

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

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

**Accrescimento e accumulo di metalli pesanti in piante  
alimurgiche del Veneto**

Relatore:

*Prof. Teofilo Vamerli*

Correlatore:

*Dott.ssa Marianna Bandiera*

Laureando:

*Cristian Dal Cortivo*

Matricola n. 1061589

ANNO ACCADEMICO 2013 - 2014



# Sommario

<b>Sommario</b> .....	<b>3</b>
<b>Riassunto</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Introduzione</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 I Metalli pesanti e il problema dell'inquinamento</b> .....	<b>10</b>
1.1.1 Inquinamento del suolo .....	10
1.1.2 Metalli pesanti: definizione e caratteristiche .....	14
1.1.3 Effetti dei metalli pesanti sugli organismi .....	15
1.1.4 Soglie di rilascio nell'ambiente e negli alimenti .....	17
<b>1.2 I metalli pesanti e le piante</b> .....	<b>19</b>
1.2.1 Ruolo biologico dei metalli nelle piante .....	19
1.2.2 Fitotossicità dei metalli pesanti .....	19
1.2.3 Biodisponibilità dei metalli .....	21
1.2.4 Assorbimento radicale .....	23
1.2.5 Le piante in terreni inquinati da metalli pesanti .....	24
1.2.6 Meccanismi di tolleranza e detossificazione .....	25
1.2.7 Efficienza del processo di accumulazione .....	27
<b>1.3 Tecniche di bonifica dei suoli inquinati</b> .....	<b>28</b>
1.3.1 <i>Phytoremediation</i> .....	30
1.3.2 Specie impiegabili nel fitorisanamento dei suoli .....	35
1.3.3 Alcune problematiche e prospettive .....	36
<b>1.4 Biofortificazione</b> .....	<b>37</b>
<b>1.5 Piante alimurgiche</b> .....	<b>39</b>
1.5.1 <i>Cichorium intybus</i> L. (cicoria selvatica) .....	39
1.5.2 <i>Rumex acetosa</i> L. (acetosa) .....	40
1.5.3 <i>Sonchus oleraceus</i> L. (grespino comune) .....	41
1.5.4 <i>Taraxacum officinale</i> L. (tarassaco) .....	42
1.5.5 <i>Tragopogon porrifolius</i> L. (barba di becco) .....	43

<b>2</b>	<b>Scopo del lavoro .....</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>Materiali e metodi .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Prova in vaso .....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Allestimento della prova.....	47
3.1.2	Analisi del terreno .....	49
3.1.3	Analisi in vivo.....	51
3.1.4	Analisi sulla biomassa alla raccolta.....	53
<b>3.2</b>	<b>Raccolta e analisi di piante spontanee in siti potenzialmente a rischio di contaminazione.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3</b>	<b>Analisi statistica .....</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>Risultati e discussione.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Prova in vaso .....</b>	<b>61</b>
4.1.1	Il terreno di sperimentazione.....	61
4.1.2	Accrescimento delle piante.....	63
4.1.3	Analisi del contenuto di clorofilla .....	67
4.1.4	Concentrazioni dei metalli in fittoni, foglie e fusti.....	68
<b>4.2</b>	<b>Valutazione di piante alimurgiche in siti potenzialmente a rischio.....</b>	<b>76</b>
4.2.1	Analisi del terreno .....	76
4.2.2	Accumulo di metalli nei vegetali.....	80
<b>4.3</b>	<b>Valutazione dei rischi alimentari .....</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>89</b>

# Riassunto

L'inquinamento da metalli pesanti sta assumendo negli ultimi anni un'importanza rilevante in termini di rischio ambientale e di salute pubblica. Molti terreni agricoli ricevono quantità crescenti di metalli tossici attraverso la fertilizzazione, la difesa fitosanitaria e l'impiego di acque d'irrigazione contaminate, e la non degradabilità di questi inquinanti rende la contaminazione permanente. Alcuni metalli come cadmio e piombo sono dannosi sia per gli organismi vegetali e animali, uomo incluso; altri invece, come cobalto, rame e zinco sono essenziali, ma divengono tossici oltre una determinata soglia.

Nel presente studio, condotto sia in ambiente controllato (vaso) che in alcuni siti della provincia di Padova, è stata accertato un buon accumulo di metalli in specie alimurgiche poliennali appartenenti alle famiglie delle *Asteraceae* (*Cichorium intybus* L., *Sonchus oleraceus* L., *Taraxacum officinale* L. e *Tragopogon porrifolius* L.) e delle *Polygonaceae* (*Rumex acetosa* L.), utilizzate ancor oggi come piante mangerecce, ed oggetto di rilancio su scala regionale in alcuni programmi di conservazione, tutela e valorizzazione della biodiversità.

La sperimentazione ha inteso verificare la capacità di accumulo di metalli essenziali (Co, Cu, Zn) e xenobiotici (Cd, Pb) nei vari organi della pianta in presenza di un arricchimento artificiale nel terreno o in siti a rischio di inquinamento, al fine di valutare i potenziali rischi alimentari o la biofortificazione, e il loro possibile impiego nelle tecnologie “verdi” di bonifica.

Le specie saggiate hanno evidenziato una buona tolleranza alla contaminazione da metalli pesanti, in termini di accrescimento epigeo e di stato nutrizionale (SPAD, contenuto di clorofilla), mentre è stata osservata una marcata diminuzione dell'accrescimento radicale di *T. officinale* e *S. oleraceus*. Discreta è risultata la capacità estrattiva, ma non sufficiente per poterle ritenere piante iperaccumulatrici. L'elevata traslocazione alla parte aerea di Cd e Zn (coefficiente di traslocazione di 2,6 e 2,3 rispettivamente) suggerisce un loro possibile impiego nella fitoestrazione di questi metalli, specialmente di *T. porrifolius* e *C. intybus*,

mentre il discreto accumulo di Pb e Cu nelle radici fittonanti (rispettivamente 15,6 e 85,7 mg kg<sup>-1</sup>) ne suggerisce una possibile applicazione nella fitostabilizzazione *in planta*.

*R. acetosa* e *T. officinale* hanno mostrato il più elevato assorbimento di metalli (1,5 e 0,6 mg per pianta, rispettivamente). Considerando una densità di 15-20 piante m<sup>-2</sup> di *R. acetosa*, o di 40-60 per *T. porrifolius*, possono essere assorbiti fino ad un massimo di 230 g di metalli per ettaro.

I siti indagati nella provincia di Padova (ex-discarda di Roncayette – Ponte San Nicolò, fosso campestre – Montà, ciglio Strada Romea – Legnaro) generalmente non sono risultati contaminati, ad eccezione del bordo strada di Legnaro, caratterizzato da elevati livelli di Pb, Cu e Zn. Nonostante i livelli modesti di inquinamento da metalli nella ex-discarda di Roncayette, *T. officinale* si è arricchito di Cd e Pb nella parte epigea, mentre il fittone ha accumulato elevati livelli di Cu.

Il naturale arricchimento in minerali essenziali quali Zn e, in misura minore Co, può rappresentare un aspetto positivo nella biofortificazione vegetale. Tuttavia il contenuto di Pb e Cd nelle foglie, risultato in vaso generalmente superiore alle soglie massime ammesse dall'UE, renderebbe pericoloso il consumo continuativo di queste piante se cresciute in ambienti contaminati.

# Abstract

## *Growth and metal uptake in alimurgic species of the Veneto region*

Metal pollution is a major problem for agricultural soils and is receiving increasing attention for the environmental and health risks that it poses. Metals are present in fertilizers, pesticides and contaminated irrigation water and, unlike organic pollutants, are not degraded by soil microflora. Some elements (e.g., Cd, Pb) are toxic to plants and animals per se, whereas others (e.g., Co, Cu, Zn) are essential at certain amounts for sustaining metabolic functions, becoming noxious only at high rates.

The present study was carried out in controlled environment (pots) and in the open, in sites of the Padova province, and aimed at ascertaining the metal uptake ability of some alimurgiche perennial species belonging to the families *Asteraceae* (*Cichorium intybus* L., *Sonchus oleraceus* L., *Taraxacum officinale* L. and *Tragopogon porrifolius* L.) and *Polygonaceae* (*Rumex acetosa* L.). These wild herbs are commonly collected as edible plants, and are now object of programs for conservation, protection and enhancement of biodiversity.

The experiment intended to verify the capacity of accumulation of essential (Co, Cu, Zn) and toxic (Cd, Pb) metals in various plant organs when grown on an artificial metal-enriched soil in pots or at sites at risk of pollution, in order to assess the potential food hazard or biofortification on the one hand, and the possible use in green technologies for soil remediation and management.

All species showed a good tolerance to high soil contamination rates, especially at aboveground (biomass and SPAD values), whereas a great reduction of root length was observed in *T. officinale* e *S. oleraceus*. All species showed a good metal accumulation, but still below to that of hyperaccumulator plants.

The high translocation of Zn and Cd from roots to shoot (coefficient of translocation of 2.6 and 2.3 respectively) suggests the possible use of these plants in phytoextraction, especially *T. porrifolius* and *C. intybus*, while the appreciable accumulation of Pb and Cu in tap-roots (respectively 15.6 and 85,7 mg kg<sup>-1</sup>) suggests their application to *in planta*

phytostabilization. *R. acetosa* and *T. officinale* showed the highest metal uptake per plant (1.5 and 0.6 mg, respectively).

Considering a density of 15-20 plants m<sup>-2</sup> for *R. acetosa*, and 40-60 for *T. porrifolius*, up to a maximum of 230 g of metals per hectare may be stored in plant tissues.

The soil collected from various sites in Padova (ex-landfill at Roncajette - Ponte San Nicolò, field ditch at Montà, roadside at Legnaro) was generally un-contaminated, with the exception of a high concentration of Pb detected at the roadside in Legnaro. Despite the low metal levels in the landfill soil, leaves of *T. officinale* were rich in Cd and Pb, and taproots in Cu.

Plants grown in contaminated soil were enriched in essential mineral nutrients such as Zn and, to a lesser extent, Co. However, leaf Pb and Cd often exceeded the maximum thresholds allowed by the EU, thus making the continuative consumption of these species hazardous when they are grown in contaminated environments.



# 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 e in particolar modo lo sviluppo dei settori industriale e agrario, 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 agrario, 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 come 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 possono essere "degradati" biologicamente ma solo convertiti da uno stato ossidativo all'altro, o essere adsorbiti dai complessi organici (Garbisu e Alkorta, 2001; Gisbert *et al.*, 2003) o accumulati dagli organismi viventi fino a raggiungere concentrazioni tali da compromettere la salute di piante e animali, compreso l'uomo. 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; Zhuang *et al.*, 2009).

# **1.1 I Metalli pesanti e il problema dell'inquinamento**

## **1.1.1 Inquinamento del suolo**

Il suolo costituisce la parte della biosfera in cui l'uomo vive e che egli trasforma attraverso le varie forme di insediamento e le sue attività. Esso rappresenta la parte più superficiale della crosta terrestre ed è il risultato della trasformazione litologica da parte di agenti chimici, fisici e biologici (Bargellini, 1998). Il terreno rappresenta quindi, per sua natura, un corpo estremamente eterogeneo, in cui l'introduzione di sostanze non facenti parte della sua struttura originaria o già presenti ma in concentrazioni differenti determina modificazioni che generalmente rappresentano un danno o un peggioramento delle condizioni di vita (Radaelli e Calamai, 2001).

Il suolo assicura una serie di funzioni chiave dal punto di vista ambientale, economico, sociale e culturale che sono indispensabili per la vita. Esso rappresenta l'habitat per diverse specie e garantisce la produzione alimentare, agricola e selvicolturale: quasi tutta la vegetazione, tra cui i pascoli, le colture arabili e gli alberi, hanno bisogno del suolo per rifornirsi di acqua e sostanze nutritive e per fissare le proprie radici. Inoltre, il suolo funge da elemento del paesaggio e del patrimonio culturale (Commissione Comunità Europea, 2002). In generale le funzioni indicate sono interdipendenti e la misura in cui sono assicurate dal suolo è molto importante per la sostenibilità. Quando il suolo diviene invece fonte di materie prime o il terreno che occupa funge da supporto per le attività umane, la capacità del suolo di assicurare le sue funzioni è ridotta o modificata, con una conseguente conflittualità tra le funzioni stesse (Commissione Comunità Europea, 2002).

La manipolazione della struttura del suolo, con l'introduzione di contaminanti, può quindi diventare fonte di alterazione delle funzioni che esso normalmente ricopre, incidendo negativamente sulla catena alimentare, sulla salute umana e, più in generale, sull'equilibrio degli ecosistemi (Commissione Comunità Europea, 2002), soprattutto se si evidenzia il fatto che la sua capacità tampone e di accumulo nei confronti delle sostanze inquinanti può effettivamente impedire l'immediata contaminazione degli altri comparti ambientali ma, contrariamente a come si è a lungo ritenuto, può anche determinare un improvviso rilascio degli inquinanti stessi una volta raggiunto il limite di ritenzione (Stigliani, 1992). Per questo motivo si è recentemente riconosciuto il problema dell'inquinamento del suolo, argomento

per il quale si dispone però di poche informazioni e di una legislazione ancora giovane e per molti aspetti carente (Zaccheo e Crippa, 2004).

Il problema della valutazione dello stato di inquinamento di un suolo è molto dibattuto, in quanto non esistono in pratica metodi di laboratorio chimici o biologici atti a misurare la diminuzione di produttività (Zaccheo *et al.*, 2000). Attualmente la legislazione italiana identifica un suolo come “sito inquinato” qualora in esso venga rilevata la presenza di sostanze in concentrazioni superiori a quelle tabellari espresse dal D. Lgs. 152/2006 (Norme in Materia Ambientale), senza tener conto di eventuali valori del fondo litologico.

I rifiuti, non solo industriali, che sono all’origine di contaminazioni (scorie di fonderia, sali da rifusione dell’alluminio, fanghi, oli esausti, ceneri leggere da incenerimento, polveri dell’abbattimento dei fumi della siderurgia, pesticidi, ecc.) possono avere origine locale (puntiforme) o diffusa. In generale la contaminazione puntiforme è associata alla presenza di miniere, all’industria, alle discariche e ad altre strutture che, sia durante il funzionamento che dopo la chiusura, possono creare rischi per il comparto suolo e acqua. La contaminazione diffusa è invece associata alla deposizione atmosferica, a determinate pratiche agricole e ad inadeguate operazioni di riciclo dei rifiuti e trattamento delle acque reflue. La deposizione atmosferica, dovuta alle emissioni dell’industria, del traffico e dell’agricoltura, di sostanze inquinanti rilascia nel suolo contaminanti acidificanti (ad esempio SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>), metalli pesanti e diversi altri composti organici (diossine, bifenili policlorurati, idrocarburi policiclici aromatici). I contaminanti acidificanti riducono progressivamente il potere tampone del suolo, comportando in alcuni casi, il superamento del carico critico con conseguente rilascio improvviso e massiccio di inquinanti.

Varie pratiche agricole possono essere considerate fonte di contaminazione diffusa del suolo come la concimazione e la difesa fitosanitaria, a causa anche della presenza di metalli pesanti, come Cd e Cu, composti organici scarsamente biodegradabili e microrganismi potenzialmente patogeni (Commissione Comunità Europea, 2002). Secondo Goldberg e Zaccheo (1998), l’inquinamento può essere determinato da sostanze organiche (scarichi urbani, reflui zootecnici, industrie di trasformazione di materiali organici naturali, fitofarmaci, numerose classi di sostanze organiche industriali, tensioattivi anionici), da sostanze minerali e inorganiche (materiali solidi in sospensione, metalli pesanti e sali disciolti) e da fattori microbiologici (acque reflue di insediamenti urbani e zootecnici).

Tra i vari inquinanti organici ed inorganici, attualmente viene rivolta particolare attenzione ai metalli pesanti. In Europa, la contaminazione del suolo dovuta a tali sostanze

riguarda circa il 34,8% dei siti inquinati, seguita dalla contaminazione da oli minerali (23,8%) e idrocarburi policiclici aromatici (10,9%) (EAA 2011).

Svariate sono le fonti da cui queste sostanze provengono: i metalli si possono riscontrare già in natura, presenti nel substrato pedogenetico (Tabella 1), o possono derivare da insediamenti civili e industriali (traffico automobilistico, forni di fusione, aree minerarie, impianti di combustione di petrolio, ecc) che causano poi fortissime emissioni soprattutto di Pb, Cd, Cr e Hg. Anche molti prodotti utilizzati in agricoltura come concimi, pesticidi, fanghi di depurazione portano direttamente al terreno una non trascurabile quantità di tali elementi (Tabella 2).

Nei decenni passati si è ritenuto che riversare sostanze tossiche nel terreno comportasse un rischio accettabile, in realtà il rilievo sanitario ed ambientale dell'inquinamento del suolo è tutt'altro che trascurabile e la presenza di metalli pesanti nei suoli agricoli è un problema molto grave: infatti, senza tener conto dei clamorosi fenomeni di fitotossicità che si possono verificare in condizioni di inquinamento molto elevato, la composizione chimica delle piante viene modificata anche senza che siano indotti danni visibili, e le piante allevate in terreni inquinati contengono quantità di metalli pesanti più elevate rispetto a piante coltivate in terreni non contaminati.

Tabella 1. Fonti naturali di metalli pesanti: la presenza di tali elementi si riscontra nel substrato pedogenetico. Intervalli di concentrazione più frequenti di alcuni metalli in rocce ignee e sedimentarie ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (Aspetti *et al.*, 2002).

<b>Elemento</b>	<b>Rocce basaltiche</b>	<b>Rocce granitiche</b>	<b>Scisti e argille</b>	<b>Scisti nere</b>	<b>Rocce calcaree</b>	<b>Arenaria</b>
As	0,2-10	0,2-13,8	-	-	0,1-8,1	0,9-6,7
Cd	0,006-0,6	0,003-0,18	0-11	0,3-8,4	(0,05)	(0,05)
Cr	400-600	2-90	30-590	26-1.000	(10)	(35)
Cu	30-160	4-30	18-120	20-200	(4)	(2)
Hg	0,002-0,5	0,005-0,04	0,005-0,51	0,03-2,8	0,01-0,22	0,001-3
Ni	45-410	2-20	20-250	10-500	(20)	(2)
Pb	2-28	6-30	16-50	7-150	(9)	<1-31
Zn	48-240	5-140	18-180	34-1.500	(20)	2-41

Tabella 2. Intervalli di concentrazione di alcuni elementi tossici in prodotti utilizzati in agricoltura ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ , Aspetti *et al.*, 2002).

Elemento	Concimi fosfatici	Concimi azotati	Fanghi di depurazione	Letame	Acqua di irrigazione	Pesticidi
As	<1-1.200	2-120	2-30	<1-25	<10	3-30
Cd	0,1-190	<0,1-9	2-3.000	<0,1-0,8	<0,05	
Cr	66-245	3,2-19	20-40.600	5,2-5,5		
Hg	0,01-2	0,3-3	<1-56	<0,01-0,2		0,6-6
Ni	7-38	7-34	16-5.300	7,8-30		
Pb	4-1.000	2-120	2-7.000	0,4-16	<20	11-26
Sb	<1-10		2-44	<0,01-0,5		
Sn	3-19	1,4-1,6	40-700	3,8		

Quella che si osserva nei suoli agrari è solitamente una contaminazione diffusa, che, sebbene non pericolosa nell'immediato, può risultare comunque molto grave perché interessa estesi territori e può coinvolgere la sicurezza alimentare.

Il contenuto totale di metalli nei suoli agrari è il risultato della somma degli input da sorgenti diverse e può essere riassunto dalla seguente equazione (Zaccheo e Crippa, 2004):

$$\text{Metalli totali} = \text{input} - \text{output}$$

$$\text{Metalli totali} = (Mr + Md + Mf + Mpc + Mi + Mro + Mia) - (Ma + Mv + Me + Ml)$$

dove: M = metalli; r = roccia madre; d = decomposizione atmosferica; f = fertilizzanti; pc = prodotti chimici utilizzati in agricoltura per vari scopi; i = acque irrigue; ro = rifiuti organici; ia = immissioni accidentali di varia origine; a = assimilazione nei raccolti; v = volatilizzazione; e = erosione; l = lisciviazione.

È anche possibile stimare il periodo di permanenza media (in anni) di ciascun elemento nel suolo dividendo il suo contenuto (moli ettaro<sup>-1</sup>) per la velocità delle perdite (moli anno<sup>-1</sup> ettaro<sup>-1</sup>). Ad esempio, per il cadmio si è constatato un periodo di residenza media nel suolo compreso tra 75 e 380 anni, per altri elementi molto più fortemente adsorbiti, quali As, Cu, Ni, Pb, Se e Zn, questo tempo raggiunge soglie comprese tra 1000 e 3000 anni.

Questo aspetto indica che un suolo sottoposto ad un flusso inquinante tende ad accumulare tali sostanze e che, una volta cessato il flusso inquinante, è necessario un tempo assai lungo affinché la concentrazione dell'elemento nel suolo ritorni ai valori iniziali.

### 1.1.2 Metalli pesanti: definizione e caratteristiche

Con il termine metalli pesanti (MP) generalmente sono definiti gli elementi caratterizzati da proprietà metalliche che sono spesso associati ad inquinamento e rischio di tossicità biologica per piante, animali e ambiente (Duffus, 2002).

Sono considerati metalli:

- elementi alcalini e alcalino-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).

Sebbene non esista una definizione universalmente accettata di metallo pesante basata sulle proprietà chimico-fisiche, tutti questi elementi appena elencati 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.

D'altra parte, le principali caratteristiche chimiche dei metalli pesanti, ossia il carattere cationico con diversi stati di ossidazione e l'elevata attitudine a formare complessi molecolari nel citoplasma cellulare, fanno includere anche elementi non strettamente metallici ma dotati di proprietà fisiche e chimiche intermedie a quelle di metalli veri e propri e non metalli, come il selenio e l'arsenico (semimetalli). Per questi motivi è stato talora proposto di abbandonare la classificazione in base alla densità o al peso atomico in favore di una nuova classificazione tripartita degli elementi chimici a seconda che esibiscano una prevalente affinità per gli atomi di ossigeno, per quelli di azoto e zolfo o, infine, un comportamento intermedio tra le due precedenti categorie.

I metalli pesanti, con l'eccezione di ferro e alluminio, pur essendo naturalmente

presenti nelle rocce, nel suolo, nelle piante e negli animali, 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.

In biologia e in medicina si definiscono *metalli in traccia* (o *elementi in traccia*) quegli elementi chimici presenti nei fluidi biologici degli organismi viventi in concentrazioni inferiori a  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  di peso. In base agli effetti fisiopatologici, i metalli in traccia possono essere suddivisi in due gruppi: nel primo gruppo si considerano gli elementi essenziali per la vita in quanto implicati in importanti processi metabolici, mentre nel secondo gruppo sono contenuti elementi tossici per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni. È importante sottolineare che anche i metalli essenziali possono risultare tossici oltre una certa concentrazione.

### **1.1.3 Effetti dei metalli pesanti sugli organismi**

Gli elementi che determinano più frequentemente fenomeni di inquinamento a causa dei loro molteplici impieghi industriali sono: cadmio, cobalto, cromo, rame, manganese, ferro, molibdeno, nichel, piombo, stagno e zinco (Adriano, 1986; Alloway, 1995). Negli organismi vegetali concentrazioni di tali elementi superiori a quella ritenuta “adeguata” risultano tossiche e provocano una serie di effetti che portano prima all'inibizione della crescita e talvolta alla morte della pianta stessa; infatti l'alterazione del processo di accrescimento è spesso la prima e più sensibile risposta della pianta a condizioni di stress e l'organo più colpito è la radice che si trova a diretto contatto con il terreno inquinato (Baker e Walker, 1989).

Ancora prima di provocare alterazioni evidenti dell'accrescimento, i metalli risultano tossici a livello cellulare. La formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) è uno dei primi effetti che questi elementi possono provocare direttamente o anche indirettamente, inibendo gli enzimi che la pianta utilizza per la difesa contro lo stress ossidativo (Halliwell e Gutteridge, 1984). I principali bersagli di queste molecole sono i componenti cellulari come gli acidi nucleici, le macromolecole proteiche e gli acidi grassi polinsaturi delle membrane cellulari.

Entrando nella catena alimentare attraverso le piante, tali elementi risultano dannosi anche per l'uomo. Gli effetti dei metalli sull'uomo sono molteplici: possono determinare

fenomeni irritativi, intossicazioni acute e croniche e possono avere azione mutagena o cancerogena. Anche gli organi o gli apparati colpiti sono molto diversi: si va dal sangue ai reni, al sistema nervoso centrale e periferico, al sistema respiratorio, all'apparato gastrointestinale, all'apparato cardiovascolare e alla cute. Il cadmio, ad esempio, la cui presenza nell'ambiente è dovuta principalmente all'uso di fertilizzanti chimici e al settore metallurgico, è ritenuto responsabile dell'insorgenza di disturbi gastrointestinali e dell'apparato riproduttivo, di forme di arteriosclerosi e di diverse forme tumorali. Tale elemento è biopersistente e, una volta assorbito dall'organismo, rimane in esso per molti anni (anche decine per gli uomini) prima di venire eliminato.

Il piombo è uno dei metalli che ha gli effetti più negativi sulla salute umana, non svolgendo alcuna funzione essenziale; deriva soprattutto da scarichi industriali e dalla combustione di carburanti come la benzina tradizionale contenente piombo tetraetile, vietata in UE dall'anno 2000, penetra nel corpo principalmente per ingestione e provoca effetti negativi sia sulle ossa, venendo incorporato in sostituzione del calcio, sia a livello di processi chimici dell'organismo umano, poiché è ritenuto inibitore della sintesi di numerosi enzimi. Inoltre, al piombo si fa risalire l'insorgenza di disturbi cerebrali e di forme più o meno gravi di depressione.

Alcuni metalli come cobalto, rame e zinco, seppur considerati inquinanti oltre certi limiti, se presenti negli alimenti esplicano funzioni essenziali per l'organismo umano. Il cobalto rientra nella struttura della vitamina B12 e come tale interviene nella sintesi degli acidi nucleici, in molti processi enzimatici e nel metabolismo del ferro, stimola l'attività di alcune ghiandole endocrine (tiroide, pancreas, surrenali) e la produzione di globuli rossi, accelerandone il processo di maturazione e allungandone la durata di vita. Una carenza di cobalto può essere responsabile di disturbi circolatori ed emicranie mentre una sovraesposizione può causare stress ossidativo con danni al DNA (Jomova e Valko, 2011).

Il rame è indispensabile nella formazione del sangue poiché fissa il ferro ai globuli rossi, contribuisce all'assorbimento della vitamina C, combatte le infezioni ed è un tonico generale, in quanto sopperisce alle carenze epatiche. La sua carenza provoca peggioramenti nei vari processi organici, dando luogo a stati di anemia. Un eccessivo assorbimento causa invece tossicità acuta a fegato, reni e milza, con  $DL_{50}$  di 110 e 400 mg  $kg^{-1}$  di peso corporeo per Cu rispettivamente in forma di ioni  $Cu^{2+}$  e nanoparticelle (Chen *et al.*, 2006), e tossicità cronica per la produzione di ROS (Tapiero *et al.*, 2003).



Lo zinco è un componente fondamentale di molti enzimi implicati nel metabolismo energetico, ha proprietà antiossidanti, partecipa alla crescita e al differenziamento cellulare. Tuttavia, fenomeni di tossicità acuta nei confronti di vari organi si riscontrano con dosi di 0,15-2 g per giorno, mentre 50-300 mg per giorno causano tossicità cronica (Nriagu, 2007).

#### 1.1.4 Soglie di rilascio nell'ambiente e negli alimenti

Molti paesi industrializzati si stanno ora concentrando sulle normative per ridurre l'impatto dell'inquinamento. Il registro europeo sulle emissioni di sostanze inquinanti (Regolamento 166 EC 2006) elenca le possibili attività inquinanti e pericolose e provvede a fornire le soglie massime di rilascio in aria, acqua e suolo per molte sostanze (Tabella 3). Per quanto riguarda i metalli, le massime quantità ammesse sono generalmente superiori nell'aria rispetto a suolo e acqua.

Tabella 3. Soglie di rilascio di metalli pesanti ( $\text{kg anno}^{-1}$ ) in diversi comparti, individuate dal Regolamento 166 EC 2006.

<b>Metallo</b>	<b>Aria</b>	<b>Acque</b>	<b>Suolo</b>
As	20	5	5
Cd	10	5	5
Cr	100	50	50
Cu	100	50	50
Hg	10	1	1
Ni	50	20	20
Pb	200	20	20
Zn	200	100	100

Dall'entrata in vigore del D.M. 471/1999 - *Regolamento recante i criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica ed il ripristino ambientale dei siti inquinati* e del successivo D. Lgs. 152/2006 - *Norme in materia ambientale*, anche l'Italia possiede un sistema normativo adeguato per affrontare il problema dell'inquinamento da metalli. Il D. Lgs. 152/2006 detta i limiti di concentrazione nel suolo per una rilevante serie di inquinanti, definiti per due destinazioni d'uso del territorio: residenziale/verde pubblico e privato, più restrittivo, e commerciale/industriale (Tabella 4). Non vengono considerati i suoli agrari in

quanto si presuppone la loro buona qualità; esso stabilisce inoltre la necessità di dover procedere alle operazioni di bonifica qualora tali limiti risultassero superati.

Tabella 4. Valori limite di concentrazione nel suolo e nel sottosuolo di alcuni inquinanti metallici in relazione alla destinazione d'uso dei siti ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.) (D. Lgs. 152/2006, Allegato 5).

<b>Metallo</b>	<b>Siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale</b>	<b>Siti ad uso industriale e commerciale</b>
As	20	50
Cd	2	15
Co	20	250
Hg	1	5
Ni	120	500
Pb	100	1.000
Cu	120	600
Zn	150	1.500

Il regolamento n. 1881/2006 della Commissione Europea stabilisce invece i tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti (Tabella 5).

Tabella 5. Tenori massimi di alcuni contaminanti metallici nei prodotti orto-frutticoli (Regolamento CE 1881/2006) e contenuto medio nelle piante agrarie. (P.F.: peso fresco)

<b>Metallo</b>	<b>Essenziale</b>	<b>Limite negli alimenti (<math>\text{mg kg}^{-1}</math> P.F.)</b>	<b>Contenuto medio nelle piante agrarie (<math>\text{mg kg}^{-1}</math> s.s.)</b>
As	no	-	0,1-5
Cd	no	0,05 <sup>(a)</sup> -0,20 <sup>(b)</sup>	0,2-0,8
Cr	no	-	0,2-1
Pb	no	0,10 <sup>(c)</sup> -0,30 <sup>(d)</sup>	0,1-10
Cu	si	-	4-15
Ni	si	-	1
Zn	si	-	15-20

<sup>(a)</sup>Ortaggi e frutta, esclusi ortaggi a foglia, erbe aromatiche, funghi, ortaggi a stelo, pinoli, ortaggi a radice e patate.

<sup>(b)</sup>Ortaggi a foglia, erbe aromatiche, funghi coltivati e sedano rapa.

<sup>(c)</sup>Ortaggi, esclusi quelli del genere *Brassica*, ortaggi a foglia, erbe aromatiche e funghi. Nel caso delle patate, il tenore massimo si applica alle patate sbucciate.

<sup>(d)</sup>Ortaggi del genere *Brassica*, ortaggi a foglia e funghi coltivati.

## **1.2 I metalli pesanti e le piante**

### **1.2.1 Ruolo biologico dei metalli nelle piante**

Secondo una delle definizioni comunemente più accettate un elemento è definito essenziale se una sua carenza non consente il completamento del ciclo vitale della pianta ed è indispensabile nei suoi processi di crescita, sviluppo o riproduzione (Barbafieri, 2005).

Gli elementi essenziali sono in genere classificati come macronutrienti o micronutrienti, a seconda delle loro concentrazioni relative nel tessuto vegetale. In realtà questa suddivisione non è sempre rigorosa poiché molti elementi possono essere presenti in concentrazioni superiori alle necessità della pianta ed inoltre nei tessuti vegetali si possono trovare elementi non essenziali a causa della non specificità di molti meccanismi di assorbimento.

Gli elementi essenziali possono essere classificati più precisamente a seconda del loro ruolo biochimico e della loro funzione fisiologica (Taiz e Zeiger, 1992), tra di essi ci sono anche alcuni metalli. Nella maggior parte dei casi il ruolo biologico che i metalli esplicano nella pianta è legato ad enzimi che permettono il trasporto di elettroni tramite cambiamenti di valenza oppure agiscono come cofattori (Taiz e Zeiger, 1992).

Ad esempio il rame è associato agli enzimi coinvolti nelle reazioni ossidoriduttive, come la fotosintesi. Una sua carenza si manifesta con la produzione di foglie verde scuro, che possono contenere delle macchie necrotiche. Le foglie possono anche apparire deformi e, in caso di carenza estrema, cadere prematuramente. Lo zinco è spesso usato come cofattore e può essere un importante componente strutturale di proteine che legano il DNA. Una sua carenza si manifesta con la riduzione dell'accrescimento internodale, col risultato che le piante presentano un accrescimento a rosetta. Le foglie possono anche risultare piccole e alterate, con margini fogliari di aspetto raggrinzito.

### **1.2.2 Fitotossicità dei metalli pesanti**

Così come la carenza di micronutrienti è dannosa, lo è anche il loro eccesso. Nella maggior parte dei casi la relazione tra la crescita della pianta e la concentrazione di nutrienti

segue l'andamento descritto in Figura 1.

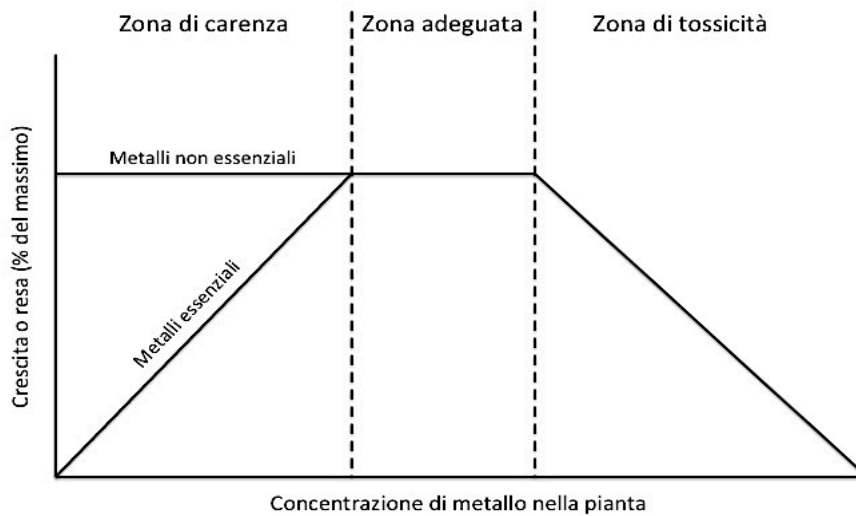


Figura 1. Effetti dei metalli essenziali e non essenziali sulla crescita della pianta (Baker e Walker, 1989).

A concentrazioni molto basse, nella zona di carenza, la crescita della pianta è inibita e si riscontra uno stimolo positivo alla crescita all'aumentare della concentrazione del nutriente. C'è un punto oltre il quale ad un aumento di concentrazione dell'elemento non consegue alcuno stimolo positivo alla crescita: in questa situazione la pianta si trova nelle condizioni ottimali, che comprendono un intervallo di concentrazione dell'elemento all'interno del quale la pianta è in grado di mantenere l'omeostasi. Una volta superato questo intervallo di concentrazioni, la crescita viene nuovamente inibita e ad un incremento di nutriente corrisponde una diminuzione della crescita della pianta. L'estensione e l'altezza dei tre intervalli variano a seconda dell'elemento considerato, della specie vegetale e in certi casi anche del genotipo all'interno di una stessa specie (Macnair, 1993).

Molti metalli pesanti come il piombo e il cadmio non rientrano nel gruppo dei micronutrienti e non esplicano nessuna funzione biologica, e la loro azione fitotossica è evidente già in piccole quantità (Liphadzi e Kirkham, 2005).

La tossicità dei metalli si deve alla loro capacità di interagire nei meccanismi biologici a livello cellulare e molecolare.

A livello molecolare possono legarsi ai gruppi sulfidrilici delle proteine e ai siti attivi degli enzimi che contengono ossigeno, zolfo o azoto in forma di gruppi -OH, -COO-, -SH, -NH<sub>2</sub> inibendo la loro attività biologica o modificandone la struttura (Baker e Proctor, 1990) o

portare alla formazione di radicali liberi causando stress ossidativo.

A livello cellulare possono sostituirsi agli elementi essenziali causando sintomi di deficienza.

L'effetto globale di questi meccanismi si manifesta in genere con un'alterazione delle funzioni della pianta come la fotosintesi, la respirazione, l'assorbimento di nutrienti minerali, o con alterazioni nella struttura della membrana e nell'espressione genica (Van Assche e Clijsters, 1990).

### **1.2.3 Biodisponibilità dei metalli**

Nel suolo i metalli sono distribuiti spesso in modo eterogeneo sia a scala di campo che a scala microscopica e si rinvencono sotto forme molto diverse che ne differenziano il comportamento in termini di biodisponibilità, di tossicità potenziale, di tendenza ad interagire con i costituenti organo-minerali, di mobilità lungo il profilo.

Nello stabilire l'ecotossicità per le specie vegetali non è dunque sufficiente conoscere la concentrazione totale dei metalli pesanti presenti nel suolo ma piuttosto è importante valutare la frazione che risulta biodisponibile e quindi assorbibile dagli organismi. La disponibilità dei metalli è determinata da diversi fattori biotici e abiotici (tabella 6). Il più importante è rappresentato dal grado di acidità del terreno, il *pH*. L'assorbimento della maggior parte dei metalli è favorito da pH acido e si riduce via via che il pH aumenta, eccezion fatta per alcuni importanti metalli dotati di pericolosità ambientale, quali cromo e arsenico, che si comportano in modo inverso. La biodisponibilità dei metalli varia anche a seconda della *tessitura* del terreno. In terreni di natura argillosa ad esempio la quantità di metalli biodisponibile è molto inferiore rispetto a terreni di natura sabbiosa. La *sostanza organica* gioca anch'essa un ruolo importante a causa dell'attitudine delle sostanze umiche a fungere da superfici adsorbenti e formare complessi con i metalli. Tuttavia la bioaccessibilità può variare a seconda che i complessi che si formano siano solubili o meno.

Nel terreno avvengono molte reazioni di ossidoriduzione che sono controllate dall'attività degli elettroni liberi in soluzione, espressa come *potenziale redox* (Eh), che rappresenta una misura della densità elettronica del suolo. Alti livelli di Eh sono tipici di terreni asciutti e ben aerati, viceversa i suoli ricchi di sostanza organica e quelli sommersi tendono ad avere livelli di Eh inferiori. Quest'ultima condizione può promuovere la

solubilizzazione, e una conseguente maggiore biodisponibilità dei metalli (Petruzzelli e Pedron, 2007).

Tabella 6. Caratteristiche fisico-chimiche del suolo che influenzano la biodisponibilità dei metalli pesanti nella rizosfera.

<b>Stimolanti</b>	<b>Limitanti</b>
Diminuzione del pH	Aumento del pH (e contenuto di Ca <sup>++</sup> )
Concentrazione delle soluzioni circolanti	Dilavamento del terreno
Processi di diffusione nelle soluzioni	Adsorbimento
Diminuzione del potenziale redox	Aumento del potenziale redox
Composizione minerale del suolo	

Parlando di biodisponibilità dei metalli, è più utile però soffermarsi sull'analisi della rizosfera piuttosto che del terreno più in generale.

Dal punto di vista spaziale, la rizosfera è definita come i pochi millimetri di suolo che circondano le radici della pianta e che sono influenzati dalla loro attività. Il confine tra la rizosfera e la rimanente grande massa del suolo (*bulk soil*) non è di facile individuazione in quanto numerosissimi fattori (tessitura e struttura del suolo, stato nutrizionale della pianta e proprietà del sistema radicale, microrganismi presenti, condizioni climatiche) influenzano il volume di suolo rizosferico.

Dal punto di vista funzionale, la rizosfera è considerata un microambiente estremamente dinamico, caratterizzato da processi di *feedback* tra l'attività radicale, caratteristiche pedologiche e la dinamica della popolazione microbica associata.

L'attività delle piante mediante l'essudazione radicale, l'assorbimento dei nutrienti e contaminanti e la crescita radicale può provocare:

- variazioni del pH rizosferico;
- trasformazione dei componenti minerali del rizosuolo;
- alterazione delle proprietà fisiche del suolo, migliorando la sua struttura e stabilità;
- rilascio di acidi organici e fitosiderofori (Shenker *et al.* 2001) che aumentano la biodisponibilità di metalli e nutrienti tramite la loro chelazione;
- fenomeni di precipitazione come conseguenza a variazioni di pH, del potenziale redox e del bilancio ionico della rizosfera;
- interazioni con i microrganismi (batteri e funghi micorrizici), fondamentali per la

biodisponibilità dei micronutrienti;

- volatilizzazione di alcuni metalli e metalloidi, come conseguenza della riduzione a forme elementari volatili e alla sintesi di composti metilati.

Tra questi, l'effetto delle radici sul pH del suolo rizosferico è considerato l'aspetto più influente sulla biodisponibilità dei metalli nel suolo (Ross, 1994; Kashem e Singh, 2002). Infatti, il pH della rizosfera può essere molto diverso da quello del *bulk soil*, questo è dovuto al diverso assorbimento di anioni e cationi da parte delle radici e tale differenza di reazione provoca fenomeni di adsorbimento o desorbimento, precipitazione o solubilizzazione dei metalli pesanti (Gobran *et al.*, 2001).

#### 1.2.4 Assorbimento radicale

L'apparato radicale rappresenta il primo organo della pianta a entrare in contatto con gli inquinanti del suolo e quindi svolge un ruolo fondamentale nell'estrazione degli stessi. Il meccanismo di accumulo dei metalli nelle piante può essere suddiviso in tre fasi essenziali: assorbimento a livello radicale, trasporto dei metalli all'interno della pianta, attivazione dei meccanismi di detossificazione (Salt *et al.*, 1995). La maggior parte dei metalli nel suolo è legata ai suoi costituenti per cui, affinché le piante possano accumularli, è necessario che questi elementi vengano resi solubili. Le radici giocano un ruolo fondamentale nella mobilizzazione dei metalli legati alle particelle del suolo (tabella 7): molte piante rilasciano fitosiderofori, quali l'acido avenico delle graminacee e altre molecole, e.g., acido citrico e malico, in grado di chelare e mantenere in soluzione i metalli (López-Millán *et al.*, 2009). Altre specie sono in grado di ridurre e conseguentemente mobilizzare gli ioni metallici grazie all'intervento di specifici riducenti legati alla membrana plasmatica delle cellule radicali.

Tabella 7. Influenza della radice sull'assorbimento dei metalli pesanti nella rizosfera.

<b>Stimolanti</b>	<b>Limitanti</b>
Acidificazione del suolo	Selettività delle membrane biologiche
Attività dei traslocatori	Danneggiamento delle membrane radicali
Rilascio di riduttori	Rilascio di ossidanti
Escrezione di molecole chelanti	Strategie per evitare l'ingresso di metalli

Il passaggio di nutrienti dal suolo all'interno della radice è regolato dalle leggi del trasporto, e può essere attivo o passivo. Il trasporto passivo, che non richiede consumo di energia, avviene in base al gradiente chimico o elettrochimico attraverso diffusione semplice del soluto attraverso la membrana cellulare, la diffusione attraverso particolari canali della membrana o grazie alla diffusione facilitata da specifiche proteine trasportatrici (carriers).

Il trasporto attivo che invece avviene contro gradiente chimico o elettrochimico è attuato esclusivamente attraverso specifiche proteine carriers e per questo richiede impiego di energia.

L'assorbimento e il trasporto dei metalli dipende quindi sia dalla specie vegetale che dal metallo. Dato che il metallo non è in grado di attraversare la membrana dell'endoderma, l'assorbimento può avvenire solo tramite radici giovani che non hanno ancora differenziato questo tessuto. Una volta raggiunto lo xilema, i metalli vengono traslocati alla parte aerea della pianta per via apoplastica o simplastica (Marschneer, 1995).

### **1.2.5 Le piante in terreni inquinati da metalli pesanti**

Diversi autori hanno rivelato l'esistenza di specifiche comunità vegetali endemiche che si sono sviluppate in terreni contaminati da metalli pesanti, alcune delle quali manifestando la capacità di assorbire elevati livelli dei metalli stessi (Baker e Brooks, 1989; Salt *et al.*, 1995; Cunningham e Ow, 1996; Raskin, *et al.*, 1997).

Svariati però, sono i meccanismi adottati dalle piante per adattarsi a substrati inquinati (Rauser, 1999; Cobbet, 2000; Clemens, 2001). La capacità di adattamento a condizioni sfavorevoli è correlata alle strategie di difesa che impediscono ai metalli pesanti di raggiungere concentrazioni tossiche a livello cellulare (Gabbrielli e Galardi, 2004). Le piante possono essere classificate in due grandi gruppi: metallofite e pseudometallofite. Queste ultime presentano una metallo-resistenza limitata, non indotta, che consente loro di sopravvivere in terreni inquinati; generalmente il meccanismo di difesa è aspecifico e utilizza la parete cellulare come barriera all'ingresso dei metalli. Le vere metallofite invece, sono piante che hanno evoluto meccanismi biologici, in seguito a una pressione selettiva, che consentono loro di colonizzare terreni inquinati da metalli pesanti; tali piante rappresentano spesso endemismi tipici del sito in cui si sono modificate. Le strategie di adattamento sono diverse tanto da poter suddividere le piante metallofite in tre gruppi (Baker, 1981):



- escluditrici: il livello di contenuto epigeo dell'inquinante è mantenuto basso tramite limitazione dell'assorbimento e della traslocazione dalle radici alle foglie;
- indicatrici: la concentrazione dell'inquinante nelle parti aeree della pianta corrisponde a quella del suolo;
- accumulatrici: i metalli vengono attivamente accumulati all'interno dei tessuti della pianta in concentrazioni superiori a quelle del substrato, indicando un'alta specializzazione fisiologica.

Tra le accumulatrici vanno poi distinte le *iperaccumulatrici* che riescono ad accumulare nella parte aerea concentrazioni di metallo superiori al 2% del peso secco della pianta (Gabbrielli e Galardi, 2004). Brooks *et al.*, (1998) indicava quale limite dell'iperaccumulazione l'1% per Mn e Zn, e 0,1% per Co, Cu, Cr, Pb, Ni.

### **1.2.6 Meccanismi di tolleranza e detossificazione**

Sebbene i micronutrienti come Zn, Mn, Ni e Cu siano essenziali per la crescita e lo sviluppo delle piante, un'alta concentrazione intracellulare di questi ioni può essere tossica. Per sopravvivere a questo potenziale stress, le piante non accumulatrici hanno sviluppato vari meccanismi per controllare l'omeostasi degli ioni all'interno delle cellule. Queste tecniche includono la regolazione dell'afflusso di ioni (stimolazione dell'attività dei trasportatori a basse concentrazioni di ioni intracellulari ed inibizione ad alte concentrazioni) ed espulsione degli ioni intracellulari nella soluzione esterna (Krämer *et al.*, 1997).

Le specie iperaccumulatrici di metalli, invece, capaci di assorbire i metalli in quantità dell'ordine di migliaia di ppm, possiedono diversi meccanismi di detossificazione: alcune specie, in presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti incrementano la produzione di metallotioneine e fitochelatine, altre incrementano la produzione di acidi organici o di aminoacidi, altra strategia adottata è quella della compartimentalizzazione. Le prime tre vie si basano sull'attivazione di specifiche vie biosintetiche per produrre molecole in grado di legare e/o complessare i metalli pesanti, la compartimentalizzazione consiste invece nella capacità di accumulare i metalli in compartimenti cellulari, come vacuolo e parete cellulare, in modo da limitarne gli effetti tossici (Gabbrielli e Galardi, 2004).

La produzione di molecole peptidiche, quali fitochelatine e metallotioneine, deriva

dall'attivazione di una specifica via biosintetica e non dall'attivazione di geni coinvolti nella risposta allo stress e garantisce la capacità di legare il metallo e sequestrarlo formando un complesso stabile. Le metallotioneine sono proteine a basso peso molecolare ricche in cisteina, la cui biosintesi viene regolata da fattori ormonali e dalla presenza di metalli come Cd, Zn, Hg, Cu, Au (Gabbrielli e Galardi, 2004). Le fitochelatine sono una famiglia di piccoli peptidi la cui produzione è stimolata dalla presenza di metalli (Cd, Hg, Ag, Au, Pb, Zn, As), caratterizzate da struttura ripetuta (acido glutammico, cisteina, glicina), che si originano per polimerizzazione del glutatione. Le fitochelatine agiscono chelando gli ioni metallici liberi per trasportarli nel vacuolo (Gabbrielli e Galardi, 2004). Il Cd, ad esempio, viene accumulato nella pianta, dove viene reso inattivo attraverso il legame con le fitochelatine (Wagner, 1984; Steffens, 1990).

Gli acidi organici sono coinvolti nel trasporto di ioni metallici: lo Zn sembra venire legato all'acido malico e trasferito nel vacuolo, mentre il Ni interessa l'acido citrico (Lee *et al.*, 1978). Per quanto riguarda gli aminoacidi, l'istidina, ad esempio, si lega ad una parte del Ni presente nella pianta in *Alyssum lesbiacum* (Candargy) (Gabbrielli e Galardi, 2004) e in *Thlaspi goesingense* (Halácsy) (Krämer *et al.*, 1997).

La compartimentalizzazione è la capacità della pianta di allocare i metalli in compartimenti o organi specifici, (vacuolo e parete cellulare). Nel vacuolo vengono raccolte le sostanze tossiche mentre la parete cellulare lega i metalli e compete con il processo di assorbimento radicale limitando la loro presenza all'interno delle cellule (Gabbrielli e Galardi, 2004).

Questa capacità di assorbire e legare o allocare in comparti specifici della pianta i metalli pesanti, consente a talune specie, iperaccumulatrici, di assorbire concentrazioni di metalli pesanti particolarmente rilevanti tra 100 e 10.000 mg kg<sup>-1</sup> di peso secco, in relazione all'elemento considerato (Baker e Brooks, 1989) (Tabella 8).

Il motivo per cui alcune piante hanno sviluppato questa capacità di iperaccumulare metalli pesanti non è ancora chiaro, anche se, secondo Martens e Boyd (1994), tra i meccanismi alla base di tale capacità potrebbero esserci:

- capacità di resistenza alla carenza di altri elementi;
- vantaggio competitivo nei riguardi di altre specie poco resistenti;
- assimilazione involontaria di elementi affini ad altri nutrienti;
- meccanismo di difesa contro erbivori e patogeni.

Tabella 8. Intervallo di concentrazione di metalli pesanti riscontrato nei tessuti vegetali e limite inferiore per le specie iperaccumulatrici ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (Baker e Brooks, 1989).

<b>Metallo</b>	<b>Range di normalità</b>	<b>Limite inferiore per le iperaccumulatrici</b>
Cd	0,03-20	100
Co	0,05-50	1.000
Mn	5-2.000	10.000
Ni	0,2-100	1.000
Cu	1-100	1.000
Se	0,01-10	100
Tl	0-0,1	1.000
Zn	5-2.000	10.000

### 1.2.7 Efficienza del processo di accumulazione

Nel processo di accumulo dei metalli, un ruolo importante è svolto dal metabolismo vegetale e dai contaminanti del suolo. Si può affermare che l'efficienza della fitoestrazione dei metalli pesanti da un suolo contaminato è determinata da tre fattori (Zerbi e Marchiol, 2004):

- biomassa prodotta dalla pianta;
- fattore di bioaccumulazione:  $B_f = [\text{Me}] \text{ pianta} / [\text{Me}] \text{ suolo}$ ;
- volume di suolo esplorato dalle radici.

Nei programmi di bonifica è importante riuscire a prevedere il numero di cicli colturali necessari, per stimare a priori la tempistica e verificare la possibilità di utilizzare altre tecniche. Si ritiene che la percentuale rimossa per ciascun ciclo colturale sia pari al rapporto tra la concentrazione dell'inquinante nella pianta moltiplicata per la biomassa prodotta dalla stessa (asportazione) e la concentrazione del metallo nel suolo per la massa di suolo esplorato:

$$\% \text{ rimozione} = ([\text{Me}] \text{ pianta} \times \text{biomassa} / [\text{Me}] \text{ suolo} \times \text{massa terreno rizosferico}) \times 100$$

Le piante modello da utilizzare nei processi di fitoestrazione dovrebbero avere quindi le seguenti caratteristiche: tolleranza ad alte concentrazioni dell'inquinante, capacità di sviluppare in tempi brevi una biomassa elevata e di assorbire e traslocare nell'apparato epigeo

elevate quantità di inquinanti, facilità di gestione colturale, proprietà genetiche stabili, interesse economico per la biomassa.

### **1.3 Tecniche di bonifica dei suoli inquinati**

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 devono 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.

Lo sviluppo delle tecniche di bonifica da applicare al disinquinamento ha avuto un grande impulso negli ultimi 30 anni; in questo lasso di tempo oltre alla messa a punto di specifici protocolli di intervento si è anche creato un mercato che oggi muove interessi diversi.

Secondo il Decreto Ministeriale n. 471/99 per bonifica s'intende: *“l'insieme degli interventi atti ad eliminare le fonti di inquinamento e le sostanze inquinanti o a ridurre le concentrazioni delle sostanze inquinanti presenti nel suolo, nel sottosuolo, nelle acque superficiali o nelle acque sotterranee ad un livello uguale o inferiore ai valori di concentrazione limite accettabili stabiliti dal presente regolamento”*. Altra definizione è quella proposta da USEPA (*United State Environmental Protection Agency*), secondo la quale le tecnologie di bonifica sono quei *“processi chimici, biologici o fisici applicati a matrici contaminate per cambiare le loro condizioni in modo permanente”* (1996). Allo stato attuale le tecniche che permettono di eliminare gli inquinanti dalle diverse matrici contaminate sono numerose, soprattutto in virtù del forte sviluppo registrato negli ultimi decenni (Zerbi e Marchiol, 2004).

L'opera di bonifica diventa strumentale non più esclusivamente alla tutela del territorio e della salute umana, ma assurge al ruolo di vettore dello sviluppo socio-economico, favorendo la trasformazione di intere aree, talvolta inserite nel tessuto urbano, da zone improduttive a zone di riqualificazione ambientale, urbana ed economica (Cao *et al.*, 2002).

Le tecnologie di bonifica possono agire sul contaminante secondo tre principi fondamentali (Zerbi e Marchiol, 2004), trasformazione: consiste nell'attacco di composti

organici che passano da sostanze a struttura complessa ad intermedi più semplici, fino, eventualmente, alla completa mineralizzazione; rimozione: è il caso tipico dei metalli pesanti, già in forma elementare, non possono essere ulteriormente degradati ma solamente asportati dalla matrice contaminata; immobilizzazione o contenimento: tecniche basate su questo principio si applicano quando non è possibile ricorrere alle altre alternative ed è necessario isolare il sito contaminato per evitare la contaminazione di aree adiacenti.

I trattamenti di bonifica possono essere classificati in base al luogo in cui avviene la bonifica o in base alla natura del processo applicato (Zerbi e Marchiol, 2004).

1. in base al luogo in cui avviene la bonifica, si distinguono interventi:

- *ex situ*, che prevedono l'escavazione del terreno e il suo trattamento in impianti installati in loco (on site), o in impianti dislocati al di fuori dell'area (off site);
- *in situ*, quando il trattamento del suolo contaminato avviene direttamente sul posto, senza la necessità di escavazioni;

2. in base alla natura del processo applicato:

- trattamenti chimico-fisici attraverso i quali i contaminanti sono rimossi dal suolo mediante l'utilizzo di agenti estrattivi (lavaggi, ventilazioni o estrazioni con solvente) oppure resi meno pericolosi mediante reazioni redox o, ancora, la mobilità dei contaminanti viene ridotta mediante il confinamento in una matrice solida. Tali trattamenti sono in genere quelli che presentano la maggiore efficienza di rimozione dei contaminanti e tempi di bonifica relativamente brevi, tuttavia sono anche i più costosi e in generale determinano una modifica delle caratteristiche originali del suolo (Cao *et al.*, 2002);
- trattamenti termici, consistono in interventi di termodistruzione (incenerimento) e di desorbimento termico. Nel primo caso vi è una totale distruzione termica delle molecole delle sostanze contaminanti e viene usato di norma per contaminazioni da composti organici; nel secondo caso si tratta di provocare la vaporizzazione del contaminante allo scopo di separarlo dalla fase solida del suolo e quindi di condensarlo. Questi trattamenti garantiscano rendimenti di rimozione molto elevati, ma sono molto costosi sia economicamente che dal punto di vista ambientale (poiché portano alla completa sterilizzazione del suolo) (Cao *et al.*, 2002);
- trattamenti biologici, si distinguono in trattamenti basati sulla capacità dei batteri e funghi di degradare composti organici e molecole di diversa natura, e trattamenti

basati sull'attività estrattiva/degradativa di piante superiori. Questi metodi sono generalmente molto lenti e presentano efficienze di rimozione più basse rispetto ai trattamenti chimici e fisici ma sono molto meno costosi e il loro impatto ambientale è modesto (Cao *et al.*, 2002).

Data la natura e la complessità dei processi di bonifica diventa fondamentale operare una scelta oculata, in base ai risultati che si vogliono raggiungere, ai tempi, ai costi e soprattutto alla tipologia di inquinamento: non è raro riscontrare siti multicontaminati (contaminati da diversi inquinanti o da elementi diversi).

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per gli interventi di bonifica biologici, sia per il minor impatto ambientale, ma anche grazie ai costi vantaggiosi rispetto ai metodi tradizionali.

Diversamente dai contaminanti di natura organica, i metalli non possono venire eliminati dall'ambiente per mezzo di trasformazioni chimiche o biologiche (Cunningham e Ow, 1996), sebbene si possa ridurre la tossicità modificandone la speciazione. I metalli, non possono essere degradati e pertanto persistono nell'ambiente (Wade *et al.*, 1993; Prasad e Freitas, 2003) a meno di una rimozione ed asportazione dalla matrice inquinata. Nel caso in cui non sia possibile intervenire per la rimozione dei metalli, si attua la tecnica del "contenimento", al fine di evitare contaminazioni dell'ambiente circostante (USEPA, 1994). L'intervento più comune consiste nel coprire il sito inquinato con cemento, bentonite o con membrane polimeriche così da ridurre la permeabilità ed evitare la lisciviazione degli inquinanti verso la falda (USEPA, 1994). In alternativa, si può rimuovere il suolo inquinato e trasportarlo in discariche appositamente destinate.

### **1.3.1 *Phytoremediation***

L'impiego della chimica comporta spesso un grosso svantaggio rappresentato dai costi molto elevati e da un impatto ambientale non trascurabile.

Per questo oltre alle tecniche di bonifica per mezzo di trattamenti chimico-fisici esistono, e si stanno sempre più diffondendo, i trattamenti definiti "biologici". Tra questi si distinguono i trattamenti che si basano sull'attività metabolica di microrganismi (*bioremediation*), da quelli che sfruttano le capacità di varie specie vegetali di degradare,

estrarre o immobilizzare i contaminanti presenti nei suoli o nelle acque (*phytoremediation*).

Il termine anglosassone *phytoremediation* (in italiano “fitorimediazione” o “fitodecontaminazione” o “fitorisanamento”) deriva dall’associazione del termine greco *phytos* (pianta) e dal suffisso latino *remedium* (curare, risanare) (Raskin *et al.*, 1997) ed 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.*, 1997).

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, 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 *et al.*, 1995).

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

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 avvengono 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 CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (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, 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).

Come appena accennato definendo i processi *in planta* ed *ex planta*, esistono varie modalità di fitorisanamento che variano a seconda del substrato da risanare, dall'origine dell'inquinante e dal tipo di azione operata dalla vegetazione sulle matrici contaminate (Salt *et al.*, 1998, Dietz e Schnoor, 2001) (figura 2):

- 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 CO<sub>2</sub> e la liberazione di O<sub>2</sub> 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);
- 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);
- fitostabilizzazione: consiste nella riduzione della biodisponibilità degli inquinanti per azione chimico-fisico-meccanica dell'apparato radicale. Evita la dispersione di inquinanti mediante l'estruzione radicale di composti chimici in grado di immobilizzare gli inquinanti nell'interfaccia radice-suolo. Questa tecnologia è indicata soprattutto per suoli moderatamente inquinati (Vangronsveld *et al.*, 1995; Rocco e Pin 2000);
  - 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. 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. Sono noti casi di fitovolatilizzazione di composti organici e del selenio;
  - fitodegradazione: consiste nella degradazione dei contaminanti organici mediante l'uso di piante e dei microrganismi ad esse associate. Le piante agiscono assimilando e trasformando, attraverso le vie metaboliche, gli inquinanti in prodotti intermedi o, al limite, in anidride carbonica ed acqua (Burken e Schnoor, 1997);
  - 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).

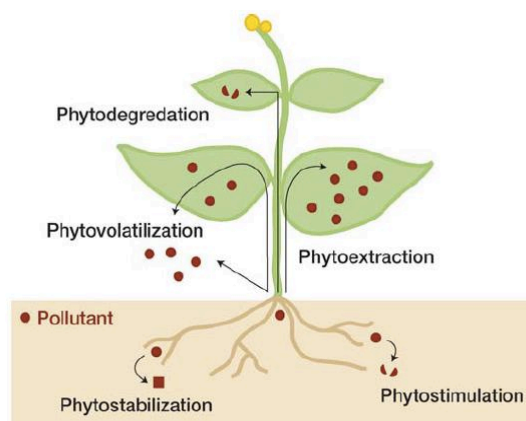


Figura 2. Rappresentazione schematica delle principali modalità di fitorisanamento.

Per l'inquinamento da metalli le tecniche di fitorisanamento più utilizzate sono la fitoestrazione e la fitostabilizzazione.

La fitoestrazione 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, anche se presenta diversi limiti. 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, o *bioavailable contaminant stripping*, 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);
- fitoestrazione assistita con chelanti o indotta, in cui l'impiego di molecole 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.

La fitostabilizzazione *in planta* dipende dall'abilità della pianta di limitare la mobilità e la biodisponibilità dei metalli nel suolo, immagazzinandoli nell'apparato radicale. Le piante utilizzate in questa tecnica devono avere una buona capacità di assorbire e immobilizzare i contaminanti a livello radicale, un lento e ridotto rinnovo dei tessuti radicali nei quali viene accumulato il contaminante e la capacità di produrre essudati radicali in grado di ridurre la mobilità e la biodisponibilità del contaminante nel terreno (Salt *et al.*, 1995).

I metalli, specialmente quelli che hanno una bassa traslocazione all'apparato epigeo come Pb e Cu, possono essere sequestrati all'interno delle radici (Marmioli *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2006) mentre gli essudati radicali, a seconda del metallo, possono limitarne la mobilità causandone la precipitazione (Marmioli *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005) o favorirne l'assorbimento da parte della pianta (Nigam *et al.*, 2001). Lo scopo della fitostabilizzazione non è quindi quello di rimuovere i contaminanti dal suolo ma di ridurre i rischi per la salute umana e per l'ambiente. Bisogna ricordare però che il sequestro dei metalli non è comunque definitivo e gli inquinanti ritornano nell'ambiente dopo la degradazione dei tessuti radicali (Arienzo *et al.*, 2004).

### 1.3.2 Specie impiegabili nel fitorisanamento dei suoli

Allo scopo di fitorisanare i terreni inquinati, numerose specie sono state oggetto di studio nel corso degli anni. Come già detto, le cosiddette piante iperaccumulatrici possono concentrare nei loro tessuti quantità elevatissime di metalli, sviluppando per contro una modesta biomassa (Baker e Brooks, 1989). Vengono definite iperaccumulatrici quelle specie nelle quali le concentrazioni di metalli nella parte aerea oscillano, in funzione del metallo considerato, tra 100 e 10.000 mg kg<sup>-1</sup>. Per queste piante, Baker e Brooks (1989) indicano come valori di iperaccumulazione 100 mg kg<sup>-1</sup> per Cd, 1.000 mg kg<sup>-1</sup> per Ni, Cu, Co, Cr e Pb e 10.000 mg kg<sup>-1</sup> per Zn e Mn. Attualmente si conoscono più di 400 specie iperaccumulatrici, appartenenti a 45 differenti famiglie botaniche (Salt *et al.*, 1998), tra le quali la più rappresentate sono quelle delle *Brassicaceae*, con i generi *Thlaspi*, *Alyssum*, e *Brassica*, e la famiglia *Fabaceae* (Baker *et al.*, 2000) (Tabella 9).

Tabella 9. Principali famiglie di specie iperaccumulatrici in relazione allo specifico metallo assorbito (Baker *et al.*, 2000).

<b>Metallo</b>	<b>Numero di specie</b>	<b>Famiglia di appartenenza</b>
Cd	1	<i>Brassicaceae</i>
Co	26	<i>Lamiaceae, Scrophulariaceae</i>
Mn	11	<i>Apocynaceae, Cunomiaceae, Proteaceae</i>
Ni	290	<i>Brassicaceae, Cunomiaceae, Violaceae</i>
Cu	24	<i>Cyperaceae, Lamiaceae, Poaceae, Scrophulariaceae</i>
Se	19	<i>Fabaceae</i>
Tl	1	<i>Brassicaceae</i>
Zn	16	<i>Brassicaceae, Violaceae</i>

Gli studi si sono orientati anche sulle cosiddette “piante da biomassa”. Diverse specie di interesse agrario, pur non essendo iperaccumulatrici, concentrano discrete quantità di metalli nei loro tessuti fornendo allo stesso tempo un alta resa in sostanza secca. In questo gruppo di piante è importante la famiglia delle *Brassicaceae*, tra cui la già citata *Brassica juncea* (L.) Czern. e *Raphanus sativus* L. (Mosca *et al.*, 2004), che da studi recenti hanno evidenziato un buono sviluppo e una buona tolleranza anche in condizioni di elevato inquinamento; dallo stesso studio si è dimostrato interessante anche l’impiego di *Helianthus annuus* L. per il buon accumulo di metalli pesanti. Anche colza, tabacco, lino, menta, cotone, mais e senape indiana possono accumulare apprezzabili quantità di metalli pesanti nei loro tessuti, fornendo anche una considerevole resa in sostanza secca (Navari-Izzo *et al.*, 2004).

Il vantaggio di queste specie, sta nell'elevata produzione di biomassa, tale da garantire un'efficace gestione agronomica ed una facile raccolta (asportazione) della parte aerea e con essa dei contaminanti presenti nel suolo.

Anche altre specie sia arboree che erbacee, interessate al fenomeno dell'accumulazione di metalli pesanti, sono attualmente oggetto di studio e sperimentazioni. Tra le specie arboree la ricerca è orientata verso l'utilizzo di salice (Greger e Landberg, 1999; Pulford e Watson, 2003; Kuzovkina *et al.*, 2004) e pioppo (Laureysens *et al.*, 2005), mentre tra le erbacee, oltre alle *Brassicaceae* e al girasole, la ricerca si è orientata anche verso altre specie di interesse agrario tra cui loiessa (*Lolium multiflorum* L.) (Rizzi *et al.*, 2004), orzo (*Hordeum vulgare* L.) (Calace *et al.*, 2004; Molas e Baran, 2004) ed erba medica (*Medicago sativa* L.) (Hernandez-Pinero *et al.*, 2002; Peralta-Videa *et al.*, 2002).

### **1.3.3 Alcune problematiche e prospettive**

L'utilizzo di piante iperaccumulatrici nella rimozione dei metalli da suoli inquinati rappresenta un metodo sicuramente valido e molto spesso conveniente rispetto a trattamenti di tipo chimico o fisico, tuttavia non mancano alcuni punti interrogativi critici. La capacità di assorbimento di metalli pesanti delle piante iperaccumulatrici è maggiore rispetto a molte altre piante da biomassa, ma confrontata con la quantità di materiale inquinante potenzialmente presente nel terreno, questa risulta insoddisfacente. Esistono anche problemi legati alla diffusione delle piante iperaccumulatrici, che hanno spesso scarsa produzione di biomassa, sono spontanee ed endemiche e le loro sementi di difficile reperibilità, con la conseguenza che i costi per un loro impiego lieviterebbero enormemente. Inoltre, la fitodecontaminazione richiede tempi piuttosto lunghi. L'impiego di alcune specie iperaccumulatrici, ad esempio le *Brassicaceae* deve essere valutato con attenzione: queste generalmente non sopportano la monosuccessione per motivi di ordine fitosanitario e devono pertanto essere inserite nell'ambito di rotazioni agrarie equilibrate che prevedano la coltivazione di altre specie appartenenti anche a famiglie botaniche diverse, in grado però di proseguire il processo di fitoestrazione. Il fitorisanamento di siti pluricontaminati è infine reso più difficile dalla mancanza di specie iperaccumulatrici di più metalli.

Nei programmi di miglioramento genetico sarebbe necessario selezionare piante con un più alto potenziale per la biomassa, oltre che genotipi che possono accumulare più metalli

contemporaneamente in grande quantità. Questa combinazione rende a tutt'oggi possibile solo un compromesso tra alto accumulo e bassa resa (o viceversa).

Ancora in fase di studio è il riutilizzo delle biomasse provenienti dal processo di fitoestrazione, dal momento che coinvolge numerose competenze tecnico-scientifiche. Al fine di recuperare e quindi di ricavare un beneficio economico dalla biomassa fitoestrattiva, uno degli utilizzi proposti è quello dell'impiego a scopo energetico di tali biomasse, mediante incenerimento. Le ceneri prodotte, ricche in metalli, possono essere destinate a processi fitoestrattivi (tra cui il recupero del metallo stesso qualora risultasse economicamente conveniente), o incorporate in conglomerati cementizi, in materiali non soggetti a degradazione o ancora, destinate alla discarica, con il vantaggio di un ridotto volume rispetto alla biomassa tal quale (Kumar *et al.*, 1995; Mosca *et al.*, 2004). Interessante risulta anche il possibile ritorno economico derivato, se la specie scelta lo consente, dall'utilizzo di frutti, semi e oli per produzioni *no food* (amido per la produzione di carta, colle, plastiche; olio per la produzione di biodiesel o oli industriali), grazie al fatto che spesso i metalli non vengono traslocati agli organi riproduttivi (Mosca *et al.*, 2004).

## 1.4 Biofortificazione

Gran parte della popolazione mondiale non ha accesso ad una alimentazione costituita da cibi freschi e deve fare affidamento su una dieta basata su poche colture cerealicole (i.e., frumento, riso, mais) che sono però carenti di alcuni amminoacidi e nutrienti essenziali, come calcio, cromo ferro, zinco, rame e manganese. La *biofortificazione* rappresenta la pratica di far assimilare i nutrienti di cui queste specie sono carenti direttamente in campo e può rappresentare un modo sostenibile di migliorare la qualità alimentare per alleviare a livello mondiale la malnutrizione e creare nuovi prodotti ad alto valore aggiunto. Tra le alternative possibili infatti, la diversificazione della dieta sembra spesso impraticabile, dal momento che implicherebbe una modifica delle abitudini alimentari (Zhu *et al.*, 2007), mentre l'arricchimento artificiale in nutrienti delle materie prime (fortificazione) e l'assunzione di integratori possono risultare inefficaci a causa delle interazioni tra i micronutrienti che porterebbe ad una riduzione di biodisponibilità e di assorbimento a livello intestinale (Sandström, 2001). Non è un caso infatti che, secondo gli standard proposti dalla Banca Mondiale e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, la biofortificazione sia considerata

uno strumento economicamente valido ed efficiente per completare il già esistente pool di strategie utili al controllo della malnutrizione umana.

Il miglioramento in campo della qualità delle colture è stato perseguito sia attraverso l'ingegneria genetica che tramite l'adeguamento e l'ottimizzazione delle pratiche agronomiche. Un esempio è quello dell'ormai conosciuto "*Golden rice*", varietà di riso geneticamente modificata per presentare un contenuto aumentato di  $\beta$ -carotene nelle cariossidi (Ye *et al.*, 2000) e molte altre colture sono state oggetto di sperimentazione negli ultimi anni per accumulare un surplus di vitamine e minerali (White e Broadley, 2009). Questo si traduce in diversi effetti benefici per la salute umana, come l'incremento di più del 40% dell'assorbimento di calcio in seguito al consumo di carote geneticamente modificate in grado di accumulare nel fittone quantità doppie di questo elemento rispetto alle tradizionali varietà (Morris *et al.*, 2008).

Lo studio della biofortificazione attraverso le pratiche agronomiche è ancora agli inizi. Ad oggi, è stato registrato un brevetto per la patata arricchita in selenio, mentre sono ancora poco studiati gli effetti della concimazione minerale con fertilizzanti a base di ioni metallici quali, ad esempio, ferro e zinco (alcuni studi sono ad esempio riportati da Cakmak *et al.*, 2010 e Aciksoz *et al.*, 2011).

La scelta della via agronomica per l'ottenimento di prodotti arricchiti in nutrienti minerali è comunque di non facile applicazione, dal momento che per questi elementi la linea di confine tra nutrizione e fitotossicità è molto labile e può dipendere dalle condizioni del suolo e del clima e dalla scelta della specie e del genotipo. Un eccesso di elementi minerali può infatti causare crescita stentata e perdite di produttività, con conseguenti rischi ambientali per l'accumulo di metalli nel terreno.

Anche l'allocazione e la forma fisica degli elementi nella pianta giocano un ruolo importante nella loro biodisponibilità per l'organismo umano. I metalli forniti tramite concimazione possono infatti essere accumulati negli organi non edibili o subire processi di aggregazione formando nanoparticelle metalliche e altri composti non assimilabili dall'uomo (Rico *et al.*, 2011).

## 1.5 Piante alimurgiche

L'uso alimentare delle piante spontanee è stato definito fitoalimurgia (dal greco *phytón*, pianta e dal latino *alimenta urgentia*, alimentazione in caso di necessità, urgenza alimentare).

L'utilizzo di queste erbe a scopo alimentare è stato fondamentale nei secoli passati per le popolazioni rurali che hanno permesso loro di sfamarsi in periodi di carestia e povertà, usanza che negli ultimi cinquant'anni grazie alle migliori condizioni di vita sta andando quasi ovunque scomparendo. Tuttavia, ci sono ancora zone anche in Veneto, come ad esempio nell'altopiano di Asiago, in cui questa tradizione è ancora viva e in primavera, con lo scioglimento della neve e con l'apparire delle prime forme vegetative è comune veder la gente andare per campi e per boschi per la raccolta di queste giovani piante. Nell'ambito della conservazione, della tutela e della salvaguardia della biodiversità, uno dei compiti affidati a Veneto Agricoltura è quello della riscoperta e di riproporre la flora spontanea e dei suoi usi in preparazioni alimentari. Le parti commestibili della pianta, in base alla specie botanica di appartenenza possono essere le foglie, i fiori, le radici o i tuberi.

La sottile linea di confine tra fitorimediazione e biofortificazione rende le piante alimurgiche di interesse particolare per lo studio dell'accumulo di metalli. Queste specie infatti, essendo spontanee e nella maggior parte dei casi infestanti, possono sia essere utilizzate per la decontaminazione di terreni inquinati che rappresentare una risorsa nutrizionale per popolazione che tradizionalmente le raccoglie per l'alimentazione.

Le cinque specie di piante alimurgiche oggetto di studio di questa tesi e descritte qui di seguito sono in assoluto tra le più diffuse nell'areale della pianura veneta e rientrano tra quelle maggiormente raccolte dalla popolazione per scopi alimentari.

### 1.5.1 *Cichorium intybus* L. (cicoria selvatica)

Il nome specifico deriva dal latino, a sua volta derivato dal greco *èntybon*, col quale si indicava un'erba simile alla cicoria (figura 3). Appartiene alla famiglia delle *Asteracee*. Conosciuta anche col nome di radicchio selvatico o di cicoria amara, è presente in tutta Italia fino a 1.500 metri di altitudine, nei terreni calcarei, argillosi e asciutti, nelle zone erbose incolte e ai bordi delle strade. Il fusto, dritto rigido e angoloso, può raggiungere anche

l'altezza di 1 metro ed è molto ramificato. Le foglie basali sono profondamente incise a denti acuti, le foglie superiori sono invece più piccole, lanceolate, semiabbraccianti il fusto. I fiori, raggruppati in grandi capolini dal colore azzurro, si schiudono all'alba e si richiudono, decolorandosi, verso il tramonto. La radice a fittone è cilindrica, lunga e carnosa ed è da sempre utilizzata, previa essiccazione, arrostitimento e macinazione, come surrogato del caffè. Le foglie si raccolgono prima della fioritura e si essiccano in luoghi aerati; le radici si raccolgono invece in autunno, si dividono in più parti e si mettono ad essiccare al sole. Le foglie vengono utilizzate prevalentemente per insaporire le insalate. Contiene sali, sostanze amare e vitamine. Ha proprietà depurative, diuretiche e stomachiche. L'infuso delle radici inoltre calma le infiammazioni delle vie urinarie (Ferrero, 2007).

Alcuni autori (Martin *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1996; Liao *et al.*, 2000; Aksoy, 2008) hanno dimostrato un elevato iperaccumulo di metalli negli organi epigei di questa specie (47,4, 149 e 20,4 mg kg<sup>-1</sup> s.s. rispettivamente di Cd, Zn e Cu) e per questo è considerata un'ottima indicatrice per l'inquinamento da cadmio, soprattutto in terreni sabbiosi.



(A)



(B)

Figura 3. Parte aerea (A) e apparato radicale (B) di *Cichorium intybus*.

### 1.5.2 *Rumex acetosa* L. (acetosa)

Il nome deriva dal latino *rumex*, asta-lancia, in riferimento alla forma appuntita delle foglie di molte specie di *Rumex*. Il nome della specie si riferisce al sapore acidulo delle foglie (figura 4). Appartiene alla famiglia delle *Polygonaceae*. Si può trovare nei prati fertili e concimati, lungo i fossati e nei pascoli, tra 0 e 1.800 metri di altitudine. È una pianta perenne, erbacea con fusti eretti, scanalati, arrossati in basso, fogliosi fin sotto l'infiorescenza, mentre i



fiori sono portati in spighe vicino alla sommità. Le foglie basali sono picciolate; l'infiorescenza è compatta, costituita da piccoli fiori, dal perianzio verde, formato da 6 elementi di cui i 4 esterni rotondo-ovoidali, con escrescenze dure, rotonde e tetragonali. I sepali interni si arrotolano al momento della fruttificazione. I frutti sono acheni neri e lucenti, protetti da tepali persistenti che assumono un colore rosso-ruggine. Le foglie giovani e fresche possono essere impiegate per insaporire le insalate, salse e minestre. Contiene acido ossalico e vitamina C. Ha inoltre proprietà depurative e drenanti, nella cura delle malattie cutanee (Ferrero, 2007).

*Rumex acetosa* è stata classificata come pianta pseudometallofita in quanto è già stata identificata in numerosi siti contaminati da metalli (Wang *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2004). In un caso di studio (Barrutia *et al.*, 2009), i valori di zinco estratto da piante di acetosa cresciute spontaneamente in un terreno di miniera abbandonato dei Paesi Baschi potevano essere paragonati a quelli di una specie iperaccumulatrice.

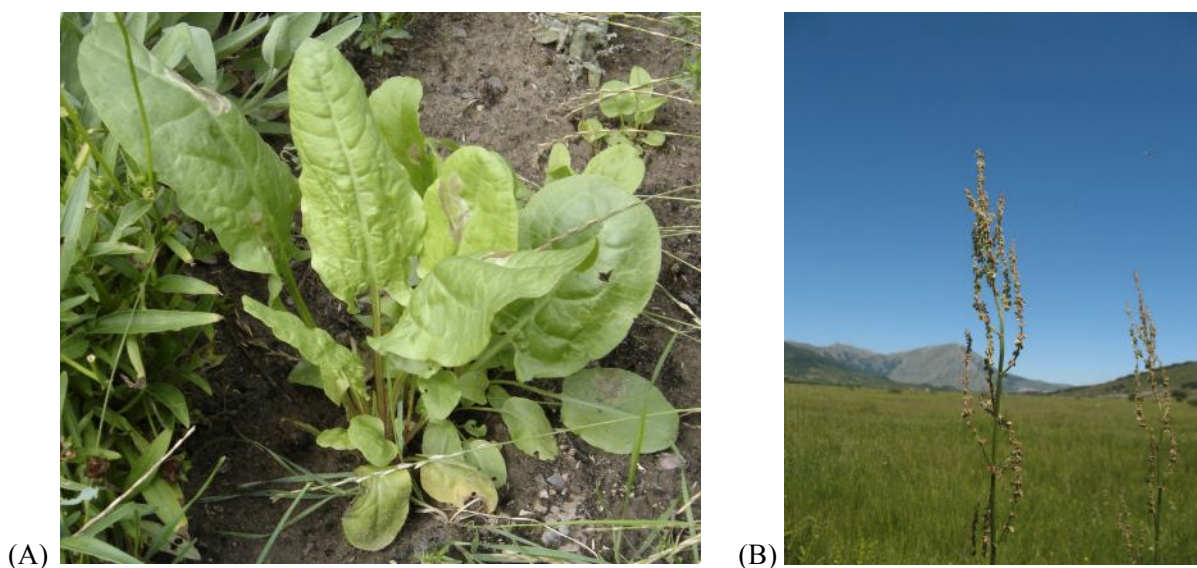


Figura 4. Foglie basali (A) infiorescenza (B) di *Rumex acetosa*.

### 1.5.3 *Sonchus oleraceus* L. (grespino comune)

Il nome deriva dal greco *sonkhos* (molle, spugnoso) e dal latino *oleraceus* che significa verdura, ortaggio coltivato (figura 5). Appartiene alla famiglia delle *Asteraceae*.

È una pianta con fusti eretti o ascendenti, tubulosi, ramosi e fogliosi fino in alto. Le foglie hanno un contorno più o meno spatolato, grossamente lobate o incise con 2-5 segmenti

per lato, le superiori sessili, generalmente dentate, amplessicauli. Le foglie della rosetta basale, passate in padella con olio e aglio, possono venire utilizzate come contorno, mentre da fresche per condire l'insalata. È un ingrediente insostituibile di tutte le zuppe arcaiche tradizionali dell'Italia centrale e settentrionale, molto adatto anche per il ripieno di torte salate. I fusti invece possono essere lessati e serviti come gli asparagi. Questa specie può venire utilizzata anche per scopi medicinali: l'acqua di cottura delle foglie ad esempio ha qualità depurative e rinfrescanti (Zuin, 2010).

Questa specie cresce senza problemi un po' dappertutto: la si può trovare in ambienti naturali, nei terreni incolti e in quelli coltivati così come in aree molto inquinate come ad esempio i bordi stradali. È infatti tollerante a concentrazioni anche molto elevate di piombo nel terreno ( $3.200 \text{ mg kg}^{-1}$  di peso secco) ed in grado di accumulare elevate concentrazioni di metalli nella parte aerea ( $1.600$  e  $2.500 \text{ mg kg}^{-1}$  s.s. di Pb e Zn rispettivamente) (Xiong, 1997; Bech *et al.*, 2012).

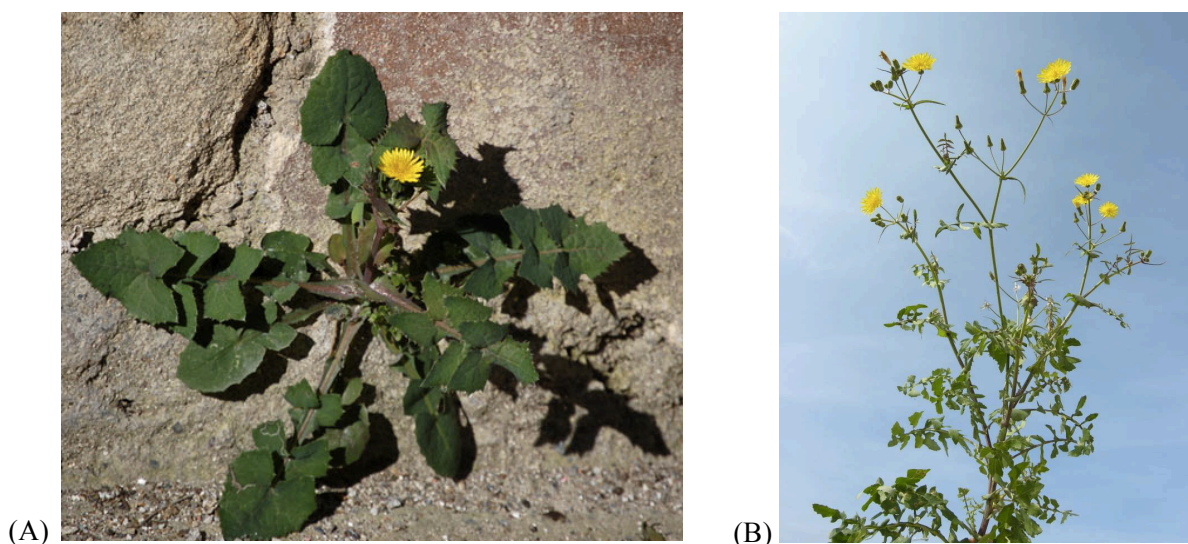


Figura 5. Foglie della rosetta basale (A) e apici con capolini (B) di *Sonchus oleraceus*.

#### 1.5.4 *Taraxacum officinale* L. (tarassaco)

Il nome deriva dal medio latino *taraxacum* ma l'origine remota è discussa. Appartiene alla famiglia delle Asteracee ed è conosciuto comunemente anche come piscialletto o dente di leone (figura 6).

Si può trovare nei prati concimati, negli ambienti disturbati, tra 0 e 1.700 metri di altitudine. È una pianta erbacea perenne che costituisce un gruppo estremamente polimorfo; fittone dapprima indiviso, poi generalmente ramificato. Le foglie sono di colore verde erba o più scure, numerose in rosetta, da intere a molto laciniate, mai macchiate, lobi più o meno triangolari, picciolo spesso alato. Ha capolini grossi di 2,5-4,0 cm di diametro, di colore giallo carico; acheni da grigio-biancastri a bruno olivacei; becco lungo il doppio dell'achenio. Fiorisce da marzo a maggio e in misura molto minore tutto l'anno. Le giovani foglie possono essere consumate crude nelle misticanze. Lessata da sola o con altre specie dal sapore più dolce è ottima come verdura cotta passata in padella con olio, aglio e pancetta o lardo. È molto adatta anche per frittate, minestre e ripieni. Tutta la pianta può inoltre avere proprietà medicinali, lassative, depurative, disintossicante, per liberare il sangue dalle impurità. La tisana di tarassaco è considerata, inoltre, un buon diuretico (Ferrero, 2007; Zuin, 2010).

Numerosi studi hanno dimostrato che questa specie accumula alti livelli di Cd, Pb, Cu e Zn (con valori di Bf in alcuni casi >1), perciò è ormai nota come pianta bioindicatrice della contaminazione di metalli pesanti nei suoli (Keane *et al.*, 2001; Malizia *et al.*, 2012; Radulescu *et al.*, 2013).

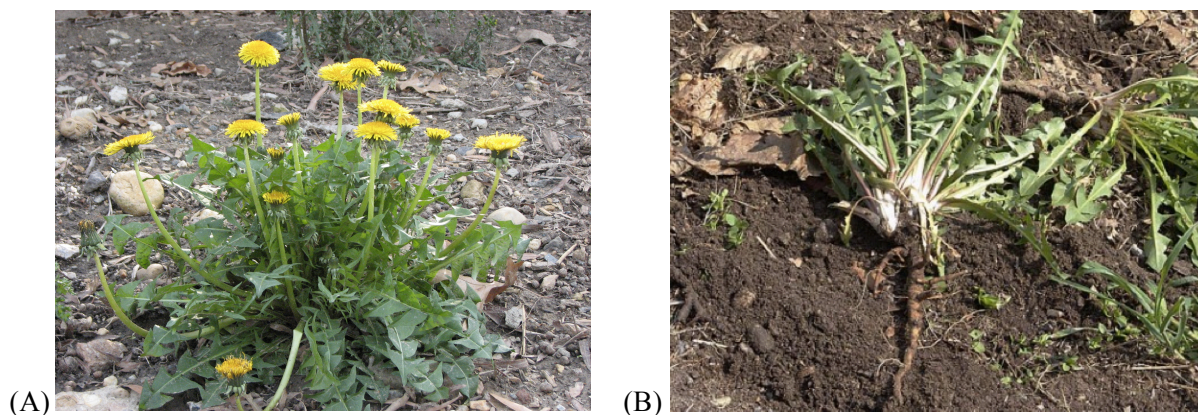


Figura 6. Parte aerea (A) e fittone esposto (B) di *Taraxacum officinale*.

### 1.5.5 *Tragopogon porrifolius* L. (barba di becco)

Il nome deriva dal greco *tragos*, caprone, e *pogòn*, barba, con riferimento alle setole del pappo, che fuoriuscendo dall'involucro, fanno pensare alla barba di un caprone. Appartiene anche'esso alla famiglia delle *Asteracee* (figura 7). Il nome comune con il quale

viene identificato è barba di becco o salsefica. Si può rinvenire ai bordi dei campi, nei prati, lungo le vie. È una specie diffusa in quasi tutta la penisola, tra 0 e 1.000 metri di altitudine. È una pianta annuale o perenne alta 20-60 cm con fusto eretto con foglie basali lineari ( $0,5 \times 10-15$  cm). Il capolino si trova su un peduncolo ingrossato, con corolla violacea (23-26 cm). Il frutto è un achenio con becco sormontato da un pappo. Anche l'insieme di questi pappi è di grandi dimensioni. Fiorisce in maggio-giugno. Le foglie del *T. porrifolius* sono tenere e gustose, molto adatte anche in misticanze, e così pure la radice, in alcune regioni italiane si ripassa al burro la pianta intera, tagliata a pezzetti. La pianta ha proprietà depurative, espettoranti, sudorifere e astringenti, bechiche (contro la tosse). Nella medicina popolare la radice trova diverse applicazioni, ad esempio come calmante per la tosse e come coadiuvante in tutte le affezioni dell'apparato respiratorio. Per il suo contenuto di inulina è consigliato l'uso della radice ai diabetici (Zuin, 2010).

Rispetto alle altre specie di piante alimurgiche già descritte il suo comportamento in suoli inquinati da metalli pesanti non è noto, in quanto finora non sono stati condotti studi specifici con questa specie coinvolta.

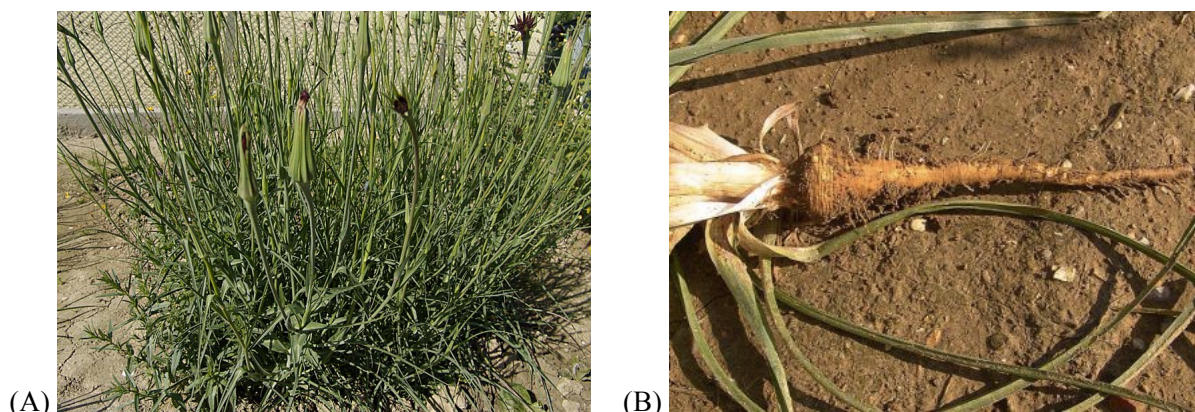


Figura 7. Parte aerea (A) e fittone (B) di *Tragopogon porrifolius*

## 2 Scopo del lavoro

La *phytoremediation* di terreni inquinati da metalli pesanti, ovvero l'impiego di piante per rimuovere contaminanti dal terreno si concretizza essenzialmente nelle tecnologie di fitoestrazione e fitostabilizzazione.

Con questa tesi si è voluto sperimentare in ambiente controllato (vaso) e in ambienti potenzialmente inquinati, la capacità di assorbimento di metalli da parte piante spontanee poliennali tipiche dell'ambiente Veneto, che abbiano anche una utilizzazione alimentare (piante alimurgiche). Sono state confrontate piante *Asteraceae* a radice fittonante, i.e., *Cycorium intybus* L., *Sonchus oleaceus* L., *Taraxacum officinale* L. e *Tragopogon porrifolius* L. – e *Polygonaceae*, i.e., *Rumex acetosa* L.

Durante la sperimentazione è stato monitorato il potenziale di accrescimento delle piante in terreno medio-limoso inquinato artificialmente con Cd, Co, Cu, Pb e Zn, rilevando la capacità di assorbimento e traslocazione degli inquinanti. In ambiente aperto, le stesse specie sono state prelevate in siti potenzialmente inquinati, i.e. su fanghi di canale, in una ex-discarica e lungo una strada ad elevata percorrenza, per la quantificazione dei metalli pesanti.

Gli obiettivi di questo lavoro di tesi riguardano sia tematiche ambientali che di qualità/sicurezza alimentare. La caratterizzazione delle piante oggetto di studio dovrà permettere l'individuazione di specie tolleranti alla contaminazione e la loro corretta applicazione nelle tecniche di fitoestrazione e fitostabilizzazione. Il carattere perennante o poliennale di queste specie può contribuire significativamente anche all'immobilizzazione oltre che alla rimozione dei contaminanti.

Trattandosi di specie alimurgiche, si è voluto valutare se l'accumulo nelle parti edibili di minerali essenziali possa favorire un miglioramento qualitativo dei loro prodotti, e se vi sia un conclamato rischio per la salute dovuto all'assorbimento metalli nocivi (es. piombo e cadmio) oltre i limiti di sicurezza.



## 3 Materiali e metodi

### 3.1 Prova in vaso

La sperimentazione è stata svolta presso la serra e i laboratori del Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università degli Studi di Padova (Legnaro), comparando 5 specie spontanee presenti nell'areale Veneto – *C. intybus*, *R. acetosa*, *S. oleraceus*, *T. officinale* e *T. porrifolius* – allevate in terreno medio-limoso artificialmente inquinato da metalli pesanti, in raffronto ad un controllo non inquinato.

#### 3.1.1 Allestimento della prova

Il terreno utilizzato nella sperimentazione proviene dall'Azienda agraria sperimentale "L. Toniolo" dell'Università di Padova, inquinato *ad hoc* con Cd, Co, Cu, Pb e Zn, apportati sottoforma di solfati metallici in soluzione (0,25 L kg<sup>-1</sup> terreno). Dopo l'applicazione dei metalli, il terreno è stato lasciato riposare per due mesi e successivamente coltivato per 4 mesi con piante spontanee, prima di essere utilizzato nella sperimentazione.

Sono stati utilizzati vasi troncoconici neri in PVC, dal diametro superiore di 85 mm e inferiore di 75 mm e 200 mm di altezza, collegati tramite un imbuto posto sul fondo del vaso e un tubo ad un contenitore per la raccolta dell'acqua di percolazione. I contenitori, così come l'apparato di collegamento, erano di colore nero opaco per evitare formazione di alghe e quindi possibili alterazioni delle acque di raccolta dovute alla radiazione solare. I vasi sono stati riempiti con una miscela di sabbia e terreno in proporzione 1:1 in peso, utilizzando terreno inquinato in raffronto a quello di controllo. La semina delle piante (5 per vaso) è avvenuta il 25/10/2011, prevedendo anche un trattamento di controllo assoluto con vasi non coltivati per ciascun trattamento. Sono state utilizzate 3 repliche per un totale di 36 vasi. Sono stati inoltre predisposti due vasi inquinati e due di controllo per la determinazione periodica del contenuto di metalli biodisponibili.

Tutti i vasi sono stati irrigati regolarmente durante la coltivazione con acqua e, all'occorrenza, soluzione Hoagland diluita al 50%. Complessivamente, dalla semina alla raccolta, sono stati distribuiti 5,5 L di acqua per vaso.

La raccolta è avvenuta allo stadio di fioritura per *S. oleaceus*, *C. intybus*, mentre le altre specie si trovavano ancora in stadio vegetativo: il 15/05/2012 sono state raccolte le piante di *S. oleaceus*, il 14/06/2012 è avvenuta la raccolta di *R. acetosa* e *T. officinale* e il 19/06/2012 quella di *T. porrifolius* e *C. intybus* (Figura 8).

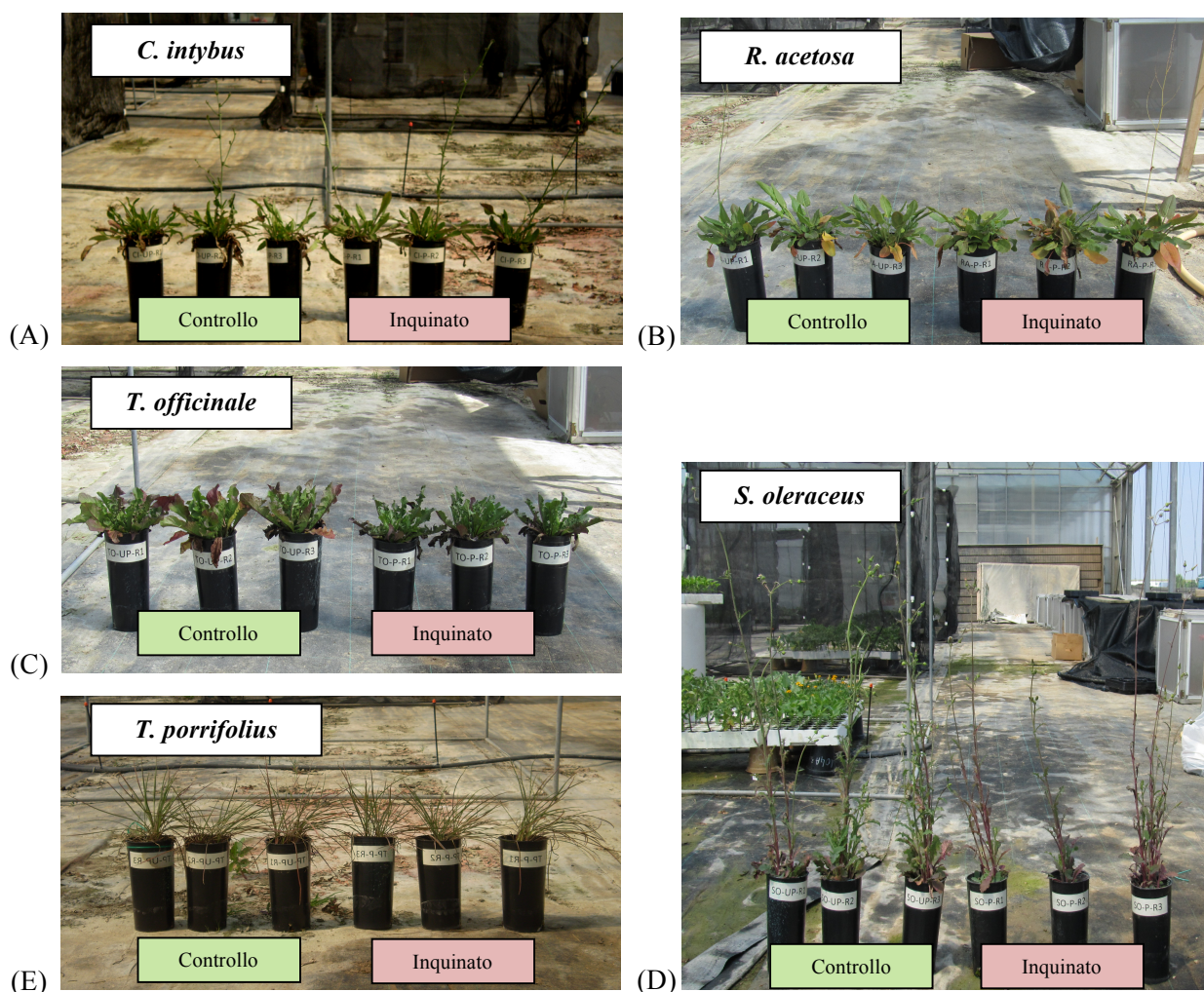


Figura 8. Piante al momento della raccolta: (A) *C. intybus*; (B) *R. acetosa*; (C) *T. officinale*; (D) *S. oleaceus*; (E) *T. porrifolius*.



### 3.1.2 Analisi del terreno

#### Contenuto totale di metalli

Il contenuto totale di metalli del terreno (Cd, Co, Cu, Pb e Zn) è stato determinato a inizio sperimentazione dopo mineralizzazione del substrato con mineralizzatore a microonde Milestone Ethos 900 (metodo EPA n° 3051, USEPA, 1995a). Per la mineralizzazione sono stati pesati 500 mg di campione di terreno secco macinato e omogeneizzato cui sono stati aggiunti 1,0 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% in volume, 2-3 gocce di H<sub>2</sub>O distillata e 5 mL di HNO<sub>3</sub> 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). 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 contenitori sono stati raffreddati in una bacinella a ricircolo d'acqua, aperti e i campioni mineralizzati sono stati trasferiti in matracci di vetro, portati a 25 mL con acqua ultrapura ed infine filtrati con filtri monouso Millipore con porosità 45 µm (Chemtek Analitica, Bologna) allo scopo di rimuovere alcune impurità (soprattutto silicati) che non vengono mineralizzate in acido nitrico.

L'analisi elementare è avvenuta tramite 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<sup>-1</sup> 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 è 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 10 e in Tabella 11.

Tabella 10. Parametri ICP-OES: strumento.

<b>Parametro</b>	<b>Valore</b>
Torcia	3 vie - 3 mm diametro
Potenza	1420 W
Flusso di gas di raffreddamento	13,6 L min <sup>-1</sup>
Flusso gas ausiliario	0,80 L min <sup>-1</sup>
Sistema di nebulizzazione	Modificato di Lichte
Flusso gas di nebulizzazione	0,92 L min <sup>-1</sup>
Flusso gas addizionale	0,20 L min <sup>-1</sup>
Velocità di aspirazione campione	2 mL min <sup>-1</sup>
Tempo di lavaggio intercampiono	30 s
Tempo di avviamento	30 s
Numero letture	3
Tempo per una singola lettura	24 s

Tabella 11. Parametri ICP-OES: elemento.

<b>Elemento</b>	<b>Lunghezza d'onda (nm)</b>
Cd	214,438
Co	228,615
Cu	324,778
Pb	220,351
Zn	213,856

## **Biodisponibilità di Cd, Co, Cu, Pb e Zn**

Durante il ciclo di coltivazione sono stati eseguiti campionamenti di terreno dai vasi appositamente preparati per verificare l'andamento della biodisponibilità dei metalli durante. I campionamenti sono stati eseguiti alla semina e in 9 date successive: 09/11/2011, 30/11, 20/12, 11/01/2012, 30/01, 02/03, 23/03, 15/05 e 12/06.

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 della soluzione sono stati pesati:

- 14,92 g di trietanolamina (0,1 M)  $[N(CH_2OHC_2)_3]$ ;
- 1,97 g di acido dietilentriamminopentacetico (DTPA) (0,01 M)  $[(HOOCCH_2)_2(NCH_2CH_2)_2NCH_2COOH]$ ;
- 1,46 g di calcio cloruro biidrato (0,01 M)  $[CaCl_2 \times 2H_2O]$ .

Dopo essere stati pesati, i reagenti sono stati solubilizzati 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 1.000 ml e portata a volume con acqua distillata.

Sono stati pesati 10 g di campione di terreno a cui sono stati aggiunti, in un tubo da 50 mL, 20 mL di soluzione (rapporto 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, portato al volume di 20 mL e filtrato, prima con filtri di carta e successivamente con filtri per siringa (PTFE, porosità 0,45  $\mu$ m) per l'analisi tramite ICP-OES, analogamente a come descritto nel paragrafo precedente.

### **3.1.3 Analisi in vivo**

#### **SPAD**

Lo SPAD (Loh *et al.*, 2002) è uno strumento che permette di valutare in modo non invasivo, il quantitativo di clorofilla presente nelle foglie, misura direttamente correlata allo

stato nutrizionale della pianta. Dal momento che la concentrazione di clorofilla è correlata positivamente con la concentrazione di azoto nella foglia, la misura dello SPAD può essere correlata all'azoto fogliare attraverso un'equazione di regressione e usata come uno strumento diagnostico rapido.

Con questa metodologia viene misurata la trasmittanza differenziale della luce, eseguendo un rilievo puntiforme su una foglia rappresentativa. Il valore che si ottiene, espresso in unità SPAD, è adimensionale ed è tanto maggiore quanto più elevato è il contenuto di clorofilla.

La misura viene effettuata nella regione spettrale del rosso (circa 650 nm), dove si ha uno dei picchi di assorbimento della clorofilla; l'altro picco di assorbimento si trova a circa 450 nm, nella regione del blu.

Nelle misurazioni SPAD è stato utilizzato il modello *Minolta Chlorophyll Meter SPAD-502* (Figura 9), un misuratore compatto e portatile, le cui parti essenziali sono la tastiera, lo schermo LCD e la testata di misurazione (pinza), in cui sono situati i due led di sorgente luminosa e il recettore.



Figura 9. Minolta Chlorophyll Meter SPAD-502 (modificato da Spectrum Technologies Inc.).

Lo SPAD-502 presenta le seguenti caratteristiche tecniche (Spectrum Technologies, 2012):

- sistema di misura: densità ottica a due differenti lunghezze;
- area di misura:  $2 \times 3$  mm;
- sorgente luminosa: 2 LED (Light Emitting Diode);
- recettore: 1 SPD (fotodiodo);

- display: 3 digit LCD (Liquid Colour Display) con un punto decimale;
- memoria: 30 dati;
- accuratezza:  $\pm 1,0$  unità SPAD;
- unità SPAD: scala da 0 a 50;
- peso: 225 g;
- alimentazione: 2 batterie alcaline al manganese tipo AA.

Per eseguire il rilievo è necessario chiudere la pinza sulla foglia, facendo attenzione a non danneggiarla, in modo da far aderire perfettamente lo strumento alla superficie vegetale. Dai due LED (sorgente luminosa) viene emessa luce in sequenza con lunghezze d'onda corrispondenti al rosso (picco a 650 nm) e all'infrarosso (picco a 940 nm). La luce che attraversa la foglia giunge al recettore (sensore luminoso), il quale converte la luce trasmessa in corrispondenti segnali elettrici. Successivamente l'amplificatore incrementa questi segnali analogici, i quali, mediante il convertitore A/D, vengono modificati in segnali digitali. Infine, il microprocessore calcola le unità SPAD corrispondenti (Konica Minolta, 1989).

Per ogni vaso sono state eseguite 6 misurazioni, dalla cui media aritmetica è derivato il dato finale. Un primo rilievo è stato effettuato in primavera (02/05/2012) per tutte le specie. Un secondo rilievo è stato effettuato poco prima della raccolta.

### **3.1.4 Analisi sulla biomassa alla raccolta**

Alla raccolta le piante di ogni vaso sono state contate e ciascuna suddivisa in parte aerea (foglie e fusti separatamente, ove presenti) e radice fittonante. Dopo aver rimosso tutti i residui di suolo tramite lavaggio con acqua demineralizzata, i campioni sono stati essiccati a 105 °C per 36 h, è stato misurato il relativo peso secco e si è proceduto alla loro macinazione.

#### **Analisi elementare dei tessuti vegetali**

I tessuti vegetali (fusti, foglie e fittoni) sono stati trattati separatamente secondo il metodo EPA n° 3052 (USEPA, 1995b): dopo macinazione sono stati mineralizzati per effettuare la determinazione all'ICP-OES per la determinazione dei metalli. Per la mineralizzazione sono stati pesati 350 mg circa di campione, a cui sono stati aggiunti 1,0 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% in volume, 2-3 gocce di H<sub>2</sub>O distillata e 5 mL di HNO<sub>3</sub> tipo Aristar 70%

superpuro. Risulta importante il rapporto stechiometrico tra acido e quantità di campione per permettere un'ossidazione completa della sostanza organica.

I campioni sono stati filtrati con filtri da 45  $\mu\text{m}$  e analizzati all'ICP-OES come eseguito per il terreno.

### **Analisi dell'apparato radicale**

Dopo la raccolta della parte aerea e del fittone, ciascun vaso è stato tagliato in 2 orizzonti di profondità di 10 cm ciascuno. Per evitare fenomeni di decomposizione, ogni campione è stato racchiuso in un sacchetto di plastica e conservato in congelatore in attesa del lavaggio.

Successivamente le radici sono state separate dal terreno secondo il metodo descritto da Oliveira *et al.* (2000): i campioni sono stati scongelati il giorno prima del lavaggio, immergendoli in una soluzione al 15% di acido ossalico, per facilitare la disgregazione degli aggregati strutturali. Il metodo prevedeva l'utilizzo di un apparato di lavaggio che separa le radici dal terreno tramite la forza centrifuga dell'acqua (Figura 10). Al centro della centrifuga è situato un foro per l'uscita dell'acqua ed in quel punto è presente un setaccio con maglia da 500  $\mu\text{m}$  per trattenere le radici.

Le radici sono state conservate in provette Falcon da 50 mL con una soluzione conservante di etanolo (15% v/v) a +4 °C sino al momento della digitalizzazione allo scanner.

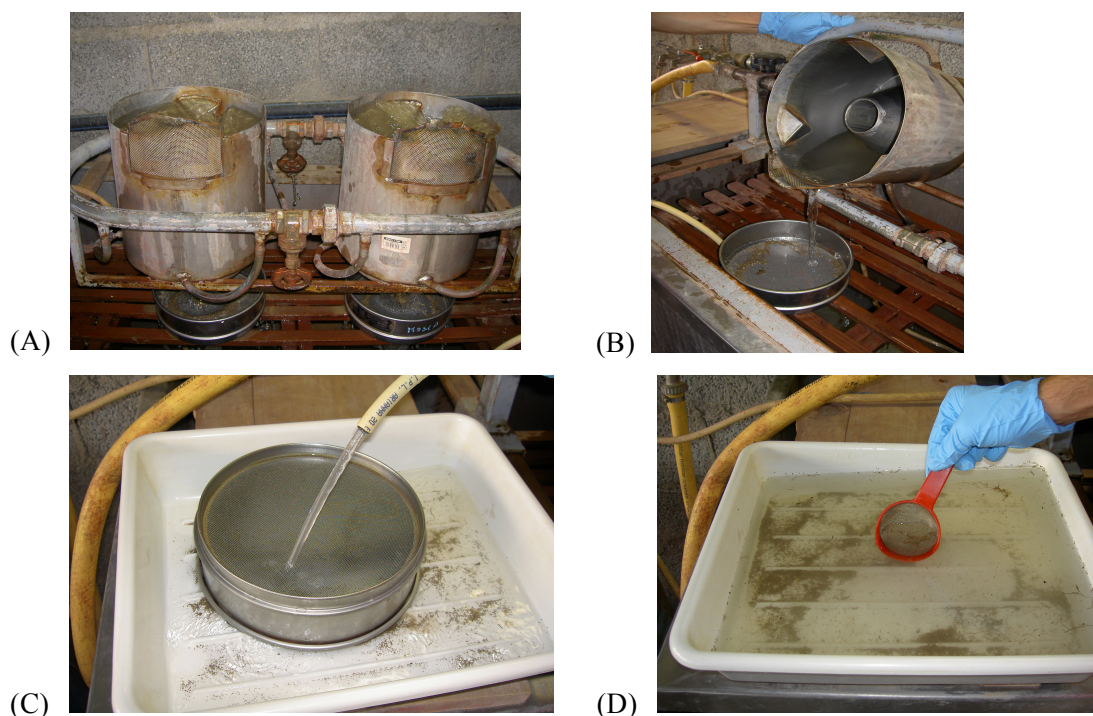


Figura 10. Fasi della separazione delle radici dal terreno per flottazione in acqua.

L'acquisizione delle immagini delle radici è stata effettuata in laboratorio con uno scanner EPSON Expression 11000XL PRO e relativo software. Ogni campione di radici è stato prelevato dalla soluzione conservante, lavato accuratamente con acqua demineralizzata e disposto su vassoi in plexiglas trasparente (20,5 × 30,7 cm) a bordi rialzati (2 cm).

Le radici sono state disposte su tutta la superficie del vassoio, aiutandosi con un sottile velo d'acqua (3 mm circa) ed eliminando eventuali residui organici e radici morte con delle semplici pinzette metalliche da laboratorio. I campioni di radici, tutti particolarmente estesi, sono stati suddivisi in più vassoi. Le immagini sono state acquisite impostando la risoluzione dello scanner a 400 DPI, in formato binario (bianco/nero) e salvate in formato TIFF non compresso (Figura 11).

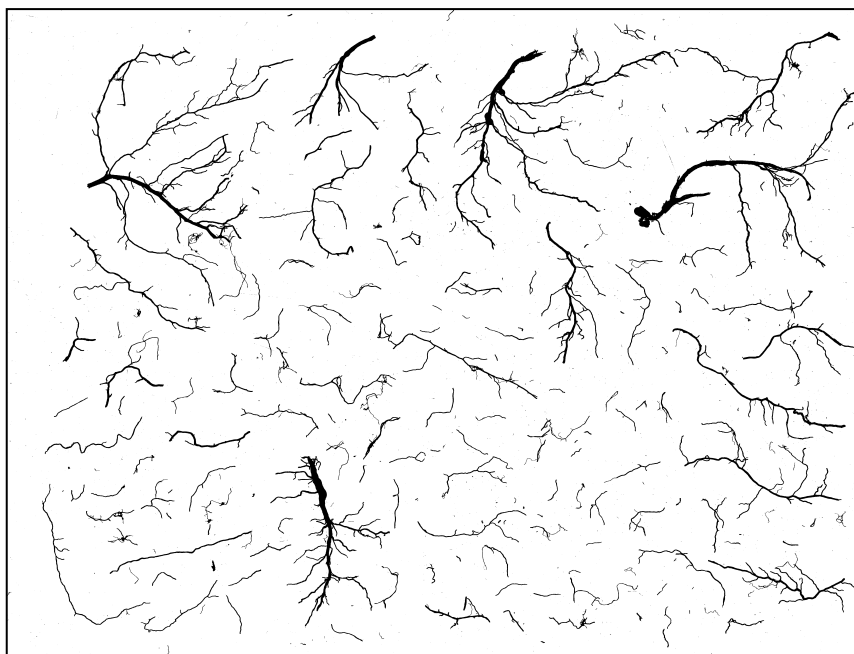


Figura 11. Esempio di immagine di radici acquisite allo scanner.

Successivamente le immagini sono state analizzate tramite il software KS 300 ver. 3.0 (Carl Zeiss Vision GmbH, München, Germany) che ha permesso di eseguire le misurazioni in automatico, impostando una funzione macro creata appositamente allo scopo.

La macro prevedeva il caricamento automatico delle immagini in sequenza in base alla loro numerazione (motivo per il quale sono state nominate con numeri progressivi crescenti) e la conversione in RGB (*Red Green Blue*). Venivano caricate successivamente le condizioni per la misurazione delle radici: sono stati infatti selezionati solo gli oggetti grafici aventi

valori di area superiore o uguale a 130 pixel e di indice di allungamento  $\left(\frac{P^2}{A}\right)$  (dove  $P$  = perimetro e  $A$  = area) superiori a 40. Gli oggetti con indice di allungamento inferiore a 40, di forma tendenzialmente tondeggianti, sono stati considerati corpi estranei (residui vegetali, semi di infestanti, piccoli sassolini, etc.).

In seguito la funzione stessa sovrapponeva a questi oggetti grafici una nuova immagine binaria, disegnando i nuovi oggetti (radici) con un valore di background pari a 0 ed un valore di foreground pari a 255.

Per calcolare la lunghezza delle radici sono stati utilizzati due algoritmi diversi, *FbLm* (*Fiber length algorithm*) e *ASkl* (*Skeletonization method*). Il primo consiste nel calcolare la lunghezza della radice, riconoscendo innanzitutto le regioni chiuse di pixel bianchi nell'immagine (le radici), calcolando area e perimetro di questi oggetti e utilizzando l'equazione:  $FbLm = \frac{P + \sqrt{P^2 - 16A}}{4}$ , dove  $P$  è il perimetro e  $A$  è l'area, riferiti allo stesso oggetto.

L'equazione è semplicemente la soluzione del sistema ottenuto dalle equazioni per calcolare il perimetro e l'area degli oggetti, nelle quali la loro lunghezza è l'incognita (Vamerali *et al.*, 2003).

Il secondo algoritmo prevede l'erosione dei pixel esterni dell'oggetto radice, ma non di quelli alle due estremità e nella parte centrale, convertendo le radici in linee di spessore di 1 pixel (denominate scheletri) aventi la stessa topologia delle radici, e di cui è possibile calcolarne l'area. La lunghezza reale del campione di radici disposte casualmente si ricava dividendo il numero di pixel dell'area per la risoluzione e moltiplicando per un fattore di correzione pari a 1,12 (Smith *et al.*, 1994; Vamerali *et al.*, 2003). I due metodi (*FbLm* e *Skeletonization*) sono risultati entrambi affidabili, e correlati positivamente ( $R^2 = 0,93$ ). Poiché il metodo *Skeletonization* tendeva a sottostimare la lunghezza a causa dell'elevata risoluzione delle immagini, sono stati utilizzati i dati di lunghezza ottenuti con l'algoritmo *FbLm*.

Il diametro radicale è stato ottenuto dal rapporto tra l'area delle radici e la loro lunghezza per ciascun sub-campione.



## 3.2 Raccolta e analisi di piante spontanee in siti potenzialmente a rischio di contaminazione

Durante il mese di marzo 2014 sono state campionate 24 piante, 3 di *R. acetosa* e 21 di *T. officinale*, prelevate da tre siti potenzialmente inquinati tutti situati nella cintura urbana della città di Padova:

- la discarica di Roncajette, nel comune di Ponte San Nicolò (Padova). È composta da 3 lotti di complessivi 390.000 m<sup>2</sup>: il lotto “A”, esteso per 25 ettari circa è il più ampio ed è posto al livello del piano campagna, i lotti “B” e “C”, estesi per 14 ettari, sono invece sopraelevati di alcuni metri (Figura 12). Questo sito iniziò ad accogliere rifiuti solidi urbani (RSU) dagli anni '60, dopo che fu terminata l'estrazione di argilla, fino al 1999. Dall'anno successivo il progetto definitivo di messa in sicurezza riguardante i lotti B e C della discarica ha previsto la loro copertura con uno strato di terreno inerte mantenuto inerbito, l'aspirazione del biogas e l'asportazione del percolato che continua tutt'oggi. In questo sito sono state raccolte 15 piante di *T. officinale* in 5 punti diversi (“A”, “B”, “C”, “D” ed “E”) della discarica (Figura 13, A);
- un fosso di raccolta delle acque in un terreno agrario situato in zona Montà, comune di Padova. Qui sono state prelevate 3 piante di *T. officinale* cresciute sull'arginello del fosso (Figura 13, B);
- un bordo stradale lungo la Strada Statale 516 “Romea”, all'incrocio con Viale dell'Università, nel comune di Legnaro (Padova). In due punti distanti tra loro poche decine di metri, sono state raccolte 3 piante di *T. officinale* (punto “A”) e 3 piante di *R. acetosa* (punto “B”) (Figura 13, C).



(A)



(B)

Figura 12. Piante di tarassaco nel lotto “A” (A) e lotto “B” (B) della discarica di Roncajette (Ponte San Nicolò, Padova).

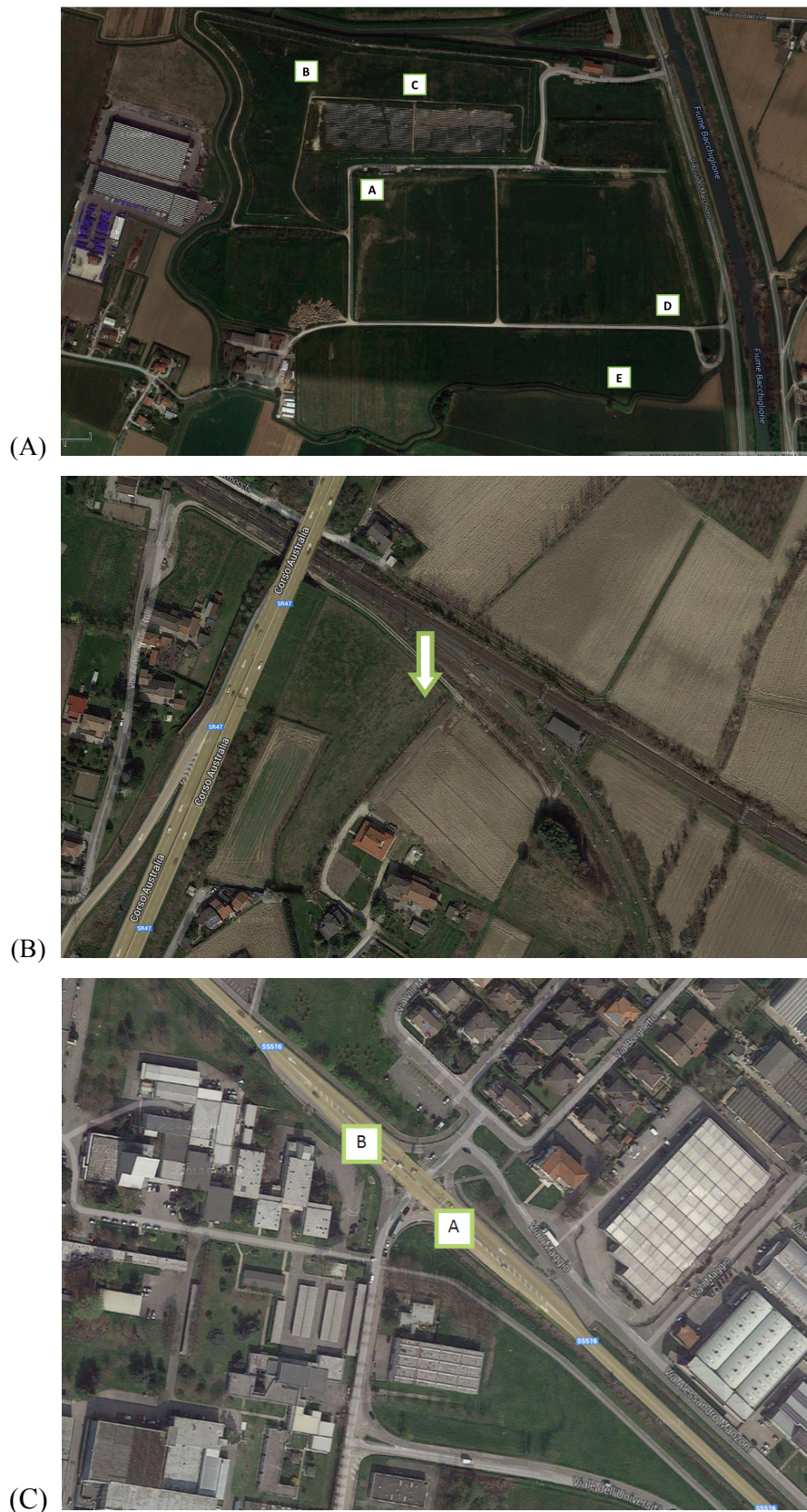


Figura 13. Mappe dei punti di campionamento di terreno e vegetazione spontanea (*T. officinale* e *R. acetosa*) presso la discarica di Roncajette (Ponte San Nicolò, Padova, A-E) (A), il fosso di raccolta delle acque in un terreno agrario (zona Montà, Padova) (B) e la SS516 (Legnaro, Padova, A-B) (C).

La raccolta delle piante è avvenuta allo stadio di fioritura, congiuntamente al prelievo di un campione di suolo a diretto contatto con l'apparato radicale della pianta raccolta. Sia le piante che il terreno sono state analizzate per il contenuto di metalli e, nel caso del terreno, anche della frazione biodisponibile, seguendo la metodica già descritta in precedenza (cfr. 3.1.2 e 3.1.4).

### **3.3 Analisi statistica**

I dati sono stati analizzati tramite ANOVA, verificando preliminarmente la normalità dei dati (test Shapiro-Wilks) e l'omogeneità delle varianze (test di Bartlett). Le medie statisticamente differenti sono state separate con il test di Newman-Keuls ( $P \leq 0,05$ ), utilizzando il programma statistico Statgraphics Centurion XV.

Riguardo la prova in vaso, i dati sono stati covariati per il numero di piante presenti nel vaso; non è stato possibile eseguire l'analisi sui dati riguardanti i fusti (biomassa e concentrazione di metalli) a causa della mancanza di questa porzione di pianta in molte repliche.



## 4 Risultati e discussione

### 4.1 Prova in vaso

#### 4.1.1 Il terreno di sperimentazione

Tabella 12. Concentrazioni di metalli ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.,  $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) nella miscela sabbia-terreno utilizzata nella sperimentazione (prima della semina), in raffronto ai limiti di legge per suoli ad uso verde pubblico, privato e residenziale (D. Lgs. 152/2006, allegato 5).

<b>Metallo</b>	<b>Limite di legge (A)</b>	<b>Terreno</b>	<b>Pre-semina (B)</b>	<b>× limite (B/A)</b>
Cd	2	Non inquinato	<0,20	-
		<b>Inquinato</b>	<b>3,66 ±0,08</b>	<b>1,83</b>
Co	20	Non inquinato	5,54 ±0,09	0,28
		<b>Inquinato</b>	<b>36,8 ±0,82</b>	<b>1,84</b>
Cu	120	Non inquinato	20,5 ±0,09	0,17
		<b>Inquinato</b>	<b>496 ±5,45</b>	<b>4,13</b>
Pb	100	Non inquinato	12,5 ±0,11	0,13
		<b>Inquinato</b>	<b>163 ±3,38</b>	<b>1,63</b>
Zn	150	Non inquinato	46,7 ±0,24	0,31
		<b>Inquinato</b>	<b>906 ±20,7</b>	<b>6,04</b>

Le concentrazioni dei cinque metalli considerati (Cd, Co, Cu, Pb e Zn) nel terreno inquinato utilizzato nella prova (miscela con sabbia) superavano abbondantemente il limite di legge stabilito dal D. Lgs. 152/2006 (Tabella 12). Zinco e Cu eccedevano maggiormente i limiti di legge, rispettivamente 6 e 4 volte; Co e Cd erano presenti in concentrazioni 1,8 volte superiori ai limiti stessi ed infine il Pb eccedeva di 1,6 volte. Gli stessi elementi, ad eccezione del Cd, erano presenti in concentrazioni molto inferiori nel terreno non inquinato.

In Figura 13 viene riportato l'andamento della biodisponibilità, ossia le concentrazioni dei metalli che risultano potenzialmente disponibili per l'assorbimento da parte delle piante nell'intervallo di tempo dalla semina alla raccolta. Com'era lecito attendersi, nella tesi inquinata i valori di biodisponibilità sono risultati più elevati rispetto al controllo. Come si

rileva anche in Tabella 14, gli andamenti di Cd, Co, Cu, e Zn sono molto simili e positivamente correlati tra di loro, seguendo un andamento decrescente. Il Pb invece ha seguito un andamento particolare, dapprima crescente e poi decrescente, raggiungendo al momento della raccolta valori di biodisponibilità simili a quelli di partenza. L'andamento decrescente di biodisponibilità di metalli tossici come il Cd rappresenta un aspetto positivo in quanto viene ridotta la frazione potenzialmente assorbibile dalle piante, anche se i valori rimangono comunque molto elevati rispetto al controllo. La frazione percentuale di metalli biodisponibili si è pressoché dimezzata dall'inizio dell'esperimento, indice che l'apporto artificiale di inquinanti ha subito una stabilizzazione nel tempo.

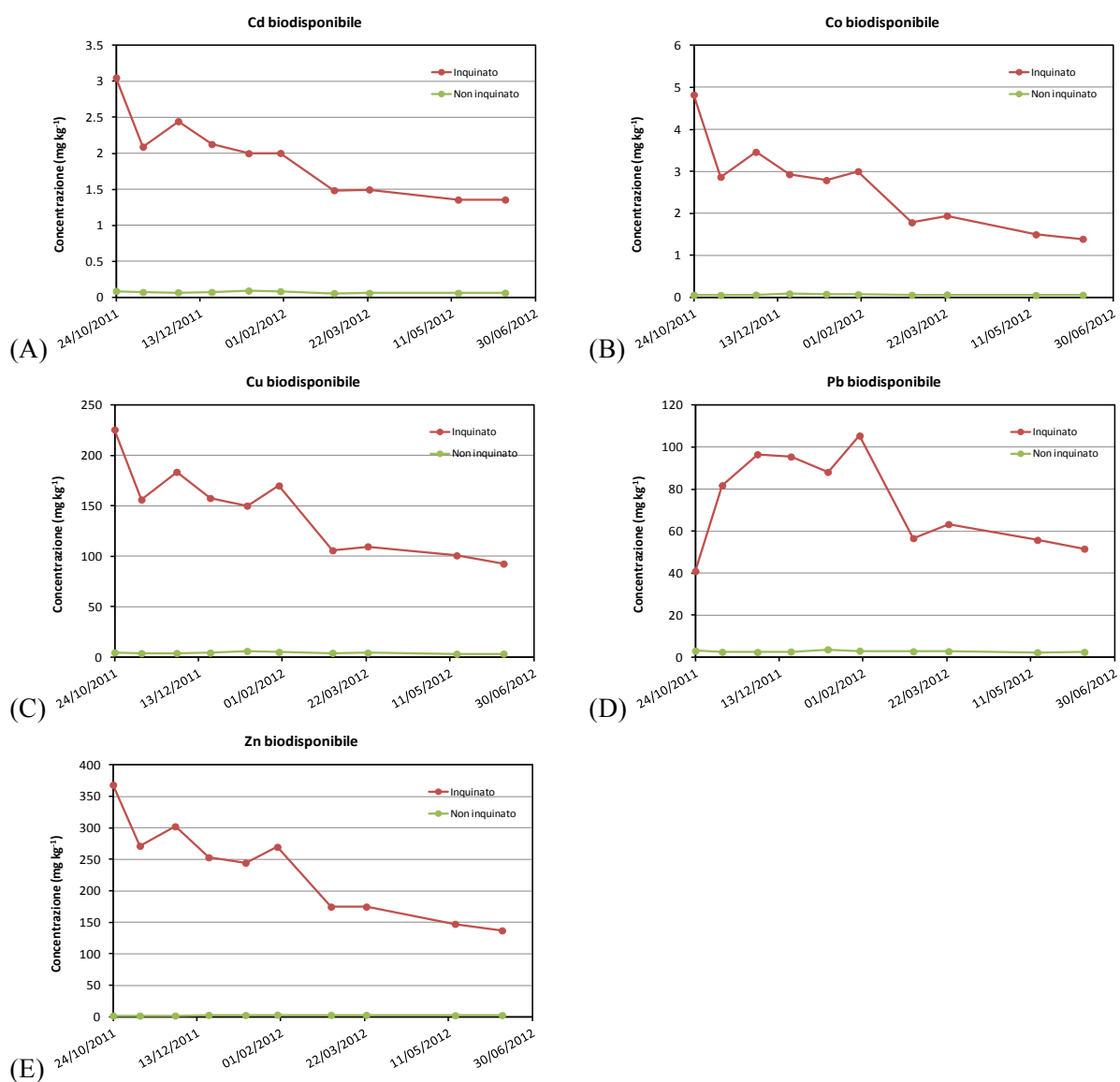
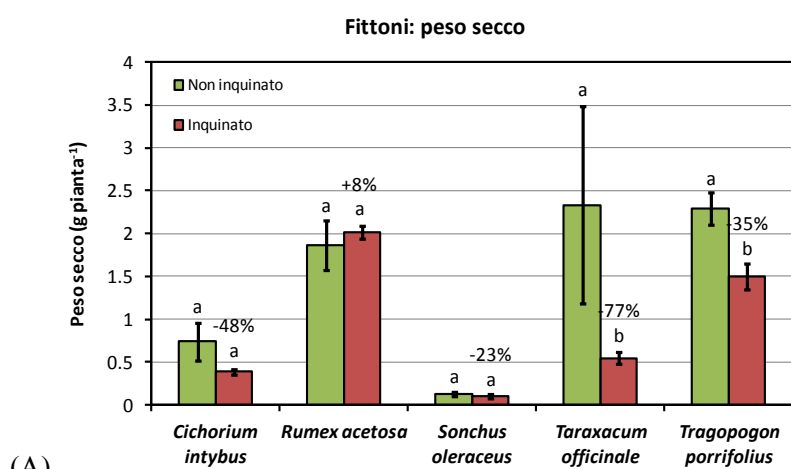


Figura 13. Andamento della biodisponibilità di metalli ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.,  $n = 2$ ) in terreno non coltivato.

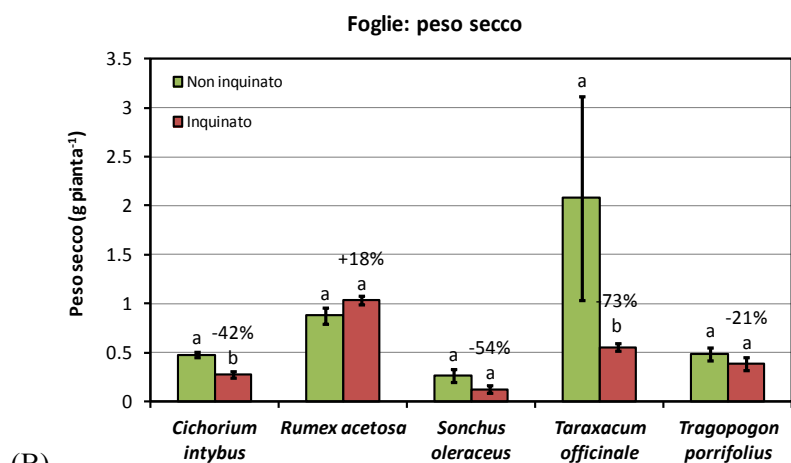
Tabella 14. Coefficienti di correlazione  $r$  (\*: $P \leq 0,05$ ) tra le concentrazioni di metalli biodisponibili nel terreno inquinato (tutte le date di campionamento).

	<b>Co</b>	<b>Cu</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
<b>Cd</b>	0,99*	0,99*	0,33	0,98*
<b>Co</b>		0,99*	0,34	0,99*
<b>Cu</b>			0,43	0,99*
<b>Pb</b>				0,44

#### 4.1.2 Accrescimento delle piante



(A)



(B)

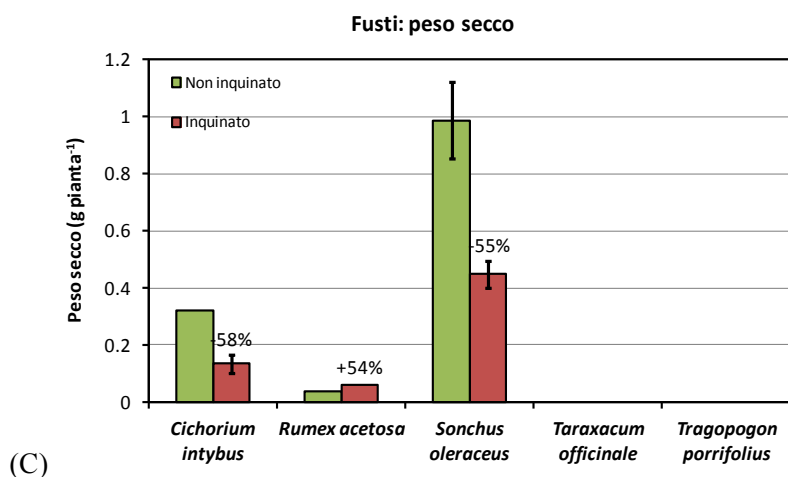


Figura 14. Peso secco alla raccolta (g s.s. pianta<sup>-1</sup>,  $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) di fittoni (A), foglie (B) e fusti (C) di piante coltivate su terreno inquinato in raffronto al controllo. Per ciascuna specie, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Tabella 15. Contenuto percentuale di acqua nei tessuti di piante coltivate in terreno inquinato in raffronto al controllo ( $n = 3$ ).

Tessuto	Terreno	<i>Cichorium intybus</i>	<i>Rumex acetosa</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Tragopogon porrifolius</i>
Fittoni	Non inquinato	71	67	79	73	70
	Inquinato	71	65	86	77	72
Foglie	Non inquinato	75	84	77	82	75
	Inquinato	82	84	76	83	77
Fusti	Non inquinato	70	90	80		
	Inquinato	74	73	81		

*T. officinale* ha mostrato sintomi da fitotossicità quando cresciuto in terreno inquinato, con perdite di biomassa (peso secco) del 73% per le foglie e del 77% per il fittone (Figura 14). Per quanto riguarda le altre specie, *C. intybus* e *T. porrifolius* hanno prodotto biomasse statisticamente inferiori al controllo, rispettivamente per le foglie (-42%) e il fittone (-35%). Va evidenziato che *R. acetosa* ha ottenuto una buona biomassa in entrambi i trattamenti, dimostrandosi una specie potenzialmente adatta a siti inquinati.



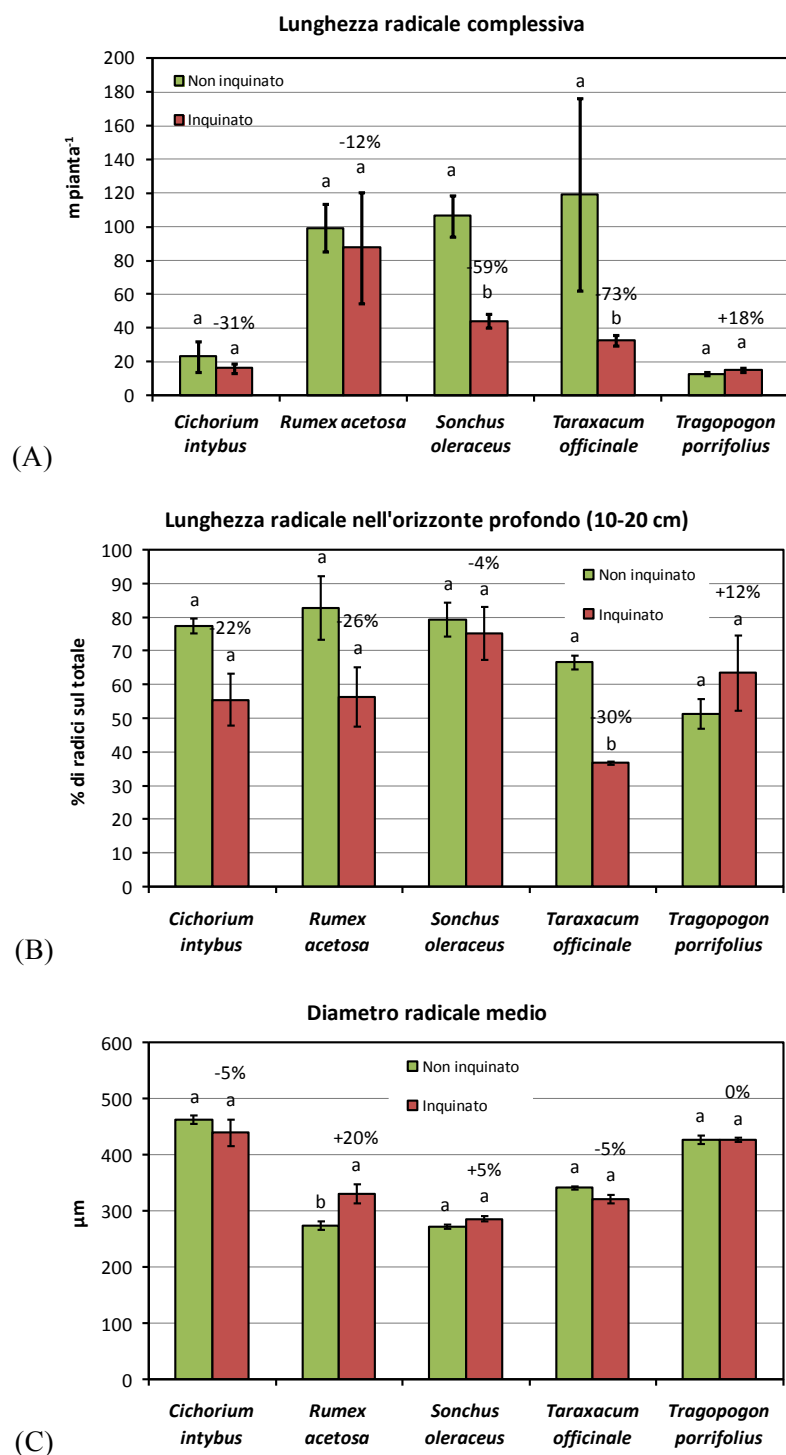


Figura 15. Lunghezza radicale complessiva per pianta (A), frazione di lunghezza radicale nell'orizzonte profondo (10-20 cm) (B) e diametro radicale medio (C) ( $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) di piante coltivate in terreno inquinato in raffronto al controllo. Per ciascuna specie, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

È stata riscontrata una notevole riduzione, rispetto al controllo, dell'accrescimento radicale in quasi tutte le piante, statisticamente significativa solamente per *S. oleraceus* e *T.*

*officinale* (Figura 15, A). Questo è anche accompagnato da una generale riduzione di radici nell'orizzonte profondo (10-20 cm) delle tesi inquinate, specialmente per *T. officinale* (-30%) (Figura 15, B). Al contrario, *T. porrifolius* è l'unica specie che mostra un lieve aumento di lunghezza radicale e della quota di radici profonde (+18% e +12%, rispettivamente), aspetto di grande utilità per la sopravvivenza della pianta in condizioni di stress. Approfondendo maggiormente le radici, l'apparato radicale può esplorare strati del terreno non inquinati o meno contaminanti e permettere una migliore sopravvivenza della specie in aree inquinate. In ogni caso l'approfondimento radicale è un segnale di buona tolleranza all'inquinamento, proprio come avviene nelle specie tolleranti la siccità.

Dall'analisi dei diametri radicale è emerso che *C. intybus* e *T. porrifolius* hanno presentato valori leggermente superiori al *T. officinale*, mentre *R. acetosa* e *S. oleraceus* sono le specie che presentano i diametri radicali più sottili (Figura 15, C).

Poiché generalmente il diametro radicale subisce variazioni quando sottoposto a stress, quale può essere la salinità (Rewald *et al.*, 2013), si è voluto analizzare anche questo aspetto. Mentre una riduzione del diametro radicale può essere imputata ad una riduzione dell'espansione o della divisione cellulare dovuta a stress abiotici con un'alta concentrazione di sali nel terreno, un suo aumento può essere spiegato dalla succulenza del cortex, ossia dall'aumento del volume dei vacuoli che permette l'accumulo di maggiori quantità di acqua nella cellula e, quindi, di diluire la concentrazione di ioni e far fronte, ad esempio, a condizioni di salinità (Munns, 2002). In questa prova, il diametro delle radici cresciute in terreno inquinato appare praticamente invariato rispetto a quello delle radici cresciute nel substrato non inquinato. Solamente *R. acetosa* ha mostrato un aumento del diametro delle radici fini (+20%), indicando che questa specie è probabilmente in grado di modificare la morfologia radicale per meglio adattarsi alle condizioni di inquinamento.

Oltre alle discrete asportazioni di metalli pesanti (cfr. 4.1.4), la buona risposta dell'apparato radicale di *T. porrifolius* all'inquinamento in termini di crescita e di distribuzione lungo il profilo, può suggerire un possibile impiego di questa specie nelle pratiche di fitoestrazione.

### 4.1.3 Analisi del contenuto di clorofilla

Mediante l'utilizzo dello SPAD è stato possibile valutare indirettamente la quantità di clorofilla presente nelle foglie, valore correlato allo stato nutrizionale della pianta. Si nota che, ad eccezione del *T. porrifolius*, a metà primavera (02/05/2012), non risentivano dell'inquinamento (Figura 16). Questo è un dato importante, considerato che generalmente la presenza elevata di metalli nel substrato e all'interno della pianta provoca la sostituzione dell'atomo di Mg nella molecola di clorofilla con altri metalli bivalenti, inattivando la molecola (Kupper *et al.* 2003; Bandiera *et al.* 2009).

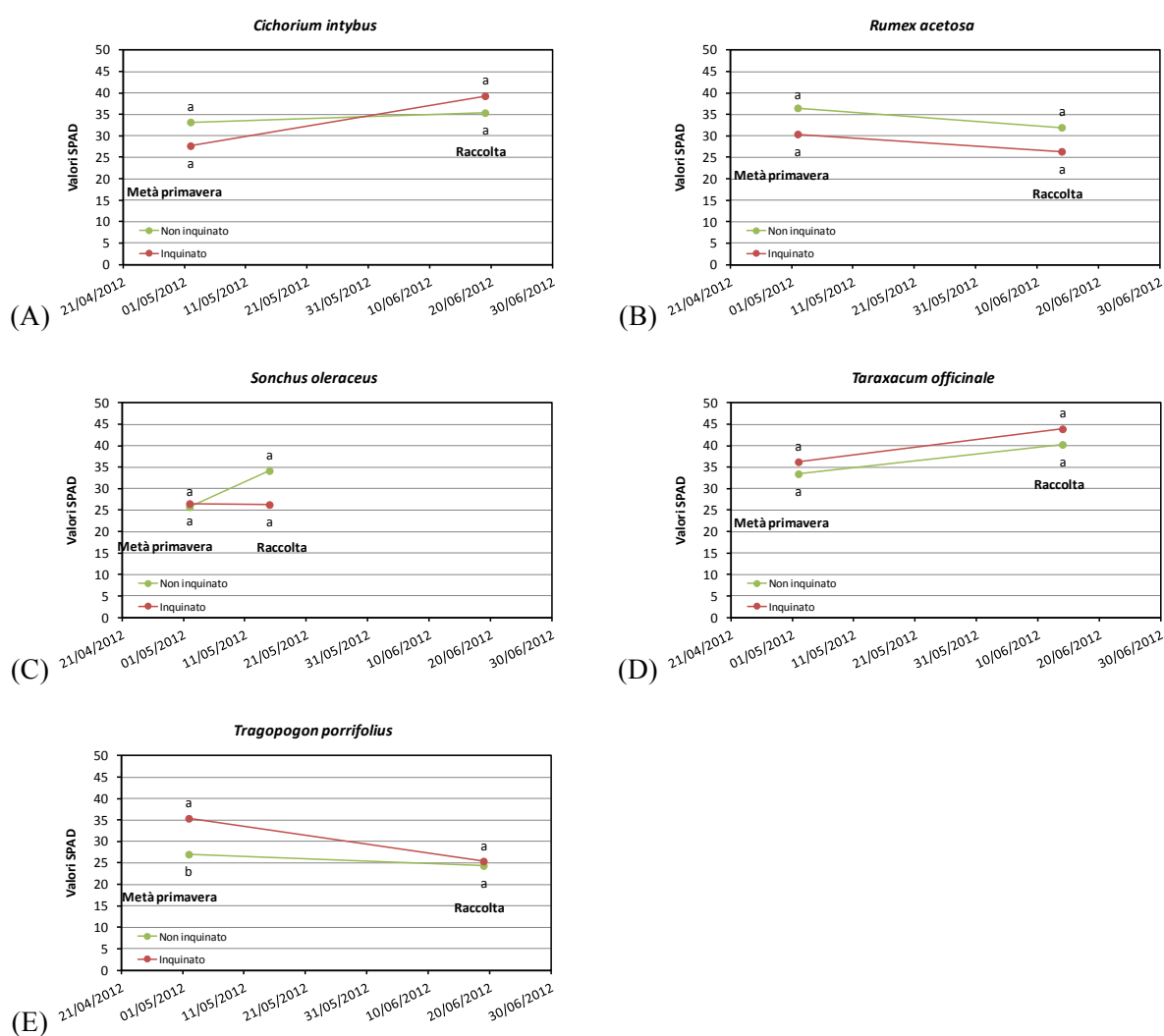


Figura 16. Andamento dei valori SPAD in varie specie coltivate in terreno inquinato in raffronto al controllo. Per ciascuna data di misurazione, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.4 Concentrazioni dei metalli in fittoni, foglie e fusti

Dalla lettura all'ICP-OES, sono state ricavate le concentrazioni di metalli pesanti nelle porzioni epigee (foglie e fusti) ed ipogee (fittoni); il coefficiente di traslocazione (CT) dei metalli dalle radici alla parte epigea è stato calcolato come rapporto della concentrazione rilevata nelle foglie e quella nel fittone. In generale, l'inquinamento ha chiaramente condizionato la concentrazione di metalli accumulati nelle parti aeree e nelle radici delle specie spontanee.

Le piante cresciute in terreno inquinato hanno mostrato concentrazioni di Cd molto più elevate di quelle del controllo sia nella parte aerea che nel fittone (Figura 17). In *T. officinale*, ad esempio, la concentrazione nel fittone era 20 volte superiore al controllo. Le piante hanno evidenziato generalmente concentrazioni abbastanza elevate nella parte aerea, in particolare nelle foglie (Tabella 15), indicando che la traslocazione del metallo è stata elevata, aspetto favorevole in caso di utilizzazione di queste specie per scopi fitoestrattivi.

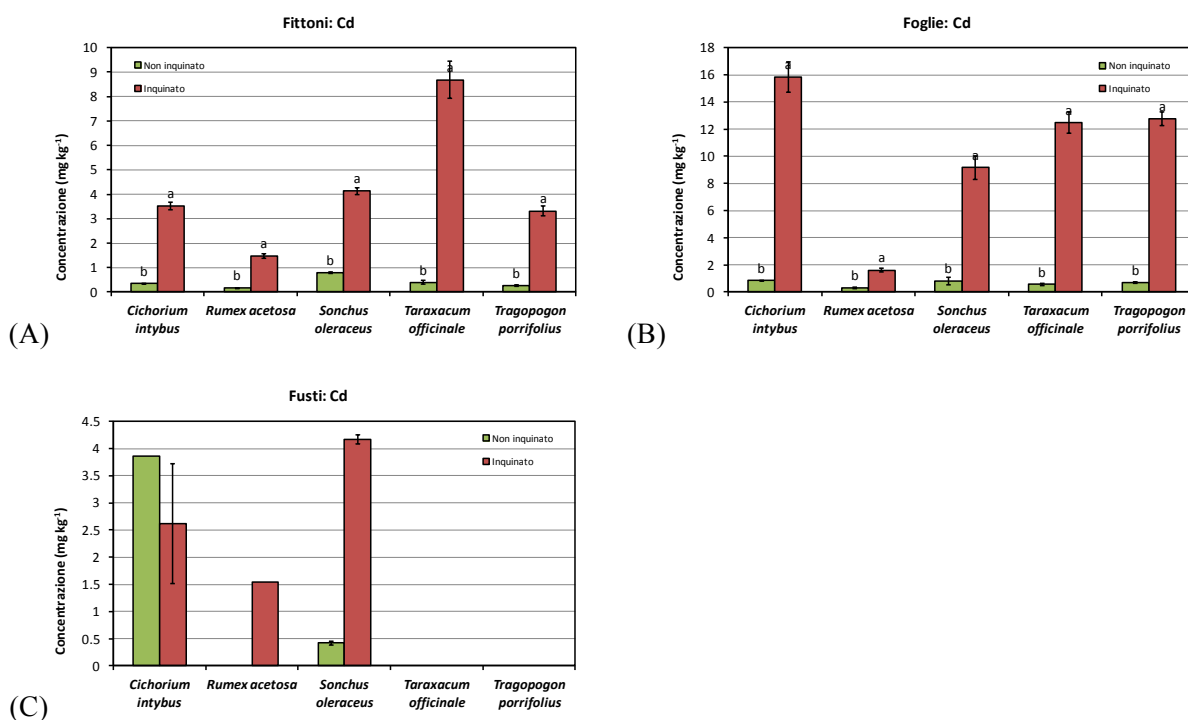


Figura 17. Concentrazione di Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.,  $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) in fittoni (A), foglie (B) e fusti (C) di piante coltivate in terreno inquinato in raffronto al controllo. Per ciascuna specie, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

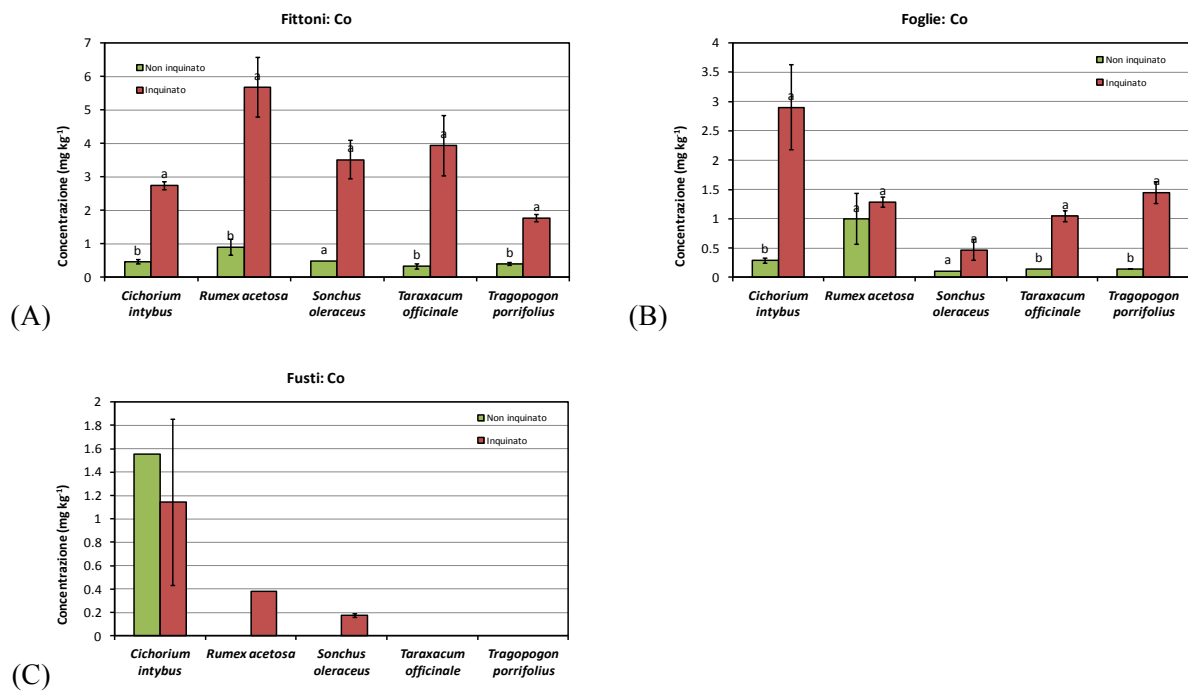


Figura 18. Concentrazione di Co ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.,  $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) in fittoni (A), foglie (B) e fusti (C) di piante coltivate in terreno inquinato da metalli in raffronto al controllo. Per ciascuna specie, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Come si nota in Figura 18, l'accumulo di Co nelle piante coltivate in terreno inquinato è stato superiore rispetto al controllo, anche se tale differenza è risultata meno marcata rispetto a quella riscontrata per il Cd. Nel caso del *S. oleraceus*, ad esempio, non c'è una differenza statisticamente significativa tra i due trattamenti né per la concentrazione del Co fogliare né per quella nel fittone, analogamente ai valori fogliari di *R. acetosa*.

Inoltre, la traslocazione del metallo dal fittone alle foglie è risultata molto scarsa (Tabella 15), con elevata ritenzione nel fittone, ad eccezione del *C. intybus* coltivato in terreno inquinato e del *R. acetosa* cresciuto nel terreno di controllo. Questo è un aspetto importante: a differenza del Cd, il Co è considerato un elemento essenziale per l'uomo, pertanto la sua presenza nelle parti edibili (generalmente le foglie) costituirebbe un miglioramento qualitativo.

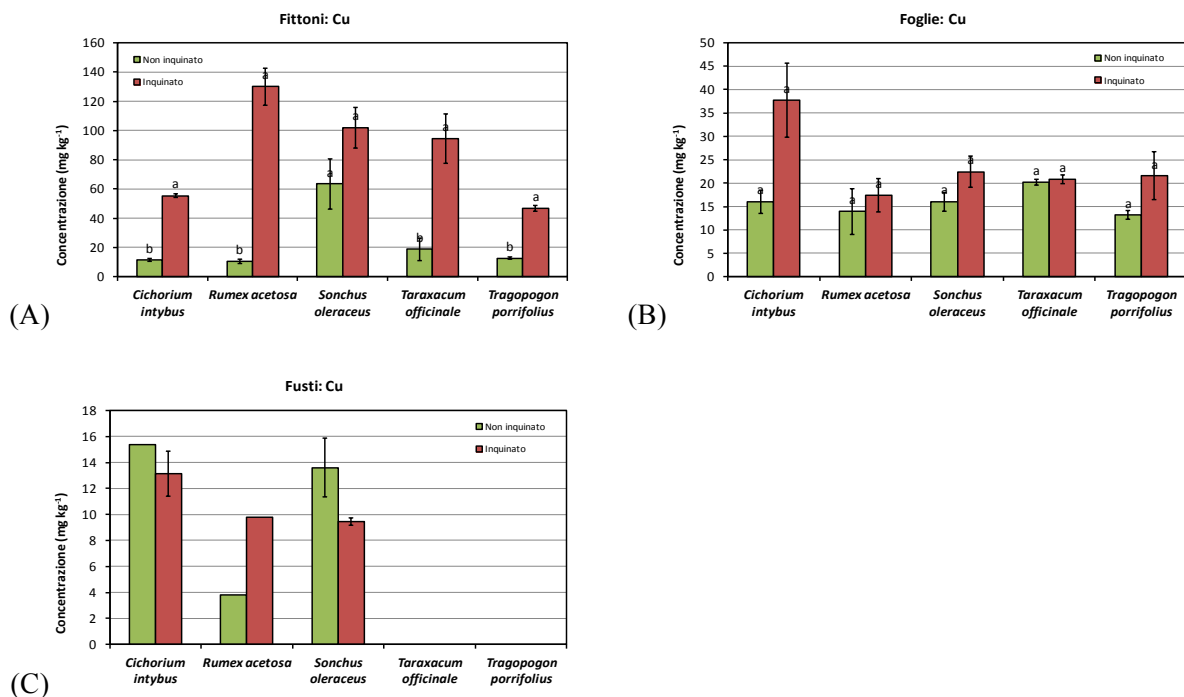


Figura 19. Concentrazione di Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.,  $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) in fittoni (A), foglie (B) e fusti (C) di piante coltivate in terreno inquinato da metalli in raffronto al controllo. Per ciascuna specie, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Per quanto riguarda il Cu, le piante coltivate su terreno inquinato hanno mostrato un accumulo superiore rispetto al controllo solamente nei fittoni (Figura 19). Tra le parti aeree non vi sono state differenze significative tra i trattamenti. Anche in questo caso, la traslocazione del metallo alla parte aerea è stata modesta (Tabella 15), essendoci concentrazioni superiori nei fittoni piuttosto che nelle foglie. Valori superiori a 1 sono stati osservati solamente nel terreno di controllo, ad indicare che la traslocazione di questo elemento viene fortemente limitata oltre una certa soglia di concentrazione nella pianta. Come il Co, anche il Cu è considerato essenziale per l'uomo, quindi la sua presenza nelle foglie è considerata positiva in termini nutrizionali e in ottica di biofortificazione. Nel caso delle specie spontanee analizzate non si sono rilevate differenze tra le piante allevate su terreno inquinato e terreno non inquinato, anche se un'elevata differenza tra le medie è riscontrabile in *C. intybus*.

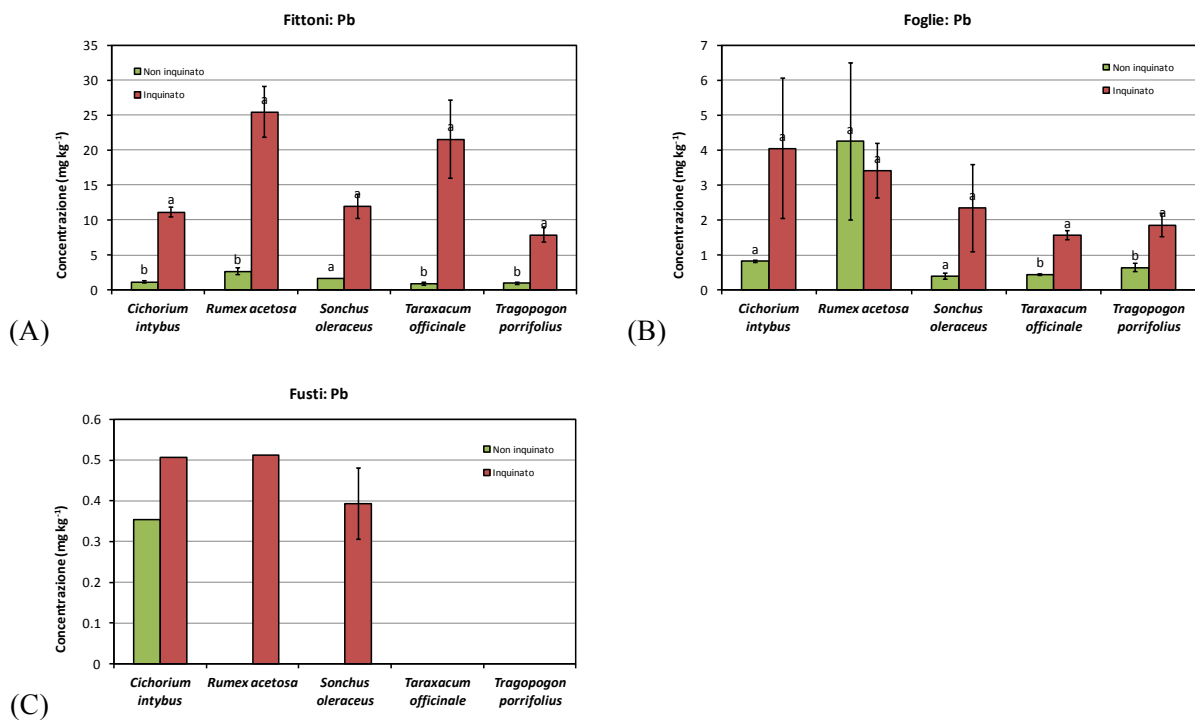


Figura 20. Concentrazione di Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.,  $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) in fittoni (A), foglie (B) e fusti (C) di piante coltivate in terreno inquinato in raffronto al controllo. Per ciascuna specie, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Le specie coltivate in terreno inquinato hanno presentato concentrazioni di piombo superiori rispetto al controllo, soprattutto nei fittoni (Figura 20), con l'unica eccezione del *S. oleraceus*. Nelle foglie invece, ad eccezione di *T. officinale* e *T. porrifolius*, le diverse specie non hanno mostrato differenze significative tra i due trattamenti. La traslocazione del metallo alla parte aerea è risultata piuttosto limitata, come evidenziato per questo metallo anche in altri studi (e.g., Vamerali *et al.*, 2011); solamente nelle piante di controllo di *R. acetosa* si è avuta una discreta traslocazione (Tabella 15). La ritenzione del metallo nei fittoni in presenza dell'inquinante nel terreno rappresenta un fattore favorevole dal punto di vista alimentare: le radici di queste piante in genere non vengono raccolte e consumate come alimento; essendo specie poliennali, la loro persistenza nel terreno potrebbe invece essere utile per stabilizzare questo pericoloso contaminante.

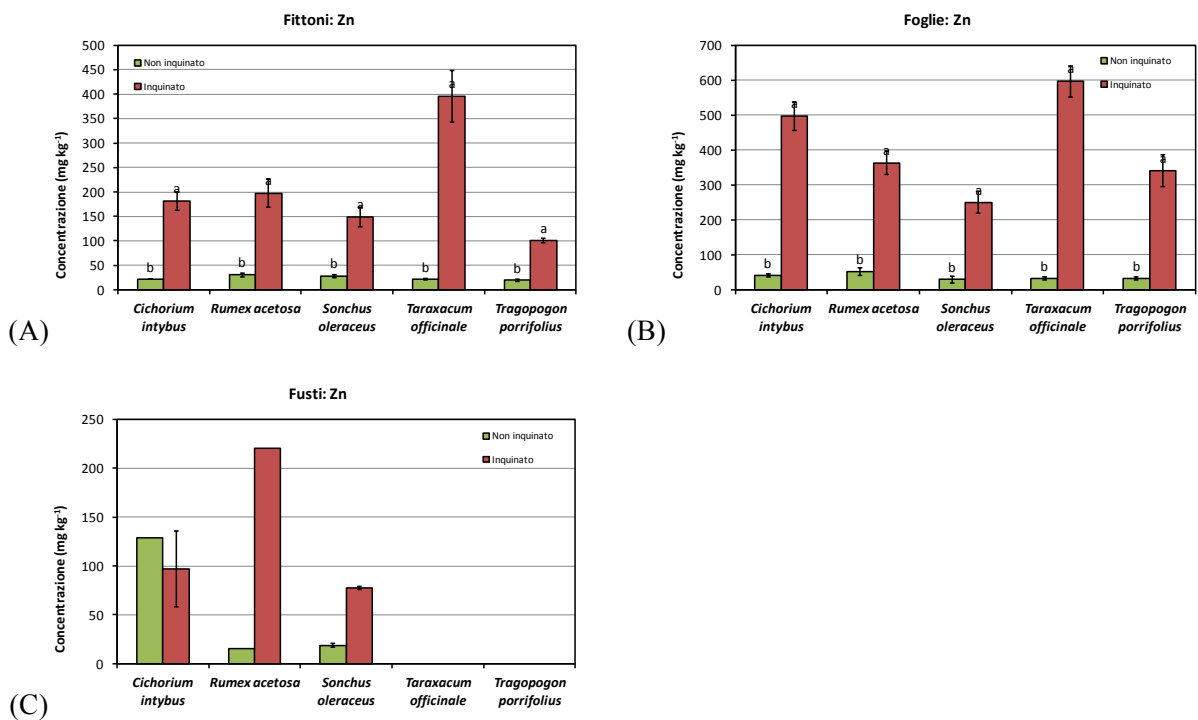


Figura 21. Concentrazione di Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$  s.s.,  $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) in fittoni (A), foglie (B) e fusti (C) di piante coltivate in terreno inquinato in raffronto al controllo. Per ciascuna specie, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Le piante allevate in terreno inquinato hanno presentato concentrazioni di Zn nettamente superiori rispetto al controllo (Figura 21) e *T. officinale* è risultata la specie con la differenza più marcata tra i due trattamenti. La traslocazione alla parte aerea del metallo è stata molto elevata ( $CT > 3$  in *T. porrifolius*, Tabella 15) e la maggiore presenza di metallo nel terreno inquinato ha favorito la sua traslocazione. Lo Zn è considerato elemento essenziale, rendendo queste specie adatte alla biofortificazione.



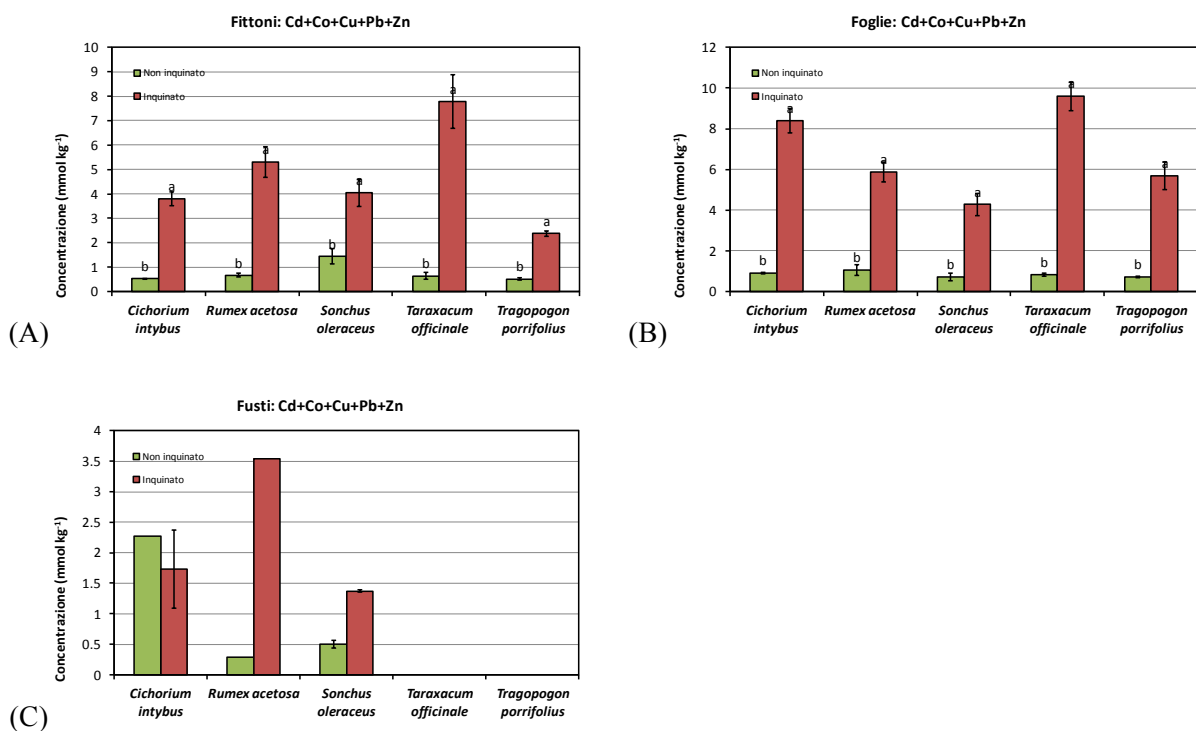


Figura 22. Concentrazione complessiva di 5 metalli (Cd, Co, Cu, Pb, Zn) (mmol kg<sup>-1</sup> s.s.,  $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ) in fittoni (A), foglie (B) e fusti (C) di piante coltivate in terreno inquinato e di controllo. Per ciascuna specie, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Tabella 15. Coefficienti di traslocazione (CT, foglie/fittoni) ( $n = 3$ ) di vari metalli. 5 MP: Cd+Co+Cu+Pb+Zn. In grigio sono evidenziati i valori più elevati per ciascun trattamento; in grassetto i valori di traslocazione superiori all'unità.

	Terreno	<i>Cichorium intybus</i>	<i>Rumex acetosa</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Tragopogon porrifolius</i>	Media specie
Cd	Inquinato	<b>4,49</b>	<b>1,11</b>	<b>2,22</b>	<b>1,45</b>	<b>3,87</b>	<b>2,63</b>
	Non inquinato	<b>2,48</b>	<b>2,06</b>	<b>1,04</b>	<b>1,40</b>	<b>2,70</b>	<b>1,94</b>
Co	Inquinato	<b>1,04</b>	0,24	0,15	0,29	0,83	0,51
	Non inquinato	0,64	<b>1,38</b>	0,00	0,32	0,37	0,63
Cu	Inquinato	<b>0,67</b>	0,14	0,23	0,23	0,47	0,35
	Non inquinato	<b>1,39</b>	<b>1,53</b>	0,28	<b>1,45</b>	<b>1,04</b>	<b>1,14</b>
Pb	Inquinato	<b>0,35</b>	0,15	0,24	0,09	0,26	0,22
	Non inquinato	0,75	<b>1,96</b>	0,21	0,58	0,78	0,96
Zn	Inquinato	<b>2,74</b>	<b>1,92</b>	<b>1,77</b>	<b>1,54</b>	<b>3,36</b>	<b>2,26</b>
	Non inquinato	<b>1,92</b>	<b>1,79</b>	<b>1,02</b>	<b>1,49</b>	<b>1,74</b>	<b>1,59</b>
5 MP	Inquinato	<b>1,71</b>	<b>1,72</b>	0,50	<b>1,37</b>	<b>1,44</b>	<b>1,30</b>
	Non inquinato	<b>2,18</b>	<b>1,10</b>	<b>1,11</b>	<b>1,24</b>	<b>2,35</b>	<b>1,60</b>

Zn e secondariamente Cu sono stati gli elementi più accumulati a livello fogliare (410 e 24 mg kg<sup>-1</sup> s.s., rispettivamente, valori medi delle specie) che nelle radici fittonanti (205 e 86 mg kg<sup>-1</sup> s.s., rispettivamente).

Valutando complessivamente la concentrazione dei 5 metalli si nota chiaramente (Figura 22) che la marcata presenza di inquinanti nel terreno facilita l'assorbimento e l'accumulo nei vegetali. La traslocazione complessiva alla parte aerea è stata buona anche se non molto marcata per alcuni metalli. Tutte le specie hanno traslocato discreti quantitativi di Cd e Zn, mentre Co, Cu e Pb sono stati per lo più accumulati nel fittone, specialmente nella tesi inquinata (Tabella 15).

Tutte le specie studiate, ad eccezione di *T. porrifolius*, sono state classificate in letteratura come piante indicatrici della presenza di metalli (Xiong, 1997; Keane *et al.*, 2001; Del Rio-Celestino, 2006; Zhao *et al.*, 2012). Questi studi, tuttavia, si riferivano ad aree contaminate da ormai lungo tempo e perciò con piante adattate a queste particolari condizioni. In questa tesi i semi sono stati prelevati da piante spontanee cresciute in suoli non contaminati (terreno coltivati), e tutte le specie sono comunque riuscite a crescere e svilupparsi quasi regolarmente anche in condizioni di marcato inquinamento.

Nelle piante oggetto di questa prova, i livelli di Zn sono risultati simili tra le diverse specie, così come quelli di Cd. In alcuni casi lo Zn ha addirittura raggiunto i 400 mg kg<sup>-1</sup> s.s., mentre la massima concentrazione di Cd (~16 mg kg<sup>-1</sup>) si è avvicinata molto alla soglia dei 30 mg kg<sup>-1</sup> s.s., valori indicati in letteratura come soglie di fitotossicità per varie piante (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Tutti questi aspetti, unitamente alla correlazione positiva tra concentrazione di metallo nel terreno e quella nei tessuti vegetali, valide per tutti i metalli con l'unica eccezione del Pb, permettono di confermare queste piante come indicatrici.

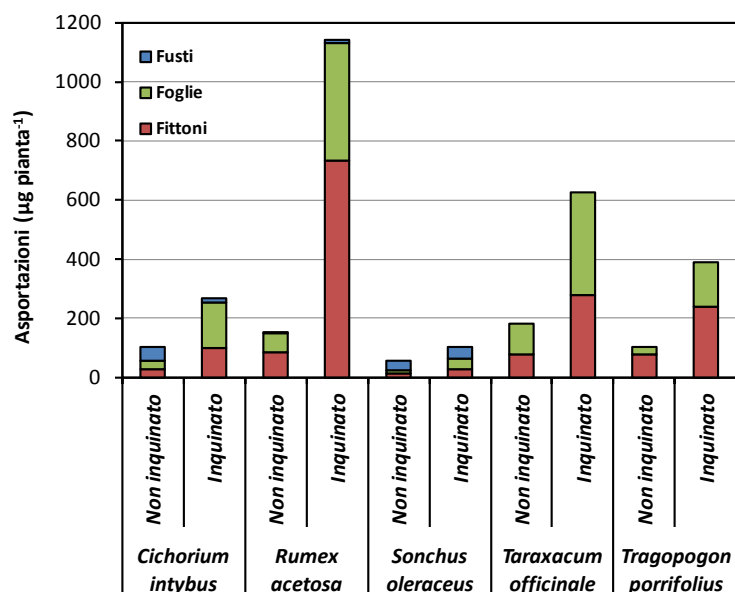


Figura 23. Asportazione complessiva di 5 metalli (Cd+Co+Cu+Pb+Zn) ( $\mu\text{g pianta}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) in fittoni, foglie e fusti di piante coltivate in terreno inquinato rispetto al controllo.

Tabella 16. Significatività del test di Newman-Keuls ( $P \leq 0,05$ ) per l'asportazione complessiva di 5 metalli (Cd+Co+Cu+Pb+Zn) ( $\mu\text{g pianta}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) in fittoni e foglie separatamente, nel confronto fra terreno inquinato e di controllo (lettere minuscole). Lettere maiuscole: confronto tra specie (E.P., effetto principale).

Organo	Specie	Non inquinato	Inquinato	E.P. 'specie'
Foglie	<i>C. intybus</i>	b	a	B
	<i>R. acetosa</i>	b	a	A
	<i>S. oleraceus</i>	a	a	C
	<i>T. officinale</i>	b	a	A
	<i>T. porrifolius</i>	b	a	B
Fittoni	<i>C. intybus</i>	b	a	C
	<i>R. acetosa</i>	b	a	A
	<i>S. oleraceus</i>	a	a	C
	<i>T. officinale</i>	b	a	B
	<i>T. porrifolius</i>	b	a	B

Per poter valutare in un substrato pluricontaminato quale specie sia più efficiente per la sua applicazione in processi di fitoestrazione, le asportazioni dei 5 metalli sono state sommate tra loro, considerando l'intera pianta (Figura 23) o le singole porzioni epigea e radicale (Tabella 16). I valori ottenuti sono stati superiori al controllo, ad eccezione di *S. oleraceus*, che non presentava differenze statisticamente significative tra le medie dei due trattamenti. Nel complesso, *R. acetosa* è stata la specie più efficiente nell'accumulare i metalli

sia nella parte aerea che in quella radicale, asportando fino a 1,2 mg di metalli per pianta, seguita da *T. officinale* con valori pressoché dimezzati (0,6 mg per pianta). Ipotizzando una densità di 15-20 piante di *R. acetosa* per m<sup>2</sup>, si potrebbero accumulare fino a 230 g di vari metalli per ettaro. Un simile quantitativo può essere raggiunto da *T. porrifolius* che, pur asportando solamente un terzo della quantità dell'acetosa, può essere seminato a densità maggiori (40-60 piante m<sup>2</sup>). L'impiego di entrambe queste specie, separatamente o in consociazione potrebbe essere validamente considerato nel predisporre piani di fitorisanamento di terreni contaminati.

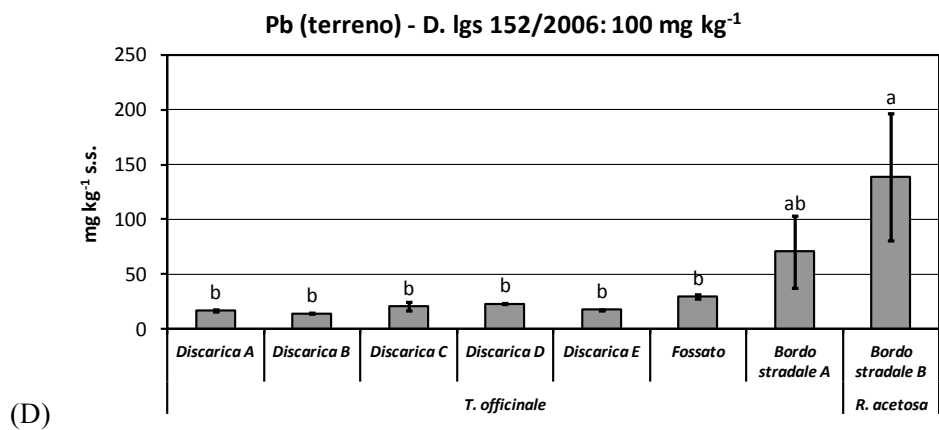
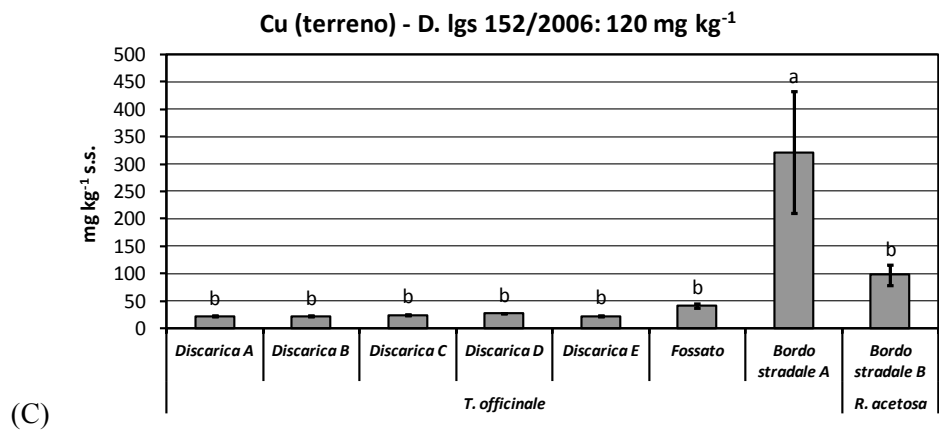
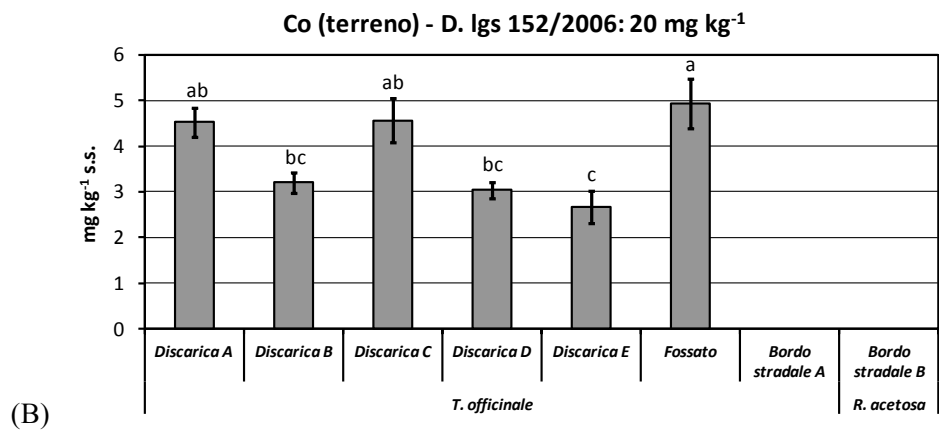
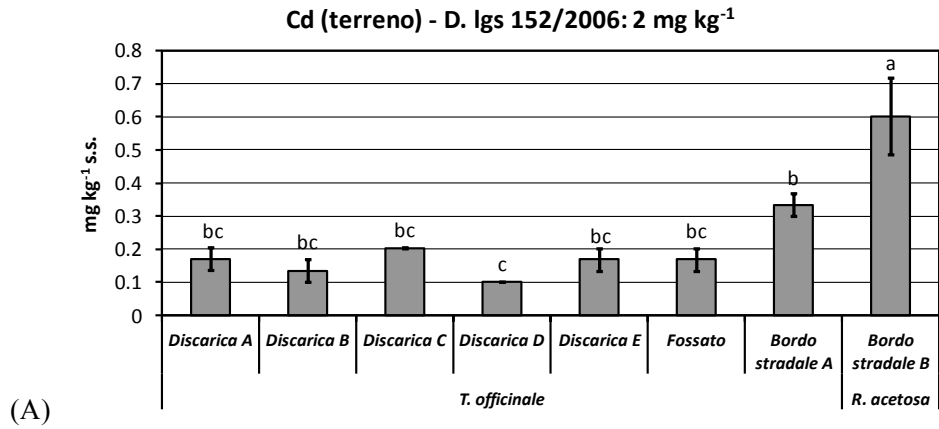
## **4.2 Valutazione di piante alimurgiche in siti potenzialmente a rischio**

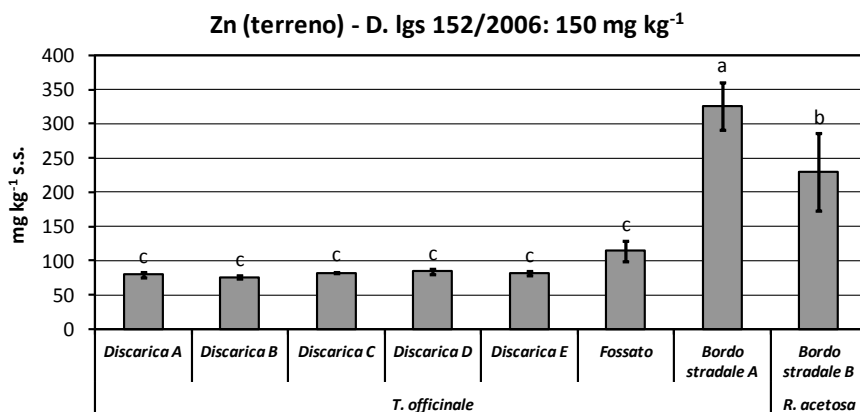
### **4.2.1 Analisi del terreno**

L'analisi dei terreni raccolti nelle diverse località della periferia di Padova hanno evidenziato che solamente in quelli prelevati lungo i bordi stradali la concentrazione di alcuni metalli poteva superare quella massima prevista dal D. Lgs. 152/2006. Come si può vedere dalla Figura 24, il terreno del campione "Bordo stradale A", supera i valori soglia di Cu e Zn, rispettivamente di ben 2,7 e 2,2 volte. Nel sito "Bordo stradale B", invece, sono stati evidenziati valori fuori limite per Pb e Zn: il Pb superava di quasi il 40% il limite di legge e lo Zn del 53%.

Per quanto riguarda il Cd, i valori rilevati nei diversi siti sono risultati molto al di sotto della concentrazione massima ammessa per l'uso a verde pubblico e residenziale (2 mg kg<sup>-1</sup>). Il valore più elevato (0,6 mg kg<sup>-1</sup>) è stato riscontrato comunque nel sito "Bordo stradale B".

È da sottolineare che i campioni di suolo prelevati dai 5 diversi punti (A-E) della discarica presentano per tutti i metalli analizzati valori di gran lunga inferiori ai limiti di legge. Questo fa presupporre che il terreno utilizzato per la copertura finale sia stato prelevato da una zona non contaminata in origine, ma soprattutto smentisce l'ipotesi che vi siano state fuoriuscite incontrollate di percolato dalla massa di rifiuti sottostante.

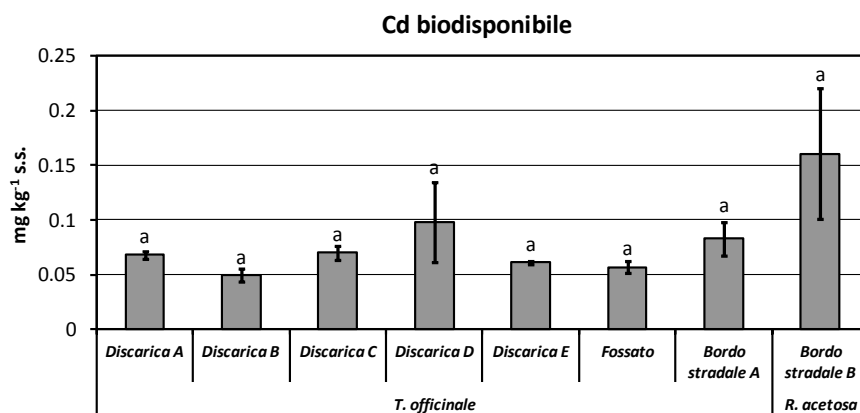




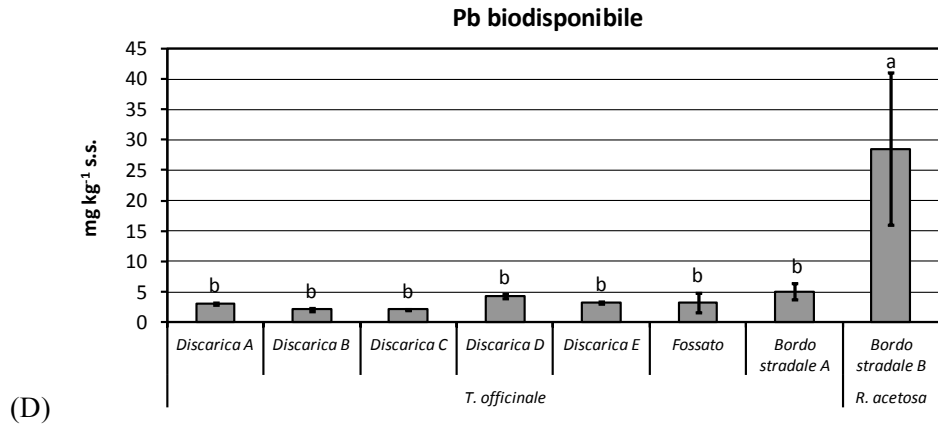
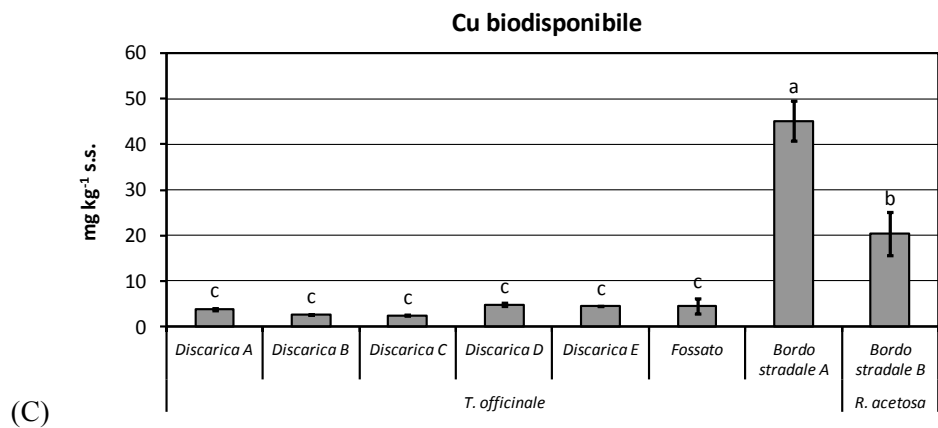
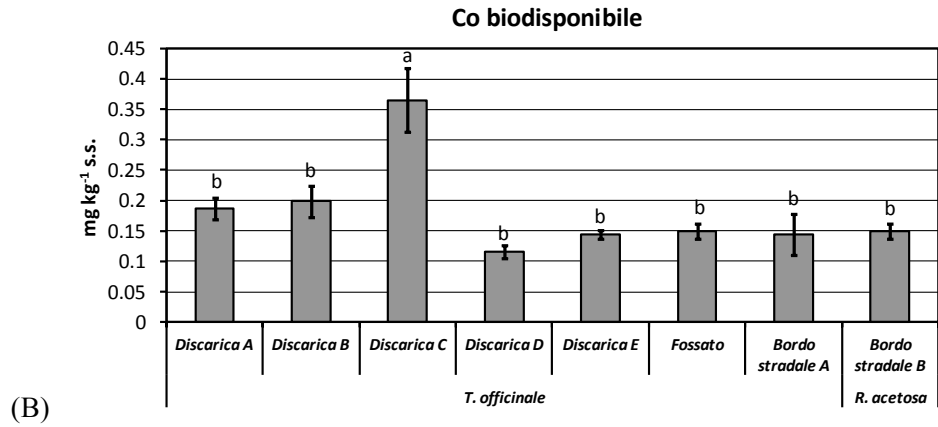
(E)

Figura 24. Concentrazione totale di metalli nel terreno dei diversi siti indagati ( $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i punti di campionamento (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ). Viene riportato il valore limite secondo l'allegato 5 del D. lgs. 152/2006, siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale.

La figura 25 mostra invece le frazioni biodisponibili dei metalli in esame. Confrontando i grafici della concentrazione totale di metalli e quelli della frazione biodisponibile, e dall'analisi della regressione si possono generalmente individuare correlazioni positive significative ( $P \leq 0.001$ ) tra i due valori (Tabella 17): elevate concentrazioni totali corrispondono, ad eccezione del Co, ad alti valori di metallo biodisponibile. È il caso, ad esempio, del Pb nel terreno del campione "Bordo stradale B". La concentrazione totale molto elevata, che superava anche i limiti di legge, faceva sì che anche la biodisponibilità di questo elemento per le piante di *R. acetosa* fosse alta. Nello stesso sito, ciò si può verificare anche nei confronti del Cd. Trattandosi di metalli tossici sia per piante che animali, descritto ciò è da ritenersi pericoloso per i possibili utilizzi alimentari.



(A)



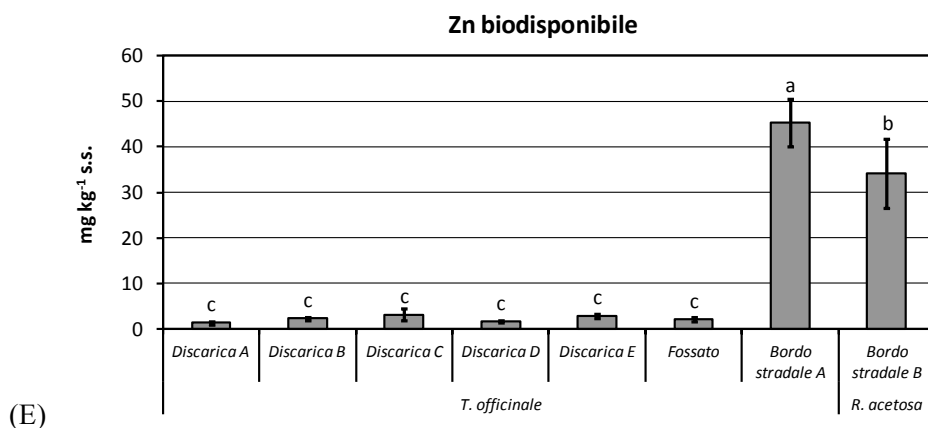


Figura 25. Concentrazione di metalli biodisponibili nel terreno dopo estrazione in DTPA ( $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i punti di campionamento (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ).

Nei siti “Bordo stradale A” e “Bordo stradale B” il Co è risultato al di sotto del limite di rilevabilità dello strumento, mentre l’analisi della frazione biodisponibile ne ha rilevato, seppur in modo minimale, la presenza. La ragione è da attribuire al forte potere estrattivo della soluzione di DTPA preparata per la determinazione della biodisponibilità degli elementi che, in questo caso, è riuscita a fornire un quantitativo di Co rilevabile dallo strumento.

Tabella 17. Coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) e significatività (n.s.:  $P > 0,05$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ) per la correlazione tra concentrazione totale e quella biodisponibile di ciascun metallo nel terreno prelevato dai diversi siti di campionamento. Viene riportata la concentrazione di metalli biodisponibili (percentuale sul totale), media di tutti i siti.

Metallo	$R^2$	P	Biodisponibilità (% sul totale)
Cd	0.56	***	37
Co	0.09	n.s.	5
Cu	0.73	***	16
Pb	0.86	***	15
Zn	0.93	***	6

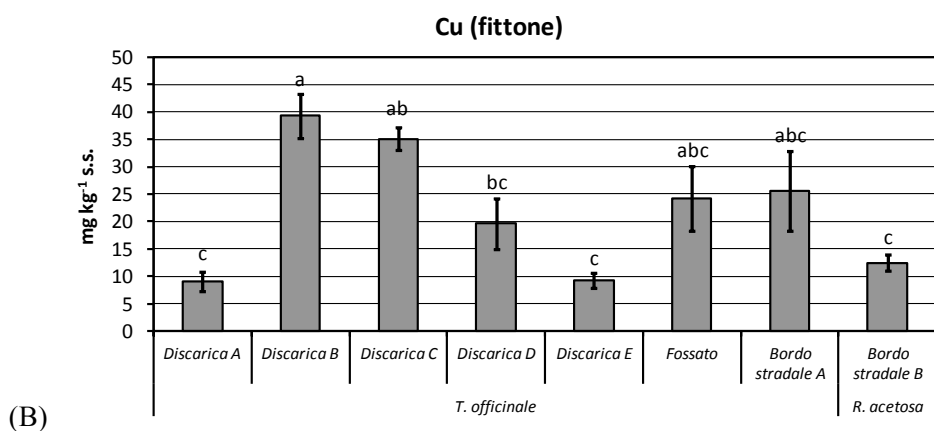
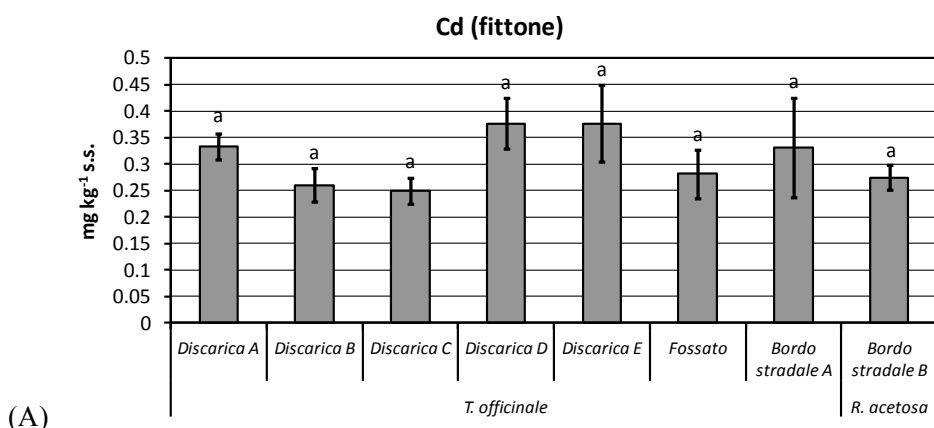
#### 4.2.2 Accumulo di metalli nei vegetali

La concentrazione dei metalli nei tessuti vegetali è risultata diversa a seconda dell’elemento considerato e del sito di campionamento. Nel caso del Pb è stato possibile



correlare la concentrazione di metallo (totale ed estraibile in DTPA,  $P \leq 0,001$ ) del terreno con quella dei tessuti epigei e delle radici. Nonostante la modesta presenza di metalli nel terreno della discarica di Roncayette, alcune zone hanno evidenziato valori apprezzabili nella porzione epigea di *T. officinale* per Cd e Pb (punto “A”), e nella radice per il Cu (punti “B” e “C”). A tale riguardo è utile evidenziare che il punto di campionamento “A” presentava evidente ristagno idrico e vegetazione spontanea più rarefatta che potrebbero aver influito positivamente sull’assorbimento e sulla traslocazione. A questo riguardo, anche le piante raccolte nel fossato di Montà, altro sito con elevata umidità permanente, a valori medio-bassi di concentrazione nel terreno di Cu e Zn sono corrisposti valori di concentrazione tra le più elevati in tarassaco (Figura 26 B, D; figura 27 B, D).

In termini quantitativi, lo Zn è l’elemento che è stato accumulato più abbondantemente nei tessuti della pianta: 63 mg kg<sup>-1</sup> s.s. nei fittoni e 52 mg kg<sup>-1</sup> s.s. nella parte aerea (valori medi delle 3 località). Il Co non è invece stato rilevato all’ICP, essendo presente vegetali nei tessuti vegetali sotto 0,03 mg kg<sup>-1</sup> s.s..



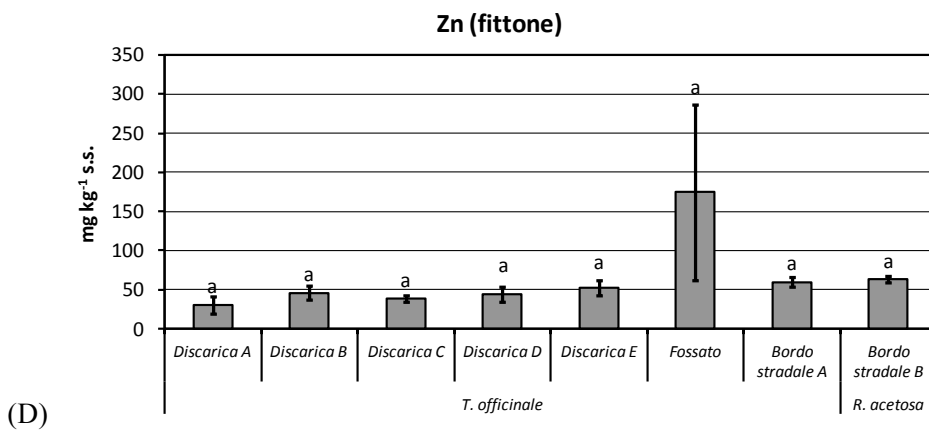
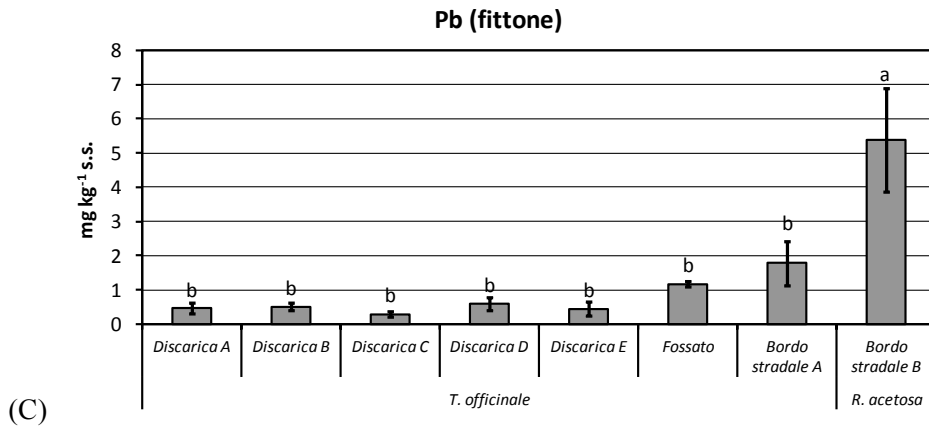
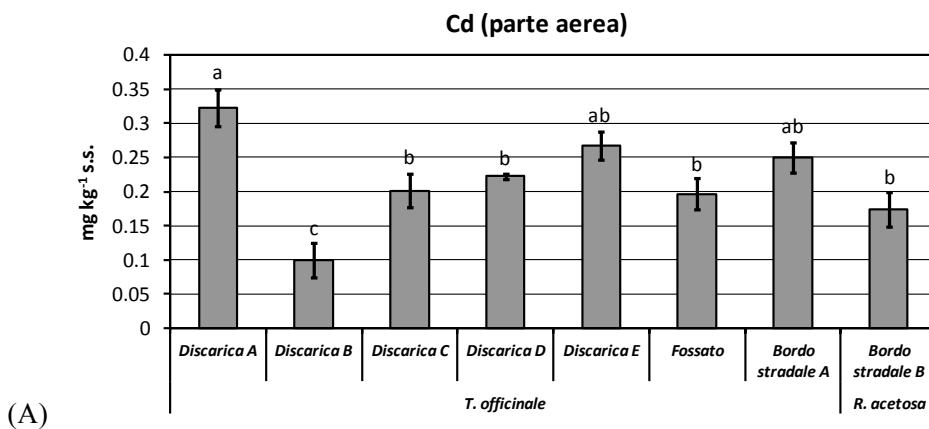


Figura 26. Concentrazione totale di metalli nel fittone della pianta ( $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i punti di campionamento (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ). Il cobalto non è stato rilevato (concentrazione inferiore a  $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ ).



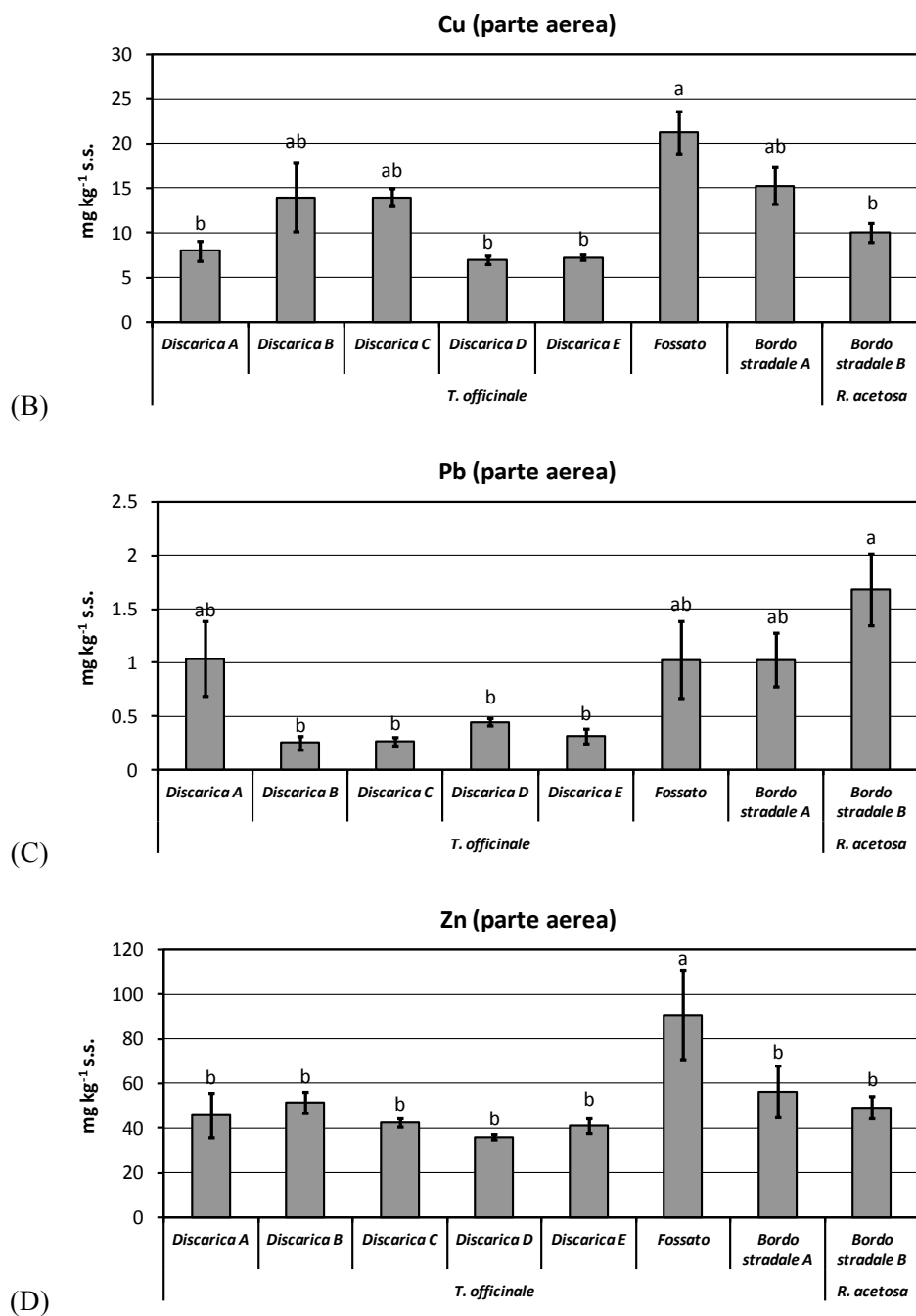


Figura 27. Concentrazione di metalli nella parte aerea della pianta ( $\pm$ E.S.,  $n = 3$ ). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i punti di campionamento (test di Newman-Keuls,  $P \leq 0,05$ ). Il cobalto non è stato rilevato dallo strumento (concentrazione inferiore a  $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Il campionamento è stato mirato su *T. officinale* e la concentrazione di metalli nelle radici è risultata in genere più elevata rispetto a quella misurata nella parte aerea, ma si evidenzia come la traslocazione alla parte epigea sia stata buona e in alcuni casi ha raggiunto valori molto elevati (e.g., Pb e Zn in “Discarica A”) (Tabella 18). Lo Zn si è dimostrato

l'elemento più traslocato dalle radici alla parte aerea in tutte le piante raccolte, con coefficienti inferiori prossimi o superiori ad 1, il Pb invece ha raggiunto il valore più alto in assoluto (2,59) nel sito "A" della discarica.

I risultati ottenuti in ambienti non controllati evidenziano l'assenza di una vera e propria contaminazione da metalli pesanti ma discreti accumuli da parte del tarassaco e dell'acetosa. Sebbene non possano essere considerate iperaccumulatrici, la buona traslocazione alla parte aerea dello Zn è da ritenere positiva per la sua fitoestrazione, mentre l'accumulo degli altri elementi prevalentemente a livello radicale le rende interessanti per la fitostabilizzazione *in planta*. La presenza di piante spontanee in aree degradate porta evidentemente anche altri benefici ambientali, riducendo la lisciviazione dei metalli nei corpi idrici sotterranei e superficiali e limitando la loro dispersione attraverso l'erosione provocata da acqua e vento.

Tabella 18. Coefficienti di traslocazione (CT, foglie/fittoni) ( $n = 3$ ) dei metalli dalla radice alla parte aerea. In grassetto sono evidenziati i valori più rilevanti ( $> 0,8$ ).

Specie	Località	Cd	Cu	Pb	Zn
<i>T. officinale</i>	Discarica A	<b>0,99</b>	<b>0,90</b>	<b>2,59</b>	<b>1,87</b>
	Discarica B	0,38	0,34	0,48	<b>1,19</b>
	Discarica C	<b>0,84</b>	0,40	0,74	<b>1,13</b>
	Discarica D	0,61	0,42	<b>0,94</b>	<b>0,94</b>
	Discarica E	0,74	<b>0,83</b>	<b>0,87</b>	<b>0,82</b>
	Fossato	0,71	<b>0,97</b>	<b>0,90</b>	<b>1,04</b>
	Bordo stradale A	<b>0,94</b>	0,68	0,63	<b>0,93</b>
<i>R. acetosa</i>	Bordo stradale B	0,66	<b>0,81</b>	0,33	<b>0,79</b>
MEDIA		0,73	0,67	<b>0,94</b>	<b>1,09</b>

### 4.3 Valutazione dei rischi alimentari

I grafici presentati nei paragrafi precedenti, illustrano le concentrazioni dei metalli presenti nelle piante riferendosi al peso secco, mentre il regolamento CE 1881/2006 indica i tenori massimi ammissibili negli alimenti di origine vegetale espressi sul peso fresco; in particolare, i limiti di Cd e Pb negli ortaggi a foglia è rispettivamente di 0,20 mg Cd kg<sup>-1</sup> P.F. e 0,30 mg Pb kg<sup>-1</sup> P.F. (Tabella 5).

In Tabella 19 vengono riportate le concentrazioni di Cd e Pb, espresse sul peso fresco, nelle foglie delle piante provenienti sia dalla prova in vaso che dai campionamenti nei diversi siti. Le foglie rappresentano frequentemente la parte edibile di queste piante, sulla quale sono stati rilevati valori fuori limite.

Tabella 19. Concentrazioni in foglie di Cd e Pb, espresse sul peso fresco (mg kg<sup>-1</sup> P.F., *n* = 3). In grigio vengono evidenziati i valori superiori al limite di legge secondo il regolamento CE 1881/2006 (Cd: 0,20 mg kg<sup>-1</sup> P.F.; Pb: 0,30 mg kg<sup>-1</sup> P.F.; Cfr. Tabella 5).

Terreno		<i>Cichorium intybus</i>	<i>Rumex acetosa</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Tragopogon porrifolius</i>
Cd	Inquinato (vaso)	2,90	0,26	1,95	2,08	3,02
	Non inquinato (vaso)	0,19	0,05	0,18	0,11	0,18
	Discarica A				0,06	
	Discarica B				0,02	
	Discarica C				0,04	
	Discarica D				0,04	
	Discarica E				0,05	
	Fossato				0,04	
	Bordo stradale A				0,05	
	Bordo stradale B		0,03			
Pb	Inquinato (vaso)	0,74	0,55	0,50	0,26	0,44
	Non inquinato (vaso)	0,18	0,68	0,09	0,08	0,16
	Discarica A				0,21	
	Discarica B				0,05	
	Discarica C				0,05	
	Discarica D				0,09	
	Discarica E				0,06	
	Fossato				0,21	
	Bordo stradale A				0,21	
	Bordo stradale B		0,34			

Si può constatare che, nella prova in vaso, le piante coltivate su terreno inquinato hanno presentano una concentrazione di Cd e Pb nelle parti fogliari sempre superiore ai limiti di legge, ad eccezione del tarassaco per il piombo. Pur non essendo specie iperaccumulatrici, l'accumulo di questi metalli è sufficiente per rendere il consumo alimentare di queste erbe spontanee poco sicuro in caso di raccolte fatte in terreni inquinati. Tra l'altro, *R. acetosa* ha presentato un accumulo pericoloso di Pb nelle foglie anche quando coltivata in terreno non inquinato (vasi di controllo), fenomeno verosimilmente dovuto alla buona traslocazione (CT prossimo a 1) che queste specie hanno dimostrato (Tabella 15).

Le piante alimurgiche vengono solitamente raccolte come specie infestanti nei terreni coltivati, ma spesso sono piante ruderali che ben si adattano in ambienti urbani e suburbani in vicinanza a fonti d'inquinamento, come strade e siti industriali. Questo aspetto è da

considerare con le dovute attenzioni poiché, sebbene raccolte in ambienti ritenuti sicuri dal punto di vista normativo, queste piante potrebbero contenere quantitativi pericolosi di metalli tossici.

## 5 Conclusioni

L'inquinamento da metalli pesanti è oggi uno dei maggiori problemi che si riscontrano nei terreni che, oltre a una contaminazione di origine naturale, possono ricevere ingenti quantità di elementi tossici attraverso le concimazioni, le acque di irrigazione e l'uso di fitofarmaci. L'utilizzo di specie spontanee per la bonifica di questi terreni potrebbe rappresentare una strategia economica ed ecocompatibile nelle tecnologie di fitoestrazione e fitostabilizzazione.

Le piante alimurgiche studiate hanno dimostrato in generale una buona tolleranza e sopravvivenza in presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti nel terreno, subendo solo una modesta riduzione del contenuto di clorofilla fogliare e di accrescimento epigeo. Più marcato è stato invece l'effetto sulle caratteristiche morfologiche degli apparati radicali. È stato osservato un aumento del diametro radicale, una riduzione della lunghezza e dell'approfondimento, fattori questi che possono limitare l'ingresso dei metalli nella pianta (meccanismo di difesa), ma allo stesso tempo limitare l'efficienza nella fitoestrazione. Gli effetti sulle radici sono stati più o meno evidenti in funzione dalla specie, con *Sonchus oleraceus* e *Taraxacum officinale* maggiormente sensibili e una buona tolleranza di *Tragopogon porrifolius*.

Anche se queste specie non possono essere considerate iperaccumulatrici di metalli pesanti, l'elevata traslocazione di Cd e Zn alla parte epigea è un aspetto positivo per la fitoestrazione di questi metalli, mentre la ritenzione di Pb e Cu nei fittoni le rende adatte alla fitostabilizzazione *in planta*. La scelta di specie spontanee nei programmi di fitorisanamento rappresenta una maggiore garanzia di successo nell'insediamento della copertura vegetale rispetto a piante agrarie, con tutti i vantaggi di una vegetazione spontanea nel limitare la dispersione degli inquinanti attraverso lisciviazione e percolazione idrica o erosione eolica.

Questo studio ha evidenziato le difficoltà che la contemporanea contaminazione da metalli essenziali e tossici per gli organismi animali pone nei confronti della biofortificazione. Il rischio che elevate quantità di metalli tossici, come Pb e Cd, entrino nella catena alimentare è fondato, dal momento che l'accumulo di metalli nelle parti edibili delle piante è risultato

fuori limite di legge anche in terreno non contaminato (soprattutto per il Pb). Va da sé che le modalità di preparazione alimentari di questi vegetali possono influire significativamente sulla perdita degli inquinanti; ad esempio, tramite bollitura si può avere una perdita importante di metalli nell'acqua di cottura attraverso il processo di *ion leakage*.

Anche se il consumo di specie alimurgiche non è predominante nella dieta, la presente sperimentazione lascia intravedere possibili applicazioni di biofortificazione per l'uomo o gli animali o per il compostaggio, ma quasi esclusivamente per lo Zn e per alcune specie soltanto (es., *C. intybus*, *T. officinale*, *T. porrifolius*), il Co.

A livello normativo, la Commissione del Ministero dell'Ambiente sta lavorando alla modificazione della Legge 152/2006, ed in particolare sulla possibile abolizione dell'allegato 5 inerente ai limiti massimi di contenuto totale di metalli pesanti nei terreni, ponendo una maggiore attenzione sulla frazione biodisponibile. Così come evidenziato in questo lavoro di tesi, la quantità totale di metalli è spesso correlata con la frazione biodisponibile, ma non sempre con la quantità di metalli assorbiti e accumulati dalle piante. In questo senso, la nuova normativa verosimilmente considererà i valori dell'attuale allegato A come soglie di allarme, ma demanderà all'analisi delle frazioni biodisponibili la valutazione effettiva di pericolosità alla coltivazione e di possibile rischio per la catena alimentare.



## 6 Bibliografia

- Aciksoz SB, Yazici A, Ozturk L, Cakmak I, 2011. Biofortification of wheat with iron through soil and foliar application of nitrogen and iron fertilizers. *Plant Soil* 349: 215-225.
- Adriano DC, 1986. Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer-Verlag, Berlin.
- Aksoy A, 2008. Chicory (*Cichorium intybus* L.): a possible biomonitor of metal pollution. *Pak. J. Bot.* 40: 791-797.
- Alloway BJ, 1995. Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and Professional, London.
- Anderson TA, Coats JR, 1995. An Overview of microbial degradation by the rhizosphere and its implications for bioremediation. In: Skipper HD, Turco RF (eds) *Bioremediation: Science and Applications*. SSSA, ASA, and CCS, Madison, 135-143.
- Arduini I, Masoni A, 2002. Fitodepurazione. *Rivista di Agronomia* 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 Environment* 319: 13-25.
- Aspetti GP, Beltrami P, Capri E, 2002. I metalli pesanti nell'ambiente. In: Capri E, Trevisan M (a cura di) *I Metalli Pesanti di Origine Agricola nei Suoli e nelle Acque Sotterranee*. Pitagora Editrice, Bologna, 1-57.
- Baker AJM, 1981. Accumulator and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3: 643-654.
- Baker AJM, Brooks RR, 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- Baker AJM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC, 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Bañuelos G (eds) *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis Publ, Boca Raton: 85-107.
- Baker AJM, Proctor J, 1990. The influence of cadmium, copper, lead and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant Systematics and Evolution* 173: 91-108.
- Baker AJM, Walker PL, 1989. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw A (ed) *Heavy Metal Tolerance in Plants - Evolutionary Aspects*. CRC press, Boca Raton, Florida, 155-178.
- Bandiera M, Mosca G, Vamerali T (2009) Humic acids affect root characteristics of fodder radish (*Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers.) in metal-polluted wastes. *Desalination* 247: 79-92.
- Barbafieri M, 2005. *Phytoremediation in: Bonifica dei siti contaminati*, McGraw-Hill.

- Bargellini A, 1998. Chimica, Società e Ambiente. Signorelli Editore, Milano.
- Barrutia O, Epelde L, García-Plazaola JI, Garbisu C, Becerril JM, 2009. Phytoextraction potential of two *Rumex acetosa* L. accessions collected from metalliferous and non-metalliferous sites: Effect of fertilization. *Chemosphere* 74: 259-264.
- Bech J, Duran P, Roca N, Poma W, Sánchez I, Barceló J, Boluda R, Roca-Pérez L, Poschenrieder C, 2012. Shoot accumulation of several trace elements in native plant species from contaminated soils in the Peruvian Andes. *J. Geochem. Explor.* 113: 106-111.
- Brooks RR, Chambers MF, Nicks LJ, Robinson BH, 1998. Phytomining. *Trends Plants Sci.* 3: 359-362.
- Burken JG, Schnoor JL, 1997. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees, *Environ. Sci. Technol.* 31: 1399-1406.
- Cakmak I, Kalayci M, Kaya Y, Torun AA, Aydin N, Wang Y, Arisoy Z, Erdem H, Yazici A, Gokmen O, Ozturk L, Horst WJ, 2010. Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9092-9102.
- Calace N, Petronio BM, Pietroletti M, Deriu D, Pompili L, 2004. Treatment of heavy metal contaminated soils to reduce metal uptake by cultivation. *Recent Research Developments in Agronomy and Horticulture Vol 1*: 29-46.
- Cao G, Concas A, Muntoni A, Grosso B, 2002. Nuove tecnologie per la bonifica e il ripristino ambientale di siti contaminati. *Chimica news ambiente*, 7: 16-17.
- Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Ma B, Wan L, 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters* 163: 109-120.
- Clemens S. 2001. Molecular mechanism of plant tolerance and homeostasis: a review. *Planta* 212: 457-486.
- Clemens S, 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719.
- Cobbett CS, 2000. Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123: 825-832.
- Commissione della Comunità Europea, 2002. Comunicazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento europeo, al Comitato Economico e Sociale e al Comitato delle Regioni: verso una strategia tematica per la protezione del suolo. COM (2002) 179 definitivo, del Consiglio 16 aprile 2002.
- Cunningham SD, Berti WR, Huang JW, 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 13: 393-397.
- Cunningham SD, Ow DW, 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110: 715-719.
- Cunningham SD, Shann JR, Crowley D, Anderson TA, 1997. Phytoremediation of contaminated water and soil. In: Krueger EL, Anderson TA, Coats JP, (eds.) *Phytoremediation of soil and water contaminants*. American Chemical Society, Washington DC, USA: 2-19.
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Testo unico ambientale.

- Decreto Ministeriale 25 ottobre 1999, n. 471. Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica ed il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del Decreto Legislativo del 5 febbraio 1997, n°22 e successive modificazioni ed integrazioni.
- 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.
- Dietz AC, Schnoor JL, 2001. Advances in phytoremediation. *Environ Health Perspect* 109: 163-168.
- Duffus JH, 2002. "Heavy metals" - A meaningless term? *Pure Appl Chem* 74. 793-807.
- EEA, 2011. Progress in management of contaminated sites (LSI 003) - Assessment published May 2014. European environment agency. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment#toc-5>. Consultato il 10/07/2014.
- Ernst WHO, Knolle F, Kratz S, Schnug E, 2004. Aspects of ecotoxicology of heavy metals in the Harz region - a guided excursion. *Lanbauforsch. Völk.* 54: 53-71.
- Ferrero M, 2007. *Andar per Erbe. Raccolta e Cucina di Comuni Piante Spontanee*. Graphot Editrice, Torino.
- Gabbrielli R, Galardi F, 2004. I metalli pesanti negli organismi vegetali. In: Zerbi G, Marchiol L (a cura di) *Fitoestrazione dei Metalli Pesanti. Contenimento del Rischio Ambientale e Relazioni Suolo-Microorganismi-Pianta*. Forum Editrice, Udine.
- 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.
- Gisbert, C, Ros R, De Haro A, Walker DJ, Pilar Bernal M, Serrano R, Avino JN, 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 440-445.
- Gobran G, Wenzel WW, Lombi E, 2001. *Trace elements in the rhizosphere*, CRC Press LCC, Boca Raton, FL.
- Goldberg LF, Zaccheo P, 1998. Inquinamento del suolo. In *Ecologia applicata*, Ed. UTET, Milano: 461-486.
- Greger M, Landberg T, 1999. Use of willow in phytoextraction. *Phytoremediation: how plants can help in cleaning the environment. A workshop held during INTECOL 98, the international conference of ecology, Florence, Italy. International Journal of Phytoremediation*, 1: 2, 115-123.
- Halliwell B, Gutteridge MC, 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
- Hernandez-Pinero JL, Maiti RK, Verde-Star MJ, Garcia-Diaz G, Nunez-Gonzalez A, Cardenas-Avila ML, Foroughbakhch R, 2002. Potential use of *Phaseolus vulgaris* L., *Avena sativa* L. and *Medicago sativa* L. in the removal of lead and cadmium from soil. *Crop Research Hisar*, 24: 3, 449-452.
- Jomova Y, Valko M, 2001. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283: 65-87.

- Kabata-Pendias A, Pendias H, 2001. Trace elements in soils. 3rd edition. CRC Press., Boca Raton, FL.
- Kashem MA, Singh BR, 2002. The effect of fertilizer additions on the solubility and plant-availability of Cd, Ni and Zn in soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 62: 287-296.
- Keane B, Collier MH, Shann JR, Rogstad SH, 2001. Metal content of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves in relation to soil contamination and airborne particulate matter. *Sci. Total Environ.* 281: 63-78.
- Konica Minolta, 1989. Chlorophyll Meter SPAD-502 - Instruction Manual. Konica Minolta Sensing Ltd., Japan.
- Krämer U, Smith RD, Wenzel W, Raskin I, Salt DE, 1997. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology*, 115: 1641-1650.
- Kumar PBNA, Dushenkov V, Motto H, Raskin I, 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29: 1232-1238.
- Kupper H, Setlik I, Setlikova E, Ferimazova N, Spiller M, Kupper FC, 2003. Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Funct. Plant Biol.* 30: 1187-1196.
- Kuzovkina YA, Knee M, Quigley MF, 2004. Cadmium and copper uptake and translocation in five willow (*Salix* L.) species. *International Journal of Phytoremediation* 6 (3): 269-287.
- Laureysens I, De Temmerman L, Hastir T, Van Gysel M, Ceulemans R, 2005. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environmental pollution* 133(3): 541-551.
- Lee J, Reeves RD, Brooks RR, Jafik T, 1978. The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. *Phytochemistry* 17: 1033-1035.
- Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA, 2000. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rondy) plants grown in NFT system. I. Copper uptake and distribution in plants. *Plant Soil* 221: 135-142.
- Lindsay WL, Norwell WA, 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J* 42: 421-428.
- Liphadzi MS, Kinkham MB, 2005. Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals: a technology for rehabilitation the environment. *South African Journal of Botany* 71: 24-37.
- Loh FCW, Grabosky JC, Bassuk NL, 2002. Using the SPAD 502 meter to assess chlorophyll and nitrogen content of benjamin fig and cottonwood leaves. *HortTechnology* 12: 682-686.
- López-Millán AF, Morales F, Gogorcena Y, Abadía A, Abadía J, 2009. Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *J. Plant Physiol.* 166: 375-384.

- Macnair M, 1993. Tansley review no.49, The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist* 124: 541-559.
- Malizia D, Giuliano A, Ortaggi G, Masotti A, 2012. Common plants as alternative analytical tools to monitor heavy metals in soil. *Chem. Cen. J.* 6: 1-10.
- Marmioli M, Antonioli G, Maestri E, Marmioli N, 2005. Evidence of the involvement of plant lingo-cellulosic structure in the sequestration of Pb, an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environ. Pollut.* 132: 217-227.
- Marschner H, 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.
- Martens SN, Boyd RS, 1994. The ecological significance on nickel hyperaccumulation: a plant chemical defence. *Oecologia* 98: 379-384.
- Martin HW, Young TR, Kaplan DI, Simon L, Adriano DC, 1996. Evaluation of three herbaceous index plant species for bioavailability of soil cadmium, chromium, nickel and vanadium. *Plant Soil* 182: 199-207.
- Molas J, Baran S, 2004. Relationship between the chemical form of nickel applied to the soil and it's uptake and toxicity to barley plants (*Hordeum vulgare* L.). *Geoderma* 122(2/4): 247-255.
- Morris J, Hawthorne KM, Hotze T, Abrams SA, Hirschi KD, 2008. Nutritional impact of elevated calcium transport activity in carrots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 1431-1435.
- Mosca G, Vamerli T, Ganis A, Coletto L, Bona S, 2004. Miglioramento dell'efficienza agronomica della fitodecontaminazione di metalli pesanti. In: Zerbi G, Marchiol L (a cura di) *Fitoestrazione di Metalli Pesanti - Contenimento del Rischio Ambientale e Relazioni Suolo-Microrganismi-Pianta*. Forum Editrice, Udine: 105-135.
- Mulligan CN, Young RN, Gibbs BF, 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soil and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60: 193-207.
- Munns R, 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
- Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C, 2004. Fitoestrazione assistita e meccanismi di tolleranza ai metalli. In: Zerbi G, Marchiol L (a cura di) *Fitoestrazione di Metalli Pesanti - Contenimento del Rischio Ambientale e Relazioni Suolo-Microrganismi-Pianta*. Forum Editrice, Udine: 49-76.
- Nigam R, Srivastava S, Prakash S, Srivastava MM, 2001. Cadmium mobilisation and plant availability - The impact of organic acids commonly exuded from roots. *Plant Soil* 230: 107-113.
- Nriagu J, 2007. Zinc Toxicity in Humans. In: J. Nriagu (ed.) *Encyclopedia of environmental health*. Elsevier B.V., Amsterdam, NL: 1-7.
- Oliveira MRG, van Noordwijk M, Gaze SR, Brower G, Bona S, Mosca G, Hairiah K, 2000. Auger sampling, in-growth cores and pinboard methods. In Smit AL, Engels C, Bengough G, van Noordwijk M, Pellerin S, van de Geijn S, (eds.) *Root growth and fuction: a handbook of methods*. Springer-Verlag, Heidelberg: 175-210.
- Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, Gomez E, Tiemann KJ, Parsons JG, Carrillo G, 2002. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfaalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution* 119(3): 291-301.

- Petruzzelli G, Pedron F, 2007. Meccanismi di biodisponibilità nel suolo di contaminanti ambientali persistenti. In: Comba P, Bianchi F, Iavarone I, Pirastu R (a cura di) *Impatto sulla Salute dei Siti Inquinati: Metodi e Strumenti per la Ricerca e le Valutazioni*. Rapporti ISTISAN 07/50: 68-75.
- Pietrelli L, Ciferri F, Giancanelli V, Menegoni P, Farneti T, Modestia F, Salluzzo A, 2004. Accumulo di metalli pesanti in piante erbacee spontanee. *Acqua&Aria* 9: 24-29.
- Prasad MNV, Freitas HMO, 2003. Metals hyperaccumulation in plants - biodiversity prospecting phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6 (3): 285-321.
- Pulford ID, Watson C, 2003. Phytoremediation of heavy metal contaminated by trees - a review. *Environment International* 29 (4): 529-540.
- Radaelli L, Calamai L, 2001. *Chimica del terreno*. Ed. Piccin Nuova Librai s.p.a., Padova.
- Radulescu C, Stihl C, Barbes L, Chilian A, Chelarescu DE, 2013. Studies concerning heavy metals accumulation of *Carduus nutans* L. and *Taraxacum officinale* as potential soil bioindicator species. *Rev. Chim-Bucharest* 64: 754-760.
- Raskin J, Kumar PBAN, Dushenkov S, Salt DE, 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 285-290.
- Raskin I, Smith RD, Salt DE, 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 8 (2): 221-226.
- Rausser WE, 1999. Structure and functions of metal chelators produced by plants: the case of organic acid, aminoacids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31: 19-48.
- Regolamento EC n. 1881/2006 della commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.
- Regolamento n. 166/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 18/1/2006 relativo all'istituzione di un registro europeo delle emissioni e dei trasferimenti di sostanze inquinanti e che modifica le direttive 91/689/CEE e 96/61/CE del Consiglio. GUE n. 33/L del 4/2/2006.
- Rewald B, Shelef O, Ephrath JE, Rachmilevitch S, 2013. Adaptive plasticity of salt-stressed root systems. Chapter 6. In: Ahmad P, Azooz MM, Prasad MNV, (Eds.). *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. Springer, New York, USA: 169-202.
- Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.* 59: 3485-3498.
- Rizzi L, Petruzzelli G, Poggio G, Guidi GV, 2004. Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytoextraction. *Chemosphere* 57(9): 1039-1046.
- Rocco F, Pin M, 2000. Nuove tecnologie di bioremediation e di phytoremediation per la decontaminazione dei suoli: esperienze e prospettive. In: Atti "workshop Gestione integrata dell'ambiente urbano: rifiuti, acque, suolo". Trieste, 30 maggio 2000: 1-5.
- Ross SM, 1994. *Toxic metals in soil-plant system*. John Wiley & Sons, Inc.

- Rulkens WH, Tichy R, Grotenhuis JTC, 1998. Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures. *Water Sci. Technol.* 37: 27-35.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar PBAN, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I, 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468-475.
- Salt DE, Smith RD, Raskin L. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668.
- Sandström B, 2001. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Brit. J. Nutr.* 85: 181-185.
- Shenker M, Fan TW, Crowley DE, 2001. Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants. *J. Environ. Qual.* 30: 2091-2098.
- Simon L, Martin HW, Adriano DC, 1996. Chicory (*Cichorium intybus* L.) and dandelion (*Taraxacum officinale* Web.) as phytoindicators of cadmium contamination. *Water Air Soil Pollut.* 91: 351-362.
- Schnoor JL, Licht LA, McCutcheon SC, Wolfe NL, Carreira LH, 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 29: 318-323.
- Smith AL, Sprangers JFCM, Sablik PW, Groenwold J, 1994. Automated measurement of root length with a three—dimensional high resolution scanner and image analysis. *Plant and Soil* 158: 145-149.
- Spectrum Technologies, 2012. <http://www.specmeters.com/nutrient-management/chlorophyll-meters/chlorophyll/spad502p/#description> (consultato il 22/07/2014).
- Steffens JC, 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual Revision Plant Physiology Mol. Biol.* 41: 553-575.
- Stigliani WM, 1992. Overview of the chemical time bomb problem in Europe. In: Proceedings “The European state of the art conference of the delayed effects of the chemicals in soil and sediments”. Veldhoven, Netherland, 2-5 september 1992: 13-29.
- Taiz L, Zeiger E, 1992. *Fisiologia Vegetale*. Traduzione italiana a cura di Massimo Maffei, edizioni Piccin.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD, 2003. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomed. Pharmacother.* 57: 386-398.
- USEPA, 1994. Selection of control technologies for remediation of soil contaminated with arsenic, cadmium, chromium, lead or mercury. Revised Draft Engineering Bulletin.
- USEPA, 1995a. EPA method 3051, microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. In: *Test Methods for Evaluating Solid Waste*, 3rd edition. Washington, DC, USA.
- USEPA, 1995b. EPA method 3052, microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices In: *Test Methods for Evaluating Solid Waste*, 3rd edition. Washington, DC, USA.
- USEPA, 1996. Soil Screening Guidance: Technical Background Document. EPA/540/R-95/128 PB96-963502, U.S. EPA, Office of Emergency Response: Washington, DC, USA.

- Vamerali T, Guarise M, Ganis A, Bona S, Mosca G, 2003. Analysis of root images from auger sampling with a fast procedure: a case of application to sugar beet. *Plant and Soil* 255: 387-397.
- Vamerali T, Bandiera M, Mosca G, 2011. In situ phytoremediation of arsenic and metal-polluted pyrite waste with field crops: Effects of soil management. *Chemosphere* 83: 1241-1248.
- Van Assche F, Clijsters H, 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13: 195-206.
- Vangronsveld J, Assche FV, Clijsters H, 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environ. Pollut.* 87: 51-59.
- Wade MJ, Davis BK, Carlisle JS, Klein AK, Valoppi LM, 1993. Environmental transformation of toxic metals. *Occup. Med.* 8: 575-601.
- Wagner GJ, 1984. Characterization of a cadmium-binding complex of cabbage leaves. *Plant Physiology* 76: 797-805.
- Wang QR, Cui YS, Liu X, Dong YT, Christine P, 2003. Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *J. Environ. Sci. Health A* 38: 823-838.
- White PJ, Broadley MR, 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol.* 182: 49-84.
- Xiong ZT, 1997. Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environ. Pollut.* 97: 275-279.
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ, 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18: 339-353.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I, 2000. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
- Yoon J, Cao X, Zhou O, 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total Environ.* 368: 456-464.
- Zaccheo P, Crippa L, 2004. Fitoestrazione dei metalli: aspetti relativi alla biodisponibilità dei metalli nei suoli agrari. In: Zerbi G, Marchiol L (a cura di) *Fitoestrazione di Metalli Pesanti - Contenimento del Rischio Ambientale e Relazioni Suolo-Microrganismi-Pianta*. Forum Editrice, Udine: 77-104.
- Zaccheo P, Crippa L, Gigliotti C, 2000. Studio dell'efficienza del mais nella *phytoremediation* in un suolo contaminato da metalli pesanti. In: Atti del convegno "La *bioremediation* in Italia: dalla teoria alla pratica". Roma 14-15 dicembre 2000: 685-692.
- Zerbi G, Marchiol L, 2004. Introduzione. In: Zerbi G, Marchiol L (a cura di) *Fitoestrazione di Metalli Pesanti - Contenimento del Rischio Ambientale e Relazioni Suolo-Microrganismi-Pianta*. Forum Editrice, Udine: 9-36.
- Zhao Y, Shentu J, Chen K, 2012. *Rumex acetosa* L. application on the bioremediation of soil polluted by combined heavy metals of Cd, Cu and Pb. *Adv. Mater. Res.* 518/523: 3069-3073.



- Zhu C, Naqvi S, Gomez-Galera S, Pelacho AM, Capell T, Christou P, 2007. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends Plant Sci* 12: 548-555.
- Zhuang P, McBride MB, Xia HP, Li NY, Lia ZA, 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.
- Zuin MC, 2010. Piante Alimurgiche del Veneto. Riconoscerle, Coltivarle e Gustarle. Veneto Agricoltura, Legnaro (Padova): 55-61.