggior contenuto idrico nelle piante cresciute nel substrato non contaminato rispetto alle altre. Si può supporre che, tale differenza sia dovuta ad uno stress idrico, indotto dal Cd. Una diminuzione del contenuto idrico nelle piante esposte a Cd rispetto a quelle non esposte è stata infatti riportata da L efevre *et al.* 2009 su *Atriplex halimus*.

Questa osservazione   valida solo da un punto di vista qualitativo in quanto l'elevata variabilit  dei campioni non permette di confermare questa osservazione da un punto di vista statistico. Il substrato B inoltre, potrebbe aver fornito alle piante l'apporto nutritivo che era invece scarso nei substrati contaminati.

Tale andamento si discosta da quanto osservato da Tapia *et al.*, (2011) che, non hanno riscontrato differenze significative nel peso secco di fusti, radici o foglie, di piante allevate su un substrato contaminato da Cd rispetto a quelle allevate nel substrato di controllo non contaminato.

Per quanto riguarda i substrati contaminati, la biomassa prodotta nei substrati ammendati con materiale inerte (CP+I) non differisce da quella dei substrati CP (non ammendati) come riscontrato anche da Martinez Fernandez e Walker (2012) relativamente ad un suolo minerario ammendato con materiale non organico.

I risultati relativi all'accrescimento e alla biomassa, possono essere riassunti come segue.

Dalle misure della lunghezza e dal peso della biomassa, non è stato quantificato un accrescimento significativo delle piante nel tempo su nessuno dei substrati.

Nonostante l'accrescimento epigeo non sia stato quantitativamente stimabile, è stato osservato un accrescimento di foglie e germogli. L'andamento di tale accrescimento è simile nei substrati contaminati e in quello non contaminato, benché in quest'ultimo le piante abbiano mostrato una performance migliore.

L'accrescimento dei tessuti verdi osservato durante la sperimentazione, è da ritenersi importante in quanto indice di una buona attività vegetativa e quindi della vitalità della pianta, anche su substrati contaminati. In maniera analoga, anche l'apparato radicale, pur non presentando un aumento significativo di biomassa, si è mostrato vitale in quanto, come sopra descritto, si presentava in espansione come dimostrato dalla presenza di nuove radici.

I risultati ottenuti mostrano inoltre che l'introduzione dell'ammendante non ha indotto miglioramento nell'accrescimento della biomassa aerea e radicale.

4.1.5 ACCUMULO DI METALLI

Al fine di valutare la capacità della specie *Atriplex halimus* a traslocare metalli nei propri tessuti da un substrato ad elevata contaminazione, è stata studiata la concentrazione di metalli nelle piante cresciute sui substrati sperimentali.

Si è voluto inoltre verificare se la presenza di ammendante inorganico potesse influire sulla concentrazione di Cd, Pb e Zn nei tessuti vegetali.

L'analisi del contenuto di metalli è stato realizzato separatamente nella parte aerea e radicale. Nella parte aerea a sua volta i fusti, sono stati separati dalle parti verdi che sono rappresentate dai germogli e dalle foglie.

In tutti i tessuti sono state rilevate concentrazioni elevate di Zinco e Piombo e, fra questi, l'elemento maggiormente assorbito è stato lo Zn. Per quanto riguarda la ripartizione fra i tessuti, le maggiori concentrazioni sia di Zn che di Pb sono state rilevate nelle radici rispetto agli altri tessuti. Se invece si osserva più in dettaglio quanto avvenuto nelle parti aeree, le maggiori concentrazioni di questi elementi sono state osservate nei tessuti verdi (foglie e germogli) rispetto ai fusti.

Le concentrazioni medie di Zn rilevate nelle piante, nei diversi substrati durante la sperimentazione, sono rappresentate in Figura 4.6.

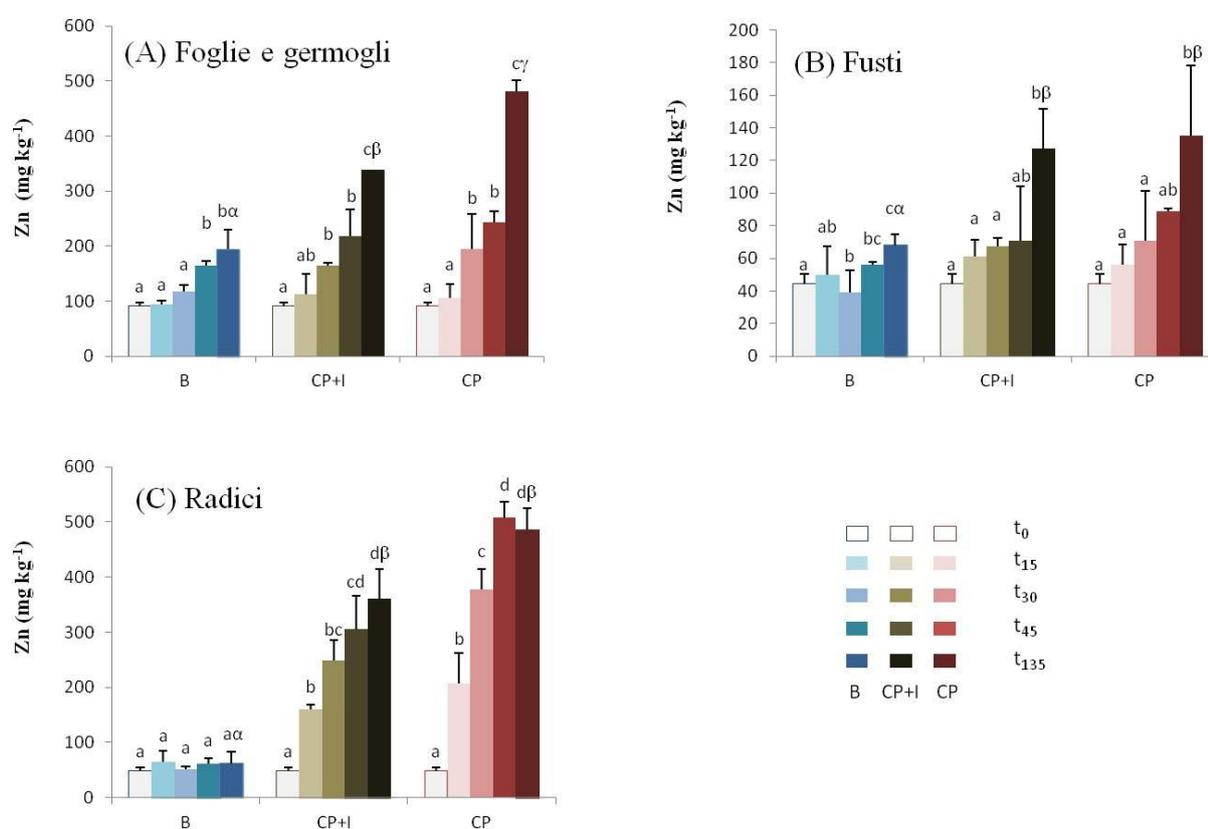


Figura 4.6. Concentrazioni di Zn nelle foglie e germogli (A), fusti (B), radici (C): valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati al termine della sperimentazione (t₁₃₅).

Nei tessuti aerei i valori massimi delle concentrazioni medie di Zn sono stati riscontrati nelle piante cresciute sul substrato CP al termine della sperimentazione (135 giorni dopo il trapianto), raggiungendo i 481,5 ppm nelle foglie e germogli (cfr figura 4.6 A) e i 135 ppm nei fusti (cfr figura 4.6 B). Tali concentrazioni corrispondono ad oltre il doppio di quelle riscontrate nel substrato non contaminato (B).

Nel substrato contaminato ammendato le concentrazioni di Zn (valore medio a 135 giorni) in tessuti verdi e in fusti hanno raggiunto rispettivamente i valori di 338,2 e 127,6 ppm (cfr figure 4.6 A, 4.6 B).

Nelle radici la concentrazione di Zn ha raggiunto circa 509 ppm, già dopo 45 giorni di sperimentazione, nelle piante cresciute su CP e restando stabile fino a 135 giorni dal trapianto (cfr figura 4.6 C). Nelle piante cresciute sul substrato di confronto (B), la concentrazione è rimasta pressoché costante e compresa fra circa 48 e 62 ppm.

Nel substrato contaminato ammendato la concentrazione di Zn (valore medio a 135 giorni) in tessuti radicali ha raggiunto il valore di circa 361 ppm (cfr figura 4.6 C).

Da quanto osservato emerge che al termine della sperimentazione la concentrazione di Zn nelle piante cresciute sui substrati contaminati (sia CP che CP+I) si discosta notevolmente da quella delle piante B. Questa differenza è particolarmente evidente nei tessuti radicali, dove la concentrazione di Zn nelle radici di CP, è circa 8 volte maggiore di quella in B. Al termine della sperimentazione la concentrazione di Zn nei tessuti verdi è stata maggiore nelle piante cresciute laddove era maggiore la presenza di contaminante (substrato CP) rispetto a quelle cresciute in CP+I. Nei fusti e nelle radici invece, le concentrazioni in questi due substrati sono simili, nonostante esista una cospicua diluizione del contaminante nel substrato CP+I.

Il contenuto di Zn presente nelle foglie e germogli riscontrato nel presente lavoro è in linea con quello riscontrato da Lutts *et al.* (2004) in coltura idroponica, mentre per i fusti e le radici è inferiore (pari a circa un terzo) a quello riportato dallo stesso autore. I valori massimi superano il livello di tossicità indicato per i tessuti aerei da Kabata Pendias e Pendias (2001) che corrisponde a 400 ppm.

Il secondo elemento maggiormente assorbito dopo lo Zn, è stato il Pb.

Le concentrazioni medie di Pb rilevate nelle piante, nei diversi substrati durante la sperimentazione, sono rappresentate in figura 4.7.

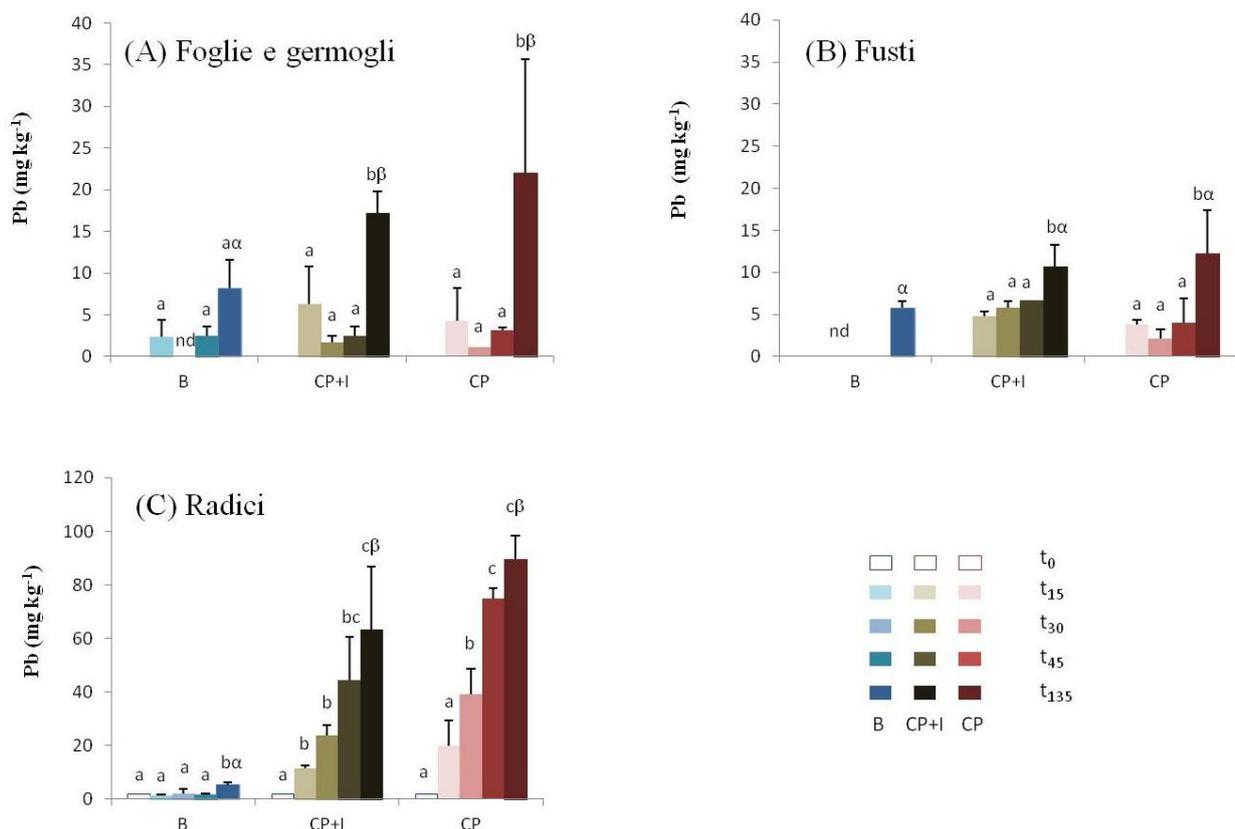


Figura 4.7. Concentrazioni di Pb nelle foglie e germogli (A), fusti (B), radici (C): valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati al termine della sperimentazione (t₁₃₅).

Nei tessuti aerei i valori massimi delle concentrazioni medie di Pb sono stati riscontrati nelle piante cresciute sul substrato CP al termine della sperimentazione (135 giorni dopo il trapianto), raggiungendo i 22 ppm nelle foglie e germogli (cfr figura 4.7 A) e i 12 ppm nei fusti (cfr figura 4.7 B). Tali concentrazioni sono circa tre volte maggiori di quelle riscontrate nel substrato non contaminato (B). Nel substrato contaminato ammendato le concentrazioni di Pb (valore medio a 135 giorni) in tessuti verdi e in fusti hanno raggiunto rispettivamente i valori di 17,2 e 10,7 ppm (cfr figure 4.7 A, 4.7 B).

Nelle radici la concentrazione di Pb ha raggiunto circa 90 ppm a 135 giorni dal trapianto (cfr figura 4.7 C). Nelle piante cresciute sul substrato di confronto (B), la concentrazione non ha superato il valore massimo di 5,3 ppm, durante l'intera sperimentazione.

Nel substrato contaminato ammendato la concentrazione di Pb (valore medio a 135 giorni) in tessuti radicali ha raggiunto il valore di 36,2 ppm (cfr figura 4.7 C).

Come osservato per lo Zn, anche per il Pb emerge che, al termine della sperimentazione, la concentrazione nelle piante cresciute sui substrati contaminati (sia CP che CP+I) si discosta notevolmente da quella delle piante B, risultando maggiore. Questa differenza è particolarmente evidente nei tessuti radicali. L'accumulo di Pb infatti è avvenuto principalmente nelle radici, dove ha mostrato un andamento crescente nel tempo su entrambi i substrati contaminati.

I valori medi riscontrati nei tessuti aerei di CP e CP+I sono risultati molto simili nel tempo, anche se è da segnalare una elevata variabilità dei dati analitici di questo elemento, come evidenziato dalle deviazioni standard riportate graficamente in fig 4.7.

Nelle radici, analogamente alla parte aerea, le concentrazioni di Pb sono risultate simili nelle piante cresciute in CP e in CP+I.

Il contenuto di Pb nelle radici e nei tessuti aerei è simile a quanto osservato da studi precedenti sulla specie *Atriplex halimus* (Manousaki e Kalogerakis 2009; Frutos *et al.*, 2017). Nella parte aerea, su substrato non ammendato, Martínez Fernández e Walker (2012) hanno riscontrato valori di Pb di poco superiori a quanto riscontrato su CP nella presente sperimentazione (118 ppm) ma in presenza di ammendante inorganico i valori possono dirsi in linea con quanto riscontrato in CP+I.

Il Cd è stato accumulato in quantità molto minore rispetto a Zn e Pb. In figura 4.8 è possibile osservare i valori medi di Cd riscontrati nei tessuti vegetali durante la sperimentazione.

Si ricorda che la concentrazione di questo elemento nel substrato di Campo Pisano (65,4 ppm) è nettamente inferiore a quelle di Zn e Pb (13283 e 3622 ppm, rispettivamente).

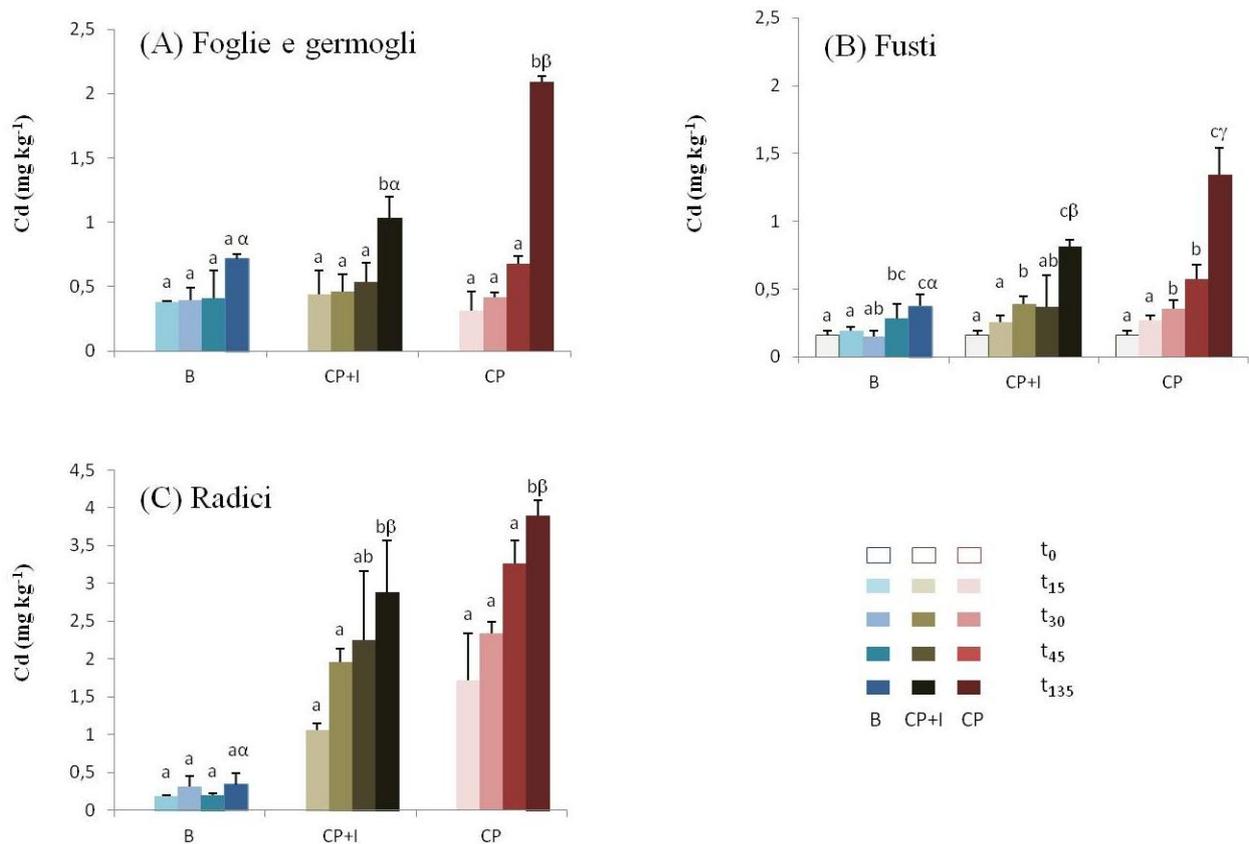


Figura 4.8. Concentrazioni di Cd nelle foglie e germogli (A), fusti (B), radici (C): valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati al termine della sperimentazione (t_{135}).

Le concentrazioni più elevate sono state riscontrate nelle radici, dove, sul substrato CP, è stato raggiunto il valore massimo di 3,9 ppm al termine della sperimentazione.

Le concentrazioni di Cd nelle parti aeree e nelle radici delle piante cresciute sui substrati contaminati, si sono mostrate in aumento nel tempo analogamente a quanto riscontrato da Lutts *et al.* (2004) mentre Tapia *et al.* (2011) hanno riscontrato un aumento solo nelle radici.

I valori di Cd riscontrati nel presente lavoro sono molto inferiori a quanto riscontrato in coltura idroponica da precedenti studi sulla specie *Atriplex halimus* (Lutts *et al.* 2004; Nedjimi e Daoud 2009) mentre possono dirsi simili a quanto osservato su substrati sperimentali da diversi autori (Martínez Fernández e Walker, 2012; Pérez Esteban *et al.*, 2013; Manousaki e Kalogerakis, 2009; Frutos *et al.*, 2017).

Da quanto emerso dall'analisi dei dati sopra esposti le piante hanno mostrato una particolare predisposizione nell'accumulare zinco rispetto a Pb e a Cd.

Da quanto emerso dall'analisi dei dati sopra esposti le piante hanno mostrato una particolare predisposizione nell'accumulare zinco rispetto a Pb e a Cd.

Per tutti i metalli le concentrazioni nei tessuti hanno mostrato un continuo aumento nel tempo confermando quanto già osservato da diversi autori nella specie *Atriplex halimus*. (Lutts *et al.*, 2004; Lèfevre *et al.*, 2009; Frutos *et al.*, 2017).

L'introduzione dell'ammendante inorganico non ha causato variazioni significative nella concentrazione dei metalli nei tessuti in accordo con quanto riscontrato da Martínez Fernández e Walker, 2012. Fanno eccezione i tessuti verdi, dove le concentrazioni di Zn e Cd, sono risultate maggiori nelle piante cresciute su CP rispetto a quelle cresciute in presenza di ammendante alla fine della sperimentazione.

Si ricorda che (cfr. par. 3.4 - A1), il contenuto di matrice contaminata nel substrato CP+I è pari ad un terzo del materiale totale quindi la concentrazione dei contaminanti è notevolmente diluita rispetto al substrato CP. In riferimento al contenuto di metalli nel substrato, la mancanza di differenze statisticamente significative nelle concentrazioni dei metalli fra le piante cresciute sui substrati CP e CP+I, si discosta da quanto ottenuto da diversi autori che, per la specie *Atriplex halimus*, hanno riscontrato un aumento della concentrazione nei tessuti vegetali all'aumentare della concentrazione nel substrato (Nedjimi e Daoud, 2009; Amer *et al.*, 2013).

4.1.5.1 TRASLOCAZIONE E BIOCONCENTRAZIONE DEI METALLI

La capacità delle piante nell'estrarre i metalli dal suolo e traslocarli nei propri tessuti può essere valutata attraverso diversi parametri, come per esempio il fattore di traslocazione (TF) o il fattore di bioconcentrazione (BF).

Il TF consente di rapportare la concentrazione totale di metallo presente nelle parti aeree con quella presente nelle radici mentre attraverso il BF viene misurato il rapporto fra la concentrazione totale di metallo nei tessuti, (parte aerea o radici) e quella contenuta nella matrice (totale o solubile).

Per poter determinare il fattore di traslocazione e di bioconcentrazione a fine sperimentazione, i dati relativi alle concentrazioni di Zn, Pb e Cd, riscontrati separatamente nelle foglie e nei fusti, sono stati rielaborati per ottenere il valore di concentrazione della biomassa aerea (costituita dall'insieme di foglie e fusti), che è stata ottenuta come media pesata delle concentrazioni tra fusti e foglie.

In Figura 4.9 sono rappresentate le concentrazioni di Zn, Pb e Cd rilevate nella parte aerea e in quella radicale delle piante, a fine sperimentazione e in funzione dei diversi substrati.

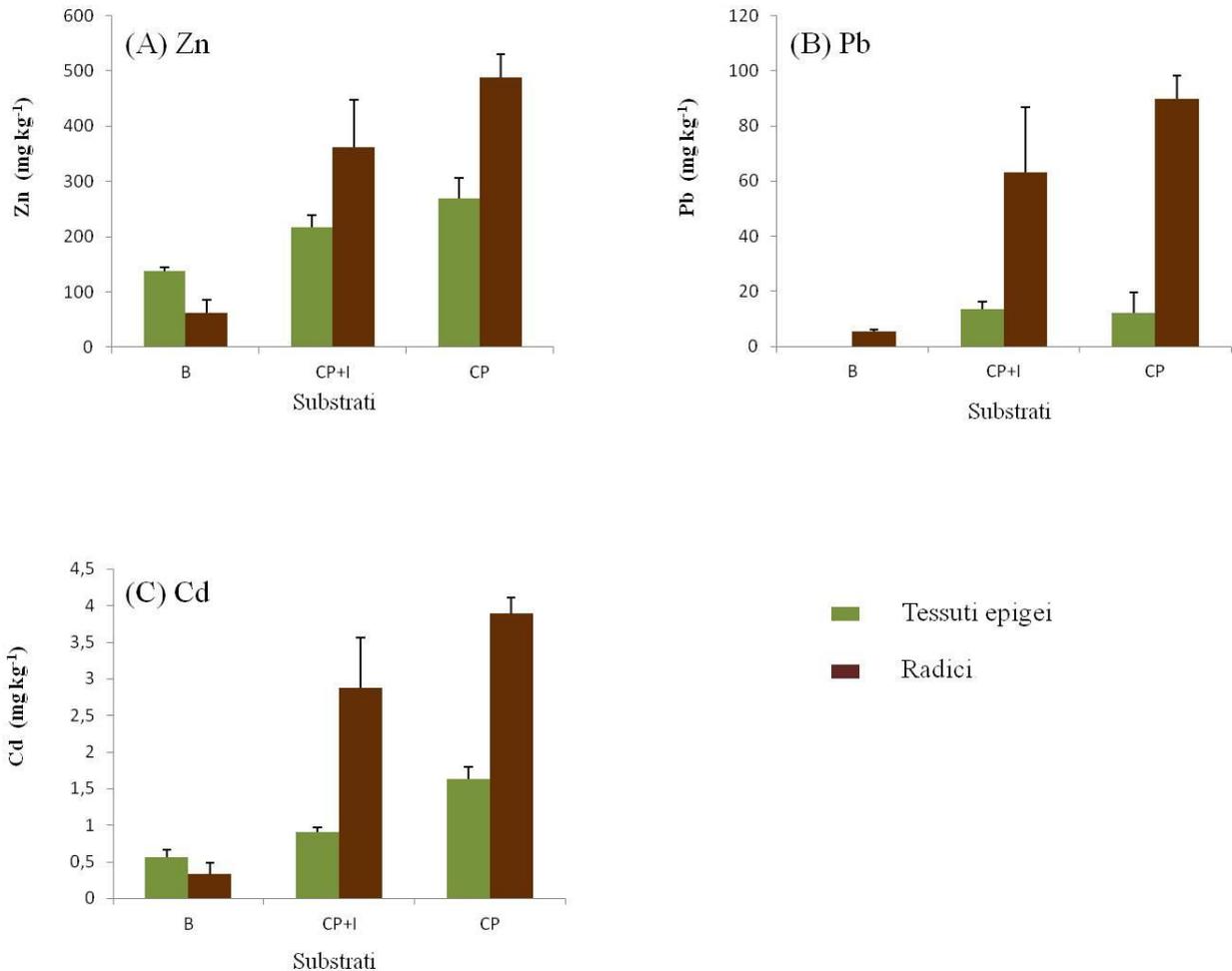


Figura 4.9. Concentrazioni di Zn (A), Pb (B) e Cd (C) nei tessuti aerei e in quelli radicali: valori medi riscontrati a fine sperimentazione (t_{135}) in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media.

Da tale analisi, a fine sperimentazione, la concentrazione di Zn nei tessuti epigei è risultata pari a 269 e 217,7 ppm, rispettivamente in CP e in CP+I. La concentrazione di Pb nei tessuti epigei è risultata pari a 13,5 ppm in CP+I e 12,3 ppm in CP, mentre quella del Cd è risultata pari a 1,6 e 0,9 ppm rispettivamente in CP e in CP+I.

Il maggiore assorbimento di metalli è avvenuto nelle radici rispetto alla parte aerea secondo quanto riscontrato per la specie *Atriplex halimus* da diversi autori (Kachout *et al.*, 2012; Lèfevre *et al.*, 2009; Amer *et al.*, 2013; Lutts *et al.*, 2004; Manousaki e Kalogerakis, 2009).

Rapportando i valori delle concentrazioni epigee con quelli rilevati nelle radici, per ciascun metallo nei diversi substrati, a fine sperimentazione (t_{135}), sono stati ottenuti i fattori di traslocazione mostrati in Tabella 4.3.

Tabella 4.3. Fattori di traslocazione (TF) per i metalli Zn, Pb e Cd rilevati nei diversi substrati sperimentali a fine sperimentazione (t_{135}).

SUBSTRATO	FATTORE DI TRASLOCAZIONE (TF)		
	Zn	Pb	Cd
CP+I	0,6	0,2	0,3
CP	0,6	0,1	0,4

I valori di TF per ciascun metallo e in ogni substrato, sono risultati tutti inferiori a 1.

I TF molto bassi riscontrati nella presente sperimentazione sono in accordo con quanto riportato da Amer *et al.* (2013) che, in coltura idroponica, per il Pb ha rilevato ($TF < 0,06$), mentre per lo Zn gli stessi autori hanno riscontrato $0,55 < TF < 1,06$. Bassi valori di TF ($< 0,3$) sono stati riscontrati anche da Kachout *et al.* (2012) su piante del genere *Atriplex* cresciute su substrati contaminati a diverse concentrazioni di Zn e Pb.

Per ottenere i fattori di bioconcentrazione, la concentrazione di metalli riscontrata nei tessuti epigei e separatamente in quelli ipogeici, è stata rapportata con quella dei metalli presenti nel substrato. Da questa analisi, per ciascun metallo e nei diversi substrati, sono stati ottenuti i fattori di bioconcentrazione mostrati in Tabella 4.4.

Tabella 4.4. Fattori di bioconcentrazione (BF) aerei e radicali, per i metalli Zn, Pb e Cd, relativamente ai substrati contaminati a fine sperimentazione (t_{135}).

SUBSTRATO	BF AEREO				BF RADICALE		
	Zn	Pb	Cd		Zn	Pb	Cd
CP+I	0,02	0,00	0,01		0,03	0,02	0,04
CP	0,02	0,00	0,02		0,04	0,03	0,06

I valori di BF relativi allo Zn e al Pb riscontrati per le radici sono nettamente inferiori a quanto rilevato da Kachout *et al.* (2012) che, su piante del genere *Atriplex* cresciute su substrati contaminati a diverse concentrazioni di Zn e Pb, hanno riscontrato valori di BF radicali compresi tra 0,3 e 2,1.

Anche i BF riscontrati per le parti aeree sono molto più bassi rispetto a quelli ottenuti in studi analoghi per la specie o il genere *Atriplex* (Moreira *et al.*, 2011; Rabier *et al.*, 2014).

4.1.6 CONCLUSIONI

L'obiettivo principale di questo studio è stato valutare la possibilità di utilizzare la specie *Atriplex halimus* nel risanamento di suoli minerari in Sardegna.

Da quanto esposto si evince che la specie ha mostrato capacità di adattarsi e crescere su substrati contaminati da metalli e di accumulare tali metalli nei tessuti senza che si evidenziassero effetti dovuti alla tossicità degli stessi.

La sopravvivenza delle piante è stata elevata ed uguale in tutti i substrati e al controllo visivo non ha evidenziato segnali di stress quali clorosi o fenomeni di senescenza né è stata rilevata la presenza di parassiti.

Si può dunque affermare che le piante non hanno mostrato riduzione della sopravvivenza o effetti visibili dovuti alla tossicità del substrato.

Per i suddetti parametri, sopravvivenza e stato sanitario, non si sono rilevate differenze indotte dalla presenza di ammendante inorganico.

Le piante si sono accresciute con un andamento simile nei substrati contaminati e in quello non contaminato, benché in quest'ultimo le piante abbiano mostrato una performance migliore.

L'accrescimento dei tessuti verdi osservato durante la sperimentazione, è da ritenersi importante in quanto indice di buona attività vegetativa e quindi della vitalità della pianta, anche su substrati contaminati. In maniera analoga, anche l'apparato radicale, pur non presentando un aumento significativo di biomassa, si è mostrato vitale e grazie alla presenza di nuove radici.

Le piante hanno mostrato assorbimento di metalli e una particolare predisposizione nell'accumulare zinco rispetto a Pb e a Cd. Per tutti i metalli le concentrazioni nei tessuti hanno mostrato un continuo aumento nel tempo e il maggiore assorbimento è avvenuto nelle radici.

L'introduzione dell'ammendante inorganico non ha causato variazioni significative nella concentrazione dei metalli nei tessuti, ad eccezione i tessuti verdi, dove le concentrazioni di Zn e Cd, sono risultate maggiori nelle piante cresciute su CP. Allo stesso tempo, l'accrescimento della biomassa aerea e radicale non è stato influenzato dalla presenza di ammendante.

Quanto osservato conferma l'elevata tolleranza alla presenza di metalli e la capacità di sopravvivere in ambienti tossici ed estremi di questa specie.

Questa caratteristica, insieme alla capacità di assorbire ed accumulare metalli nei propri tessuti, inducono ad approfondire lo studio della specie per fitorisanamento di suoli minerari in Sardegna.

4.2 A2 - Radicazione di talee di *Atriplex halimus* su suolo contaminato da metalli pesanti per valutarne la capacità di insediamento in attività di fitorisanamento

4.2.1 INTRODUZIONE

4.2.1.1 OBIETTIVI

L'obiettivo principale di questo studio è stato valutare la possibilità di propagare la specie *Atriplex halimus* mediante la coltivazione diretta di talee su un substrato minerario contaminato da un'elevata concentrazione di metalli.

Al fine di valutare la capacità di insediamento della specie impiantata mediante talea per le attività di fitorisanamento, sulle piante ottenute (barbatelle) sono stati valutati la sopravvivenza, l'adattamento, la produzione di biomassa e l'accumulo di metalli nei tessuti.

Un altro obiettivo di questa sperimentazione è stato studiare l'effetto di diversi ammendanti sulla capacità di propagazione mediante talea, in particolare nella prima fase di sviluppo delle piante. A tale scopo una matrice mineraria contaminata è stata ammendata ottenendo diversi substrati ed è stata valutata l'influenza degli stessi sulla capacità di propagazione, sopravvivenza e nel favorire la radicazione e lo sviluppo di biomassa aerea. È stata valutata inoltre l'influenza di tali substrati sull'accumulo di metalli nei tessuti aerei.

4.2.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

Lo studio è stato realizzato in vaso, utilizzando talee di *Atriplex halimus* che sono state poste a radicare su substrato contaminato da metalli.

Le risposte delle talee e delle piante da esse ottenute sono state confrontate su quattro diversi substrati: B, CP, CP+A, CP+I.

Il substrato B rappresenta il bianco di riferimento. I substrati contaminati sono stati i seguenti: CP, costituito esclusivamente dal suolo di Campo Pisano; CP+A composto da materiale di Campo Pisano, compost, sabbia e ghiaia nelle proporzioni 25: 8: 33: 33 (% in volume); CP+I contenente matrice di Campo Pisano, sabbia e ghiaia nelle proporzioni 33: 33: 33 (% in volume).

In ogni vaso, contenente 27 L di substrato, sono state messe a dimora 35 talee legnose, della lunghezza di 20 cm circa. Al termine della sperimentazione (8 settimane), è stata valutata la sopravvivenza delle talee e, da ogni substrato è stato prelevato un campione rappresentativo di 5 piante. Su questo campione sono state valutate la crescita radicale e della biomassa aerea, il contenuto di clorofilla e di carotenoidi e la concentrazione finale di metalli contaminanti nei tessuti aerei.

4.2.2 CARATTERISTICHE DEI SUBSTRATI

All'inizio della sperimentazione i substrati sono stati caratterizzati, secondo quanto descritto nel capitolo 3, e di seguito sono descritte le loro caratteristiche fisico-chimiche. In tabella 4.5 e 4.6. sono descritte le concentrazioni di Cd, Pb e Zn contenute nella frazione fine dei substrati (<2 mm). Le principali caratteristiche fisico - chimiche dei substrati sono invece riportate in tab. 4.7.

Tabella 4.5. Concentrazioni di Cd, Pb e Zn nei substrati all'inizio della sperimentazione e confronto con i valori di Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC) previsti dal D.Lgs 152/2006, All.5, Tab.1, Parte V, per Siti ad uso Verde pubblico e privato e residenziale (a) e per siti ad uso commerciale e industriale (b).

Elemento	Bianco [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano+ Inerti [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano+ Compost [mg kg ⁻¹]	CSC (a) [mg kg ⁻¹]	CSC (b) [mg kg ⁻¹]
Cd	Nd	54,16	47,52	25,32	2	15
Pb	Nd	2532,75	2228,16	1088,55	100	1000
Zn	29,56	10077,05	8968,53	5624,23	150	1500

*Nd=valore inferiore alla soglia di rilevabilità strumentale (0,002 mg L⁻¹ nell'estratto).

Oltre al contenuto totale di Cd, Pb e Zn, nei substrati è stato valutato anche quello biodisponibile per le piante (tab 4.4).

Tabella 4.6. Frazione biodisponibile di Cd, Pb e Zn nei substrati all'inizio della sperimentazione

Metalli biodisponibili*				
		Cd (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
Frazione adsorbita e/o complessata (estraente EDTA)	B	nd	1,7±0,1	0,7±0,0
	CP	6,6±0,7	213,3±19,4	925,7±71,0
	CP+I	2,8±0,5	76,3±9,8	348,7±46,8
	CP+A	3,4±0,0	89,9±0,4	394,5±1,6
Frazione lisciviabile (estraente H ₂ O)	B	nd	Nd	nd
	CP	nd	Nd	1,31±0,5
	CP+I	nd	Nd	1,20±0,5
	CP+A	nd	Nd	1,24±0,4
Frazione scambiabile (estraente KNO ₃)	B	nd	nd	0,29±0,1
	CP	nd	nd	1,24±0,5
	CP+I	nd	nd	0,83±0,2
	CP+A	nd	nd	0,99±0,1

*Biodisponibilità calcolata sulla frazione fine (particelle con diametro<2mm).

Nd indica che il valore nell'estratto è inferiore alla soglia di rilevabilità strumentale (Cd 0,002 mg L⁻¹; Pb 0,02 mg L⁻¹).

I dati ottenuti (Tabella 4.5 e Tabella 4.6) mostrano che il contenuto di metalli biodisponibile è nettamente inferiore al contenuto di metalli totale come già osservato in studi precedenti sui substrati di Campo Pisano (Cao *et al.*, 2009; Bacchetta *et al.*, 2012; Bacchetta *et al.*, 2015).

Tabella 4.7. Caratteristiche fisico chimiche dei substrati all'inizio della sperimentazione

Substrato	pH	C.S.C. [meq/100g suolo]	N [%]	C [%]	P biodisponibile [mg kg⁻¹]
B	5,5	23,2	0,07±0,0	3,9±0,7	29,0±1,8
CP	7,3	Nd*	Nd**	6,97±0,1	Nd***
CP+I	7,3	8,4	Nd**	5,9±0,1	Nd***
CP+A	7,6	11,0	0,08±0,0	7,1±0,5	13,6±1,4
Compost	8,1	50,05	0,92±0,1	21,2±0,9	

*Nd: volume soluzione titolante bianco-volume soluzione titolante campione = 0

**Nd: valore inferiore alla soglia di rilevabilità strumentale (0,01%)

***Nd: valore inferiore alla soglia di rilevabilità strumentale (2µg di P nell'estratto)

Se si considera il contenuto di nutrienti (Tabella 4.7) è possibile notare la scarsità di azoto e fosforo biodisponibile nei substrati CP e CP+I (risultati irrilevabili dall'analisi chimica). Lo scarso contenuto di azoto conferma quanto già osservato su matrice di Campo Pisano da Bacchetta *et al.* (2015). Per quanto riguarda il fosforo, è stata rilevata una scarsa presenza dell'elemento in forma biodisponibile mentre, sulla matrice di Campo Pisano, Bacchetta *et al.* (2015) hanno rilevato un elevato contenuto di fosforo totale (357,9 mg kg⁻¹). Questi importanti nutrienti sono invece presenti in moderate concentrazioni nel substrato di confronto (B) e in CP+A (ARPAV, 2007). In quest'ultimo substrato, la presenza di N e P è apportata esclusivamente dal compost, che svolge anche l'importante funzione di incrementare la CSC come osservato su Campo Pisano da Bacchetta *et al.* (2012). Il valore della CSC risulta buono in CP+A (Sequi, 1990) ed è stato osservato un incremento anche in presenza di solo ammendante inerte.

Non è stato possibile rilevare la concentrazione di fosforo biodisponibile nel compost poiché, con il metodo utilizzato, su questo materiale si sono ottenute delle soluzioni analitiche che non è stato possibile rendere limpide e il dato spettrofotometrico è risultato compromesso.

4.2.3 ADATTAMENTO E SOPRAVVIVENZA

Durante il periodo sperimentale è stata monitorata la sopravvivenza delle piante ed è stato tenuto sotto controllo visivo lo stato sanitario. Lo scopo di queste osservazioni era in primo luogo verificare se le talee fossero in grado di originare piante sui substrati contaminati e come le piante/barbatelle ottenute fossero in grado di sopravvivere su tali substrati.

Si è anche monitorato come i substrati influissero sulla sopravvivenza e sullo stato sanitario delle piante.

La sopravvivenza è stata misurata attraverso il conteggio delle barbatelle (talee radicate) vive al termine della sperimentazione (durata 56 giorni), rispetto al numero iniziale di talee. E' stato individuato anche un momento intermedio (t_m pari a 35 giorni) per valutare l'andamento della sopravvivenza nel tempo.

Nella Figura 4.10. Sopravvivenza delle barbatelle. è possibile osservare la sopravvivenza nei tre substrati, misurata in tre distinti momenti della sperimentazione: iniziale, intermedio e finale (t_0 , t_m , t_f).

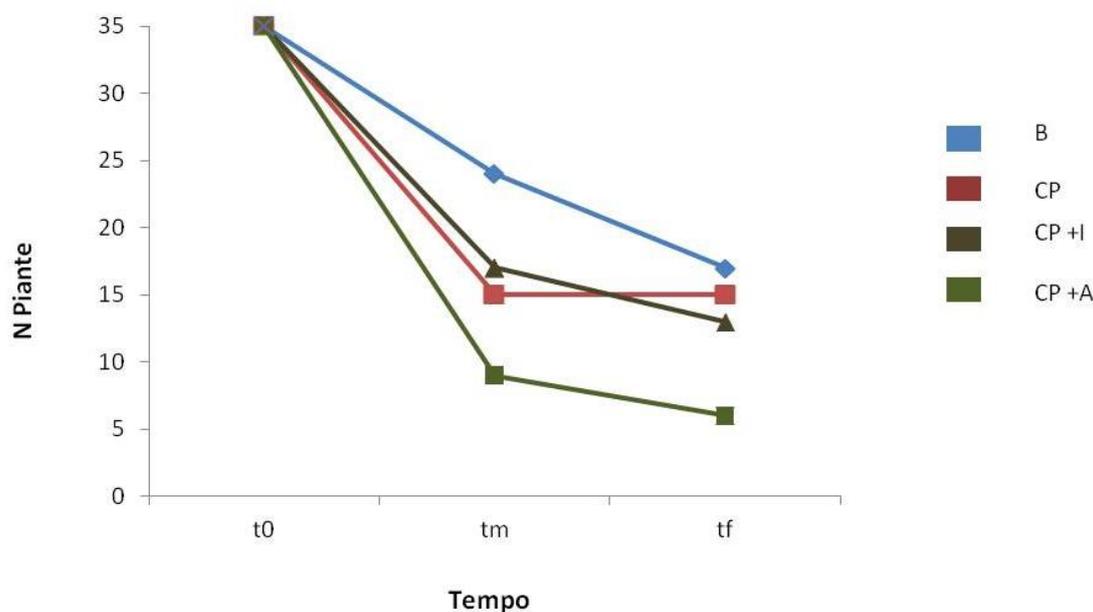


Figura 4.10. Sopravvivenza delle barbatelle.

Al termine della sperimentazione la sopravvivenza delle barbatelle è risultata massima tra le piante cresciute su terreno non contaminato (48,5%) e minima in CP+A (17,4%). Le piante cresciute nel substrato contaminato puro (CP) hanno mostrato una sopravvivenza del 42,8%, simile a quella del substrato non contaminato (B) e maggiore di quelle cresciute su CP+I (37,1 %).

La bassa sopravvivenza riscontrata per tutti i substrati, potrebbe essere stata condizionata dalla presenza di insetti dannosi per le piante. E' stata infatti rilevata la presenza di larve di ditteri sciaridi proliferanti, in maniera particolare, in presenza di materia organica e umidità, associate a temperature medio-elevate. Per controllare la presenza di questi fitofagi, che si nutrono di radici in via di sviluppo, è stato necessario effettuare due trattamenti fitosanitari. A tale scopo è stata distribuita nel suolo una soluzione (qb) contenente i principi attivi Abamectina e Tiamethoxam (rispettivamente 0,002 e 0,01 % V/V di ciascun principio attivo). In seguito al secondo trattamento non sono state rilevate ulteriori infestazioni fino al termine della sperimentazione.

Relativamente allo stato sanitario delle piante, durante tutta la sperimentazione, il controllo visivo non ha evidenziato segnali di stress quali clorosi o necrosi fogliare a differenza di quanto riscontrato da Mancilla-Leytón *et al.*, (2016) in presenza di elevate concentrazioni di Cu.

Per quanto riguarda la capacità di radicazione di talee della specie *Atriplex halimus* si può dire che le percentuali di radicazione ottenute, rientrano nell'intervallo di dati osservato da Dessena e Mulas (2012 b), che riportano un'elevata variabilità nella percentuale di radicazione (20 - 90%) di popolazioni spontanee (su substrato non contaminato) prelevate in diverse aree costiere della Sardegna.

I risultati di sopravvivenza di barbatelle ottenute su substrato contaminato, per la specie *Atriplex halimus*, possono essere confrontati con un unico studio attualmente presente nella letteratura di settore, condotto da Mancilla-Leytón *et al.* (2016) su substrato di perlite contaminato con soluzioni a diversa concentrazione di Cu.

I risultati ottenuti nella presente sperimentazione discordano da quanto ottenuto da Mancilla-Leytón *et al.*, (2016) che, in assenza o a moderata concentrazione di contaminante (Cu) hanno raggiunto una sopravvivenza del 100 %, mentre a maggiore concentrazione di contaminante la sopravvivenza si è ridotta al 60%.

Da quanto esposto, emerge che la specie ha mostrato la capacità di propagarsi su substrati contaminati da metalli mediante radicazione di talee, come già osservato da Mancilla-Leytón *et al.*, (2016) per *Atriplex halimus* e da Andrades Moreno *et al.*, 2013 per la specie *Halimione portulacoides*.

Per quanto riguarda la presenza di ammendanti, nell'intervallo di tempo studiato, la loro presenza non ha apportato un miglioramento nella sopravvivenza di barbatelle di *Atriplex halimus*.

4.2.4 ACCRESCIMENTI E BIOMASSA

Al fine di valutare la capacità della specie *Atriplex halimus* di radicare e crescere sui substrati contaminati sperimentali, al termine della sperimentazione è stata valutata la qualità della radicazione e della germogliazione ed è stato rilevato l'accrescimento della parte aerea e radicale.

Come descritto in precedenza, si è voluto migliorare la fertilità del substrato contaminato con l'aggiunta di ammendanti e a tale scopo è stato studiato se la presenza di ammendante potesse favorire la radicazione e lo sviluppo di biomassa aerea.

Per quanto riguarda la qualità della radicazione e della germogliazione, la valutazione è stata ottenuta mediante l'attribuzione di un punteggio secondo i parametri indicati nel capitolo 3 (paragrafo 3.4). I punteggi medi attribuiti alla radicazione e alla germogliazione sono mostrati in Tabella 4.8. Qualità della radicazione e della germogliazione, in una scala di valori compresi tra 0 e 5.

Tabella 4.8. Qualità della radicazione e della germogliazione, in una scala di valori compresi tra 0 e 5.

	Substrati			
	B	CP	CP+I	CP+A
Punteggio medio di Radicazione	2,8 ±0,4	1,6±0,5	1,0±0,0	2,8±0,4
Punteggio medio di germogliamento	5,0±0,0	2,8±0,8	1,4±0,5	3,0±0,7

La miglior qualità della germogliazione è stata osservata nelle talee radicate sul substrato non contaminato (B) e a seguire su quello ammendato con compost (CP+A). Analogamente, per quanto riguarda la radicazione, i migliori risultati qualitativi, sono stati ottenuti nei substrati B e CP+A. Inoltre, dai dati di radicazione e germogliazione non emerge alcuna correlazione significativa tra la qualità delle radici e quella dei germogli.

La crescita della parte aerea è stata quantificata attraverso il rilievo del peso dei germogli e la crescita dell'apparato radicale è stata quantificata attraverso il peso delle radici.

Si ricorda che si è trattato di piante che hanno emesso i nuovi tessuti radicali e fogliari a partire da fusti lignificati, ovvero le talee, prive di biomassa verde. Per questo motivo si è ritenuto avesse particolare importanza valutare l'emissione di nuovi tessuti a partire dai fusti iniziali e valutare quindi separatamente i germogli e i fusti. Analoga attenzione è stata dedicata alle nuove radici emesse, che sono state separate dalla sezione di fusto ipogea.

Le talee sono state prelevate da una stessa pianta (per cui erano geneticamente identiche), avevano la stessa lunghezza ed erano tutte di tipo legnoso basale, per garantire buona capacità di radicazione in accordo con Accardo Palumbo *et al.* (2004). La loro variabilità principale era dettata dunque dalla biomassa.

In Figura 4.11 si può osservare il peso dei fusti a fine sperimentazione.

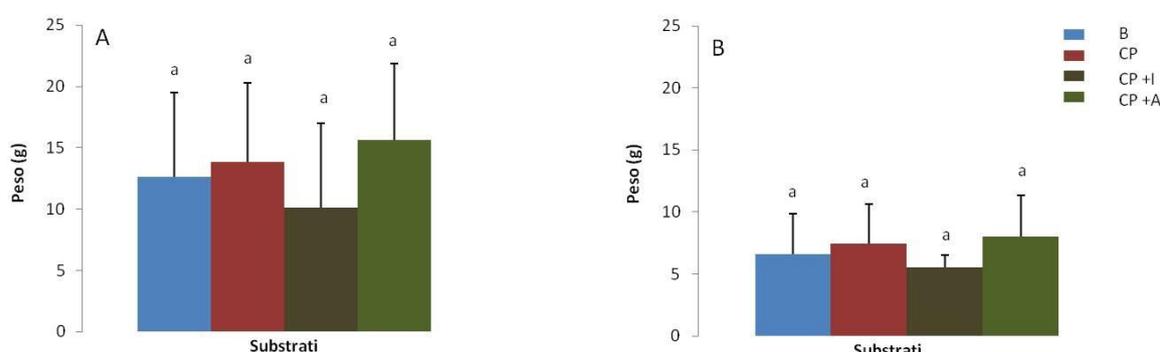


Figura 4.11. Biomassa dei fusti in termini di peso fresco (A) e peso secco (B) in relazione ai diversi substrati, a fine sperimentazione. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative.

Dall'analisi statistica è risultato che i fusti, suddivisi per substrato, non presentano differenze significative fra loro in termini di biomassa, sia fresca che secca.

Si è voluto comprendere inoltre se la biomassa dei fusti abbia influito sullo sviluppo dei germogli e delle radici. Dall'analisi di correlazione fra i pesi dei fusti, dei germogli e delle radici, non è emersa alcuna correlazione significativa fra la biomassa dei fusti e lo sviluppo dei nuovi tessuti radicali e aerei.

Questa osservazione è in accordo con quanto riportato da Dos Santos Utmazian *et al.* (2007) che, su pioppo e salice testati per fitorisanamento da metalli in coltura idroponica, nel valutare se la dimensione delle talee di origine avesse influenzato lo sviluppo di nuova biomassa, hanno riscontrato che non esiste una relazione fra la biomassa della talea di origine e quella di foglie e germogli. Anche Weih e Nordh (2002), su salice, hanno riscontrato che non esiste una relazione fra la dimensione della talea di origine e la produzione iniziale di biomassa.

Per quanto riguarda la biomassa epigea, in Figura 4.12 è possibile osservare il peso dei germogli al termine della sperimentazione relativamente ai diversi substrati.

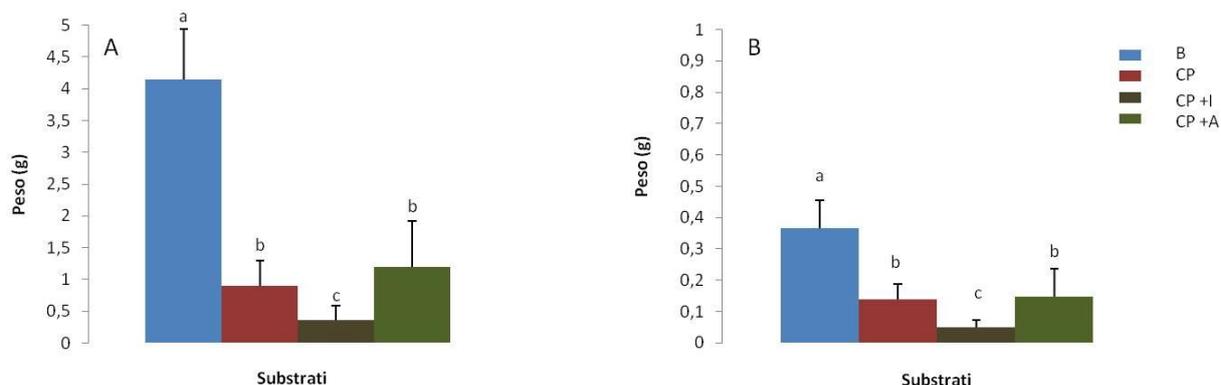


Figura 4.12. Biomassa dei germogli, peso fresco (A) e peso secco (B) in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative.

Relativamente allo sviluppo dei germogli nei diversi substrati, questi hanno mostrato uno stesso comportamento in termini di peso fresco e secco. Confrontando gli accrescimenti fra i substrati, si è potuto osservare che esistono differenze significative fra le biomasse a seconda del substrato di sviluppo e che quello maggiore è stato riscontrato nelle piante cresciute nel substrato non contaminato. La biomassa verde sviluppata in B, differisce statisticamente da quella sviluppata in ogni altro substrato. In presenza di compost è stato rilevato che lo sviluppo dei germogli è stato simile a quello su substrato di Campo Pisano puro (CP) e maggiore che in presenza di soli ammendanti inerti.

Da quanto esposto sullo sviluppo dei germogli, si possono osservare delle sostanziali differenze fra lo sviluppo avvenuto su substrati contaminati e quello non contaminato in accordo con quanto osservato da Mancilla-Leytón *et al.* (2016). Questi risultati suggeriscono che un'elevata presenza di contaminanti può ridurre lo sviluppo di questi tessuti in accordo con quanto supposto da Mateos-Naranjo *et al.* (2013) e Mancilla-Leytón *et al.* (2016). Tapia *et al.*, (2013), su *Atriplex halimus* e

Andrades Moreno *et al.* (2013) per la specie *Halimione portulacoides*, hanno osservato una maggiore produzione di biomassa aerea nel substrato non contaminato.

Per quanto riguarda i substrati contaminati, l'introduzione di ammendanti non ha indotto aumenti nella produzione di germogli.

Relativamente alla biomassa radicale, in Figura 4.13 è possibile osservare il peso delle radici al termine della sperimentazione in funzione dei diversi substrati.

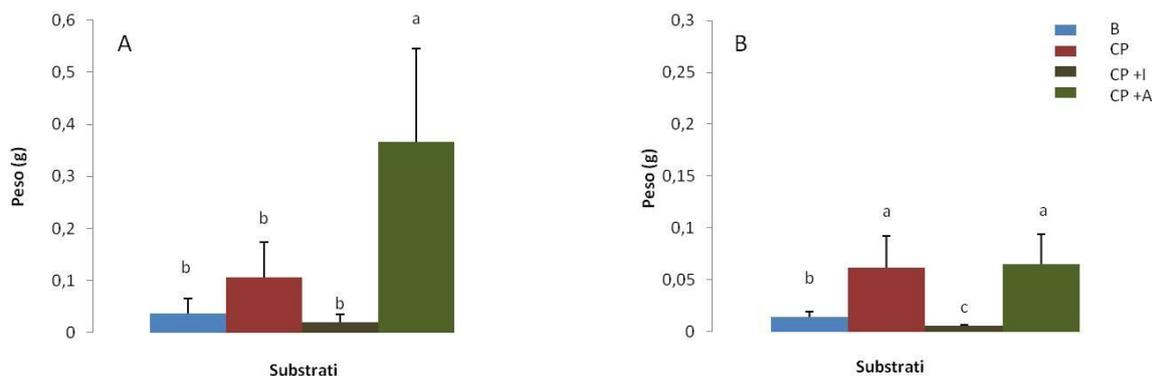


Figura 4.13. Biomassa delle radici, peso fresco (A) e peso secco (B) in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative tra i substrati.

Nello sviluppo della biomassa radicale, a differenza di quanto rilevato per i germogli, si può riscontrare una differenza nell'andamento del peso fresco e del peso secco in funzione dei substrati. Nelle piante cresciute sul substrato CP+A infatti, si è rilevato un peso fresco radicale significativamente maggiore rispetto a quello rilevato per gli altri substrati. Confrontando statisticamente i dati dei pesi secchi ottenuti sui substrati contaminati, si rileva invece che le biomasse delle radici sviluppate in CP+A non sono differenti statisticamente da quelli rilevati in CP e che tale biomassa risulta significativamente maggiore che in B e in CP+I.

Considerato che i pesi freschi delle le radici cresciute in presenza di compost mostrano un peso più elevato che negli altri substrati (fig. 4.12 a), si sono valutati anche i contenuti di umidità dei tessuti radicali riscontrando una differenza significativa fra i substrati CP e CP+C (rispettivamente 70 e 80 % circa). Questa differenza non è stata riscontrata da Martínez-Fernández e Walker (2012) e da Manousaki e Kalogerakis (2009).

Da quanto esposto a proposito dello sviluppo radicale, si può osservare che non vi sono state sostanziali differenze fra lo sviluppo avvenuto su substrati contaminati e quello non contaminato, contrariamente a quanto osservato da Mancilla-Leytón *et al.*, (2016) per la specie *Atriplex halimus* e da Andrades Moreno *et al.* (2013) per la specie *Halimione portulacoides*.

Per quanto riguarda l'introduzione di ammendanti, la presenza di solo materiale inerte non ha indotto miglioramenti nella produzione di radici, mentre in presenza di compost è stato riscontrato un maggiore peso fresco radicale.

In diversi studi, effettuati su piante di età maggiore rispetto a quelle utilizzate nella presente sperimentazione, è emerso un maggiore accrescimento delle piante indotto dagli ammendanti organici (Pérez-Esteban *et al.*, 2013; Frutos *et al.*, 2017; Clemente *et al.*, 2012).

Dai risultati relativi alla biomassa sopra esposti si può osservare che vi è stato un sviluppo di germogli e radici nelle talee impiantate. L'accrescimento osservato durante la sperimentazione è da ritenersi importante in quanto è un indice della capacità della specie di emettere ed accrescere nuovi tessuti, quindi a propagarsi per talea, anche su substrati contaminati.

I risultati ottenuti mostrano inoltre che l'introduzione di ammendanti non ha indotto aumenti nella produzione di germogli mentre nelle radici, in presenza di compost, è stato riscontrato un maggiore peso fresco e un maggiore contenuto idrico. Nonostante in questa sperimentazione la presenza di compost non abbia indotto miglioramenti, per applicazioni di durata maggiore si ritiene fondamentale somministrare alle piante i nutrienti di cui è privo il substrato di Campo Pisano.

4.2.5 CLOROFILLA E CAROTENOIDI

Con il fine di indagare sulla tolleranza della specie *Atriplex halimus* ad elevate concentrazioni di metalli nel substrato, è stato valutato il contenuto di pigmenti fotosintetici.

L'analisi dei pigmenti fotosintetici presenti nelle foglie, è stata realizzata su ogni gruppo di piante, confrontando fra loro i risultati ottenuti nei substrati di accrescimento.

A tal fine è stato valutato il contenuto dei singoli tipi di clorofilla, ovvero clorofilla a (C_a) e clorofilla b (C_b) e il contenuto di clorofille totali, che corrisponde alla somma della clorofilla a con la clorofilla b (C_{a+b}). In Figura 4.14 vengono riportati i dati relativi al contenuto di pigmenti fotosintetici.

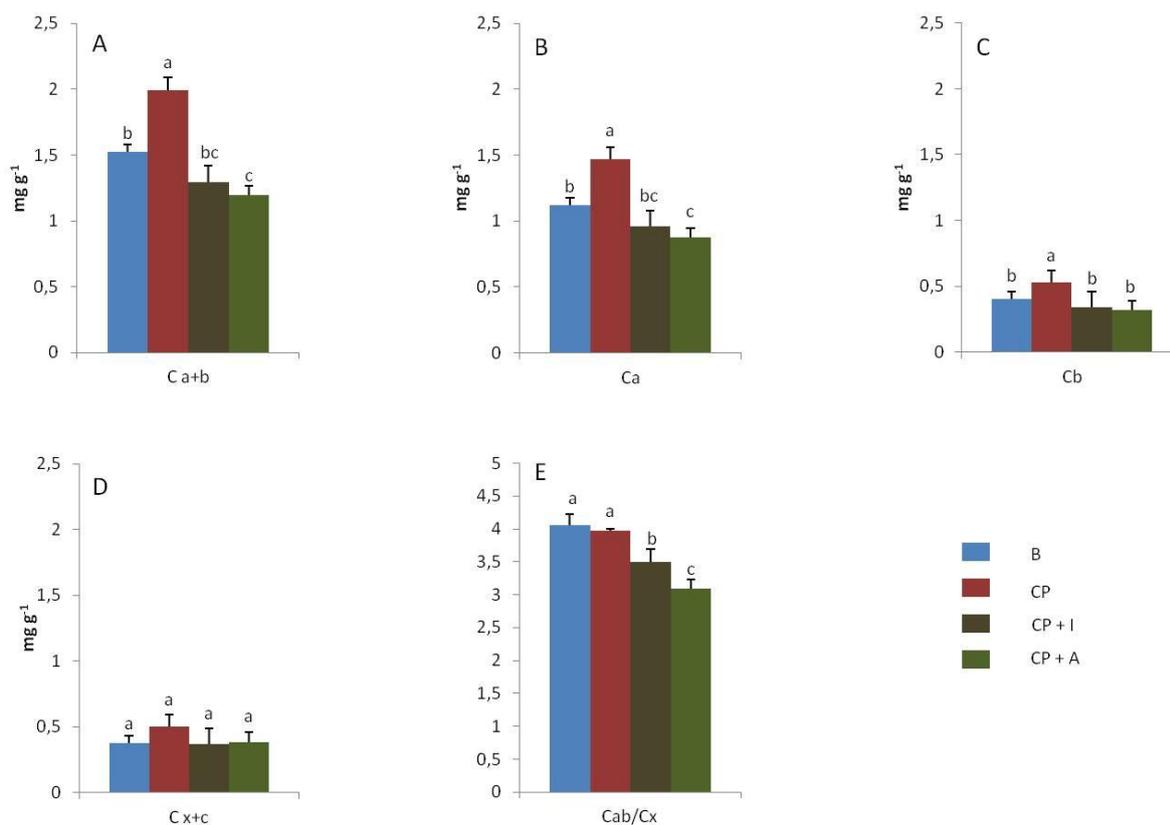


Figura 4.14. Contenuti di clorofille totali (A), clorofilla a (B), clorofilla b (C), carotenoidi (D) e rapporto fra contenuti in clorofille e carotenoidi (E), in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Per ogni parametro, lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statistiche non significative tra i substrati.

Dal confronto del contenuto totale di clorofille (C_{a+b}), si nota che i valori sono diversi a seconda del substrato e che il contenuto maggiore è stato riscontrato in CP. Se si osserva più in dettaglio quanto avvenuto per ciascun tipo di clorofilla C_a e C_b , si evidenzia un andamento analogo a quello riscontrato per i contenuti totali, con valori massimi in corrispondenza del substrato CP.

Un'altra analisi sui pigmenti è stata realizzata per valutare il contenuto di caroteni e xantofille (C_{x+c}), chiamati anche carotenoidi. Mentre un elevato contenuto in clorofille serve, in linea generale, ad indicare lo stato di benessere della pianta, elevate concentrazioni di caroteni e xantofille possono indicare la presenza di processi di stress. Anche un basso valore del rapporto fra il contenuto di clorofilla e quello di caroteni e xantofille (C_{a+b}/C_{x+c}) può risultare particolarmente indicativo nella valutazione di stati di stress.

Nelle piante osservate in questa sperimentazione si può notare che il contenuto di caroteni e xantofille è pari circa ad un quarto di quello delle clorofille e non presenta differenze significative indotte dai substrati (Figura 4.14-D).

L'assenza di differenze significative nei valori di C_{a+b}/C_{x+c} per piante cresciute sui substrati B e CP è indice che le piante non hanno evidenziato segni di stress dovuti alla presenza dell'alta concentrazione dei metalli.

I dati fin qui analizzati hanno permesso di rilevare che il substrato CP era quello in cui le foglie sviluppavano i maggiori contenuti di pigmento verdi mentre per quanto riguarda il contenuto di carotenoidi non esistono differenze fra i substrati.

Il picco nella concentrazione di clorofilla nelle piante cresciute in CP è in linea con quanto trovato da Tapia *et al.*, (2013), che su piante di *Atriplex halimus*, hanno riscontrato contenuti di clorofilla più elevati laddove il substrato era contaminato da As. Le ragioni di tale fenomeno non sono ancora note. Secondo i suddetti autori, in alcune piante la clorofilla non sarebbe un buon indicatore nel riflettere lo stato di stress da esposizione ad As e specialmente in quelle appartenenti al genere *Atriplex*, principalmente a causa del loro carattere alofilo e del metabolismo fotosintetico di tipo C4.

Precedenti studi sulla specie *Atriplex halimus*, mostrano che in coltura idroponica è stata osservata una riduzione nel contenuto di C_a e C_b all'aumentare della concentrazione di metalli nella soluzione (Lotmani e Mesnoua (2011), Nedjimi e Daoud (2009)), mentre su substrato contaminato da Cd e Pb, Manousaki e Kalogerakis (2009), non hanno riscontrato nessun effetto dovuto ai metalli.

In piante ottenute da talea su substrato contaminato da Cu, Mancilla Leytón *et al.* (2016), non hanno rilevato alcuna differenza nel contenuto di pigmenti fotosintetici all'aumentare della concentrazione di metallo nel substrato, benché abbiano rilevato una riduzione dell'efficienza fotosintetica.

Il risultato ottenuto nella presente sperimentazione, come nel caso di Mancilla Leytón *et al.* (2016) sopra citato, potrebbe supportare l'ipotesi che, in questa fase di sviluppo, le elevate concentrazioni di metalli non hanno causato effetti drastici nell'apparato fotosintetico delle piante. Le stesse infatti, come anche evidenziato dall'analisi dell'indicatore C_{a+b}/C_{x+c} , non hanno mostrato segni particolari di stress attribuibili alle alte concentrazioni dei metalli.

4.2.6 ACCUMULO DI METALLI

Al fine di valutare la capacità di accumulo di metalli delle piante di *Atriplex halimus*, propagate mediante talea su substrati con alte concentrazioni di metalli, al termine della sperimentazione è stato analizzato il contenuto di Cd, Pb, Zn presente nei tessuti.

Le analisi sono state realizzate separatamente nei germogli e nei tessuti legnosi.

Le radici, sviluppatesi durante il periodo di radicazione delle talee, sono state escluse dall'analisi. L'insieme delle radici infatti, in ogni gruppo, non ha raggiunto la quantità sufficiente necessaria al procedimento analitico. Si è inoltre valutato che, le parti sotterranee del fusto, dal punto di vista fisiologico non potessero ancora includersi nei tessuti radicali. Si è ritenuto infatti che la dimensione del fusto sotterraneo fosse elevata rispetto ai tessuti radicali veri e propri e questa sproporzione avrebbe viziato il risultato.

Le concentrazioni medie di Zn rilevate nella parte aerea delle piante a fine sperimentazione e in funzione dei diversi substrati, sono rappresentate in Figura 4.15.

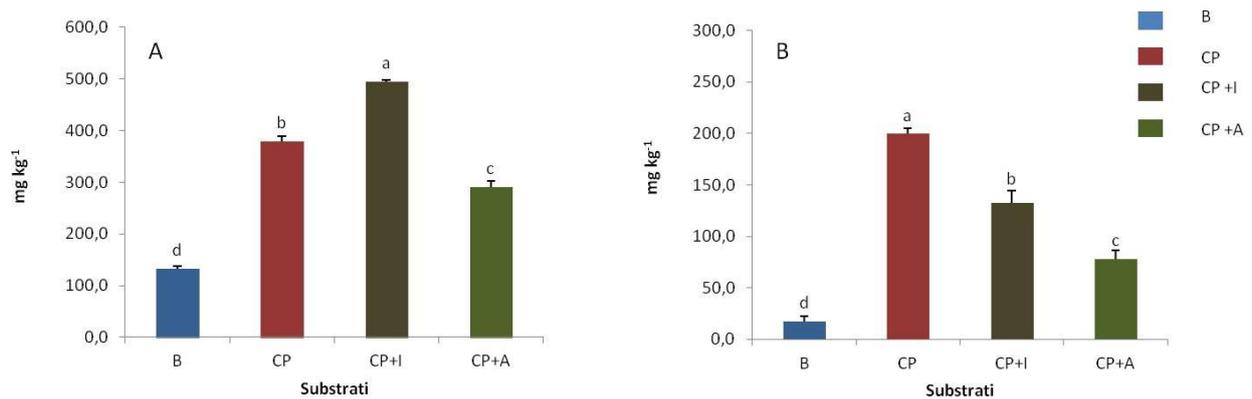


Figura 4.15. Concentrazione di Zn nei germogli (A) e nei fusti (B), valori medi riscontrati nei diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze non significative all'interno dello stesso tessuto.

Fra i diversi metalli analizzati lo Zn è stato quello maggiormente assorbito. Per ogni substrato le concentrazioni di questo elemento, sono risultate superiori nei tessuti verdi rispetto a quelli legnosi. Nei tessuti verdi sono state rilevate differenze significative tra concentrazioni di Zn, relative ai diversi substrati. La concentrazione di Zn più elevata, pari a 495,4 mg kg⁻¹, è stata riscontrata nei germogli delle piante cresciute sul substrato CP+I. Negli altri substrati sono state rilevate concentrazioni di Zn seguenti 379,7; 291,2 e 132,6 mg kg⁻¹ rispettivamente in CP, CP+A, B.

Anche nei fusti, le concentrazioni di Zn sono significativamente differenti fra tutti i substrati. In questi tessuti, la concentrazione di Zn più elevata, pari a 199,8 mg kg⁻¹, è stata osservata nel substrato contaminato puro (CP). Negli altri substrati, le concentrazioni medie sono state le seguenti: 132,5; 78,2; 17,4 mg kg⁻¹, rispettivamente in CP+I, CP+A, B.

Le concentrazioni medie di Pb rilevate nella parte aerea delle piante a fine sperimentazione e in funzione dei diversi substrati, sono rappresentate in Figura 4.16.

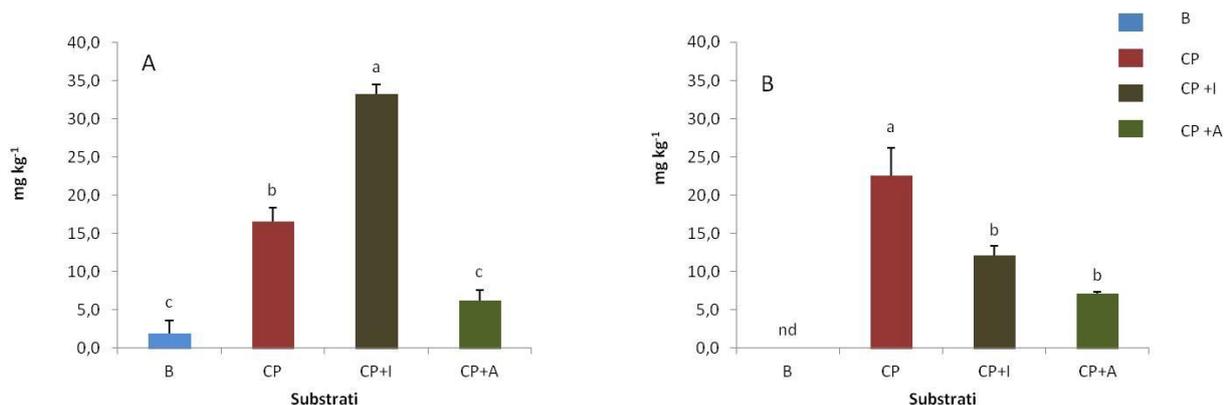


Figura 4.16. Concentrazione di Pb nei germogli (A) e nei fusti (B), valori medi riscontrati nei diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze non significative all'interno dello stesso tessuto.

Le concentrazioni di Pb riscontrate nei tessuti, per i diversi substrati, mostrato un andamento analogo a quello osservato per lo Zn, con la differenza che, nel caso del piombo, le concentrazioni riscontrate nei fusti sono dello stesso ordine di grandezza.

Nei tessuti verdi, le uniche concentrazioni di Pb che non mostrano differenze significative sono quelle rilevate nei substrati B e CP+A. La concentrazione più elevata di Pb ($33,2 \text{ mg kg}^{-1}$) è stata rilevata nei germogli delle piante cresciute sul substrato contaminato ammendato con inerti (CP+I). Questo valore è dell'ordine di 10 volte inferiore di quello più basso osservato per lo Zn su substrato contaminato. Negli altri substrati, le concentrazioni medie sono state le seguenti: 16,6; 6,2; 1,9 mg kg^{-1} , rispettivamente in CP, CP +A e B.

Nei fusti le uniche concentrazioni di Pb che non mostrano differenze significative sono quelle rilevate nei substrati CP+I e CP+A. In questi tessuti, la concentrazione di Pb più elevata, pari a $22,5 \text{ mg kg}^{-1}$, è stata osservata nel substrato contaminato puro (CP). Negli altri substrati, le concentrazioni medie sono state le seguenti: 12,1, e $7,1 \text{ mg kg}^{-1}$, rispettivamente in CP +I e CP +A

Le concentrazioni medie di Cd rilevate nelle piante, nei diversi substrati durante la sperimentazione, sono rappresentate in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**

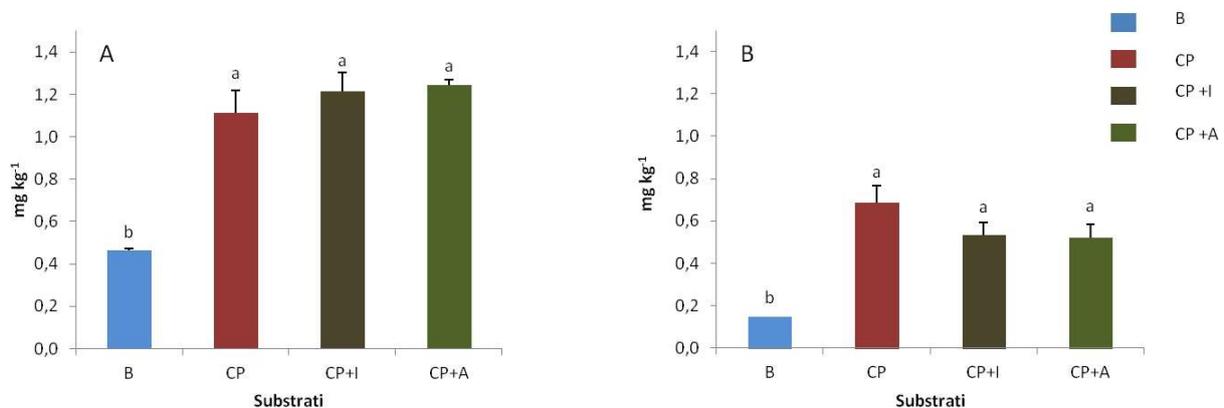


Figura 4.17. Concentrazione di Cd nei germogli (A) e nei fusti (B), valori medi riscontrati nei diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze non significative all'interno dello stesso tessuto.

Le concentrazioni di questo elemento sono risultate molto basse rispetto a quelle osservate per lo Zn e il Pb. Sia nei germogli che nei fusti le concentrazioni di Cd sono risultate maggiori nei substrati contaminati rispetto a quelli non contaminati. Nei fusti non si sono rilevate differenze significative indotte dagli ammendanti. Il contenuto di Cd rilevato nei germogli ($1,1-1,2 \text{ mg kg}^{-1}$) è stato maggiore (circa il doppio) di quello rilevato nei fusti ($0,5-0,7 \text{ mg kg}^{-1}$).

Da quanto emerso dall'analisi dei dati sopra esposti le piante hanno mostrato una particolare predisposizione nell'accumulare Zn rispetto a Pb e a Cd.

I risultati riguardanti il contenuto di metalli nei tessuti non trovano attualmente un riscontro bibliografico per mancanza di studi analoghi nella letteratura di settore, relativi a barbatelle della specie *Atriplex halimus* ottenute da talee impiantate su substrato contaminato.

All'interno del genere *Atriplex*, per la specie *Atriplex portulacoides*, Andrades Moreno *et al.* (2013), hanno rilevato il contenuto di metalli presente in barbatelle di talee radicate su substrato contaminato (dopo 120 giorni), rilevando concentrazioni di Zn, Pb inferiori a quelle ottenute nel presente lavoro. Concordemente a quanto osservato dallo stesso autore, nel presente lavoro è stato rilevato un maggiore assorbimento di Zn nei germogli rispetto ai fusti, mentre per il Pb non sono state riscontrate differenze fra i tessuti.

I valori di metalli riscontrati nel presente lavoro sono dello stesso ordine di grandezza di quelli osservati da diversi autori sulla specie *Atriplex halimus* coltivata su substrati sperimentali contaminati, con metodi differenti rispetto alla presente sperimentazione (Martínez - Fernández e Walker, 2012; Pérez - Esteban *et al.*, 2013; Manousaki e Kalogerakis, 2009; Frutos *et al.*, 2017). L'introduzione degli ammendanti ha avuto diversi effetti nell'assorbimento dei metalli sui suoli contaminati; in Figura 4.18 sono rappresentate le concentrazioni di Zn, Pb e Cd riscontrate nei fusti e nei germogli, nei diversi substrati.

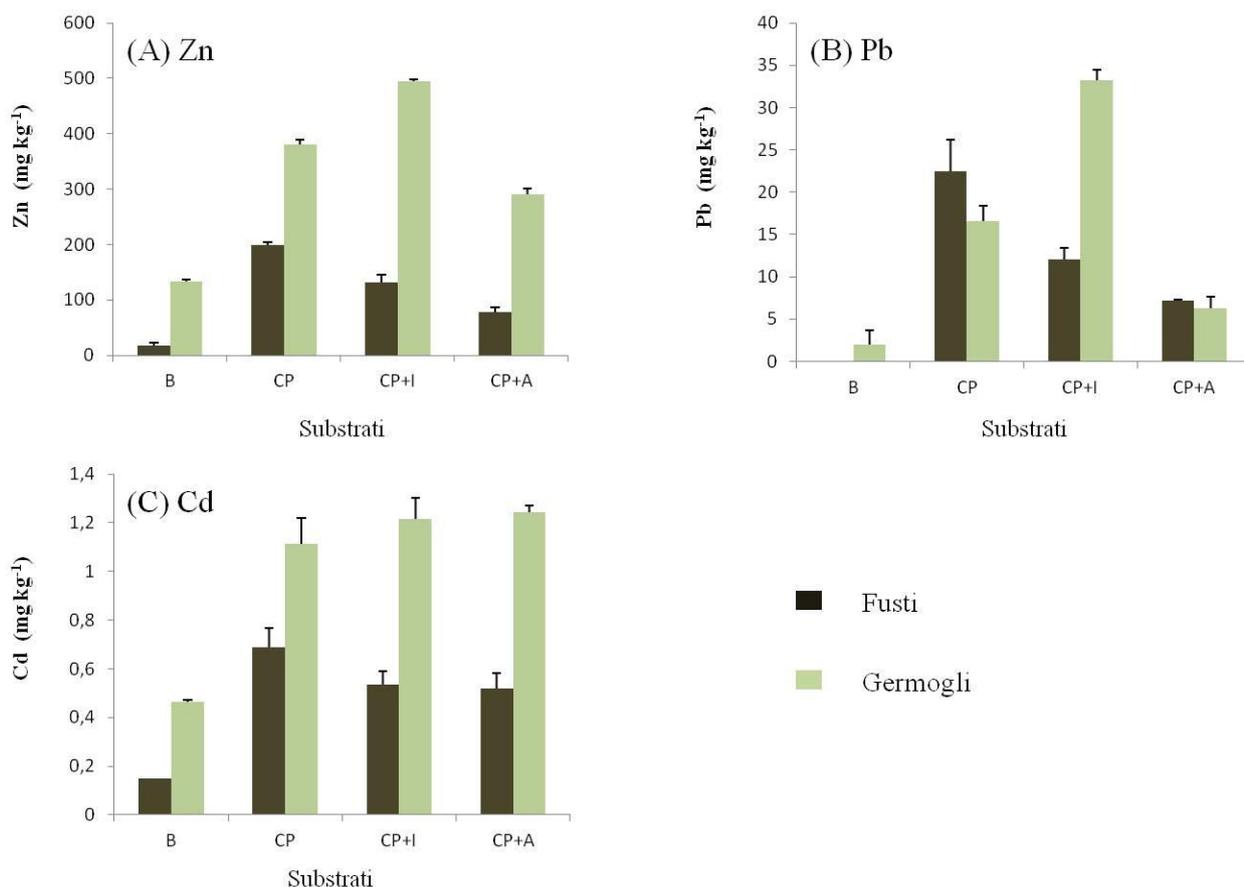


Figura 4.18. Concentrazioni di Zn (A), Pb (B) e Cd (C) riscontrate nei fusti e nei germogli, valori medi riscontrati nei diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media.

Relativamente a Zn e Pb, nei tessuti verdi, si è osservato un assorbimento maggiore in presenza di ammendante inerte (CP+I). Secondo tale osservazione dunque, per tali metalli, vi è stata una maggiore traslocazione nei nuovi tessuti in presenza di ammendante inerte mentre risulta ridotta quando il substrato è stato ammendato con compost.

Nei fusti invece le concentrazioni maggiori sono state rilevate in assenza di ammendanti (CP).

Tale osservazione si discosta da quanto riscontrato da Martínez - Fernández e Walker (2012) che non hanno riscontrato variazioni significative nella concentrazione dei metalli nei tessuti aerei di *Atriplex halimus* indotte dall'introduzione di ammendanti inerti e organici.

Nel caso del Cd, l'introduzione di ammendante non ha apportato alcuna variazione rispetto al substrato contaminato puro, né in fusti né in germogli in accordo con Martínez - Fernández e Walker (2012) e Clemente *et al.* (2012)

4.2.7 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questo studio permettono di affermare che la specie *Atriplex halimus* è capace di propagarsi mediante la coltivazione diretta di talee su substrato minerario contaminato da un'elevata concentrazione di metalli.

Su tali substrati, la specie ha mostrato buona capacità di insediamento dando origine a piante in grado di vegetare senza mostrare segni dovuti alla fitotossicità del substrato. Lo sviluppo di germogli e di radici nelle talee impiantate ha indicato la discreta capacità della specie ad emettere ed accrescere nuovi tessuti. La specie ha inoltre mostrato un'elevata capacità di traslocare metalli nei tessuti aerei.

L'introduzione di ammendanti, nella fase di sviluppo analizzata, non ha avuto influenza sullo sviluppo della biomassa se non nell'incremento del contenuto idrico delle radici in presenza di compost.

L'introduzione di ammendanti ha influenzato la traslocazione dei metalli. Nei tessuti verdi si è osservato un maggiore assorbimento di Zn e Pb in presenza di ammendante inerte (CP+I), mentre nei fusti è stato maggiore in assenza di ammendanti.

Per comprendere la potenzialità di *Atriplex halimus* in attività di fitorisanamento, mediante impianto per talea, sarebbero auspicabili ulteriori studi in condizioni di campo, monitorando i parametri di biomassa e accumulo di metalli nei tessuti per periodi di tempo superiori a quelli utilizzati negli studi attualmente realizzati.

4.3 A3 - Studio dell'adattamento di giovani piante della specie *Atriplex halimus* su substrato contaminato da metalli pesanti per il loro uso in fitorisanamento

4.3.1 INTRODUZIONE

4.3.1.1 OBIETTIVI

L'obiettivo principale di questa sperimentazione è stato valutare la possibilità di far crescere giovani piante di *Atriplex halimus* (barbatelle), su suolo contaminato da un'elevata concentrazione di metalli, eliminando la fase di accrescimento intermedio in vivaio e poter così ridurre i costi relativi a questa prima fase di produzione.

A tale scopo, piante di *Atriplex halimus* sono state ottenute con un processo di taleggio e, una volta prodotte le barbatelle, queste sono state immediatamente disposte su substrato contaminato, senza che attraversassero una fase intermedia di accrescimento e adattamento in vivaio.

Sotto tale aspetto la sperimentazione differisce notevolmente da quanto realizzato più frequentemente nelle sperimentazioni in fitorisanamento con la specie *Atriplex halimus*, dove le piante vengono generate da seme.

Al fine di valutare la capacità di insediamento della specie, impiantata sotto forma di barbatella, per le attività di fitorisanamento, sulle piante sono stati valutati la sopravvivenza, l'adattamento, la produzione di biomassa e l'accumulo di metalli nei tessuti.

Un altro obiettivo di questa sperimentazione è stato studiare se, nella prima fase di sviluppo delle piante, l'introduzione di ammendanti potesse migliorare la performance della specie in ambito di fitorisanamento. A tale scopo la matrice mineraria contaminata è stata ammendata ed è stata valutata l'influenza degli ammendanti sulla sopravvivenza, sullo sviluppo della biomassa e sull'accumulo di metalli nei tessuti.

4.3.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

La sperimentazione è stata suddivisa in due fasi di lavoro distinte: una prima fase durante la quale sono state create giovani piantine (barbatelle) e una seconda fase di accrescimento sui substrati sperimentali.

Nella prima fase, le piante di *Atriplex halimus* sono state create mediante un processo di taleggio in idonee condizioni produttive (impianto di radicazione).

Nella seconda fase, le giovani piante (barbatelle) di 2 mesi di età, ottenute dalla prima fase sperimentale, sono state testate su suolo contaminato puro (CP) e ammendato (CP+A) e la risposta delle piante è stata confrontata con quella ottenuta su substrato non contaminato (B).

Il contenuto dei vasi per i substrati B, CP e CP+A, presenta le stesse caratteristiche dei substrati corrispondenti nella sperimentazione A2, sia per quanto riguarda la tipologia, sia per quanto riguarda i quantitativi.

In ogni vaso, contenente 27 L di substrato, sono state messe a dimora 20 barbatelle.

Le piante hanno vegetato sui substrati B, CP, CP+A durante 3 mesi. In questo periodo il materiale vegetale è stato prelevato a distanza di 30-60-90 giorni dall'impianto (t_{30} , t_{60} , t_{90}).

Ad ogni campionamento è stata valutata la sopravvivenza e, da ogni substrato sono state sacrificate 2-3 piante ai fini delle valutazioni. Su questi campioni sono stati valutati, lo sviluppo della biomassa aerea e radicale e la concentrazione di Cd, Pb e Zn nei tessuti. Relativamente al contenuto di metalli nelle piante, è stata stabilita anche la condizione "zero" delle piante, sottoponendo ad analisi un campione del materiale vegetale che è stato utilizzato per il taleggio.

4.3.2 CARATTERISTICHE DEI SUBSTRATI

I substrati nella sperimentazione corrispondono a B, CP e CP+A utilizzati nella sperimentazione A2. Le caratteristiche chimico fisiche sono pertanto le stesse descritte per la sperimentazione A2 e per i dettagli si rimanda ad essa.

4.3.3 ADATTAMENTO E SOPRAVVIVENZA

Durante il periodo sperimentale è stata monitorata la sopravvivenza delle piante ed è stato tenuto sotto controllo visivo lo stato sanitario. Lo scopo di queste osservazioni era in primo luogo verificare se le barbatelle/piante erano in grado di sopravvivere sui substrati contaminati e come questi influissero sul loro stato sanitario. Si è anche monitorato come i substrati influissero sulla sopravvivenza e sullo stato sanitario delle piante.

Con il rilievo della sopravvivenza sono state registrate perdite fino ai primi 30 giorni della sperimentazione (t_{30}) e dopo questo momento non è stata osservata nessuna ulteriore perdita, salvo i sacrifici per i 3 campionamenti.

La sopravvivenza è risultata massima tra le piante cresciute nel substrato contaminato puro, CP, (45%) e minima nel substrato non contaminato, B, (25%). La sopravvivenza rilevata nel substrato contaminato ammendato, CP+A (40%), può dirsi simile a quella rilevata in CP.

La bassa sopravvivenza riscontrata per tutti i substrati, potrebbe essere stata condizionata dalla presenza di larve d'insetti dannosi per le piante, unitamente alle difficili condizioni climatiche riscontrate nei primi 30 giorni della sperimentazione.

I primi 30 giorni di sperimentazione infatti, si sono tenuti nel mese di agosto, fra i più caldi per le nostre latitudini e data l'elevata temperatura dell'aria è stato necessario intervenire con abbondanti irrigazioni ed ombreggiando la serra. Queste condizioni, con ogni probabilità, hanno favorito la proliferazione di larve di ditteri della famiglia degli sciaridi.

La presenza di questi insetti fitofagi è stata rilevata anche nella sperimentazione A2 ed è stata descritta nel paragrafo 4.3.3.

Per combattere la presenza delle larve sono stati necessari diversi interventi con prodotti fitosanitari. Sulle talee in radicazione e a distanza di 3 giorni dal trapianto, è stato effettuato un trattamento a base di Clorpirifos. Dopo 2 settimane dal trapianto, all'osservarsi di elevata mortalità delle piante, è stato effettuato un trattamento a base di Imidacloprid. All'osservarsi di ulteriori attacchi si è infine

distribuita una soluzione a base di Thiamethoxam. In seguito all'ultimo trattamento il numero di piante è rimasto costante.

Relativamente alla sopravvivenza, la presenza di ammendanti nei substrati contaminati non ha apportato alcun miglioramento. I risultati ottenuti nella presente sperimentazione, con ogni probabilità a causa degli attacchi parassitari, sono bassi se confrontati con quelli ottenuti in diverse sperimentazioni con la specie *Atriplex halimus*:

Clemente *et al.* (2012), in una sperimentazione realizzata in campo, con giovani piante di *Atriplex halimus*, ottenute da seme, ad un anno dal trapianto su suolo minerario hanno riscontrato una sopravvivenza compresa tra 79 - 89 % in presenza di ammendante organico (compost e reflui suinicoli, rispettivamente) e del 59% in presenza di ammendante inorganico Ca (OH)₂.

Martínez Fernández e Walker (2012), in una sperimentazione realizzata in vaso, con giovani piante di *Atriplex halimus* (previamente accresciutesi su perlite per 60 giorni, dopo l'emergenza dal seme), a 30 giorni dal trapianto hanno riscontrato una sopravvivenza del 90 - 100 %, anche in presenza di elevate concentrazioni di metalli. Questi autori, hanno testato la specie sia su substrati non contaminati che su substrati minerari, tal quali o in presenza di ammendanti (compost, reflui da allevamento suino, residui oleari solidi, materiale inorganico a base di ossidi di Ca e Mg), senza che questi avessero significativa influenza sulla sopravvivenza.

Relativamente allo stato sanitario delle piante, fino a 60 giorni dal trapianto, il controllo visivo non ha evidenziato segnali di stress, quali clorosi o fenomeni di senescenza. Al termine della sperimentazione (t₉₀), è stata osservata clorosi fogliare sulle piante presenti nel substrato non contaminato (B) e in quello contaminato non ammendato (CP). Tale effetto, non riscontrato sul substrato ammendato con materiale organico, è probabilmente dovuto a carenze nutritive.

Nella presente sperimentazione le piante non hanno mostrato effetti visibili dovuti alla tossicità del substrato.

I risultati ottenuti sono in linea con quelli riportati da Frutos *et al.* (2017) che, dopo 90 giorni dal trapianto di giovani piante di *Atriplex halimus* su substrato minerario, hanno riscontrato fenomeni di clorosi e di senescenza nelle piante cresciute su substrato non ammendato non osservati su quelle cresciute in presenza di ammendante organico (compost da residui di funghicoltura).

4.3.4 ACCRESCIMENTI E BIOMASSA

Al fine di valutare la capacità della specie *Atriplex halimus* a crescere sui substrati contaminati sperimentali, è stato studiato l'accrescimento della parte aerea e radicale.

La crescita della parte aerea e dell'apparato radicale sono state quantificate attraverso il peso dei germogli e delle radici rispettivamente, separandole dalla parte lignificata (fusti).

Come descritto in precedenza, si è voluto migliorare la fertilità del substrato contaminato con l'aggiunta di ammendanti e, a tale scopo è stato studiato se la presenza di ammendante potesse favorire lo sviluppo della biomassa aerea e di quella radicale.

In Figura 4.19 è possibile osservare il peso medio dei germogli e delle radici, per ogni substrato, relativo ai diversi campionamenti.

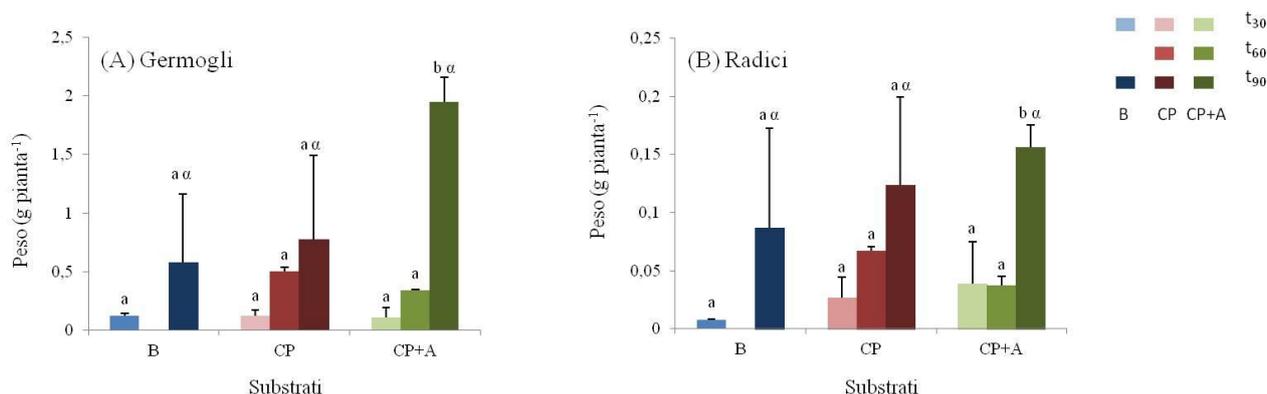


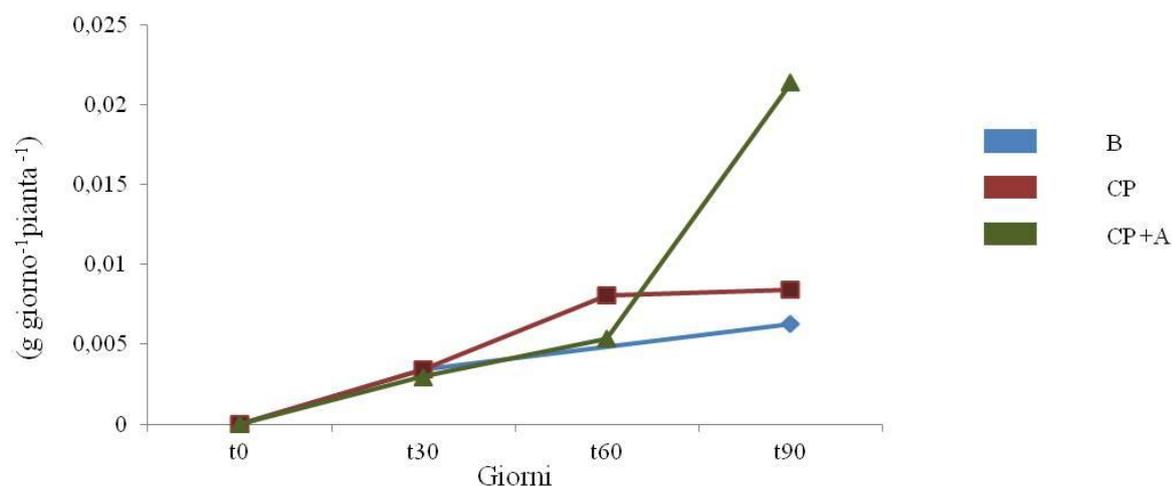
Figura 4.19. Biomassa dei germogli (A) e delle radici (B),: valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati al termine della sperimentazione (t_{90}).

L'assenza di campionamento a 60 giorni dal trapianto per il substrato B è dovuta alla bassa sopravvivenza delle piante (soli 5 esemplari totali), le cui ragioni sono state discusse nel paragrafo 4.3.3. Per questo substrato si è scelto di ridurre il numero di campionamenti a due: uno iniziale a t_{30} con 2 esemplari sacrificati e uno finale a t_{90} con 3 esemplari sacrificati.

Relativamente alla biomassa, sia dei germogli che delle radici, si osserva che vi è stata una crescita nel tempo. Tale crescita, osservabile da un punto di vista qualitativo nei substrati B e CP, diventa statisticamente significativa, a fine sperimentazione, nel substrato contaminato ammendato (CP+A). In tale substrato infatti, dopo 90 giorni di sperimentazione (t_{90}) vi è stato un incremento significativo della biomassa dei germogli e delle radici, rispetto ai campionamenti precedenti (t_{30} e t_{60}).

A fine sperimentazione è stato osservato che la presenza di ammendante non ha indotto differenze statisticamente significative nella biomassa aerea e radicale. Si può comunque osservare che da un punto di vista qualitativo, il substrato CP+A, nella fase finale della sperimentazione, ha favorito lo sviluppo dei tessuti. Tale effetto risulta particolarmente evidente se si osserva il grafico in Figura 4.20 (A), che rappresenta l'accrescimento medio giornaliero dei germogli in funzione del tempo, per i diversi substrati e dalla foto delle piante riportata in Figura 4.20 (B).

(A) Accrescimento germogli



(B)



Figura 4.20. A) Biomassa dei germogli: accrescimento medio giornaliero in funzione del tempo, in relazione ai diversi substrati. B) immagine delle piante, in ciascun substrato alla fine della sperimentazione (t_{90}).

Da quanto esposto sullo sviluppo dei germogli, si può osservare che, fino a 60 giorni dal trapianto non esistono sostanziali differenze fra i quantitativi di biomassa cresciuta sul substrato contaminato (CP), quello non contaminato (B) e quello contaminato ammendato (CP+A). Solo a 90 giorni dal trapianto, da un punto di vista qualitativo, si osserva una maggiore crescita delle piante sul substrato CP+A.

Tale andamento può dirsi in accordo con quanto osservato da Tapia *et al.* (2011) che, a 70 giorni dal trapianto di giovani piante di *Atriplex halimus*, su substrato contaminato da Cd, non hanno riscontrato differenze significative nella biomassa di piante allevate su un substrato contaminato, rispetto a quelle allevate su un substrato di controllo non contaminato.

Allo stesso tempo, se si fa riferimento ai soli substrati contaminati e alla sola biomassa aerea, a differenza di quanto osservato da Martínez Fernández e Walker (2012), benché dal punto di vista qualitativo si sia rilevato un maggiore accrescimento delle piante in presenza di ammendante (CP+A), non è stato possibile mettere in evidenza differenze significative nella produzione di biomassa, rispetto al substrato non ammendato (CP).

Anche nella sperimentazione realizzata da Pérez Esteban *et al.* (2013), a un anno dal trapianto di giovani piante di *Atriplex halimus* su substrati minerari ammendati con diverse tipologie e quantitativi di materiale organico, è stata riscontrata una maggiore produzione di biomassa aerea in presenza di ammendante organico rispetto ai suoli non ammendati.

Nello stesso lavoro Pérez Esteban *et al.* (2013), non hanno rilevato sostanziali differenze tra accrescimento radicale avvenuto in substrati minerari ammendati e non ammendati, in accordo con i risultati ottenuti nella presente sperimentazione.

I risultati relativi all'accrescimento e alla biomassa, possono essere riassunti come di seguito.

Dalle misure del peso della biomassa rilevate a fine della sperimentazione (t90) è stato quantificato un accrescimento significativo delle piante nel substrato contaminato ammendato (CP+A). Da un punto di vista qualitativo, da t₆₀ a t₉₀, le piante cresciute in CP+A hanno mostrato una performance migliore rispetto a quelle cresciute negli altri substrati (CP e B).

Durante l'intera sperimentazione da t₃₀ a t₉₀, non si sono rilevate differenze statisticamente significative né qualitative nell'accrescimento delle piante sviluppatesi su substrato contaminato non ammendato (CP) e in quello di controllo (B).

L'accrescimento dei tessuti verdi e radicali osservato durante la sperimentazione nel substrato contaminato ammendato, è da ritenersi importante in quanto indice di una buona attività vegetativa delle piante. Tale accrescimento è particolarmente evidente solo nella fase finale della sperimentazione, ciò suggerisce che tempi di sperimentazione più lunghi rispetto a quelli utilizzati, sarebbero più idonei a mettere in evidenza gli effetti benefici della presenza dell'ammendante.

4.3.5 ACCUMULO DI METALLI

Al fine di valutare la capacità della specie *Atriplex halimus* a traslocare metalli nei propri tessuti dai substrati contaminati, è stata studiata la concentrazione di metalli nelle piante cresciute sui substrati sperimentali. Si è voluto inoltre verificare se la presenza di ammendanti potesse influire sulla concentrazione di Cd, Pb e Zn nei tessuti vegetali.

L'analisi del contenuto di metalli è stata realizzata separatamente per la parte aerea e quella radicale. Per quest'ultima, il contenuto di metalli è stato valutato solo al termine della sperimentazione (t_{90}), in quanto nei campionamenti precedenti il materiale è risultato insufficiente ad effettuare le analisi.

Relativamente al substrato non contaminato (B), a causa della scarsità di piante sopravvissute alla prima fase dopo il trapianto, si è scelto di non sacrificare nessuna pianta nel campionamento a 60 giorni (t_{60}), al fine di avere un numero di piante sufficiente per il campionamento finale.

Per quanto già esposto nelle parte introduttiva alla sperimentazione, relativa al contenuto di metalli nelle piante, la condizione di "zero" è stata stabilita sottoponendo ad analisi un campione del materiale vegetale utilizzato per il taleggio, ottenuto da piante madri vegetanti nei pressi di punti contaminati dell'area di Santa Gilla (cfr. par. 3.4 - A3).

Dall'analisi realizzata su tale campione, è stata riscontrata la seguente concentrazione di metalli: $25,8 \pm 6,4$ per lo Zn; $1,9 \pm 0,7$ per il Pb, $0,3 \pm 0,03$ per il Cd.

Mediante le analisi realizzate sulle piante durante la fase di accrescimento nei substrati sperimentali, effettuate differenziando la parte epigea da quella ipogea, sono state rilevate le concentrazioni di Zinco, Piombo e Cadmio. Come verrà mostrato più in dettaglio in seguito, i risultati ottenuti mostrano delle elevate concentrazioni per i primi due metalli (Zn e Pb), con i valori maggiori per lo Zn, mentre per quanto riguarda l'ultimo (Cd), si sono rilevati valori più bassi.

In Figura 4.21 è possibile osservare le concentrazioni medie di Zn nelle parti aeree (germogli e fusti), per ogni substrato, relative a diversi campionamenti.

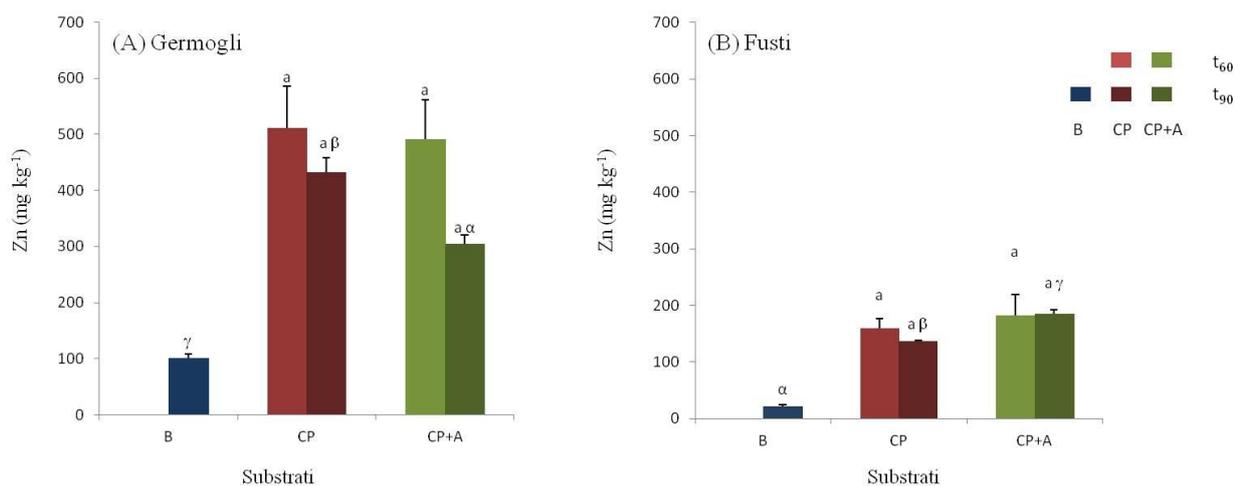


Figura 4.21. Concentrazioni di Zn nei germogli (A) e nei fusti (B): valori medi riscontrati nel tempo (t_{60} e t_{90}) in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati al termine della sperimentazione (t_{90}).

Nei germogli, relativi al campionamento a 60 giorni dal trapianto (t_{60}), (Figura 4.21 A), le concentrazioni di Zn sono risultate simili nei due substrati contaminati. Nei valori trovati, pari a 511 ppm nelle piante cresciute sul substrato CP, e pari a 490 ppm in quelle del substrato CP+A, non si evidenziano infatti differenze significative. Per le ragioni già esposte a inizio paragrafo, nel campionamento a t_{60} , non si sono effettuate misure nelle piante cresciute nel substrato non contaminato (B).

Nei germogli relativi al campionamento a 90 giorni dal trapianto (t_{90}) (Figura 4.21 A), le concentrazioni di Zn sono risultate di poco inferiori, anche se non in maniera significativa, rispetto al campionamento precedente (t_{60}). I valori trovati, pari a 432 ppm in CP, 304 ppm in CP+A e 101 ppm in B, evidenziano l'esistenza di differenze significative fra i diversi substrati.

Nei fusti le concentrazioni di Zn più elevate si sono state riscontrate a fine sperimentazione (t_{90}) (cfr Figura 4.21 B), con il valore massimo nel substrato CP+A. I valori trovati, pari a 185,1 ppm nel substrato CP+A, 136,5 ppm nel substrato CP e a 21,8 ppm nel substrato non contaminato (B), evidenziano l'esistenza di differenze significative fra i diversi substrati.

Nei tessuti aerei i valori più elevati delle concentrazioni medie di Zn sono stati misurati nei germogli. Le concentrazioni massime, riscontrate nei germogli e nei fusti a fine sperimentazione (t_{90}), sono risultate rispettivamente 4 e 8 volte più elevate di quelle rilevate nel substrato di riferimento (B).

L'andamento nel tempo delle concentrazioni medie di Zn riscontrate nei tessuti aerei di CP e CP+A è risultato molto simile.

In Figura 4.22 è possibile osservare le concentrazioni medie di Pb nelle parti aeree (germogli e fusti), per ogni substrato, relative a diversi campionamenti.

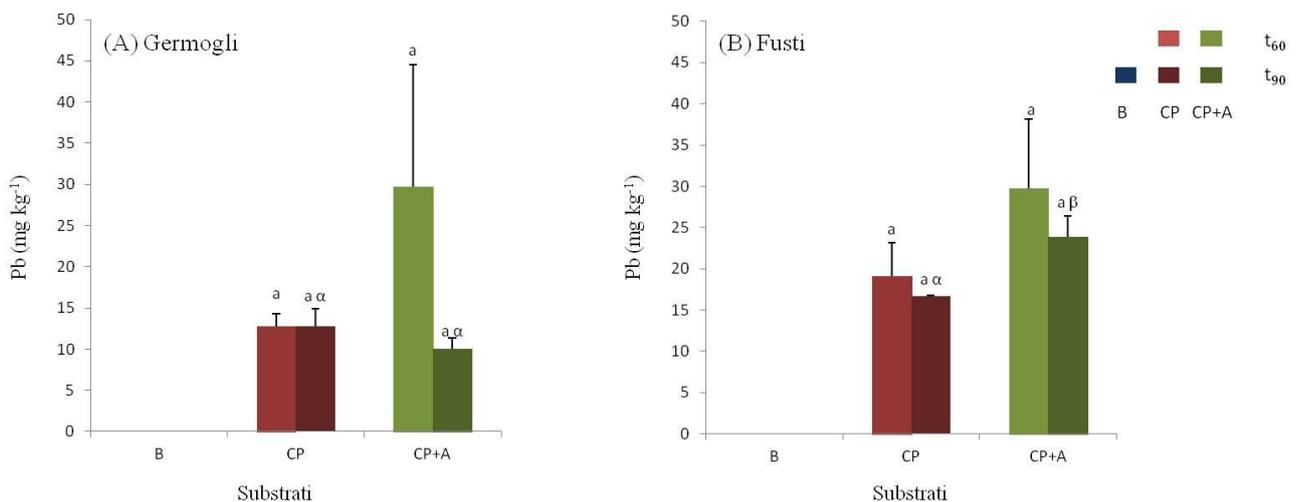


Figura 4.22. Concentrazioni di Pb nei germogli (A) e nei fusti (B): valori medi riscontrati nel tempo (t_{60} e t_{90}) in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati al termine della sperimentazione (t_{90}).

Nei tessuti aerei (germogli e fusti), i valori più elevati delle concentrazioni medie di Pb, pari a circa 30 ppm, sono stati riscontrati nel campionamento a 60 giorni dal trapianto (t_{60}) nel substrato CP+A. Nei germogli, a fine sperimentazione (campionamento a t_{90}), non sono state osservate differenze significative tra le concentrazioni di Pb rilevate nei tessuti cresciuti in CP e in CP+A.

Nei fusti, a fine sperimentazione (campionamento a t_{90}), le concentrazioni di questo metallo sono risultate significativamente differenti. Le stesse infatti, come nel caso dello zinco, sono risultate maggiori in presenza di ammendante (CP+A).

L'andamento nel tempo delle concentrazioni medie di Pb riscontrate nei fusti di CP e CP+A è risultato molto simile.

In Figura 4.23 è possibile osservare le concentrazioni medie di Cd riscontrate nelle parti aeree (germogli e fusti), per ogni substrato, relative a diversi campionamenti.

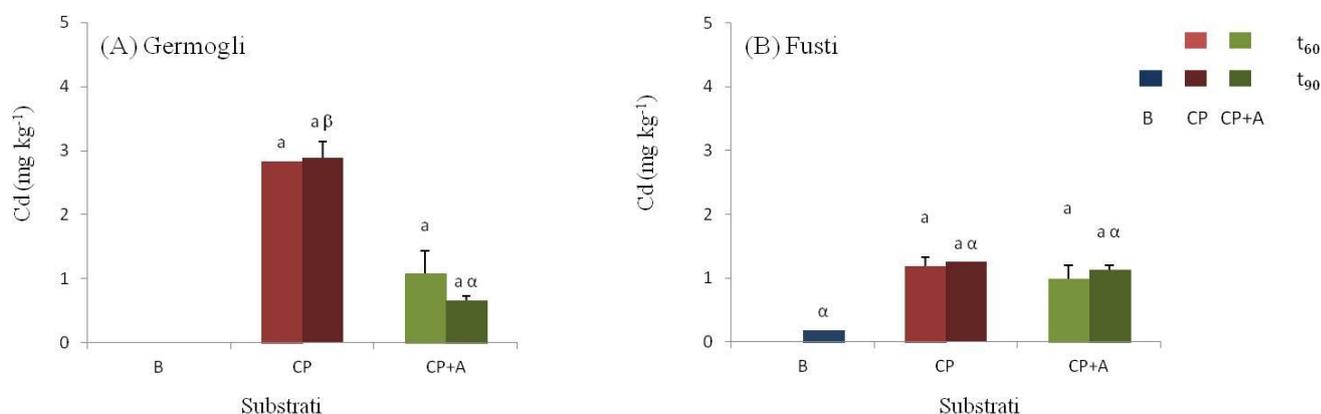


Figura 4.23. Concentrazioni medie di Cd nei germogli (A) e nei fusti (B): valori medi riscontrati nel tempo (t_{60} e t_{90}) in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati al termine della sperimentazione (t_{90}).

Le concentrazioni medie di Cd sono risultate molto basse rispetto a quelle osservate per lo Zn e il Pb. Le concentrazioni più elevate sono state riscontrate nei germogli, dove, sul substrato CP, è stato misurato il valore massimo di 2,8 ppm al termine della sperimentazione (t_{90}).

Nei germogli, i valori ottenuti a fine sperimentazione (t_{90}) mostrano una differenza significativa tra i substrati CP e CP+A, con le concentrazioni medie che hanno raggiunto valori più elevati in CP.

Nei fusti invece, le concentrazioni medie di Cd, riscontrate a fine sperimentazione, non hanno presentato differenze significative tra i substrati.

L'andamento nel tempo delle concentrazioni medie di Cd riscontrate nei fusti di CP e CP+A è risultato molto simile.

In Figura 4.24 è possibile osservare le concentrazioni medie di Zn, Pb e Cd, riscontrati nell'apparato radicale, per ogni substrato, relative al campionamento finale (t_{90}).

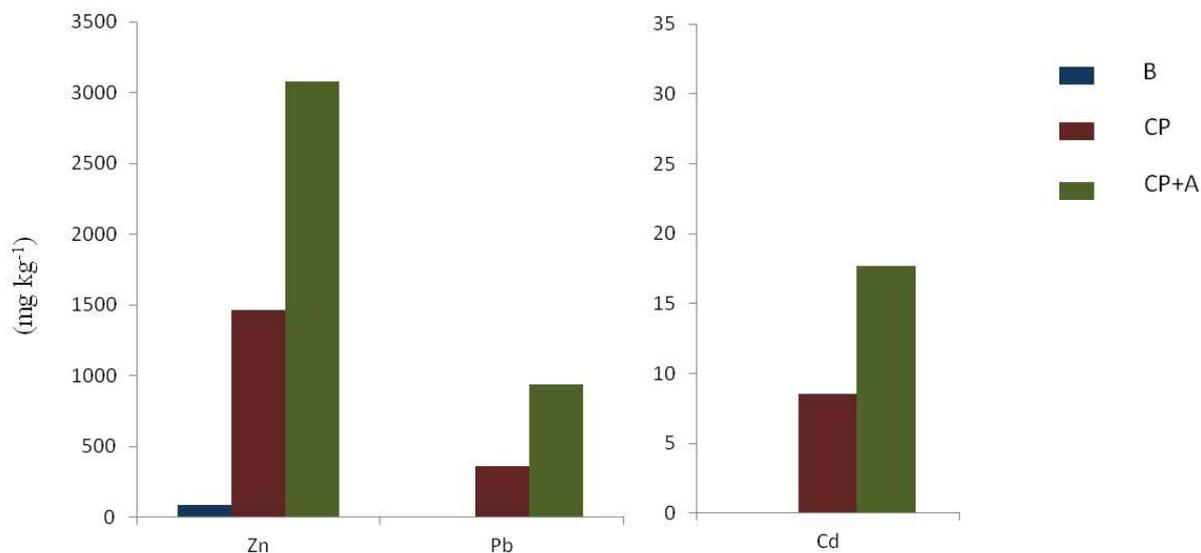


Figura 4.24. Concentrazioni di Zn, Pb e Cd, rilevate nelle radici al termine della sperimentazione (t_{90}) nei substrati B, CP e CP+A.

Da quanto osservato emerge che la maggiore concentrazione per i tre elementi contaminanti è stata osservata nel substrato contaminato ammendato (CP+A) rispetto a quello contaminato puro (CP), nonostante nel substrato CP+A la concentrazione fosse diluita rispetto a CP.

Il valore massimo di Zn, pari a circa 3000 ppm, rilevato per le radici nel substrato ammendato (CP+A), risulta oltre il doppio di quello riscontrata nelle radici di CP e circa 6 volte maggiore dei valori massimi precedentemente discussi per le parti aeree.

Il valore massimo di Pb, pari a circa 900 ppm, rilevato nel substrato ammendato (CP+A), risulta oltre il doppio di quella riscontrata nelle radici di CP e circa 30 volte maggiore dei valori precedentemente discussi per le parti aeree.

I valori osservati per il Cd sono nettamente inferiori rispetto a quelli di Zn e Pb. La concentrazione massima riscontrata (in CP+A) è pari a 17,6 ppm, questo valore risulta doppio rispetto a quello riscontrato in CP.

Da quanto fin qui osservato, relativamente alle concentrazioni medie di metalli nei tessuti delle parti aeree, è emerso che al termine della sperimentazione (t_{90}), la concentrazione di Zn nelle piante cresciute sui substrati contaminati (sia CP che CP+A) si discostava notevolmente da quella delle piante cresciute nel substrato non contaminato B.

Al termine della sperimentazione, la concentrazione di Zn nei tessuti verdi è stata maggiore nelle piante cresciute laddove era maggiore la presenza di contaminante (substrato CP) rispetto a quelle cresciute in CP+A. Nei fusti invece, le concentrazioni di Zn è risultata maggiore in CP+A, nonostante in questo substrato esistesse una cospicua diluizione del metallo rispetto al substrato CP. Al termine della sperimentazione le concentrazioni di Pb riscontrate nei tessuti, sono risultate molto più basse rispetto a quelle rilevate per lo Zinco.

Nei germogli, le concentrazioni di Pb, a differenza di quanto osservato per lo Zn, non mostrano differenze significative fra i substrati. Nei fusti invece, la concentrazione è risultata maggiore in presenza di ammendante, così come osservato per lo zinco.

Al termine della sperimentazione le concentrazioni di Pb riscontrate nei tessuti, sono risultate molto più basse rispetto a quelle rilevate per lo Zinco.

Nei germogli, le concentrazioni di Pb, a differenza di quanto osservato per lo Zn, non mostrano differenze significative fra i substrati. Nei fusti invece, la concentrazione è risultata maggiore in presenza di ammendante, così come osservato per lo zinco.

Al termine della sperimentazione le concentrazioni di Cd riscontrate nei tessuti, sono risultate molto più basse rispetto a quelle rilevate per gli altri metalli.

I valori ottenuti per i germogli hanno mostrato una differenza significativa tra i substrati CP e CP+A, mentre nei fusti, non si sono osservate differenze significative tra i substrati.

Relativamente alle concentrazioni medie di Zn, Pb e Cd nelle radici è emerso che la maggiore concentrazione per i tre elementi contaminanti è stata osservata nel substrato contaminato ammendato (CP+A) rispetto a quello contaminato puro (CP), nonostante nel substrato CP+A la concentrazione fosse diluita rispetto a CP. Le concentrazioni di Zn e Pb riscontrate nelle radici inoltre, sono risultate molto maggiori di quelle riscontrate nei tessuti aerei. Se confrontati con le concentrazioni più elevate riscontrate nei tessuti aerei, i valori ottenuti per le radici sono circa 6 volte maggiori della per lo Zn e di oltre 30 volte per il Pb.

Si specifica che l'analisi del contenuto di metalli nelle radici non è stata replicata in triplo (come invece è avvenuto per le parti aeree) a causa delle restrizioni quantitative del materiale da analizzare, per questo motivo non è stato possibile analizzare statisticamente questi dati.

Le concentrazioni di Zn e Pb riscontrate nei tessuti verdi in presenza di ammendante, possono dirsi simili a quelle rilevate da Clemente *et al.* (2012), dopo 16 mesi di sperimentazione, nelle foglie di *A. halimus* impiantate su terreno minerario (in campo) ammendato con compost.

Sono state rilevate differenze significative indotte dagli ammendanti per quanto riguarda lo Zn (germogli e fusti), il Pb (fusti) e il Cd (germogli), a differenza di quanto riportato da Martínez - Fernández e Walker (2012) che, su tessuti aerei di *Atriplex halimus* non hanno riscontrato variazioni significative nella concentrazione dei metalli indotte dall'introduzione di ammendanti organici.

I valori medi di Zn, Pb e Cd, riscontrati nei tessuti aerei di CP e CP+A sono risultati pressoché costanti tra i campionamenti a 60 e 90 giorni. Per quanto riguarda il substrato CP, questo risultato può dirsi in accordo con quanto riscontrato in assenza di compost da Frutos *et al.* (2016) per Cd e Pb e da Tapia *et al.* (2011) per il Cd.

Da quanto emerso dall'analisi dei dati sopra esposti sulle parti aeree le piante hanno mostrato una particolare predisposizione nell'accumulare Zn rispetto a Pb e a Cd.

Il contenuto di Cd nelle radici di CP è simile a quanto osservato da studi precedenti sulla specie *Atriplex halimus* su substrato irrorato con soluzioni contenenti Pb e Cd da Manousaki e Kalogerakis (2009) e su substrato contaminato ammendato con compost da fungicoltura da Frutos *et al.* (2017).

4.3.5.1 TRASLOCAZIONE, BIOCONCENTRAZIONE E CONTENUTO TOTALE DI METALLI

Per poter determinare il fattore di traslocazione e di bioconcentrazione a fine sperimentazione, i dati relativi alle concentrazioni di Zn, Pb e Cd, riscontrati separatamente nei germogli e nei fusti, sono stati rielaborati per ottenere il valore di concentrazione della biomassa aerea (costituita dall'insieme di germogli e fusti). A t60 e a t90 infatti, è stato rilevato inizialmente come la concentrazione di metalli si sia ripartita tra i fusti e i germogli separatamente e a partire da questi dati, è stato poi ottenuto il valore della concentrazione nell'intera biomassa aerea, ottenuta come media pesata delle concentrazioni tra fusti e germogli.

Da tale analisi, la concentrazione di Zn nei tessuti epigei è risultata pari a 194,1 e 253,7 ppm, rispettivamente in CP e in CP+A. La concentrazione di Pb nei tessuti epigei è risultata pari a 15,9 ppm sia CP che in CP+A, mentre quella del Cd è risultata pari a 1,6 e 0,8 ppm rispettivamente in CP e in CP+A.

Rapportando questi valori con quelli rilevati nelle radici, per ciascun metallo nei diversi substrati, sono stati ottenuti i fattori di traslocazione mostrati in Tabella 4.9.

Tabella 4.9. Fattori di traslocazione (TF) per i metalli Zn, Pb e Cd rilevati nei diversi substrati sperimentali a fine sperimentazione (t₉₀).

SUBSTRATO	FATTORE DI TRASLOCAZIONE (TF)		
	Zn	Pb	Cd
CP	0,17	0,04	0,10
CP+A	0,06	0,02	0,09

I valori di TF per ciascun metallo e in ogni substrato, sono risultati tutti inferiori a 1 e minimi in presenza di ammendante (CP+A).

I TF molto bassi riscontrati nella presente sperimentazione sono in accordo con quanto riportato da Amer *et al.* (2013) che, in coltura idroponica, per il Pb ha rilevato (TF<0,06), mentre per lo Zn gli stessi autori hanno riscontrato $0.55 < TF < 1.06$. Bassi valori di TF ($<0,3$) sono stati riscontrati anche da Kachout *et al.* (2012) su piante del genere *Atriplex* cresciute su substrati contaminati a diverse concentrazioni di Zn e Pb.

Per ottenere i fattori di bioconcentrazione, la concentrazione di metalli riscontrata nei tessuti epigei e separatamente in quelli ipogei, è stata rapportata con quella dei metalli presenti nel substrato.

Da questa analisi, per ciascun metallo e nei diversi substrati, sono stati ottenuti i fattori di bioconcentrazione mostrati in Tabella 4.10.

Tabella 4.10. Fattori di bioconcentrazione (BF) aerei e radicali, per i metalli Zn, Pb e Cd, relativamente ai substrati contaminati a fine sperimentazione (t₉₀).

SUBSTRATO	BF AEREO			BF RADICALE		
	Zn	Pb	Cd	Zn	Pb	Cd
CP	0,05	0,01	0,03	0,26	0,33	0,34
CP+A	0,02	0,01	0,03	0,31	0,37	0,33

I valori di BF relativi allo Zn e al Pb riscontrati per le radici possono dirsi in linea con quanto rilevato da Kachout *et al.* (2012) che, su piante del genere *Atriplex* cresciute su substrati contaminati a diverse concentrazioni di Zn e Pb, hanno riscontrato valori di BF radicali compresi tra 0,3 e 2,1 .

I BF riscontrati per le parti aeree sono molto più bassi rispetto a quelli ottenuti in studi analoghi per la specie o il genere *Atriplex* (Moreira *et al.*, 2011; Rabier *et al.*, 2014).

Per comprendere la capacità di fitoestrazione da parte delle piante, oltre all'analisi delle concentrazioni, si è voluto indagare sulla capacità di accumulo di metallo da parte dei tessuti aerei. A tal fine, le concentrazioni sono state moltiplicate per il peso della biomassa aerea totale (fusti + germogli). È stato così ottenuto il valore medio, espresso in µg, della quantità di metallo totale accumulato nella parte aerea di ogni pianta. Il dato ottenuto dunque, combina l'assorbimento di metallo con lo sviluppo di biomassa aerea e può costituire un importante parametro per valutare la qualità di una pianta candidata al fitorisanamento.

Nella Figura 4.25 per ogni metallo (Zn, Pb e Cd), si possono osservare gli accumuli nella parte aerea in funzione del tempo (t₃₀, t₆₀, t₉₀) e dei diversi substrati.

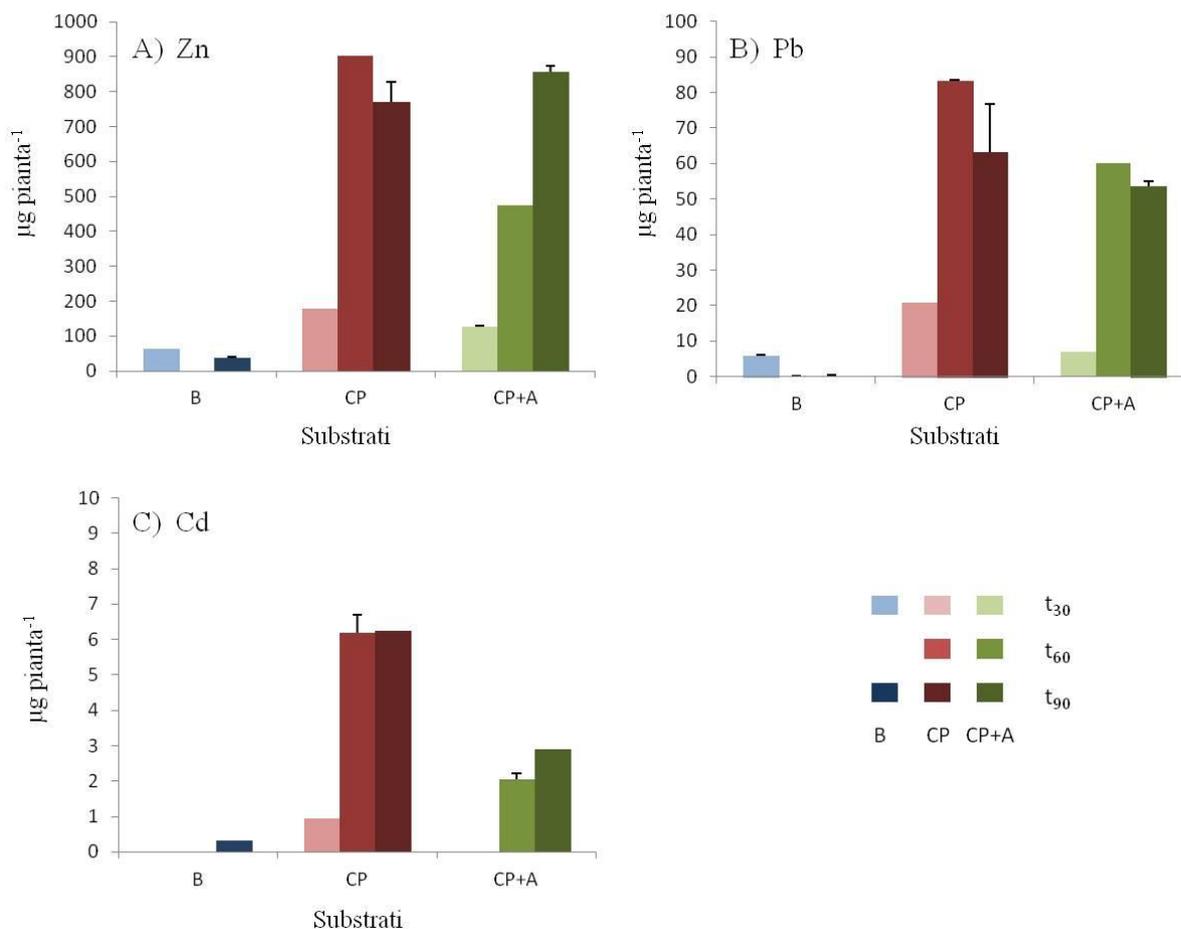


Figura 4.25. Quantità di Zn (a), Pb (b) e Cd (c) accumulata nella parte aerea di ogni pianta ($\mu\text{g planta}^{-1}$): valori medi riscontrati nel tempo (t_{60} e t_{90}) in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media.

I risultati mostrano che il metallo maggiormente accumulato dalle piante è stato lo Zn, seguito dal Pb e, con valori molto più bassi, dal Cd.

Relativamente alla quantità di Zn rilevata nei tessuti aerei in CP+A, si osserva un incremento rilevante durante l'intera sperimentazione da t_{30} a t_{90} . Tale aumento è legato allo sviluppo della biomassa aerea, principalmente dovuto alla crescita dei nuovi germogli che, come visto in precedenza (Figura 4.19), contribuiscono in maniera esclusiva all'incremento della biomassa aerea. In presenza di ammendante, che favorisce lo sviluppo di biomassa aerea, si è osservata una correlazione significativa tra la quantità di biomassa verde e l'accumulo di Zn. A tal proposito è importante osservare che a fine sperimentazione (t_{90}), la quantità di Zn accumulato nelle piante cresciute nel substrato CP è dello stesso ordine di grandezza di quella rilevata sulle piante cresciute nel substrato CP+A, nonostante in quest'ultimo la concentrazione di metalli fosse diluita rispetto a CP.

Relativamente alle quantità di Pb, analogamente a quanto visto per lo Zn, a fine sperimentazione (t_{90}), si sono rilevati accumuli molto simili tra le piante cresciute su CP e quelle cresciute su CP+A, nonostante anche in questo caso in CP+A la concentrazione del metallo fosse diluita rispetto a CP.

I contenuti di Cd, sono risultati bassi se confrontati con quelli di Zn e Pb a rispecchiare quanto già osservato riguardo le concentrazioni. A differenza di Zn e Pb, a fine sperimentazione (t_{90}), l'accumulo osservato nelle piante cresciute sul substrato CP è stato nettamente maggiore (più che doppio), rispetto a quello delle piante cresciute su CP+A.

L'elevata propensione all'accumulo di metalli nelle piante che sviluppano maggiore biomassa grazie alla presenza di ammendanti organici, osservata nel nostro caso per lo Zn e per il Pb, è in linea con quanto osservato da Pérez Esteban *et al.* (2013).

Questi autori hanno riscontrato un accumulo di metalli nelle parti aeree di piante cresciute su suoli minerari ammendati con letame, nelle quali si aveva un maggiore sviluppo di biomassa, simile a quello rilevato in piante cresciute su substrato non ammendato, nelle quali si aveva un minore sviluppo di biomassa.

Secondo questi autori, l'elevata produzione di biomassa raggiunta in presenza di letame, ha come effetto finale un elevato accumulo di metalli nelle piante. Gli ammendanti utilizzati, oltre a svolgere la funzione di stabilizzare i metalli nel suolo possono dunque supportare il raggiungimento di elevati accumuli di metalli nelle parti "falcibili/asportabili" delle piante, per rimuovere i metalli dal suolo.

4.3.6 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questo studio permettono di affermare che la specie *Atriplex halimus*, è capace di crescere mediante la coltivazione di barbatelle su substrato minerario contaminato da un'elevata concentrazione di metalli.

Durante la tutta la sperimentazione, sulle piante non si sono osservati segni dovuti alla fitotossicità del substrato, né su quelle cresciute su substrato contaminato puro CP né su quelle cresciute su substrato contaminato ammendato CP+A, a conferma che la specie ha un'elevata adattabilità a suoli con elevate concentrazioni di metalli.

L'introduzione di ammendanti organici, in particolare nella fase finale della sperimentazione (ultimi 30 gg), ha avuto influenza evidente sullo sviluppo della biomassa. Le piante cresciute nel substrato contaminato ammendato (CP+A), infatti, hanno mostrato un accrescimento significativo.

La specie ha inoltre mostrato un'elevata capacità ad accumulare metalli nei tessuti aerei e radicali.

Nei tessuti aerei, si è osservata un'ottima propensione all'accumulo di Zn e Pb nelle piante che hanno sviluppato maggiore biomassa grazie alla presenza di ammendanti. Tale fenomeno non è stato invece osservato per il Cd, il cui accumulo non è stato influenzato dalla presenza di ammendanti.

Nelle radici sono state osservate concentrazioni molto elevate di Zn e Pb. Dallo studio delle concentrazioni dei metalli misurate nelle parti aeree e nella parte radicale, si è potuto verificare che le piante non hanno un'alta propensione a traslocare metalli dalle radici alla parte aerea. I fattori di traslocazione TF è risultato infatti <1 per tutti i metalli.

Per quanto visto in questo studio risulta dunque che la pianta è un'ottima candidata dal punto di vista della fitostabilizzazione dei metalli nel suolo, grazie all'ottima capacità delle radici a svilupparsi in suoli altamente contaminati. Allo stesso tempo, grazie alla capacità di accumulare notevoli concentrazioni di metalli e all'elevata produzione di biomassa, potrebbe risultare adatta anche dal punto di vista della fitoestrazione

A tal proposito, per valutare a pieno tutte le potenzialità di *Atriplex halimus* in attività di fitorisanamento, mediante impianto di barbatelle, sarebbero auspicabili ulteriori studi in condizioni di campo, monitorando i parametri di biomassa e accumulo di metalli nei tessuti per periodi di tempo superiori a quelli utilizzati negli studi attualmente realizzati.

4.4 A4 - Studi preliminari sulla selezione clonale della specie *Atriplex halimus* per l'uso in attività di fitorisanamento di metalli pesanti con elevata produzione di biomassa

4.4.1 INTRODUZIONE

4.4.1.1 OBIETTIVI

L'obiettivo principale di questa sperimentazione è stato valutare la risposta di 6 cloni della specie *Atriplex halimus*, selezionati a partire da popolazioni spontanee della Sardegna, per l'applicazione in fitorisanamento di suoli contaminati da un'elevata concentrazione di metalli.

A tale scopo, durante 5 mesi, è stato valutato se tra i cloni esistessero differenze adattative, produttive e nell'assorbimento di metalli.

Un altro obiettivo di questa sperimentazione è stato studiare se l'introduzione di ammendanti potesse migliorare la performance della specie in ambito di fitorisanamento e se, nella prima fase di sviluppo delle piante, potesse indurre differenze fra i cloni. A tale scopo la matrice mineraria contaminata è stata ammendata ed è stata valutata l'influenza degli ammendanti sulla sopravvivenza e sullo sviluppo di biomassa aerea e radicale. È stata valutata inoltre l'influenza di tali ammendanti sull'accumulo di metalli nei tessuti aerei e radicali.

4.4.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

L'attività sperimentale è stata realizzata in due distinte fasi di lavoro: una prima fase durante la quale sono state create giovani piante (barbatelle) e una seconda fase di accrescimento delle stesse sui substrati sperimentali.

Nella prima fase, a partire da piante spontanee (piante madre) sono stati ottenuti 6 cloni di barbatelle di *Atriplex halimus* mediante un processo di taleaggio realizzato in idonee condizioni produttive (impianto di radicazione). Nella fase di produzione delle giovani piante, le talee di *Atriplex halimus* sono state prelevate da tre Pianta Madre che vegetavano su una matrice contaminata (piante C) e da tre Pianta Madre che vegetavano su una matrice non contaminata (Pianta NC). Da ogni Pianta Madre sono state create 100 talee che sono state lasciate a radicare per otto settimane. Le piante originate dalla stessa pianta madre, ovvero i suoi cloni, sono stati denominate come di seguito: C1, C2, C3, NC1, NC2, NC3.

La seconda fase è stata realizzata in vaso. In ogni vaso, contenente 25 L di substrato, sono stati disposti 3 cloni, in numero di 15 piante per ogni clone (45 piante per vaso).

E' necessario sottolineare che per il clone NC3, a causa di condizioni fitosanitarie non ottimali, si è dovuto utilizzare un numero minore di individui, costituito da 5 piante per ogni substrato.

Le risposte dei cloni sono state valutate su tre diversi substrati: B*, CP, CP+A.

Il substrato B* rappresenta il bianco di riferimento mentre i substrati contaminati sono stati i seguenti: CP, costituito esclusivamente dal suolo di Campo Pisano; CP+A composto da materiale di

Campo Pisano, compost, sabbia e ghiaia nelle seguenti proporzioni: 21 L di Campo Pisano, 7 L di compost, 3,5 L di sabbia, 3,5 L di ghiaia.

Dopo l'espianto delle barbatelle dal substrato di perlite (t_0), è stata effettuata una valutazione della sopravvivenza, dello stato di radicazione e di germogliamento. È stato inoltre valutato il contenuto di metalli presente nei loro tessuti.

Durante il successivo periodo sperimentale su substrato, il materiale vegetale è stato prelevato a distanza di 90 e 150 giorni dal trapianto (t_{90} , t_{150}).

Ad ogni campionamento è stata valutata la sopravvivenza e, da ogni substrato, sono state sacrificate 3 piante. Su questi campioni sono stati valutati lo sviluppo della biomassa aerea e radicale e la concentrazione di Cd, Pb e Zn nei tessuti.

Relativamente al contenuto di metalli nelle piante, è stata stabilita anche la condizione "zero", sottoponendo ad analisi un campione del materiale vegetale che è stato utilizzato per il taleggio.

4.4.2 CARATTERISTICHE DEI SUBSTRATI

All'inizio della sperimentazione i substrati sono stati caratterizzati, secondo quanto descritto nel capitolo 3, e di seguito sono descritte le loro caratteristiche fisico-chimiche.

In Tabella 4.12. sono descritte le concentrazioni di Cd, Pb e Zn contenute nella frazione fine dei substrati (<2 mm). Le principali caratteristiche fisico - chimiche dei substrati sono invece riportate in Tabella 4.12.

Tabella 4.11. Concentrazioni di Cd, Pb e Zn nei substrati all'inizio della sperimentazione e confronto con i valori di Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC) previsti dal D.Lgs 152/2006, All.5, Tab.1, Parte V, per Siti ad uso Verde pubblico e privato e residenziale (a) e per siti ad uso commerciale e industriale (b).

Elemento	Bianco (B*) [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano (CP) [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano+ Ammendante (CP+A) [mg kg ⁻¹]	CSC (a) [mg kg ⁻¹]	CSC (b) [mg kg ⁻¹]
Cd	Nd	71,4	60,2	2	15
Pb	Nd	3024,7	2523,4	100	1000
Zn	62,3	12481,6	9187,3	150	1500

*nd = valore inferiore al limite di rilevabilità strumentale.

Tabella 4.12. Caratteristiche fisico chimiche dei substrati all'inizio della sperimentazione.

Substrato	pH	C.S.C. [meq/100g suolo]	N [%]	C [%]	P biodisponibile [mg kg ⁻¹]
B*	7,7	23,3	0,07	3,9	29,1
CP	7,4	*Nd	**Nd	6,5	***Nd
CP+A	7,7	11,3	0,09	7,1	10,3
Compost	8,3	57,6	0,94	21,2	

*Nd: volume soluzione titolante bianco-volume soluzione titolante campione = 0

**Nd: valore inferiore alla soglia di rilevanza strumentale (0,01%)

***Nd: valore inferiore alla soglia di rilevanza strumentale (2µg di P nell'estratto)

Come si può osservare in Tabella 4.12, in tutti i substrati il pH è neutro tendente all'alcalino e rappresenta quello più adeguato per la specie *Atriplex halimus*.

La capacità di scambio cationico (CSC), risulta ottimale in B* e buona in CP+A (Sequi, 1990), nel substrato CP invece, il dato è risultato inferiore ai limiti di rilevanza analitica.

Il fosforo è stato analizzato nella sua forma biodisponibile e quindi prontamente utilizzabile dalle piante. I valori ottenuti, interpretati secondo le indicazioni Arpav (2007), indicano che la dotazione è risultata buona in B e scarsa in CP+A. In CP il fosforo biodisponibile, presenta concentrazioni molto basse, tali da non poter essere rilevabile. In quest'ultimo substrato, la presenza di N e P è apportata esclusivamente dal compost, che svolge anche l'importante funzione di incrementare la CSC come osservato su Campo Pisano da Bacchetta *et al.* (2012).

Come già osservato in precedenza (cfr paragr. 4.2.2) non è stato possibile rilevare la concentrazione di fosforo biodisponibile nel compost poiché, con il metodo utilizzato, su questo materiale si sono ottenute delle soluzioni analitiche che non è stato possibile rendere limpide e il dato spettrofotometrico è risultato compromesso.

4.4.3 ADATTAMENTO E SOPRAVVIVENZA

Durante il periodo sperimentale è stata monitorata la sopravvivenza delle piante ed è stato tenuto sotto controllo visivo lo stato sanitario. Lo scopo di queste osservazioni era in primo luogo verificare la capacità di propagazione dei cloni e di verificare se le barbatelle fossero in grado di sopravvivere sui substrati contaminati. È stato inoltre osservato se esistessero differenze nella sopravvivenza fra i cloni e come i substrati influissero sulla sopravvivenza e sullo stato sanitario delle piante.

Dopo otto settimane di radicazione su substrato di perlite, le talee radicate (barbatelle) sono state espantate ed è stata valutata la capacità di propagazione dei cloni. A tale scopo, sulle talee espantate sono stati rilevati i seguenti parametri:

- quante talee, rispetto alle 100 poste a radicare si presentavano vive e, quante tra queste si presentavano radicate o no;
- quante talee, rispetto alle 100 poste a radicare si presentavano morte e, quante tra queste si presentavano radicate o no.

In Tabella 4.13 è possibile osservare lo stato della radicazione al momento dell'espianto delle barbatelle dal substrato di perlite.

Tabella 4.13. Valutazione dello stato della radicazione dei cloni, in valore percentuale rispetto al numero delle talee iniziali.

Cloni	Talee vive[%]		Talee morte [%]	
	Vive Radicate [%]	Vive non Radicate [%]	Morte Radicate [%]	Morte non Radicate [%]
C1	52	0	26	22
C2	93	1	1	5
C3	71	1	12	16
NC1	64	3	20	13
NC2	66	4	17	13
NC3	17	0	39	44

La percentuale di radicazione ha presentato notevoli differenze tra i 6 cloni e compresa fra 17% e 93%.

Da quanto si può osservare in Tabella 4.13, la percentuale di radicazione più elevata (93%) è stata rilevata nel clone C2, mentre quella più bassa (17%) è stata osservata nel clone NC3. Come già detto nel paragrafo introduttivo, per quest'ultimo clone, il basso numero di individui a disposizione, ha imposto una riduzione delle piante trapiantate nella fase sperimentale successiva.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_0 , la capacità di propagazione del gruppo di cloni C non ha mostrato differenze significative rispetto a quella del gruppo NC.

Per quanto riguarda la capacità di radicazione di talee della specie *Atriplex halimus* si può dire che le percentuali di radicazione ottenute, rientrano nell'intervallo di dati osservato da Dessena e Mulas (2012 - b), che riportano un'elevata variabilità nella percentuale di radicazione (20 - 90%) di popolazioni spontanee prelevate in diverse aree costiere della Sardegna.

In seguito al trapianto sui substrati sperimentali (B*, CP e CP+A) la sopravvivenza è stata valutata, dopo 90 e 150 giorni dal trapianto (rispettivamente t_{90} e t_{150}). In Tabella 4.14 sono riportati i dati di sopravvivenza rilevati nel primo campionamento dopo il trapianto (t_{90}).

Tabella 4.14. Sopravvivenza delle piante al campionamento t_{90} , in ciascun clone

Substrati	Sopravvivenza [%]					
	C1	C2	C3	NC1	NC2	NC3
B	46,7	86,7	100	100	93,3	33,3
CP + A	26,7	93,3	100	93,3	53,3	26,7
CP	46,6	100	100	86,7	93,3	26,7

La sopravvivenza delle piante a t_{90} è risultata diversa tra i 6 cloni e, da quanto si può osservare in Tabella 4.14, il clone C3 ha mostrato la maggiore sopravvivenza su ogni substrato (100%) mentre il clone NC3 ha presentato la più bassa percentuale di sopravvivenza, in maniera analoga a quanto osservato nel campionamento precedente (t_0).

Per alcuni cloni inoltre, si osserva una notevole variabilità della sopravvivenza sui diversi substrati sperimentali (B*, CP, CP+A).

A causa della bassa sopravvivenza rilevata nei cloni C1 e NC3 durante i campionamenti avvenuti a t_0 e t_{90} , questi cloni non sono stati ritenuti di interesse per una possibile applicazione in fitorisanamento e sono stati esclusi dai rilievi effettuati al termine della sperimentazione (t_{150}).

Tra t_{90} a t_{150} , il numero di piante nei cloni C2, C3, NC1, NC2, è rimasto costante.

Per quanto riguarda l'introduzione di ammendanti, nell'intervallo di tempo studiato, la loro presenza non ha apportato un miglioramento nella sopravvivenza delle piante.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_{90} la sopravvivenza del gruppo di cloni C non ha mostrato differenze significative rispetto a quella del gruppo NC.

Questa analisi potrebbe suggerire che la sopravvivenza sui substrati contaminati non dipende dall'area di provenienza (contaminata o non contaminata), ma dalla capacità di adattamento propria di ciascun clone.

Relativamente allo stato sanitario delle piante, dopo 90 giorni dal trapianto, il controllo visivo ha evidenziato segnali diffusi di clorosi su tutti i substrati. A seguito di tale osservazione, nel substrato di controllo (B*) è stata somministrata una soluzione nutritiva (Hoagland e Arnon, 1938) fino alla scomparsa dei sintomi di clorosi.

Al termine della sperimentazione (t_{150}), sui cloni considerati (C2, C3, NC1, NC2) è stata osservata clorosi fogliare su tutti quelli cresciuti in CP. Esclusivamente sul clone C3, sono stati osservati lievi fenomeni di clorosi e di senescenza fogliare, anche nel substrato non contaminato (B) e in quello contaminato ammendato (CP+A).

Da quanto riportato è emersa la presenza di fenomeni di clorosi fogliare in tutti i substrati, sia contaminati che non contaminati. I fenomeni di clorosi osservati nel substrato di controllo dopo 90

giorni dal trapianto, sono da attribuire alla necessità di elementi nutrienti, risultati insufficienti nella prima fase di accrescimento delle piante. In seguito alla somministrazione della soluzione fino alla fine sperimentazione, fatta eccezione per il clone C3, le piante cresciute su B* hanno mostrato uno stato sanitario ottimale.

Se si valuta quanto ottenuto sui suoli contaminati, a t_{90} , il risultato si discosta da quanto riportato da Frutos *et al.* (2017) che, dopo 90 giorni dal trapianto di *Atriplex halimus* su suolo minerario, hanno riscontrato fenomeni di clorosi e di senescenza, sia su substrato non ammendato che in quello ammendato (con compost da residui di funghicoltura).

A fine sperimentazione, la presenza di fenomeni di clorosi e senescenza rilevata sulle piante cresciute sui substrati contaminati e assente su quelle cresciute sui substrati non contaminati (fatta eccezione per il clone C3), è in linea con quanto osservato da Frutos *et al.* (2017).

Da quanto esposto emerge che, esiste un notevole variabilità nella capacità di propagazione delle talee e nella sopravvivenza delle piante sui substrati contaminati fra i cloni esaminati. Tali parametri variano a seconda delle caratteristiche intrinseche del clone e non dipendono dall'area di provenienza (contaminata e non contaminata) o dal substrato sperimentale.

Relativamente alla presenza di ammendanti nei substrati contaminati, nell'intervallo di tempo studiato, la loro presenza non ha apportato un miglioramento nella sopravvivenza di barbatelle/piante di *Atriplex halimus*, sebbene abbia influito positivamente sullo stato sanitario delle piante.

Durante l'intera sperimentazione non è stata rilevata la presenza di parassiti mentre sono stati evidenziati fenomeni di clorosi attribuibili in parte alla tossicità del substrato e in parte alla necessità di elementi nutrienti.

4.4.4 ACCRESCIMENTI E PRODUZIONE DI BIOMASSA

Al fine di valutare la capacità della specie *Atriplex halimus* a crescere sui substrati contaminati, è stato studiato l'accrescimento della parte aerea e radicale.

Ad ogni campionamento (t_0 , t_{90} , t_{150}), la crescita della parte aerea e dell'apparato radicale sono state quantificate attraverso il peso dei germogli e delle radici rispettivamente.

Per quanto riguarda la parte aerea, i germogli sono stati separati dal fusto di origine (talea). Il peso dei fusti è stato quantificato, ma il dato non viene mostrato nel dettaglio in quanto non utile in questo stadio della sperimentazione.

Al fine di comprendere se esistessero differenze tra i cloni nella produzione di biomassa, aerea e radicale, le biomasse prodotte da ogni clone sono state confrontate fra loro ad ogni campionamento. Come descritto in precedenza, si è voluto migliorare la fertilità del substrato contaminato con l'aggiunta di ammendanti ed è stato studiato se la presenza di ammendante favorisse o meno lo sviluppo della biomassa aerea e di quella radicale.

Di seguito, per ogni campionamento, verranno esposti e confrontati i dati relativi all'accrescimento dei cloni.

4.4.4.1 T_0

La biomassa verde e radicale rilevata all'espianto delle barbatelle dal substrato di perlite (t_0), rappresenta rispettivamente, la capacità di emissione di germogli e di radici da parte di ogni clone, a partire dalle talee.

In Figura 4.26 è rappresentata la biomassa dei germogli e delle radici (peso secco medio per pianta) rilevata per ogni clone, al momento t_0 .

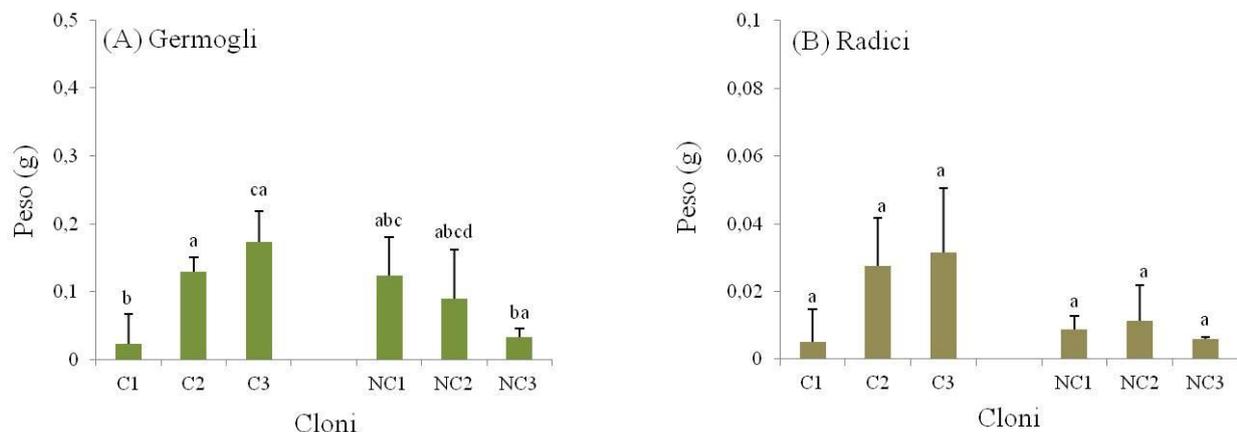


Figura 4.26. Biomassa dei germogli (A) e delle radici (B) rilevata in ogni clone durante t_0 . Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato.

Per quanto riguarda la germogliazione, come si può osservare in Figura 4.26 (A), durante t_0 è stata rilevata l'esistenza di differenze significative fra alcuni cloni, mentre nel caso delle radici (Figura 4.26 B), non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa fra i cloni.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_0 , la biomassa verde e radicale dei cloni C non ha mostrato differenze significative rispetto a quella dei cloni NC.

Con i dati rilevati durante t_0 , si è voluto comprendere se la biomassa dei fusti influisse sullo sviluppo dei germogli e delle radici. Dall'analisi di correlazione fra i pesi dei fusti, dei germogli e delle radici, in ciascun clone, non è emersa alcuna correlazione significativa fra la biomassa dei fusti e lo sviluppo dei nuovi tessuti radicali e aerei.

Questa osservazione è in accordo con quanto riportato da Dos Santos Utmazian *et al.* (2007) che, su pioppo e salice testati per fitorisanamento di metalli in coltura idroponica, nel valutare se la dimensione delle talee di origine influenzasse lo sviluppo di nuova biomassa, hanno riscontrato che non esisteva una relazione fra la biomassa della talea di origine e quella di foglie e germogli prodotti. Anche lo studio condotto da Weih e Nordh (2002), su talee di salice, per produzione di biomassa e fitorisanamento, dimostrava l'assenza di relazione fra la dimensione della talea di origine e la produzione iniziale di biomassa.

4.4.4.2 T_{90}

Con il campionamento avvenuto dopo 90 giorni dal trapianto (t_{90}), per ciascun substrato sperimentale (B, CP e CP+A), è stato valutato se esistessero differenze fra i cloni nella produzione di biomassa.

In Figura 4.27 è rappresentata la biomassa dei germogli e delle radici (peso secco), rilevata per ogni clone al campionamento t_{90} .

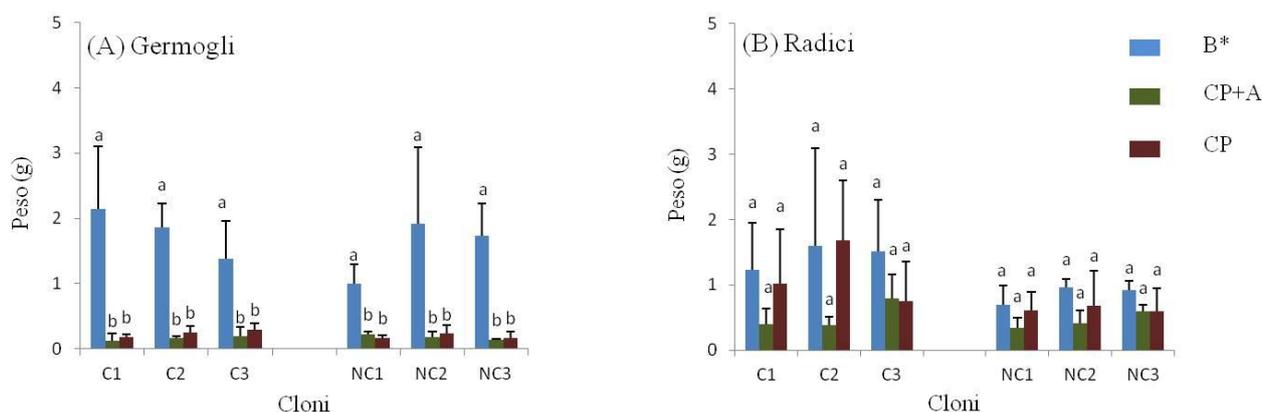


Figura 4.27. Biomassa dei germogli (A) e delle radici (B) rilevata in ogni clone durante t_{90} . Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano, per ciascun clone, l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato.

Dall'osservazione dei dati emerge che, per ciascun substrato, fra i cloni non esistono differenze significative nella produzione di biomassa verde né in quella radicale (Figura 4.27).

Da quanto rilevato emerge che per ciascun clone esistono differenze sostanziali fra lo sviluppo dei germogli avvenuto su substrato contaminato e quello su substrato non contaminato.

Nel substrato non contaminato (B*) infatti, la biomassa verde è risultata maggiore che nei substrati contaminati (CP e CP+A). Tale andamento non si osserva nelle radici, la cui biomassa non ha presentato differenze sostanziali attribuibili ai differenti substrati.

Relativamente all'introduzione di ammendanti nei substrati contaminati, l'assenza di differenze sostanziali tra la biomassa delle piante cresciute in CP e quelle cresciute in CP+A, implica che l'introduzione del compost non ha indotto miglioramenti nello sviluppo dei germogli e delle radici.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_{90} , la biomassa verde e radicale delle piante C non ha mostrato differenze significative rispetto a quella delle piante NC.

L'andamento osservato si discosta da quanto riportato da Tapia *et al.* (2011) che, dopo 70 giorni di accrescimento di piante di *Atriplex halimus* allevate su substrato contaminato da Cd, non hanno riscontrato differenze significative nel peso secco di radici o foglie, rispetto a quelle allevate nel substrato di controllo non contaminato.

Se si fa riferimento ai soli substrati contaminati, a differenza di quanto osservato da Martínez Fernández e Walker (2012) non è stato possibile rilevare una maggiore produzione di biomassa aerea in presenza di ammendante (CP+A) rispetto al substrato puro (CP).

Per quanto riguarda le radici, i risultati ottenuti nella presente sperimentazione sono in accordo con quanto osservato da Pérez Esteban *et al.* (2013) che, non hanno rilevato sostanziali differenze tra accrescimento radicale avvenuto in substrati minerali non ammendati e in substrati ammendati con materia organica.

4.4.4.3 T_{150}

Dopo 150 giorni dal trapianto (t_{150}) è stata realizzata la valutazione finale dello sviluppo delle piante. Come esposto in precedenza, in questo ultimo campionamento, sono stati analizzati 4 dei 6 cloni iniziali (C2, C3, NC1, NC2).

In Figura 4.28 è rappresentata la biomassa dei germogli e delle radici (peso secco), rilevata per ogni clone al campionamento t_{150} .

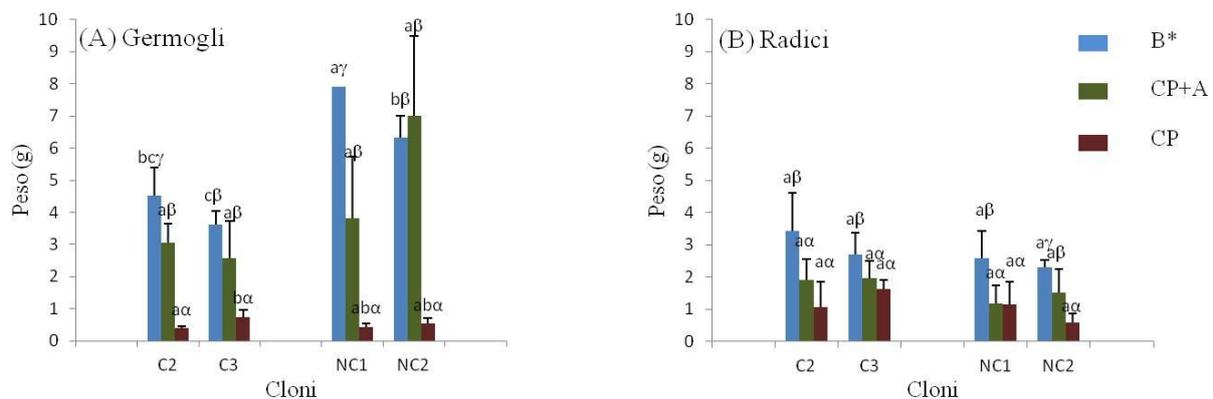


Figura 4.28. Biomassa dei germogli (A) e delle radici (B) rilevata in ogni clone durante t_{150} . Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano, per ciascun clone, l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano, per ciascun clone, l'esistenza di differenze statisticamente significative tra i substrati.

In questa fase, nonostante la biomassa verde presentasse i primi segni di lignificazione, è stata comunque considerata come "germogli", per distinguere questi tessuti dalla talea di origine.

Dal rilievo del peso dei germogli si è potuto osservare che, in ciascun substrato, esistono differenze significative fra i diversi cloni (Figura 4.28 A). Per ogni clone inoltre, lo sviluppo dei germogli è risultato nettamente maggiore nei substrati non contaminati (B*) e contaminati ammendati (CP+A), rispetto a quello ottenuto nel substrato contaminato puro (CP). Per quanto riguarda i substrati contaminati, l'introduzione di ammendanti ha indotto miglioramenti significativi nello sviluppo dei germogli. In presenza di ammendanti infatti, la produzione di biomassa verde è risultata significativamente maggiore che in CP.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_{150} , la biomassa verde delle piante C ha mostrato differenze significative rispetto a quella delle piante NC. Infatti, sia nel substrato di riferimento (B*) che in quello contaminato ammendato (CP+A), le piante NC hanno presentato una produzione media di biomassa verde maggiore di quella delle piante provenienti da Santa Gilla (C).

Dal rilievo del peso delle radici si è potuto osservare che, in ciascun substrato, non esistono differenze significative fra i diversi cloni, (Figura 4.28 B). Per ciascun clone, si può osservare inoltre che vi sono state differenze significative fra le piante cresciute nel substrato di controllo (B*) rispetto a quelle cresciute nei substrati contaminati (CP e CP+A).

In riferimento ai soli substrati contaminati, la biomassa radicale è risultata simile fra CP+A e CP, ad eccezione del clone NC2, per cui è stata rilevata una biomassa maggiore in presenza di ammendanti. Se si esclude tale clone si può dunque affermare che l'introduzione di ammendanti nei substrati contaminati, non ha indotto miglioramenti significativi nello sviluppo delle radici.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_{150} , la biomassa radicale delle piante C non ha mostrato differenze significative rispetto a quella delle piante NC.

La maggiore produzione di biomassa aerea rilevata in presenza di ammendante (CP+A) rispetto al substrato puro (CP) può dirsi in accordo con quanto osservato da Martínez Fernández e Walker (2012). Anche Pérez Esteban *et al.* (2013), dopo un anno dal trapianto di di *Atriplex halimus* su substrati minerari ammendati con diverse tipologie e quantitativi di materiale organico, hanno riscontrato una maggiore produzione di biomassa aerea in presenza di ammendante organico rispetto ai suoli non ammendati.

La maggiore produzione biomassa radicale riscontrata nel substrato B* rispetto a CP e CP+A, si discosta da quanto osservato da Tapia *et al.*, (2011) che, non hanno riscontrato differenze significative nel peso secco di fusti, radici o foglie, di piante allevate su un substrato contaminato da Cd rispetto a quelle allevate nel substrato di controllo non contaminato.

Per quanto riguarda le radici, ad eccezione del clone NC2, i risultati ottenuti nella presente sperimentazione sono in accordo con quanto osservato da Pérez Esteban *et al.* (2013) che, non hanno rilevato sostanziali differenze tra accrescimento radicale avvenuto in substrati minerari non ammendati e in substrati ammendati con materia organica.

Relativamente alle differenze significative nella produzione di biomassa aerea, riscontrate fra i diversi cloni (Figura 4.28 A), ad oggi, l'assenza di studi che implicino una selezione clonale della specie in esame su suolo contaminato, non permette un confronto dei risultati ottenuti con studi analoghi. Tuttavia il risultato è in linea con quello ottenuto da diversi autori, su altre specie legnose ad elevata produzione di biomassa. Tra questi particolarmente interessanti sono i risultati ottenuti da Mughini *et al.* (2013), che su 13 cloni di eucalipto, previamente selezionati per la loro elevata produzione di biomassa, testati per 8 mesi su suolo contaminato da metalli, hanno osservato una elevata variabilità nella produzione di biomassa (foglie, branche e fusti) da parte di cloni differenti.

Anche Pietrini *et al.* (2009), su 10 cloni di pioppo testati in coltura idroponica, hanno rilevato notevole variabilità fra gli stessi, sia in soluzione trattata con Cd sia in quella di controllo (non trattata). Weih e Nordh (2002), hanno realizzato una selezione clonale al fine di valutare diverse applicazioni del salice nella produzione di biomassa e in fitorisanamento. Anche tali autori, hanno riscontrato notevole variabilità nella produzione di biomassa e in risposta a diversi trattamenti di irrigazione e fertilizzazione, da parte dei diversi cloni utilizzati.

4.4.4.4 ACCRESCIMENTI NEL TEMPO

Fino a questo punto sono stati esposti e discussi in maniera puntuale i risultati relativi alle biomasse misurate ad ogni campionamento, di seguito si vuole invece evidenziare come i cloni siano cresciuti nel tempo. L'analisi è stata eseguita su due cloni scelti in funzione della provenienza (uno dal gruppo C e uno dal gruppo NC). Da ogni gruppo è stato scelto quello che ha evidenziato una maggiore produzione di biomassa, rispettivamente C2 ed NC2.

In Figura 4.29 è rappresentato lo sviluppo della biomassa aerea avvenuto nei cloni C2 e NC2 su ciascun substrato, durante il periodo sperimentale in vaso.

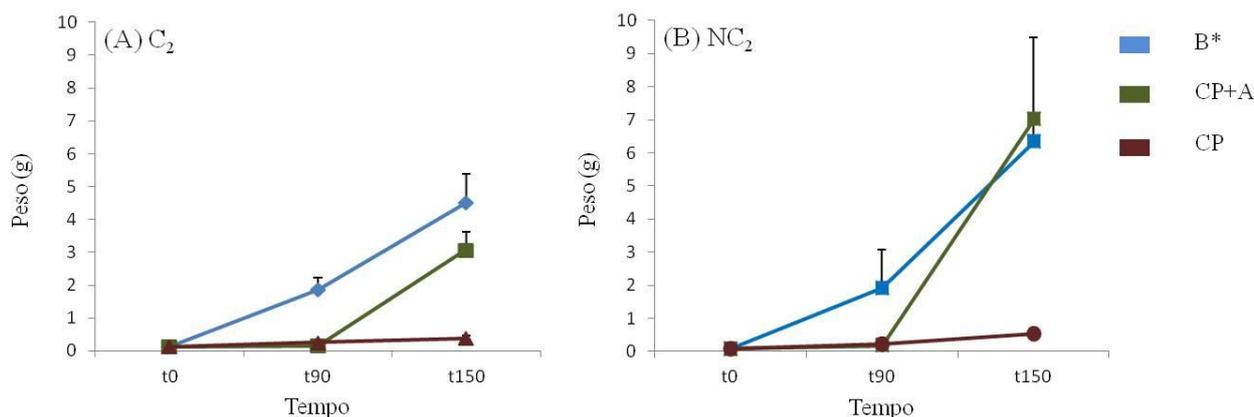


Figura 4.29. Biomassa dei germogli nei cloni C2 (A) e NC2 (B): valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media.

Secondo quanto rilevato nei tre campionamenti, in entrambi i cloni, nel substrato non contaminato (B) l'accrescimento è risultato continuo, mentre nel substrato contaminato non ammendato (CP), la biomassa è rimasta approssimativamente costante nel tempo. Non si sono rilevate differenze di rilievo tra l'andamento della crescita dei due cloni, se non per una migliore performance del clone NC2 nell'intervallo di tempo tra t₉₀ e t₁₅₀.

Nel substrato contaminato ammendato vi è stato un notevole accrescimento della biomassa verde durante l'intervallo di tempo intercorso tra i campionamenti avvenuti dopo 90 e 150 giorni dal trapianto (t₉₀ e t₁₅₀).

Questo comportamento potrebbe suggerire che, l'effetto positivo degli ammendanti sulla crescita diventa evidente solo dopo un certo intervallo di tempo dal trapianto.

A tal proposito Clemente *et al.* (2012), su coltivazione in campo, riportano che l'accrescimento di *Atriplex halimus* risulta stimolato dalla presenza ammendanti organici, nel lungo termine nel caso si tratti di compost e, con effetto immediato dopo l'addizione al suolo, nel caso di reflui suinicoli.

4.4.4.5 SINTESI

I risultati relativi all'accrescimento e alla biomassa, possono essere riassunti come segue.

Nel campionamento a t₉₀ le piante cresciute in B hanno mostrato una performance migliore rispetto a quelle cresciute nei substrati contaminati (CP e CP+A), mentre a t₁₅₀ la biomassa presente nel

substrato contaminato ammendato (CP+A) e risultata simile a quella del substrato non contaminato (B). Per quanto riguarda i substrati contaminati, l'introduzione di ammendanti ha indotto miglioramenti nella produzione delle parti verdi. L'accrescimento dei germogli ha avuto infatti un andamento promettente in presenza di ammendante, tale accrescimento è stato evidente solo nella fase finale delle sperimentazione (tra t_{90} e t_{150}). In definitiva, a fine sperimentazione, le piante cresciute in CP+A hanno mostrato una performance migliore rispetto a quelle cresciute nei substrati CP.

In riferimento all'origine dei cloni, a t_0 e t_{90} la biomassa verde del gruppo di cloni C non ha mostrato differenze significative rispetto a quella del gruppo NC, mentre a t_{150} , nei substrati B* e CP+A, la biomassa rilevata nel gruppo di cloni NC è risultata maggiore di quella del gruppo C.

Per quanto riguarda le radici, in riferimento all'origine dei cloni, a t_0 , t_{90} e a t_{150} , la biomassa radicale del gruppo di cloni C non ha mostrato differenze significative rispetto a quella del gruppo NC.

Da quanto esposto emerge che, esiste variabilità nella produzione di biomassa fra i cloni esaminati che varia, a seconda delle caratteristiche intrinseche del clone e non dipende dall'area di provenienza (contaminata e non contaminata). Tale risultato è in linea con quanto trovato da Kopponen *et al.* (2001) che, su cloni di betulla provenienti da 6 diversi siti di origine (contaminati da metalli e non), hanno rilevato differenze nell'accrescimento sia fra cloni provenienti dalla stessa area, sia fra cloni provenienti da aree diverse.

4.4.5 ACCUMULO DI METALLI

Al fine di valutare la capacità della specie *Atriplex halimus* a traslocare metalli nei propri tessuti dai substrati contaminati, è stata studiata la concentrazione di metalli nelle piante cresciute sui substrati sperimentali.

Per valutare se esistessero differenze nella traslocazione di metalli fra i diversi cloni, ad ogni campionamento, si sono messe a confronto le concentrazioni di Cd, Pb e Zn rilevate in ogni clone.

Come descritto in precedenza si è voluta migliorare la fertilità del substrato contaminato con l'aggiunta di ammendanti, è stato quindi studiato se la presenza di ammendanti influisse sul contenuto di metalli nella biomassa, valutando tale contenuto separatamente per la parte aerea e per quella radicale.

Come già esposto nelle parte introduttiva, la condizione "zero" relativa al contenuto di metalli nelle piante è stata stabilita sottoponendo ad analisi un campione del materiale vegetale utilizzato per il taleaggio.

In Tabella 4.15 sono mostrate le concentrazioni di Cd, Pb e Zn riscontrate nelle piante prelevate in ambiente naturale, distinte secondo il nome del clone utilizzato durante la sperimentazione, (condizione "zero").

Tabella 4.15. Concentrazioni di Cd, Pb e Zn riscontrate nelle piante prelevate in ambiente naturale (condizione “zero”).

Pianta madre	Cd [mg kg⁻¹]	Pb [mg kg⁻¹]	Zn [mg kg⁻¹]
C1	0,2±0,0	2,8±0,1	38,4±5,3
C2	0,1±0,0	2,0±0,1	21,0±0,6
C3	0,2±0,0	1,2±0,2	28,4±4,3
NC1	nd	1,2±0,1	29,4±1,1
NC2	0,3±0,0	1,0±0,0	16,1±2,7
NC3	0,2±0,0	nd	35,7±3,2

Per quanto riguarda l'analisi dei metalli delle piante prelevate in campo, in tutte è stata rilevata la presenza di Zn. Le concentrazioni di questo elemento, utilizzato dalle piante per l'attività biologica, si è presentato dentro un intervallo tipico per la specie, compreso fra 16,1 e 38,4 ppm, In quasi tutte le piante è stata riscontrata la presenza di Cd e Pb e questi elementi che, a differenza dello zinco, non sono utilizzati nei processi metabolici, rappresentano dei contaminanti nei tessuti vegetali. Sia il Cd che il Pb sono stati riscontrati sia nelle piante provenienti da area contaminata (C) sia in quelle provenienti da area non contaminata (NC).

4.4.5.1 T_0

All'espianto delle barbatelle dal substrato di radicazione (campionamento a t_0), su un campione casuale di piante appartenenti a ciascun clone, è stato analizzato il contenuto di metalli. Tale analisi è stata condotta sull'intera pianta, unendo i tessuti radicali con quelli aerei.

In Figura 4.30 è rappresentata la concentrazione di Cd, Pb e Zn rilevata nel campionamento a t_0 in ogni clone.

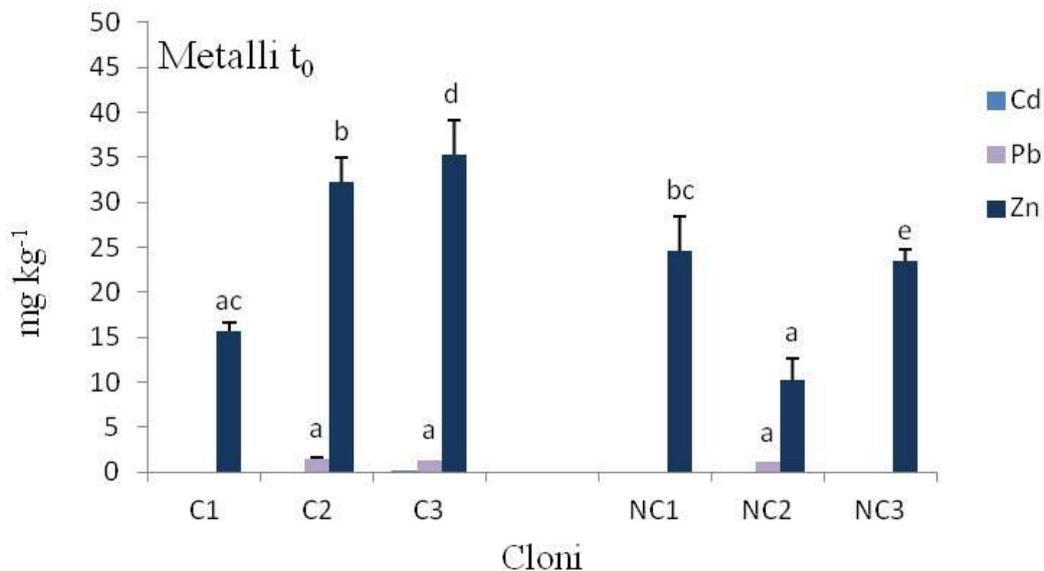


Figura 4.30. Concentrazioni di Cd, Pb e Zn riscontrate in ogni clone durante t_0 . Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano, per ogni metallo, l'esistenza di differenze statisticamente non significative fra i cloni.

La presenza di Zn in ciascun clone è risultata molto simile a quella riscontrata nelle piante di origine, mentre per quanto riguarda il Cd e il Pb, in linea generale è stata osservata una diminuzione che ha reso il Cd irrilevabile su quasi tutti i cloni.

4.4.5.2 T_{90}

Dopo 90 giorni dal trapianto nei substrati sperimentali è stato analizzato il contenuto dei metalli nelle piante, separando le parti aeree (germogli e fusti) da quelle radicali.

In Figura 4.31 è rappresentata la concentrazione di Cd, Pb e Zn del campionamento a t_{90} , rilevata nei tessuti epigei di ogni clone, per ogni substrato sperimentale.

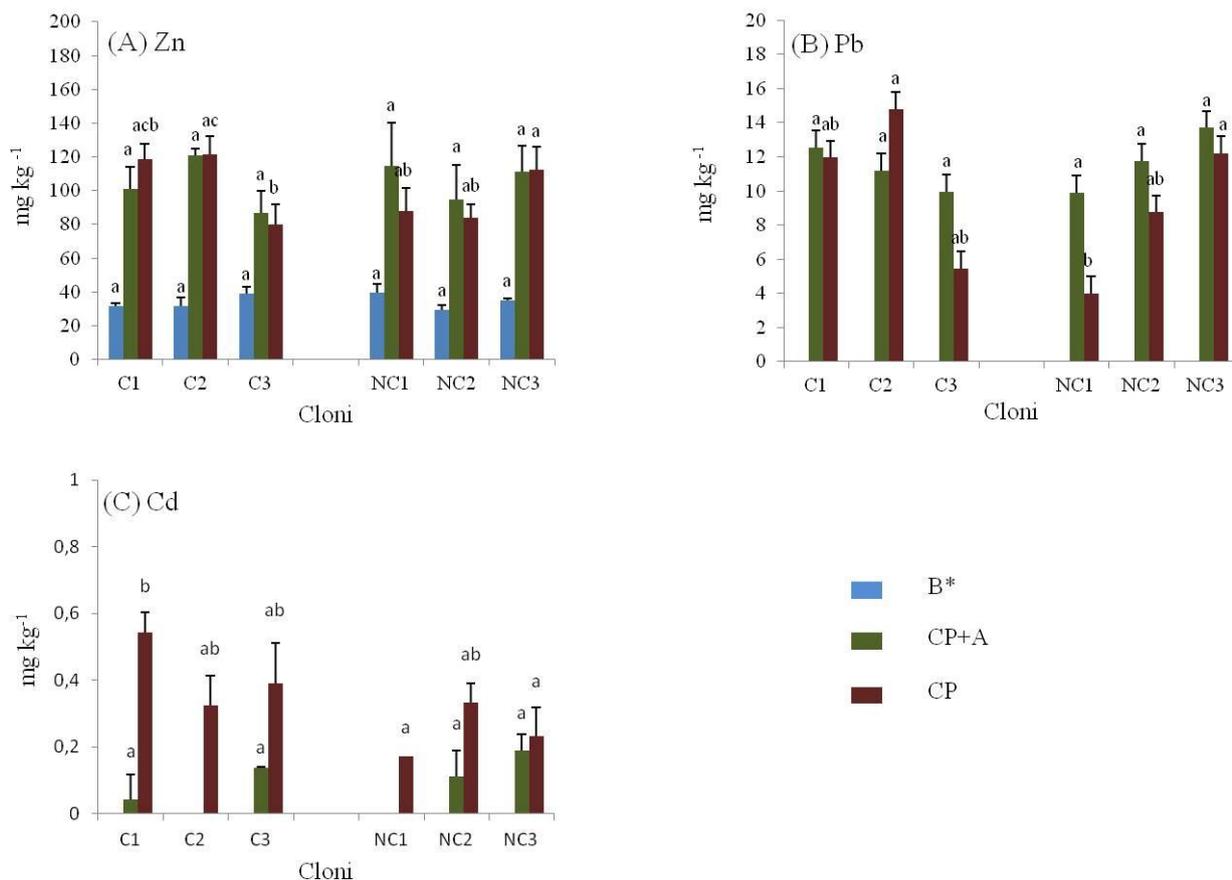


Figura 4.31. Concentrazioni di Zn (A), Pb (B) e Cd (C) rilevata nei tessuti epigei in ogni clone relativamente ad ogni substrato durante t_{90} . Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano, per ciascun clone, l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato.

Nei tessuti epigei, la concentrazione di Zn rilevata nei substrati contaminati, in tutti i cloni, è risultata di oltre 5 volte superiore a quella del Pb. Si sono rilevate concentrazioni di Cd molto basse che non hanno superato i 0.6 mg Kg^{-1} .

Se si osserva quanto rilevato per ciascun clone sui diversi substrati, si rilevano differenze fra l'assorbimento di metalli avvenuto su substrati contaminati e quello non contaminato. Nei substrati contaminati (CP e CP+A) infatti, la concentrazione di Zn, Pb e Cd è risultata nettamente più elevata che nel substrato non contaminato (B).

L'introduzione degli ammendanti ha avuto diversi effetti nell'assorbimento dei metalli sui suoli contaminati. Relativamente a Zn e Pb, si è osservato un assorbimento simile nelle piante cresciute in presenza di ammendante (CP+A) e nel substrato non ammendato (CP). Per quanto riguarda il Cd, nella maggior parte dei cloni è stata osservata una concentrazione più elevata in assenza di ammendante.

Relativamente alla comparazione fra cloni, dal rilievo delle concentrazioni di metalli, si è potuto osservare che, nei substrati B e CP+A, fra i diversi cloni non esistono differenze significative nella concentrazione epigea di Zn, Pb e Cd.

Variabilità fra i cloni, è stata invece rilevata nella concentrazione di Zn, Pb e Cd, sul substrato contaminato non ammendato (CP).

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_{90} , la concentrazione di Zn, Pb e Cd nei tessuti epigei del gruppo di cloni C, non ha mostrato differenze significative rispetto a quelle del gruppo NC.

In Figura 4.32 è rappresentata la concentrazione di Cd, Pb e Zn del campionamento a t_{90} , rilevata nei tessuti radicali di ogni clone, per ogni substrato sperimentale.

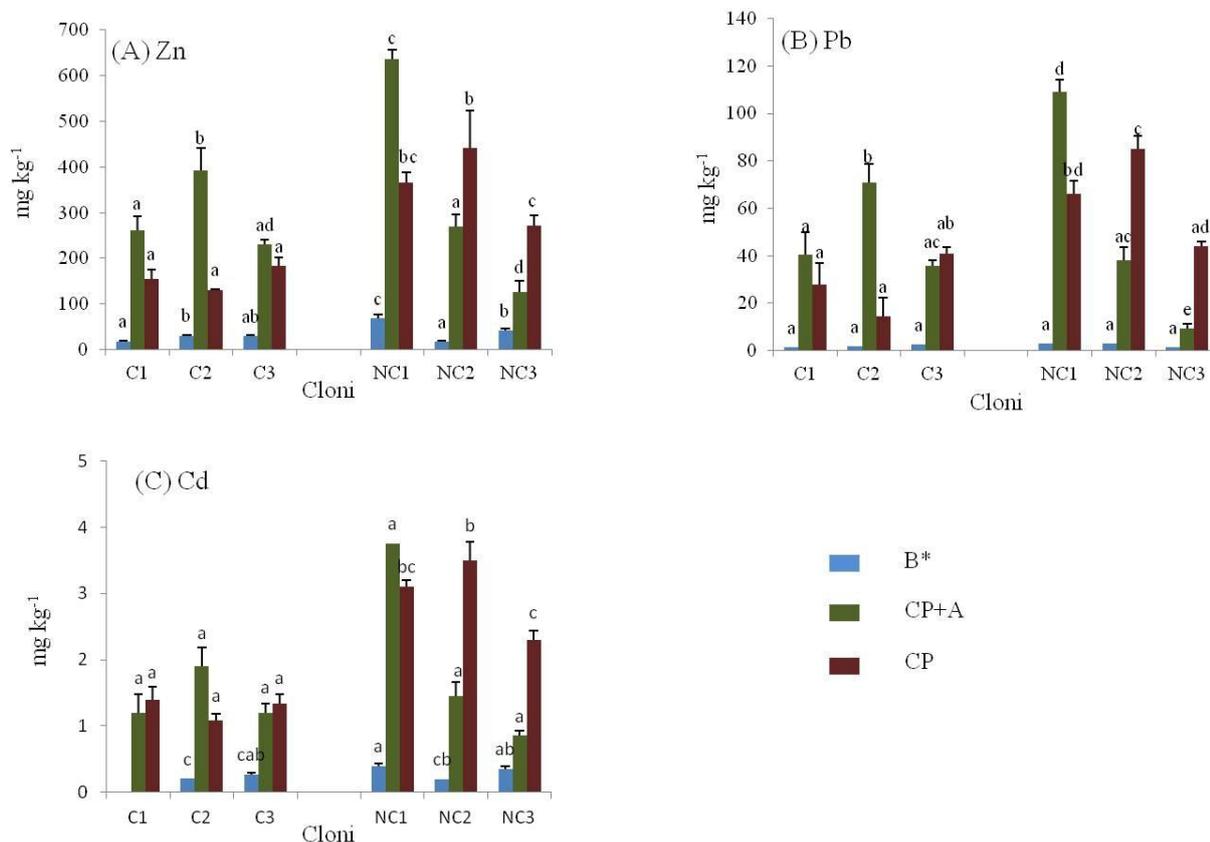


Figura 4.32. Concentrazioni di Zn (A), Pb (B) e Cd (C) rilevata nei tessuti radicali in ogni clone, relativamente ad ogni substrato durante t_{90} . Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano, per ciascun clone, l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato.

Nei tessuti radicali sono state rilevate concentrazioni di Zn, Pb e Cd sensibilmente maggiori di quelle rilevate nei tessuti aerei, con i valori massimi per tutti i metalli riscontrati nel clone NC1, sul substrato CP+A.

Se si confronta quanto rilevato, per ciascun clone, sui diversi substrati, si può osservare che vi sono state differenze fra l'assorbimento di metalli avvenuto su substrati contaminati e quello non contaminato. Nei substrati contaminati (CP e CP+A) infatti, le concentrazioni di Zn, Pb e Cd sono risultate più elevate che nel substrato non contaminato (B*).

Dai dati ottenuti non emerge un effetto chiaramente attribuibile alla presenza di ammendanti, si è osservata infatti una notevole variabilità fra i cloni cresciuti in presenza di ammendante (CP+A) e nel substrato non ammendato (CP). Per alcuni cloni l'assorbimento dei metalli nei tessuti radicali è stato maggiore in CP che in CP+A mentre per altri si è rilevato l'effetto opposto.

Relativamente alla comparazione fra cloni, dal rilievo delle concentrazioni di metalli, si è potuto osservare che, in tutti i substrati, fra i diversi cloni esistono differenze significative nella concentrazione radicale di Zn, Pb e Cd. L'unica eccezione è stata rappresentata dal Cd sul substrato CP+A, dove fra cloni non è stata rilevata alcuna variabilità nella concentrazione.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_{90} , nei substrati B e CP+A, la concentrazione di Zn, Pb e Cd nei tessuti radicali del gruppo di cloni C, non ha mostrato differenze significative rispetto a quella del gruppo NC. Al contrario, nel substrato CP, sono state rilevate differenze significative nell'assorbimento di tutti i metalli, che nel gruppo di cloni NC è risultato maggiore rispetto a quello del gruppo C.

4.4.5.3 T_{150}

Dopo 150 giorni dal trapianto nei substrati sperimentali è stato analizzato il contenuto finale dei metalli nelle piante, separatamente nelle parti aeree (germogli e fusti) e radicali. Come descritto in precedenza, durante questo campionamento sono stati valutati solo 4 dei 6 cloni iniziali.

In Figura 4.33 è rappresentata la concentrazione di Cd, Pb e Zn del campionamento a t_{150} , rilevata nei tessuti epigei di ogni clone, per ogni substrato sperimentale.

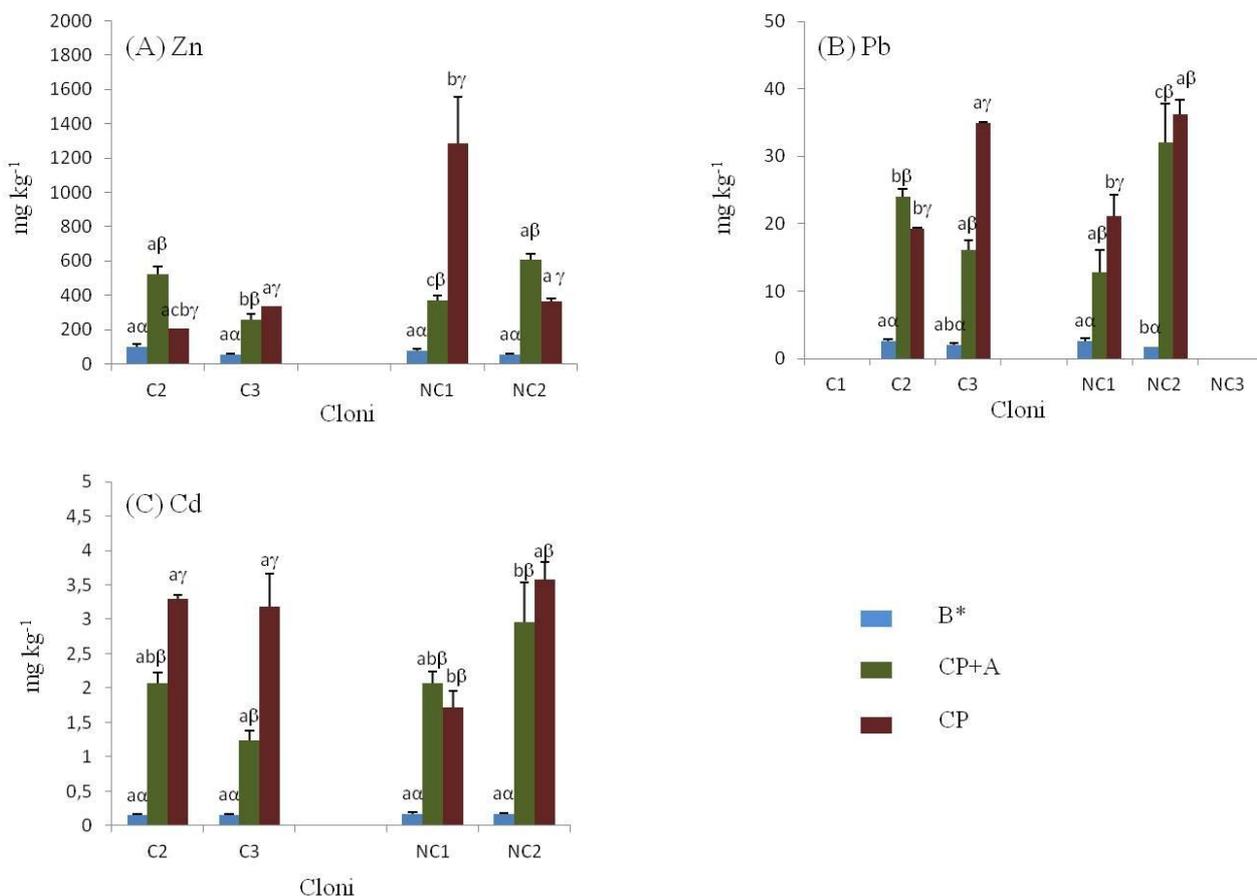


Figura 4.33. Concentrazioni di Zn (A), Pb (B) e Cd (C) rilevata nei tessuti epigei in ogni clone, relativamente ad ogni substrato durante t_{150} . Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano, per ciascun clone,

l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati, relativamente ad ogni clone.

Se si confronta quanto rilevato per ciascun clone, sui diversi substrati, si può osservare che vi sono state differenze significative fra l'assorbimento di metalli avvenuto su substrati contaminati e quello non contaminato. Nei substrati contaminati (CP e CP+A) infatti, le concentrazioni di Zn, Pb e Cd sono risultate più elevate che nel substrato non contaminato (B*).

Dai dati ottenuti non emerge un effetto chiaramente attribuibile alla presenza di ammendanti, si è osservata infatti una notevole variabilità fra i cloni cresciuti in presenza di ammendante (CP+A) e nel substrato non ammendato (CP). Per alcuni cloni l'assorbimento dei metalli nei tessuti aerei è stato maggiore in CP che in CP+A mentre per altri si è rilevato l'effetto opposto.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t_{150} , la concentrazione di metalli nei tessuti epigei del gruppo di cloni C, non ha mostrato differenze significative rispetto a quella del gruppo NC. Relativamente allo Zn nel substrato CP e al Cd nel substrato CP+A sono state rilevate differenze significative nell'assorbimento. Lo stesso è risultato maggiore nel gruppo di cloni NC rispetto a quello del gruppo C.

In Figura 4.34 è rappresentata la concentrazione di Cd, Pb e Zn del campionamento a t_{150} , rilevata nei tessuti radicali di ogni clone, per ogni substrato sperimentale.

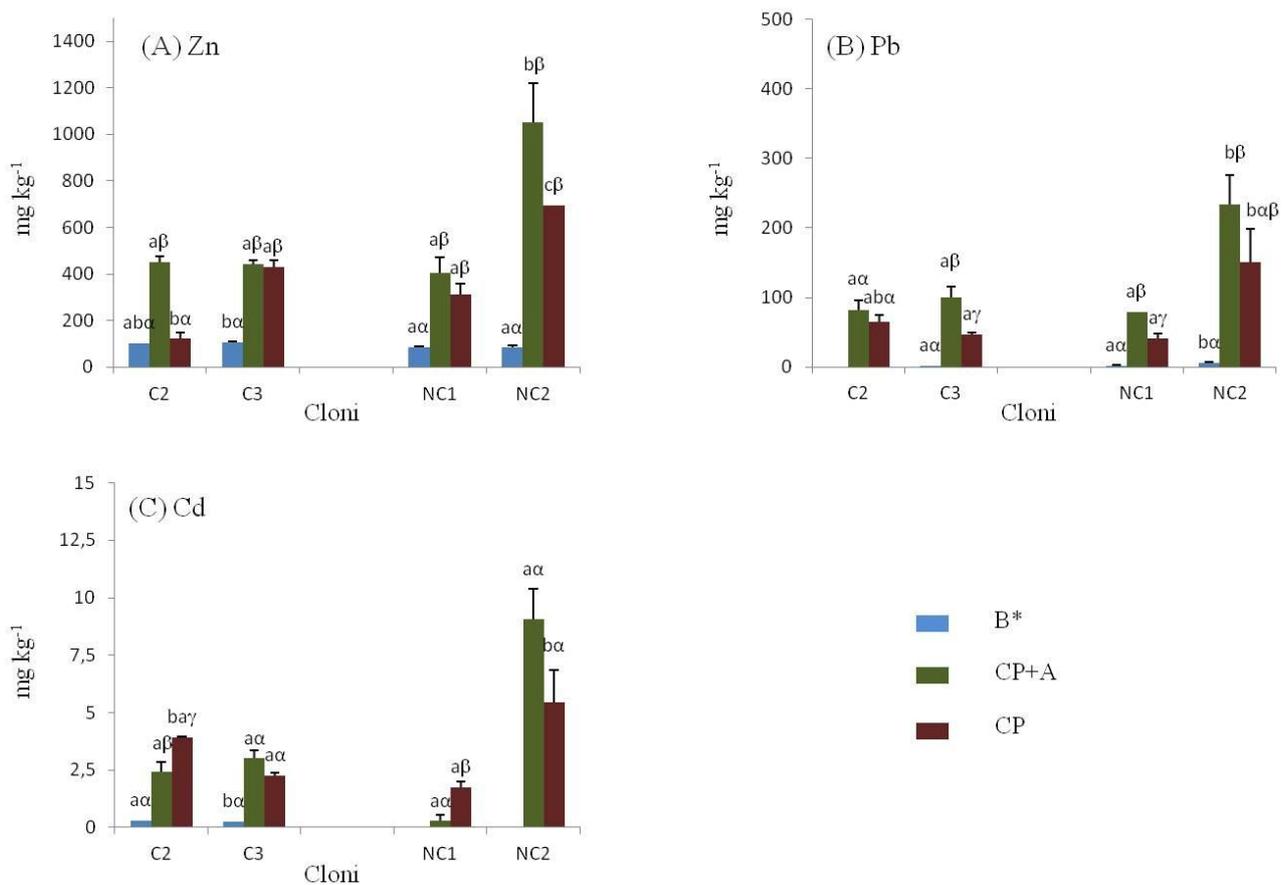


Figura 4.34. Concentrazioni di Zn (A), Pb (B) e Cd (C) rilevata nei tessuti radicali in ogni clone, relativamente ad ogni substrato durante t_{150} . Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano, per ciascun clone,

l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato. Le lettere α , β , γ , indicano l'esistenza di differenze significative tra i substrati, relativamente ad ogni clone.

Nei tessuti radicali, le concentrazioni di Zn, Pb e Cd più elevate, rispettivamente pari a 1051, 233 e 9 mg kg⁻¹, sono state riscontrate nel clone NC2, sul substrato CP+A. Se si fa riferimento a queste concentrazioni si può osservare che la concentrazione di Zn è risultata 4,5 volte più elevata di quella del Pb e oltre 100 volte quella del Cd.

Se si confronta quanto rilevato, per ciascun clone, sui diversi substrati, si può osservare che vi sono state sostanziali differenze fra l'assorbimento di metalli avvenuto su substrati contaminati e quello non contaminato. Nei substrati contaminati (CP e CP+A) infatti, la concentrazione di Zn, Pb e Cd è risultata nettamente più elevata che nel substrato non contaminato (B).

Dai dati ottenuti non emerge un effetto chiaramente attribuibile alla presenza di ammendanti, si è osservata infatti una notevole variabilità fra i cloni cresciuti in presenza di ammendante (CP+A) e nel substrato non ammendato (CP), solo in alcuni casi sono rilevabili differenze significative tra le concentrazioni rilevate nei due substrati, alcuni cloni hanno presentato maggiore concentrazione su CP e altri su CP+A.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a t₁₅₀, nei substrati CP e CP+A, la concentrazione di Zn e Pb nei tessuti radicali del gruppo di cloni C, non ha mostrato differenze significative rispetto a quella del gruppo NC.

Nel substrato CP+A sono state rilevate differenze significative nell'assorbimento di Cd, risultato maggiore nel gruppo di cloni NC rispetto al gruppo C.

4.4.5.4 TRASLOCAZIONE E ACCUMULO DEI METALLI NEL TEMPO

Anche in questa fase sperimentale, la capacità delle piante nell'estrarre i metalli dal suolo e traslocarli nei propri tessuti è stata valutata attraverso il fattore di traslocazione (TF).

In Tabella 4.16 sono mostrati i fattori di traslocazione ottenuti a fine sperimentazione per Zn, Pb e Cd, per ogni clone nei substrati contaminati.

Tabella 4.16. Fattori di traslocazione (TF) per i metalli Zn, Pb e Cd, nei diversi substrati sperimentali, e per ciascun clone, a fine sperimentazione (t_{150}).

ELEMENTO	SUBSTRATO	CLONI			
		C2	C3	NC1	NC2
Zn	CP+A	1,2	0,6	0,9	0,6
Zn	CP	1,7	0,8	3,4	0,5
Pb	CP+A	0,3	0,2	0,2	0,1
Pb	CP	0,3	0,8	0,5	0,2
Cd	CP+A	0,8	0,4	7,3	0,3
Cd	CP	0,8	1,4	1,0	0,7

I risultati mostrano una notevole variabilità del parametro TF in funzione del metallo, del substrato e del clone osservato. In generale le piante hanno mostrato una maggiore propensione all'accumulo radicale rispetto a quello aereo ($TF < 1$), ma almeno in un caso tutti i cloni, fatta eccezione per l'NC2, hanno mostrato un comportamento opposto ($TF > 1$). Relativamente al Pb, tutti i cloni hanno mostrato una scarsa attitudine a traslocare il metallo nella parte aerea ($TF < 1$).

Per comprendere la capacità di fitoestrazione da parte delle piante, oltre all'analisi dei valori di concentrazione si è voluto indagare sulla capacità di accumulo di metallo da parte dei tessuti aerei. I valori di accumulo, espressi in μg di metallo medi per pianta, sono stati ottenuti a partire dai dati delle concentrazioni medie (per clone e per substrato) e del peso della biomassa aerea (dato medio per clone e substrato), ottenuti ai campionamenti effettuati a 90 e 150 giorni dal trapianto.

Il dato ottenuto dunque, correla l'assorbimento di metallo con lo sviluppo di biomassa aerea e può costituire un importante parametro per valutare la qualità di una pianta candidata al fitorisanamento. Nella **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** si possono osservare gli accumuli di Zn, Pb e Cd nel tempo da t_{90} a t_{150} dei cloni valutati fino al termine della sperimentazione (C2, C3, NC1, NC2).

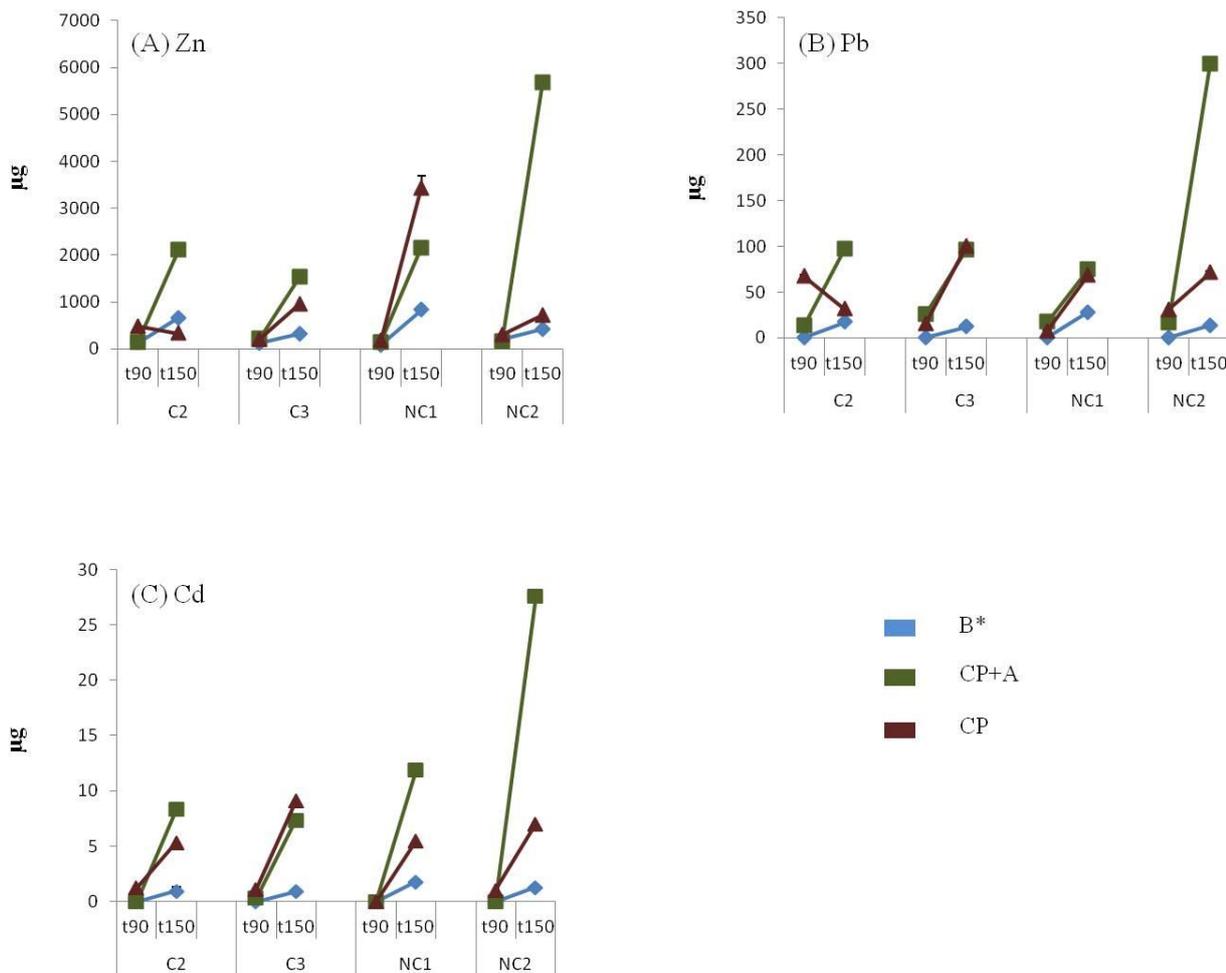


Figura 4.35. Quantità media di Zn (A) Pb (B) e Cd (C), accumulata nella parte aerea di ogni pianta ($\mu\text{g pianta}^{-1}$) in ogni substrato, relativamente a ciascun clone.

Dai dati emerge che per tutti i cloni, su tutti i substrati, il contenuto totale di Zn, Pb e Cd, aumenta in maniera evidente tra t₉₀ e t₁₅₀, con un'unica eccezione relativa al clone C2 che sul substrato CP ha mostrato una diminuzione nel contenuto di Zn e Pb.

Per tutti i cloni si osserva una maggiore propensione all'accumulo di zinco e Pb rispetto al Cd.

Fatta eccezione per il clone NC2, i valori di metallo accumulati nei tessuti aerei, sono simili tra piante cresciute sul substrato contaminato puro CP e contaminato ammendato CP+A, nonostante in quest'ultimo le concentrazioni di metallo risultino notevolmente diluite.

Per quanto riguarda le differenze tra i cloni, la più importante che si rileva è quella relativa al clone NC2, che a fine sperimentazione ha presentato un accumulo di metalli nettamente superiore a tutti gli altri. Per tale clone la maggiore propensione allo sviluppo di biomassa in presenza di ammendante su CP+A, ha determinato il notevole aumento nel contenuto totale di Zn, Pb e Cd.

Da questo punto di vista si può affermare che su substrato contaminato il risultato ottenuto nel clone NC2 in presenza di ammendante è particolarmente interessante ai fini di un possibile utilizzo nel per fitorisanamento.

4.4.5.5 SINTESI

I risultati relativi all'accumulo di metalli, possono essere riassunti come segue.

Da quanto emerso dall'analisi dei dati sopra esposti le piante hanno mostrato una particolare predisposizione nell'accumulare Zn rispetto a Pb e a Cd.

Nei substrati contaminati (CP e CP+A), la concentrazione di Zn, Pb e Cd misurata a fine sperimentazione è risultata significativamente più elevata che nel substrato non contaminato (B*) sia nei tessuti epigei sia in quelli radicali.

Nelle parti epigee, relativamente a Zn e Pb, si è osservato un assorbimento simile nelle piante cresciute in presenza di ammendante (CP+A) e nel substrato non ammendato (CP), nonostante nel primo le concentrazioni di metallo risultassero notevolmente diluite. Relativamente al Cd, nella maggior parte dei cloni, è stata rilevata una concentrazione più elevata in assenza di ammendante.

Nei tessuti radicali invece, è stata osservata notevole varietà nei comportamenti a seconda del clone e del metallo, inoltre, dai dati ottenuti, non è emerso nessun effetto chiaramente attribuibile alla presenza di ammendanti. Si è osservata infatti una notevole variabilità fra i cloni cresciuti in presenza di ammendante (CP+A) e nel substrato non ammendato (CP), solo in alcuni casi sono state rilevate differenze significative tra le concentrazioni. Alcuni cloni hanno presentato maggiore concentrazione su CP e altri su CP+A.

I valori di Zn e di Cd riscontrati nella presente sperimentazione, sia nei tessuti aerei che in quelli radicali, sono risultati rispettivamente più elevati (Zn) e in linea (Cd), rispetto ai valori riscontrati da Pérez Esteban *et al.* (2013) dopo un anno di accrescimento di *Atriplex halimus* su substrato minerario non ammendato e ammendato con letame.

Tali autori inoltre, non hanno riscontrato differenze sostanziali nella concentrazione di Zn e Cd, rilevata nelle piante cresciute su substrati ammendati e quelle cresciute in assenza di ammendante. Anche tale risultato è in accordo con quanto emerso nella presente sperimentazione.

In riferimento all'origine dei cloni, secondo quanto rilevato a fine sperimentazione, nei substrati CP e CP+A, la concentrazione di Zn e Pb nei tessuti radicali del gruppo di cloni C, non ha mostrato differenze significative rispetto a quella del gruppo NC. In alcuni casi sono state rilevate differenze significative nell'assorbimento di un metallo, risultato maggiore nel gruppo di cloni NC rispetto al gruppo C, o viceversa. In linea generale si può comunque affermare che, relativamente all'assorbimento dei metalli, non sono emerse differenze fondamentali nel comportamento delle piante chiaramente attribuibili al sito di origine.

Relativamente alla traslocazione di metalli nei tessuti i risultati mostrano una notevole variabilità del parametro TF in funzione del metallo, del substrato e del clone osservato. In generale le piante hanno mostrato una maggiore propensione all'accumulo radicale rispetto a quello aereo ($TF < 1$), ma almeno in un caso tutti i cloni, fatta eccezione per l'NC2, hanno mostrato un comportamento opposto ($TF > 1$). Solo nel caso del Pb, tutti i cloni hanno mostrato una scarsa attitudine a traslocare il metallo nella parte aerea ($TF < 1$).

I valori di TF riscontrati nella presente sperimentazione, per lo Zn si sono risultati in linea con quanto riportato da Amer *et al.* (2013) che, su *Atriplex halimus*, in coltura idroponica, hanno riscontrato $0.55 < TF > 1.06$. Mentre per il Pb, i valori trovati sono risultati più elevati di quelli riportati da Amer *et al.* (2013) che hanno rilevato valori estremamente bassi ($TF < 0,06$).

Kachout *et al.* (2012), su piante del genere *Atriplex* cresciute su substrati contaminati a diverse concentrazioni di Zn e Pb, hanno invece riscontrato valori di TF più bassi ($<0,3$) rispetto a quelli ottenuti nel presente lavoro.

In uno studio analogo compiuto su specie differenti, Zacchini *et al.* (2009), su 10 cloni di pioppo e salice esposti a Cd in coltura idroponica, hanno rilevato che entrambe le specie sono capaci di traslocare elevate quantità di Cd nei tessuti aerei. Fra i cloni di pioppo il TF è risultato variabile mentre tra quelli di salice hanno mostrato un comportamento omogeneo.

Dai dati relativi all'accumulo nel tempo dei metalli nei tessuti aerei emerge che per tutti i cloni, su tutti i substrati, il contenuto totale di Zn, Pb e Cd, è aumentato in maniera evidente tra t_{90} e t_{150} , con un'unica eccezione relativa al clone C2 che, sul substrato CP, ha mostrato una diminuzione nel contenuto di Zn e Pb.

In uno studio analogo compiuto su specie differenti, Mughini *et al.* (2013), su 13 cloni di eucalipto cresciuti su suolo contaminato da metalli, riportano che, le concentrazioni di metalli rilevate nei cloni sperimentali dopo 8 mesi dal trapianto sono risultate sempre più elevate di quelle del clone di controllo, analizzato precedentemente (dopo 6 mesi dal trapianto).

Nella presente sperimentazione, se si fa eccezione per il clone NC2, i valori di metallo accumulati nei tessuti aerei, sono stati simili tra piante cresciute sul substrato contaminato puro CP e contaminato ammendato CP+A, nonostante in quest'ultimo le concentrazioni di metallo risultino notevolmente diluite.

L'elevata propensione all'accumulo di metalli nelle piante che sviluppano maggiore biomassa grazie alla presenza di ammendanti organici, osservata nel nostro caso per lo Zn e per il Pb, è in linea con quanto osservato da Pérez Esteban *et al.* (2013).

Questi autori hanno riscontrato un accumulo di metalli nelle parti aeree di piante cresciute su suoli minerari ammendati con letame, nelle quali si aveva un maggiore sviluppo di biomassa, simile a quello rilevato in piante cresciute su substrato non ammendato, nelle quali si aveva un minore sviluppo di biomassa.

Secondo questi autori, l'elevata produzione di biomassa raggiunta in presenza di letame, ha come effetto finale un elevato accumulo di metalli nelle piante. Gli ammendanti utilizzati, oltre a svolgere la funzione di stabilizzare i metalli nel suolo possono dunque supportare il raggiungimento di elevati accumuli di metalli nelle parti "falcibili/asportabili" delle piante, per rimuovere i metalli dal suolo.

Per quanto riguarda le differenze tra i cloni, è importante quella relativa al clone NC2, che a fine sperimentazione ha presentato un accumulo di metalli nettamente superiore a tutti gli altri. Per tale clone la maggiore propensione allo sviluppo di biomassa in presenza di ammendante su CP+A, ha determinato il notevole aumento nel contenuto totale di Zn, Pb e Cd.

4.4.6 CONCLUSIONI

L'obiettivo principale di questa sperimentazione è stato valutare la risposta di 6 cloni della specie *Atriplex halimus*, selezionati a partire da popolazioni spontanee della Sardegna, per l'applicazione in fitorisanamento di suoli contaminati da un'elevata concentrazione di metalli.

Sebbene la specie *Atriplex halimus* sia studiata in attività di fitorisanamento, attualmente non esistono studi di selezione clonale con l'obiettivo di confrontare le risposte adattative di diversi cloni alla crescita su substrati contaminati.

Relativamente all'adattamento e alla sopravvivenza, dalla presente sperimentazione è emerso che, fra i 6 cloni esaminati, esiste un notevole variabilità nella capacità di propagazione delle talee e nella sopravvivenza delle piante sui substrati contaminati.

Tali parametri variano a seconda delle caratteristiche intrinseche del clone e non dipendono dall'area di provenienza (contaminata e non contaminata) o dal substrato sperimentale.

La presenza di ammendanti nei substrati contaminati, non ha apportato un miglioramento nella sopravvivenza di barbatelle/piante di *Atriplex halimus*, sebbene abbia influito positivamente sullo stato sanitario delle piante. Sulle stesse non è stata rilevata la presenza di parassiti mentre sono stati evidenziati fenomeni di clorosi attribuibili in parte alla tossicità del substrato e in parte alla necessità di elementi nutrienti.

Relativamente alla produzione di biomassa, a fine sperimentazione si è rilevato che, nel substrato contaminato ammendato (CP+A) la produzione è risultata simile a quella del substrato non contaminato (B).

L'introduzione di ammendanti nei substrati contaminati, ha indotto miglioramenti nella produzione delle parti verdi. Tale effetto si è reso evidente solo nella fase finale delle sperimentazione (tra t_{90} e t_{150}) quando si è potuto osservare che, le piante cresciute in CP+A hanno mostrato una performance migliore rispetto a quelle cresciute nei substrati CP.

Relativamente all'accumulo di metalli le piante hanno mostrato una particolare predisposizione nell'accumulare Zn rispetto a Pb e a Cd.

Nei substrati contaminati (CP e CP+A), la concentrazione di Zn, Pb e Cd misurata a fine sperimentazione è risultata significativamente più elevata che nel substrato non contaminato (B*) sia nei tessuti epigei sia in quelli radicali.

Nelle parti epigee, relativamente a Zn e Pb, si è osservato un assorbimento simile nelle piante cresciute in presenza di ammendante (CP+A) e nel substrato non ammendato (CP), nonostante nel primo le concentrazioni di metallo risultassero notevolmente diluite. Relativamente al Cd, nella maggior parte dei cloni, è stata rilevata una concentrazione più elevata in assenza di ammendante.

Nei tessuti radicali invece, è stata osservata notevole variabilità nelle concentrazioni a seconda del clone e del metallo, inoltre, dai dati ottenuti, non è emerso nessun effetto chiaramente attribuibile alla presenza di ammendanti.

Dai valori del fattore di traslocazione calcolati è emerso che in generale le piante hanno avuto una maggiore propensione all'accumulo radicale rispetto a quello aereo ($TF < 1$), benchè in alcuni casi si sia osservato un comportamento opposto ($TF > 1$).

Dai dati relativi alla quantità totale di metalli accumulati nel tempo nei tessuti aerei, è emerso che per tutti i cloni (eccetto il C2), su tutti i substrati, il contenuto totale di Zn, Pb e Cd, è aumentato in maniera evidente tra t_{90} e t_{150} . Tali valori, sono stati simili tra le piante cresciute sul substrato contaminato puro (CP) e contaminato ammendato (CP+A), con l'eccezione del clone NC2 che, a fine sperimentazione ha presentato un accumulo di metalli nettamente superiore a tutti gli altri.

In riferimento all'origine dei cloni, sebbene siano state riscontrate delle differenze nella produzione di biomassa e nell'accumulo di metalli fra i gruppi di cloni C e i gruppi NC in linea generale si può comunque affermare che, non sono emerse differenze fondamentali nel comportamento delle piante chiaramente attribuibili al sito di origine.

Relativamente alla variabilità fra cloni, di particolare rilievo sono stati i risultati relativi al clone NC2. Tale clone ha mostrato la maggiore propensione allo sviluppo di biomassa su substrato contaminato in presenza di ammendante (CP+A) e, a fine sperimentazione si è distinto per il notevole aumento nel contenuto totale di Zn, Pb e Cd.

Dai risultati ottenuti si evince dunque che esiste una possibilità concreta di realizzare una selezione clonale sulla specie *Atriplex halimus*, che permetta di ottenere cloni particolarmente adatti alle diverse tecniche di fitorisanamento.

La specie *Atriplex halimus* si è mostrata un'ottima candidata per la selezione clonale ai fini di una produzione di filiera e di un'organizzazione produttiva mirata. La selezione clonale infatti, potrebbe consentire di realizzare un sistema di coltivazione con obiettivi produttivi definiti, sia per quanto riguarda la produzione di biomassa che per quanto riguarda l'accumulo di metalli nei tessuti.

4.5 M1 - Studi preliminari sull'utilizzo della specie *Medicago polymorpha* per attività di fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti in sardegna

4.5.1 INTRODUZIONE

4.5.1.1 OBIETTIVI

La sperimentazione di seguito riportata costituisce il primo lavoro realizzato per valutare la possibilità di utilizzare la leguminosa autoctona isolana *Medicago polymorpha* var. Pratosardo, per fitorisanamento in suoli contaminati di origine mineraria.

Lo scopo del lavoro è stato testare la capacità di germinazione, sopravvivenza e l'adattamento nella prima fase di sviluppo, della specie, in suoli ad elevata contaminazione da metalli.

La possibilità di usare questa leguminosa in fitorisanamento, oltre che per svolgere funzione di copertura del terreno, è dettata dalla sua capacità di incrementare il contenuto di azoto nel suolo e migliorarne la fertilità. A tale scopo, si è verificato se la presenza di *Medicago polymorpha* incrementasse la presenza di azoto nel substrato contaminato.

4.5.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

Per realizzare l'attività sperimentale, la germinazione e la capacità di sopravvivenza di plantule di *Medicago polymorpha*, varietà Pratosardo, è stata testata in un substrato contaminato da metalli. A tal fine la sperimentazione è stata suddivisa in due fasi: nella prima è stata valutata la capacità di germinazione dei semi, mentre nella seconda, sulle plantule ottenute dalla germinazione, è stata valutata la sopravvivenza e la produzione di biomassa.

Per la prima fase i semi di *Medicago polymorpha* sono stati disposti in vaso e ne è stata osservata la capacità di germinazione. In seguito, le plantule ottenute dalla fase di germinazione, sono state monitorate per due mesi e, alla fine della sperimentazione sono state valutate la loro sopravvivenza e lo sviluppo di biomassa aerea e radicale.

Per valutare tali parametri, la sperimentazione è stata realizzata su substrato contaminato proveniente da Campo Pisano, CP, (cfr. paragrafo 3.3.1). I risultati osservati su CP sono stati confrontati con quelli ottenuti su un substrato agricolo non contaminato (U), prelevato nella stazione sperimentale Agris-DIRVE, San Michele di Ussana (CA).

Il contenuto di azoto nei substrati è stato analizzato sia prima della semina che alla fine della sperimentazione, per valutare se la presenza di leguminose ne avesse favorito l'aumento.

Sulla biomassa vegetale è stata analizzata la presenza di metalli, per capire se la specie, fosse in grado di estrarre i metalli dal suolo e accumularli nei propri tessuti.

4.5.2 CARATTERISTICHE DEI SUBSTRATI

All'inizio della sperimentazione i substrati sono stati caratterizzati secondo quanto descritto nel capitolo 3, le loro caratteristiche fisico-chimiche sono descritte di seguito.

In Tabella 4.1 e Tabella 4.18 sono descritte le concentrazioni di Cd, Pb e Zn e di nutrienti contenute nella frazione fine dei substrati (<2 mm). Le principali caratteristiche fisico - chimiche dei substrati sono invece riportate in Tabella 4.17.

Tabella 4.17. Concentrazioni di Cd, Pb e Zn nei substrati all'inizio della sperimentazione e confronto con i valori di Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC) previsti dal D.Lgs 152/2006, All.5, Tab.1, Parte V, per Siti ad uso Verde pubblico e privato e residenziale (a) e per siti ad uso commerciale e industriale (b).

Elemento	Ussana [mg kg ⁻¹]	Campo Pisano [mg kg ⁻¹]	CSC (a) [mg kg ⁻¹]	CSC (b) [mg kg ⁻¹]
Cd	*nd	72,2±4,3	2	15
Pb	*nd	3040,5±77,8	100	1000
Zn	74,2±4,3	12779,2±57,8	150	1500

*nd = valore inferiore al limite di rilevabilità strumentale.

Nel substrato Ussana non è stata rilevata la presenza di Cd e Pb mentre il contenuto di Zn corrisponde ad una buona dotazione per un suolo agricolo.

Tabella 4.18. Concentrazioni di nutrienti e caratteristiche fisiche dei substrati all'inizio della sperimentazione.

Parametro	Campo Pisano	Ussana
pH	7,3	7,4
CSC meq/100g	*nd	15,5
Cu (mg kg ⁻¹)	55,4	16,7
Mn (mg kg ⁻¹)	1316,8	310,3
Ca (%)	15,65	13,58
Mg (%)	6,02	0,47
K (%)	0,03	0,28
P biodisponibile (mg kg ⁻¹)	*nd	6,3
N Totale (%)	*nd	0,11 ±0,03
C Totale (%)	6,97±0,07	4,28 ±0,09
C/N	*nd	38,9

*nd = valore inferiore al limite di rilevabilità strumentale.

Come si può osservare dalla Tabella 4.18 i valori di pH sono molto simili fra i substrati. La capacità di scambio cationico è risultata buona in U (Sequi, 1990) mentre è risultata inferiore al limite di rilevabilità in CP.

Per quanto riguarda la presenza di microelementi entrambi i substrati possono essere considerati ricchi in Cu, Mn, Mg e K (ARPAV, 2007).

La percentuale di calcio, simile fra i substrati CP e U, può ritenersi molto elevata. Il contenuto di fosforo biodisponibile, che in CP risulta al di sotto del limite strumentale di rilevabilità, nel

substrato U può dirsi molto scarso. Secondo ARPAV (2007) infatti, può essere considerata buona una dotazione maggiore di 21 ppm di fosforo assimilabile, mentre quando il valore è inferiore a 7 ppm, è considerata molto scarsa.

Il contenuto di azoto, inferiore al limite di rilevabilità strumentale sul substrato CP, nel substrato U ha presentato un tenore medio per suoli agricoli (ARPAV, 2007), da ritenersi sufficiente nel caso il substrato debba ospitare una leguminosa azotofissatrice, in virtù degli incrementi di N che questa vi apporterà. Il rapporto tra contenuto di azoto e quello di carbonio totale (Tabella 4.18), pari a $C/N > 11$, è da considerarsi non ottimale (Sequi, 1989; Arpav, 2007).

4.5.3 GERMINAZIONE E SOPRAVVIVENZA

A partire dalla semina (t_s) durante il primo mese della sperimentazione, è stata osservata la capacità germinativa della specie sui substrati sperimentali, attraverso il monitoraggio settimanale. A partire da questo momento (tg_3) e fino al termine della sperimentazione (t_f), è stata valutata la sopravvivenza delle plantule.

In Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. è rappresentata la percentuale di germinazione rilevata su ogni substrato.

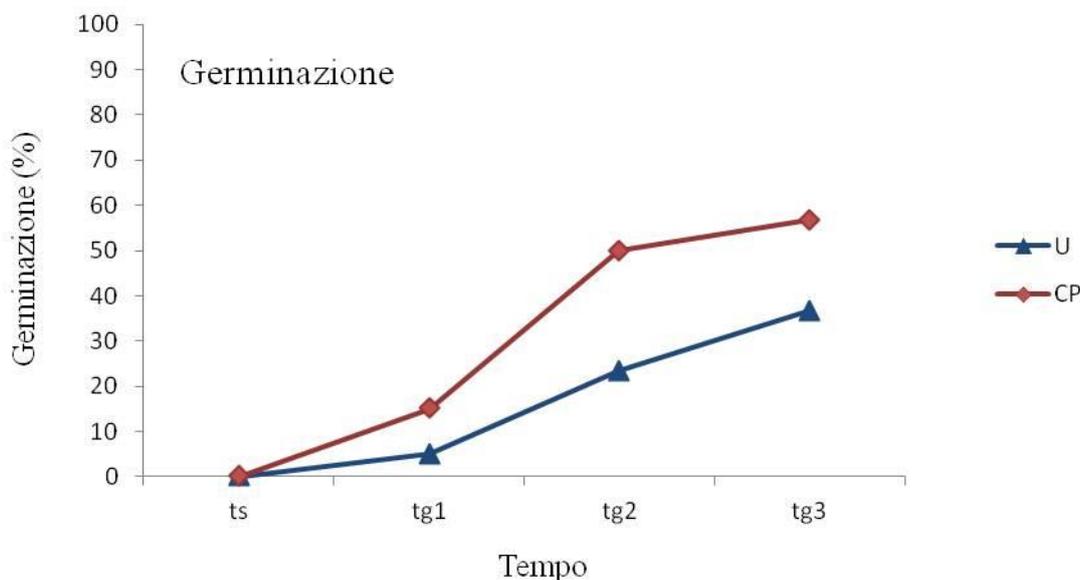


Figura 4.36. Percentuale di germinazione di *Medicago polymorpha* nei substrati sperimentali.

Il processo di germinazione è iniziato durante la prima settimana dopo la semina, dopo 3 settimane dalla semina non sono state osservate ulteriori germinazioni e il periodo della germinazione è stato dichiarato concluso (tg_3).

La percentuale più elevata di germinazione è stata osservata nel substrato contaminato (CP), pari a 56,6%, mentre nel substrato di riferimento (U) è stata pari a 36,6%. Tali valori, da ritenersi molto

bassi in normali attività agronomiche, fanno presupporre che la germinazione non è stata compromessa dalla presenza di metalli.

Il risultato si discosta da quanto osservato da altri lavori sulle leguminose dai quali è emersa una un'influenza della presenza dei metalli sulla germinazione.

Nei substrati contaminati da metalli la germinazione dei semi può risultare compromessa mediante due diversi effetti: la tossicità dei metalli e l'inibizione dell'assorbimento idrico (Kranner e Colville, 2011).

Sulla specie *Medicago sativa* L., Peralta et al. (2001), in coltura idroponica, in soluzioni contenenti 10 ppm di Cd, hanno riscontrato che la germinazione dei semi risulta ridotta del 50% rispetto ad una soluzione non contaminata.

Gli stessi autori, hanno osservato che per quanto riguarda lo Zn, la germinazione non risulta ridotta in nessuna fra le soluzioni sperimentali testate.

In esperimenti condotti in vaso sulla specie *Lupinus albus* L., Fumagalli et al. (2014) hanno confrontato i risultati di germinazione su un substrato contaminato da metalli ed uno di controllo, non contaminato. Questi autori hanno riscontrato che, concentrazioni nel suolo di 500 mg kg⁻¹ Zn danneggiano la germinazione di *Lupinus albus* e che, a concentrazioni Zn nel suolo > di 1500 mg kg⁻¹, la germinazione risulta completamente inibita.

Relativamente alla sopravvivenza delle piante, misurata dopo 8 settimane, si è osservato un valore del 100% in entrambi i substrati, (nessuna delle piante è morta). Da quanto osservato emerge dunque che la specie *Medicago polymorpha* var. Pratosardo è capace di germinare e sopravvivere su substrati ad elevata contaminazione di metalli.

Il risultato si discosta notevolmente da quanto ottenuto per specie differenti di leguminose da Yang et al. (2003), che su *Sesbania rostrata* e *S. sesban*, cresciute per 20 settimane in substrato minerario contaminato da elevate concentrazioni di Zn, Pb e Cd, hanno osservato una percentuale di sopravvivenza molto bassa (18 % in *S. rostrata* e 6,3% in *S. sesban*).

4.5.4 ACCRESCIMENTI E BIOMASSA

Al fine di valutare la capacità della specie *Medicago polymorpha* a crescere sui substrati contaminati sperimentali, è stato studiato l'accrescimento della parte aerea e radicale.

La crescita avvenuta sul substrato contaminato (CP) è stata confrontata con quella su substrato di controllo (U).

La crescita della parte aerea e dell'apparato radicale sono state quantificate attraverso la misura della lunghezza e del peso dei tessuti epigei e radicali rispettivamente, a fine sperimentazione, ovvero dopo due mesi dalla fine della germinazione.

In Figura 4.37 è rappresentata la lunghezza e il peso dei germogli e delle radici rilevate alla fine della sperimentazione sui substrati U e CP.

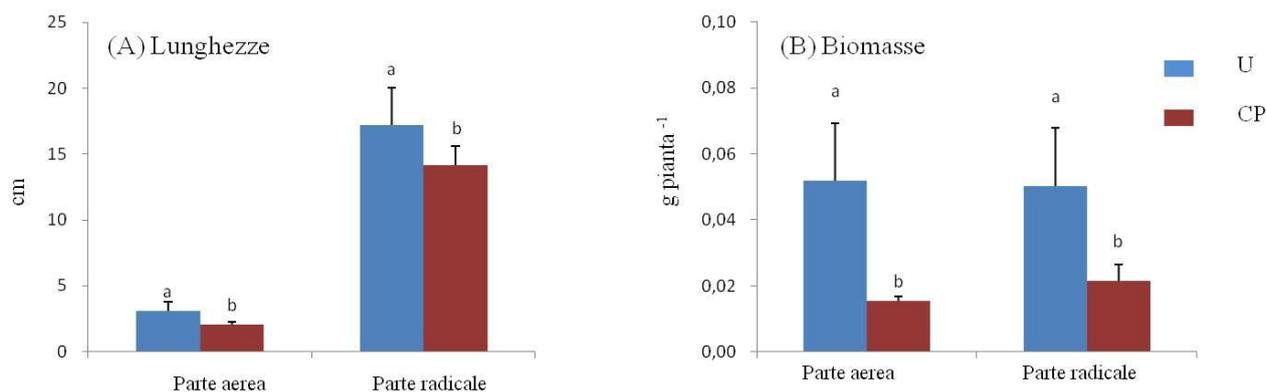


Figura 4.37. Lunghezza aerea e radicale (A) e biomassa aerea e radicale(B): valori rilevati a fine sperimentazione. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano, per ciascun parametro, l'esistenza di differenze statisticamente non significative fra i substrati.

L'altezza delle piante e la lunghezza delle radici sono risultate significativamente differenti nei due substrati sperimentali e maggiori nelle piante cresciute nel substrato non contaminato (U) rispetto a quello contaminato CP (Figura 4.37 A).

Anche i pesi della biomassa aerea e di quella radicale (pesi secchi), sono risultati significativamente differenti nei due substrati. I pesi medi delle parti aeree e delle radici, delle piante cresciute nel substrato contaminato (CP), sono risultati inferiori rispetto a quelli delle piante cresciute nel substrato non contaminato (U), rispettivamente di circa un terzo (parti aeree) e di circa la metà (radici).

Da quanto esposto emerge dunque che la crescita di *Medicago polymorpha* risulta inibita sul substrato minerario. Non risulta chiaro se tale inibizione dipenda dalla tossicità del substrato o dalla particolare scarsità di alcuni elementi nutrienti (N e P).

Relativamente all'effetto sullo sviluppo, dovuto alla presenza dei metalli studiati nel presente lavoro (Zn, Pb e Cd), la letteratura di settore, su specie differenti di leguminose, riporta risultati contrastanti.

Fumagalli *et al.* (2014), sulla specie *Lupinus albus* L., cresciuta su un substrato contaminato da metalli confrontato con uno di controllo non contaminato (in vaso), hanno osservato una limitazione della crescita dovuta ad elevate concentrazioni di Zn. Gli stessi autori hanno rilevato che la crescita di *Lupinus albus* non è inibita dalla presenza di Cd.

Sulla specie *Medicago sativa* L., Peralta *et al.* (2001), in coltura idroponica, in soluzioni contenenti Cd, hanno osservato che, la lunghezza delle radici aumenta a basse concentrazioni e si riduce a concentrazioni elevate del metallo (>20 mg L⁻¹), secondo un fenomeno chiamato "ormesi". Gli stessi autori, hanno osservato che per quanto riguarda lo Zn, la lunghezza radicale non risulta ridotta in nessuna fra le soluzioni sperimentali testate, inclusa quella massima (40 ppm).

Da quanto osservato nella presente sperimentazione è emerso che la specie *Medicago polymorpha* var. Pratosardo è capace di accrescersi su substrati ad elevata contaminazione di metalli. L'accrescimento è risultato ridotto nel substrato contaminato, ma non è risultato chiaro se tale

inibizione dipendesse dalla tossicità del substrato o dalla particolare scarsità di alcuni elementi nutrienti (N e P). Al fine di valutare più in dettaglio le potenzialità della specie in fitorisanamento sarebbe interessante valutare eventuali effetti positivi nell'utilizzo di ammendanti per l'apporto di elementi nutrienti.

4.5.5 CONTENUTI DI AZOTO NEI SUBSTRATI E NEI TESSUTI VEGETALI

Al fine di valutare se la presenza di *Medicago polymorpha* incrementasse la presenza di azoto nel substrato contaminato, è stato rilevato il contenuto di questo elemento sui substrati sperimentali all'inizio e alla fine della sperimentazione.

Al termine della sperimentazione l'analisi del contenuto di azoto totale è stata realizzata su campioni di suolo prelevati dai vasi in cui erano cresciute le piante di *Medicago polymorpha*.

In Figura 4.36 è rappresentato il contenuto di azoto nei substrati all'inizio e al termine della sperimentazione e nei tessuti vegetali.

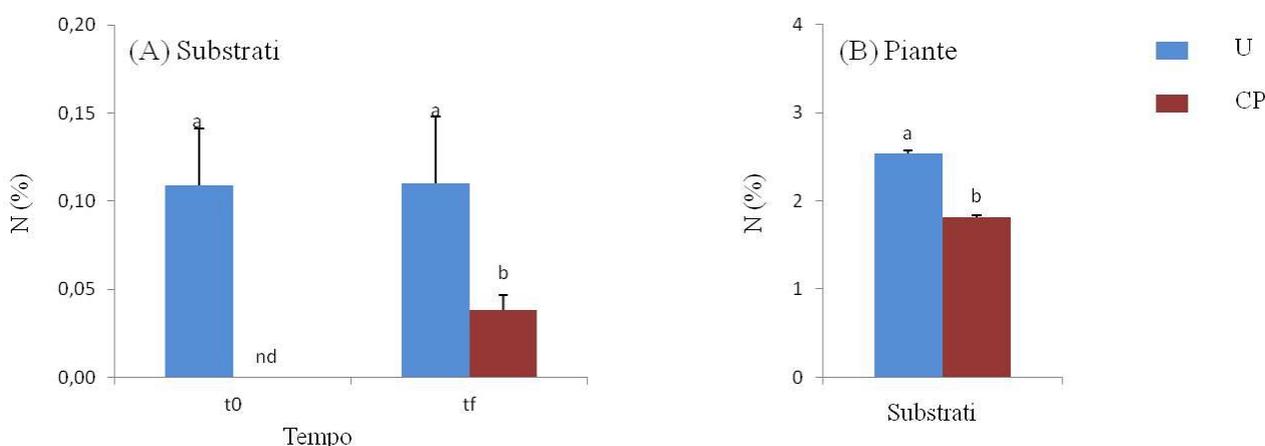


Figura 4.38. Contenuto di azoto rilevato nei substrati all'inizio e al termine della sperimentazione (A) e nei tessuti vegetali a fine sperimentazione (B). Lettere uguali indicano, per ciascun parametro, l'esistenza di differenze statisticamente non significative fra i substrati.

Il contenuto di azoto nelle piante cresciute su substrato contaminato (CP) è risultato più basso, pari circa al 70%, di quello contenuto nelle piante cresciute su substrato U.

Per quanto riguarda il substrato, all'inizio della sperimentazione non è stato possibile quantificare la presenza di azoto nel substrato contaminato (CP), in quanto la concentrazione è risultata inferiore al limite di rilevabilità strumentale che corrisponde a 0,01% (Cfr Tabella 4.19.)

Alla fine della sperimentazione è stato possibile osservare che la concentrazione di azoto nel substrato CP è aumentata. La concentrazione di azoto rilevata su CP, è risultata comunque significativamente più bassa rispetto a quella del substrato non contaminato (U).

Da quanto esposto si può osservare che la presenza di *Medicago polymorpha*, in questa fase sperimentale, ha incrementato il contenuto di azoto nel substrato. Questo risultato si differenzia da quanto osservato su un'altra specie di leguminosa da Fumagalli *et al.* (2014) che, dopo 6 mesi di

coltivazione di *Lupinus albus*, non hanno riscontrato incrementi di azoto né su un suolo contaminato da metalli né su un suolo di confronto non contaminato.

Relativamente alla fissazione dell'azoto nella presente sperimentazione, il risultato ottenuto mostra che nei substrati deve esserci stata la presenza di rizobatteri. E' importante ricordare infatti che affinché il fenomeno possa avvenire è necessaria la simbiosi tra pianta e rizobatteri. Questi ultimi intervengono oltre che nell'azotofissazione anche nella mobilizzazione del fosforo del suolo, rendendolo biodisponibile. L'importanza dei rizobatteri associati alle piante leguminose in fitorisanamento viene sottolineata da Hao *et al.* (2014).

4.5.6 CLOROFILLA E CAROTENOIDI

Con il fine di indagare sulla tolleranza della specie *Medicago polymorpha* ad elevate concentrazioni di metalli nel substrato, è stato valutato il contenuto di pigmenti fotosintetici.

L'analisi dei pigmenti fotosintetici presenti nelle foglie, è stata realizzata confrontando fra loro i risultati ottenuti nei substrati di accrescimento. A tal fine è stato valutato il contenuto dei singoli tipi di clorofilla, ovvero clorofilla a (C_a) e clorofilla b (C_b) e il contenuto di clorofille totali, che corrisponde alla somma dei due tipi descritti (C_{a+b}).

Un'altra analisi sui pigmenti è stata realizzata per valutare il contenuto di caroteni e xantofille (C_{x+c}), chiamati anche carotenoidi.

Un elevato contenuto in clorofille serve, in linea generale, ad indicare lo stato di benessere della pianta, elevate concentrazioni di caroteni e xantofille possono invece indicare la presenza di processi di stress. Anche un basso valore del rapporto fra il contenuto di clorofilla e quello di caroteni e xantofille (C_{a+b}/C_{x+c}) può risultare particolarmente indicativo nell'individuazione di stati di stress.

In Figura 4.39 vengono riportati i dati relativi al contenuto di pigmenti fotosintetici riscontrati nelle piante a fine sperimentazione.

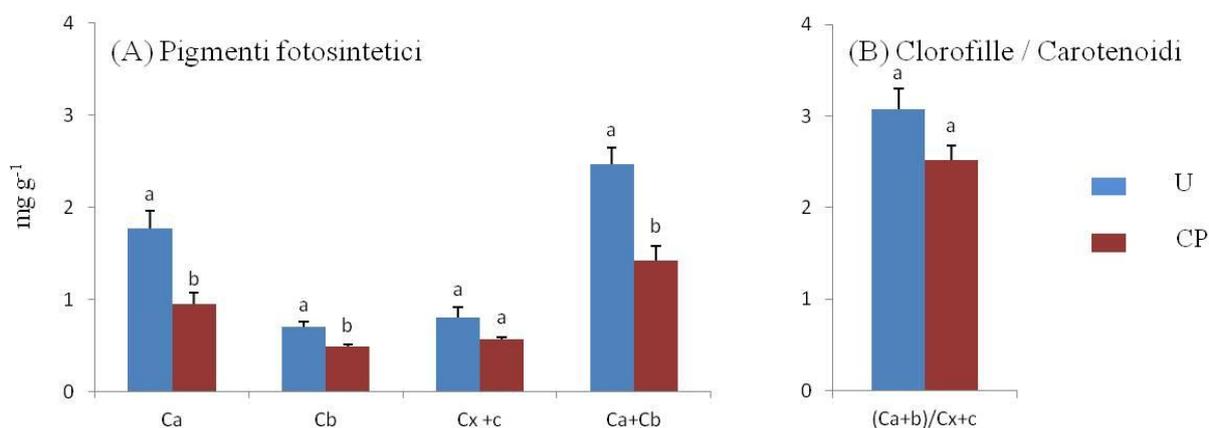


Figura 4.39. Contenuto di pigmenti fotosintetici nelle piante. Lettere uguali indicano, per ciascun parametro, l'esistenza di differenze statisticamente non significative nello stesso substrato.

Il contenuto di Clorofilla a (C_a) e clorofille totali (C_a+C_b) è risultato significativamente differente fra le piante cresciute sul substrato di controllo (U) e quelle cresciute nel substrato contaminato (CP). Il contenuto di caroteni e xantofille (C_{x+c}) invece, non mostra differenze significative fra le piante del substrato U e quelle del substrato CP, analogamente a quanto riscontrato nel rapporto tra il contenuto totale di clorofille e quello di caroteni (C_a+C_b/C_{x+c}).

Per quanto riguarda il contenuto di Clorofilla totale ($C_a + C_b$) e di clorofilla a (C_a), il risultato può dirsi in accordo con quanto osservato da Mondal *et al.* (2015) che, su plantule di *Vigna radiata* cresciute su substrato irrorato con soluzioni contenenti concentrazioni crescenti di Hg, hanno riscontrato che i contenuti di questi pigmenti sono significativamente maggiori nelle piante non trattate rispetto a quelle trattate.

A differenza di quanto rilevato nella presente sperimentazione, gli stessi autori hanno osservato che i contenuti di clorofilla b (C_b) differiscono significativamente fra le piante trattate e quelle non trattate e che il contenuto di pigmenti fotosintetici decresce all'aumentare dei livelli di Hg nel substrato.

Anche Dey e Mondal (2016), su *Cicer arietinum*, hanno osservato che il contenuto di Clorofilla totale ($C_a + C_b$), di clorofilla a (C_a), di clorofilla b (C_b) e di carotenoidi (C_{x+c}), decresce all'aumentare della concentrazione di metalli (Cr e Pb) nelle soluzioni distribuite al substrato di accrescimento (in placche Petri).

Le analisi mostrano dunque che le piante cresciute sul substrato non contaminato presentano livelli maggiori di clorofilla, indice di un migliore attività fotosintetica rispetto a quelle cresciute sul substrato contaminato. Ciò nonostante, se si utilizza come indicatore il rapporto fra clorofille e carotenoidi (C_{a+b}/C_{x+c}), emerge che queste ultime non hanno evidenziato particolari segni di stress.

4.5.7 ACCUMULO DI METALLI

Al fine di valutare la capacità della specie *Medicago polymorpha* a traslocare metalli nei propri tessuti dai substrati contaminati, è stata studiata la concentrazione di metalli nelle piante cresciute sui substrati sperimentali.

Le concentrazioni medie di Zn, Pb e Cd, rilevate nelle piante a fine sperimentazione, sono rappresentate in Figura 4.40.

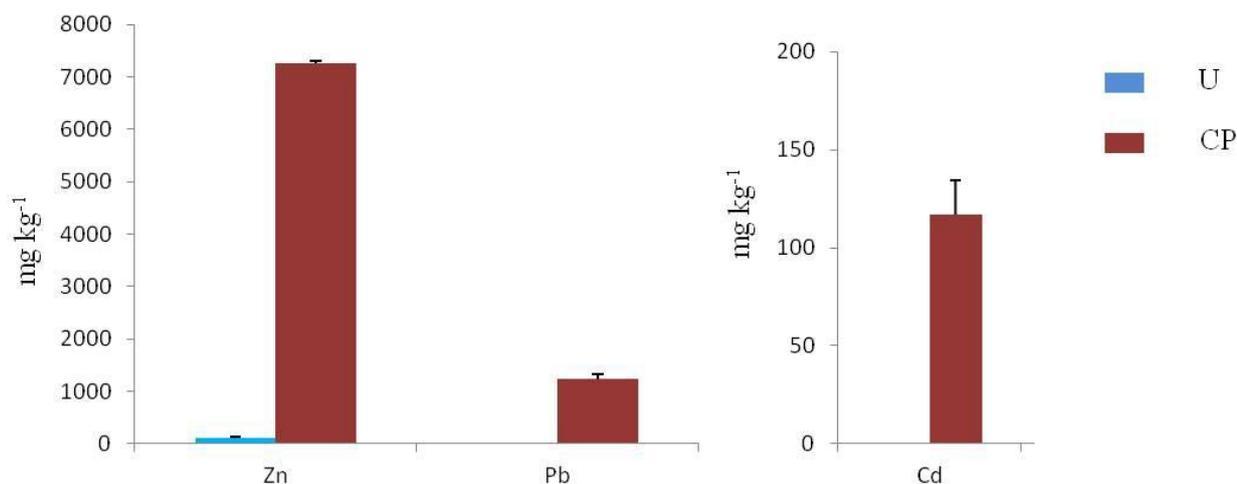


Figura 4.40. Concentrazioni di Cd, Pb, Zn nelle piante al termine della sperimentazione.

Nelle piante di medica polimorfa cresciuta su substrato CP, sono stati raggiunti elevate concentrazioni di metalli e le piante hanno mostrato una particolare predisposizione nell'accumulare Zn rispetto a Pb e a Cd. La concentrazione media di Zn rilevata è stata pari a 7268 mg kg^{-1} , quella di Pb 1227 mg kg^{-1} e quella di Cd circa 117 mg kg^{-1} .

Le concentrazioni di Zn riscontrate nella presente sperimentazione, possono dirsi in linea con quelle rilevate nei tessuti aerei della specie *Medicago sativa* da Peralta *et al.* (2001), in coltura idroponica (pari a circa 4000 mg kg^{-1}) mentre risultano nettamente inferiori a quelli rilevati nelle radici ($>22000 \text{ mg kg}^{-1}$) dagli stessi autori.

Per quanto riguarda il Cd, i valori riscontrati nella presente sperimentazione sono nettamente inferiori a quelli riscontrati da Peralta *et al.* (2001) che hanno riportato circa 4000 e 7000 ppm rispettivamente nelle parti aeree e radicali.

Fumagalli *et al.* (2014), sulla specie *Lupinus albus* L., cresciuta su substrati contaminati da soluzioni a concentrazioni crescenti di metalli (in vaso), hanno osservato una elevata propensione all'assorbimento radicale di Cd (circa 1600 mg kg^{-1}) e di Zn (circa 3500 mg kg^{-1}). I valori di metalli di rilevati da questi autori nelle parti aeree di *Lupinus albus* sono invece nettamente inferiori a quelli riscontrati sull'intera pianta nella presente sperimentazione.

Da quanto esposto si osserva che la specie *Medicago polymorpha* var. Pratosardo, cresciuta su suoli ad elevata contaminazione da metalli, è in grado di estrarre metalli dal substrato ed accumularne elevate concentrazioni nei propri tessuti.

4.5.8 CONCLUSIONI

Lo scopo della sperimentazione è stato quello testare la capacità di germinazione, sopravvivenza e l'adattamento nella prima fase di sviluppo, della specie *Medicago polymorpha* var. Pratosardo, in suoli ad elevata contaminazione da metalli.

Relativamente alla germinazione, il lavoro ha mostrato che nonostante si siano ottenuti valori del parametro molto bassi (56% su CP) rispetto a quelli attesi per le normali attività agronomiche, è stato possibile verificare che la germinazione non è stata compromessa dalla presenza di metalli nel substrato, la stessa è stata infatti superiore sul substrato contaminato rispetto a quello non contaminato.

Tutte le piante germinate sono arrivate a fine sperimentazione, la sopravvivenza a 8 settimane è stata dunque del 100% in entrambi i substrati. E' emerso dunque che la specie *Medicago polymorpha* var. Pratosardo è capace di germinare e sopravvivere su substrati ad elevata contaminazione di metalli.

Relativamente all'accrescimento si è potuto verificare che le piante sul substrato contaminato sono cresciute meno di quelle del substrato non contaminato. Ciò nonostante non è stato possibile appurare se tale differenza dipendesse dalla tossicità del substrato o dalla particolare scarsità di alcuni elementi nutrienti (N e P). Al fine di valutare più in dettaglio le potenzialità della specie in fitorisanamento sarebbe dunque interessante valutare eventuali effetti positivi nell'utilizzo di ammendanti per l'apporto di elementi nutrienti.

Relativamente alla fissazione dell'azoto, si è verificato che sul suolo contaminato dove a inizio sperimentazione la presenza dell'elemento non era rilevabile, in quanto al di sotto del limite di rilevanza strumentale, a fine sperimentazione è stato misurato un aumento apprezzabile nelle concentrazioni dell'elemento. La possibilità di usare questa leguminosa in fitorisanamento, è dunque auspicabile oltre che per svolgere funzione di copertura del terreno, anche per sua capacità di incrementare il contenuto di azoto nel suolo e migliorarne la fertilità.

Le analisi relative al contenuto di clorofille e dei carotenoidi che le piante, su entrambi i substrati, non hanno evidenziato particolari segni di stress. Dall'analisi delle concentrazioni dei metalli nei tessuti si è potuto osservare che la specie *Medicago polymorpha* var. Pratosardo, cresciuta su suoli ad elevata contaminazione da metalli, è in grado di estrarre metalli dal substrato ed accumularne elevate concentrazioni nei propri tessuti senza mostrare evidenti segni di stress a causa della loro presenza.

4.6 M2 - Studi sulla germinazione e l'adattamento della specie *Medicago polymorpha* su suoli contaminati da metalli pesanti in Sardegna

4.6.1 INTRODUZIONE

4.6.1.1 OBIETTIVI

Sulla base dei risultati ottenuti nella sperimentazione M1, in M2 si è voluta approfondire ulteriormente la conoscenza sulla leguminosa autoctona isolana *Medicago polymorpha* var. Pratosardo al fine della sua introduzione in attività di fitorisanamento di suoli ad elevata contaminazione da metalli pesanti.

A questo scopo, è stata testata la sua capacità di germinazione, sopravvivenza e sviluppo fino a fioritura, su substrato contaminato.

Un altro obiettivo di questa sperimentazione è stato studiare se l'introduzione di ammendanti potesse migliorare la performance della specie in ambito di fitorisanamento. A tale scopo la matrice mineraria contaminata è stata ammendata ed è stata valutata l'influenza degli ammendanti sulla germinazione, la sopravvivenza e sullo sviluppo di biomassa aerea e radicale.

4.6.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

Il lavoro sperimentale è stato suddiviso in due fasi.

Nella prima fase semi di *Medicago polymorpha* sono stati fatti germinare in un substrato contaminato puro (CP) e contaminato ammendato (CP+A). La germinazione avvenuta su questi substrati è stata confrontata con quella su substrato proveniente da un suolo agricolo ottimale (U). La germinazione è avvenuta in *plateaux* di polistirolo apposti per la semina, disponendo 50 semi in ciascun substrato. Questa prima fase è durata quattro settimane dal momento della semina (t_s) a quello di fine della germinazione (t_{g4}).

Tra la fine della prima fase corrispondente con la fine della germinazione (t_{g4}) e l'inizio della seconda fase, corrispondente col trapianto (t_m), le piante sono rimaste a vegetare nel substrato di germinazione per 1 mese.

Nella seconda fase, un campione di piante ottenuto dalla prima fase, in numero di 10 piante per ogni substrato, è stato trapiantato in vaso e monitorato fino a fioritura. Questa seconda fase ha avuto una durata di due mesi, intercorsi tra il momento del trapianto in vaso (t_m) e quello della fioritura (t_f).

Per quanto riguarda i substrati, come descritto nel paragrafo 3.5-M2, il substrato ottimale U proviene da un suolo agricolo non contaminato (U), prelevato nella stazione sperimentale Agris-DIRVE, San Michele di Ussana (CA).

Il substrato CP, è costituito esclusivamente dalla matrice di Campo Pisano.

Il substrato CP+A è costituito dalla matrice di Campo Pisano miscelata a compost, sabbia e ghiaia nelle seguenti proporzioni in volume: 3:1:1 rispettivamente di Campo Pisano, compost, inerti (cfr par. 3.5-M2).

Nella prima fase sperimentale, sulla specie *medicago polymorpha* è stata valutata la performance germinativa, mentre nella fase successiva è stata valutata la sopravvivenza, il numero di piante giunte a fioritura e lo sviluppo di biomassa aerea e radicale.

4.6.2 CARATTERISTICHE DEI SUBSTRATI

I substrati utilizzati nella sperimentazione corrispondono a CP e CP+A utilizzati nella sperimentazione A4 (Cfr. par. 4.4.2) e ad U utilizzato nella sperimentazione M1 (Cfr. par. 4.5.2). Le caratteristiche chimico fisiche sono pertanto le stesse descritte per le sperimentazioni A4 e M1 e per i dettagli si rimanda ad esse.

4.6.3 GERMINAZIONE E SOPRAVVIVENZA

4.6.3.1 GERMINAZIONE

Al fine di valutare la capacità germinativa di *Medicago polymorpha* sui substrati, a partire dalla semina (ts), è stata monitorata settimanalmente la germinazione.

Sulle piante così ottenute è stata valutata la sopravvivenza prima che avvenisse il trapianto in vaso (tm). Sulle piante trapiantate in vaso infine, è stata rilevata la sopravvivenza al termine della sperimentazione (tf).

Alla fine della sperimentazione si è verificato inoltre se le piante cresciute sui substrati contaminati fossero in grado di giungere a fioritura.

In Figura 4.39 è rappresentata la percentuale di germinazione rilevata su ogni substrato.

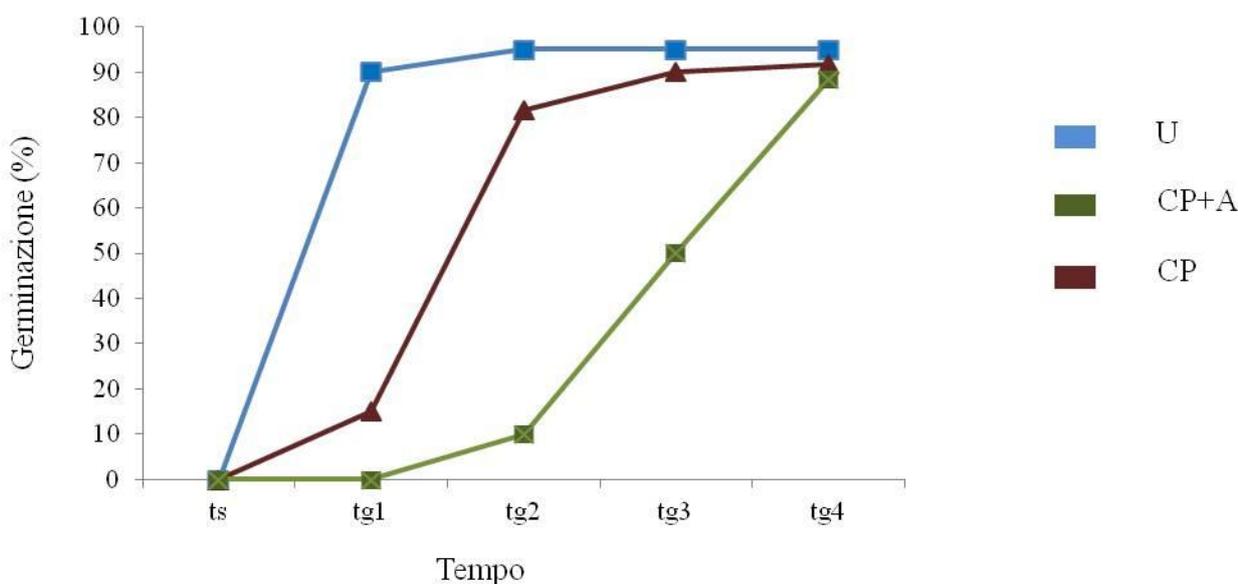


Figura 4.41. Germinazione dei semi: percentuali rilevate in ogni substrato, in relazione al tempo.

La percentuale di semi germinati è stata molto simile nei tre substrati e ha rispettato il seguente ordine decrescente: 98% in U, 97% in CP, 94% in CP+A.

Nei tre substrati è osservato un diverso trend di germinazione, in quanto più rapida nel substrato di origine agricola e lenta nel substrato contaminato ammendato. Nel substrato U infatti, al termine della prima settimana dopo la semina, aveva germinato il 90% dei semi, mentre in CP aveva germinato solo il 15% e in CP+A nessun seme. Nei substrati contaminati, a 3 settimane dalla semina, la germinazione aveva interessato il 90% dei semi in CP e solo il 50% in presenza di compost. La germinazione è stata completata in tutti i substrati dopo 4 settimane dalla semina.

I risultati ottenuti riguardo la germinazione, indicano che questa attività non è risultata compromessa dalla presenza di metalli. In presenza di ammendante, la germinazione è avvenuta lentamente rispetto al substrato di controllo (U) e a quello contaminato non ammendato (CP), ma ha raggiunto elevate percentuali nell'arco di un mese.

I risultati ottenuti per la germinazione si discostano da quanto osservato sulla specie *Medicago sativa* L., da Peralta et al. (2001), che, in coltura idroponica, in soluzioni contenenti 10 ppm di Cd, hanno riscontrato che la germinazione dei semi risulta ridotta del 50% rispetto ad una soluzione non contaminata. Allo stesso tempo, per quanto riguarda lo Zn, questi autori hanno osservato che, la germinazione non risulta ridotta in nessuna fra le soluzioni sperimentali testate.

I risultati ottenuti nella presente sperimentazione discordano anche da quanto riportato da Fumagalli et al. (2014) che, in esperimenti condotti in vaso sulla specie *Lupinus albus* L., hanno confrontato i risultati di germinazione su un substrato contaminato da metalli ed uno di controllo, non contaminato. Questi autori hanno infatti riscontrato che, elevate concentrazioni di Zn nel suolo ($500 > \text{di } 1500 \text{ mg kg}^{-1}$) possono danneggiare la germinazione fino a inibirla completamente.

Per quanto riguarda la sopravvivenza, prima del trapianto nei vasi (tm), nei substrati U e CP non è stata registrata nessuna mortalità mentre in CP+A la sopravvivenza è stata pari al 98%.

Sulle piante cresciute in vaso, al termine della sperimentazione (tf), sulle 10 piante trapiantate su ogni substrato, sono sopravvissute tutte quelle che cresciute sul substrato U (100%), mentre in ciascuno dei substrati contaminati (CP e CP+A) è stata osservata una notevole mortalità, a fine sperimentazione sono sopravvissute solo 3 piante su 10 (30%).

Relativamente alla sopravvivenza, il risultato ottenuto può dirsi in accordo con quanto osservato da Yang et al. (2003), su *Sesbania rostrata* e *S. sesban*, cresciute per 20 settimane in substrato minerario contaminato da elevate concentrazioni di Zn, Pb e Cd. Tali autori infatti, sulle specie esaminate, hanno osservato una percentuale di sopravvivenza molto bassa (18 % in *S. rostrata* e 6,3% in *S. sesban*).

Da quanto osservato emerge dunque che la specie *Medicago polymorpha* var. Pratosardo è risultata capace di germinare e sopravvivere su substrati ad elevata contaminazione di metalli.

Nei substrati contaminati, nel lungo periodo, la specie ha mostrato un basso tasso di sopravvivenza e nessuna pianta ha mostrato segni di induzione fiorale, mentre tutte le piante cresciute nel substrato non contaminato U hanno raggiunto la fase riproduttiva.

L'apporto di ammendante non ha interferito nella percentuale di germinazione ma ha influito sui tempi di germinazione aumentandoli. Per quanto riguarda la sopravvivenza, si può dire che l'ammendante non ha apportato miglioramenti.

4.6.4 PRODUZIONE DI BIOMASSA

Al fine di valutare la capacità della specie *Medicago polymorpha* a crescere sui substrati contaminati sperimentali è stato studiato l'accrescimento della parte aerea e radicale confrontandolo con quello delle piante cresciute su substrato di controllo (U).

La crescita della parte aerea e dell'apparato radicale sono state quantificate prima del trapianto (t_m) e alla fine della sperimentazione (t_f).

Più precisamente, al momento t_m , sulle piante destinate al trapianto, sono state rilevate le lunghezze delle parti aeree e di quelle radicali. Alla fine della sperimentazione, sulle piante presenti su ogni substrato contaminato (3 su 10 iniziali) sono stati rilevati le lunghezze e i pesi della biomassa aerea e di quella radicale. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli rilevati su un campione (3 piante) prelevato dal substrato di origine agricola (U).

In Figura 4.42 è rappresentata la lunghezza della parte aerea e delle radici rilevate prima del trapianto sui substrati e alla fine della sperimentazione.

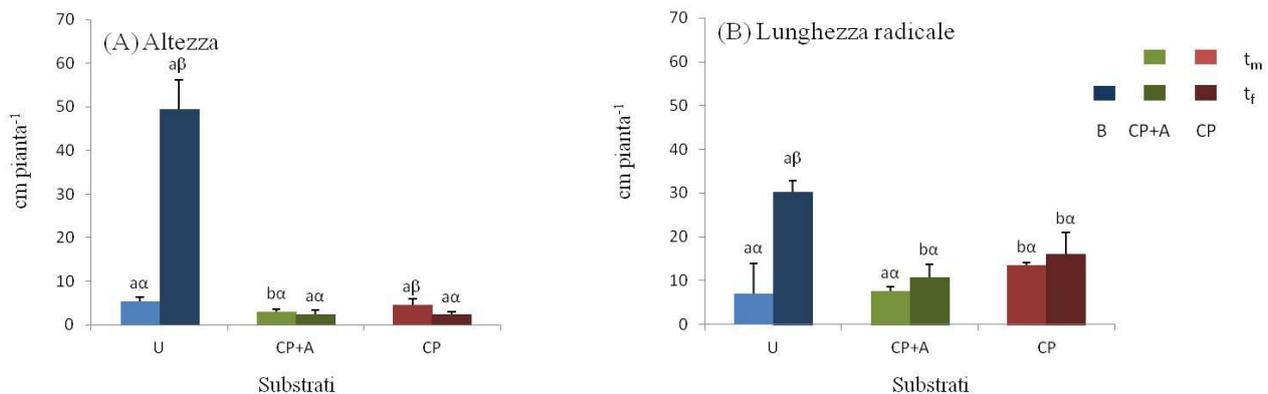


Figura 4.42. Altezze della parte aerea (A) e lunghezza degli apparati radicali (B): valori medi riscontrati nel tempo in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative tra i substrati durante lo stesso campionamento. Le lettere α e β , indicano, per ciascun substrato, l'esistenza di differenze statisticamente significative nel tempo.

L'altezza delle piante e la lunghezza delle radici misurate a fine sperimentazione sono risultate significativamente differenti tra i substrati sperimentali. Le piante cresciute nel substrato non contaminato (U) sono cresciute maggiormente che nei substrati contaminati (CP e CP+A).

In Figura 4.43 è rappresentata la biomassa della parte aerea e delle radici rilevata alla fine della sperimentazione.

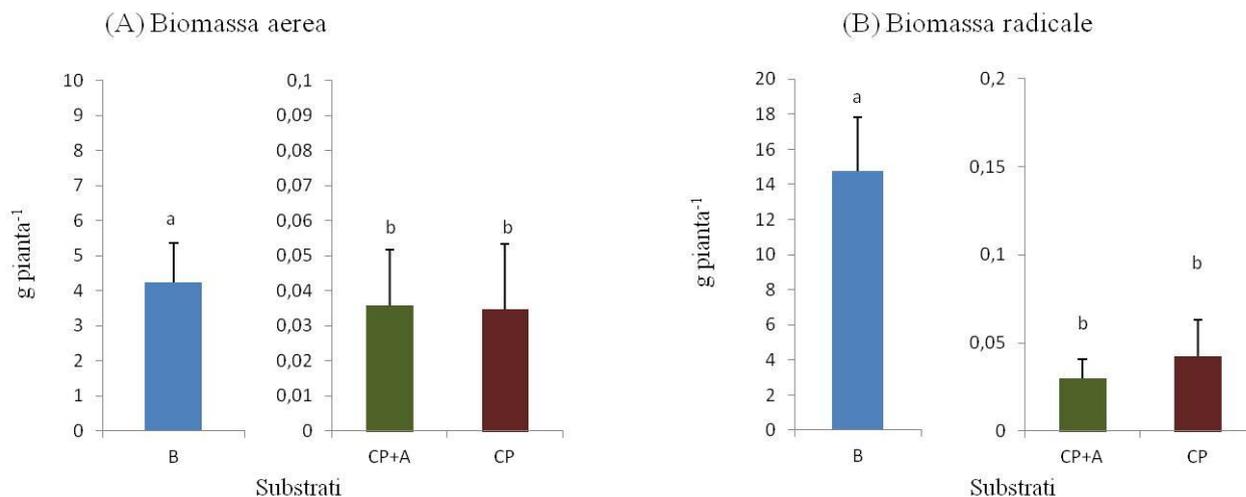


Figura 4.43. Biomassa della parte aerea (A) e radicale (B), valori medi riscontrati in relazione ai diversi substrati. Le barre indicano la deviazione standard dalla media. Lettere uguali indicano l'esistenza di differenze statisticamente non significative tra i substrati.

La quantità di biomassa prodotta nelle piante crescite sul substrato di controllo (U), è risultata molto più elevata di quella prodotta dalle piante cresciute nei substrati contaminati (CP e CP+A).

Da quanto osservato emerge che il substrato contaminato ha limitato l'accrescimento delle piante l'introduzione dell'ammendante non ha apportato beneficio allo sviluppo delle piante.

Il risultato ottenuto può dirsi in accordo con quanto osservato da diversi autori su diverse specie di leguminose. Fumagalli *et al.* (2014), sulla specie *Lupinus albus* L., cresciuta su un substrato contaminato da metalli confrontato con uno di controllo non contaminato (in vaso), hanno osservato una limitazione della crescita alla fine della sperimentazione (45-55 giorni dalla germinazione) dovuta ad elevate concentrazioni di Zn. Gli stessi autori hanno rilevato che la crescita di *Lupinus albus* risulta inibita dalla presenza di Cd.

Da quanto esposto emerge dunque che, la specie *Medicago polymorpha*, è capace di vegetare su substrati ad elevata contaminazione da metalli, ma il suo sviluppo risulta notevolmente ridotto, anche in presenza degli ammendanti.

In CP e CP+A per esempio la biomassa secca e quella fresca sono molto simili, a differenza di quanto avviene in U. Il contenuto idrico dei tessuti infatti, nelle piante U è risultato dell'ordine del 90%, mentre nelle piante cresciute nei substrati contaminati è risultato intorno al 30%.

4.6.5 CONCLUSIONI

Da quanto finora osservato riguardo la crescita di medica polimorfa su substrato contaminato, si può sostenere che la specie ha mostrato buona capacità di germinazione, ma un adattamento limitato all'avanzare del ciclo vitale.

Il substrato di accrescimento ha sicuramente costituito il fattore limitante per la specie, ma non necessariamente a causa della sola presenza dei metalli. Un importante fattore che ha agito sinergicamente alla tossicità da metalli è stata la scarsa disponibilità di nutrienti. La scarsità di nutrienti infatti costituisce un fattore limitante per lo sviluppo delle piante e per l'instaurarsi di simbiosi azotofissatrice. Nel substrato contaminato, l'ammendante non ha fornito un sufficiente quantitativo di nutrienti.

Per esplorare la possibilità di introdurre *Medicago polymorpha* in fitorisanamento di suoli contaminati da metalli, si ritiene necessario approfondire lo studio mediante l'introduzione di inoculi batterici e incremento di nutrienti (P e N) nel substrato.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

L'obiettivo principale della tesi è stato valutare la possibilità di utilizzare la specie *Atriplex halimus* per il fitorisanamento di suoli ad elevata contaminazione da metalli in Sardegna. Per raggiungere tale obiettivo, sono state sviluppate le sperimentazioni A1, A2, A3, A4, all'interno delle quali sono stati perseguiti diversi obiettivi specifici.

Un'altro obiettivo, è stato quello di valutare la possibilità di utilizzare la specie *Medicago polymorpha* (famiglia *Fabaceae*) nel fitorisanamento di suoli contaminati da metalli. A tale scopo sono state sviluppate le sperimentazioni M1 e M2.

Di seguito vengono riassunti i principali risultati emersi durante l'intero lavoro, separatamente per le specie *Atriplex halimus* e *Medicago polymorpha*.

5.1 Specie *Atriplex halimus*

Le attività sperimentali realizzate sulla specie *Atriplex halimus* possono essere riassunte brevemente come di seguito.

- In ogni sperimentazione sono state studiate le capacità di sopravvivenza e di adattamento, la produzione di biomassa e l'accumulo di metalli nei tessuti da parte della specie, cresciuta su substrati contaminati.
- Mediante l'introduzione di ammendanti sono state create diverse combinazioni di substrati e si è valutato se tale introduzione potesse consentire di raggiungere una migliore performance produttiva della specie in ambito di fitorisanamento.
- Sono state testate diverse soluzioni di impianto e di produzione del materiale vegetale che permettessero di ottenere di elevati standard di produzione per la specie *Atriplex halimus* in fitorisanamento, compatibilmente con un contenimento dei costi.
- È stata studiata la potenzialità di fitorisanamento e di produzione di biomassa della specie *Atriplex halimus* mediante una selezione clonale, nell'ottica di una coltivazione produttiva mirata al risanamento di suoli contaminati da metalli.

Secondo quanto emerso dai risultati ottenuti nelle diverse sperimentazioni eseguite nel presente lavoro, si è potuto valutare positivamente la possibilità di utilizzare la specie *Atriplex halimus* nel risanamento di suoli minerari in Sardegna. Nel seguito del presente paragrafo vengono discussi i diversi aspetti.

ADATTAMENTO E SOPRAVVIVENZA

La specie *Atriplex halimus* ha mostrato un'ottima capacità di adattarsi e crescere su substrati contaminati da elevate concentrazioni di metalli, senza evidenziare rilevanti effetti dovuti alla tossicità degli stessi.

La sopravvivenza delle piante sui suoli contaminati è stata elevata sia nel caso di impianto di materiale vegetale adulto (sperimentazione A1), sia nel caso di impianto di barbatelle (sperimentazione A2, A3).

ACCRESCIMENTI E SVILUPPO DI BIOMASSA

La specie *Atriplex halimus* ha mostrato un'importante capacità di accrescersi sui substrati contaminati da elevate concentrazioni di metalli ed in particolare in presenza di ammendanti organici.

Nella sperimentazione A1, in cui non sono stati introdotti ammendanti organici, non è stato possibile rilevare statisticamente un accrescimento della biomassa nei substrati contaminati ammendati con materiale inerte.

Nel caso in cui l'impianto è avvenuto mediante talea (sperimentazione A2), la specie ha mostrato una discreta capacità a sviluppare germogli e ad emettere radici sui substrati ad elevata contaminazione.

L'accrescimento e lo sviluppo di biomassa è stato particolarmente evidente in presenza di ammendanti organici, tale effetto è stato osservato nelle sperimentazioni A3 e A4.

La selezione clonale (sperimentazione A4) ha permesso di individuare l'esistenza di differenze nella produzione di biomassa fra cloni. In presenza di ammendante infatti, è stata osservata una maggiore propensione allo sviluppo di biomassa da parte di alcuni cloni rispetto ad altri e fra questi, di particolare rilievo sono stati i risultati relativi al clone NC2.

SOLUZIONI DI IMPIANTO

Dopo aver verificato la capacità di piante adulte di *Atriplex halimus* (sperimentazione A1) a sopravvivere e crescere su suoli contaminati, è stata dimostrata anche la possibilità di impianto di talee (sperimentazione A2) e di barbatelle (sperimentazioni A3, A4).

Tutte le soluzioni di impianto testate, si sono dimostrate efficaci e, in vista di una coltivazione per fitorisanamento, potrebbero consentire una notevole riduzione dei costi, sia in fase di produzione delle piante sia in fase di impianto.

La coltivazione di talee capaci di radicare in campo (sperimentazione A2), necessita di procedimenti molto semplificati nella produzione del materiale vegetale, rispetto al caso della coltivazione di piante complete. L'impianto di talee inoltre, può essere applicato con maggiore facilità nei casi in cui le condizioni del piano di coltivazione si mostrino difficili, come in presenza di pendenze elevate o nei casi in cui risulti molto difficoltoso intervenire con i mezzi meccanici per la preparazione del terreno pre - impianto.

L'utilizzo di barbatelle (sperimentazioni A3, A4) può consentire la riduzione dei tempi di produzione del materiale vegetale, evitando che lo stesso stanzii in vivaio prima dell'impianto.

ACCUMULO METALLI

La specie ha mostrato un'importante capacità di assorbire metalli e una particolare predisposizione nell'accumulare Zn rispetto a Pb e a Cd.

Per tutti i metalli le concentrazioni nei tessuti hanno mostrato un aumento nel tempo e, nella maggior parte dei casi, valori più elevati nei tessuti radicali rispetto a quelli aerei.

Per quanto riguarda la ripartizione dei metalli nei tessuti della parte aerea, per lo Zn è stata osservata una maggiore concentrazione nelle parti verdi rispetto ai tessuti legnosi, mentre la ripartizione di Pb e di Cd fra i tessuti aerei (verdi e legnosi) non ha mostrato un andamento omogeneo.

Nelle sperimentazioni A3 e A4, si è potuta constatare l'importante influenza che l'introduzione di ammendante organico (compost) ha avuto nell'accumulo epigeo di metalli. Nei tessuti aerei, si è osservata infatti un'ottima propensione all'accumulo di Zn e Pb nelle piante che, grazie alla presenza di ammendanti organici, hanno sviluppato maggiore biomassa.

Sempre nelle parti epigee e relativamente a Zn e Pb, si è osservato un assorbimento simile fra le piante cresciute nel substrato non ammendato (CP) e quelle cresciute in presenza di ammendante organico (CP+A), nonostante in quest'ultimo le concentrazioni di metallo risultassero notevolmente diluite.

Per quanto riguarda il Cd, le concentrazioni sono risultate basse sia nei tessuti aerei che in quelli radicali e la presenza di ammendanti non ha avuto importante influenza sul suo accumulo nei tessuti vegetali.

Relativamente alla variabilità fra cloni (sperimentazione A4), di particolare rilievo sono stati i risultati relativi al clone NC2. Tale clone, su substrato contaminato, grazie alla maggiore propensione allo sviluppo di biomassa aerea che ha mostrato in presenza di ammendante organico (CP+A), si è distinto per la maggiore capacità di accumulare metalli.

ATTITUDINE DELLA SPECIE AL FITORISANAMENTO

Dai valori del fattore di traslocazione calcolati (sperimentazioni A1, A3, A4) è emerso che in generale le piante hanno avuto una maggiore propensione all'accumulo radicale rispetto a quello aereo ($TF < 1$) ma in diversi casi, nella sperimentazione A4, è stato osservato un comportamento opposto ($TF > 1$).

Secondo i risultati relativi al TF, la specie *Atriplex halimus*, potrebbe dirsi adatta a svolgere sia fitostabilizzazione che fitoestrazione.

Le specie adatte alla fitostabilizzazione dovrebbero essere quelle in cui la capacità di concentrare metalli presenti un rapporto < 1 tra le parti aeree e le radici (Mendez e Maier, 2008) mentre per svolgere fitoestrazione dovrebbero essere capaci di accumulare elevate concentrazioni di metalli nelle parti asportabili (Kidd *et al.*, 2015) e/o TF o $BCF > 1$ (Van der ent *et al.*, 2013).

È opportuno specificare però che tale distinzione può essere superata se si tiene conto della elevata capacità di accumulare metalli nei tessuti asportabili, da parte di specie che producono un'elevata quantità di biomassa. Le piante che producono un'elevata quantità di biomassa e che accumulano moderati livelli di metalli nei loro tessuti, sono infatti consigliate per svolgere fitorisanamento,

proprio perché la bassa concentrazione di contaminanti nei tessuti può essere compensata dall'elevata quantità di biomassa aerea (Van Oosten e Maggio, 2015).

CAPACITÀ DI FITOESTRAZIONE

A partire dalla quantità di biomassa asportabile e dalla concentrazione di metallo nei tessuti, è possibile stimare la quantità di metallo fitoestraibile annualmente (Chen *et al.*, 2012).

Relativamente alla produzione di biomassa, a tutt'oggi non sono presenti dati per la specie *Atriplex halimus* ottenuti da coltivazioni su suoli contaminati.

Per quanto riguarda la produzione totale annua di biomassa si può applicare il calcolo estimativo basato su dati estrapolati dalla bibliografia, secondo quanto già realizzato da altri autori su diverse specie testate per fitorisanamento (Dickinson *et al.*, 1994; French *et al.* 2006; Lewandowski *et al.*, 2006; Citterio *et al.*, 2003).

Per la specie *Atriplex halimus*, secondo quanto riportato da Walker e Lutts (2014), la specie è in grado di produrre 10 t ha⁻¹ anno⁻¹ di biomassa aerea senza l'apporto di input, mentre in caso di elevata salinità del suolo, i migliori risultati nella produzione di biomassa si attestano intorno a 15-20 t ha⁻¹ anno⁻¹ (Falasca *et al.*, 2014).

Utilizzando i dati di biomassa estrapolati dalla bibliografia e quelli di concentrazione epigea di metalli ottenuti in presenza di ammendante organico nelle sperimentazioni A3 e A4, si ottengono i risultati esposti in tabella 5.1.

Relativamente alla sperimentazione A4, si è fatto riferimento al clone NC2, che ha dimostrato la migliore performance per fitorisanamento.

Tabella 5.1. Stima di metallo estraibile in funzione della concentrazione nei tessuti e della produzione annua di biomassa per ettaro.

Metallo	Sperimentazione	Concentrazione metallo nella biomassa aerea (mg kg⁻¹)	Biomassa aerea 10 t ha⁻¹ anno⁻¹	Biomassa aerea 15 t ha⁻¹ anno⁻¹
			Metallo estraibile (g ha ⁻¹ anno ⁻¹)	Metallo estraibile (g ha ⁻¹ anno ⁻¹)
Zn	A3	253,7	2537	3805,5
Zn	A4 (clone NC2)	608,9	6089	9133,5
Pb	A3	15,9	159	238,5
Pb	A4 (clone NC2)	32	320	480
Cd	A3	0,8	8	12
Cd	A4 (clone NC2)	2,9	29	43,5

Il risultato ottenuto può essere utilizzato per valutare in prima approssimazione la capacità di fitoestrazione della specie sui suoli sperimentali. In caso di una raccolta ciclica della biomassa

aerea, con i dati della tabella 5.1 è possibile stimare in prima approssimazione il numero di cicli necessari a riportare un sito sotto il limite normativo di contaminazione (Robinson *et al.*, 2012; Dickinson *et al.*, 1994).

A tal fine si precisa che, tale calcolo è valido solo se si assume che la concentrazione di metallo nei tessuti e la produzione di biomassa restino costanti per ogni ciclo e non varino nel tempo. Questa assunzione, fine solo ad una stima ipotetica, va naturalmente valutata con cautela in accordo con French *et al.* (2012).

Nei substrati utilizzati nella sperimentazione A3 e A4, che si ricorda essere altamente contaminati (sterili di discarica mineraria) si renderebbero necessari oltre 1000 cicli (nell'ipotesi che la quantità di suolo esplorato dalle radici sia di 1 t m⁻² di suolo). Tempi così lunghi fanno comprendere che, non è possibile decontaminare totalmente tali siti mediante l'applicazione di tecniche di fitorisanamento.

A risultati analoghi sono giunti Conesa *et al.* (2012), secondo i quali la riuscita del fitorisanamento per la rimozione dei contaminanti fino a livelli di legge, non è possibile su suoli con elevata contaminazione da metalli come quelli presenti in molte aree minerarie.

Ciò nonostante, in assenza di altre tecniche che permettano il risanamento di tali suoli nei limiti della fattibilità economica, l'applicazione delle tecniche di fitorisanamento, in particolare con la specie *Atriplex halimus*, utilizzata nel presente lavoro, può risultare comunque vantaggiosa per diverse ragioni.

La coltivazione della specie permette infatti, grazie alla copertura vegetale dei suoli altamente contaminati, di ridurre la diffusione dei contaminanti e di migliorare le condizioni fisico - chimiche del suolo. Mediante la produzione di biomassa ai fini della produzione energetica e del recupero dei metalli, tale coltivazione può inoltre rendere possibile uno sfruttamento economico delle aree altamente contaminate diversamente inutilizzabili.

PRODUZIONE DI BIOMASSA

Diversi studi hanno valutato la possibilità di usare coltivazioni energetiche per fitorisanamento (French *et al.* 2006; Mleczek *et al.* 2010; Schreurs *et al.* 2011; Syc *et al.*, 2012; Jiang. *et al.* 2015). Fra le diverse possibilità, in caso di contaminazione da metalli, può risultare appropriata la produzione di energia mediante il processo di combustione insieme al recupero di metalli depositati nelle ceneri (Kidd *et al.*, 2015; Van der Ent *et al.*, 2013)

Secondo Ali *et al.*, (2013) inoltre, si prevede che la fitoestrazione diventi nel futuro una attività commerciale redditizia nel campo della phytoremediation e del phytomining di metalli pesanti. Nel caso in esame, considerato il basso valore dei metalli estratti e la quantità estraibile, il recupero dei metalli è da ritenersi certamente un aspetto secondario dell'attività, mentre particolarmente rilevante può risultare l'utilizzo della biomassa a fini energetici.

I valori di produzione di biomassa riportati in letteratura per la specie *Atriplex halimus*, su suoli non contaminati, si assestano fra 10 e 20 t ha⁻¹ anno⁻¹ (Walker e Lutts, 2014; Falasca *et al.*, 2014) e possono dirsi in linea con le quantità prodotte da altre colture ampiamente utilizzate per la produzione energetica.

Per quanto riguarda la produzione delle principali colture energetiche legnose, quella di pioppo può raggiungere $24 \text{ t ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$, quella dell'Eucaliptus è mediamente di $10 - 17 \text{ t ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$, quella del salice di $5 - 10 \text{ t ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$ (Searle *et al.*, 2014).

L'energia ottenibile dalla combustione di *Atriplex halimus*, secondo Walker e Lutts (2014) risulta fra $17,2$ e $12,8 \text{ MJ kg}^{-1}$, rispettivamente in fusti e foglie mentre secondo Weise *et al.* (2005), il potere calorifico varia tra 13 e 15 MJ kg^{-1} a seconda del periodo. Questi valori sono prossimi a quelli ottenibili dalla combustione di salice, da cui è possibile ricavare $16 - 18 \text{ MJ kg}^{-1}$ (Schreurs *et al.*, 2011; Syc *et al.*, 2012).

Dalle stime fatte emerge dunque che la specie può essere utilizzata con successo per la produzione di biomassa a fini energetici su suoli ad elevata contaminazione di metalli.

5.2 *Medicago polymorpha*

Nello studio della specie *Medicago polymorpha*, è stata utilizzata una varietà autoctona (Var. Pratosardo) e sono stati approfonditi gli aspetti descritti di seguito.

- Si è studiata la capacità di germinazione, sopravvivenza e adattamento di *Medicago polymorpha*, in suoli ad elevata contaminazione da metalli.
- Si è valutata la capacità di *Medicago polymorpha* a incrementare il contenuto di azoto in un substrato contaminato da metalli (sperimentazione M1).
- È stata studiata la capacità della specie di raggiungere la fioritura su substrato contaminato da metalli in presenza di ammendanti.

GERMINAZIONE E SOPRAVVIVENZA

I risultati ottenuti nel presente lavoro, mostrano che la specie ha una buona capacità di germinazione e, nel primo periodo successivo all'emergenza, di sopravvivere su substrato contaminato. La sopravvivenza si è però ridotta all'avanzare del ciclo vitale e sul substrato contaminato la specie non è risultata in grado di giungere a fioritura.

SVILUPPO DELLA BIOMASSA

Sui substrati contaminati, le piante sono cresciute meno di quelle del substrato non contaminato. Ciò nonostante non è stato possibile appurare se tale differenza dipendesse dalla tossicità del substrato o dalla particolare scarsità di alcuni elementi nutrienti (N e P).

ACCUMULO DI METALLI

Dall'analisi delle concentrazioni dei metalli nei tessuti si è potuto osservare che la specie *Medicago polymorpha* var. Pratosardo, cresciuta su suoli ad elevata contaminazione da metalli, è in grado di estrarre metalli dal substrato ed accumularne elevate concentrazioni nei propri tessuti senza mostrare evidenti segni di stress a causa della loro presenza.

FISSAZIONE DELL'AZOTO

Relativamente alla fissazione dell'azoto, nella sperimentazione M1 sul suolo contaminato, a fine sperimentazione è stato misurato un aumento apprezzabile nelle concentrazioni dell'elemento. La possibilità di usare questa leguminosa in fitorisanamento, è dunque auspicabile oltre che per svolgere funzione di copertura del terreno, anche per sua capacità di incrementare il contenuto di azoto nel suolo e migliorarne la fertilità.

5.3 Considerazioni conclusive

Il presente lavoro ha permesso di valutare positivamente la possibilità di utilizzare la specie *Atriplex halimus* nel risanamento di suoli minerari in Sardegna.

La specie ha infatti mostrato capacità di adattarsi e crescere su substrati contaminati da elevate concentrazioni di metalli, senza evidenziare rilevanti effetti dovuti alla tossicità degli stessi.

La sopravvivenza delle piante sui suoli contaminati è stata elevata sia nel caso di impianto di materiale vegetale adulto, sia nel caso di impianto di barbatelle.

Per quanto riguarda l'impianto *Atriplex halimus*, è stata dimostrata la possibilità di impiantare la specie anche mediante la coltivazione diretta di talee su substrato minerario contaminato da un'elevata concentrazione di metalli. Le soluzioni di impianto testate (con barbatelle e talee), si sono dimostrate efficaci e, in vista di una coltivazione, potrebbero consentire una notevole riduzione dei costi, sia in fase di produzione delle piante sia in fase di impianto.

L'utilizzo di barbatelle consente infatti la riduzione dei tempi di produzione del materiale vegetale, evitando che lo stesso stanzii in vivaio prima dell'impianto, mentre la coltivazione di talee capaci di radicare in campo, richiede procedimenti molto semplificati nella produzione del materiale vegetale, rispetto al caso della coltivazione di piante complete.

L'impianto di talee inoltre, può essere applicato con maggiore facilità nei casi in cui le condizioni del piano di coltivazione siano particolarmente difficili, come in presenza di pendenze elevate o nei casi in cui risulti molto difficoltoso intervenire con i mezzi meccanici per la preparazione pre-impianto del terreno.

Dalle sperimentazioni realizzate nel presente lavoro è emerso che, la specie *Atriplex halimus* è un'ottima candidata ai fini del fitorisanamento sia dal punto di vista della fitostabilizzazione dei metalli nel suolo, che dal punto di vista della fitoestrazione.

Un utilizzo ai fini della totale decontaminazione di suoli minerari contenenti elevate concentrazioni di metalli, non si dimostra fattibile a causa dell'elevato numero di anni necessari a raggiungere concentrazioni inferiori al limite normativo. Ciò nonostante, in assenza di altre tecniche che permettano il risanamento di tali suoli nei limiti della fattibilità economica, l'applicazione delle tecniche di fitorisanamento, in particolare con la specie *Atriplex halimus*, utilizzata nel presente lavoro, può risultare comunque vantaggiosa per diverse ragioni.

La coltivazione della specie permette infatti, grazie alla copertura vegetale dei suoli altamente contaminati, di ridurre la diffusione dei contaminanti e di migliorare le condizioni fisico-chimiche del suolo. Mediante la produzione di biomassa ai fini della produzione energetica e del recupero dei metalli, tale coltivazione può inoltre rendere possibile uno sfruttamento economico delle aree altamente contaminate diversamente inutilizzabili.

Nel presente lavoro si è inoltre, valutata la possibilità di utilizzare la specie *Medicago polymorpha* (famiglia *Fabaceae*) nel fitorisanamento di suoli contaminati da metalli.

L'utilizzo di leguminose in processi di fitorisanamento consente infatti di soddisfare la duplice esigenza di fornire azoto al terreno e proteggere il suolo mediante una copertura vegetale duratura. La loro capacità di migliorare le disponibilità di azoto nel terreno consente allo stesso tempo la riduzione dei costi di distribuzione e incorporazione di fertilizzanti azotati.

I risultati ottenuti hanno mostrato che la specie ha una buona capacità di germinazione e, nel primo periodo successivo all'emergenza, di sopravvivere su substrato contaminato. La sopravvivenza si è però ridotta all'avanzare del ciclo vitale e sul substrato contaminato la specie non è risultata in grado di giungere a fioritura.

Per valutare concretamente la possibilità di introdurre la specie *Medicago polymorpha* in fitorisanamento si ritiene necessario, oltre ad un'adeguata preventiva fertilizzazione, approfondire lo studio utilizzando anche appropriati simbionti azotofissatori.

Per comprendere meglio le potenzialità dell'utilizzo della specie *Atriplex halimus* nel fitorisanamento in condizioni reali, alla luce delle maturate esperienze sulla specie, si auspicano ulteriori studi mediante la sua coltivazione in campo. Considerata inoltre la variabilità clonale riscontrata nella specie su suoli contaminati, si ritiene di notevole interesse approfondire lo studio sulla selezione di cloni con specifiche attitudini produttive in ambito di fitorisanamento.

Bibliografia

- Akinyele I.O., Shokunbi O.S. (2015). Concentrations of Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Cd, Pb, Ni in selected Nigerian tubers, legumes and cereals and estimates of the adult daily intakes. *Food Chemistry* 173; 702 - 708.
- Ali H., Khan E., Sajad M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869 - 881.
- Ali H., Naseer M., Sajad M.A. (2012). Phytoremediation of heavy metals by *Trifolium alexandrinum*. *International Journal of Environmental Sciences* 2; 1459 - 1469.
- Alkorta I., Hernández - Allica J., Becerril J.M., Amezaga I., Albizu, I., Garbisu C. (2004). Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. *Reviews on Environmental Health* 3; 71 - 90.
- Amer N., Al Chami Z., Al Bitar L., Mondelli D., Dumontet S. (2013). Evaluation of *Atriplex halimus*, *Medicago lupulina* and *Portulaca oleracea* for phytoremediation of Ni, Pb and Zn. *International Journal of Phytoremediation* 15 (5); 498 - 512.
- Andrades-Moreno L., Cambrollé J., Figueroa M.E, Mateos-Naranjo E. (2013). Growth and survival of *Halimione portulacoides* stem cuttings in heavy metal contaminated soils. *Marine Pollution Bulletin* 75; 28 - 32.
- Anjum N.A., Umar S., Iqbal M. (2014). Assessment of cadmium accumulation, toxicity, and tolerance in Brassicaceae and Fabaceae plants - implications for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 21 (17); 10286 - 10293.
- Arpas (2006). Piano di monitoraggio della laguna di Santa Gilla e dello stagno di Capoterra. Fase I. Campionatura analisi e sedimenti.
http://www.sardegnaambiente.it/documenti/21_46_20080212173837.pdf [15 Marzo 2015].
- ARPAV (2007). L'interpretazione delle analisi del terreno, strumento per la sostenibilità ambientale. Dipartimento Provinciale di Treviso, Servizio Osservatorio Suolo e Rifiuti.
http://www.arpa.veneto.it/arpavinforma/pubblicazioni/linterpretazione-delle-analisi-del-terreno/at_download/file [04 Aprile 2015].
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (2005). Department of health and human services, Public Health Service - Zinc.
<https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=300&tid=54#bookmark02> [15 Marzo 2015].
- Bacchetta G., Cao A., Cappai G., Carucci A., Casti M., Fercia M.L., Lonis R., Mola F. (2012). A field experiment on the use of *Pistacia lentiscus* L. and *Scrophularia canina* L. subsp. bicolor (Sibth. et Sm.) Greuter for the phytoremediation of abandoned mining areas. *Plant Biosystems* 146 (4), 1054 - 1063.
- Bacchetta G., Cappai G., Carucci A., Tamburini E. (2015). Use of native plants for the remediation of abandoned mine sites in Mediterranean semiarid environments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 94; 326 - 333.

- Bani A., Echevarria G., Sulce S., Morel J.L. (2015). Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: a five - year field study. *International Journal of Phytoremediation* 17; 117 - 127.
- Barbafieri M., Lubrano L, Petruzzelli G. (1996). Characterization of pollution in sites contaminated by heavy metals: a proposal. *Annali di chimica* 86; 585 - 594.
- Bazihizina N., Colzi I, Giorni E, Mancuso S., Gonnelli C. (2015). Photosynthesizing on metal excess: Copper differently induced changes in various photosynthetic parameters in copper tolerant and sensitive *Silene paradoxa* L. populations. *Plant Science* 232; 67 - 76.
- Beringer T., Lucht W., Schaphoff S., (2011). Bioenergy production potential of global biomass plantations under environmental and agricultural constraints. *Bioenergy* 3; 299 - 312.
- Bidar G., Pruvot C., Garçon G., Verdin A., Shirali P., Douay F. (2009). Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal - contaminated field. *Environmental Science and Pollution Research* 16; 42 - 53.
- Bullitta S.M., Sulas L, Franca A. (2009). Potenzialità di specie erbacee autoctone non convenzionali per usi produttivi e multipli. *Italian Journal of Agronomy* 4; 271-276.
- Cambrollé J., Mancilla-Leytón J.M., Muñoz-Vallés S., Luque T., Figueroa M.E. (2012). Zinc tolerance and accumulation in the salt - marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* 86; 867 - 874.
- Cao A., Carucci A., Lai T., Bacchetta G., Casti M. (2009). Use of native species and biodegradable chelating agents in the phytoremediation of abandoned mining areas. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84; 884 - 889.
- Chaney R.L., Scott Angle J., Broadhurst C.L., Peters C.A., Tappero R.V., Sparks D.L. (2007). Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality* 36, 1429 - 1443.
- Chen B.C., Lai H.Y., Juang K.W. (2012). Model evaluation of plant metal content and biomass yield for the phytoextraction of heavy metals by switchgrass. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80; 393 - 400.
- Cidu R., Frau F. (2009). Distribution of trace elements in filtered and non filtered aqueous fractions: Insights from rivers and streams of Sardinia (Italy). *Applied Geochemistry* 24; 611 - 623.
- Citterio S., Santagostino A., Fumagalli P., Prato N., Ranalli P., Sgorbati S. (2003). Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa* L. *Plant and Soil*, 256 (2); 243 - 252.
- Clemens S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88; 1707 - 1719.
- Clemente R., Walker D.J., Pardo T., Martínez Fernández D., Bernal M.P. (2012). The use of a halophytic plant species and organic amendments for the remediation of a trace elements-contaminated soil under semi arid conditions. *Journal of hazardous materials* 223 - 224; 63 - 71.

- Conesa M.H., Evangelou W.H.M., Robinson H.B., Schulin R. (2012) A critical view of the current state of phytotechnologies to remediate soils: still a promising tool? *The Scientific World Journal*. DOI:10.1100/2012/173829.
- Convisar (2012). Modelli viticoli e gestione del vigneto in Sardegna. A cura di Gianni Nieddu. www.sardegna.digitallibrary.it/documenti/17_151_20130327091447.pdf. [15 Marzo 2015].
- Cunningham S.D., Ow D.W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation - update on biotechnology. *Plant Physiology* 110 (3); 715 - 719.
- D.M. 13 settembre 1999. Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo. GU Repubblica Italiana S.O. 248, 21/10/1999.
- D.M. 18 settembre 2001, n. 468. Decreto del Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio. Programma nazionale di bonifica e ripristino ambientale. G.U. Repubblica Italiana 13, 16/1/2002.
- D.M. 25 marzo 2002. Rettifiche al decreto ministeriale 13 settembre 1999 riguardante l'approvazione dei metodi ufficiali di analisi chimica del suolo. GU Repubblica Italiana S.O. 84, 10/04/2002.
- DalCorso G., Manara A., Furini A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics* 5; 1117 - 1132.
- Decreto del Presidente della Repubblica del 13 marzo 1976, n 448. Esecuzione della convenzione relativa alle zone umide d'importanza internazionale, soprattutto come habitat degli uccelli acquatici. G.U. n.173, 03/07/1976.
- Degetto S., Schintu M., Contu A., Sbrignadello G. (1997). Santa Gilla lagoon (Italy): a mercury sediment pollution case study. Contamination assessment and restoration of the site. *The science of the total environment* 204; 49 - 56.
- Del Pozo A., Ovalle C. Advances in grassland research in the Mediterranean region of Chile. In: Acar Z. (ed.), López-Francos A. (ed.), Porqueddu C. (ed.). New approaches for grassland research in a context of climate and socio - economic changes. Zaragoza: CIHEAM 2012, p. 527 -531 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 102).
- Delibera Regionale del 1 giugno 2011, n. 27/13. Regione Autonoma della Sardegna. Sito di interesse nazionale del Sulcis-Iglesiente-Guspinese. Perimetrazione definitiva di dettaglio.
- Delibera Regionale del 5 dicembre 2003, n. 45/34. Regione Autonoma della Sardegna. Piano Regionale di Gestione dei rifiuti, Sezione bonifica dei siti inquinati.
- Dessena L., Mulas M. (2012) a. Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.) as an ornamental species for arid environments. *Acta Horticulturae* 937 (1); 211 - 216.
- Dessena L., Mulas M. (2012) b. Cultivar selection from spontaneous population of *Atriplex halimus* L. *Acta Horticulturae*, 937 vol 1, 205 - 210.
- Dickinson N.M., Punshon T., Hodgkinson R.B., Lepp N.W. (1994). Metal tolerance and accumulation in willows. *Willow Vegetation Filters for Municipal Wastewater and Sludges*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 121 - 127.
- DM 17/02/2016. Iscrizione di varietà di specie foraggere ai relativi registri nazionali. (16A01537). GU Serie Generale n.49, 29/2/2016.

- Domínguez T.M., Maranón T., Murillo J.M., Robinson B.H. (2008) Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain: a large - scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution*, 152; 50 - 59.
- Dos Santos Utmazian M.N., Wieshammer G., Vega R., Wenzel W.W. (2007). Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environmental Pollution* 148; 155 - 165.
- Duffus JH (2002) “Heavy metals” - A meaningless term? *Pure and Applied Chemistry* 74; 793 - 807.
- ECHA, European Chemicals Agency (2013). Support document for identification of cadmium. <https://echa.europa.eu/documents/10162/a048359b-de39-4b7e-8602-51272a55aeae> [15 Marzo 2015]
- EEA, European Environment Agency (2014). Progress in management of contaminated sites. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment> [15 Marzo 2015]
- Eissa M.A, Ahmed E.M. (2016). Nitrogen and Phosphorus Fertilization for some Atriplex plants grown on metal-contaminated soils. *Soil and Sediment Contamination* 25 (4); 431 - 442.
- Eissa M.A. 2015. Impact of compost on metals phytostabilization potential of two halophytes species. *International Journal of Phytoremediation* 17; 662 - 668.
- El - Bakatoushi R., Alframawy A.M., Tammam A., Youssef D., El - Sadek L. (2015) Molecular and Physiological Mechanisms of Heavy Metal Tolerance in *Atriplex halimus*. *International Journal of Phytoremediation* 17(9); 789 - 800.
- EPA, United States Environmental Protection Agency, Lead. <https://www.epa.gov/lead> [15 Marzo 2015].
- Ersat, servizio circondariale Sassari (1997). *Scheda tecnica per l'impiego della Medica polimorfa*. Scheda illustrativa per gli agricoltori realizzata nell'ambito del programma “Introduzione di criteri di rotazione agronomica nelle colture del grano con coltivazioni biologiche di erba medica polimorfa” 1997 - 98.
- European Union (2007). European Communities, Risk Assessment Report: Cadmium Metal: Part I - Environment, Volume 72 (publication EUR 22919 ENV) and Part II Human Health - Volume 74 (publication EUR 22767 EN).
- Fahr M., Laplaze. L., El Mzibri M., Doumas P., Bendaou N., Hocher V., Bogusz D., Smouni A. (2015). Assessment of lead tolerance and accumulation in metallicolous and non - metallicolous populations of *Hirschfeldia incana*. *Environmental and Experimental Botany* 109; 186 - 192.
- Falasca S.L., Pizarro M.J., Mezher R.N. (2014). The agro-ecological suitability of *Atriplex nummularia* and *A. halimus* for biomass production in Argentine saline drylands. *International Journal of Biometeorology* 58; 1433 - 1441.
- FAO/WHO (2002). Human vitamin and mineral requirements: report of a Joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand. FAO: Rome.

- Fara G., Franca A., Porqueddu C., Caredda S. Roggero P.P (1997). Mediche e trifogli annuali autoriseminanti per usi foraggeri e non convenzionali: I. Adattamento e persistenza. *Rivista di agronomia* 31 (4); 1009 - 1018.
- Farrag K., Senesi N., Nigro F., Petrozza A., Palma A., Shaarawi S., Brunetti G. (2012). Growth responses of crop and weed species to heavy metals in pot and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research* 19 (8); 3636 - 3644.
- French C.J., Dickinson N.M., Putwain P.D. (2006). Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environmental Pollution* 141; 387 - 395.
- Frutos I., García - Delgado C., Cala V., Gárate A., Eymar E. (2017). The use of spent mushroom compost to enhance the ability of *Atriplex halimus* to phytoremediate contaminated mine soils. *Environmental Technology* 38; 1075 - 1084.
- Fumagalli P., Comolli R., Ferrè C., Ghiani A., Gentili R., Citterio S. (2014). The rotation of white lupin (*Lupinus albus* L.) with metal - accumulating plant crops: a strategy to increase the benefits of soil phytoremediation. *Journal of environmental management* 145; 35 - 42.
- Garbisu C. and Alkorta I. (2001). Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource technology* 77; 229 - 236.
- Hernández-Allica, J., Becerril J.M., Garbisu C. (2008). Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environmental Pollution* 152, 32 - 40.
- Hoagland D., Arnon D.I. (1938). The water - culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Bulletin*, 347; 1 - 39.
- ICSC 0052 Lead. International Chemical Safety Cards. International Programme on Chemical Safety (IPCS). <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0052.htm>. [15 Marzo 2015].
- IPCC, 2011: Summary for Policymakers. In: IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation [O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, K. Seyboth, P. Matschoss, S. Kadner, T. Zwickel, P. Eickemeier, G. Hansen, S. Schlömer, C. von Stechow (eds)], Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council) 2009. Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised. PHYTO-3. Washington, D.C.: Interstate Technology and Regulatory Council, Phytotechnologies Team, Tech. Reg. Update. www.itrcweb.org [15 Marzo 2015].
- Jiang Y., Lei M., Duan L., Longhurst P., 2015. Integrating phytoremediation with biomass valorisation and critical element recovery: A UK contaminated land perspective. *Biomass and Bioenergy* 83, 328-339.
- Kachout S.S., Mansoura A.B., Mechergui R., Leclerc J.C., Rejeb M.N., Ouerghi Z., 2012. Accumulation of Cu, Pb, Ni and Zn in the halophyte plant *Atriplex* grown on polluted soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92; 336-342.
- Kidd P., Mench M., Álvarez-López V., Bert V., Dimitriou I., Friesl-Hanl W., Herzig R., Janssen J.O., Kolbas A., Müller I., Neu S., Renella G.O, Ruttens A., Vangronsveld J., Puschenreiter

- M. (2015). Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation* 17 (11); 1005 - 1037.
- Kopponen P., Utriainen M., Lukkari K., Suntioinen S., Kärenlampi L, Kärenlampi S. (2001). Clonal differences in copper and zinc tolerance of birch in metal - supplemented soils. *Environmental Pollution* 112; 89 - 97.
- Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. (1995.) Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29 (5); 1232 - 1238.
- Laffont - Schwob I., d'Enjoy - Weinkammerer G., Pricop A., Prudent P., Masotti V., Rabier J. (2011). Evaluation of a potential candidate for heavy metal phytostabilization in polluted sites of the Mediterranean littoral (SE Marseille): endomycorrhizal status, fitness biomarkers and metal content of *Atriplex halimus* spontaneous populations. *Ecological Questions* 14; 89 - 90.
- Langeveld H., Quist-Wessel F., Dimitriou I., Aronsson P., Baum C., Schulz U., Bolte A., Baum S., Köhn J., Weih M., Gruss H., Leinweber P., Lamersdorf N., Schmidt - Walter P., Berndes G. (2012). Assessing environmental impacts of short rotation coppice (SRC) expansion: model definition and preliminary results. *Bioenergy Research* 5, 621 - 635.
- Lefèvre L.I., Marchal G., Meerts P., Corréal E., Lutts S. (2009). Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus*. *Environmental and Experimental Botany* 65, 142 - 152.
- Lewandowski I., Schmidt U., Londo M., Faaij A. (2006). The economic value of the phytoremediation function - assessed by the example of cadmium remediation by willow (*Salix* spp). *Agricultural Systems* 89 (1); 68 - 89.
- Li N.Y., Li Z.A., Zhuang P., Zou B., McBride M. (2009). Cadmium uptake from soil by maize with intercrops. *Water Air and Soil Pollution* 199; 45 - 56.
- Lichtenthaler HK. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148; 350 - 382.
- Lutts S., Lefèvre I., Delpérée C, Kivits S., Dechamps C., Robledo A., Correal E. (2004). Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean saltbush. *Journal of Environmental Quality* 33; 1271 - 1279.
- Magdziak Z., Gąsecka M., Goliński P., M. Mleczek, (2015). Phytoremediation and Environmental Factors; 45 - 55. In A.A. Ansari et al. (eds.), *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, Volume 1, 45. Springer International Publishing Switzerland 2015.
- Malizia D., Giuliano A., Ortaggi G., Masotti A., 2012. Common plants as alternative analytical tools to monitor heavy metals in soil. *Chemistry Central Journal*, 6 (Suppl 2): S6. Proceedings of CMA4CH 2010: Application of Multivariate Analysis and Chemometry to Cultural Heritage and Environment, Taormina, Italy. 26 - 29 September 2010.

- Mancilla-Leytón J.M., Navarro-Ramos M.J., Muñoz-Vallés S., Figueroa M.E., Cambrollé J. (2016). Evaluation of the potential of *Atriplex halimus* stem cuttings for phytoremediation of metal-polluted soils. *Ecological Engineering* 97; 553 - 557.
- Manousaki E., Kalogerakis N. (2009). Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus*): metal uptake in relation to salinity. *Environmental Science Pollution Research* 16; 884 - 854.
- Marcello A., Salvadori I., Zuffardi P. (1965). Contributo alla conoscenza delle mineralizzazioni del Cambrico Sardo. Problemi minerali della Sardegna, Ottobre 1965; 55 - 82.
- Marchiol L. 2004. Prospettive e limitazioni del fitorisanamento. Ricerca e Innovazione, Notiziario ERSA 4/2008.
- Marchiol L., Fellet G., Perosa D., Zaccheo P., Zerbi G. (2008). Utilizzo di piante agrarie nel fitorisanamento di suoli contaminati da metalli pesanti e metalloidi: (II) primi risultati della sperimentazione in situ di Torviscosa (Udine). *Italian Journal of Agronomy* 1; 15 - 29.
- Martínez - Fernández D. and Walker D.J. (2012). The Effects of Soil Amendments on the Growth of *Atriplex halimus* and *Bituminaria bituminosa* in Heavy Metal - contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution* 223; 63 - 72.
- Mateos - Naranjo E., Andrades - Moreno L., Cambrollé J., Perez - Martin A. (2013). Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90; 136 - 142.
- Mateos - Naranjo E., Andrades - Moreno L., Redondo - Gómez S. (2011). Comparison of germination growth, photosynthetic responses and metal uptake between three populations of *Spartina densiflora* under different soil pollution conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74; 2040 - 2049.
- Meers E., Vandecasteele B., Ruttens A., Vangronsveld J., Tack F.M.G. (2007). Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 60; 57 - 68.
- Mench M., Lepp N., V. Bert, Schwitzguébel J.P., Gawronski S. W., Schröder P., Vangronsveld J., (2010). Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments* 10 (6); 1039 - 1070.
- Mendez M.O., Maier R.M. (2008). Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Environmental Science and Biotechnology* 7; 47 - 59.
- Mleczeck M., Rutkowski P., Rissmann I., Kaczmarek Z., Golinski P., Szentner K., Strazynska K., Stachowiak A. (2010). Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass and Bioenergy* 34(9); 1410 - 1418.
- Mleczeck M., Rutkowski P., Rissmann I., Kaczmarek Z., Golinski P., Szentner K., Strazynska K., Stachowiak A., (2010). Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass and Bioenergy* 34 (9); 1410 - 1418.

- Mola - Yudego B., Díaz - Yáñez O., Dimitriou I. (2015). How much yield should we expect from fast-growing plantations for energy? Divergences between experiments and commercial willow plantations. *Bioenergy Research* 8, 1769 - 1777.
- Mondal N.K., Das C., Datta J.K. (2015). Effect of mercury on seedling growth, nodulation and ultrastructural deformation of *Vigna radiata* (L) Wilczek. *Environmental Monitoring and Assessment* 187: 241. DOI 10.1007/s10661-015-4484-8.
- Moreira H., Marques A.P.G.C., Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L. (2011). Heavy Metal Accumulation in plant species indigenous to a contaminated Portuguese site: prospects for phytoremediation. *Water Air and Soil Pollution* 221; 377 - 389.
- Mughini G., Alianiello F. Benedetti A., Mughini Gras L., Gras M.A., Salvati L. (2013). Clonal variation in growth, arsenic and heavy metal uptakes of hybrid Eucalyptus clones in a Mediterranean environment. *Agroforestry Systems* 87; 755 - 766.
- Mulas M., Mulas G. (2004). The strategic use of *Atriplex* and *Opuntia* to combat desertification. Università degli studi di Sassari, Nucleo di Ricerca sulla Desertificazione: www.uniss/nrd.it.
- Nedjimi B. e Daoud Y. (2008). Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora* 204; 316 - 324.
- Nehnevajova E., Herzig R., Federer G., Erismann K.H, Schwitzguébel J.P. (2005). Screening of sunflower cultivars for metal phytoextraction in a contaminated field prior to mutagenesis, *International Journal of Phytoremediation* 7 (4); 337 - 349.
- Neilson S., Rajakaruna N. (2015). Phytoremediation of Agricultural Soils: Using Plants to Clean Metal- Contaminated Arable Land; 159 - 168. In A.A. Ansari et al. (eds.), *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, Volume 1, 45. Springer International Publishing Switzerland 2015.
- Novo L.A.B., Covelo E.F., Gonzalez L. (2013) Phytoremediation of amended copper mine tailings with *Brassica juncea*, *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*, 27 (3); 215 - 226.
- Ordóñez A., Loredó J., De Miguel E., Charlesworth S. (2003). Distribution of Heavy Metals in the Street Dusts and Soils of an Industrial City in Northern Spain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44 (2); 160 - 170.
- OriginPro Software. <http://www.originlab.com/Origin>
- Ovalle C., Alejandro del Pozo A., Peoples M.B., Lavín A. (2010). Estimating the contribution of nitrogen from legume cover crops to the nitrogen nutrition of grapevines using a ¹⁵N dilution technique. *Plant and Soil* 334; 247 - 259.
- Ovalle C., Porqueddu C., del Pozo A (2001). Ecotypic differentiation of *Medicago polymorpha* in Sardinia and Chile. In: Delgado I. (ed.), Lloveras J. (ed.). *Quality in lucerne and medics for animal production*. Zaragoza : CIHEAM, 2001, 99 - 102. Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 45.
- Padmavathiamma P.K., Li L.Y., (2007). Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water Air and Soil Pollution* 184; 105 - 126.

- Pardo T., Clemente R., Epelde L., Garbisu C., Bernal M.P. (2014) Evaluation of the phytostabilisation efficiency in a trace elements contaminated soil using soil health indicators. *Journal of Hazardous Materials* 268; 68 - 76.
- Paredes M., Becerra V., Rojo C., Del Pozo A., Ovalle C., Aronson J. (2002). Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in central Chile. RAPDs studies show little genetic divergence. *Euphytica* 123; 431 - 439.
- Parraga-Aguado I., González-Alcaraza M.N., Álvarez-Rogela J., Conesa H.M., 2014. Assessment of the employment of halophyte plant species for the phytomanagement of mine tailings in semiarid areas. *Ecological Engineering* 71, 598-604.
- Peralta J.R., Gardea - Torresdey J.L., Tiemann K.J., Gomez E., Arteaga S., Rascon E., Parsons J.G. (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66; 727 - 734.
- Perez-Esteban J., Escolastico C., Fernandez J., Masaguer A., Moliner A. (2013). Bioavailability and extraction of heavy metals from contaminated soil by *Atriplex halimus*. *Environmental and Experimental Botany* 88; 53 - 59.
- Pérez-Esteban J., Escolástico C., Moliner A., Masaguer A., Ruiz-Fernández J. (2014). Phytostabilization of metals in mine soils using *Brassica juncea* in combination with organic amendments. *Plant and Soil* 377; 97 - 109.
- Petruzzelli G., Pedron F., Rosellini I., Barbaferri M. (2015). The Bioavailability Processes as a Key to Evaluate Phytoremediation Efficiency; 31-43. In A.A. Ansari et al. (eds.), *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, Volume 1, 45. Springer International Publishing Switzerland 2015.
- Pietrini F., Zacchini M., Iori V., Pietrosanti L., Bianconi D., Massacci A. (2009). Screening of poplar clones for cadmium phytoremediation using photosynthesis, biomass and cadmium content analyses. *International Journal of Phytoremediation* 12; 105 - 120.
- Pietrosanti L., Pietrini F., Matteucci G., Massacci A., Aromolo R., Zuin M.C., Capotorti G., Nardella A. (2012). Fitostabilizzazione e controllo idrologico in un sito multicontaminato da metalli pesanti nell'area industriale di Porto Marghera. *Atti di Convegno: Bonifica, recupero ambientale e sviluppo del territorio: esperienze a confronto sul fitorimediaio*. *Micron* 22, 2012.
- Pollard A.J., Reeves R. D., Baker A.J.M. (2014). Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science* 8 (17); 217 - 218.
- Pottier M., García de la Torre V. S., Victor C., David L. C., Chalot M., Thomine S. (2015). Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environmental Pollution* 199;73 - 82.
- Rabier J., Laffont - Schwob I., Pricop A., Ellili A., D'Enjoy - Weinkammerer G., Salducci M.D., Masotti V. (2014). Heavy metal and arsenic resistance of the halophyte *Atriplex halimus* L. along a gradient of contamination in a French Mediterranean spray zone. *Water Air and Soil Pollution*, 225 (7); 1 - 16.

- Regolamento (CE) N. 1881/2006 del 19 dicembre 2006. Tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 364, del 20.12.2006.
- Renella G. (2012). Il progetto europeo GREENLAND (Gentle remediation of trace element contaminated land): una soluzione verde per l'inquinamento. Atti di Convegno: Bonifica, recupero ambientale e sviluppo del territorio: esperienze a confronto sul fitorimedia. *Micron* 22, 2012.
- Ribeiro de Souza S.C., López de Andrade S.A., De Souza L.A., Schiavinato M.A. (2012). Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. *Journal of Environmental Management* 110; 299 - 307.
- Riffaldi R., Levi-Minzi R. (1989). Il controllo degli inquinanti in agricoltura: gli inquinanti inorganici. In: Chimica del suolo (coordinatore Paolo Sequi). Bologna: Patron: 567 -5 77.
- Robinson B., Schulin R., Nowack, B., Roulier S., Menon M., Clothier B., Mills T. (2006). Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *Forest Snow and Landscape Research* 80 (2); 221 - 224.
- Safronova V.I., Piluzza G., Zinovkina N.Y., Kimeklis A.K., Belimov A.A., Bullitta S. (2012). Relationships between pasture legumes, rhizobacteria and nodule bacteria in heavy metal polluted mine waste of SW Sardinia. *Symbiosis* 58; 1 - 3.
- Safronova V.I., Piluzza G, Bullitta S, Belimov A.A. (2011). Use of legume-microbe symbioses for phytoremediation of heavy metal polluted soils: Advantages and potential problems. In: Golubev IA (ed) Handbook for phytoremediation. Nova, USA, 443 - 470.
- Schreurs E., Voets T., Thewys T. (2011). GIS-based assessment of the biomass potential from phytoremediation of contaminated agricultural land in the Campine region in Belgium. *Biomass and Bioenergy* 35; 4469 - 4480.
- Searle S. Y., Malins C. J., 2014. Will energy crop yields meet expectations? *Biomass and Bioenergy* 65, 3-12.
- Sequi P. (1989). Chimica del suolo, Patron Editore, Bologna, pp. 627.
- Shahid M, Xiong T., Masood N., Leveque T., Quenea K., Austruy A., Foucault Y., Dumat C. (2014). Influence of plant species and phosphorus amendments on metal speciation and bioavailability in a smelter impacted soil: a case study of food-chain contamination. *Journal of Soils and Sediments* 14; 655 - 665.
- Sheaffer C.C., Seguin P. (2003). Forage Legumes for Sustainable Cropping Systems. *Journal of Crop Production* 8; 187 - 216.
- Sitzia M.; Fois N. (1999) *Semi e legumi di Medicago polymorpha L. come risorsa alimentare estiva per gli ovini in ambiente mediterraneo*. Rivista di agronomia 33 (3); 185 - 188.
- Stephenson C., Black C.R. (2014). One step forward, two steps back: the evolution of phytoremediation into commercial technologies. *Bioscience Horizons* 7:hzu009–hzu009. 10.1093/biohorizons/hzu009.
- Šyc M., Pohořelý M., Kameníková P., Habart J., Svoboda K., Punčochář M. (2012). Willow trees from heavy metals phytoextraction as energy crops. *Biomass and Bioenergy* 37; 106 - 113.

- Tangahu B.V., Abdullah S.R.S., Basri H., Idris M., Anuar N., Mukhlisin M. (2011). A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*. DOI:10.1155/2011/939161.
- Tapia Y., Cala V., Eymar E., Frutos I., Gárate A., Masaguer A. (2011). Phytoextraction of Cadmium by Four Mediterranean Shrub Species, *International Journal of Phytoremediation* 13 (6); 567 - 579.
- Tapia Y., Diaz O., Pizarro C., Segura R., Vines M., Zúñiga G., Moreno - Jiménez E. (2011). *Atriplex atacamensis* and *Atriplex halimus* resist As contamination in Pre-Andean soils (northern Chile). *Science of the Total Environment* 450 - 451; 188 - 196.
- Tlustoš P.; Száková J.; Hrubý J.; Hartman I.; Najmanová J.; Nedelník J.; Pavlíková D.; Batysta M., (2006). Removal of As, Cd, Pb, and Zn from contaminated soil by high biomass producing plants. *Plant Soil and Environment* 52 (9); 413-423.
- Trakal L., Martínez-Fernández D., Vítková M., Komárek M. (2015) Phytoextraction of Metals: Modeling Root Metal Uptake and Associated Processes in: Phytoremediation: management of environmental contaminants (vol. 1). Springer International Publishing Switzerland. Ansari *et al.*(Eds.).
- Vamerali T., Bandiera M., Coletto L., Zanetti F., Dickinson N.M., Mosca G. (2009) Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environmental Pollution* 157; 887 - 894.
- Vamerali T., Bandiera M., Mosca G. (2010). Field crops for phytoremediation of metal contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters* 8; 1 - 17.
- van der Ent A., Baker A.J.M., Reeves R.D., Pollard A.J., Schat H. (2013) Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil* 362; 319 - 334.
- Van Oosten M.J, Maggio A. (2015). Functional biology of halophytes in the phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Environmental and Experimental Botany* 111; 135 - 146.
- Vargiu M., Spanu E., Loche F., Salis L. (2000). Preliminary results of some forage legume populations cultivated in three different Sardinian environments. In: Sulas L. (ed.). *Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses*, Zaragoza: CIHEAM, 2000; 55 - 58 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 45).
- Viard B., Pihan F., Promeyrat S., Pihan J.C. (2004). Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: bioaccumulation in soil, Graminaceae and land snails. *Chemosphere* 55; 1349 - 1359.
- Vickerman D.B., Shannon M.C., Bañuelos G.S., Grieve C.M., Trumble J.T. (2002). Evaluation of *Atriplex* lines for selenium accumulation, salt tolerance and suitability for a key agricultural insect pest. *Environmental Pollution* 120; 463 - 473
- Walker D.J., Lutts S., Sánchez-García M., Correal E. (2014). *Atriplex halimus* L.: Its biology and uses. *Journal of Arid Environments*, 100 - 101; 111 - 121.
- Watson C., Pulford I.D., Riddell - Black D. (2003). Development of a hydroponic screening technique to assess heavy metal resistance in willow (*Salix*). *International Journal of Phytoremediation*, 5(4); 333 - 349.

- Weih M., Nordh N.E. (2002). Characterising willows for biomass and phytoremediation: growth, nitrogen and water use of 14 willow clones under different irrigation and fertilisation regimes. *Biomass and Bioenergy* 23; 397 - 413.
- Weise D.R., White R.H.; Beall F.C.; Etlinger M. (2005). Use of the cone calorimeter to detect seasonal differences in selected combustion characteristics of ornamental vegetation. *International Journal of Wildland Fire* 14; 321 - 338.
- WHO, World Health Organization, (2010). Preventing disease through healthy environments exposure to cadmium: a major public health concern. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland. www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf [15 Marzo 2015].
- Wintermans J.F.G.M., De Monts A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta* 109, 448 - 453.
- Wong M.H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50; 775 - 780.
- Zacchini M., Pietrini F., Scarascia Mugnozza G., Iori V., Pietrosanti L., Massacci A. (2009). Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water Air and Soil Pollution* 197; 23 - 34.

Ringraziamenti

Questa tesi è stata realizzata grazie all'aiuto e all'accoglienza della Professoressa Alessandra Carucci e della Professoressa Giovanna Cappai, che voglio ringraziare prima di tutti.

Un particolare ringraziamento per la disponibilità va a Prof. Aldo Muntoni e alla D.ssa Martina Piredda.

Ringrazio la D.ssa Mirella Vargiu di Agris Sardegna per avermi fornito il materiale utilizzato in alcune sperimentazioni e il Dott. Salvatore Pulisci per l'ospitalità all'Istituto Agrario Duca degli Abruzzi di Elmas.

Agli amici che ho conosciuto in questo percorso, Daniele, Silvia e Silvia, Emanuela e Daniela, e Debora Jjt, che c'è sempre stata.

E poi, ma sì, grazie a me!