



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti
Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

**Effetti della dinamica degradativa di radici di
colza in terreno inquinato sulla
fitostabilizzazione di metalli pesanti nel lungo
periodo**

Relatore:
Ch.mo Prof. Teofilo Vamerali

Correlatore:
Ch.mo Prof. Giuliano Mosca

Laureando:
Matteo Zattere
Matricola n. 1014669

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT	5
1 INTRODUZIONE	7
1.1 Metalli pesanti	9
1.2 Tecniche di bonifica di suoli contaminati.....	12
1.2.1 Fitorimediazione.....	13
1.2.2 Fitoestrazione	17
1.2.3 Fitostabilizzazione	19
1.2.4 Degradazione dei residui colturali.....	22
2. SCOPO DELLA TESI.....	25
3. MATERIALI E METODI	27
3.1 Allestimento della prova.....	27
3.2 Prova di degradazione	28
3.2 Contenuto totale di metalli nel suolo.....	32
3.3 Frazione biodisponibile di Cd, Cu, Ni, Pb e Zn	32
3.4 Attività microbica nel suolo	33
3.5 Contenuto totale di metalli nelle piante spontanee.....	35
4 RISULTATI	36
4.1 Accrescimento delle piante.....	36
4.3 Dinamica degradativa dei fittoni	42
4.4 Dinamica di rilascio di metalli dai fittoni in via di degradazione	44
4.5 Biodisponibilità dei metalli	47
4.6 Attività microbica nel terreno.....	49
4.7 Concentrazione di metalli presenti nelle piante spontanee.....	50
5 DISCUSSIONE	54

5.1 Produzione di biomassa e accumulo dei metalli.....	54
5.2 Dinamica di degradazione della biomassa radicale.....	55
5.3 Dinamica di rilascio di metalli pesanti dai fittoni	58
5.4 Flora spontanea.....	58
6. CONCLUSIONI	60
7. BIBLIOGRAFIA	62

RIASSUNTO

Questo studio ha avuto come obiettivo lo studio della dinamica degradativa di fittoni di colza (*Brassica napus* (L.) var. *oleifera* Metzg.) in un terreno medio-limoso inquinato ad hoc con solfati di rame, zinco, cadmio e cobalto, al fine di valutarne la capacità di fitostabilizzazione nel medio-lungo periodo. Sono stati inoltre misurati la frazione di metalli estraibile in DTPA e l'attività microbica (idrolisi della fluoresceina di-acetato) nel terreno per verificare come la mobilità degli inquinanti influenzi l'attività degradativa della microflora batterica. È stata valutata inoltre l'attività microbiologica prevalente (cellulosolitica o proteolitica) del terreno tramite l'utilizzo di "fertimetri".

Sono state confrontate due cultivar, un ibrido a taglia convenzionale (Excalibur) uno semi-nano (PR45D01) coltivati a due diverse densità (44 e 64 semi m⁻²). Excalibur ha prodotto una biomassa radicale (fittoni: 2.3 t ha⁻¹) e aerea (33 t ha⁻¹) superiore a quella di PR45D01, traducendosi in un maggiore accumulo di metalli a livello radicale (500 mg Cd, 550 mg Co, 10 g Cu e 58 g Zn per ettaro). Anche l'aumento della densità di coltivazione ha determinato una maggiore produzione di biomassa e accumulo di metalli. A inizio sperimentazione i fittoni sono stati puliti e inseriti in *nylon-net-bags* e interrati nel terreno inquinato in PVC, e predisponendo una tesi di controllo non inquinata. Le radici sono quindi state periodicamente raccolte campionate, i.e. 35, 125, 216, 316 e 392 giorni dall'interramento per misurarne il peso e il contenuto residuo di metalli.

Il ritmo degradativo dei fittoni è stato approssimato con una funzione di tipo sigmoidale, senza rilevare differenze significative tra le varietà o tra densità a confronto. Si è registrata una forte perdita di biomassa radicale nei primi 100 giorni di incubazione, ciononostante dopo 392 giorni persisteva ancora circa il 43% della biomassa iniziale nel terreno inquinato e solo il 33% nel controllo. La degradazione dei fittoni è stata quindi più lenta nel terreno inquinato (tempo di dimezzamento, $t_{1/2} \sim 159$ giorni) rispetto al controllo ($t_{1/2} \sim 107$), e ciò è stato attribuito alla minore attività microbiologica in conseguenza dell'elevata biodisponibilità dei metalli, in particolare Cu e Zn.

Il contenuto di metalli pesanti nei fittoni in via di degradazione è risultato aumentare per tutti gli elementi considerati nella tesi inquinata, ma anche per Co e Zn nel controllo. Tale aumento può essere spiegato dai fenomeni di adsorbimento alla superficie della sostanza organica, che sarebbero stati favoriti dall'ambiente confinato e

dalla rallentata lisciviazione, ma anche dalla elevata biodisponibilità di metalli della tesi inquinata.

In conclusione, è prevedibile poter stabilizzare efficacemente i metalli pesanti nei fittoni di colza grazie alla frazione di biomassa radicale recalcitrante alla degradazione, soprattutto in siti non lavorati. I quantitativi di metalli stabilizzati nelle radici per unità di superficie sono risultati modesti poiché ottenuti da coltivazione di colza in terreno non inquinato, ma è prevedibile che la quantità aumenti notevolmente in siti contaminati, così come è prevedibile aumentare annualmente la quota di sostanza organica indegradata attraverso nuovi cicli di coltivazione. Nel lungo periodo, l'efficienza della fitostabilizzazione in terreni fortemente inquinati può aumentare per effetto di una minore attività microbiologica. Ulteriori miglioramenti potrebbero essere raggiunti utilizzando specie arboree, in virtù della loro maggiore biomassa radicale e della più consistente lignificazione delle radici, che le rende meno suscettibili a degradazione.

Sono comunque indispensabili ulteriori studi per definire meglio il ruolo delle condizioni ambientali sulla degradazione della biomassa vegetale e individuare le specie più adatte a questo tipo di applicazione.

Long-term effects of root degradation dynamics in rapeseed on metal phytostabilisation in polluted soil

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the dynamics of decomposition of taproots in rapeseed (*Brassica napus* (L.) var . *Oleifera* Metzg) in a polluted soil, in order to evaluate the potential phytostabilisation of heavy metals in the medium-long term.

A conventional sized hybrid (Excalibur) and a semi-dwarf hybrid (PR45D01) were sown at densities of 44 and 64 seeds m⁻² in September 2010 and plants were collected in June 2011 for measuring shoot and root biomass and metal contents. Excalibur produced greater biomass than PR45D01 (33 and 2.3 t ha⁻¹ for shoot and taproot biomass, respectively) and resulted in a greater accumulation of metals (taproots: 500 mg of Cd, 550 mg of Co, 10 g of Cu and 58 g Zn per hectare). The highest sowing density also resulted in higher biomass production (shoot and root) and metal accumulation.

A set of taproots was placed in 1.5-mm mesh nylon-net-bags before burying them in PVC boxes filled with either Co-Zn-Cd-Co contaminated or unpolluted silty-loam soil. The roots were then periodically collected (i.e. 35, 125, 216, 316 and 392 days after burying) to measure the residual biomass and metal contents. Soil DTPA-extractable metals and microbial activity (hydrolysis of fluorescein diacetate) were measured to assess the influence of these parameters on dynamics of taproot degradation. Prevailing microbial activity (cellulosolytic or proteolytic) was also evaluated through ad-hoc prepared “fertimetres”.

Root degradation was approximated with a sigmoidal model and no significant differences were found between varieties or sowing densities. There was a fast biomass loss in the first 100-day incubation period, although after 392 days there was ~43% of root biomass still undegraded in polluted soil compared with ~33% of controls. Root degradation was therefore slower in the polluted soil (half-life, $t_{1/2}$ ~159 days) than in controls ($t_{1/2}$ ~107 days). This was attributed to lower microbial activity of the polluted soil, which depended on the high metal bioavailability.

Metals contents in degrading roots generally increased over time in the polluted thesis, whereas only Co and Zn increased in controls. This increase may be a

consequence of metal adsorption onto organic materials due to the high metal bioavailability and limited water percolation from boxes.

It is concluded that metal stabilisation in rapeseed roots seems feasible in the medium-long term, since part of root biomass is recalcitrant to degradation. Although the amount of metals here retained by roots is poor, because it derives from cultivation in unpolluted soil, it is predicted that this amount greatly increases in polluted sites and root biomass increase over time through new cultivation cycles, especially of no-tillage systems. Therefore, in the long term the efficiency of phytostabilisation could potentially increase, especially in polluted soils, as impaired microbial activity implies slower degradation of organic materials and reduced metal release. Improved metal stabilization may be achieved with woody species, thanks to their greater root biomass and lignin content, which would result in slower degradation. However, further studies are needed to better define the role of environmental conditions in the degradation of plant biomass and identify the most suitable species for phytostabilisation.

1 INTRODUZIONE

Nell'era moderna, con l'aumento della popolazione mondiale, la richiesta di generi alimentari è in costante aumento, ma la disponibilità di nuove terre coltivabili sta rapidamente diminuendo. La salvaguardia del terreno, e soprattutto della “rizosfera”, cioè della porzione di suolo con cui le radici delle piante interagiscono per reperire l'acqua e i nutrienti necessari alla propria crescita e sviluppo, diviene pertanto fondamentale per garantire che le esigenze alimentari delle generazioni attuali e future siano adeguatamente soddisfatte.

Ciononostante, le attività umane, in particolar modo lo sviluppo industriale e l'agricoltura hanno influito negativamente sulle caratteristiche dei suoli, compromettendone in molte aree la piena funzionalità. L'eccessivo sfruttamento del terreno tramite pratiche agricole non idonee, l'uso di principi attivi altamente inquinanti e nocivi, lo scarico di rifiuti, talvolta molto tossici, su siti di interesse agricolo, hanno contribuito a rendere molte zone non coltivabili. Tra le attività industriali invece, quelle con il maggiore impatto sul suolo sono l'attività estrattiva e metallurgica, in quanto insistono direttamente sui terreni, risultando spesso incompatibili con i delicati equilibri biologici che caratterizzano i suoli, in particolare quelli più fertili e vulnerabili.

Tra le sostanze che inquinano ed alterano maggiormente l'ambiente, i metalli pesanti, i.e., Cd, Cr-VI, Pb, Co, Cu, Ni, Se, Zn, assumono sempre maggior rilevanza a causa delle crescenti quantità estratte e utilizzate e della loro tossicità. La loro natura chimica li rende particolarmente dannosi, in quanto non posso essere "degradati" biologicamente ma solo convertiti da uno stato ossidativo all'altro, o essere adsorbiti dai complessi organici (Garbisu and Alkorta, 2001; Gisbert et al., 2003) o accumulati dagli organismi viventi fino a raggiungere concentrazioni tali da compromettere la salute di piante e animali, ma anche dell'uomo (REFs). Se ne deduce quindi che la corretta gestione e la bonifica di aree inquinate da metalli devono prevedere la rimozione fisica degli stessi, oppure la loro conversione in forme immobili che non possono essere assorbite dagli organismi (Clemens, 2006; Thompson and Banningam, 2008; Zhuang et al., 2009).

Tabella 1. Concentrazioni soglia per la contaminazione del suolo e del sottosuolo riferite alla specifica destinazione d'uso dei siti da bonificare (estratto dell'Allegato 5 al Titolo V, Parte Quarta del D. lgs. 152/2006).

	Siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale (mg kg ⁻¹ s.s.)	Siti ad uso commerciale e industriale (mg kg ⁻¹ s.s.)
Antimonio (Sb)	10	30
Arsenico (As)	20	50
Berillio (Be)	2	10
Cadmio (Cd)	2	15
Cobalto (Co)	20	250
Cromo totale (Cr tot)	150	800
Cromo VI (Cr VI)	2	15
Mercurio (Hg)	1	5
Nichel (Ni)	120	500
Piombo (Pb)	100	1000
Rame (Cu)	120	600
Selenio (Se)	3	15
Stagno (Sn)	1	350
Tallio (Tl)	1	10
Vanadio (V)	90	250
Zinco (Zn)	150	1500

A livello italiano, la definizione di inquinamento e le attività di bonifica sono regolate dal Testo unico ambientale (D. lgs. 152/2006), che fissa inoltre la soglia di concentrazione nel suolo entro cui ciascun inquinante può essere considerato tollerabile.

La Tabella 1 riporta le concentrazioni soglia per i metalli pesanti, distinguendo tra terreni ad uso industriale e terreni ad uso residenziale - verde pubblico, così come riportato nell'Allegato 5 al Titolo V, parte Quarta del D. Lgs. 152/2006.

1.1 Metalli pesanti

Con il termine *metalli pesanti* (MP) generalmente sono definiti gli elementi caratterizzati da proprietà metalliche e che sono spesso associati ad inquinamento e rischio di tossicità biologica (Duffus, 2002). Sono considerati metalli:

- elementi alcalini e alcalini-terrosi (e.g., Cs, Ba),
- metalli di transizione e post-transizione (e.g., Ag, Cd, Co, Cr, Mn, Hg, Mo, Ni, Cu, V, Zn, Pb, Sn, Tl),
- semi-metalli (e.g., As, Sb, Se),
- lantanoidi (e.g., Ce),
- attinoidi (e.g., U).

Tutti questi elementi sono accomunati dalle seguenti caratteristiche:

- densità $> 5 \text{ g cm}^{-3}$;
- numero atomico > 20 ;
- comportamento cationico;
- spiccata attitudine a formare complessi;
- stati di ossidazione diversi a seconda delle condizioni di pH ed Eh;
- grande affinità per i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi.

I metalli pesanti, con l'eccezione di ferro e alluminio, pur essendo naturalmente presenti nelle rocce, nel suolo, nelle piante e negli animali, rocce costituiscono meno dell'1% della crosta terrestre e sono pertanto considerati elementi traccia. Le loro concentrazioni nei suoli, nei sedimenti e nelle rocce infatti sono solitamente di parti per milione o per miliardo.

Da un punto di vista ecotossicologico, i metalli si possono classificare in tre gruppi:

1. metalli che hanno un importante ruolo fisiologico;
2. metalli che non hanno alcuna azione fisiologica conosciuta;
3. metalli chimicamente simili ad un elemento indispensabile.

Il primo gruppo è formato da metalli che sono definiti essenziali per animali e piante dato che rientrano nella struttura di alcune molecole fondamentali, come gli enzimi. Zinco e rame, ad esempio, appartengono a questa categoria. Tuttavia, una delle

principali caratteristiche dei metalli pesanti, indipendentemente che siano essenziali o no, è che essi possono produrre effetti tossici già a basse concentrazioni, in quanto possono formare complessi stabili con molecole organiche, interferendo per esempio con la funzionalità di molte proteine, tra cui gli enzimi, ma anche con fosfolipidi di membrana e DNA.

Per i nutrienti, tra cui sono compresi anche i micronutrienti come alcuni metalli, si possono individuare delle concentrazioni ottimali o “adeguate”, che nel caso delle piante consentono la massima crescita; al di sotto di tali concentrazioni si verificano invece condizioni di carenza (Baker e Walker, 1898). L’intervallo di concentrazione entro cui l’apporto nutritivo risulta adeguato è diverso a seconda dell’elemento e della specie vegetale considerati. Concentrazioni superiori a quelle ottimali risultano tossiche e provocano una serie di effetti che portano all’inibizione della crescita, ma possono anche causare la morte della pianta stessa. Elementi che non rivestono alcun ruolo fisiologico sono invece sempre potenzialmente dannosi.

Nello stabilire l’ecotossicità per le specie vegetali non è sufficiente conoscere la concentrazione totale dei metalli pesanti (MP) presenti nel suolo, ma piuttosto è importante valutarne la frazione che risulta biodisponibile e quindi facilmente assorbibile. La biodisponibilità dei metalli è determinata da fattori biotici e abiotici, come elencato in Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche del suolo che influenzano l’assorbimento di metalli pesanti.

Stimolanti	Limitanti
Diminuzione del pH	Aumento del pH
Concentrazione di MP in soluzione	Dilavamento dal terreno
Processi di diffusione nelle soluzioni	Adsorbimento
Diminuzione del potenziale redox	Aumento del potenziale redox del suolo
Composizione minerale del suolo	

La biodisponibilità dei metalli dipende quindi dalle caratteristiche del suolo; tuttavia, anche le attività umane possono alterare le proprietà del terreno, pertanto possono contribuire alla mobilizzazione o immobilizzazione dei MP. Per esempio, l’emissioni in atmosfera di sostanze come l’anidride solforosa (SO₂) acidificano le piogge e provocano un abbassamento del pH del suolo, favorendo quindi la mobilizzazione dei metalli. Pratiche agricole come la calcitazione e l’uso di fertilizzanti

possono al contrario determinare un aumento del pH e quindi una stabilizzazione degli inquinanti metallici. Il potenziale redox può mutare a seguito dell'intervento antropico, per via del drenaggio di suoli sommersi o a causa dell'irrigazione praticata in quelli aridi al fine di un loro possibile impiego agricolo. Il contenuto di sostanza organica può essere incrementato dall'interramento dei residui colturali e dall'aggiunta di concime biologico, mentre lavorazioni profonde e pratiche agricole intensive possono causarne un deficit. La capacità di scambio cationico viene indirettamente alterata dalle attività che modificano il pH, il contenuto di sostanza organica e la salinità della soluzione circolante; quest'ultima, ad esempio, aumenta in seguito all'uso di acque irrigue salmastre, tipico delle aree costiere dove le riserve idriche dolci sotterranee sono sovrasfruttate. La salinizzazione del suolo può a sua volta causare l'alterazione degli equilibri di scambio ionico a favore della solubilizzazione dei metalli pesanti.

Le stesse piante e i microrganismi del suolo sono in grado di modificare la biodisponibilità dei metalli (Tabella 3) agendo sul loro stato di ossidazione: le radici delle piante e la microfauna del terreno infatti possono liberare protoni od ossigeno, favorendo quindi reazioni di riduzione o ossidazione e rilasciare agenti complessanti come gli acidi organici e i siderofori che si legano ai metalli facilitandone l'assorbimento.

Tabella 3. Influenza della radice sull'assorbimento dei metalli pesanti.

Fattori stimolanti	Fattori limitanti
Acidificazione del suolo	Selettività della membrana biologica
Attività dei traslocatori	Drenaggio delle membrane radicali
Rilascio dei riduttori	Strategie per evitare l'ingresso dei metalli
Escrezioni di molecole chelanti	Rilascio di ossidanti

L'assorbimento dei metalli dal terreno e dalla soluzione circolante da parte delle piante avviene secondo due meccanismi differenti:

- trasporto passivo: semplice diffusione secondo gradiente di concentrazione e senza consumo di energia;
- trasporto attivo: movimento contro gradiente di concentrazione e quindi con consumo di energia.

L'assorbimento e il trasporto dei metalli pesanti all'interno della pianta dipendono sia dalla specie vegetale che dal metallo; dato che i metalli non sono in grado di attraversare la barriera dell'endoderma, l'assorbimento può avvenire solo tramite radici giovani che non hanno ancora differenziato tale tessuto. Una volta raggiunto lo xilema, i metalli, probabilmente in parte complessati e in parte come acquaioni, vengono traslocati verso la parte aerea della pianta.

1.2 Tecniche di bonifica di suoli contaminati

La rimozione dei metalli dai suoli contaminati si presenta come un problema complicato da affrontare, in quanto i metalli pesanti, essendo già in forma elementare, persistono inalterati nell'ambiente (Wade *et al.*, 1993). Pertanto, le tecniche di bonifica debbono porsi l'obiettivo di rimuovere fisicamente i metalli in eccesso, o quantomeno di isolare la matrice contaminata per evitare la migrazione degli inquinanti e l'estensione della contaminazione.

Di seguito sono elencate le principali tecniche di bonifica chimico-fisiche che si applicano tradizionalmente ai siti inquinati da metalli pesanti; questi interventi hanno però gli svantaggi di avere un forte impatto ambientale e un alto costo di attuazione.

- **Isolamento e contenimento:** costruzione di un'opera di contenimento che può essere predisposta direttamente all'interno del sito da bonificare (*in situ*) oppure in un altro sito appositamente predisposto per il trattamento della matrice contaminata (*ex situ*). Non si tratta comunque di una soluzione permanente alla contaminazione, in quanto le strutture di contenimento sono soggette a deterioramento (USEPA, 1990).
- **Separazione meccanica:** sfrutta le diverse densità delle particelle per la separazione, che avviene con l'ausilio di attrezzature meccaniche (cicloni, centrifughe, vasche di flottazione). La separazione meccanica può sfruttare anche le proprietà magnetiche degli inquinanti.
- **Separazione pirometallurgica:** la matrice contaminata viene trattata ad alte temperature (200-700 °C) in fondi rotanti o ad arco in postazioni fisse o mobili; in queste condizioni i metalli volatilizzano e vengono recuperati tramite appositi filtri.
- **Trattamenti chimici:** hanno lo scopo di ridurre la disponibilità e mobilità dei metalli attraverso l'impiego di sostanze chimiche con cui i

metalli possono interagire. Le reazioni comprendono ossidazione (ozono, perossido di idrogeno), riduzione e neutralizzazione; esse convertono gli inquinanti in forme meno pericolose, meno mobili e quindi più stabili e inerti.

- **Barriere permeabili:** utilizzate per trattare falde contaminate; consistono nell'installazione di barriere permeabili reattive in grado di adsorbire i metalli pesanti (Vidac e Pohland, 1996).
- **Separazione elettrocinetica:** tecnologia basata sul movimento di ioni dovuto all'applicazione di un campo elettrico di bassa intensità generato da anodi e catodi appositamente predisposti nel suolo (Mulligan et al. 2001).
- **Soil flushing:** consiste nell'iniettare acqua, anche contenente additivi, nel suolo contaminato o direttamente in falda per mobilizzare i metalli, in modo da far aumentare il livello dell'acquifero fino alla zona contaminata. Gli inquinanti vengono quindi drenati nel sottostante acquifero e l'acqua viene captata attraverso appositi pozzi e trattata.
- **Soil washing:** tecnica ex situ che si basa sull'utilizzo di diversi agenti chimici addizionati alla matrice contaminata. Il materiale viene trattato in appositi reattori dove avviene la separazione del contaminante e le particelle di suolo.

A parte le già citate tecniche di bonifica per mezzo di trattamenti chimico-fisici, esistono, e si stanno sempre più diffondendo, trattamenti che sfruttano processi biologici. Tra questi si distinguono i trattamenti che si basano sull'attività metabolica di microrganismi (bioremediation), e quelli che sfruttano le capacità di varie specie vegetali di degradare (per le sostanze organiche), estrarre o immobilizzare i contaminanti presenti nei suoli o nelle acque (phytoremediation).

1.2.1 Fitorimediazione

La fitorimediazione è una tecnica di bonifica che consiste nell'utilizzo di piante per il trattamento di superfici inquinate. Il termine inglese *phytoremediation* è stato tradotto in italiano con i termini *fitorisanamento* o *fitodecontaminazione*.

La fitorimediazione è definita come quella “tecnica che utilizza piante superiori e microrganismi della rizosfera per la rimozione, degradazione e immobilizzazione dei contaminanti presenti nell’ambiente” (Cunningham et al., 1996) .

La “phytoremediation”, poco costosa rispetto alle tradizionali tecniche di trattamento chimico e fisico in quanto richiede solo i costi di coltivazione e raccolta della biomassa vegetale, ha ricevuto recentemente l’interesse da parte della ricerca in quanto presenta numerosi vantaggi rispetto ai trattamenti tradizionali: alcune delle specie vegetali utilizzabili possiedono per esempio un loro valore commerciale (olio o biomassa per uso bioenergetico) che riduce il costo dell’intero processo; le piante concentrano contaminanti nei tessuti, riducendo il volume della biomassa inquinata e richiedendo attrezzature di estrazione di piccole dimensioni e poco costose (Miller, 1996; Saxena et al., 1999); inoltre la presenza di una copertura vegetale limita l’erosione del suolo, migliora il paesaggio e la fertilità del terreno. Infine, l’impiego di tecnologie verdi a basso impatto ambientale è generalmente accettato dall’opinione pubblica.

La possibilità di utilizzare piante per la depurazione di matrici inquinate è stata ampiamente studiata nel corso dell’ultimo ventennio, ma le prime notizie sull’impiego dei vegetali per i trattamenti delle acque reflue risalgono a circa 300 anni fa; inoltre è almeno dalla metà degli anni ‘70 del secolo scorso che sono stati proposti i primi metodi per la fitorimediazione di fanghi di escavazione e di suoli contaminati da metalli pesanti (Cunningham e Lee, 1995).

Le fitotecnologie consentono quindi di trattare sia acque (fitodepurazione) che suoli (fitorimediazione) (REFs).

I processi di fitorimediazione si dividono a loro volta in due gruppi:

- processi *in planta*, che richiedono l’assorbimento dell’inquinante da parte dei sistemi radicali e quindi l’accumulo all’interno dei tessuti vegetali;
- processi *ex planta*, che invece avvengano nella rizosfera, cioè senza accumulo di sostanze inquinanti nella pianta (Arduini e Masoni, 2002).

Nei processi di fitorimediazione *in planta*, dopo essere stato assorbito dalla pianta, il contaminante può essere:

- degradato per formare metaboliti intermedi o, più raramente, per un'ossidazione completa a CO₂ e H₂O (fitodegradazione, applicabile ai contaminanti organici);
- coniugato, cioè legato ad altre molecole;
- inattivato mediante deposito nelle componenti strutturali della pianta, quali ad esempio la parete cellulare ed il vacuolo di cellule delle radici (fitostabilizzazione) o di fusti e foglie (fitoestrazione);
- trasportato alle foglie e poi volatilizzato attraverso gli stomi (fitovolatilizzazione).

Nei processi di fitorimediazione *ex planta*, invece, l'inattivazione dell'inquinante avviene all'esterno della pianta e precisamente:

- sulle sue superfici esterne, e mediante azioni di tipo fisico (rizofiltrazione e aerofiltrazione) o chimico (stabilizzazione);
- nel volume di terreno circostante le radici, mediante l'emissione di essudati radicali e l'attività dei microrganismi della rizosfera. La decontaminazione avviene ad opera di sostanze che la pianta o i microrganismi della rizosfera liberano nel substrato e che sono in grado di degradare il contaminante (fitodegradazione e biodegradazione) o di immobilizzarlo mediante legami complessi (fitostabilizzazione e biostabilizzazione).

I processi che determinano la fitoestrazione e fitostabilizzazione, come anticipato si avvalgono anche di attività biologiche che avvengono a livello della rizosfera, cioè nell'interfaccia suolo-radice, dove si trovano un sottile strato di terreno che la microflora ad essi associata (Wenzel et al., 1999). Le superfici esterne delle radici fungono, infatti, da supporto per biofilm batterici attivi e per estensioni di ife fungine che aumentano significativamente la loro area di contatto con il suolo e le loro capacità metaboliche e, a loro volta, producono e rilasciano nel substrato enzimi in grado di degradare i contaminanti organici e di promuovere l'assorbimento, l'immobilizzazione e la volatilizzazione degli inquinanti organici e inorganici (Arduini e Masoni, 2002).

L'aerofiltrazione si basa sulla capacità della parte aerea delle piante di filtrare l'aria trattenendo i contaminanti in essa presenti, sia mediante il loro assorbimento sia semplicemente mediante un'azione di tipo fisico. L'azione di aerofiltrazione più nota e

più importante è senza dubbio la cattura della CO₂ e la liberazione di O₂ ma a questa se ne aggiungono altre, come la costruzione dei frangivento per la protezione delle colture dalla salsedine lungo le coste e dalle particelle di terreno trasportate dal vento e le barriere vegetate lungo le autostrade per la filtrazione dei gas di scarico degli autoveicoli. Le coperture vegetali possono anche trattenere i pollini, le spore fungine e batteriche e altri patogeni (Arduini e Masoni, 2002).

La rizofiltrazione sfrutta la capacità delle radici di trattenere i contaminanti sia chimicamente, mediante adsorbimento, sia fisicamente. L'adsorbimento interessa soprattutto i composti a carica elettrica positiva, che si legano ai residui di carica negativa presenti sui rivestimenti esterni delle radici, quindi queste ultime fungono semplicemente da filtro passivo (Arduini e Masoni, 2002).

La fitostabilizzazione mira ad ottenere l'immobilizzazione dei contaminanti presenti nell'ambiente, rendendoli innocui. Si distinguono due tipi di fitostabilizzazione, in planta ed ex planta. La prima prevede l'assorbimento dei contaminanti da parte delle piante e la loro incorporazione ed immobilizzazione nei tessuti delle radici, mentre la seconda prevede il rilascio nel substrato di essudati radicali capaci di polimerizzare i contaminanti sulla superficie esterna della radice oppure di precipitarli legandoli alla matrice del suolo (Arduini e Masoni, 2002).

La fitodegradazione interessa esclusivamente i contaminanti organici e può avvenire sia all'interno della pianta, previo assorbimento, sia direttamente nel substrato, mediante l'azione degli essudati radicali e dei microrganismi associati alla rizosfera (Arduini e Masoni, 2002).

La fitovolatilizzazione è un processo che si basa sulla capacità delle piante di assorbire e convertire in forma volatile gli elementi presenti nel terreno liberandoli successivamente nell'atmosfera (Zayed et al., 2000). Rispetto alle altre tecniche di fitorimediazione, la fitovolatilizzazione offre il vantaggio di ottenere la decontaminazione del substrato senza dover rimuovere la biomassa vegetale (Arduini e Masoni, 2002), ma determina il trasferimento degli inquinanti dal sistema suolo all'atmosfera.

La fitoestrazione prevede l'assorbimento da parte delle piante dei contaminanti presenti nel terreno o nelle acque ed il loro accumulo all'interno degli organi ipogei o epigei, che vengono successivamente asportati. Può essere utilizzata per la rimozione dei metalli pesanti, dei radionuclidi e degli elementi nutritivi (Arduini e Masoni, 2002).

Di seguito sono descritte più in dettaglio la fitoestrazione e la fitostabilizzazione; quest'ultima costituisce l'oggetto principale di questa tesi e sarà quindi trattata in modo più completo.

1.2.2 Fitoestrazione

La fitoestrazione, come accennato, consiste nell'accumulo di metalli pesanti nella biomassa aerea di piante in grado di assorbire questi elementi e trasferirli dalle radici a fusti e foglie, e ad oggi risulta, almeno teoricamente, il miglior approccio per rimuovere la contaminazione da metalli pesanti dal suolo senza danneggiare la struttura di quest'ultimo e la sua fertilità. La fitoestrazione è maggiormente indicata per terreni che presentano un livello di inquinamento moderato e localizzato nello strato superficiale del suolo, dove si collocano le radici delle piante (Rulkens et al., 1998).

La fitoestrazione può avvenire in due modi:

- Fitoestrazione continua, in cui la maggiore o minore capacità di rimozione da parte della pianta determina il ritmo di bonifica, e l'unica variabile che si può controllare è il numero di cicli vegetativi (Salt et al., 1995; Salt et al., 1997).
- *Fitoestrazione assistita con chelanti o indotta*, in cui l'impiego di molecole organiche capaci di legare i metalli rendendoli più biodisponibili per l'assorbimento radicale (chelanti, spesso sintetici) consente di aumentare e accelerare la rimozione dei metalli dal terreno.

I primi tentavi di utilizzo di piante per la rimozione di metalli pesanti si sono avvalsi di specie vegetali dette “*iperaccumulatrici*” cioè piante che accumulano almeno un metallo in concentrazioni molto superiori a quelli che si riscontrano normalmente nei tessuti delle piante e che inoltre possiedono un'elevata capacità traslocazione degli stessi asportabili alla biomassa aerea. Il termine ‘*specie iperaccumulatrice*’ è stato inizialmente coniato e utilizzato da Brooks, nel 1977, per indicare quelle piante in grado di accumulare il Ni in concentrazioni $> 1 \text{ g kg}^{-1}$ sul peso secco. Successivamente il termine è stato esteso a tutte le specie che, senza mostrare sintomi di tossicità, accumulano almeno un metallo in concentrazioni 100 volte superiori alle concentrazioni normalmente presenti nei tessuti dei vegetali. I limiti di concentrazione per poter ritenere che una specie sia un'iperaccumulatrice di un certo elemento variano quindi a

seconda del metallo, e sono più basse per metalli molto tossici che solitamente vengono poco o per niente assorbiti, mentre sono e più alte per metalli che invece vengono utilizzati dalle piante come cofattori di enzimi per lo svolgimento di normali processi metabolici. Per esempio, specie che accumulano Co, Cu, Cr, Pb o Ni in concentrazioni $> 1 \text{ g kg}^{-1}$ sul peso secco sono considerate iperaccumulatrici, mentre Mn e Zn devono essere concentrati ad almeno 10 g kg^{-1} per ritenere che una certa pianta sia un'iperaccumulatrice di questi metalli (Brooks et al., 1977).

I principali meccanismi fisiologici grazie ai quali alcune piante sono in grado di tollerare la presenza di elevate quantità di metalli nei propri tessuti sono numerosi, e in genere consistono nell'isolamento degli elementi tossici rispetto ai siti in cui avvengono i processi metabolici, in modo tale da impedire che i metalli interferiscano con le macromolecole cellulari. Tra i processi di isolamento del contaminante si ricordano:

- compartimentalizzazione, cioè la segregazione in comparti cellulari, come il vacuolo, separati dalle principali vie metaboliche (Lasat et al., 1998);
- chelazione, cioè il legame con molecole organiche (fitochelatine) appositamente adibite al controllo delle concentrazioni di metalli all'interno della cellula vegetale (Cobbet, 2000);
- biotrasformazione, cioè la conversione in forme ioniche biologicamente meno attive e quindi meno pericolose (Salt et al., 1998).

Oltre alla capacità di assorbire e trasferire i metalli alla parte aerea e alla presenza di efficienti meccanismi di compartimentazione e biotrasformazione, per una efficiente fitoestrazione la pianta deve anche produrre un'elevata quantità di biomassa. La quantità di metallo rimossa dal terreno infatti è data dal prodotto della concentrazione dell'elemento di interesse nei tessuti per la biomassa del tessuto stesso. Ne deriva pertanto che a parità di concentrazione, a grandi biomasse corrispondono estrazioni maggiori. Il principale limite all'utilizzo di specie iperaccumulatrici in fitoestrazione è costituito proprio dalla scarsa produzione di biomassa, che risulta in rimozioni di metalli modeste e in tempi di bonifica eccessivamente lunghi (centinaia di anni). Efficienze maggiori possono essere invece ottenute utilizzando specie che compensano una minore concentrazione di metalli nei tessuti con la produzione di biomasse maggiori, garantendo pertanto tempi di intervento più accettabili. Esempi di

specie da biomassa che sono state testate per la fitoestrazione sono il pioppo, il salice, la thuya, fino a specie di interesse agrario quali il colza, il girasole e il mais.

1.2.3 Fitostabilizzazione

Oltre a trasferire quantità significative di metalli alla parte aerea, alcune specie sono in grado di immobilizzare concentrazioni anche maggiori nel sistema radice-rizosfera tramite un complesso insieme di processi quali l'adsorbimento, l'assorbimento, la precipitazione, la complessazione e la riduzione dei metalli, oppure di accumulare i metalli direttamente all'interno dei tessuti radicali, senza che avvenga traslocazione di elementi tossici alla parte aerea della pianta. In generale, l'immobilizzazione di metalli nel sistema radice-rizosfera viene indicato con il termine di "fitostabilizzazione" e, al pari della fitoestrazione, questo processo può essere sfruttato per la decontaminazione di terreni inquinati.

La fitostabilizzazione è l'approccio più utilizzato per la bonifica di suoli, sedimenti e fanghi (Mueller *et al.*, 1999) e dipende dall'abilità della pianta di limitare la mobilità e la biodisponibilità dei metalli nel suolo. Lo scopo della fitostabilizzazione non è quindi quello di rimuovere i contaminati dal suolo, ma di ridurre la loro mobilitazione lungo la catena trofica, limitando i rischi per la salute umana e per l'ambiente.

Come anticipato, la fitostabilizzazione può avvenire nella rizosfera o direttamente all'interno dei tessuti radicali. Qualora si intenda intervenire su un suolo contaminato tramite fitostabilizzazione, è necessario scegliere con cura la specie da utilizzare, in quanto, come per la fitoestrazione, la scelta della specie è una variabile determinante per il successo dell'intervento (Rizzi *et al.*, 2004).

Un buon candidato per l'impiego in fitostabilizzazione di metalli nelle radici, per esempio, deve avere una elevata capacità di assorbire e immobilizzare i contaminanti, un lento e ridotto rinnovo dei tessuti in cui viene accumulato il contaminante e la capacità di produrre essudati radicali in grado di ridurre la mobilità e la biodisponibilità del contaminante nel terreno (Arduini e Masoni, 2002). Tra le specie erbacee, quelle con apparato radicale fittonante possono pertanto rivelarsi promettenti per la fitostabilizzazione, in quanto la minore velocità di degradazione del fittone rispetto alle radici fini consentirebbe un più lento rilascio nell'ambiente dei metalli trattenuti.

Le piante devono inoltre sviluppare un esteso ed efficiente apparato radicale e minimizzare la traslocazione dei metalli dalle radici alla parte aerea (Mendez e Maier, 2008).

La presenza di una copertura vegetale sul terreno permette inoltre di ridurre i fenomeni erosivi, di creare un ambiente aerobico nella rizosfera e di apportare sostanza organica al suolo, consentendo la formazione di aggregati che oltre a migliorare la fertilità del terreno possono ulteriormente ridurre la mobilizzazione dei metalli nella rizosfera (Pulford e Watson, 2003; Robinson et al., 2006).

L'effetto delle radici sulla mobilità dei metalli è comunque ambivalente, in quanto può causare sia un aumento che una riduzione della mobilità dei metalli a seconda delle caratteristiche del terreno e delle esigenze specifiche della pianta. Infatti, se l'accumulo all'interno della radice immobilizza temporaneamente i metalli sequestrandoli dalla soluzione circolante (De Rio Celestino et al., 2006; Marmiroli et al., 2005; Vazquez et al., 2006; Yoon et al., 2006), gli essudati radicali possono sia diminuire la mobilità di alcuni elementi come Pb e Cu, grazie a fenomeni di precipitazione (Heim et al., 1999; Marmiroli et al., 2005; Yang et al., 2005) sia favorirne la mobilizzazione tramite rilascio di chelanti con conseguente formazione di complessi solubili (Nigam et al., 2001).

Per esempio, in uno studio di fitorimediazione di ceneri di pirite con *Salicaceae* (*Polulus alba*, *P. nigra*, *P. tremula* e *Salix alba*) le radici si sono dimostrate un *sink* per Cu, Zn, As e Pb, con un contenuto di metalli fino a cento volte superiore rispetto a quello della parte aerea nel caso del Cu (Vamerali et al., 2009).

È stato inoltre evidenziato che le radici fini hanno una maggiore affinità verso i metalli pesanti, quali As e Cu, rispetto alle radici di conduzione, trattenendo nella loro biomassa gli elementi assorbiti ad una più elevata concentrazione (Vamerali et al. 2009).

Nello stesso studio, le differenze tra le specie si sono rivelate più pronunciate nelle radici grossolane (più vecchie) per le quali i valori di accumulazione più elevati sono stati riscontrati in *P. nigra* (As, Cu, Pb e Zn) e *S. alba* (Zn).

È stata trovata anche una correlazione positiva tra la quantità di radici e l'accumulo di metalli nei tessuti legnosi e nelle foglie.

L'accumulo nelle radici è molto maggiore che nella biomassa aerea e il sistema radicale contiene la maggior parte di contaminanti rimossi dal suolo (varia da 84% in *S. alba* a 89% in *P. alba*). Correlazioni positive sono state trovate tra la biomassa delle

radici fini e di quelle di conduzione e l'assorbimento di Zn, e tra la biomassa delle radici grossolane e la concentrazione di Cu, Pb e Zn nelle foglie. La biomassa delle radici fini profonde è risultata positivamente correlata con le concentrazioni di Co, Cu, e Pb nelle foglie, ma spesso era negativamente correlata con le concentrazioni nelle radici di molti elementi traccia (eccetto Zn) (Vamerali et al., 2009).

Nelle radici grossolane, il massimo contenuto di metalli è stato riscontrato in *P. nigra* – seguito da *P. alba* – con valori 4 volte superiori che in *P. tremula* e in *S. alba* (24 vs. 6 mg per pianta).

La comprensione dei processi di sviluppo del sistema radicale, quindi, può rappresentare una chiave di lettura dei processi di fitorimediazione e utile per una corretta gestione dei substrati inquinati utilizzando sistemi vegetali. Le radici fini hanno un turnover veloce, superiore al 90 % nell'anno, nelle conifere e nelle specie decidue, inclusi i pioppi (Majdi et al., 2007; Ruess et al., 1996). La quantificazione del *turnover* delle radici e una migliore conoscenza dei processi che avvengono nella rizosfera sono necessari per stabilire l'esatto contributo delle radici fini nell'immobilizzazione dei metalli sul lungo periodo (Vamerali et al., 2009). Rimane molto da capire invece per quanto riguarda la mobilità dei metalli nella rizosfera e il ruolo delle radici fini e di conduzione (Dickinson, 1982; Punz e Sieghardt, 1993; Turner e Dickinson, 1993; Whiting et al. 2003).

Bisogna ricordare però che il sequestro dei metalli all'interno delle radici non è comunque definitivo e gli inquinanti ritornano nell'ambiente in seguito alla degradazione dei tessuti radicali (Vangronsveld et al., 1995; Arienzo et al., 2004). Una corretta valutazione dell'efficienza della fitostabilizzazione non può pertanto prescindere dalla definizione delle dinamiche con cui elementi tossici vengono rilasciati/trattenuti dalle radici durante i normali processi di mineralizzazione della sostanza organica del suolo. Tuttavia, attualmente non sono noti i tempi di rilascio dei metalli accumulati nelle radici, né sono state definite con chiarezza le dinamiche di mineralizzazione della biomassa vegetale morta, a causa della complessità del processo e del gran numero di variabili potenzialmente coinvolte e che devono pertanto essere tenute in considerazione. I processi che stanno alla base della fitostabilizzazione restano pertanto ancora scarsamente compresi.

1.2.4 Degradazione dei residui colturali

La degradazione dei residui colturali che giungono periodicamente al terreno o che vi restano naturalmente incorporati (parti ipogee) è soggetta ad un numero elevato di fattori che concorrono al processo medesimo (Bloomfield et al., 1996). I fattori coinvolti nella determinazione della dinamica degradativa dei residui colturali possono essere così raggruppati:

- microorganismi e macrofauna del terreno;
- temperatura;
- caratteristiche chimiche e fisiche del terreno;
- caratteristiche morfologiche e composizione chimica della pianta.

Negli strati meno profondi del terreno, i residui vegetali costituiscono il substrato alimentare di insetti, larve e lombrichi, che demoliscono tali residui grazie all'azione meccanica degli apparati boccali. Questi frammenti di minori dimensioni divengono a loro volta un substrato maggiormente attaccabile dai microorganismi del suolo (batteri e funghi) che degradano le macromolecole organiche (amidi, cellulosa, emicellulose, lignina, proteine, etc.) convertendole in molecole più piccole e solubili. I microorganismi svolgono l'attività di decomposizione dei residui organici tramite un complesso di ectoenzimi che determinano per lo più l'idrolisi della sostanza organica. La cellulosa, ad esempio, viene convertita in glucosio, che è solubile; le sostanze proteiche in amminoacidi, etc. A questo punto le sostanze organiche più semplici possono venire utilizzate dai microorganismi, dove tramite un'altra serie di enzimi, detti endoenzimi, vengono rielaborati secondo necessità. Una certa demolizione può avvenire anche per semplice ossidazione chimica a mezzo di catalizzatori inorganici, tuttavia è ben maggiore il lavoro effettuato dai microorganismi del suolo tramite enzimi ossidanti. La rapidità della decomposizione della sostanza organica dipende dunque anche da quelle leggi fisiologiche che governano la vita di questi microorganismi.

A temperature inferiori a 0 °C la decomposizione organica è molto rallentata; lo stesso risulta avvenire a temperature superiori qualora l'umidità sia nulla o quasi. Al contrario, con il progressivo aumento della temperatura (fino circa ai 30-35 °C) l'attività dei microorganismi aumenta rapidamente.

Il diametro radicale è correlato negativamente alla degradazione radicale (Meentemeyer and Berg, 1986; Dry et al., 1990, Vogt et al, 1986): diversi studi hanno

individuato, infatti, come un aumento di quest'ultimo, a parità di condizioni ambientali, accresca il tempo necessario per la degradazione (Boot, 1990), mentre per le radici fini il tempo necessario alla degradazione è notevolmente inferiore. Questo comportamento viene spiegato non solo con la differenza di biomassa, ma anche dal rapporto delle sostanze che compongono la radice: le radici fibrose, infatti, hanno concentrazioni più elevate di nutrienti e un alto rapporto N:lignina (Berg 1984; Camirè et al., 1991), condizioni che favoriscono l'attività degradativa da parte dei microrganismi.

Anche l'umidità svolge un ruolo fondamentale per l'attività microbica responsabile della degradazione della sostanza organica (Swift et al., 1979). Carenze o eccessi di umidità, infatti, limitano l'attività dei microrganismi, rallentando la decomposizione dei residui organici. In condizioni di bassa umidità viene infatti a mancare il mezzo acquoso indispensabile per le reazioni chimiche e biologiche, mentre quando l'acqua è in eccesso si verifica una concomitante carenza di ossigeno, anch'esso indispensabile per i processi ossidativi delle macromolecole organiche. Ne consegue che terreni ben areati avranno condizioni più propizie per una rapida decomposizione delle sostanze organiche. I terreni devono poi contenere una giusta dose di elementi minerali; qualora alcuni di essi siano in difetto, oppure in eccesso, essi esplicano un'azione deprimente sulla decomposizione della sostanza organica del terreno.

Si deve tenere in considerazione anche che non tutti i tessuti della piante si degradano in maniera uniforme, poiché la composizione varia; la cellulosa è il principale costituente delle pareti cellulari, specialmente nei tessuti giovani; successivamente nelle pareti cellulari vengono incorporate altre sostanze, quali emicellulose, lignina, pectine e sostanze minerali che hanno tempi e modalità di degradazione differenti. Naturalmente vi sono cellulose di più rapida e di più lenta decomposizione; le cellulose considerate di riserva sono decomposte molto più rapidamente delle cellulose dette di sostegno, perché queste ultime sono spesso associate ad altre molecole (es. lignina, etc.) con cui costituiscono aggregazioni molto stabili, inoltre c'è differenza di comportamento specifico tra le cellulose delle singole specie botaniche. Le emicellulose, gruppo di polisaccaridi non saccaroidi, si rinvencono di preferenza nella parete cellulare assieme ad altre sostanze dette incrostanti, con prevalente funzione di sostegno. La lignina, invece, rappresenta un gruppo di composti che si accumulano durante la lignificazione dei tessuti delle piante superiori e conferisce resistenza alla decomposizione dovuta ad attacchi enzimatici delle parti cellulari (Alexander, 1977; Berg, 1984; Mun e Whitford, 1998).

Per quanto riguarda l'importanza della composizione chimica della biomassa nei processi degradativi, di particolare interesse risultano anche la concentrazione di Ca e il rapporto C:N che assieme alla evapotraspirazione spiegherebbero il 90% delle variabili nei processi di degradazione radicale (Silver e Miya, 2000). Il Ca svolge un ruolo importante a livello cellulare e nei processi fisiologici della pianta: stabilità delle pareti e delle membrane, divisione ed estensione cellulare, modulatore di attività enzimatiche, funzione osmotica, bilanciamento di carica e pH citoplasmatico, ritardo della senescenza (McLaughlin and Wimmer 1991).

Poiché il contenuto di carbonio che caratterizza la composizione dei tessuti vegetali è costante, il valore del rapporto C/N risulta inversamente proporzionale alla percentuale di azoto. Tenuto conto che l'attività microbica viene esaltata dalla disponibilità di azoto, saranno maggiormente suscettibili di completa decomposizione le radici con il valore di C/N più basso (Jensen, 1929; Heal et al. 1997, Cromack and Monk, 1975; Flanagan and Van Cleve, 1983, Fog 1988; Taylor et al., 1989; Aerts, 1997). I residui vegetali con rapporto C/N inferiori a 20 contengono quantità di azoto organico sufficienti a soddisfare le necessità della microflora rizosferica, e sono quindi suscettibili di completa mineralizzazione. I materiali organici caratterizzati da valori C/N maggiori di 30 invece, non fornendo adeguate quantità di azoto, costringono i microorganismi ad utilizzare per la produzione di biomassa tutte le forme azotate (NH_4^+ , NO_3^-) disponibili nel suolo, inducendo, conseguentemente, temporanee difficoltà nutrizionali per le piante.

2. SCOPO DELLA TESI

L'impiego delle piante per la bonifica di siti inquinati da metalli pesanti si sta diffondendo grazie alla maggiore compatibilità ambientale delle tecnologie verdi rispetto alle tecniche di bonifica tradizionali, che risponde meglio alle attuali necessità di coniugare interventi di risanamento con la conservazione e tutela della funzionalità degli ecosistemi. Tuttavia, le tecnologie verdi hanno ancora un'efficienza limitata, e ciò costituisce il principale ostacolo al loro impiego su larga scala. La rimozione di inquinanti metallici tramite fitoestrazione è solitamente modesta a causa della ridotta biomassa delle piante iper-accumulatrici o dalle basse concentrazioni di metalli accumulate dalle piante da biomassa. La fitoestrazione rappresenta quindi, allo stato attuale, una tecnologia interessante per le sue potenzialità, ma ancora difficilmente applicabile a situazioni concrete.

La fitostabilizzazione in radice potrebbe essere implementata parallelamente alla fitoestrazione per aumentarne l'efficienza complessiva e l'applicabilità della tecnologia. Da studi recenti, è emerso che il colza può essere utilizzato con successo per interventi di fitostabilizzazione *in planta* grazie alla sua capacità di accumulare metalli nelle radici fittonanti. Questa tecnologia trova il suo limite applicativo nella degradazione delle radici, con conseguente rimobilizzazione degli inquinanti. Finora, quest'ultimo aspetto è stato però trascurato dalla ricerca, e il tempo medio di ritenzione degli inquinanti nelle radici in funzione della velocità di degradazione dei tessuti radicali non è ancora un dato noto.

Questa tesi mira a colmare questa lacuna di conoscenza andando a definire la dinamica degradativa di radici di colza al termine del ciclo di coltivazione, in funzione di alcuni fattori colturali (varietà e densità di semina) e ambientali (concentrazione di metalli pesanti nel terreno). Lo studio, pur non essendo risolutivo, costituisce una importante analisi del processo degradativo di una pianta da biomassa modello, che si pone come obiettivo la valutazione del tempo medio di ritenzione di alcuni metalli nei fittoni in via di degradazione.

Questo lavoro è stato condotto in ambiente confinato e, anche se le dinamiche di degradazione dei fittoni e il rilascio dei metalli potrebbero discostarsi rispetto ad un sistema aperto, non ha impedito di discriminare l'effetto dei fattori allo studio.

A supporto dello studio delle dinamiche degradative, è stata misurata anche l'attività microbiologica nel terreno, che è stata assunta come rappresentativa

dell'attività di mineralizzazione della sostanza organica del suolo. L'associazione dell'attività microbica con la misura della degradazione di materiale vegetale non costituisce un elemento di novità per la letteratura scientifica, tuttavia è innovativo il contesto in cui queste misure sono state condotte.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Allestimento della prova

La prova è stata allestita presso l'Azienda Sperimentale "Lucio Toniolo" dell'Università di Padova, a Legnaro (PD), utilizzando 2 cultivar di colza (*Brassica napus* L. var. oleifera Mertz):

- PR45D01: Ibrido semi-dwarf (Pioneer). È un ibrido semi-nano di ciclo medio, idoneo per le semine anticipate di inizio-metà settembre. Ha una resistenza molto elevata al freddo.
- EXCALIBUR: Ibrido CHH (Dekalb). È un ibrido che presenta un buon vigore di partenza, una rapida ripresa vegetativa e epoche di fioritura e maturazione anticipate.

La semina è stata eseguita il 30 Settembre 2010 con una seminatrice di precisione con dischi da colza a 120 fori (diametro 1,2 mm); l'interfila era di 45 cm e sono state adottate due diverse densità di semina:

- 44 semi m^{-2} (ottimale);
- 63 semi m^{-2} (fitta).

Lo schema sperimentale era a split-plot con 3 ripetizioni; ogni parcella possedeva una larghezza di 4,5 m e una lunghezza di 12 m.

La coltura è stata concimata in presemina con 130 kg ha^{-1} di perfosfato triplo e 120 kg ha^{-1} di solfato di potassio, corrispondenti a 60 kg ha^{-1} di P_2O_5 e di K_2O rispettivamente. In copertura è stata effettuata la concimazione azotata (100 kg ha^{-1} N come solfato d'ammonio e altri 50 kg ha^{-1} N come nitrato ammonico).

Alla maturazione della granella (25 maggio 2011), sono state prelevate 15 piante (radice e parte aerea) per parcella. Dopo aver accuratamente rimosso i residui di suolo tramite aria compressa, 3 piante per parcella sono state utilizzate per la misura del peso fresco e secco (105 °C, 24 h) e del contenuto totale di metalli (fittone e parte aerea); per i soli fittoni è stato determinato anche il contenuto di fibre totali (ADF), lignina, cellulosa e ceneri (AIA) secondo il metodo Van Soest (1987).

Dopo essere stati puliti e pesati (peso fresco) come sopra, i dodici fittoni rimanenti sono stati messi in refrigerazione (+4 °C) per essere conservati fino all'inizio della prova di degradazione (Giugno 2011).

3.2 Prova di degradazione

La prova è stata impostata con l'obiettivo di determinare la dinamica degradativa di fittoni di colza in terreno inquinato (P, Polluted) in raffronto ad un controllo non contaminato (UP, Unpolluted).

A maggio 2010 sono stati raccolti circa 300 kg di terreno medio-limoso dell'azienda sperimentale dell'Università e lasciati a seccare in serra. Il contenuto di metalli totali del terreno è stato misurato per verificare il rispetto dei limiti di legge per le concentrazioni di Cd, Co, Cu e Zn.

Trascorsa una settimana, a metà del terreno sono stati aggiunti 25 L di una soluzione di solfati di Cd, Co, Cu e Zn appositamente predisposta per ottenere concentrazioni di metalli pari a 4, 40, 200 e 750 mg kg⁻¹ rispettivamente di Cd, Co, Cu e Zn, corrispondenti a ~2 (Cd, Co, Cu) e 5 (Zn) volte i limiti consentiti dal D.lgs 152/06. Il terreno è stato quindi lasciato ad asciugare in serra per un'altra settimana e mescolato periodicamente per consentire una distribuzione uniforme dei metalli. Dopo di che, il terreno è stato suddiviso in 6 aliquote uguali per riempire altrettante casse di PVC (60Lungh.×40Largh.×34Altez. cm) di capienza 56 litri, in cui sono state interrate a circa 15 cm di profondità le radici (12 per cassa), nel frattempo conservate in cella frigo. Prima di essere interrate, le radici sono state inserite in *nylon-net-bags* (maglia 1 mm) marcati con un cartellino identificativo del trattamento (Fig. 1).



Figura 1. Fittone inserito in nylon-net-bags.

Le casse sono state poste sopra ad un telo in PVC di dimensione 4×5 metri per evitare dispersione di metalli nell'ambiente, e coperte con una rete metallica di dimensione (maglia 1,5 cm) per evitare che la macrofauna terricola potesse interferire con la sperimentazione.

Una tesi di controllo non inquinata (UP, Unpolluted) è stata predisposta allo stesso modo, ma senza contaminare il terreno con i metalli, per un totale di 12 casse (2 cultivar $\times$ 2 densità $\times$ 3 repliche), ciascuna contenente 12 radici.

Durante i 12 mesi successivi, le radici sono state raccolte periodicamente (Tabella 2) per determinarne la biomassa residua e la concentrazione di metalli. I valori misurati durante la prova di degradazione sono stati confrontati con quelli iniziali per determinare la dinamica di degradazione dei fittoni e il conseguente rilascio di metalli pesanti.

Tabella 4. Data dei campionamenti per la prova di degradazione.

Data	Sampling	Giorni
		dall'Interramento (GDI)
07/06/2011	Interramento	0
12/07/2011	Campionamento 1	35
10/10/2011	Campionamento 2	125
09/01/2012	Campionamento 3	216
18/04/2012	Campionamento 4	316
3/07/2012	Campionamento 5	392

Ad ogni campionamento, le radici sono state lavate con acqua deionizzata e, per evitare perdite di materiale, i sacchetti di rete sono stati svuotati su un setaccio a maglia 0,2 mm per il lavaggio. Le radici sono state quindi essiccate (105 °C, 24 ore) per la determinazione del peso secco e mineralizzate per la misura del contenuto di metalli pesanti (ICP-OES) come descritto nel prossimo paragrafo.

3.1 Analisi elementare dei tessuti vegetali

Dopo essere stati raccolti, puliti e averne determinato il peso fresco e secco, i tessuti vegetali (parti aeree e fittoni) secchi sono stati macinati e mineralizzati per poi procedere all'analisi elementare dei metalli.

La mineralizzazione è avvenuta secondo il metodo USEPA (1995b) utilizzando un mineralizzatore a microonde AOAC 17Th ED 2000 999.10, Milestone Ethos 900 che è in uso al dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente

dell'Università di Padova. Questo strumento consente di lavorare in modo veloce, riproducibile e in sicurezza per gli operatori, in quanto per ogni tipologia di campione è possibile stabilire quantità e concentrazione degli acidi, tempi di mineralizzazione, potenza in Watt e quindi temperature ottimali per ottenere una soluzione perfettamente limpida e matrici il più possibile omogenee.

Per la mineralizzazione sono stati pesati 350 mg circa di campione a cui sono stati aggiunti 1,0 ml di H₂O₂ al 30% in volume, 2-3 gocce di H₂O distillata e 5 ml di HNO₃ tipo Aristar 70% superpuro (purezza relativa pari a 0,02 ppm per il Fe, 0,01 ppm per Cr e Zn e 0,005 ppm per Mn e Cu), in modo da ridurre al minimo le possibili contaminazioni esterne. Risulta importante il rapporto stechiometrico tra acido e quantità di campione per permettere un'ossidazione completa della sostanza organica.

Dopo la pesata e l'aggiunta dei reagenti, i campioni sono stati chiusi negli appositi contenitori di teflon con una chiave dinamometrica e posti nel supporto del mineralizzatore. Il programma di mineralizzazione utilizzato era così definito:

- 5 minuti a 250 W;
- 1 minuto a 0 W;
- 5 minuti a 400 W;
- 2 minuti a 0 W;
- 5 minuti a 650 W;
- 2 minuti a 250 W.

Il ciclo è stato completato con 7 minuti di ventilazione, dopodiché i campioni sono stati raffreddati in una bacinella a ricircolo d'acqua.

I campioni mineralizzati sono stati trasferiti in matracci di vetro, portati a 25 ml con acqua ultrapura (resistività superiore a 10 MΩ) e filtrati con filtri monouso Millipore di porosità 0.45 µm (Chemtek Analitica, Bologna) allo scopo di rimuovere le possibili impurità (soprattutto silicati) che non vengono mineralizzate in acido nitrico. La determinazione del contenuto di elementi minerali è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro con sorgente al plasma ad accoppiamento indotto e rivelazione ottica simultanea dell'emissione, ICP/OES (Inductively Coupled Plasma, Optical Emission Spectroscopy) Spectro Ciros Vision EOP (Spectro Italia S.r.l., Lainate, Milano). Questo strumento consente di eseguire l'analisi quali-quantitativa di molti elementi con sensibilità dell'ordine dei µg kg⁻¹ per i metalli pesanti. Per procedere all'analisi dei campioni è stato necessario scegliere la lunghezza o le lunghezze d'onda più opportune

(ogni elemento emette radiazioni caratteristiche per lunghezza d'onda). L'analisi qualitativa per via spettrometrica si basa appunto sulla corrispondenza biunivoca tra lunghezza d'onda della radiazione emessa e l'elemento che l'ha prodotta, mentre il valore dell'intensità di detta radiazione è l'indice della determinazione quantitativa. La scelta delle linee relative è stata effettuata in modo tale da evitare che il picco di emissione di ciascun elemento interferisse con i picchi di altri elementi con emissioni a frequenze simili. I campioni inseriti all'interno delle provette venivano prelevati attraverso un autocampionatore che consentiva di automatizzare il procedimento analitico. Ogni dieci campioni è stato inserito uno standard di controllo con tolleranza $\pm 10\%$. Prima della lettura di ciascun campione, lo strumento provvedeva al lavaggio del sistema attraverso l'aspirazione e il flussaggio di acido nitrico al 3% per 30 secondi attraverso tutte le parti della macchina a contatto con il campione, seguito dall'aspirazione e il flussaggio del campione per 30 secondi. L'analisi vera e propria consisteva in tre letture da 24 secondi ciascuna, eseguite consecutivamente. Il risultato era ottenuto dalla media aritmetica delle tre letture. Contemporaneamente veniva calcolata anche la deviazione standard relativa per una stima immediata dell'attendibilità dell'analisi. I parametri usati per la determinazione sono riportati in Tabella 3 e in Tabella 4. Nelle analisi sono stati considerati i metalli che erano stati aggiunti al terreno e quelli di cui si voleva determinare anche la biodisponibilità (Cd, Co, Cu, Ni, Pb e Zn).

Tabella 5. Parametri ICP/OES: elementi.

Elemento	Lunghezza d'onda (nm)
Cadmio	214,438
Cobalto	228,615
Rame	324,778
Nichel	231,604
Piombo	220,351
Zinco	213,856

Tabella 6. Parametri ICP/OES strumento

Elemento	
Torcia	3 vie - 3 mm diametro interno
Potenza	1420 W
Flusso di gas di raffreddamento	13,6 L/mm
Flusso di gas ausiliario	0,80 L/mm
Sistema di nebulizzazione	Modificato di Lichte
Flusso di gas di nebulizzazione	0,921 L/mm
Flusso di gas addizionale	0,20 L/mm
Velocità di aspirazione campione	2 ml/mm
Tempo di lavaggio intracampione	30 s
Tempo di avviamento	30 s
Numero letture	3
Tempo per una singola lettura	24 s

3.2 Contenuto totale di metalli nel suolo

Il contenuto totale di Cd, Co, Cu, Ni, Pb e Zn del terreno è stato determinato previa mineralizzazione (metodo USEPA, 1995a) e analisi con ICP-OES, analogamente a quanto avvenuto per i campioni di materiale vegetale.

3.3 Frazione biodisponibile di Cd, Cu, Ni, Pb e Zn

L'estrazione della frazione biodisponibile di metalli pesanti (Cd, Cu, Ni, Pb e Zn) dal terreno è stata eseguita utilizzando una soluzione alcalina preparata secondo il metodo indicato nel Decreto Ministeriale 13/09/1999: Approvazione dei “Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo” (Lindsay e Norwell, 1978).

Per la preparazione di 1 L di soluzione estraente sono stati pesati:

- 14,92 g di trietanolammina (0,1M) $[N(CH_2OHC_2)_3]$;
- 1,97 g di acido dietilentriamminopentacetico (DTPA) (0,05 M);
- 1,46 g di calcio cloruro biidrato (0,01 M) $[CaCl_2 \times 2H_2O]$.

Dopo essere stati pesati, i reagenti sono stati sciolti in 900 ml di acqua distillata per mezzo di un agitatore magnetico. Il pH è stato portato al valore di 7,3 tramite

l'aggiunta di HCl (1:1 v/v). La soluzione è stata trasferita in un matraccio tarato da 1000 ml e portata a volume con aggiunta di acqua distillata.

Sono stati pesati 10 g di campione di terreno a cui sono stati aggiunti, in tubi da 50 ml, 20 ml di soluzione (rapporto di estrazione suolo/soluzione di 1:2). I tubi sono stati messi in agitazione a 60 cicli al minuto per 2 ore, quindi centrifugati a 5.000 rpm per 5 minuti. Il surnatante è stato prelevato e filtrato, prima con filtri di carta e successivamente con filtri per siringa (PTFE, porosità 0,45 μm) per l'analisi ICP-OES.

3.4 Attività microbica nel suolo

L'attività microbica del terreno in cui erano state poste ad incubare le radici è stata misurata con due metodi, l'idrolisi della fluoresceina diacetato (Adam e Duncan, 2001) e la degradazione dei fertimetri. Di seguito i due metodi sono riportati separatamente.

Idrolisi della fluoresceina diacetato (FDA)

Campioni di terreno sono stati prelevati dalle casse a circa 10 cm di profondità, a partire dal 25/08/2011 e fino al 19/06/2012 ad intervalli di circa 7 giorni.

L'analisi dell'attività microbica è stata eseguita secondo il metodo proposto da Adam and Duncan (2001). Sono stati pesati 2 grammi di suolo fresco a cui sono stati aggiunti, in una beuta da 50 ml, 15 ml di soluzione tampone fosfato (60 mM, pH 7,6) e 0,2 ml di soluzione FDA stock ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ FDA). Un adeguato numero di bianchi è stato predisposto allo stesso modo ma senza l'aggiunta della soluzione FDA stock. I campioni e i relativi bianchi sono stati quindi messi ad agitare nell'incubatore orbitale (100 rpm/min.) a 30 °C per 20 minuti; subito dopo, sono stati aggiunti 15 ml di soluzione di cloroformio e metanolo (2:1 v/v) per bloccare la reazione. Tutti i campioni sono quindi stati trasferiti in tubi da 50 ml e centrifugati a $2.000 \text{ rpm min}^{-1}$ per 3 minuti. Il surnatante è stato filtrato con carta Whatman 42 prima della lettura dell'assorbanza a 490 nm con lo spettrofotometro. La concentrazione di FDA idrolizzata rilasciata durante la reazione è stata calcolata mediante una retta di taratura nel range 0-5 mg FDA idrolizzata mL^{-1} ; la retta di taratura è stata costruita misurando l'assorbanza di diluizioni progressive di una soluzione madre di FDA con concentrazione iniziale pari a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabella 5). Lo standard con concentrazione 0 mg mL^{-1} di FDA è stato usato per

azzerare lo spettrofotometro prima di misurare l'assorbanza di ciascun set di bianchi e campioni.

Tabella 7. Concentrazione di FDA nelle soluzioni per la determinazione della retta di taratura

mL Soluzione MADRE	mL Soluzione Tampone-Fosfato	FDA ($\mu\text{g/mL}$)
0	10	0
0,5	9,5	1
1	9	2
1,5	8,5	3
2	8	4
2,5	7,5	5

Analisi dell'attività microbica tramite fertimetri

Questa tipo di analisi permette di valutare il tipo di attività microbica prevalente nel suolo (cellulosolitica o proteolitica) attraverso la misura della degradazione di “fertimetri”. I fertimetri sono dei dispositivi costituiti da due fili secondo il metodo proposto da Squartini *et al.* (2012):

- Cotone: tre stelle, n. 16, colore bianco
- Seta: tre stelle, Bozzolo Reale n. 24, colore celeste 342

Un adeguato numero di fertimetri è stato interrato a 10 cm di profondità nelle stesse casse in cui le radici erano state poste ad incubare, e sono stati lasciati nel terreno per 7, 14, o 21 giorni. Trascorso l'intervallo di tempo fissato, i fertimetri sono stati delicatamente rimossi e lasciati ad asciugare a temperatura ambiente all'interno di sacchetti di carta per una settimana.

La degradazione dei fili è stata misurata con un dinamometro digitale (IMADA ZP, Elis, Electronic Instruments and Systems, Roma) con la funzione PEAK che registra la tensione massima (-kg) a cui il filo può resistere prima di spezzarsi. Il valore ottenuto è stato quindi confrontato con il valore di tensione a cui può resistere un uguale filo non interrato che fungeva da controllo. I risultati sono stati espressi come % di resistenza rispetto al controllo standardizzati sul numero di giorni di interrimento dei fertimetri.

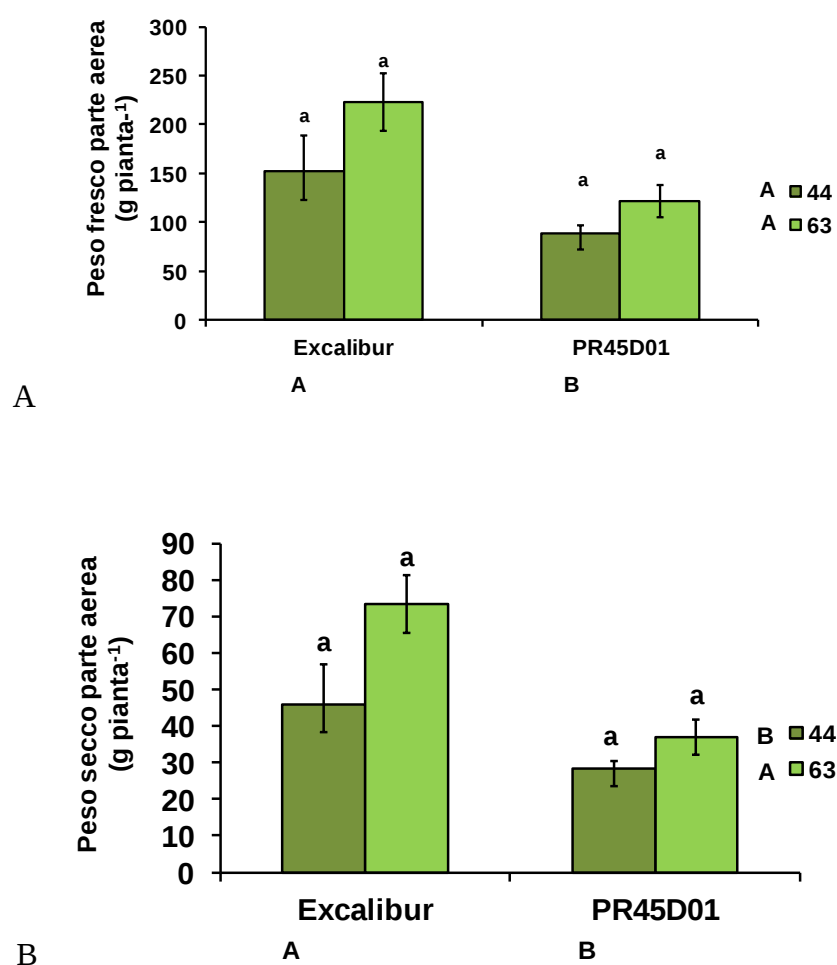
3.5 Contenuto totale di metalli nelle piante spontanee

Le piante cresciute spontaneamente sul terreno delle casse inquinate e non inquinate sono state catalogate, classificate e determinata la loro densità di popolamento (data 28/10/2011) prima di essere mineralizzate per analizzarne il contenuto di metalli pesanti analogamente a quanto fatto per i fittoni e le parti aeree del colza.

4 RISULTATI

4.1 Accrescimento delle piante

Come indicato nei materiali e metodi, sono state prese in considerazione due ibridi CHH di colza, uno seminano (PR45D01) e uno a taglia convenzionale (Excalibur); alla raccolta, sono stati determinati il peso fresco e secco della parte epigea per singola pianta, la produzione stimata per ettaro e l'umidità (Fig. 2).



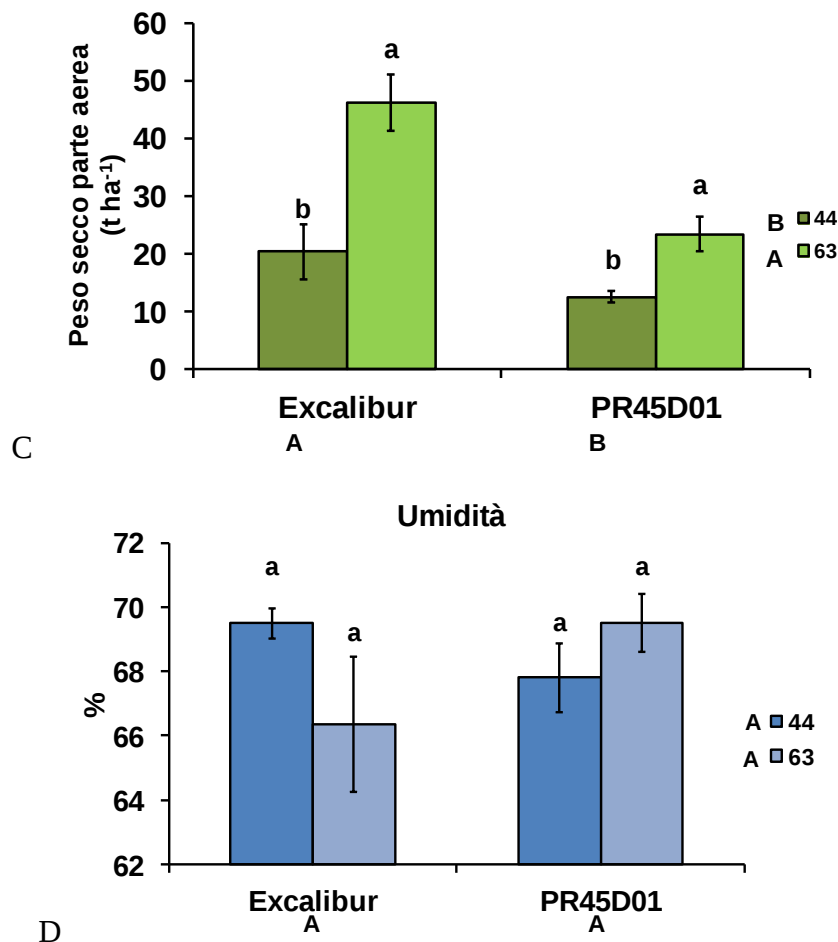
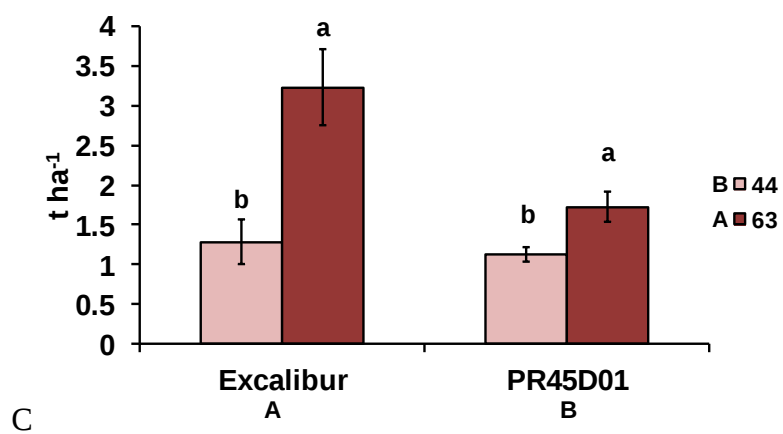
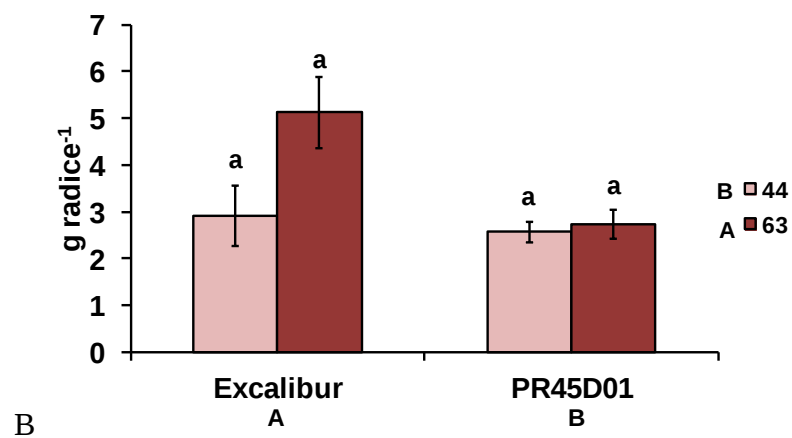
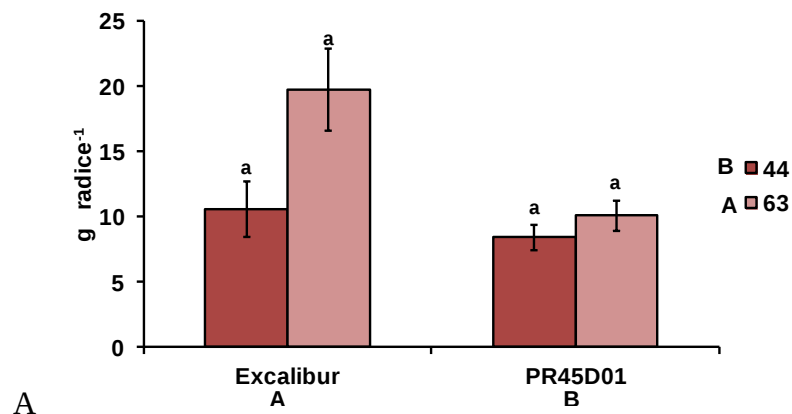


Figura 2. Peso fresco (A) e secco (B) per pianta, peso secco per unità di superficie (C) e umidità (D) dell'apparato epigeo del colza a maturità. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls, $P \leq 0,05$; effetti principali “cultivar” e “densità di semina” e loro interazione). Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

Il peso fresco e il peso secco per singola pianta (Fig. 2 A e B) sono risultati significativamente maggiori per la densità di semina più alta (63 piante m⁻²), con un massimo in Excalibur di 223 g per pianta per il peso fresco e 73 g per pianta per il peso secco. Tra le due varietà, Excalibur ha avuto un accrescimento maggiore, con differenze statisticamente significative rispetto a PR45D01. La biomassa prodotta da Excalibur è stata infatti di 187 g di peso fresco e 60 g di peso secco per pianta, contro i 105 e 32 g rispettivamente di peso fresco e secco per pianta prodotti da PR45D01.

Estendendo i risultati su base ettaro (Fig. 2 C), Excalibur si è confermata più produttiva dell'ibrido seminano, soprattutto alla densità più alta (~46 t ha⁻¹ vs. ~23 t ha⁻¹ prodotte da PR45D01 alla densità di 63 piante m⁻²).

L'umidità nei tessuti epigei non è risultata influenzata dalla densità di semina né dall'ibrido, e il valore medio era ~68%.



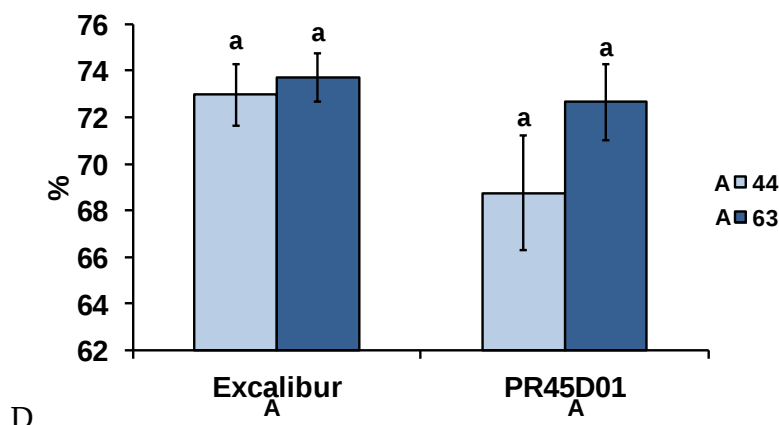


Figura 3. Peso fresco (A) e secco (B) per pianta, peso secco per unità di superficie (C) e umidità (D) dei fittoni di colza a maturità. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls, $P \leq 0,05$; effetti principali "cultivar" e "densità di semina" e loro interazione). Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

Anche a livello ipogeo il peso fresco e secco dei singoli fittoni sono risultati significativamente maggiori in Excalibur e per la densità di semina più alta (63 piante m^{-2}), (Fig. 3 A e B). I fittoni di Excalibur infatti avevano un peso medio di 15 (peso fresco) e 4 (peso secco) g, mentre quelli dell'ibrido seminano pesavano soltanto 9 e 2.6 g, rispettivamente per il peso fresco e secco. Estendendo i risultati su una superficie di un ettaro (Fig. 3 C), la superiorità di Excalibur e l'aumento di biomassa all'aumentare della densità di semina sono risultati ancora più evidenti. Infatti, passando da una densità di 44 piante m^{-2} alla densità di 63 piante m^{-2} , la biomassa dei fittoni prodotta da Excalibur è più che raddoppiata (da 1.28 a 3.22 $t ha^{-1}$), mentre quella dell'ibrido seminano ha avuto un aumento più contenuto (+52%), ma comunque significativo.

Come per la biomassa aerea, il contenuto d'acqua nei fittoni non è stato influenzato significativamente né dalla densità né dalla varietà, con un valore medio di ~70%.

4.2 Concentrazioni e accumulo di metalli nei fittoni a maturità

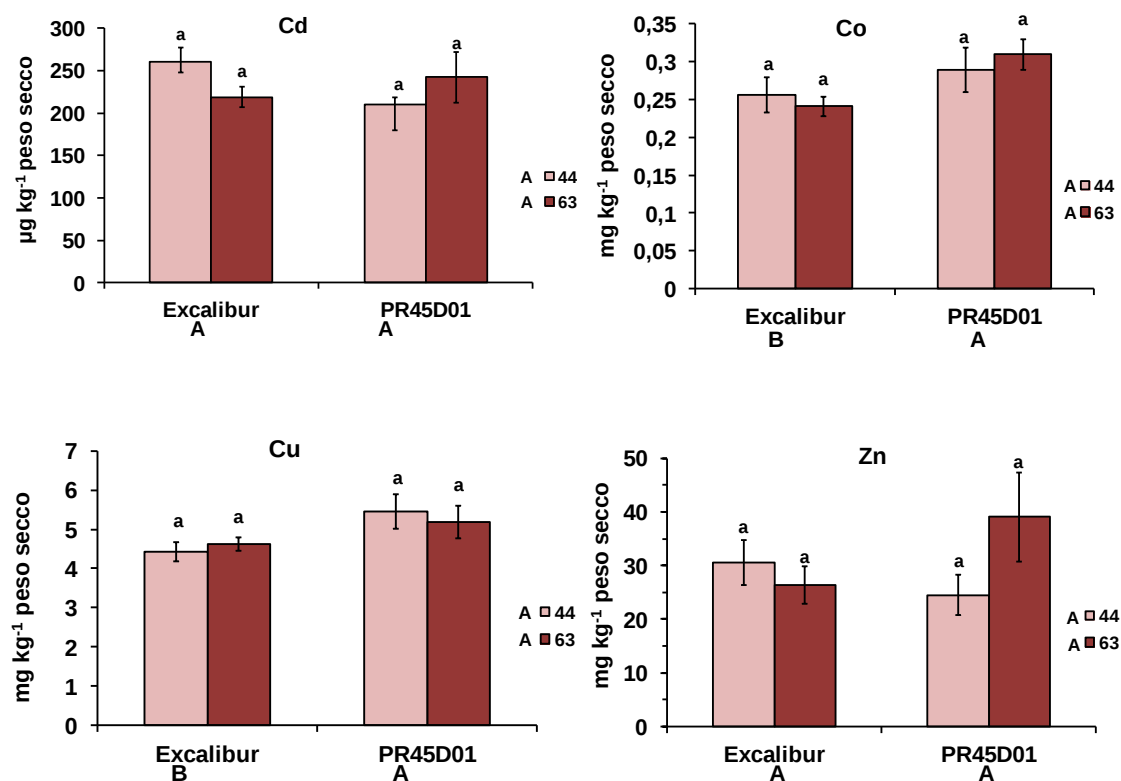


Figura 4. Concentrazione di metalli pesanti nei fittoni a maturità. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls, $P \leq 0,05$; effetti principali "cultivar" e "densità di semina" e loro interazione). Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

La concentrazione media dei metalli è risultata diversa a seconda dell'elemento e della varietà ma non della densità di semina. L'ibrido seminano ha accumulato livelli più elevati di tutti gli elementi considerati, con l'unica eccezione del Cd, che è risultato maggiormente concentrato nei fittoni di Excalibur (Fig. 4). In media, le concentrazioni di metalli in PR45D01 sono state 0,226 mg Cd kg⁻¹, 0,29 mg Co kg⁻¹, 5,3 mg Cu kg⁻¹ e 32 mg Zn kg⁻¹, mentre in Excalibur le concentrazioni erano di 0,239 mg Cd kg⁻¹, 0,24 mg Co kg⁻¹, 4,5 mg Cu kg⁻¹ e 28 mg Zn kg⁻¹.

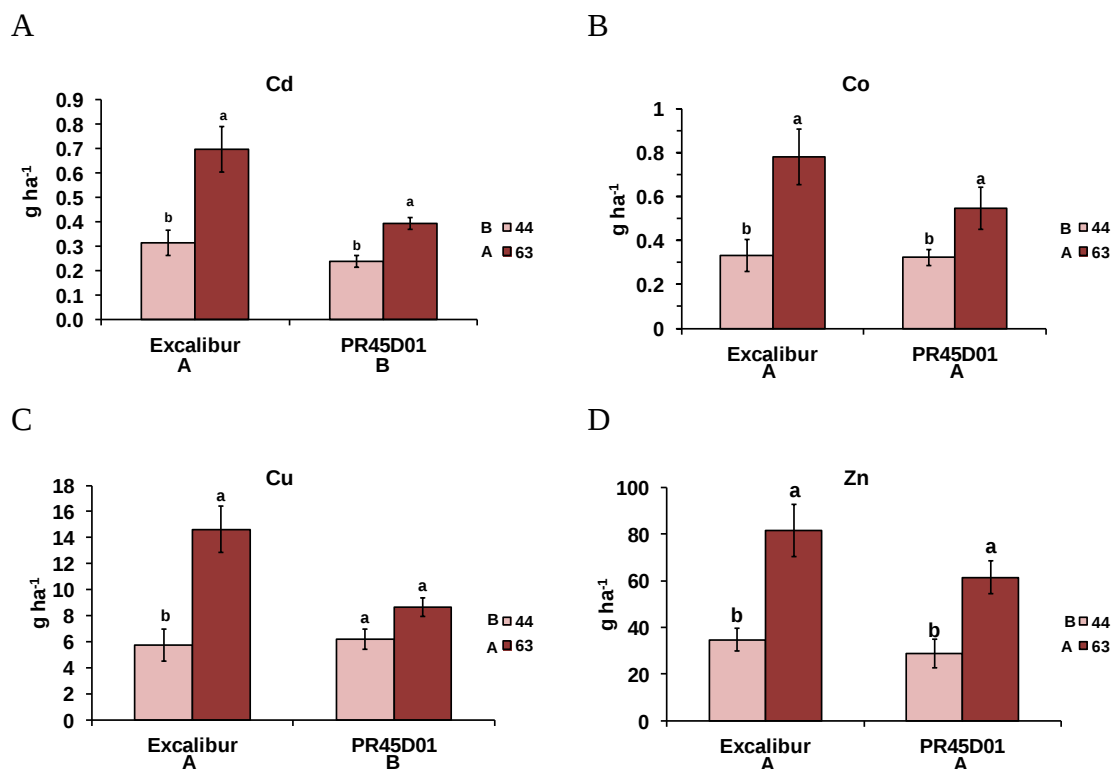
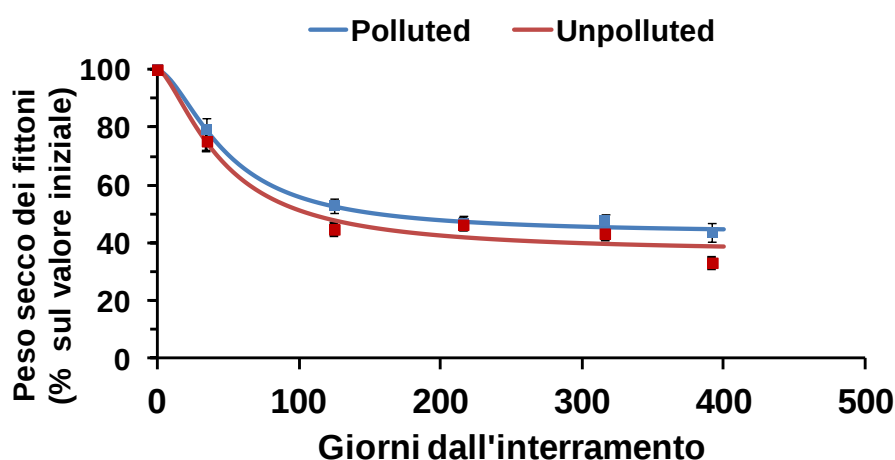


Figura 5. Accumulo di metalli pesanti nei fittoni a maturità. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (Test Newman-Keuls, $P \leq 0,05$; effetti principali "cultivar" e "densità di semina" e loro interazione). Le barre verticali rappresentano l'errore standard.

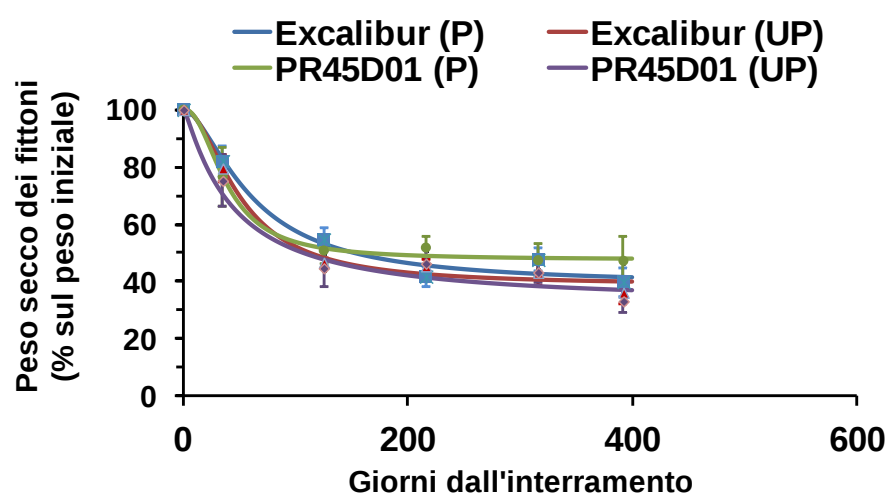
Considerando l'accumulo di metalli nei fittoni (g ha^{-1}), per tutti gli elementi considerati sono emerse differenze significative tra le densità di semina, con accumuli maggiori per la densità più alta (Fig. 5) per effetto della biomassa più elevata. L'accumulo di metalli alla densità di 44 piante m^{-2} infatti è stato di $0,27 \text{ g Cd ha}^{-1}$, $0,33 \text{ g Co ha}^{-1}$, $5,9 \text{ g Cu ha}^{-1}$ e 32 g Zn ha^{-1} , mentre l'accumulo alla densità di 63 piante m^{-2} è salito a $0,54 \text{ g Cd ha}^{-1}$, $0,66 \text{ g Co ha}^{-1}$, 12 g Cu ha^{-1} e 71 g Zn ha^{-1} .

Tra le varietà, differenze significative sono state riscontrate per Cd e Cu, che sono stati accumulati maggiormente dall'ibrido a taglia convenzionale (Excalibur) rispetto all'ibrido seminano. Excalibur infatti ha accumulato in media $0,51 \text{ g Cd ha}^{-1}$ e 10 g Cu ha^{-1} , con un aumento del 60% e 37% rispettivamente per Cd e Cu in confronto a PR45D01.

4.3 Dinamica degradativa dei fittoni



A



B

Figura 6. *Dinamica degradativa dei fittoni per l'effetto principale “livello di inquinamento” (A) e per l'interazione “cultivar × livello di inquinamento” (B). La biomassa dei fittoni residua è espressa come % del peso secco iniziale. Le barre verticali rappresentano l'errore standard.*

La biomassa residua dei fittoni misurata durante i cinque campionamenti e espressa come % del valore iniziale non si è differenziata significativamente tra le densità né tra le varietà (dati non mostrati); al contrario, i valori di biomassa residua sono risultati significativamente diversi a seconda del substrato di incubazione dei fittoni (inquinato vs. non inquinato). Pertanto, sono stati riportati solo le dinamiche

degradative relative all'effetto principale "livello di inquinamento" e all'interazione "cultivar $\times$ livello di inquinamento".

Durante i 392 giorni di interramento, la biomassa dei fittoni si è ridotta a circa un terzo del valore iniziale (Fig. 6 A), con differenze non significative tra le cultivar a confronto (Fig. 6 B). In generale la biomassa radicale ha subito un forte riduzione nei primi mesi dall'interramento, mentre successivamente la degradazione è continuata con un ritmo molto più lento, tanto che al termine della sperimentazione la biomassa residua (%) era solo di poco inferiore a quella misurata al campionamento precedente.

La dinamica degradativa è stata approssimata in tutti i casi con un modello MMF, che appartiene alla famiglia dei modelli sigmoidei; l'equazione del modello MMF è la seguente:

$$y = \frac{(a \times b + c \times x^d)}{b + x^d}$$

Dove y rappresenta la % di biomassa residua al tempo x , mentre x è espresso in numero di giorni dall'interramento (GDI).

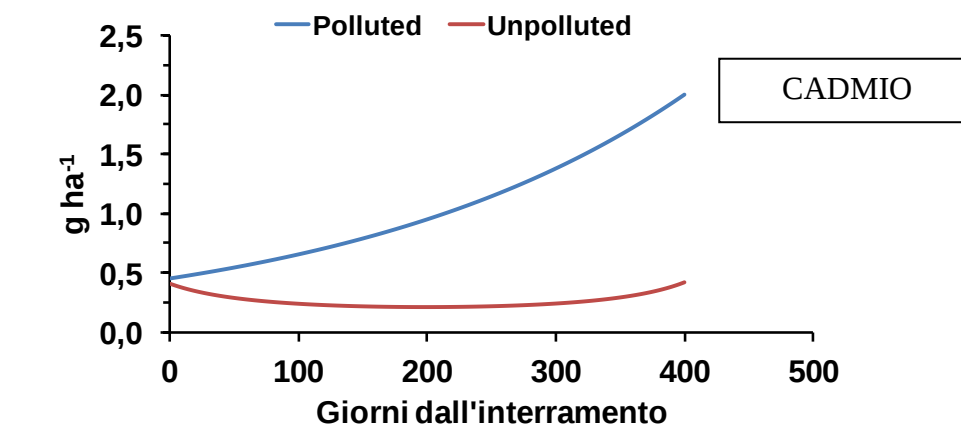
Le funzioni sigmoidali vengono utilizzate per descrivere diversi processi biologici (per esempio attività enzimatiche), e anche nel caso della degradazione dei fittoni di colza è risultato esserci un buona *interpolazione* dei dati sperimentali ($R^2 > 96\%$).

L'individuazione di una funzione in grado di approssimare bene la dinamica degradativa dei fittoni ha permesso a sua volta di stimare il tempo di dimezzamento stesso della biomassa radicale, cioè il tempo (espresso in giorni) necessario affinché la biomassa venga ridotta del 50% rispetto al valore iniziale. Il tempo di dimezzamento nel suolo inquinato è stato stimato in ~159 giorni, mentre per il suolo non inquinato in ~107 giorni, con una differenza di 52 giorni tra i due terreni.

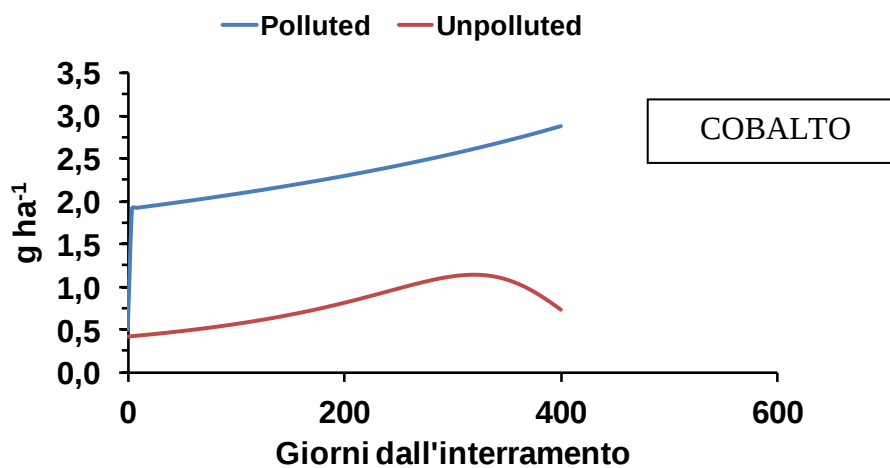
La biomassa radicale quindi si conserverebbe maggiormente inalterata nel terreno inquinato rispetto a quanto accade nel terreno di controllo. Come si vede dal grafico in Fig. 6 A, infatti, a parità di GDI la biomassa residua nel terreno inquinato (P) è sempre maggiore rispetto a quella nel terreno non inquinato (UP). La Fig. 6 B mostra la stessa situazione, con entrambe le cultivar che mantengono valori più alti di biomassa (in %) quando questa viene posta a incubare nel terreno inquinato rispetto alla situazione di terreno non inquinato.

Sebbene ciascuna combinazione “cultivar × inquinamento” sia stata approssimata con una specifica funzione (Fig. 6 B), la forma delle curve e la stima dei tempi di dimezzamento sono risultati molto simili tra le varietà (a parità di livello di inquinamento), pertanto si ritiene che la dinamica degradativa possa essere considerata indipendente dal genotipo, come suggerito anche dai valori di biomassa residua (%) che in nessuno dei campionamento si sono differenziati tra le varietà. Lo stesso si può dire per il fattore “densità di semina” (dati non presentati).

4.4 Dinamica di rilascio di metalli dai fittoni in via di degradazione



A



B

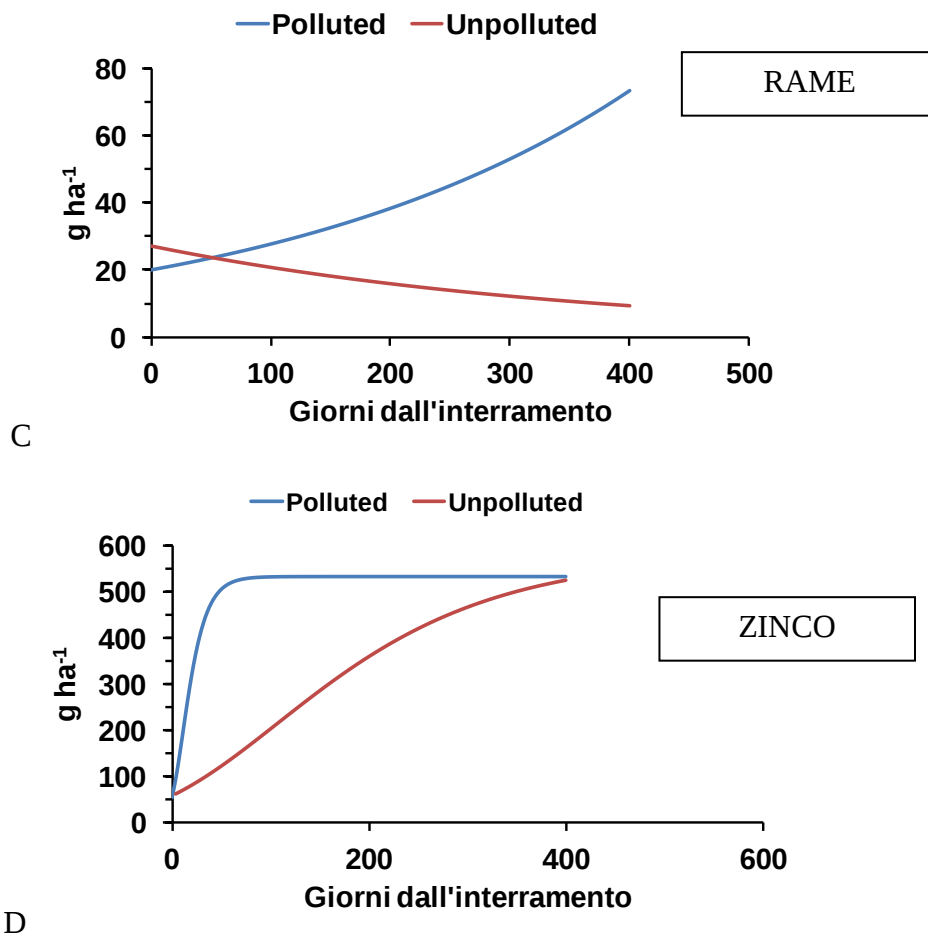


Figura 7. Andamento del contenuto residuo di Cadmio (A), Cobalto (B), Rame (C) e Zinco (D) nei fittoni di colza in via di degradazione in funzione del livello di inquinamento del terreno.

Il contenuto residuo di metalli pesanti nei fittoni in via di degradazione non si è differenziato significativamente tra le densità né tra le varietà, pertanto sono stati riportati solo i valori relativi all'effetto principale "livello di inquinamento", che invece è risultato significativo.

Come visibile in Fig. 7, l'andamento del contenuto di metalli nel terreno inquinato è stato sempre crescente; nel terreno di controllo andamenti crescenti sono stati osservati per Co e Zn, mentre i contenuti di Cd e Cu sono diminuiti con il procedere della degradazione delle radici.

L'andamento di ciascun elemento è stato approssimato con una funzione diversa, ma uguale tra i due livelli di inquinamento:

Rational model per Co;

$$y = \frac{a + b \times x}{1 + c \times x + d \times x^2}$$

Exponential model per Cu:

$$y = a \times e^{b \times x}$$

Gompertz model per Zn:

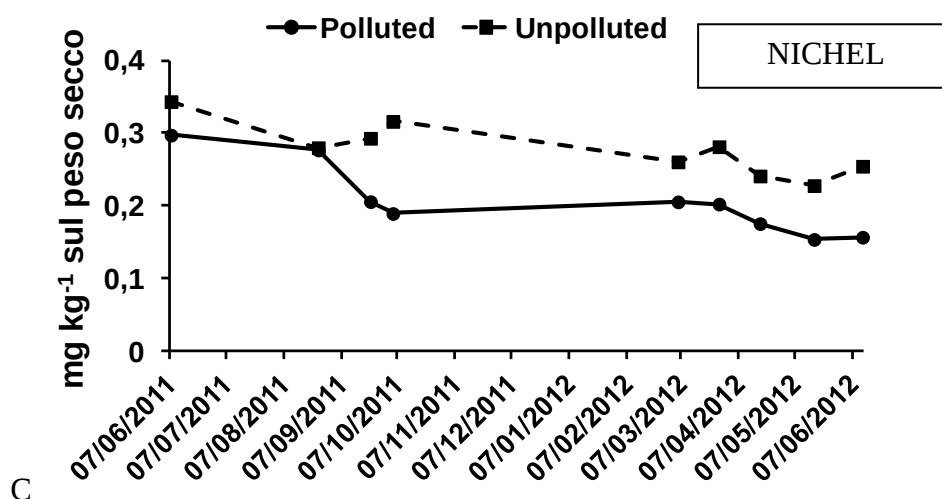
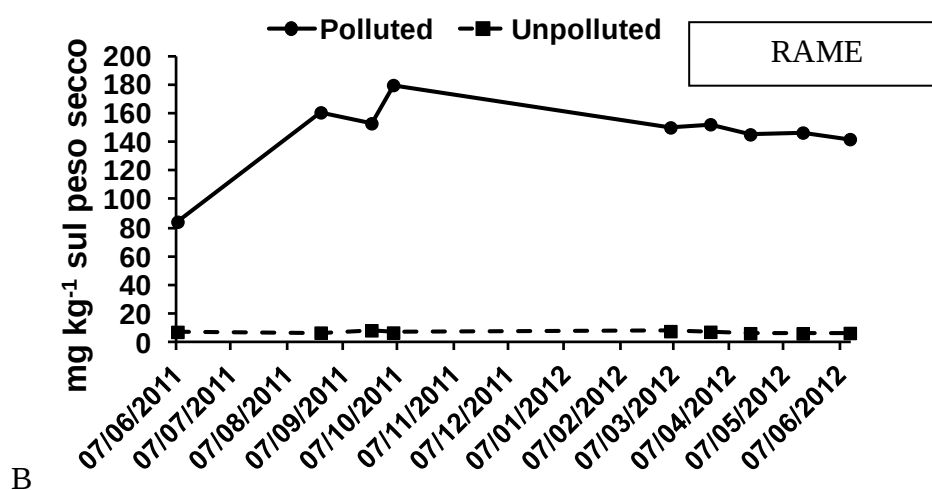
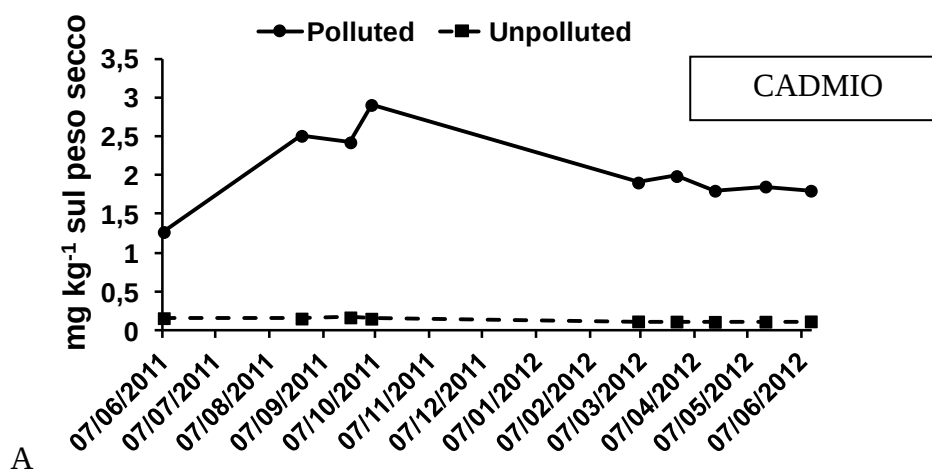
$$y = a \times e - e^{(b-c \times x)}$$

Dove y è il contenuto di metalli in g ha^{-1} al tempo x , e x è l'intervallo di tempo espresso in giorni dall'interramento (GDI). Tutte queste funzione, ad eccezione della funzione esponenziale, appartengono alla famiglia delle funzioni sigmoidali che, come anticipato, si prestano bene alla modellizzazione di processi biologici.

Nel caso del Cd sono stati adottati due modelli diversi a seconda del livello di inquinamento del terreno: *Exponential model* per il terreno inquinato e *Reciprocal quadratic* per quello non inquinato. Per il Cd non è stato possibile individuare un unico modello che approssimasse bene l'andamento dell'elemento in entrambi i terreni, cosa che invece è stata possibile per Co e Zn. La scelta è stata quindi dettata dalla necessità di trovare una funzione che descrivesse in modo quanto più puntuale possibile la dinamica di ritenzione/rilascio dei metalli nei due terreni.

Per il Cu, sebbene sia stato utilizzato lo stesso modello sia per il terreno inquinato che per quello non inquinato, è stato possibile ottenere una buona interpolazione solo per il terreno inquinato; nel terreno non inquinato invece non è stato possibile trovare una funzione che desse una buona approssimazione dei dati. La funzione esponenziale, utilizzata in questo caso, non è infatti stata in grado di approssimare bene la prima parte della curva, e il contenuto iniziale di Cu è pertanto risultato molto più elevato di quello reale (Fig. 7 C).

4.5 Biodisponibilità dei metalli



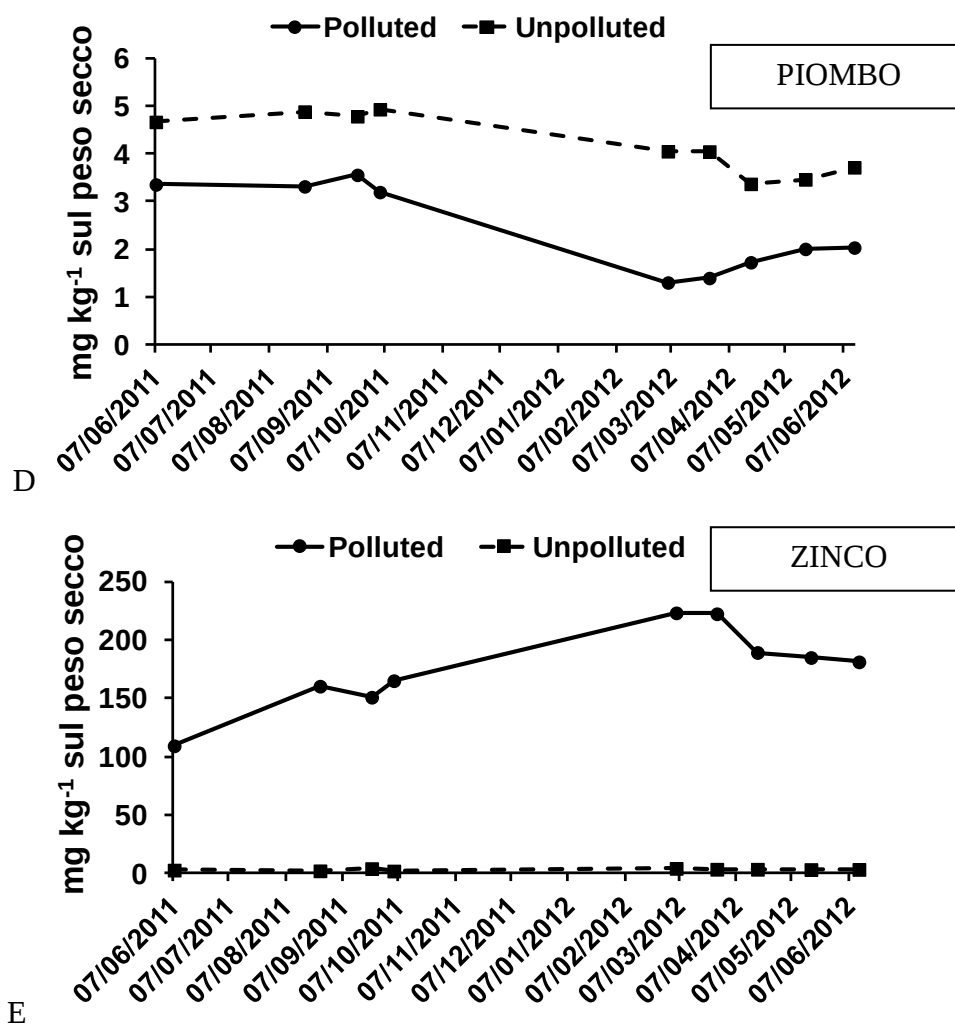


Figura 8. Andamento delle concentrazioni di Cadmio (A), Rame (B), Nichel (C), Piombo (D) e Zinco (E) biodisponibili nei due terreni (Lindsay e Norwell, 1978) .

I metalli apportati artificialmente nella tesi inquinata (Cd, Cu e Zn) sono risultati ovviamente maggiormente biodisponibili rispetto al controllo (Fig. 8). Il Ni è risultato invece ugualmente biodisponibile nei due terreni, mentre per Pb i valori sono stati leggermente più elevati nel terreno di controllo.

Nella tesi inquinata, le biodisponibilità di Cd, Cu e Zn sono aumentate subito dopo l'apporto e solo in seguito hanno presentato un trend decrescente per poi stabilizzarsi, presumibilmente al raggiungendo di concentrazioni di equilibrio. Ciononostante, i valori di biodisponibilità sono rimasti molto più elevati di quelli misurate nel controllo. Il tempo necessario per raggiungere valori di biodisponibilità costanti sono risultati diversi a seconda dell'elemento. Per esempio, la concentrazione Zn ha raggiunto un picco ($\sim 220 \text{ mg kg}^{-1}$) dopo circa nove mesi, e solo in seguito i valori

si sono stabilizzati ($\sim 170 \text{ mg kg}^{-1}$). Per Cd e Cu invece, valori all'incirca costanti sono stati raggiunti in tempi compresi tra quattro e nove mesi.

4.6 Attività microbica nel terreno

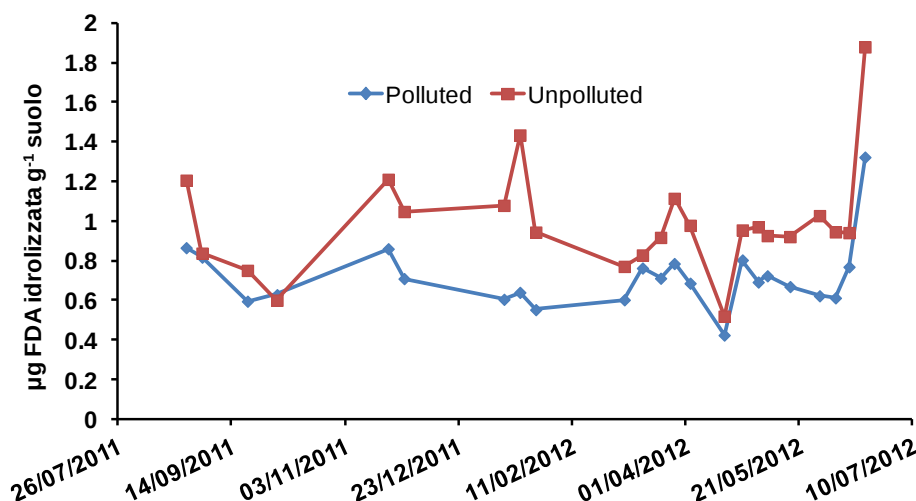


Figura 9. Andamento dell'attività microbica nel terreno misurata mediante l'analisi dell'idrolisi della fluoresceina diacetato.

L'attività microbica nel terreno misurata tramite il metodo dell'idrolisi della fluoresceina diacetato ha dato andamenti simili tra le due tesi, tuttavia l'attività microbica è sempre risultata maggiore nella tesi non inquinata (Fig. 9). La differenza è stata quasi sempre significativa ($P \leq 0.05$).

Il grafico in Fig. 10 riporta l'andamento dell'attività microbica misurata tramite la degradazione dei fertimetri e permette di definire il tipo di attività degradativa prevalente nel terreno. La degradazione dei fili di cotone è stata infatti assunta come rappresentativa di attività cellulolitiche, mentre la degradazione dei fili di seta è stata assunta come rappresentativa di attività proteolitiche.

All'inizio della sperimentazione, la degradazione del cotone è stata pressoché nulla indipendentemente dal livello di inquinamento del terreno, mentre la degradazione a carico della seta è stata più elevata, con differenze significative tra i due terreni. L'attività microbica sia proteolitica che cellulolitica si è modificata nel corso della sperimentazione ma, nonostante le fluttuazioni osservate, quella proteolitica ha prevalso sulla cellulolitica per circa due terzi del periodo di sperimentazione; solo nell'ultimo

periodo l'attività cellulosolitica è aumentata in entrambi i terreni, pur rimanendo più elevata nel controllo non inquinato.

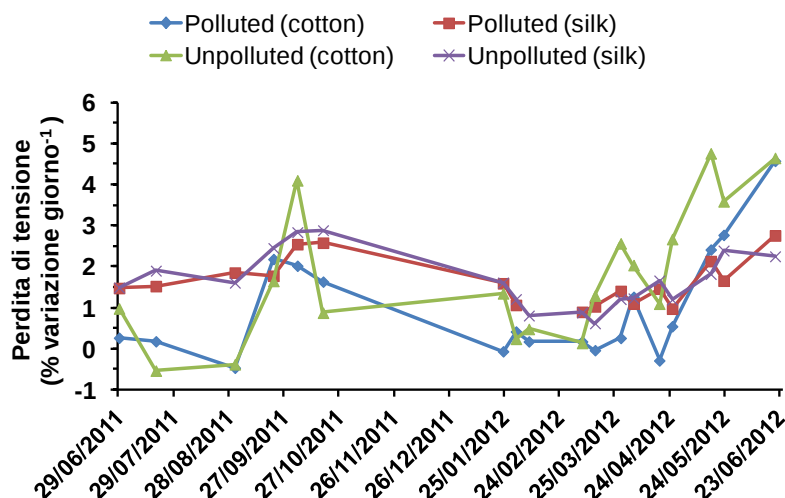


Figura 10. Attività microbica nel terreno misurata come perdita di tensione di fili di cotone (cotton) e seta (silk). I valori sono espressi come perdita di tensione in % rispetto ad un riferimento non interreato e standardizzata sul numero di giorni di incubazione dei fertimetri nel terreno.

I dati indicano quindi che le proteine vengono degradate prima dei composti strutturali e che entrambe le attività sono più intense nel terreno non inquinato. In generale comunque anche nella tesi inquinata è rilevabile un'attività microbica confrontabile a quella del terreno di controllo.

4.7 Concentrazione di metalli presenti nelle piante spontanee

Nel terreno di controllo e in quello inquinato sono cresciute spontaneamente alcune specie erbacee tipiche dell'ambiente veneto. La composizione della flora spontanea è risultata simile tra i due terreni (*Portulaca oleracea* L., *Capsella bursa-pastoris* L., *Chenopodium album* L., *Veronica persica* L. etc.), tuttavia alcune specie (*Digitalia sanguinalis* L., *Lamium purpureum* L., *Plantago lanceolata* L.) erano presenti solo nel terreno di controllo, indicando verosimilmente una maggiore sensibilità alla presenza di elementi tossici.

Il livello di inquinamento ha condizionato la concentrazione di metalli accumulati nelle parti aeree e nelle radici delle specie spontanee. Non è tuttavia stato

possibile eseguire un'analisi statistica a causa del basso numero di individui di molte specie, pertanto i risultati riportati in questo paragrafo sono solo indicativi.

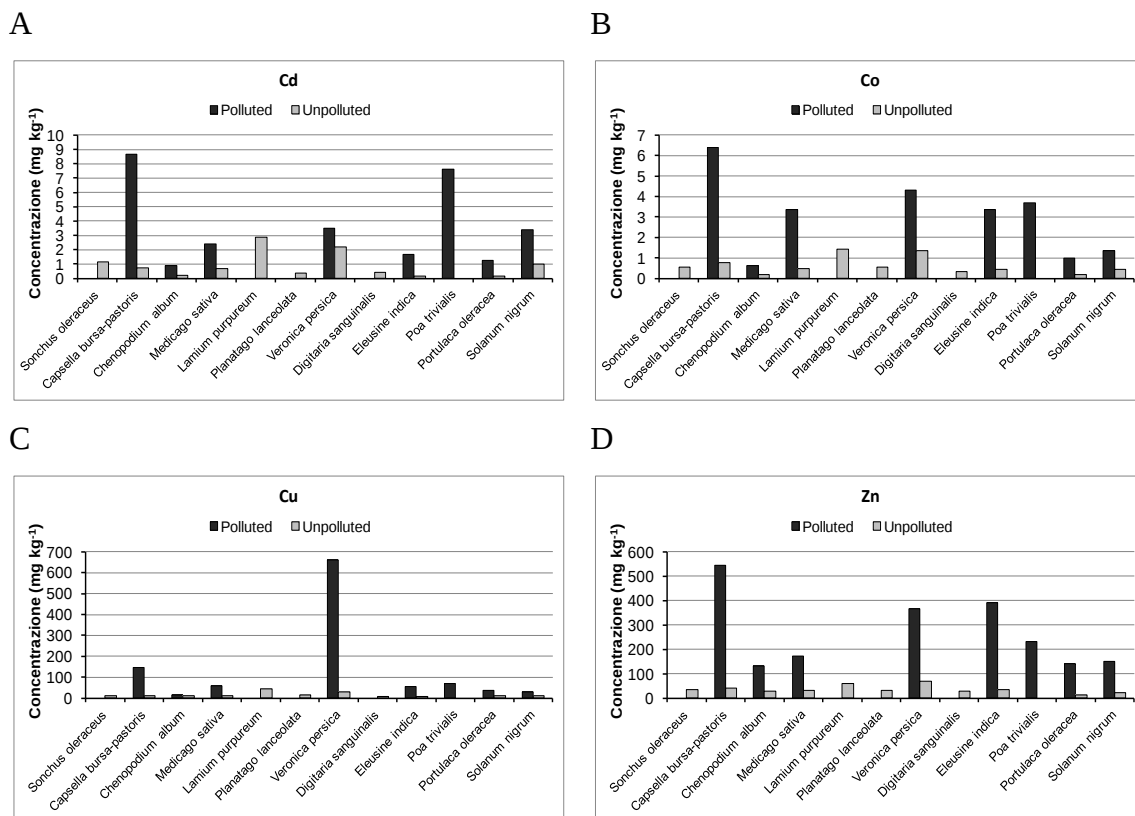


Figura 11. Concentrazione di metalli pesanti nella parte epigea delle piante spontanee cresciute nelle casse.

Nel terreno inquinato, alcune specie hanno raggiunto concentrazioni di metalli nella parte aerea notevoli, sia in raffronto alle altre specie, sia in comparazione con la stessa specie nel terreno di controllo (Fig. 11). *Capsella bursa-pastoris*, ad esempio, ha presentato le maggiori concentrazioni di Cd (8.68 mg kg^{-1}), Co (6.38 mg kg^{-1}) e Zn (543 mg kg^{-1}). Nel terreno inquinato, concentrazioni relativamente elevate ($3\text{-}4 \text{ mg kg}^{-1}$) di Co sono state riscontrate anche in *Elusine indica* L., *Medicago sativa* L., *Poa trivialis* L. e *Veronica persica* L.; le stesse specie, ad eccezione dell'erba medica, hanno raggiunto anche alte concentrazioni di Zn ($230\text{-}360 \text{ mg kg}^{-1}$). Per quanto riguarda il Cu invece, la concentrazione più elevata (662 mg kg^{-1}) è stata riscontrata in *Veronica persica* L..

Nella tesi di controllo invece le concentrazioni sono state molto più modeste, in media $0.9 \text{ mg Cd kg}^{-1}$, $0.6 \text{ mg Co kg}^{-1}$, 15 mg Cu kg^{-1} , 36 mg Zn kg^{-1} .

Interessante infine è stato il comportamento di *Portulaca oleracea* L., che ha sempre avuto concentrazioni di metalli tra le più basse, indipendentemente dal contenuto di metalli nel terreno e nonostante la sua elevata presenza.

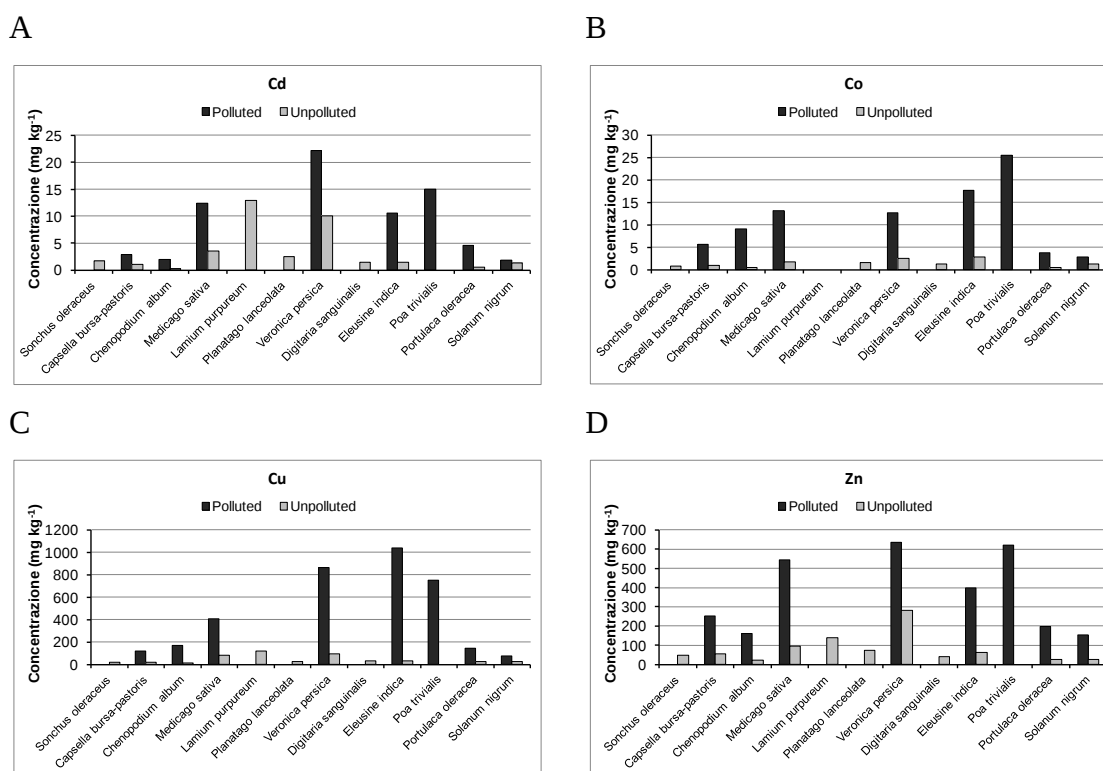


Figura 12. Concentrazione di metalli pesanti nella parte ipogea delle piante spontanee cresciute nelle casse.

La concentrazione di metalli nelle radici delle piante spontanee è risultata in genere più alta rispetto a quella misurata nella parte aerea, e anche a livello radicale sembrano esserci differenze notevoli nella capacità di accumulo delle diverse specie (Fig. 12). Nel terreno inquinato, *Veronica persica* L. ha fatto registrare le maggiori concentrazioni di Cd (22 mg kg⁻¹) e Zn (635 mg kg⁻¹), ma anche elevati accumuli di Cu (867 mg kg⁻¹); concentrazioni relativamente elevate di Cd sono state misurate anche in *Elusine indica* L. (10 mg kg⁻¹). *Poa trivialis* L. ha invece avuto la maggiore concentrazione di Co (25 mg kg⁻¹), seguita da *E. indica* e *V. persica* (rispettivamente 17 e 12 mg Co kg⁻¹). *E. indica* inoltre è risultata la maggiore accumulatrice di Cu (1.040 mg kg⁻¹), seguita da *V. persica* e *P. trivialis* (700-800 mg kg⁻¹).

Infine, sempre nel terreno inquinato, *Medicago sativa* L. ha fatto registrare discrete concentrazioni di Cd (12 mg kg⁻¹) e Co (13 mg kg⁻¹) e elevate concentrazioni di Cu (407 mg kg⁻¹) e Zn (546 mg kg⁻¹).

Nel terreno non inquinato le concentrazioni di metalli si sono invece mantenute su valori più modesti, come già riscontrato anche per la parte aerea. Tuttavia *M. sativa* ha dato i maggiori accumuli di Cu (79 mg kg⁻¹) e Zn (96 mg kg⁻¹), suggerendo quindi

una buona propensione all'accumulo indipendentemente dalla concentrazione dei metalli nel terreno.

Anche per quanto riguarda la concentrazione di metalli nelle radici, *P. oleracea* ha mantenuto valori molto bassi, tendenzialmente i più bassi in assoluto rispetto alle altre specie.

5 DISCUSSIONE

5.1 Produzione di biomassa e accumulo dei metalli

La biomassa prodotta e la concentrazione dei metalli nei tessuti epigei e ipogei sono i principali parametri per stimare la capacità di una pianta di accumulare metalli (Li et al., 2003; Quartacci et al., 2006), e possono essere efficacemente influenzati dalla tecnica agronomica.

Come atteso, la varietà Excalibur si è dimostrata più produttiva rispetto a PR45D01 sia a livello epigeo che ipogeo, confermando quindi la superiorità produttiva dei genotipi a taglia convenzionale rispetto a ibridi con habitus seminano. Entrambi gli ibridi hanno risposto bene all'aumento della densità di semina, indicando quindi che semine fitte possono contribuire in modo significativo all'aumento della produzione complessiva indipendentemente dal genotipo. I migliori risultati di biomassa sono quindi stati ottenuti con Excalibur seminato a 63 semi m⁻², anche se rimane da valutare l'opportunità di ulteriori aumenti dell'investimento di piante anche su valori non utilizzati a livello agronomico.

In accordo con studi precedenti, che indicano per le specie da biomassa l'esistenza di una correlazione positiva tra biomassa e quantità di metalli accumulati, l'ibrido Excalibur è in grado di offrire una migliore stabilizzazione di metalli rispetto a PR45D01. L'aumento della densità di semina ha agito efficacemente in entrambi i genotipi, suggerendo quindi che anche per scopi di fitoestrazione e fitostabilizzazione sono da preferire semine più fitte rispetto alle densità convenzionali. In generale i maggiori accumuli di metalli riportati per Excalibur sono stati attribuiti alla maggiore biomassa prodotta piuttosto che a variazioni nelle concentrazioni degli elementi. Non è comunque da escludere che possa esserci una certa specificità nell'accumulo di alcuni elementi (Cd e Cu nei fittoni e nella biomassa aerea, Zn solo nella biomassa aerea) a seconda del genotipo. La variabilità intraspecifica dovrebbe quindi essere investigata per determinare quali siano, per le specie di interesse nell'ambito delle fitotecnologie, le varietà maggiormente efficienti per la rimozione di specifici metalli dal terreno.

5.2 Dinamica di degradazione della biomassa radicale

L'analisi della dinamica degradativa dei fittoni ha rivelato una sostanziale indifferenza del processo rispetto al genotipo e alla densità di semina, indicando che questi fattori sono poco importanti nella determinazione della suscettibilità dei fittoni alla degradazione microbica. Il tasso di mineralizzazione sembra quindi procedere indipendentemente dalle dimensioni dei singoli fittoni e dal loro numero. In altre parole, la maggiore o minore disponibilità di materiale organico nel terreno non incide sulla dinamica del processo degradativo.

La decomposizione delle foglie e dei residui vegetali in generale può essere messa in relazione con numerosi parametri chimici dei residui stessi (Cornelissen, 1996), quali la concentrazione di azoto (Heal et al., 1997; Henriksen e Breland 1999) e lignina (Heal et al., 1997). Poiché la dinamica degradativa delle due varietà è risultata uguale, è molto probabile quindi che le varietà utilizzate siano molto simili in termini di abbondanza di carboidrati strutturali. Differenze maggiori si dovrebbero invece riscontrare per specie diverse, come suggerito da numerosi studi.

L'ampio intervallo temporale in cui si è svolta la sperimentazione ha permesso di verificare che la decomposizione dei tessuti vegetali procede con una precisa dinamica in funzione del tempo. I risultati sembrano confermare che composti chimici diversi vengono degradati con dinamiche diverse, ma potrebbero suggerire anche che composti diversi sono soggetti a degradazione in periodi diversi. Nello specifico, la rapida perdita di biomassa che si è registrata nei primi 100 giorni di incubazione è stata attribuita alla mineralizzazione dei composti più labili (carboidrati non strutturali e proteine), mentre la successiva fase di degradazione, avrebbe interessato i composti strutturali (lignine, cellulose) che sono più recalcitranti verso l'attività microbica responsabile della degradazione. Tale ipotesi è confermata dai dati di intensità dell'attività microbiologica condotti con i fertimetri, che hanno evidenziato una più rapida degradazione delle proteine (filo di seta) rispetto a quella dei carboidrati strutturali (filo di cotone). L'inversione nel tipo di attività prevalente (proteolitica nei primi sei mesi e cellulosolitica nell'ultimo periodo) va a sostegno dell'ipotesi che la degradazione dei materiali strutturali non solo richieda più tempo rispetto a quella dei composti più labili, ma che la maggior parte della degradazione avvenga solo dopo che i composti facilmente degradabili sono stati mineralizzati. Un'ulteriore conferma a questa ipotesi deriva dall'analisi visiva del materiale radicale ai diversi intervalli

dall'interramento che, dopo il primo campionamento, si presentava costituito esclusivamente dal parenchima corticale, cioè dal tessuto più ricco in fibre e cellulosa (come indicato da uno studio precedente), mentre il cilindro centrale e la corteccia erano già stati degradati. La corteccia e il cilindro conduttore sono state quindi le prime strutture radicali ad essere attaccate dalla microflora del suolo, probabilmente in virtù del loro basso rapporto C/N (Jensen, 1929; Heal et al. 1997, Cromack and Monk, 1975; Flanagan and Van Cleve, 1983, Fog 1988; Taylor et al., 1989; Aerts, 1997). Attualmente non ci sono dati sull'effetto del contenuto di cellulosa sulla dinamica degradativa di tessuti vegetale, ma questo studio sembra suggerire che questa componente potrebbe contribuire a rallentare la degradazione microbica.

Nonostante la composizione chimica dei residui vegetali sia probabilmente il fattore determinante la dinamica degradativa, il genotipo e la densità di semina divengono rilevanti nel determinare lo stock iniziale di biomassa interrata (kg ha^{-1}). L'ibrido Excalibur e densità di piante elevate permetterebbero quindi di mantenere, dopo un determinato periodo di incubazione, biomasse residue maggiori rispetto a PR45D01 e alla densità più bassa.

La dinamica degradativa è stata significativamente influenzata dalla presenza di metalli nel terreno in cui le radici erano state poste a incubare. La maggiore degradazione nella tesi non inquinata è coerente con la maggiore attività microbica riscontrata in questo terreno. I dati di attività microbica (fluoresceina e fertimetri) concordano nell'attribuire al terreno non inquinato una maggiore attività sia proteolitica che cellulosolitica, nonostante l'intensità dell'attività sia risultata variabile nel tempo, probabilmente in risposta al variare delle condizioni climatiche. Nella tesi inquinata, la minore attività microbica e la conseguente minore degradazione della biomassa radicale si sono tradotte in un tempo di dimezzamento maggiore rispetto a quello individuato per la tesi non inquinata. Considerati gli elevati valori di R^2 dei modelli di interpolazione, si ritiene che i valori di $t_{(1/2)}$ siano attendibili, almeno per quanto riguarda le condizioni di incubazione a cui le radici sono state sottoposte per questo studio.

Le differenze di degradazione radicale e attività microbica riscontrate tra la tesi inquinata e quella non inquinata sono verosimilmente dovute alla biodisponibilità di metalli pesanti. I metalli possono infatti inibire la microflora del terreno a causa della loro tossicità, determinando quindi un rallentamento delle attività degradative con conseguente aumento dell'intervallo di tempo necessario per completare la degradazione dei fittoni.

È stato verificato, inoltre, che nella tesi inquinata la biodisponibilità dei metalli ha impiegato diversi mesi (i.e., ~ 9 mesi per Zn) per stabilizzarsi su un valore costante. Ciò è attribuibile alla recente contaminazione artificiale del terreno e all'ambiente confinato, che ha limitato la lisciviazione dei metalli mobili. L'ambiente confinato, avendo influito sull'attività microbica, può anche aver alterato la dinamica di degradazione dei fittoni. Inoltre è possibile che i sacchetti di rete di nylon utilizzati per facilitare il recupero dei fittoni abbiano influito sulla velocità di degradazione dei fittoni stessi, in quanto non hanno permesso ai macroinvertebrati di contribuire alla degradazione delle lettiera (Curry e Byrne, 1997). Il processo degradativo in condizioni naturali potrebbe quindi svolgersi con dinamiche diverse e in tempi più brevi rispetto a quanto riportato in questo studio. Tuttavia, poiché entrambe le tesi erano esposte alle stesse condizioni, i risultati ottenuti rimangono validi per un confronto diretto tra i fattori relativi allo studio.

In termini di fitostabilizzazione, i risultati indicano che dopo un anno c'è ancora una parte di biomassa radicale recalcitrante alla degradazione, nella quale i metalli precedentemente accumulati e sottratti alla frazione mobile possono rimanere confinati. Questo stock non degradato può fornire una base a cui andranno ad aggiungersi i residui colturali del ciclo successivo. Nel lungo periodo è quindi possibile aumentare lo stock annuale di residui colturali in cui mantenere e incrementare la quota di metalli immobilizzati. Va ricordato inoltre che per questa sperimentazione è stata utilizzata una specie erbacea annuale, quindi con una produzione di biomassa limitata ad un solo ciclo colturale. Data la relazione positiva tra biomassa prodotta e assorbimento di metalli, è lecito pensare che l'utilizzo di specie poliennali e in particolare di specie arboree potrebbe dare risultati quantitativamente più importanti. Piante legnose come il pioppo o il salice avrebbero anche il vantaggio, grazie ad apparati radicali più estesi, di esplorare maggiori volumi di suolo potenzialmente non raggiungibili dalle specie erbacee. La presenza di radici lignificate inoltre garantirebbe una maggiore resistenza alla degradazione microbica (Alexander, 1977; Berg, 1984; Mun e Whitford, 1998) aumentando la permanenza degli inquinanti nei tessuti ipogei e l'efficienza complessiva della fitostabilizzazione.

5.3 Dinamica di rilascio di metalli pesanti dai fittoni

Oltre alla dinamica di degradazione della biomassa radicale, in questo studio è stata presa in considerazione anche la dinamica di rilascio dei metalli pesanti dai fittoni in via di degradazione. I risultati sono stati interessanti ma inattesi, in quanto spesso il contenuto di metalli nei fittoni è aumentato anziché diminuire. Ciò può essere dovuto a fenomeni di adsorbimento sulle superfici radicali, che sarebbe stato favorito dall'elevata biodisponibilità dei metalli stessi nel terreno, e dal fatto che i metalli sono rimasti altamente biodisponibili, soprattutto nella tesi inquinata, per tutto il periodo della prova. L'elevata mobilità dei metalli, come già accennato, può essere dovuta alla ridotta lisciviazione a causa dell'ambiente confinato in cui le radici sono state incubate; inoltre è possibile che eventi piovosi e il conseguente accumulo di acqua nelle casse abbiano contribuito a mantenere elevata la quota di metalli in soluzione, favorendone quindi il contatto con le radici. Nel terreno non inquinato, invece, i metalli erano meno concentrati e meno biodisponibili ed infatti il loro accumulo è stato minore; il contenuto di Cu e Cd nei fittoni interrati nel terreno di controllo è diminuito e ciò indica che comunque anche in ambiente confinato è avvenuto un certo rilascio di metalli a seguito alla degradazione dei fittoni.

Per quanto riguarda varietà e densità, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative, come avvenuto per la dinamica degradativa.

I modelli matematici utilizzati per descrivere l'andamento del contenuto di metalli nei fittoni hanno approssimato bene i dati sperimentali, e suggeriscono che ciascun elemento segua una propria dinamica di rilascio/adsorbimento, la quale risente sicuramente della dinamica degradativa del fittone ma anche delle caratteristiche del terreno. Questo studio suggerisce quindi che i processi di fitostabilizzazione in radice non dipendono solo dalla quantità di metalli stoccata nella biomassa, ma risentono in modo significativo anche delle condizioni del terreno.

5.4 Flora spontanea

La presenza di una flora spontanea sul terreno in cui la prova è stata predisposta suggerisce che anche suoli inquinati e con un'elevata concentrazione di metalli biodisponibili possono essere facilmente colonizzati da specie spontanee. Piante erbacee

spontanee non iperaccumulatrici e non necessariamente adattate a terreni con elevate concentrazioni di metalli possono quindi essere resistenti alla presenza contemporanea di diversi elementi tossici, e in alcuni casi sono in grado di concentrarli in quantità notevoli (es. *Veronica persica*). Varie specie spontanee potrebbero essere utilizzate per migliorare l'efficienza della fitostabilizzazione sia tramite una stabilizzazione del suolo per prevenirne l'erosione, sia tramite un diretto contributo della flora spontanea all'accumulo di metalli (Mendez e Maier, 2008). La capacità di bioaccumulo di metalli da parte di specie spontanee dovrebbe essere investigata per valutarne le potenzialità di utilizzo nell'ambito dei progetti di bonifica con tecnologie verdi.

Queste osservazioni potrebbero costituire nuovi spunti per lo sviluppo di strategie di risanamento di terreni inquinati, ma c'è sicuramente bisogno di ulteriori ricerche per definire le specie più adatte per la fitostabilizzazione.

6. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio, seppure non esaustivi, hanno fornito indicazioni utili per la comprensione delle dinamiche degradative della biomassa radicale del colza e del rilascio di metalli pesanti in presenza di elevati livelli di inquinanti metallici nel terreno, in relazione all'attività microbica del terreno.

Lo stock di metalli pesanti accumulato da questa pianta modello è strettamente legato all'entità di biomassa prodotta, e possibili incrementi sarebbero perseguibili tramite la scelta varietale (ibridi vigorosi) e elevati investimenti di piante. La dinamica degradativa della biomassa radicale sembra invece non essere influenzata da questi fattori agronomici, seguendo modelli tipicamente sigmoidali. Sebbene la mineralizzazione dei tessuti radicali avvenga molto velocemente, il processo degradativo rallenta man mano che i componenti organici più labili vengono attaccati, lasciando i composti strutturali maggiormente resistenti. Va evidenziato che il processo degradativo può subire un importante rallentamento in presenza di livelli significativi di contaminazione da metalli pesanti a causa del rallentamento dell'attività microbica del terreno.

I tessuti radicali più ricchi di fibre rimangono indegradati nel terreno per periodi relativamente lunghi (>12 mesi), e la persistenza di una parte considerevole della biomassa anche dopo un anno di incubazione suggerisce che è possibile aumentare annualmente la sostanza organica in grado di trattenere metalli nel suolo attraverso nuovi cicli di coltivazione. Questa pratica avrebbe anche il vantaggio di aumentare il pool di carbonio organico del terreno, con tutti i benefici per fertilità e la struttura che ne conseguono. La quantità di metalli complessivamente trattenibile dalla biomassa radicale residua sembra inoltre aumentare nel tempo, anziché ridursi, grazie a fenomeni di adsorbimento sulle particelle organiche.

In generale, per ottenere una efficiente stabilizzazione, si suggerisce di adottare quelle strategie agronomiche che consentono di massimizzare la biomassa iniziale e quindi lo stock iniziale di metalli, potendo poi contare sulla scarsa attività degradativa che caratterizza i suoli contaminati. È ipotizzabile quindi avere una efficienza di fitostabilizzazione che aumenta all'aumentare del livello di contaminazione, cioè in quei siti particolarmente degradati ai quali questa tecnologia deve effettivamente rivolgersi. È possibile inoltre che l'utilizzo di specie poliennali arboree, che presentano sistemi

radicali più estesi e radici maggiormente lignificate, possa trasformarsi in un miglioramento ulteriore del processo di fitostabilizzazione.

Ulteriori studi sarebbero comunque necessari per approfondire gli effetti delle condizioni ambientali sulle dinamiche degradative dei residui vegetali nel lungo periodo e in condizioni naturali, e individuare le specie maggiormente adatte alla fitostabilizzazione.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aerts R., 1997 Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. *Oikos* 79, 439-449.
- Aerts R., Bakker C., De Caluwe H., 1992. Root turnover as a determinant of the cycling of C, N, and P in a dry heathland ecosystem. *Biogeochemistry* 15, 175-190.
- Alexander M., 1977. Introduction to soil microbiology, 2nd ed. Wiley, New York.
- Ames B.A., Shingenaga M.K., Park M., 1991. Oxidative damage and repair: chemical, biological and medical aspect, Ed Elmsford A., Pergamon press, New York, 181-187.
- Andrén O., Steen E., Rajkai K., 1992 Modeling the effects of moisture on barley straw and root decomposition in the field. *Soil Biol Biochem*, 24, 727-736.
- Arduini I., Masoni A., 2002. Fitodepurazione. *Riv. Agron.* 36, 17-32.
- Arienzo M., Adamo P., Cozzolino V., 2004. The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soils from a metallurgical site. *Sci. Total Environ.* 319, 13-25.
- Asseng S., Ritchie J.T., Smucker A.J.M., Robertson M.J., 1998. Root growth and water uptake during water deficit and recovering in wheat. *Plant and Soil* 201, 265-273.
- Baker A.J.M., Brooks. R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126.
- Banuelos G.S., Ajiwa H.A., Mackey L.L., Wu C., Cook S., Akohoue S., 1997. Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium, *J. Environ. Qual.* 26, 639-646.
- Belgrand M., Dreyer E., Joannes H., Velter C. e Sculler L., 1987. A semi-automated data processing system for root growth analysis: application to a growing oak seedling. *Tree Physiol.* 3, 393-404.
- Berg B., 1984. Decomposition of root litter and some factors regulating the process: long-term root litter decomposition in a Scots pine forest. *Soil Biol Biochem*, 16, 609-617

- Bhom W., 1979. Methods of studying root systems. Ecological Studies 33, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 188 pp.
- BIO-WISE. Contaminated land remediation: a review of biological technology. London: DTI; 2000.
- Bloomfield J., Vogt K.A., Wargo P.M., 1996 .Tree root turnover and senescence. In: Waisel Y, Eshel A., Kafkafi U. (eds) Plant roots: the hidden half, 2nd edn. Dekker, New York, pp 363-381.
- Blum A., Arkin G.F., 1984. Sorghum root growth and water-use as affected by water supply and growth duration. Field Crops Research 9, 131-142.
- Boot R.G.A., 1990. The significance of size and morphology of root systems for nutrient acquisition and competition. Plant and Soil 129, 291-299.
- Brown S.L., Chaney R.L., Angle J.S., Baker J. S.M., 1995.Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. Soil Sci. Soc.Am.J. 59, 125-133.
- Burken J.G., Schnoor J.L. 1997. Uptake amd metabolism of atrazine by poplar trees, Environ. Sci. Technol. 31, 1399-1406.
- Cahoon, G.A., Morton, E.S., 1961. An apparatus for the quantitative separation of plant roots from soil. Proc. Am. Soc. Hortic: Sci. 78, 593-596.
- Camiré C., Côté B., Brulotte S., 1991. Decomposition of roots of black alder and hybrid poplar in short-rotation plantings: nitrogen and lignin control. Plant Soil 138, 123-132.
- Carter D.C., Hendricks J.J., Mitchell R.J., Pecot S.D., 2004. Fine root carbon allocation and fates in longleaf pine forests. Forest Science 50, 177-187.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie 88, 1707-1719.
- Cornelissen J.H.C., 1996. An experimental comparison of leaf decomposition rates in a wide range of temperate plant species and types. Journal of Ecology 84, 573-582.
- Cromack K., Monk C.D., 1975. Litter production, decomposition, and nutrient cycling in a mixed hardwood watershed and a white pine watershed. In: Mineral cycling in southeastern ecosystems. Proceedings of a symposium, 1–3 May 1974, Augusta, Georgia. ERDA symposium series 36. US Energy pp 609–624.

- Cromack K., Sollins P., Graustein W.C., Speidel K., Todd A.W., Spycher G., Li C.Y., Todd R.L. 1979. Calcium oxalate accumulation and soil weather in mats of hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biol Biochem* 11, 463–468.
- Curry J.P., Byrne D., 1997. Role of earthworms in straw decomposition in a winter cereal field. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 555-558.
- Dalton, F.N., 1995. In-situ root extent measurements by electrical capacitance methods. *Plant and Soil* 173 (1), 157-165.
- Dary E., Chamber-Pérez M.A., Palomares A.J., Pajuelo E., 2010. *In situ* phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal-resistant plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Material* 177, 323-330.
- Davies K.J.A., Lin S.W., Pacifici R.E., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Degradation of denaturated protein, *J. Biol. Biochem* 260, 12600-12606.
- Del Rio Celestino M., Font R., Moreno Rojas R., De Haro Bailon A., 2006. Uptake of lead and zinc by wild plants growing on contaminated soils. *Ind. Crop. Prod.* 24, 230-237.
- Dickinson N.M., 1982. Investigation and measurement of root turnover in semipermanent grassland. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 19, 307-314.
- Drew M.C., Saker L.R., 1980. Assessment of a rapid method using soil cores, for estimating the amount and the distribution of crop roots in the field. *Plant and Soil* 55, 283-295.
- Duffus J.H., 2002. “Heavy metals” – A meaningless term *Pure Appl. Chem.* 74, 793-807.
- Dushenkov D., 2003. Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant Soil* 249, 167-175.
- Dushenkov V., Kumar P.B.A.N., Motto H., Raskin I., 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams, *Environ. Sci. Technol* 29, 1239-1245.
- Dyer M.L., Meentemeyer V., Berg B., 1990. Apparent controls of mass loss rate of leaf litter on a regional scale: litter quality versus climate. *Scand J For Res* 5, 311-324.

- Edmonds R.L., 1980. Litter decomposition and nutrient release in Douglas-fir, red alder, western hemlock, and Pacific silver fir ecosystems in western Washington. *Can J For Res* 10, 327-37.
- Flanagan P.W., Van Cleve K., 1983. Nutrient cycling in relation to decomposition and organic matter quality in taiga ecosystems. *Can J For Res* 13, 795-817.
- Foale M.A. e Upchurch D.R., 1982. Soil coring method for sites with restricted access. *Agron. J.* 74, 761-763.
- Fog K., 1988. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biol Rev Camb Phil Soc* 63, 433-462.
- Frnandez O.A., Cadwell M.M., 1975. Phenology end dynamics of roots growth of three cool semi-desert shrubs under field conditions. *J. Ecology*, 63, 703-714.
- Gabbrielli e Galardi, 2004. I metalli pesanti negli organismi vegetali. In: "Fitoestrazione di metalli pesanti. Contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi- pianta" Zerbi e Marchiol (a cura di), Forum ed, 2004.
- Garbisu C., Alkorta I., 2001. Phytoextraction: A cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Biores. Technol.* 77(3), 229-236.
- Gholz H,L,, Hendry L,C,, Cropper W,P, 1986. Organic matter dynamics of fine roots in plantations of slash pine (*Pinus elliottii*) in north Florida. *Can. J. For. Res.* 16, 529-538.
- Gisbert, C., Ros, R., de Haro, A., Walker, D.J., Pilar Bernal, M., Serrano, R., Avino, J.N., 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 440-445.
- Guo D.L., Mithcell R.J., Hendricks J.J., 2004. Fine root branch orders respond differently to carbon source-sink manipulations in longleaf pine forest. *Oecologia* 140, 450-457.
- Halliwell B., Gutteridge M.C., 1948. Oxigen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Heal O.W., Anderson J.M., Swift M.J., 1997. Plant litter quality and decomposition: an historical overview. In: Cadish G., Giller K.S. (Eds.), *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*. CAB International, Wallingford, 3-30.

- Heal O.W., Anderson J.M., Swift M.J., 1997. Plant litter quality and decomposition: an historical overview. In: Cadisch G, Giller KE (eds) *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, pp 3-30.
- Heim A., Luster J., Brunner I., Frey B., Frossard E. 1999. Effects of aluminum treatment on Norway spruce roots, aluminum binding forms, element distribution, and release of organic acids. *Plant Soil* 216, 103-116.
- Henriksen T.M., Breland T.A., 1999. Evaluation of criteria for describing crop residue degradability in a model of carbon and nitrogen turnover in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1135-1149.
- Jackson R.B., Mooney H.A., Schulze E.D., 1997. A global budget for fine root biomass, surface area, and nutrient contents. *Proceeding of National Academy of Sciences, USA* 94: 7362-7366.
- Jensen H.L. 1929. On the influence of carbon:nitrogen ratios of organic material on the mineralisation of nitrogen. *J Agric Sci* 19, 71-82.
- Joslin J.D., Gaudinski J.B., Torn M.S., Riley, W.J., Hanson P.J., 2006. Fine-root turnover patterns and their relationship to root diameter and soil depth in a ¹⁴C-labeled hardwood forest. *New Phytologist* 17, 523-535.
- Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I., 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soil, *Environ. Sci.Technol.* 29, 1200-1238.
- Lambers H, Cambridge ML, Konings H, Pons TL (eds) *Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants*. SPB, The Hague, pp 299-311.
- Lasat M.M., 2002, Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanism. *J. Environ. Qual.* 31, 109-120.
- Lauenroth W.K., 2000. Methods of estimating belowground net primary production. *Methods in Ecosystem Science*, eds O.E.Sala, R.B.Jackson, H.A. Mooney & R.W. Howarth, pp. 58-71.
- Li Y.M., Chaney R., Brewer E., Roseberg R., Angle J.S., Baker A.J.M., Reeves R., Nelkin J., 2003. Development of a technology for commercial phytoextraction of Nickel: economic and technical consideration. *Plant and Soil* 249, 107-115.

- Lindsay W.L., Norwell W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 42, 421-428.
- Lopareva-Pohu A., Verdin A., Garçon G., Sahraoui L.H., Pourrut B., Debiane D., Waterlot C., Laurelle F., Bidar G., Douay F., Shirali P., 2011. Influence of fly ash aided phytostabilisation of Pb, Cd and Zn highly contaminated soils on *Lolium perenne* and *Trifolium repens* metal transfer and physiological stress. *Environmental Pollution* 159, 1721-1729.
- Majdi H., Nylund J.E., Agren G.I., 2007. Root respiration data and minirhizotron observations conflict with root turnover estimates from sequential soil coring. *Scand. J. of For. Res.* 22, 299-303.
- Martel A.E., Calvin M. 1958. The chemistry of metal-chelater, Verlag-Chemie, Weinheim, Germania.
- Martin I., Bardos P., 1996. A review of full scale treatment technologies for the remediation of contaminated land. Richmond, Surrey: EPP Publications.
- McClaugherty C.A., Aber J.D., Melillo J.M., 1982. The role of fine roots in the organic matter and nitrogen budgets of two forested ecosystems. *Ecology* 63,1481-1490
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E., 2001. Plant and rhizosphere process involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil* 232(1/2), 207-214.
- McLaughlin S.B., Wimmer R., 1999. Tansley review no. 104. Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *New Phytol.* 142, 373–417.
- Meentemeyer V., Berg B, 1986. Regional variation in rate of mass loss of *Pinus sylvestris* needle litter in Swedish pine forests as influenced by climate and litter quality. *Scand. J. For. Res.* 1, 167-180.
- Mendez M.O., Maier R.M. 2008. Phytostabilisation of mine tailings in arid and semiarid environments-an emerging remediation technology. *Environ Health Perspect* 116, 278-283.
- Milchunas D.G., Lauenroth W.K., 1992. Carbon dynamics and estimates of primary production by harvest, ¹⁴C dilution and ¹⁴C turnover. *Ecology* 73, 593-607.
- Milchunas D.G., Lauenroth W.K., Singh J.S., Cole C.V., Hunt H.W., 1985. Root turnover and production by ¹⁴C dilution: implications of carbon partitioning in plants. *Plant and Soil* 188, 352-365.

- Milchunas D.G., Morgan J.A., Mosier A.R., Lelain D.R., 2005. Root dynamics and demography in shortgrass steppe under elevated CO₂, and comments on minirhizotron methodology. *Global Change Biology* 11, 1837-1855.
- Mosca G., Vamerali T., Ganis A., Coletto L., Bona S., 2004. In “Fitoestrazione di metalli pesanti. Contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi- pianta” Zerbi e Marchiol (a cura di), Forum ed., 105-135.
- Mueller B., Rock S., Gowswami Dib., Ensley D., 1999. Phytoremediation Decision Tree. Interstate Technology and Regulatory Cooperation Work Group, ITRC, 1-36.
- Mun H.T., Whitford W.G., 1998. Changes in mass and chemistry of plant roots during the long-term decomposition on a Chihuahuan desert watershed. *Biol. Fertil. Soils* 26, 16-22.
- Nguyen C., 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanism and controls. *Agronomie* 23, 375-396.
- Nigam R., Srivastava S., Prakash S., Srivastava M.M., 2001. Cadmium mobilisation and plant availability – the impact of organic acids commonly exuded from roots. *Plant Soil* 230, 107-113.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air water and soils by trace metals. *Nature* 333(6169), 134-139.
- Paustian K., Agren G.I., Bosatta E., 1997. Modelling litter quality effects on decomposition and soil organic matter dynamics. In: Cadish G., Giller K.E., (Eds.), *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*. CAB International Wallingford, 313-335.
- Pulford I.D., Watson C., 2003. Phytoremediation of heavy metal contaminated by trees – a review. *Environment International* 29 (4), 529-540.
- Quartacci M.F., Argilla A., Baker A.J.M., Navari-Izzo F., 2006. Phytoextraction of metals from multiply contaminated soil by Indian Mustard. *Chemosphere* 63, 918-925.
- Raskin, I., Gleba, D., Smith, R., 1996. Using plant seedlings to remove heavy metals from water. *Plant Physiol.* 111 (2), 552-552.
- Robinson B.H., Bañuelos G., Conesa H.M., Evangelou M.W.H., Schulin R., 2009. The phytomanagement of trace elements in soils. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28, 240-266.

- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, L., 1998. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 49 (1), 643-668.
- Schalscha, E., Ahumada, I., 1998. Heavy metals in rivers and soils of central Chile. *Water Sci. Technol* 37 (8), 251-255.
- Singh J.S., Gupta S.R., 1977. Plant decomposition and soil respiration in terrestrial ecosystems. *The Botanical Review* 43, 450-528.
- Swift M.J., Heal O.W., Anderson J.M., 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. Blackwell, Oxford, 372 pp.
- Swift MJ, Heal OW, Anderson JM 1979. The influence of the physico-chemical environment on decomposition process. In: Anderson DJ, Greig-Smith P, Pitelka FA (eds) *Decomposition in terrestrial ecosystems. Studies in Ecology*, vol. 5. University of California Press, Berkeley, Calif., pp 220-266.
- Taylor B.R., Parkinson D., Parsons W.F.J., 1989. Nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates: a microcosm test. *Ecology* 70, 97–104.
- Thompson, J., Bannigan, J., 2008. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology* 25, 304e315.
- Tierney G.L., Fahey T.J., 2002. Fine root turnover in a northern hardwood forest: a direct comparison of the radiocarbon and minirhizotron methods. *Canadian Journal of Forest Resources* 32, 1692-1697.
- Tierney G.L., Fahey T.J., 2001. Evaluating minirhizotron estimates of fine root longevity and production in the forest floor of a temperate broadleaf forest. *Plant and Soil* 229, 167-176.
- USEPA, 1995a. EPA method 3051. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. In: *Test Methods for Evaluating Solid Waste*, third ed. Washington, DC.
- USEPA, 1995b. EPA method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. In: *Test Methods for Evaluating Solid Waste*, third ed. Washington, DC.
- Vamerali T., Ganis A., Bona S., Mosca G., 2003. Fibrous root turnover and growth in sugar beet (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) as affected by nitrogen shortage. *Plant and Soil* 255, 169-177.

- Vamerali T., Marchiol L., Bandiera M., Fellet G., Dickinson N. M., Lucchini P., Mosca G., Zerbi G., 2012. Advances in agronomic management of phytoremediation: methods and results from a 10-year study of metal-polluted soils. *Italian Journal of Agronomy* 7 e42, 323-330.
- Vamerali T., Bandiera M., Colletto L., Zanetti F., Dickinson N.M., Mosca G. 2009. Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environ. Pollut.*, 157, 887-894.
- Van Der Krift T.A.J., Berendse F., 2002. Root life spans of four grass species from habitats differing in nutrient availability. *Functional Ecology* 16, 198-203.
- Van Soest P.J., 1987. Nutritional ecology of the ruminants. *Ruminant metabolism. Nutritional strategy, the cellulytic fermentation and the chemistry of forages and plant fibers.* Cornell University Press, Ithaca, London.
- Vangronsveld J., Van Assche F., Clijsters H., 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metals immobilization end revegetation, *Environ. Pollut.* 87 (1): 51-59.
- Varun M., D'Souza R., Pratas J., Paul M.S., 2012. Metal contamination of soils and plants associated with the glass industry in North Central India: prospects of phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research International* 19, 269-281.
- Vidac R.D. Pohland F.G. 1996. Treatment walls. TE 96-01, GWRTAC (Ground Water Remediation Technologies Analysis Center), Pittsburg, PA.
- Wade M.J., Davis B.K., Carlisle J.S., Klein A.K., Valoppi L..M., 1993. Enviromental transformation of toxic metals, *Occup. Med.* 8, 575-601.
- Waring RH, Schlesinger WH 1985. *Forest Ecosystems: Concepts and Management.* Academic Press, Inc, New York.
- Watson C.A, Ross J.M., Bagnaresi U., Minotta G.F., Roffi F., Atkinson D., Balck K.E., Hooker J.E., 2000. Environment-induced modifications to root longevity in *Lolium perenne* and *Trifolium repens*. *Annals of Botany* 85, 397-401.
- Zhuang, P., McBride, M.B., Xia, H.P., Li, N.Y., Lia, Z.A., 2009. Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, South China. *Science of the Total Environment* 407, 1551-1561.

Ringraziamenti

*Sono tante le persone che devo ringraziare, ignare o meno di avermi permesso di arrivare fino a questo giorno. Al primo posto sicuramente la mia famiglia: **Emma e Daniel**, seguono i miei familiari; papà **Nereo**, mamma **Monica** ed **Emy**. Un abbraccio e un caloroso ringraziamento a tutti i miei parenti e conoscenti che mi hanno sostenuto finora, una grande pacca sulla spalla al mio migliore amico **Marco** "Dai vez che ghea ghemo fatta", alla mia figlioccia **Paola** "Riga dritto me raccomando", a tutti i miei amici di facoltà, collegio "Don Nicola Mazza", amici qui a casa, compagni di squadra del **Rugby Altovicentino**. Infine, ultimi ma non per questo in ordine di importanza, un grandissimo ringraziamento doveroso a **Paola Lucchini**, senza di lei dubito sarei riuscito a laurearmi, sempre presente e disponibile. Un sentito grazie al prof. **Teofilo Vamerali** per avermi dato la possibilità di laurearmi presso il suo dipartimento e al prof. **Giuliano Mosca**, sempre disponibile per un chiarimento/saluto/caffè.*