



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

POTENZIALE DI FITORISANAMENTO DI
PIANTE COLTIVATE NEL CONTRASTARE LA
CONTAMINAZIONE DA NICHEL IN CALCI DI
CARBONATAZIONE PROVENIENTI
DALL'INDUSTRIA SACCARIFERA

*Phytoremediation potential of crop plants in
countering nickel contamination in carbonation lime
coming from the sugar industry*

TIPO TESI: sperimentale

Studente:

MARIA CHIARA BATTISTELLI

Relatore:

PROF. COSTANTINO VISCHETTI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

Alla mia famiglia.

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	8
1 INTRODUZIONE	15
1.1 METALLI PESANTI E FITORISANAMENTO	15
1.1.1 I metalli pesanti.....	15
Origine dei metalli pesanti nel suolo	17
Mobilità, biodisponibilità e tossicità dei metalli pesanti	19
1.1.2 Il fitorisanamento.....	24
Crescita delle piante in siti contaminati con metalli pesanti	29
Meccanismo di bioaccumulo di metalli pesanti e piante iperaccumulatrici	36
I principali parametri utilizzati nella valutazione della fitoestrazione	41
Vantaggi e limiti della tecnica	43
1.1.3 Quadro normativo sui siti contaminati.....	45
2 SCOPO DELLA TESI	53
3 MATERIALI E METODI.....	56
3.1 Prelievo dei campioni nel sito contaminato	57
3.2 Determinazione del pH, della sostanza organica e del nichel totale nelle calci di carbonatazione	58
3.3 Prova in serra	59
3.4 Prova outdoor.....	61
3.5 Estrazione del nichel solubile e biodisponibile e analisi degli eluati.....	62
Substrato	62
Piante	63
3.6 Analisi statistica	63
4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	64
4.1 Prova in serra	64

4.1.1 Nichel nel substrato	64
4.1.2 Nichel nelle piante	65
4.2 Prova outdoor.....	68
4.2.1 Nichel nel substrato	68
4.2.2 Nichel nelle piante	71
5 CONCLUSIONI	74
6 BIBLIOGRAFIA	75
7 SITOGRAFIA	87

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1: Fonti di metalli pesanti nel suolo e loro specie ioniche nella soluzione circolante.....	18
Tabella 1-2: Ioni metallici induttori e non induttori della sintesi di PC.....	31
Tabella 1-3: Confronto fra il range di normale concentrazione dei metalli nei tessuti vegetali e valori limite inferiori nelle iperaccumulatrici.....	39
Tabella 1-4: Valori di concentrazione limite accettabili di alcuni metalli pesanti e metalloidi nel suolo e nel sottosuolo riferiti alla specifica destinazione d'uso dei siti da bonificare..	47
Tabella 3-1: Caratteristiche del substrato impiegato nei due casi studio.....	58
Tabella 4-1: Fattore di traslocazione per il nichel nelle piante cresciute nella prova in serra.....	66
Tabella 4-2: Concentrazione di Ni solubile ($\mu\text{g L}^{-1}$) e biodisponibile ($\mu\text{g kg}^{-1}$) nella rizosfera.....	70
Tabella 4-3: Fattore di traslocazione per il Ni nelle piante cresciute nella prova all'aperto..	72

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Esempio di meccanismo di complessazione di cationi di metalli pesanti da parte della sostanza organica.....	21
Figura 1-2: Curve di risposta dello sviluppo della pianta a diverse concentrazioni di metalli pesanti essenziali e non essenziali.....	23
Figura 1-3: Rappresentazione dei meccanismi adottati dalle piante per ridurre la mobilità degli inquinanti	26
Figura 1-4: Struttura generale di una fitochelatina	30
Figura 1-5: Ciclo del GSH, processo di sintesi delle fitochelatine e loro azione all'interno della cellula vegetale.....	31
Figura 1-6: Confronto fra piante escluditrici, indicatrici, accumulatrici ed iperaccumulatrici basato sulla relazione fra la concentrazione di metallo nel suolo ed all'interno dei tessuti della pianta.....	34
Figura 1-7: Rappresentazione schematica della fitoestrazione con chelanti.....	36
Figura 1-8: Influenza del pH sulla mobilizzazione degli ioni metallici.....	37
Figura 1-9: Confronto nella modalità di accumulo fra piante iperaccumulatrici e piante escluditrici.....	38
Figura 1-10: CFPP per differenti metalli/metalloidi	42
Figura 1-11: Schema semplificato e riassuntivo della procedura prevista per l'analisi sito-specifica, al fine di valutare la necessità o meno dell'intervento di bonifica.....	49
Figura 1-12: Localizzazione e superficie dei Siti di Interesse Nazionale	50
Figura 1-13: Principali contaminanti inorganici rilevati nei siti visionati in Europa.....	52
Figura 3-1: Pianta area di contaminazione individuata dall'ARPAM	56
Figura 3-2: Parcelle individuate nell'area contaminata omogenea di Ponte Pio.....	57
Figura 3-3: Schema adottato per il prelievo dei cinque campioni in ogni parcella.....	58
Figura 3-4: Prova condotta in serra su colza e spinacio.....	60
Figura 3-5: Prova condotta outdoor con girasole (a) e sorgo (b)	61
Figura 4-1: Concentrazioni di nichel nelle calce prima e dopo la coltivazione. (a) Ni solubile ($\mu\text{g L}^{-1}$) nei campioni di calce; (b) Ni biodisponibile ($\mu\text{g kg}^{-1}$) nei campioni di calce.....	64

Figura 4-2: Concentrazione di nichel (mg kg^{-1} di sostanza secca) nelle piante. (a) Porzione ipogea; (b) Porzione epigea..... 66

Figura 4-3: Concentrazioni di nichel presenti nelle calci dei quattro box (1-4) prima e dopo la coltivazione delle piante. (a) Ni solubile ($\mu\text{g L}^{-1}$); (b) Ni biodisponibile ($\mu\text{g kg}^{-1}$)..... 69

Figura 4-4: Concentrazione di Ni (mg kg^{-1} di sostanza secca) nelle diverse porzioni delle piante. (a) Radici, (b) Steli, (c) Foglie, (d) Infruttescenze. 71

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

Unità di misura

m^3	Metro cubo
cm^3	Centimetro cubo
m^2	Metro quadrato
m	Metro
nm	Nanometri
kg	Chilogrammi
g	Grammi
mg	Milligrammi
μg	Microgrammi
L	Litro
ml	Millilitro
min	Minuto
Da	Dalton
kW	Chilowatt
W	Watt
$^{\circ}C$	Gradi centigradi
d	Densità
M	Concentrazione molare
p/p	Peso/peso
v/v	Volume/volume

Elementi, ioni e composti chimici

Ag	Argento
Al	Alluminio
As	Arsenico
Ba	Bario
Bi	Bismuto
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
Ce	Cerio
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cs	Cesio
Cu	Rame
Fe	Ferro
Hg	Mercurio
Mg	Magnesio
Mn	Manganese
Mo	Molibdeno
Na	Sodio
Ni	Nichel
Pb	Piombo
Sb	Antimonio
Se	Selenio
Sn	Stagno
Te	Tellurio

Tl	Tallio
U	Uranio
V	Vanadio
W	Tungsteno
Zn	Zinco
Cd^{2+}	Ione cadmio (II)
Cl^-	Ione cloro (-I) - Ione cloruro
Co^{2+}	Ione cobalto (II) - Ione cobaltoso
Cu^{2+}	Ione rame (II) – ione rameico
Fe^{2+}	Ione ferro (II) – ione ferroso
Fe^{3+}	Ione ferro (III) – ione ferrico
Hg^{2+}	Ione mercurio (II) – ione mercurico
Mg^{2+}	Ione magnesio (II)
Mn^{2+}	Ione manganese (II) – ione manganoso
Ni^{2+}	Ione nichelio (II)
Pb^{2+}	Ione piombo (II) – ione piomboso
Zn^{2+}	Ione zinco (II)
AsO_4^{-3}	Ione arseniato
CO_3^{2-}	Ione triossocarbonato (IV)
COO^-	Ione carbossilato
$\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$	Esa-aquo rame (III)
$\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$	Tetra-ammino rame (II)
HCO_3^-	Ione monoidrogenotriossocarbonato – ione bicarbonato
NH_4^+	Ione ammonio

Ni(OH)^+	Ione monoidrossido di nichel (I)
Ni(OH)_3^-	Ione triidrossido di nichel (I)
OH^-	Ione idrossido
PO_4^{3-}	Ione fosfato
SeO_4^{2-}	Ione seleniato
SeO_3^{2-}	Ione selenito
SO_4^{2-}	ione tetraossolfato (VI) - Ione solfato
ZnCl_4^{2-}	Ione tetra-cloro zincato (II)
$\text{Zn(NH}_3)_4^{2+}$	Ione tetra-ammino zincato (II)
CaCl_2	Dicloruro di calcio - Cloruro di calcio
CaCO_3	Triossocarbonato di calcio - Carbonato di calcio
HNO_3	Acido triossonitrico - Acido nitrico
H_2O	Monossido di diidrogeno - Acqua
H_2O_2	Diossido di diidrogeno - Acqua ossigenata
DTPA	Acido dietilentriamminopentacetico
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico
NTA	Acido nitrilotriacetico
Altri acronimi e abbreviazioni	
AMU	Sequestro di metallo annuale per ettaro
ARPA	Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale
ARPAM	Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Marche
ATP	Adenosina trifosfato
BAF	Fattore di bioaccumulo
Ca	Concentrazione del metallo nella parte aerea

CAT	Catalasi
CFPP	Fattore di concentrazione per parti di pianta
Cp	Concentrazione del metallo nella pianta
Cpp	Concentrazione del metallo nella parte di pianta considerata
Cr	Concentrazione del metallo nella radice
Cs	Concentrazione del metallo nel suolo
CSC	Concentrazione Soglia di Contaminazione
CSR	Concentrazione Soglia di Rischio
Cys	Cisteina
D	Profondità dell'apparato radicale
D.Lgs.	Decreto Legislativo
D.M.	Decreto ministeriale
EEA	European Environment Agency
Eh	Potenziale redox
EPT	Elementi potenzialmente tossici
FR	Radicali liberi
GB	Betaina di glicina
Glu	Acido glutammico
GSH	Glutazione
HSPs	Proteine Heat Shock
ISPRA	Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
ISS	Istituto Superiore della Sanità
L.	Linneo
L ⁿ⁻	Ligandi

LAI	Leaf Area Index – indice di superficie fogliare
M ^{x+}	Ione nucleare metallico
M	Metallo/metalloide
Mac	Metalli dai prodotti chimici
Matm	Metalli dai depositi atmosferici
MATTM	Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare
Mb	Massa della biomassa
Mcr	Metalli rimossi dalle piante
Me	Metalli asportati per erosione
Mf	Metalli dai fertilizzanti
Mic	Metalli da altri contaminanti inorganici
MI	Metalli asportati per lisciviazione
Mom	Metalli da materiale organico
Mpm	Metalli dal materiale litologico
Mr	Massa di terreno rizosferico
Msed	Metalli dai depositi sedimentati
MT	Metallotioneina
Mtm	Metalli da materiali tecnologici
Mv	Metalli asportati per volatilizzazione
n.	Numero
<i>p</i>	Probabilità di sbagliare
PAH	Idrocarburi policiclici aromatici
ρ_b	Densità del suolo essiccato
PC	Fitochelatine

PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria – batteri promotori della crescita delle piante
RGR	Relative Growth Rate – tasso di crescita relativo
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
SIN	Siti di Interesse Nazionale
S.n.c	Società in nome collettivo
SO	Sostanza organica
SOD	Superossido dismutasi
S.p.A.	Società per Azioni
SWH	Peso del suolo per ettaro
Tr	Tempo
TC	Coefficiente di traslocazione suolo-pianta
TF	Fattore di traslocazione
UE	Unione Europea
UV	Ultravioletto
V-ATPasi	ATPasi del vacuolo
V-Ppasi	Proton-fosfatasi del vacuolo
W	Sostanza secca
Y	Produzione di biomassa asportabile della pianta per anno per ettaro

1. INTRODUZIONE

1.1 METALLI PESANTI E FITORISANAMENTO

1.1.1 I metalli pesanti

Attualmente non esiste una definizione univoca di metalli pesanti. Vengono indicati solitamente con questo termine tutti gli elementi che presentano un numero atomico superiore a 20 ed una densità (d) maggiore di 5.0 g cm^{-3} . Dal punto di vista fisico si caratterizzano per essere ubiquitari, altamente persistenti (data la scarsa degradabilità) e buoni conduttori di energia elettrica (Kimbrough et al., 1999; Chien & Kao, 2000; Zhang & Chen, 2002), mentre dal punto di vista chimico si distinguono per la tendenza a comportarsi come cationi, per l'attitudine a formare complessi, per l'affinità con i solfuri, per la bassa solubilità delle forme idrate e per essere pH ed Eh dipendenti.

I metalli pesanti comprendono soprattutto elementi di transizione, quali ferro (Fe, $d = 7.9 \text{ g cm}^{-3}$), cromo (Cr, $d = 7.2 \text{ g cm}^{-3}$), cobalto (Co, $d = 8.9 \text{ g cm}^{-3}$), nichel (Ni, $d = 8.7 \text{ g cm}^{-3}$), rame (Cu, $d = 8.9 \text{ g cm}^{-3}$), zinco (Zn, $d = 7.1 \text{ g cm}^{-3}$), molibdeno (Mo, $d = 10.2 \text{ g cm}^{-3}$), cadmio (Cd, $d = 8.6 \text{ g cm}^{-3}$), mercurio (Hg, $d = 13.5 \text{ g cm}^{-3}$), manganese (Mn, $d = 7.4 \text{ g cm}^{-3}$), argento (Ag, $d = 10.49 \text{ g cm}^{-3}$), piombo (Pb, $d = 11.3 \text{ g cm}^{-3}$), vanadio (V, $d = 5.9 \text{ g cm}^{-3}$), eccetera (Prasad & Hagemeyer, 1999), ed elementi che presentano proprietà simili ai precedenti e per questo detti metalloidi. Tra i metalloidi rientrano elementi appartenenti a: semimetalli e non metalli, come stagno (Sn), alluminio (Al), arsenico (As), antimonio (Sb), bismuto (Bi) e selenio (Se); alcuni elementi alcalini e alcalino-terrosi come cesio (Cs) e bario (Ba); attinidi (uranio) e lantanidi (cerio) (Alloway, 1995).

“Elementi in traccia” è un secondo termine ampiamente utilizzato per indicare i metalli pesanti. Dal punto di vista geochimico rientrano sotto tale definizione tutti gli elementi presenti

nelle rocce e nel suolo con una concentrazione inferiore a 1000 mg kg^{-1} , mentre nell'ambito biologico vengono definiti tali gli elementi aventi una concentrazione solitamente minore di 100 mg kg^{-1} di sostanza secca (Alloway, 1995).

È interessante la possibilità di avere nel suolo metalli micronutrienti della nutrizione (esempi: ferro, rame, zinco, manganese, molibdeno), la cui trattenuta evita carenze nutrizionali, e metalli inquinanti (esempi: piombo, nichel, cromo, mercurio, cadmio, arsenico), la cui trattenuta evita possibili inquinamenti delle acque sotterranee.

La speciazione dei metalli pesanti, ovvero la possibilità di presentarsi sotto diverse forme chimiche, è oggetto di numerosi studi, in quanto porta ad una variazione delle loro proprietà, quindi della mobilità e della biodisponibilità (Tack & Verloo, 1995). È essenziale studiare le interazioni che le varie forme hanno con i componenti del suolo, dato che la tossicità delle sostanze chimiche può dipendere fortemente dalla forma e dallo stato di ossidazione che presentano nell'ambiente, ad esempio il cromo esavalente (VI) risulta essere più dannoso della forma trivalente (III) (Prasad & Hagemeyer, 1999).

Le possibili forme chimiche dei metalli sono:

- Ionica: spesso cationi, i quali possono presentare diversi stati di ossidazione; ad esempio: Fe (III), Fe (II), Zn (II), Zn (I), Cu (II), Cu (I), Cr (III), Cr (VI), eccetera. L'elevata solubilità della forma ionica comporta un aumento della concentrazione degli elementi nella soluzione circolante.
- Complessata: consiste nella formazione di legami elettrostatici (e di coordinazione o dativi nel caso delle forme chelate) fra uno ione centrale coordinante, detto ione nucleare (M^{x+}), ed un numero variabile di gruppi coordinati o ligandi (L^{n-} , ioni o molecole) che fungono da elettrondonatori nei confronti dello ione nucleare. Il complesso ha caratteristiche proprie e manca del rispetto delle valenze. La carica del complesso (ML^{x-n}), che può essere negativa, nulla o positiva, ne influenza la solubilità (Antoniadis et al., 2017). Ad una carica elevata, ad esempio, può corrispondere un'alta solubilità e mobilità del complesso contenente M che, qualora fosse un contaminante, aumenterebbe il rischio di inquinamento. Possiamo distinguere ligandi inorganici ed organici. I primi possono essere ioni (che comportano un cambio della carica del complesso, esempi: $Ni(OH)^+$, $Ni(OH)_3^-$, $ZnCl_4^{2-}$) o molecole neutre (la carica rimane inalterata, esempi: $Cu(NH_3)_4^{2+}$, $Cr(H_2O)_6^{3+}$, $Zn(NH_3)_4^{2+}$). I secondi sono invece rappresentati dalla frazione umica del suolo, la quale permette la formazione di chelati e complessi spesso insolubili. La stabilità del complesso dipende principalmente dal pH del mezzo e dalle caratteristiche dello ione nucleare. Una

bassa stabilità potrebbe portare ad un facile rilascio di M, qualora venissero meno le condizioni che hanno permesso la formazione del complesso/chelato.

- Precipitata: prevede la formazione di composti insolubili come sali (formati da metalli e anioni, come solfato, fosfato e carbonato), idrossidi inorganici (esempi: di ferro, rame, zinco) e solfuri. L'ambiente basico, favorendo l'insolubilizzazione del metallo e la sua precipitazione (rimozione dalla soluzione circolante), comporta un duplice effetto: positivo, per la riduzione di inquinanti potenzialmente lisciviabili, e negativo, per la sottrazione di microelementi nutrizionali. Fanno eccezione molibdeno e cromo, i quali presentano insolubilità in ambiente acido e solubilità in ambiente basico. Il processo, essendo influenzato da numerosi fattori, può avvenire con un grado più o meno elevato; se totale comporta la completa rimozione dalla soluzione.
- Fissata: gli ioni localizzati sulle superfici colloidali inorganiche di ossidi e idrossidi vengono permanentemente fissati (nucleazione).

Origine dei metalli pesanti nel suolo

La concentrazione eccessiva di metalli pesanti nelle diverse matrici ambientali (suolo, sottosuolo, aria e acqua) comporta variazioni degli ecosistemi, difficoltà nella crescita dei "biota" e danni alla salute umana. I fattori che influenzano il quantitativo di metalli presenti nel suolo possono essere riportati, in maniera semplificata, all'interno di una equazione (Alloway, 1995) che tenga conto di input e output:

$$M_{tot} = (M_{pm} + M_{atm} + M_{sed} + M_f + M_{ac} + M_{tm} + M_{om} + M_{ic}) - (M_{cr} + M_e + M_l + M_v)$$

Dove: M = metallo/metalloide; M_{pm} = M dal materiale litologico; M_{atm} = M dai depositi atmosferici; M_{sed} = M dai depositi sedimentati; M_f = M dai fertilizzanti; M_{ac} = M dai prodotti chimici per l'agricoltura; M_{tm} = M da materiali tecnologici; M_{om} = M da materiale organico; M_{ic} = M da altri contaminanti inorganici; M_{cr} = M rimossi dalle piante; M_e = M asportati per erosione; M_l = M asportati per lisciviazione; M_v = M asportati per volatilizzazione.

Possiamo dividere le principali fonti di metalli pesanti in:

- Naturali: gli elementi apportati dipendono dal substrato pedogenetico, dall'orografia e dalla genesi del suolo. I metalli, incorporati nella struttura cristallina del minerale per sostituzione dei principali ioni costituenti (quali silicio, ferro e alluminio) durante il processo di formazione delle rocce per raffreddamento e cristallizzazione del magma, possono essere rilasciati all'interno della soluzione circolante durante il processo di pedogenesi, dove si ha la disgregazione e la decomposizione dei costituenti della roccia

madre. Ad esempio, suoli formati a partire da rocce ultramafiche, come la serpentinite, possono arrivare a concentrazioni di nichel superiori ai 5000 mg kg⁻¹ (Alloway, 1995). La permanenza dei metalli liberati, detti inquinanti geochimici, all'interno del suolo è legata a numerosi fattori, tra cui la vegetazione, le condizioni pedoclimatiche e il tempo.

- Antropiche: sono legate alle attività che l'uomo pratica sul suolo e comportano la liberazione nell'ambiente di quantità ingenti di metalli pesanti, quali piombo, zinco, arsenico, cadmio, rame, mercurio, cromo e nichel (Tabella 1-1).

Tabella 1-1: Fonti di metalli pesanti nel suolo e loro specie ioniche nella soluzione circolante (Nanthi et al., 2003).

Metal	Density (g cm ⁻³)	Ionic species in soil solution	Contaminant sources	Toxicity ^a
Arsenic (As)	5.73	As(III): As(OH) ₃ , AsO ₃ ³⁻ ; As(V): H ₂ As ₄ ⁻ , HAsO ₄ ²⁻	Timber treatment, paints, pesticides, geothermal	Toxic to plants, humans, and animals
Cadmium (Cd)	8.64	Cd ²⁺ , CdOH ⁺ , CdCl ⁻ , CdHCO ₃ ⁺ , CdSO ₄ ⁰	Electroplating, batteries, fertilizers	Toxic to plants, humans, and animals
Chromium (Cr)	7.81	Cr(III): Cr ³⁺ , CrO ₂ , CrOH ²⁺ , Cr(OH) ₄ ⁺ ; Cr(VI): Cr ₂ O ₇ ²⁻ , CrO ₄ ²⁻	Timber treatment, leather tanning, pesticides, dyes	Cr (VI) toxic to plants, humans, and animals ^b
Copper (Cu)	8.96	Cu ²⁺ (II), Cu ²⁺ (III)	Fungicides, electrical, paints, pigments, timber treatment, fertilizers, mine tailings	Toxic to plants, humans and animals
Lead (Pb)	11.35	Pb ²⁺ , PbOH ⁺ , PbCl ⁻ , PbHCO ₃ ⁺ , PbSO ₄ ⁰	Batteries, metal products, preservatives, petrol additives	Toxic to plants, humans, and animals
Manganese (Mn)	7.21	Mn ²⁺ , MnOH ⁺ , MnCl ⁻ , MnCO ₃ ⁰ , MnHCO ₃ ⁺ , MnSO ₄ ⁰	Fertilizer	Toxic to plants
Mercury (Hg)	13.55	Hg ²⁺ , HgOH ⁺ , HgCl ₂ ⁰ , CH ₃ Hg ⁺ , Hg(OH) ₂ ⁰	Instruments, fumigants, geothermal	Toxic to humans and animals
Molybdenum (Mo)	10.2	MoO ₄ ²⁻ , HMoO ₄ ⁻ , H ₂ MoO ₄ ⁰	Fertilizer	Toxic to animals
Nickel (Ni)	8.90	Ni ²⁺ , NiSO ₄ ⁰ , NiHCO ₃ ⁺ , NiCO ₃ ⁰	Alloys, batteries, mine tailings	Toxic to plants, humans, and animals
Zinc (Zn)	7.13	Zn ²⁺ , ZnSO ₄ ⁰ , ZnCl ⁻ , ZnHCO ₃ ⁺ , ZnCO ₃ ⁰	Galvanizing, dyes, paints, timber treatment, fertilizers, mine tailings	Toxic to plants

Le principali attività antropiche possono essere così raggruppate:

1. Industriali: il rilascio di contaminanti è legato ad attività industriali di produzione, (vernici, pneumatici, derivati del petrolio), a fumi, aerosol e acque di scarico. Si aggiungono poi l'estrazione mineraria, i processi di combustione, i fanghi di depurazione delle acque reflue aziendali, le fonderie, le industrie elettrolitiche e molte altre attività che possono comportare inquinamento diretto o indiretto delle matrici ambientali (Bradl, 2005).
2. Civili: la liberazione, in forma liquida o gassosa, degli elementi inquinanti è legata alle attività urbane e domestiche. Esempi sono: i fumi di scarico delle vetture, il riscaldamento, lo smaltimento dei rifiuti, l'utilizzo di prodotti di cosmetica, igiene, medicinali, eccetera.

3. Agricole: contaminanti derivanti dall'impiego di fitofarmaci, liquami (soprattutto se da allevamento intensivo di suini), antiparassitari, concimi chimici, effluenti di depurazione, biosolidi (ovvero fanghi di depurazione, rifiuti di origine animale, rifiuti solidi urbani e alcuni rifiuti industriali come i fanghi di pasta di carta), eccetera. (Bradl, 2005).

Gli inquinanti liberati possono raggiungere il suolo con diversi meccanismi: correnti d'aria, flussi d'acqua, gravità, trasporto intenzionale (trattamenti) e movimentazione di terra. La contaminazione può essere estensiva o localizzata (Alloway, 1995).

L'asporto degli elementi dal suolo (gli output nell'equazione sopra indicata) essendo legato a numerosi fattori risulta essere difficilmente identificabile. Importante è sottolineare che non tutti i metalli subiranno trasferimento di massa (lisciviazione, erosione, volatilizzazione) in quanto una frazione potrà subire *uptake* da parte delle piante e dei microrganismi, ed un'altra potrà prendere parte a reazioni con la fase solida del suolo. Tutto ciò influenza ed è influenzato dalla mobilità e dalla biodisponibilità degli elementi inquinanti.

Mobilità, biodisponibilità e tossicità dei metalli pesanti

La capacità del suolo di legare numerosi composti chimici fa sì che sia un importante serbatoio di contaminanti. All'interno del suolo possiamo individuare una fase liquida, ovvero la soluzione circolante, e una fase solida, costituita da componenti di natura inorganica ed organica. Le proprietà di queste fasi insieme a numerosi altri fattori (quali pH, ligandi presenti e loro concentrazione, forze di legame metallo-ligando, natura del metallo, competizione fra ioni equivalenti, potenziale ossidoriduttivo, condizioni pedoclimatiche, tempo, eccetera) determinano l'instaurarsi di un equilibrio dinamico fra metalli in soluzione e legati alla fase solida (Nanthi et al., 2003). Bassi valori di pH, ad esempio, indicano una concentrazione elevata di ioni idrogeno che, a causa dell'elevata affinità con la frazione colloidale, entrano in competizione con gli ioni metallici presenti sul complesso di scambio provocandone la liberazione all'interno della soluzione circolante (Prasad & Hagemeyer, 1999). All'aumentare del pH, viceversa, si ha un incremento della carica elettronegativa superficiale dei colloidi a carica pH dipendente (macromolecola umica, ossidi di ferro, alluminio e manganese, argille 1:1 e bordi di argille 2:1) e quindi una maggiore ritenzione cationica ed una minore ritenzione anionica (Adriano, 2001; Antoniadisa et al., 2017). Quest'ultimo caso, in particolare, è tipico dei suoli mediterranei dove la microsolubilità dell'elevata quantità di carbonato di calcio (CaCO_3) presente permette il mantenimento di un pH subalcalino (Antoniadisa et al., 2017).

In generale, i processi che interessano maggiormente i metalli nel suolo sono: scambio ionico, ossidazione/riduzione, precipitazione/dissoluzione, complessazione/dissociazione,

adsorbimento/desorbimento (Violante et al., 2010). L'adsorbimento è un fenomeno di tipo chimico-fisico dove la carica superficiale della micella colloidale porta all'attrazione di ioni di carica opposta provenienti dalla soluzione circolante e alla formazione di un doppio strato elettrico diffuso (complesso di scambio). È possibile distinguere adsorbimento non specifico, dove la carica degli ioni equilibra la carica delle micelle del suolo attraverso l'attrazione elettrostatica (ioni scambiabili), e adsorbimento specifico dove si ha la formazione di un legame chimico tra gli ioni e il colloide (ione stabilmente incorporato e non scambiabile) (Sposito, 1984; Barrow, 1985).

La concentrazione totale del metallo nel suolo è data dalla sommatoria di cinque frazioni (Elder, 1989; Salomons, 1995):

- Disciolta-scambiabile: comprende i metalli in soluzione, inclusi i complessi di cationi e anioni e gli ioni idratati le cui solubilità sono fortemente influenzate dal pH e tendono ad aumentare con la diminuzione del pH (fanno eccezione gli ossianioni metallici, formati ad esempio da cromo, vanadio, molibdeno, uranio, e i metalloidi come arsenico e selenio, i quali sono maggiormente solubili in ambiente basico); riguarda inoltre i metalli presenti sui complessi di scambio di colloidi organici e inorganici che, in determinate condizioni, possono tornare disciolti in soluzione (Adriano, 1986).
- Associata a ossidi di ferro-manganese: i metalli possono dar luogo ad adsorbimento sulla superficie dei suddetti ossidi in funzione delle condizioni di Eh (Salomons, 1995). Ad esempio, fenomeni di inondazione prolungata, causanti la formazione di un ambiente riducente per mancanza di ossigeno, portano al rilascio del metallo all'interno della soluzione circolante da parte degli ossidi (Antoniadis et al., 2017).
- Complessata-chelata a materia organica: a pH basico i gruppi funzionali acidi della macromolecola umica (carbossilici, fenolici e tiolici) dissociano, facendole assumere una carica negativa (più o meno elevata a seconda del grado di dissociazione). Questa rende possibile la complessazione o la chelazione (se disponibile il doppietto elettronico) dei cationi metallici, fissandoli alla componente organica (Figura 1-1).

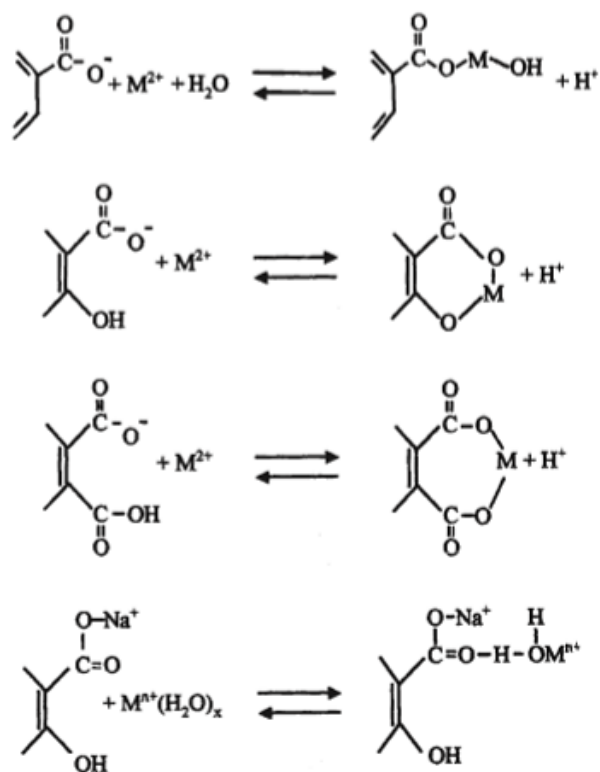


Figura 1-1 Esempio di meccanismo di complessazione di cationi di metalli pesanti da parte della sostanza organica (Basta et al., 2005).

L'ordine generale di affinità per i cationi metallici complessati dalla sostanza organica è: $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (Adriano, 2001). Cationi poco acidi, come Cd^{2+} e Hg^{2+} , prediligono legami con basi deboli (tioli), mentre cationi molto acidi, quali Fe^{3+} e Mn^{2+} , tendono a formare legami con basi forti (OH^- , COO^-); altri, infine, sono in grado di formare complessi con la base indipendentemente dalla sua forza (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , ecc.) (Pearson, 1968; Essington, 2004). I metalli sono in grado di legarsi sia alla frazione unica della componente organica, con la quale rimangono immobilizzati, sia alla frazione fulvica, con la quale formano composti organo-metallici solubili (Alloway, 1990; Ross, 1994). In quest'ultimo caso il rapporto fra la concentrazione di metallo libero e la concentrazione di molecola fulvica disponibile determinerà la formazione o di un legame forte covalente (metallo poco concentrato, esempio: $[\text{M}]/[\text{fulvica}] < 0.001$) o di un legame debole elettrostatico (metallo più concentrato, esempio: $[\text{M}]/[\text{fulvica}] > 0.003$) (Essington, 2004).

- Associata a solfati e carbonati: la presenza di anioni SO_4^{2-} e CO_3^{2-} (presenti con pH basici) porta alla precipitazione dei metalli pesanti, specialmente se questi sono presenti a

concentrazioni elevate. La mobilità di solfati e carbonati risulta essere strettamente legata alle condizioni ambientali (Salomons, 1995).

- Fissata nelle reti cristalline dei minerali.

La mobilità, intesa come la capacità di una specie chimica di disciogliersi e rimanere in soluzione, decresce generalmente con questo ordine per le diverse frazioni: disciolta > scambiabile > legata alla sostanza organica > associata ai carbonati > associata a ossidi di Fe-Mn > associata a solfati > fissata nei minerali (Nanthi et al., 2003). Tanto più è elevata la mobilità della frazione, tanto più saranno alti la disponibilità del metallo per l'assorbimento da parte dei "biota" (soprattutto microrganismi e piante) e il rischio di inquinamento.

Un metallo è biodisponibile se presente o trasformabile in forma ionica, se può raggiungere le radici delle piante in tempi compatibili con la crescita e lo sviluppo di queste e se, una volta assorbito, influisce sul loro ciclo vitale (Sposito, 1989). Cadmio, nichel, zinco, arsenico, selenio e rame sono metalli generalmente molto assorbibili da parte della pianta, meno invece cobalto, manganese, ferro, piombo, cromo e uranio (Barbafieri, 2005). La bio-accessibilità risulta essere fondamentale specialmente per gli elementi essenziali. Un elemento viene definito tale se è indispensabile nei processi di crescita, sviluppo e riproduzione della pianta e se una sua carenza ne previene il completamento del ciclo vitale (Barbafieri, 2005). In funzione della loro concentrazione all'interno dei tessuti vegetali è possibile distinguere gli elementi essenziali in macronutrienti e micronutrienti. Diversi metalli, come rame, ferro, cobalto, manganese, selenio, molibdeno e zinco, rientrano all'interno dei micronutrienti, ricoprendo nella pianta ruoli biologici importanti come cofattori, elementi strutturali di proteine (soprattutto enzimi) e, avendo la possibilità di assumere più stati di ossidazione, come trasportatori di elettroni. Una loro carenza può portare alla manifestazione di sintomi di stress fisiologico (ad esempio clorosi e necrosi), ad un calo dell'efficienza fotosintetica e di traslocazione, a una riduzione di crescita e produzione e, se elevata, al deperimento della pianta (Alloway, 1995; Prasad & Hagemeyer, 1999). Un loro eccesso, viceversa, può dar luogo a fenomeni di fitotossicità. Quest'ultima può essere data anche da basse concentrazioni di altri metalli presenti nel suolo i quali, oltre a non rientrare negli elementi essenziali, non sembrano partecipare ad alcuna funzione biologica (ad esempio piombo e cadmio). Sei, in particolare, sono i metalli a maggiore azione tossica nelle piante, in ordine: Cd > Co > Hg > Mn > Pb > Cr (Poonam, 2004). La relazione fra la biodisponibilità del metallo e lo sviluppo della pianta viene rappresentata in maniera semplificata in Figura 1-2: l'andamento delle curve, in termini di altezza e intervallo, sarà poi differente a seconda dell'elemento, della specie e, talvolta, della varietà considerati (Alloway, 1995).

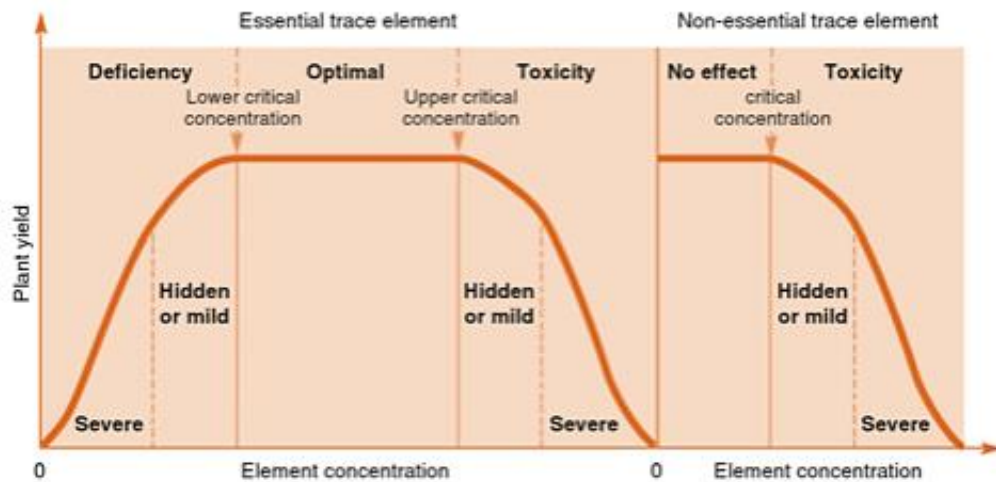


Figura 1-2 Curve di risposta dello sviluppo della pianta a diverse concentrazioni di metalli pesanti essenziali e non essenziali (Alloway, 1995). Per gli elementi essenziali la curva è divisa in tre fasi: carenza, tolleranza e tossicità; mentre per i non essenziali non vi è carenza e il plateau di tolleranza corrisponde alla dose zero (Berry & Wallace, 1981; Aller et al., 1990).

La tossicità di un metallo è spesso data dalla possibilità che si leghi o si sostituisca a componenti di biomolecole importanti nei processi fisiologici, causando ad esempio carenza, inibizione enzimatica e disturbo del metabolismo (Prasad & Hagemeyer, 1999; Liu et al., 2008; Mohanty et al., 2012). Inoltre, si è visto in numerosi studi come i metalli pesanti stimolino in diverse modalità, dirette e indirette, la formazione di radicali liberi (FR) e di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, se non compensate da un efficiente sistema di disintossicazione e riparazione, possono portare a stress ossidativo e danni alle componenti cellulari (membrane, cloroplasti, acidi nucleici, eccetera) (Van Assche & Clijsters, 1986; Marschner, 1995). Ad esempio, il cadmio, essendo un metallo molto stabile, non è in grado di ossidare o donare elettroni all'ossigeno e, di conseguenza, formare ROS direttamente. Tuttavia, la sua capacità di reagire con lo zolfo, presente nei gruppi tiolici di diversi aminoacidi (esempio: cisteina, costituente fondamentale del glutatone), e di sostituirsi ad altri metalli (esempi: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) nei siti attivi degli enzimi (inclusi quelli responsabili della risposta enzimatica all'ossidazione) porta indirettamente ad un aumento dello stress ossidativo (Cuyper et al., 2010; Zhou et al., 2013).

Comprendere l'origine ed i fattori che influenzano la disponibilità dei metalli pesanti nel suolo permetterà di stabilire la procedura migliore per la loro gestione, con l'obiettivo di ridurre al minimo il loro impatto sull'ecosistema.

1.1.2 Il fitorisanamento

Attività industriali, civili ed agricole possono portare ad un aumento consistente della concentrazione di metalli pesanti nel suolo, comportando un rischio per l'ecosistema e per la salute pubblica. Qualora il quantitativo superasse i valori di CSR (Concentrazione Soglia di Rischio), stabiliti tramite procedura sito specifica, come previsto nel Decreto Legislativo 152/2006 (Allegato 5, parte quarta), si richiede l'intervento di messa in sicurezza e di bonifica. Il D.Lgs. 152/2006 (Articolo 240 comma 1) definisce il termine bonifica come *“l'insieme degli interventi atti ad eliminare le fonti di inquinamento e le sostanze inquinanti o a ridurre le concentrazioni delle stesse presenti nel suolo, nel sottosuolo e nelle acque sotterranee ad un livello uguale o inferiore ai valori delle concentrazioni soglia di rischio”*. Fra i diversi metalli pesanti quelli più frequentemente trovati nei siti contaminati sono zinco, rame, cromo, piombo, arsenico, cadmio, nichel, e mercurio (Raskin et al., 1997). I metalli, diversamente dai contaminanti organici, non subiscono degradazione da parte delle sostanze chimiche e della componente microbica per cui, dopo essere stati introdotti nel suolo, la loro concentrazione totale persiste a lungo (Adriano, 2001). L'intervento di bonifica, a seconda della metodologia scelta, può essere realizzato presso un'industria decontaminante (*ex-situ*) o direttamente sul sito contaminato (*in-situ*). Quest'ultimo, non richiedendo la movimentazione del terreno, presenta dei costi nettamente inferiori.

Le tecnologie utilizzabili negli interventi di bonifica possono essere suddivise in tre categorie principali: metodi fisici (come lavaggio del suolo, incapsulamento o elettrocinesi), metodi chimici (quali solidificazione, precipitazione o scambio di ioni) e metodi biologici, che utilizzano microrganismi (biorimedia) e/o piante (fitorimedia) selezionati per rimuovere, degradare o stabilizzare metalli pesanti nel substrato (Bradl, 2005; Hakeem et al., 2014; Ansari et al., 2015). Sebbene i metodi fisici e chimici riescano ad assicurare una rapidità ed un'efficacia di intervento, risultano essere molto dispendiosi e possono causare, oltre alla distruzione della fertilità del suolo, l'inquinamento dell'aria e delle acque sotterranee. Questi aspetti hanno portato ad un interesse sempre crescente nei confronti dei metodi biologici. Va tuttavia evidenziato che in molti casi un utilizzo combinato dei tre approcci può dare risultati interessanti (Armishaw et al., 1992) compensando le limitazioni e gli svantaggi delle diverse tecnologie. Il biorimedia è una tecnica di risanamento che raccoglie numerose strategie di

intervento (bioassorbimento, bioventilazione, biospargimento, bioaumentazione, lisciviazione biologica, eccetera) basate sull'utilizzo e/o la stimolazione di comunità microbiche (principalmente alghe, batteri e funghi, tra cui le micorrize arbuscolo-vescicolari), indigeni o alloctoni, per contrastare l'effetto dei contaminanti ambientali, tra cui i metalli pesanti (Hanjun et al., 2010; Gorkem & Duyusen, 2010; Mani & Kumar, 2013).

Tali microrganismi, che da tempo sono oggetto di studio, possono essere utilizzati da soli o unitamente a interventi di fitorisanamento, dove le piante sono favorite dalla loro attività metabolica e di secrezione (fitorimedio bioassistito) (Mani & Kumar, 2013). Alcuni funghi, ad esempio, sono in grado aumentare la disponibilità di nutrienti come azoto, fosforo, potassio, calcio, zolfo, zinco, cobalto, eccetera, grazie ad un'ampia rete di ife (Nadeem et al., 2017). Di crescente interesse sono anche i batteri promotori della crescita delle piante (PGPB – Plant growth promoting bacteria), comunità microbiche rizosferiche utili per biostimolare la crescita vegetale e favorire la tolleranza a stress (Nadeem et al., 2017). In alcuni casi, tuttavia, l'impiego dei microrganismi non è possibile o poco efficace (ad esempio per metalli come cadmio e piombo che potrebbero essere poco assimilabili, o per un pericolo dato dalla possibilità di ingresso del metallo nella catena alimentare), per cui si preferisce l'utilizzo esclusivo del fitorimedio (Kensa, 2011; Mani & Kumar, 2012).

Il termine fitorisanamento deriva dal prefisso greco *phyto* (pianta) e dalla parola latina *remedium* (correggere o rimuovere), ed indica una tecnologia applicabile in-situ, emergente ed ecologica, che utilizza piante selezionate per assorbire, accumulare, disintossicare e/o rendere inoffensivi contaminanti presenti nel substrato di crescita (suolo, sedimenti, aria, acque e fanghi), attraverso processi fisici, chimici o biologici, al fine di migliorare la qualità dell'ambiente (Prasad & Hagemeyer, 1999; Tangahu et al., 2011). Il fitorimedio si è rivelato essere sicuro per l'ambiente, economico, esteticamente gradevole e adatto a decontaminare ampi appezzamenti, tra cui anche quelli ad utilizzo agricolo, altrimenti inutilizzabili (Poonam et al., 2004). I meccanismi adottati dalle piante nel fitorimedio possono essere suddivisi come segue (Figura 1-3):

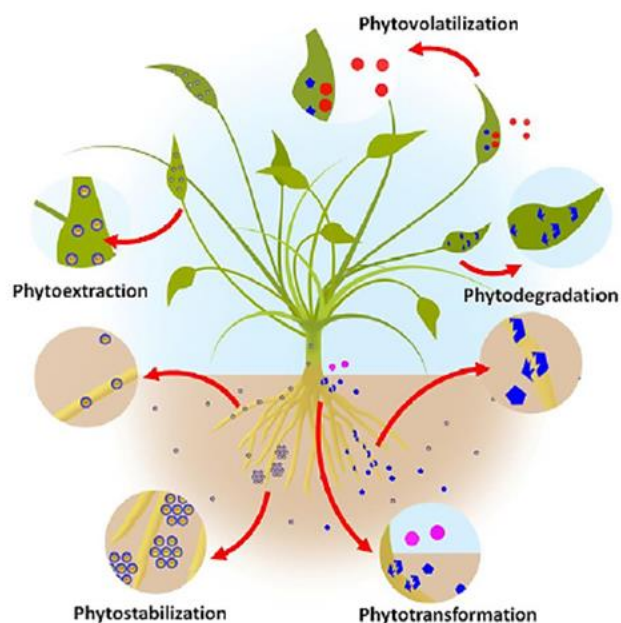


Figura 1-3 Rappresentazione dei meccanismi adottati dalle piante per ridurre la mobilità degli inquinanti (“Open science publications”).

1) Rizodegradazione o fitostimolazione: sfrutta la capacità della pianta di stimolare la comunità microbica presente nella rizosfera, attraverso l’arieggiamento, la decomposizione di materiale organico (“*root turnover*”) e l’emissione di essudati radicali, in modo tale da favorire la sua azione di degradazione nei confronti dei contaminanti organici (Robinson, 2003; Kokyo et al., 2014). I microrganismi comprendono soprattutto funghi (per lo più micorrizici) e batteri (rizobatteri). Entrambi partecipano alla detossificazione sia in maniera indiretta, favorendo la crescita della pianta (ad esempio aumentandone la superficie esplorata dall’apparato radicale e rendendo disponibili nutrienti), sia in maniera diretta (i funghi in particolare), attraverso l’emissione ed il sequestro di sostanze ed enzimi, l’attivazione di trasportatori di membrana, la selettività nei confronti dei diversi elementi ed il trasporto attraverso le ife (Antoniadis et al., 2017). Tra le attività compiute dalla pianta per favorire la vita microbica ricopre particolare importanza l’emissione di essudati radicali che, essendo ricchi di sostanze nutritive (amminoacidi, carboidrati, enzimi, vitamine, alcoli, sostanze fenoliche, acidi organici, acidi grassi, nucleotidi, steroli, eccetera), permettono di instaurare rapporti di simbiosi e co-metabolismo fra pianta e organismi (Anderson et al., 1993). La selezione della comunità microbica è legata principalmente alle condizioni pedoclimatiche, alla vegetazione presente e al tipo di contaminante; è possibile che l’emissione degli essudati porti alla presenza in rizosfera

anche di “*biota*” non utili al fitorimedio. Diversi studi hanno dimostrato l’efficacia della rizodegradazione specialmente nei confronti di idrocarburi (ad esempio idrocarburi policiclici aromatici – PAH), i quali vengono scissi fino a diventare acqua, anidride carbonica e ioni alogenuri, se presenti nella molecola di partenza (Bradl, 2005).

- 2) Fitodegradazione: fa parte, insieme alla rizodegradazione, del fitorimedio bioassistito, in cui il contaminante presente nel suolo viene scisso grazie all’azione associata di microrganismi e vegetali. Questo, tuttavia, differisce dal precedente in quanto la degradazione dell’inquinante è direttamente legata a enzimi e processi metabolici della pianta. In particolare, la fitodegradazione si può verificare sia internamente, previo assorbimento (è necessario che il composto sia adatto a subire l’*uptake* da parte dell’apparato radicale) e azione metabolica, sia esternamente (nella rizosfera) tramite la secrezione di sostanze complessate ed enzimi (Kokyo et al., 2014). Gli enzimi responsabili della degradazione (come ossigenasi per gli idrocarburi, nitroreduccasi e dealogenasi) possono portare alla formazione di intermedi con una tossicità maggiore rispetto a quella del composto di partenza (Brugnoli & Massarelli, 2014). I prodotti ottenuti al termine dell’attività enzimatica/metabolica possono essere infine rilasciati (sotto forma di anidride carbonica e acqua) o stoccati, ad esempio nelle foglie.
- 3) Fitostabilizzazione: consiste nello sfruttare l’apparato radicale e/o gli essudati da questo emessi per stabilizzare, smobilitare e legare i contaminanti presenti nella matrice del suolo e nelle acque sotterranee, impedendone l’erosione (eolica e idraulica) e la lisciviazione (Prasad & Hagemeyer, 1999). La riduzione della mobilità dell’inquinante è data sia da meccanismi di sequestro, che prevedono l’assorbimento e la compartimentazione nei tessuti radicali, sia da meccanismi di immobilizzazione e precipitazione sulla superficie radicale (complessazione, chelazione, adsorbimento) (Tangahu et al., 2011). La fitostabilizzazione è utilizzabile sia per contaminanti organici che inorganici ed è spesso affiancata dall’impiego di ammendanti, per favorire la crescita della pianta ed il mantenimento dei parametri fisico-chimici che hanno portato ad una maggiore stabilità. Le piante scelte per la fitostabilizzazione devono presentare facilità d’insediamento, crescita rapida, poche esigenze, un apparato radicale profondo ed una bassa capacità di traslocazione verso le porzioni epigee, per far sì che queste possano essere consumate sia dall’uomo che dagli animali (Prasad & Oliveira Freitas, 2003). Sebbene l’inquinante risulti essere meno mobile, la sua permanenza nel sito rappresenta una delle criticità della tecnica, insieme alla difficoltà di valutazione dell’efficienza di piante e ammendanti scelti, alla

necessità di individuare specie tolleranti, alla richiesta di cure colturali e di monitoraggi del sito (ad esempio il pH) (Bradl, 2005).

- 4) Fitovolatilizzazione: i contaminanti vengono assorbiti a livello radicale, per poi essere trasportati per via xilematica e volatilizzati tal quali o in forma modificata (più o meno soggetta a fotodegradazione) attraverso gli stomi, sedi degli scambi gassosi (Bradl, 2005; Kokyo et al., 2014). Contaminanti come selenio, arsenico e mercurio possono essere rimossi dal suolo e dalle acque con questa tecnica, tuttavia è necessario che l'elemento possa subire l'*uptake* da parte dell'apparato radicale. Ad esempio, il selenio, assorbito come selenite, può essere trasformato tramite una serie di processi di riduzione in organo-metallo dimetilato, composto volatile meno tossico di quello iniziale (Bradl, 2005; Brooks, 1998). Sebbene la tecnica permetta una rimozione dal suolo dell'inquinante, il suo rilascio in atmosfera ne comporta un ritorno nell'ecosistema ed una possibile deposizione; l'effetto potrà essere positivo (ad esempio la deposizione di selenio in suoli di esso carenti) o negativo, qualora venisse mantenuta la tossicità (più o meno elevata a seconda delle modificazioni subite nella pianta, a livello radicale, fogliare o durante la traslocazione). Per questa motivazione è importante associare a questa tecnica un'analisi del rischio ambientale (Brugnoli & Massarelli, 2014).
- 5) Fitoestrazione: prevede l'assorbimento, la traslocazione e l'accumulo dei contaminanti in porzioni ipogee, qualora queste siano di facile raccolta, ma soprattutto epigee della pianta, le quali possono essere poi bruciate per ottenere energia e riciclo del metallo dalle ceneri (Tangahu et al., 2011). Il metallo biodisponibile, presente in soluzione o mobilizzabile dalle altre frazioni nel suolo, viene attratto ed internalizzato dalla membrana plasmatica delle cellule radicali per poi essere detossificato (solitamente tramite chelazione o complessazione) in ambiente apoplastico e/o simplastico. In funzione della capacità di accumulazione della pianta può infine essere stoccato a livello radicale (capacità bassa) o nelle porzioni epigee (solitamente foglie, meno fiori e frutti), previa traslocazione per via xilematica (capacità alta). L'efficacia della tecnica è legata a numerosi fattori quali: la biodisponibilità del metallo, le caratteristiche della pianta (specie, varietà, tolleranza, meccanismi di assorbimento, detossificazione, traslocazione e compartimentazione, quantità di biomassa, area esplorata dall'apparato radicale, età, eccetera), l'affinità contaminante – pianta, eventuale aggiunta di agenti chelanti (favoriscono la solubilizzazione e l'*uptake* dei contaminanti), condizioni pedoclimatiche, cure colturali e disponibilità dei nutrienti (Evangelou et al., 2007; Tangahu et al., 2011). L'allontanamento dal sito e la possibilità di recupero del metallo contaminante hanno portato, insieme ai

vantaggi generali del fitorimedia, ad un aumento dell'interesse e degli studi sulla possibilità di impiegare la fitoestrazione nelle operazioni di bonifica.

Crescita delle piante in siti contaminati con metalli pesanti

Le piante che sono in grado di colonizzare terreni con una elevata disponibilità di metallo devono avere meccanismi efficienti che consentano di mantenere bassa la concentrazione dell'elemento potenzialmente tossico nel citoplasma e nei compartimenti più sensibili (Ernst et al., 1992). Gli approcci che possono essere adottati dalla pianta sono due: l'esclusione e la detossificazione.

Nell'esclusione la pianta, al fine di proteggere le strutture interne, evita/riduce l'ingresso del metallo e la sua traslocazione, attraverso più meccanismi. Il primo fra questi è l'essudazione, sia di sostanze influenti sul pH (come HCO_3^- , ad azione alcalinizzante) sia di sostanze chelanti in grado di ridurre la mobilità del metallo; seguono poi l'immobilizzazione esercitata dalla parete cellulare tramite la formazione di legami e complessi (ad esempio con frazioni proteiche) e la selettività esercitata dalla membrana plasmatica e dai trasportatori in essa presenti (Taylor, 1991; Tice et al., 1992). In diversi studi è stata inoltre rilevata la possibile influenza delle micorrize sull'esclusione del metallo, tramite la secrezione di composti ad azione chelante, come la glomalina, e l'assorbimento da parte delle ife (Hall, 2002; Bedini et al., 2004). Va ricordato inoltre che alcuni metalli pesanti rientrano fra gli elementi essenziali per la pianta, per cui non è possibile pensare ad una esclusione totale, piuttosto a meccanismi metallo-specifici attualmente in studio. Qualora vi fosse un ingresso abbondante di metallo potenzialmente tossico, la pianta, oltre a mantenerlo in ambiente apoplastico, può presentare pompe di efflusso attive per restituirlo in rizosfera (Zhu et al., 2004).

La detossificazione prevede l'ingresso regolato di ioni e composti metallici all'interno delle cellule vegetali, dove avviene una loro inattivazione e/o conversione in forme meno tossiche (Zhu et al., 2004). I metalli pesanti causano la morte cellulare nelle piante per inattivazione di enzimi, danno alle proteine strutturali (agendo su gruppi metallo-sensibili come solfidrili e istidili) (Van Assche & Clijsters, 1990; Kneer & Zenk, 1992) e generazione di stress ossidativo (dato dalla formazione di radicali liberi - FR e specie reattive dell'ossigeno - ROS). La formazione di FR e ROS, se non opportunamente bilanciata dalla presenza di antiossidanti, può provocare danni consistenti in più compartimenti cellulari, ad esempio la rottura delle membrane per ossidazione lipidica e la denaturazione di proteine e acidi nucleici. Tutto ciò si ripercuote negativamente su importanti processi metabolici, come la fotosintesi e la fissazione del carbonio (Gratão et al., 2019). I meccanismi di difesa cellulare sviluppati dalle piante consistono in risposte enzimatiche e non, al fine di ristabilire l'omeostasi e di evitare l'innescò

di reazioni autocatalitiche di ossidazione. Tra le risposte enzimatiche, assume particolare rilevanza la superossido dismutasi (SOD, EC 1.15.1.1) in grado di catalizzare il passaggio da FR e ROS ad ossigeno e acqua ossigenata (H_2O_2). L'enzima SOD, oltre a presentare diverse forme (Cu-SOD, Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD sono le più frequenti nelle piante), si localizza nelle zone metallo-sensibili come i cloroplasti, la matrice mitocondriale e il citosol (Cuypers et al., 2010). L' H_2O_2 prodotta, essendo potenzialmente tossica per la cellula, viene rapidamente convertita in ossigeno e acqua da due enzimi principali: catalasi (CAT, EC 1.11.1.6) e perossidasi (assume nome differente in funzione del substrato ossidato, ad esempio ascorbato-perossidasi e glutatione-perossidasi) (Gratão et al., 2019).

Le risposte non enzimatiche allo stress causato dai metalli pesanti includono specifici ligandi quali le fitochelatine (PC), le metallotioneine (MT), le proteine Heat Shock (HSPs), prolina e betaina di glicina (GB, o trimetilglicina), melatonina, ferritina e sostanze fenoliche. Le fitochelatine (struttura generale in Figura 1-4) sono polipeptidi ricchi di cisteina, aventi come formula generale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{X}$, in cui X può essere glicina, γ -alanina, serina o acido glutammico ed n è il numero di peptidi = 2–11 (solitamente da 2 a 4) (Kumar et al., 2016).

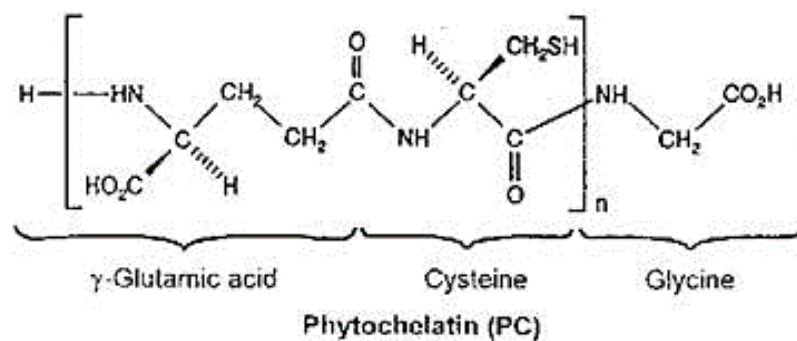


Figura 1-4 Struttura generale di una fitochelatina (Wikipedia).

La sintesi delle PC (Figura 1-5) avviene nel citoplasma per azione dell'enzima PC-sintasi (γ -glutamyl-cisteina dipeptidil trans-peptidasi), utilizzando come substrato il glutatione (GSH, costituito da aminoacidi e sintetizzato nel cloroplasto) (Kumar et al., 2016).

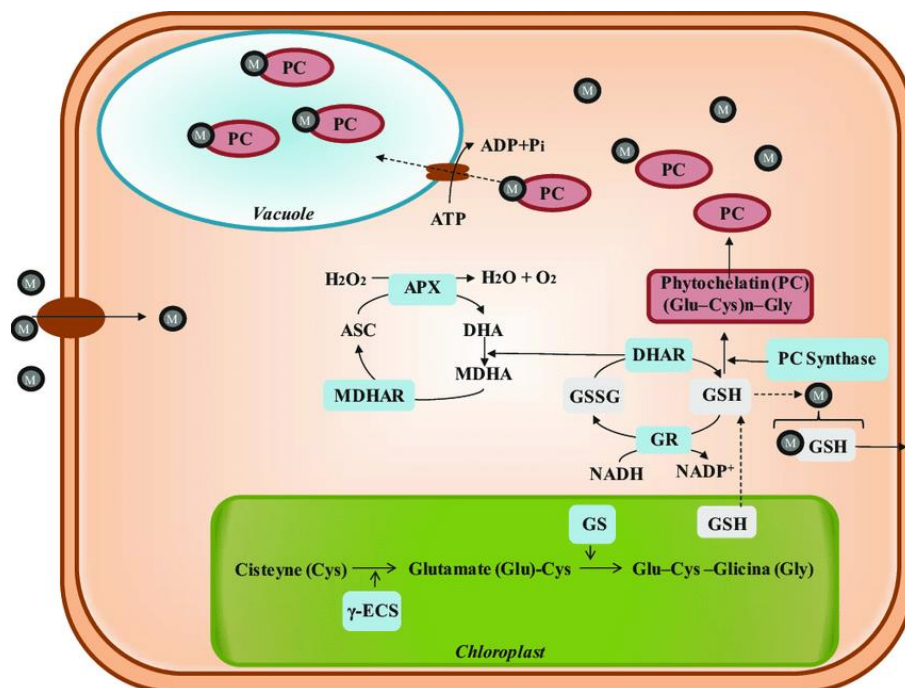


Figura 1-5 Ciclo del GSH, processo di sintesi delle fitochelatine e loro azione all'interno della cellula vegetale (Gratão et al., 2019). Enzimi: γ -glutamato-cistein sintetasi (γ -ECS), glutatione sintetasi (GS).

La produzione delle fitochelatine, così come quella del glutatione, viene stimolata dall'aumento della concentrazione di alcuni ioni metallici (Tabella 1-2) nel citosol ed inibita dall'azione feedback (Tomaszewska et al. 1996; Vatamauniuk et al. 2000; Hall, 2002).

Tabella 1-2 Ioni metallici induttori e non induttori della sintesi di PC (Rausser, 1995).

Induttori	Non induttori
Ag	Na
Bi	Mg
Cd	Al
Cu	Ca
Hg	V
Ni	Cr
Sn	Mn
Sb	Fe
Te	Co
W	Cs
Zn	
SeO_4^{-2}	
SeO_3^{-2}	
AsO_4^{-3}	

L'azione detossificante delle PC è data dalla loro capacità sia di formare complessi con il metallo pesante (in corrispondenza del gruppo tiolico della cisteina) sia di trasportarli successivamente all'interno del lume vacuolare (Salt & Rauser, 1995).

Le metallotioneine (MT) sono proteine a basso peso molecolare (2-16 kDa) che, grazie alla ricchezza in cisteina (più del 30% rispetto agli altri aminoacidi che le costituiscono), sono in grado di chelare gli elementi di transizione (Kumar et al., 2016). In funzione del rapporto fra i residui cisteinici e gli altri aminoacidi vengono generalmente suddivise in tre classi: I, II, III. La biosintesi delle MT (polipeptidi codificati da geni), così come per le fitochelatine, è indotta da numerosi fattori tra cui agenti citotossici, ormoni e metalli pesanti (Kagi, 1991; Yang et al., 2005; Zhou et al., 2006). È possibile quindi dire che sia le fitochelatine che le metallotioneine sono risposte strettamente legate alla presenza dei metalli. Altre risposte di tipo non enzimatico, invece, presentano la funzione detossificante come attività aggiuntiva alla loro funzione principale. Un esempio sono le HSPs/chaperones: sono proteine, raggruppate in famiglie in base al loro peso molecolare, situate sia nel citoplasma che negli organelli cellulari (nucleo, mitocondri, cloroplasti, reticolo endoplasmatico, eccetera) ed aventi funzioni nei processi di sintesi, traslocazione, degradazione, stabilizzazione e protezione di proteine e membrane, sia in condizioni normali che in seguito a shock termico (Wang et al., 2004). Tuttavia, in numerosi studi è emerso un aumento della loro espressione non solo se sottoposte ad alte temperature, ma anche in seguito ad altri fattori abiotici causanti stress, tra cui quello ossidativo dato dai metalli pesanti (Vierling, 1991; Waters et al., 1996; Hall, 2002). Le sHSPs (*small*, proteine a basso peso molecolare 12-40 kDa) sono le più abbondanti nelle piante, e la loro diversificazione riflette probabilmente un adattamento molecolare per tollerare le diverse condizioni di difficoltà (Wang et al., 2004). Le HSP, infine, una volta rilevato lo stress possono fungere da mediatori ed agire sinergicamente con altri meccanismi per contenere il danno cellulare.

Anche la prolina, sintetizzata a partire da ornitina o da glutammato, e la betaina di glicina, prodotta nel cloroplasto a partire da colina, sembrano partecipare alla funzione antiossidante nei confronti di FR e ROS. La GB, in particolare, essendo molto presente nel cloroplasto, permetterebbe una protezione delle membrane tilacoidali ed il mantenimento dell'efficienza fotosintetica. Sulla sua azione antiossidante, tuttavia, sono necessari ulteriori studi, per comprendere se questa sia diretta o legata a meccanismi di risposta innescati da un aumento della sua concentrazione (Genard et al. 1991; Gratão et al., 2019).

La melatonina svolge nelle piante numerose funzioni di regolazione, sia dei metabolismi (primario e secondario, ad esempio: ciclo di Calvin, ciclo degli acidi tricarbossilici, ciclo

ascorbato-glutatione, biosintesi degli acidi grassi, del mio-inositolo, dei carotenoidi, degli antociani, flavonoidi, eccetera) sia dell'espressione genica, ad esempio di enzimi, recettori e fattori di trascrizione (Zhang et al., 2016; Sun et al., 2016; Sarafi et al., 2017; Arnao & Hernández-Ruiz, 2019 a). In diversi studi condotti da Arnao e Hernández-Ruiz (2013, 2018, 2019 a,b) si è evidenziato come il suo livello endogeno vari in funzione delle condizioni ambientali e, soprattutto, come la sua concentrazione aumenti in situazioni di stress biotico (patogeni) e abiotico (deficit e ristagno idrico, estremi termici, radiazioni UV, metalli pesanti, eccetera). L'aumento della melatonina in circolo nello xilema ha un effetto biostimolante per la pianta, che riesce ad incrementare l'assorbimento di azoto, fosforo, zolfo (migliorano il metabolismo cellulare), e la tolleranza nei confronti di elementi potenzialmente tossici (Arnao & Hernández-Ruiz, 2019 a,b). In particolare, in caso di presenza di metalli pesanti, e quindi di stress ossidativo, la melatonina permette di rafforzare la risposta antiossidante, la sintesi e l'azione delle fitochelatine (Arnao & Hernández-Ruiz, 2019 a).

Il ferro è uno dei micronutrienti essenziali per le piante ma, essendo un metallo, un suo eccesso in forma ionica nel citosol può danneggiare le strutture cellulari. Per ovviare a ciò la pianta presenta la fitoferritina, una struttura proteica costituita da 24 subunità sferiche disposte a formare un canale centrale dove viene depositato il ferro come idrossifosfato ferrico, eliminandone quindi l'effetto tossico (Prasad & Hagemeyer, 1999). Oltre all'azione sequestrante nei confronti del ferro, è emerso da prove in vitro che la ferritina possa avere effetto chelante anche nei confronti di altri cationi bivalenti come Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Cu^{2+} (Sczekan & Joshi, 1989).

Infine, per quanto riguarda le sostanze fenoliche, sono ben note le loro proprietà antiossidanti, legate alla capacità di dislocare la carica negativa, acquisita dalla cessione di protoni destinati alla stabilizzazione del radicale, nell'anello benzenico strutturale. Si va quindi a formare un radicale più debole e meno dannoso del precedente metallico.

Essendo i meccanismi di resistenza (così come quelli di trasporto e di accumulo) legati principalmente all'azione di proteine o di molecole presentanti frazioni proteiche (enzimatiche e non), è possibile quantificarne l'espressione nella pianta, sia in condizioni normali che di stress, per definire la sua capacità di tolleranza nei confronti dei metalli pesanti.

Come suggerito da Baker nel 1981 è possibile distinguere tre tipologie di piante in base alla relazione che queste hanno con il suolo e al meccanismo di difesa adottato nei confronti dei metalli pesanti (Figura 1-6):

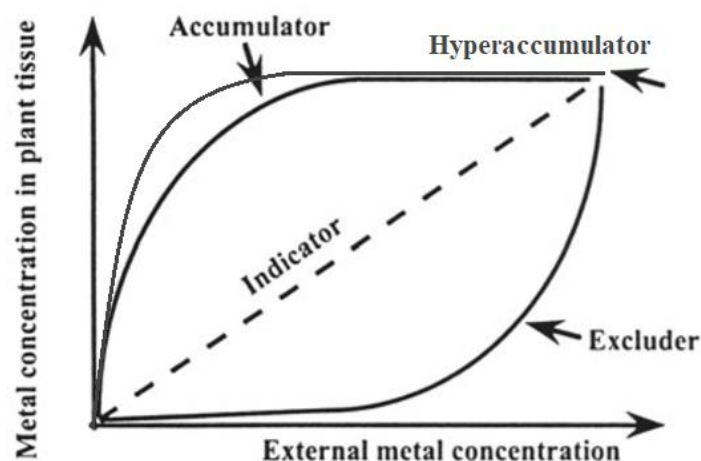


Figura 1-6 Confronto fra piante escluditrici, indicatrici, accumulatrici ed iperaccumulatrici basato sulla relazione fra la concentrazione di metallo nel suolo ed all'interno dei tessuti della pianta. (Rielaborazione grafici Prasad & Hagemeyer, 1999; Zerbi & Marchiol, 2004).

- Escluditrici: per un ampio range di concentrazioni del metallo nel suolo il quantitativo presente nel germoglio rimane basso e costante, grazie all'utilizzo di meccanismi di esclusione. Questa tipologia di piante trattiene e detossifica la maggior parte dei metalli all'interno dei tessuti radicali, riducendo al minimo la traslocazione verso le foglie, le cui cellule rimangono sensibili all'effetto fitotossico (Hall, 2002). Tuttavia, il raggiungimento di un punto critico della concentrazione esterna può comportare un'insufficienza di risposta da parte della pianta, un aumento della concentrazione interna e la manifestazione di sintomi di intossicazione.
- Indicatrici: l'assorbimento e il trasporto dei metalli al germoglio sono regolati in modo tale che la concentrazione interna rifletta i livelli esterni. L'intensità della manifestazione dei sintomi (ad esempio riduzione della crescita, fenomeni di clorosi e necrosi) riflette pertanto in maniera lineare il livello di contaminazione.
- Accumulatrici: la pianta, grazie ad una predisposizione genetica e fisiologica, è in grado di assorbire, traslocare ed accumulare i metalli presenti nel suolo, sia a basse che ad alte concentrazioni, a condizioni che queste siano compatibili con la vita del "biota". Pertanto, come per le escluditrici, non vi sarà una proporzionalità fra concentrazione interna ed esterna, e l'ampiezza dello scostamento sarà influenzata da fattori legati alle caratteristiche del suolo e della pianta.

Nella fitoestrazione le piante impiegate sono le accumulatrici, scelte in funzione dei parametri che determinano il successo del metodo di risanamento (Salt et al., 1998; Robinson et al., 2000; Ciura et al., 2005):

- elevata capacità di estrazione, detossificazione, traslocazione e accumulazione del metallo, preferibilmente nelle porzioni epigee, senza manifestare sintomi;
- tolleranza al metallo e alle altre condizioni del sito;
- crescita veloce e consistente produzione di biomassa;
- alta velocità di accumulo;
- apparato radicale sviluppato e profondo;
- semplicità della gestione agronomica;
- fenotipo vegetale adatto alla raccolta e di facile trattamento e smaltimento.

Sia la gestione della coltura che la tolleranza alle condizioni pedoclimatiche del sito possono essere favorite dall'utilizzo di specie autoctone che tuttavia, per essere impiegate, devono soddisfare anche gli altri requisiti (Sarma, 2011).

Nell'applicazione della fitoestrazione è possibile adottare due strategie differenti (Wise et al., 2000; Pulford & Waston, 2003). La prima prevede l'utilizzo di "normali" accumulatrici insieme all'applicazione nel suolo di prodotti naturali o sintetici, in grado di modificare le caratteristiche fisico-chimiche del substrato (co-remediation). Alcuni esempi sono l'aggiunta di chelanti ad azione acidificante che permettano un aumento della mobilitazione e della biodisponibilità del metallo (esempi, sintetici: EDTA, NTA, DTPA; naturali: acido citrico) (Figura 1-7); o di sequestranti (come bentonite e zeolite) in grado di trattenere l'inquinante (in quest'ultimo caso l'utilizzo di piante estraenti rappresenta un'operazione coadiuvante alla tecnica principale, cioè sottrarranno all'ambiente ciò che non viene immobilizzato). La seconda strategia prevede invece l'impiego di piante dette iperaccumulatrici.

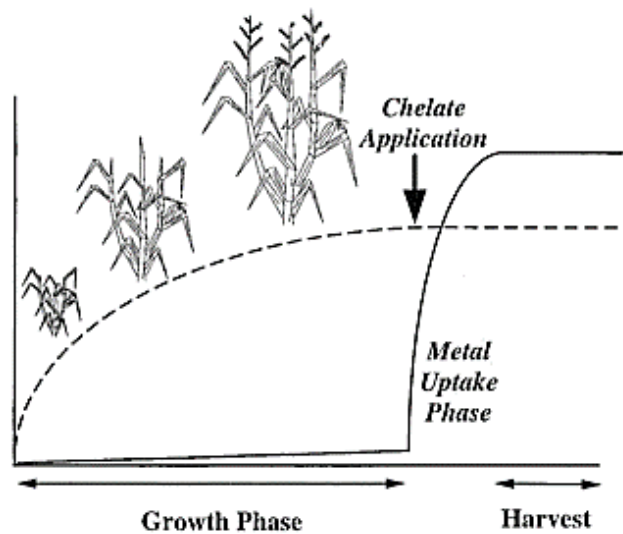


Figura 1-7 Rappresentazione schematica della fitoestrazione con chelanti. La linea continua rappresenta la concentrazione di metallo nella biomassa; la linea tratteggiata l'accrescimento della pianta. (Wise et al., 2000).

Meccanismo di bioaccumulo di metalli pesanti e piante iperaccumulatrici

La pianta prende contatto con il suolo attraverso l'apparato radicale, dando origine ad una relazione basata sull'instaurarsi di un equilibrio dinamico, influenzato sia dalle caratteristiche del terreno (tessitura, porosità, pH, umidità, disponibilità di nutrienti, eccetera) che da quelle della vegetazione (Yamamoto & Kozlowski, 1987). In particolare, le radici intrattengono rapporti solamente con la porzione di terreno a loro più vicina, ovvero la rizosfera, che a seguito di queste interazioni presenta caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche nettamente differenti dalla zona non-rizosferica (Prasad & Hagemeyer, 1999).

Il bioaccumulo nelle piante può essere suddiviso in tre fasi:

- 1) Mobilizzazione e *uptake* del metallo: la pianta è in grado di sottrarre al terreno il metallo biodisponibile, ovvero quello già presente in soluzione circolante e quello che vi può passare dalle altre frazioni del suolo. In particolare, ad essere principalmente assorbite sono le forme ioniche idratate e libere, le coppie ioniche inorganiche solubili (comprese le forme idrossiliche metalliche) ed i chelati organometallici, soprattutto se a basso peso molecolare (Tack, 2010). La mobilizzazione si realizza principalmente con tre modalità: secrezione nella rizosfera di molecole chelanti (tra cui anche i fitosiderofori, solitamente secreti in carenza di ferro ma in grado di chelare anche altri metalli), specifiche reductasi metalliche legate alla membrana plasmatica e, come mostrato in Figura 1-8, l'estrusione di protoni dalle radici (acidificazione della rizosfera) (Salt et al., 1995).

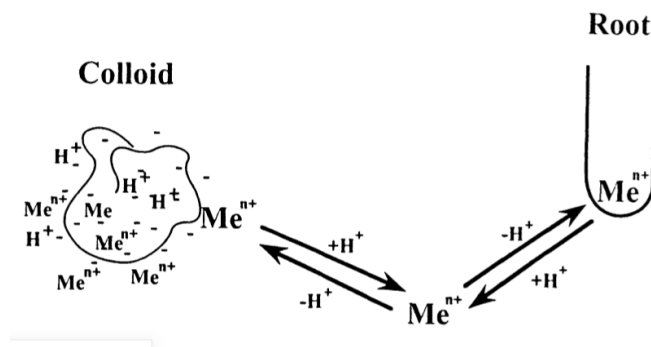


Figura 1-8 *Influenza del pH sulla mobilizzazione degli ioni metallici (Prasad & Hagemeyer, 1999).*

Una volta presente in soluzione il metallo deve essere condotto sulla superficie radicale e questo avviene grazie alla forza di richiamo della pianta (data dal processo di evapotraspirazione), all'azione dei microrganismi e alla presenza di un gradiente di carica metallo-parete cellulare. Entrato a contatto con la parete il metallo può attraversarla passivamente per diffusione (permessa fisicamente dalla presenza di pori nella struttura cellulosa, emicellulosica, pectica e glicoproteica della parete cellulare, e chimicamente dalla presenza di una carica negativa più o meno densa, data ad esempio dalla dissociazione dei gruppi carbossilici degli acidi poligalatturonici costituenti le pectine) e raggiungere l'ambiente apoplastico (Prasad & Hagemeyer, 1999). Qui una parte potrà andare incontro a detossificazione e accumulo, grazie alla presenza di controioni (Cl^- , NH_4^+ , CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) e chelanti naturali come acidi organici a basso peso molecolare (acidi citrico, fumarico, malico, succinico, propionico, tartarico, malico, ossalico, eccetera), nicotianamina (ligando polidentato avente tre gruppi carbossilici e tre amminici), aminoacidi (istidina, glicina, prolina, cisteina, eccetera) e fitine (sali di acido fitico o inositol-esafosforico); mentre una seconda parte, sia in forma ionica che chelata, potrà attraversare la membrana plasmatica tramite trasportatori proteici (carrier, pompe protoniche, simporto e antiporto) ed entrare in ambiente simplastico (Prasad & Hagemeyer, 1999; Poonam et al., 2004; Leitenmaier & Küpper, 2013; Antoniadisa et al., 2017). Sebbene spesso l'internalizzazione tramite trasportatori sia metallo-specifica, è possibile che un metallo potenzialmente tossico riesca a superare la selettività della membrana per affinità con un elemento essenziale. All'interno del citoplasma i metalli perdono la loro pericolosità non solo per azione di chelanti e controioni, ma anche per l'attivazione delle

risposte enzimatiche e non enzimatiche viste nei meccanismi di detossificazione. Il metallo
42

quindi, una volta modificato e/o degradato e/o complessato, avrà perso la sua tossicità e potrà o essere stoccato all'interno del vacuolo della cellula radicale (raggiunto grazie alle PCs e internalizzato grazie alla presenza sul tonoplasto di due pompe protoniche: V-ATPasi e V-Ppasi) o essere traslocato nelle porzioni epigee della pianta (Kumar et al., 2016).

- 2) Traslocazione xilematica: il raggiungimento dei vasi xilematici radicali per i metalli è complicato, a causa della presenza della banda suberizzata del Caspari. È per questo che la maggior parte dell'assorbimento del metallo avviene nelle radici più giovani, dove le bande non essendo ancora completamente sviluppate permettono un passaggio più facile (Marshner, 1995). Lo spostamento acrotono, favorito dalla forza di richiamo delle porzioni aeree, coinvolge un'ampia serie di molecole spesso proteiche ed ATP dipendenti, utilizzate in funzione dell'elemento da trasportare (Kumar et al., 2016).
- 3) Compartimentazione nelle parti epigee della pianta: le iperaccumulatrici sono in grado di accumulare la maggior parte dei metalli nelle cellule del tessuto fogliare senza manifestare sintomi. Questo rappresenta il punto chiave della loro efficienza di sequestro rispetto alle colture che accumulano a livello radicale (Figura 1-9).

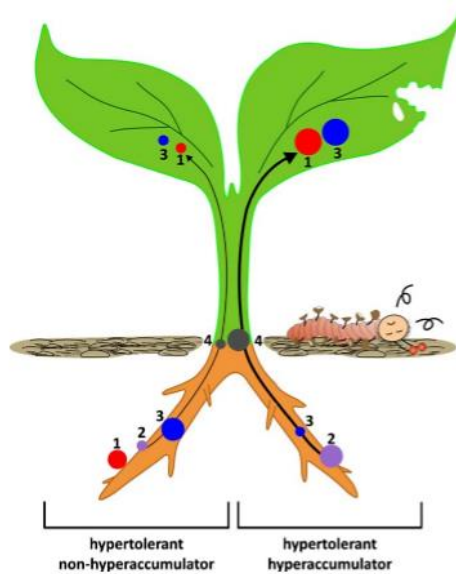


Figura 1-9 Confronto nella modalità di accumulo fra piante iperaccumulatrici e piante escluditrici (Rascio & Navari-Izzo, 2010).

1. *Metalli legati assorbiti sulla parete e/o chelati*
2. *Assimilazione radicale*
3. *Metalli chelati nel citosol e/o sequestrati nel vacuolo*
4. *Traslocazione acrotona*

Al fine di non arrecare danno al sistema fotosintetico, vitale per la pianta, il metallo giunto alle foglie previa traslocazione, viene rapidamente detossificato/sequestrato in strutture non metallo-sensibili, come i vacuoli e le pareti delle cellule che costituiscono l'epidermide, i tricomi e la cuticola (Rascio & Navari-Izzo, 2010). In molti casi, inoltre, viene evitato l'ingresso dei metalli pesanti nelle cellule sussidiarie e di guardia degli stomi, con l'obiettivo di preservare la loro funzionalità e l'efficienza degli scambi gassosi (Frey et al., 2000; Cosio et al., 2005).

La regolazione ed il coordinamento di ciascuna fase, le cui modalità variano in funzione dell'elemento coinvolto, della sua quantità e della sua essenzialità o meno, sono fondamentali per la vita dell'organismo.

Con il termine iperaccumulatrici vengono definiti erbe, arbusti e alberi capaci di concentrare i metalli pesanti nella loro biomassa a livelli anche cento volte superiori ai normali valori (Tabella 1-3), senza mostrare sintomi di fitotossicità (Prasad & Hagemeyer, 1999).

Tabella 1-3 Confronto fra il range di normale concentrazione dei metalli nei tessuti vegetali e valori limite inferiori nelle iperaccumulatrici. Valori riferiti al peso secco ed espressi in $mg\ kg^{-1}$ (Baker & Brooks, 1989).

Metallo	Range di normalità	Limite inferiore per le iperaccumulatrici
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

In particolare, Baker e Brooks nel 1989 e Verbruggen et al. nel 2009, hanno evidenziato che per essere definita tale una pianta deve accumulare > 0.01% di Cd, > 0.1% di Co, Cu, Cr, Pb, Ni, As, Sb o Se, e >1% di Mn o Zn (tutte le percentuali fanno riferimento al peso secco di porzioni di pianta epigee). Ad oggi più di 450 specie, soprattutto erbacee, sono state riconosciute come iperaccumulatrici naturali (circa lo 0.2% delle angiosperme oggi note), appartenenti principalmente alle seguenti famiglie: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae, ed Euphobiaceae (Prasad & Oliveira Freitas, 2003; Rascio & Navari-Izzo, 2010). È bene evidenziare che l'individuazione di specie adatte risulta essere estremamente difficile

in quanto la capacità di accumulo, oltre ad essere variabile sia fra le specie che all'interno di queste, può non essere correlata alla tolleranza nei confronti del metallo, variare in funzione dell'organo di accumulo analizzato e/o essere dovuta ad una specializzazione della pianta cresciuta su sito contaminato (non essere genotipicamente espressa) (Prasad & Hagemeyer, 1999). Difficile è anche fornire la motivazione che abbia portato queste piante ad una capacità di sequestro così elevata. Secondo Martens e Boyd (1994) è possibile ricondurre la spiegazione del fenomeno a quattro meccanismi principali: di resistenza a carenze di altri elementi, di vantaggio competitivo rispetto a specie meno resistenti, di assimilazione involontaria per affinità con altri nutrienti e di difesa contro potenziali patogeni e predatori. Interessanti ricerche hanno riscontrato che molti dei geni coinvolti nei meccanismi di iperaccumulo sono presenti anche in piante accumulatrici "normali", ad essere diversa tuttavia è la loro regolazione ed espressione (Verbruggen et al., 2009).

La scelta di utilizzare piante iperaccumulatrici nel fitorisanamento è stata dettata dalle caratteristiche vantaggiose che presentano, come la crescita veloce, l'apparato radicale profondo, l'elevata capacità di accumulo e l'efficiente sistema di detossificazione e traslocazione del metallo nelle foglie. Tutto ciò va a compensare la criticità principale di queste colture, ovvero una bassa produzione di biomassa, dovuta al fatto che le risorse energetiche vengono destinate principalmente al sostegno dei meccanismi fisiologici coinvolti nella detossificazione (Robinson et al., 2000). Con l'obiettivo di incrementare questo parametro si è volta l'attenzione verso la possibilità di utilizzare specie coltivate nel fitorimediazione, che non solo producono più biomassa mantenendo un discreto livello di accumulo, ma permettono una migliore programmazione e gestione agronomica. I risultati ottenuti dalle prove effettuate su colture alimentari (riso, fava, mais, grano, eccetera), oleaginose (girasole, senape, colza, arachidi, eccetera), bioenergetiche e foraggere hanno permesso di selezionare alcune specie annuali (ciclo di durata 3-5 mesi) particolarmente inclini ad estrarre metalli, come girasole (*Helianthus annuus*), mais (*Zea mays*), senape (*Brassica juncea*), orzo (*Hordeum vulgare*), tabacco (*Nicotiana tabacum*), avena (*Avena sativa*) e pisello (*Pisum sativum*) (Poonam et al., 2004; Ciura et al., 2005; Evangelou et al., 2007). L'utilizzo di specie annuali, sebbene abbiano un accumulo inferiore rispetto alle arbustive e alle arboree, permette di realizzare un numero alto di cicli di bonifica consecutivi e la raccolta rapida di dati utili alla ricerca. Inoltre, l'impiego di piante erbacee, dotate di un apparato radicale robusto e fibroso permette di stabilizzare ed esplorare volumi di suolo notevoli. Come è possibile immaginare, la coltura in seguito alla raccolta non potrà essere destinata al consumo alimentare a causa della concentrazione di metallo contenuta. Affinché la biomassa (di cui è necessaria l'asportazione,

altrimenti i metalli, in seguito alla degradazione della componente organica, tornerebbero nel suolo) non rappresenti un rifiuto da smaltire si è provveduto all'ideazione di un processo chiamato “*phytomining*”, avente come obiettivo l'ottenimento di ricavi dal recupero dei metalli accumulati dalle piante grazie alla loro azione sequestrante (Poonam et al., 2004). Lo stesso processo potrà essere eseguito anche sui sottoprodotti ottenuti dalla trasformazione fisico-chimica di colture bioenergetiche impiegate nella fitoestrazione. Il *phytomining* va ad affiancare le operazioni di riduzione di volume e peso tipiche dello smaltimento (compostaggio, compattazione, trattamento termico, eccetera) (Bradl, 2005).

I principali parametri utilizzati nella valutazione della fitoestrazione

- 1) Coefficiente di traslocazione (TC) suolo-pianta o BAF (fattore di bioaccumulo): consiste nel rapporto fra la concentrazione del metallo nella pianta (C_p , espressa in mg kg^{-1}) e la concentrazione dello stesso nel suolo (C_s , espressa in mg kg^{-1}) (Adriano, 2001).

$$TC = C_p/C_s$$

Il valore di TC dipenderà dalle caratteristiche pedoclimatiche, dalle caratteristiche della pianta, dalla natura e dalla quantità dell'elemento.

- 2) Fattore di traslocazione (TF): è dato dal rapporto tra la concentrazione del metallo nella parte aerea (C_a) e la concentrazione dello stesso nelle radici (C_r). Entrambe sempre espresse in mg kg^{-1} .

$$TF = C_a/C_r$$

Solitamente le piante in condizioni di stress da metalli pesanti presentano un valore di TF <1, indice del tentativo di limitare i contaminanti inorganici alle radici e di evitarne la traslocazione verso gli organi aerei vitali. Un TF >1, viceversa, sta a significare una tolleranza della pianta nei confronti del metallo ed una sua capacità nel traslocarlo nelle porzioni epigee (Chanu & Gupta, 2016). Il TF è uno dei fattori chiave della fitoestrazione e nella valutazione degli iperaccumulatori.

- 3) Fattore di concentrazione per parti di pianta (CFPP): esprime il rapporto fra la concentrazione del metallo nella parte di pianta considerata (C_{pp}) e la concentrazione dello stesso nel suolo (C_s) (espresse in mg kg^{-1}).

$$CFPP = C_{pp}/C_s$$

Questo indice assume importanza per capire come la pianta ripartisce il metallo assorbito nei diversi organi, sia fra parti ipogee ed epigee, sia in queste ultime fra foglie, frutti e fiori (Figura 1-10) (Prajapati & Meravi, 2014). Scostamenti nei valori di CFPP possono essere dovuti alla diversità della natura e della tossicità dei metalli, dei ruoli da loro ricoperti nei

processi fisiologici e dalla differente affinità pianta-metallo. Ad esempio, metalli come cromo, piombo e rame tendono ad essere confinati nella radice per affinità con le componenti della parete, altri invece, come cadmio, zinco e ferro sono più soggetti ad essere traslocati (Van Assche & Clijsters, 1990).

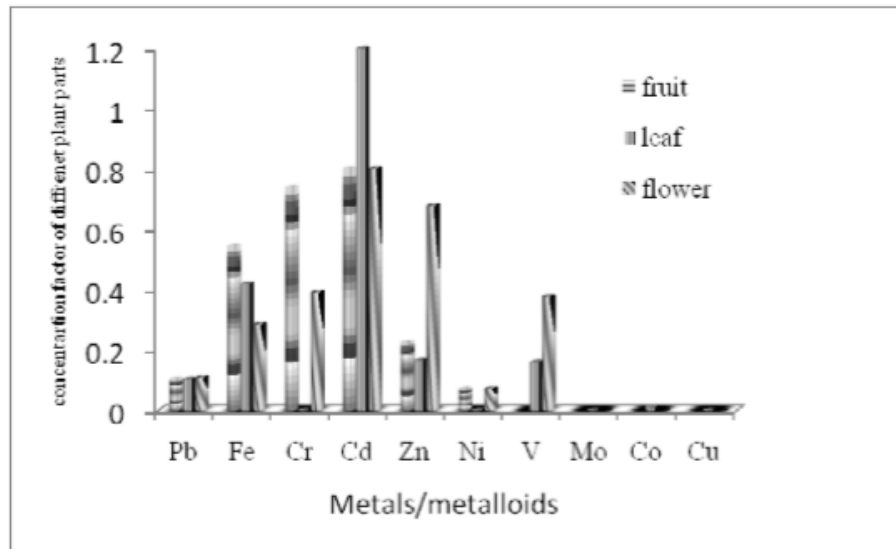


Figura 1-10 CFPP per differenti metalli/metalloidi (Prajapati & Meravi, 2014).

- 4) Determinazione della percentuale di rimozione del metallo: per stimare il quantitativo di contaminante rimosso ad ogni ciclo colturale è necessario tenere in considerazione il BAF, la quantità di biomassa prodotta e l'estensione dell'apparato radicale (Zerbi & Marchiol, 2004). Il valore viene determinato attraverso il rapporto fra il prodotto della Cp e il quantitativo di biomassa (Mb) ed il prodotto della Cs e la massa di terreno rizosferico (Mr).

$$\% \text{ rimozione} = (Cp \times Mb) / (Cs \times Mr) \times 100$$

La biomassa può essere espressa facendo riferimento a diversi parametri (come l'altezza della pianta, il numero di radici laterali, il numero di foglie, il quantitativo di carbonio contenuto, eccetera) ma il più utilizzato è la sostanza secca (Prasad & Hagemeyer, 1999). Insieme alla determinazione della biomassa può essere interessante una valutazione del tasso di crescita relativo (RGR, Relative Growth Rate) e del valore del LAI (Leaf Area Index).

Il primo, determinato con la formula che segue (dove W è la sostanza secca e t è il tempo), indica il tasso di accumulo di nuova massa secca per unità di massa secca esistente (Khawar & Bhagirath, 2018; Prasad & Hagemeyer, 1999), riflettendo quindi la produttività della pianta.

$$RGR = (\Delta W / \Delta t) \times (1/W)$$

Il valore del LAI (Leaf Area Index), invece, rappresenta un dato importante in quanto, essendo coincidente con la superficie fotosintetizzante, indica l'investimento produttivo della pianta (Prasad & Hagemeyer, 1999).

5) Fattore tempo (t_r): permette di prevedere il numero di anni richiesti per la bonifica del sito contaminato. Viene calcolato con la seguente formula (Antoniadis et al., 2017):

$$t_r = \Delta C_s \times SWH / AMU$$

Dove:

ΔC_s = differenza di concentrazione del metallo nel suolo prima e dopo il processo di bonifica (mg kg^{-1});

SWH = peso del suolo per ettaro (kg ha^{-1}), dato dal prodotto di $\rho_b \times D \times 10^7$, dove:

ρ_b = densità del suolo essiccato (g cm^{-3});

D = profondità del suolo da riparare, nel caso del fitorimediazione corrisponde alla profondità raggiungibile dell'apparato radicale (m);

10^7 = fattore di conversione;

AMU = sequestro di metallo annuale per ettaro, dato dal prodotto di $C_p \times Y$, dove C_p è la concentrazione di metallo nella pianta (mg kg^{-1}) e Y la produzione di biomassa asportabile della pianta per anno per ettaro (kg di sostanza secca).

Vantaggi e limiti della tecnica

Nella scelta della modalità di bonifica è opportuno tenere in considerazione vantaggi e svantaggi di ciascuna tecnica. I pregi della fitoestrazione, già in parte visti nel capitolo precedente, possono essere così sintetizzati (Prasad & Hagemeyer, 1999; Khan et al., 2004):

- costo nettamente inferiore rispetto ai metodi di risanamento fisici e chimici;
- applicabile *in situ* (senza movimentazione di terreno) anche su aree ampie;
- efficace nella riduzione del quantitativo di inquinanti presenti nelle varie matrici ambientali;
- uso da parte della pianta di energia solare (costo zero) per alimentare i vari processi fisiologici e metabolici, compreso quello di estrazione;
- esteticamente apprezzabile;
- ecologico e sicuro per l'ambiente;
- rende possibile il recupero dei metalli pesanti e l'ottenimento da questi di un ritorno economico in grado di compensare parte dei costi sostenuti;
- effetti positivi generali, aggiuntivi all'azione decontaminante, dati dalla presenza della pianta sul terreno, ad esempio l'arieggiamento del suolo, il controllo dell'erosione,

l'apporto di sostanza organica, la stimolazione della microflora e della microfauna rizosferica per il mantenimento dell'ecosistema.

D'altra parte, il fatto che sia una tecnica basata sull'utilizzo di piante, e quindi esseri viventi, comporta una serie di limitazioni legate alle loro caratteristiche e alle loro necessità. I principali aspetti che è necessario tenere in considerazione sono:

- Biodisponibilità del metallo: sebbene questa sia necessaria per effettuare il sequestro del contaminante, un suo eccesso può comportare da un rallentamento della crescita della pianta ad una sua morte per effetto fitotossico (Tangahu et al., 2011). La pianta, infatti, è in grado di tollerare anche concentrazioni elevate di metallo nel substrato, tuttavia queste devono poter essere compatibili con la vita (Sarma, 2011). Importante è ricordare che la biodisponibilità può essere stimolata/limitata da numerosi fattori, sia biotici che abiotici, e che un suo eccesso, oltre a danneggiare la coltura, aumenta in modo consistente il rischio di lisciviazione e di inquinamento delle falde sotterranee.
- Profondità del sito da decontaminare: come visto nel meccanismo di bioaccumulo, ed in particolare nella fase di *uptake*, la pianta è in grado di estrarre il metallo solamente se prossimo al suo apparato radicale, presente cioè in ambiente rizosferico (Tangahu et al., 2011). Sarà pertanto necessario che il contaminante sia presente nell'area esplorata dalle radici ("*root zone*") che, per le piante erbacee, si concentra nel primo metro al di sotto della superficie del suolo. Inquinamenti a maggiore profondità, se non raggiungibili nemmeno dallo sviluppo radicale di piante arbustive e arboree, richiederanno o la movimentazione del terreno o l'applicazione di un'altra tecnologia di risanamento.
- Presenza contemporanea di più inquinanti nel sito da bonificare: spesso l'azione di sequestro delle piante iperaccumulatrici avviene nei confronti di uno o pochi elementi specifici, per cui prima di poterle applicare in siti pluricontaminati sono necessari studi e ricerche (Bradl, 2005), al fine di evitare una riduzione dell'efficienza, un allungamento dei tempi e fenomeni di fitotossicità.
- Condizioni pedoclimatiche e di accessibilità del sito: durante la scelta delle specie impiegate è bene confrontare le esigenze della coltura (tessitura, struttura, pH e salinità del suolo, temperature richieste nelle fasi di sviluppo, fabbisogni idrici e nutrizionali, cure culturali richieste, eccetera) con le condizioni pedoclimatiche del luogo in cui si richiede l'intervento di bonifica (Sarma, 2011). Nel caso in cui queste fossero troppo diverse fra loro sarà necessario valutare possibili interventi, e costi di questi, per rendere il sito idoneo o cambiare le specie utilizzate. Il sito, inoltre, deve poter essere accessibile per i mezzi

utilizzati per le cure colturali ordinarie e per eventuali interventi aggiuntivi a seguito dell'insorgere di malattie e avversità (Kokyo, 2014).

- Smaltimento biomassa ricca di contaminanti: durante la pianificazione dell'intervento di bonifica è necessario prendere in considerazione che al termine di ciascun ciclo colturale verrà prodotto un quantitativo più o meno consistente di biomassa ricca di inquinanti, potenzialmente tossica e, pertanto, non destinabile al consumo o alla distribuzione in campo (Poonam et al., 2014). La gestione di questo materiale ed i costi da sostenere per il suo smaltimento rappresentano una delle criticità principali della tecnica.
- Difficoltà nella previsione dei risultati: essendo numerose le variabili da considerare per la realizzazione della bonifica con fitorimediazione, è difficile poter assicurare la riuscita dell'intervento. Il sito è un sistema aperto e dinamico e, sebbene vengano fatte ricerche e molteplici prove in laboratorio, non è certo che le piante diano gli stessi risultati dopo il loro spostamento in campo. Spesso, infatti, si verificano efficienze reali inferiori alle teoriche, date ad esempio da complicità nell'adattamento, dall'utilizzo di specie alloctone, dalle diverse età di piante e contaminanti (Antoniadis et al., 2017).
- Tempi per il completamento della bonifica: il fitorimediazione richiede tempi molto più lunghi (anni) rispetto alle altre tecniche di bonifica (settimane o mesi), e numerosi cicli colturali per rientrare al di sotto dei valori di concentrazione limite previsti (Tangahu et al., 2011; Antoniadis et al., 2017). È importante sottolineare che la fitoestrazione permette una riduzione dei contaminanti nel suolo ma non una loro completa rimozione. Sebbene la crescita delle piante iperaccumulatrici sia rapida ed il loro apparato radicale ben sviluppato, la scarsa produzione di biomassa porta ad un allungamento del periodo richiesto per la bonifica. Tutto ciò comporta l'impossibilità di utilizzo di questa tecnica in caso di pericolo imminente per la salute umana e ambientale o se vi fosse una richiesta di rapido intervento da parte degli investitori, che spesso non sono disposti ad attendere anni (Bradl, 2005).

1.1.3 Quadro normativo sui siti contaminati

L'ambiente e la salute dell'uomo risentono negativamente della presenza di sostanze potenzialmente pericolose nelle diverse matrici ambientali: suolo, sottosuolo, sedimenti e acque.

In Italia diverse sono state le disposizioni e le leggi riguardanti gli strumenti amministrativi e di finanziamento per il risanamento e la bonifica ambientale: legge n. 349 del 1986, legge n. 441 del 29 ottobre 1987 (in particolare l'Articolo 5) e n. 475 dell' 8 novembre 1988 (in particolare l'Articolo 9). Tutta via in queste mancavano i criteri per la redazione di piani

regionali di intervento. Le prime linee guida vennero fissate con il D.M. 121 del 16 maggio 1989, al quale seguì il Decreto Legislativo n. 22 del 5 febbraio 1997, noto come Decreto Ronchi.

Il D.Lgs. 22/97 si propose di *“razionalizzare e semplificare il quadro normativo vigente, allineando l’ordinamento nazionale a quello comunitario sulla base dei principi previsti dalle direttive CE n. 91/156, 91/689 e 94/62”* riguardanti la gestione dei rifiuti, dei rifiuti pericolosi, degli imballaggi e dei rifiuti di imballaggi. Il decreto stabilì le condizioni, le persone giuridiche, le modalità e gli enti pubblici coinvolti nelle operazioni di bonifica e nella gestione dello smaltimento dei rifiuti, favorendo l’impiego delle tecnologie più idonee a garantire la tutela della salute pubblica e dell’ambiente. Il Decreto Ronchi venne successivamente completato e attuato dal D.M. n.471 del 25 ottobre 1999: la prima normativa organica nazionale sui siti contaminati (D’Aprile et al., 2007), costituita da 18 articoli e 5 allegati tecnici. Questa è il *“Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell’art. 17 del DLvo 5/2/97, n. 22, e successive modificazioni e integrazioni”*.

Nel D.M. 471/99 con sito inquinato viene inteso un:

“sito che presenta livelli di contaminazione o alterazioni chimiche, fisiche o biologiche del suolo o del sottosuolo o delle acque superficiali o delle acque sotterranee tali da determinare un pericolo per la salute pubblica o per l’ambiente naturale o costruito. Ai fini del presente decreto è inquinato il sito nel quale anche uno solo dei valori di concentrazione delle sostanze inquinanti nel suolo o nel sottosuolo o nelle acque sotterranee o nelle acque superficiali risulta superiore ai valori di concentrazione limite accettabili stabiliti dal presente regolamento”

nell’Allegato 1 tali valori vengono forniti in forma tabellare, espressi in milligrammi su chilogrammo di sostanza secca ed in relazione alla specifica destinazione d’uso del sito: verde pubblico, privato e residenziale nella prima colonna, commerciale ed industriale nella seconda (Tabella 1-4).

Tabella 1-4 Valori di concentrazione limite accettabili di alcuni metalli pesanti e metalloidi nel suolo e nel sottosuolo riferiti alla specifica destinazione d'uso dei siti da bonificare (Tabella realizzata facendo riferimento alla tabella 1 dell'Allegato 1 del D.M. 471/99).

	A. Siti ad uso Verde pubblico, privato e residenziale (mg kg ⁻¹ sostanza secca)	B. Siti ad uso Commerciale e Industriale (mg kg ⁻¹ sostanza secca)
Composti inorganici		
Antimonio	10	30
Arsenico	20	50
Cadmio	2	15
Cobalto	20	250
Cromo totale	150	800
Mercurio	1	5
Nichel	120	500
Piombo	100	1000
Rame	120	600
Selenio	3	15
Vanadio	90	250
Zinco	150	1500

Come indicato nell'Allegato 1 (D.M. 471/99)

“Non si richiede che, nella totalità dei siti in esame, le analisi chimiche siano condotte sulla lista completa delle sostanze indicate in Tabella. Per ogni sito sulla base delle attività pregresse, della caratterizzazione specifica, e di ogni altra fonte di informazione l'autorità competente seleziona, tra le sostanze indicate in tabella, "sostanze indicatrici" che permettano di definire in maniera esaustiva l'estensione, il tipo di inquinamento e il rischio posto per la salute pubblica e l'ambiente”.

Qualora il sito richieda l'intervento di bonifica ed il risanamento ambientale, ai fini di eliminare l'inquinamento o ricondurre le concentrazioni delle sostanze inquinanti entro i valori limite, sarà necessaria la redazione del progetto seguendo i criteri generali descritti nell'Allegato 4 (D.M. 471/99): questo prevede “*un'accurata attività di caratterizzazione del sito inquinato e dell'area soggetta agli effetti dell'inquinamento presente nel sito*”. Il progetto è articolato secondo tre livelli:

1. Piano di caratterizzazione: descrive in maniera accurata il sito (comprese le componenti ambientali), le attività su di esso svolte, la localizzazione e la possibile estensione della contaminazione, le condizioni necessarie per la protezione ambientale e per la tutela della salute pubblica. Presenta inoltre le indagini da attuare per definire la tipologia, il grado e l'estensione dell'inquinamento.
2. Progetto preliminare: in seguito all'analisi dei dati raccolti, stabilisce gli obiettivi e le migliori tecnologie da adottare nell'intervento di bonifica, tenendo da conto i vincoli normativi e la destinazione futura del sito. Definisce infine gli interventi e i lavori da realizzare, permettendo quindi una stima dei costi.
3. Progetto definitivo: determina i lavori ed i relativi costi in maniera dettagliata, la manutenzione necessaria per l'opera di bonifica, il risanamento ambientale e le misure di sicurezza del sito.

Ad oggi la normativa nazionale è rappresentata dal D.Lgs. n.152/2006 "Norme in materia ambientale" il quale, nelle sei parti di cui è composto, raccoglie e modifica la normativa ambientale precedente. Le disposizioni transitorie fra i due decreti vengono individuate nell'articolo 265 comma 4 e nell'articolo 242 comma 11 del D.Lgs. 152/2006.

La parte quarta, Titolo V, del decreto

"disciplina gli interventi di bonifica e ripristino ambientale dei siti contaminati e definisce le procedure, i criteri e le modalità per lo svolgimento delle operazioni necessarie per l'eliminazione delle sorgenti dell'inquinamento e comunque per la riduzione delle concentrazioni di sostanze inquinanti, in armonia con i principi e le norme comunitari, con particolare riferimento al principio "chi inquina paga"".

Rispetto al precedente decreto si evidenzia l'introduzione di due parametri:

- Concentrazione Soglia di Contaminazione: *"i livelli di contaminazione delle matrici ambientali che costituiscono valori al di sopra dei quali è necessaria la caratterizzazione del sito e l'analisi di rischio sito specifica, come individuati nell'Allegato 5 alla parte quarta del presente decreto"*. I valori delle CSC riportati in Allegato 5 corrispondono, con qualche modifica, a quelle dell'Allegato 1 del D.M. 471 e, allo stesso modo, non viene considerata la totalità degli inquinanti ma solamente quelli definiti "contaminanti indice", desunti dalla caratterizzazione del sito e da fattori quali: il superamento dei valori di fondo naturali (CSC), i livelli di tossicità, i gradi di mobilità e persistenza, la correlabilità ad attività svolta nel sito e la frequenza dei valori superati di CSC. Il superamento dei valori di CSC non comporta l'immediata attuazione della bonifica (Figura 1-11), ma una ulteriore raccolta di dati riguardo il sito.

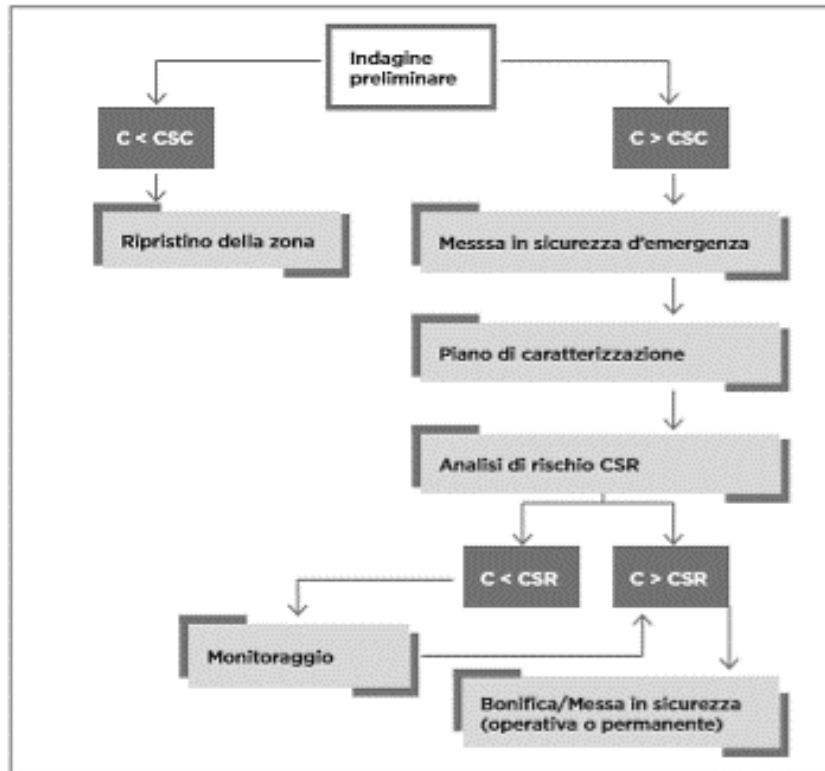


Figura 1-11 Schema semplificato e riassuntivo della procedura prevista per l'analisi sito-specifica, al fine di valutare la necessità o meno dell'intervento di bonifica (ISPRA, 2010).

- Concentrazioni Soglia di Rischio (CSR): i livelli di contaminazione delle matrici ambientali, da determinare caso per caso con l'applicazione della procedura di analisi di rischio sito specifica, il cui superamento richiede la messa in sicurezza e la bonifica (Romanambiente: normativa bonifica siti inquinati).

Il D.Lgs. 152 fornisce inoltre una nuova definizione di sito potenzialmente contaminato:

“sito nel quale uno o più valori di concentrazione delle sostanze inquinanti rilevati nelle matrici ambientali risultino superiori ai valori di concentrazione soglia di contaminazione (CSC), in attesa di espletare le operazioni di caratterizzazione e di analisi di rischio sanitario e ambientale sito specifica, che ne permettano di determinare lo stato o meno di contaminazione sulla base delle concentrazioni soglia di rischio (CSR)”;

e di sito contaminato:

“sito nel quale i valori delle concentrazioni soglia di rischio (CSR), determinati con l'applicazione della procedura di analisi di rischio di cui all'Allegato 1 alla parte quarta del presente decreto sulla base dei risultati del piano di caratterizzazione, risultano superati”.

In Italia sono oltre 15000 i siti potenzialmente contaminati, fra questi più di 3400 già dichiarati contaminati; a questi si aggiungono gli oltre 1500 siti minerari abbandonati e le aree comprese nei 41 Siti di Interesse Nazionale (SIN) individuati in Figura 1-12 (ISPRA, 2010; ISPRA, 2018).

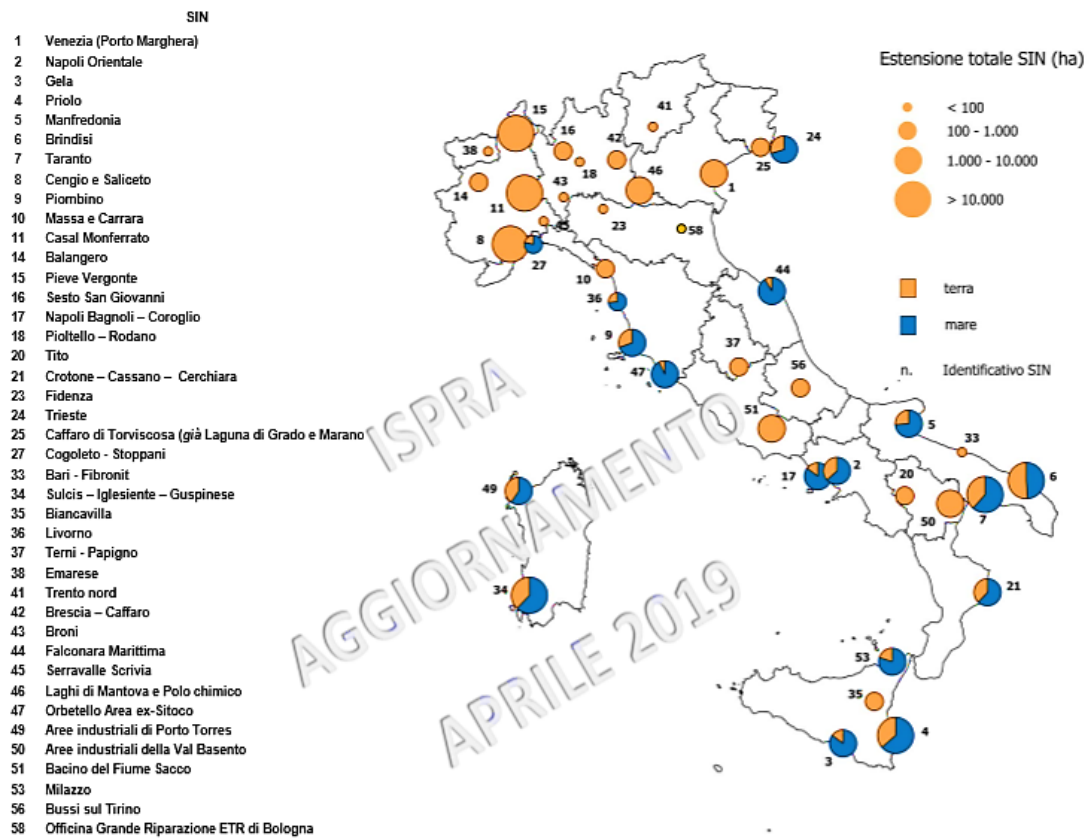


Figura 1-12 Localizzazione e superficie dei Siti di Interesse Nazionale (ISPRA, aggiornamento aprile 2019).

I SIN “ai fini della bonifica, sono individuabili in relazione alle caratteristiche del sito, alle quantità e pericolosità degli inquinanti presenti, al rilievo dell’impatto sull’ambiente circostante in termini di rischio sanitario ed ecologico, nonché di pregiudizio per i beni culturali ed ambientali” (Articolo 252, comma 1 del D.Lgs. 152/06 e successive modifiche e integrazioni). I soggetti a cui compete la procedura di bonifica sono il Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM), che si avvale dell’aiuto dell’Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), dell’Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPA), dell’Istituto Superiore di Sanità (ISS) ed altri soggetti qualificati pubblici o privati. Tra i doveri dell’ISPRA, oltre ai SIN, rientrano cinque ulteriori tematiche: l’anagrafe dei siti da bonificare, la caratterizzazione ambientale, il monitoraggio

delle matrici aeriformi, le tecnologie di bonifica e l'analisi di rischio sanitario e ambientale (ISPRA, 2019).

I dati registrati mostrano un avanzamento dello stato di attuazione degli interventi a partire dal 2014. In particolare, rispetto al 2013, sono aumentate del 65% le percentuali delle aree a terra, per le quali sono stati approvati progetti di bonifica. Interessante è inoltre l'incremento delle percentuali di interventi in situ, validi sostituti degli interventi ex situ meno sostenibili dal punto di vista ambientale anche nella prospettiva della circular economy (MATTM – Relazione sullo stato dell'ambiente, 2016). La Fondazione MacArthur, principale promotore della transizione globale verso la circular economy, la definisce come un'economia “basata sul principio di evitare rifiuti e inquinamento, mantenere in uso prodotti e materiali, e rigenerare i sistemi naturali”. Stando al primo Rapporto nazionale realizzato dal Circular Economy Network nel 2019, l'Italia è al primo posto in Europa in questo ambito (EconomyUp, 2020).

A livello europeo l'importanza del suolo all'interno degli equilibri ambientali e la protezione di questo dal degrado è stata riconosciuta con l'approvazione del 7° programma di azione per l'ambiente (Decisione 1386/2013/UE) con validità fino al 2020. La sensibilità dell'Europa al tema della protezione del suolo aveva già portato nel 2006 la Commissione europea a redigere la Strategia Tematica per il Suolo (COM2006(231)1 definitivo) e una proposta di Direttiva quadro per la protezione del suolo (COM2006(232)2). L'opposizione da parte di alcuni Stati membri, legata principalmente alla sussidiarietà, ai costi ritenuti eccessivi e al carico amministrativo, ha portato al ritiro della Direttiva nel 2014 (MATTM). “È venuta così a mancare l'unica proposta legislativa europea specificatamente mirata alla tutela del suolo, ma la sua formulazione ha, comunque, rivestito una grande importanza nell'indirizzare le attività europee e nazionali sui suoli” (MATTM - Relazione sullo stato dell'ambiente, 2016). Secondo il rapporto dell'European Environment Agency (EEA) nel 2019 in Europa ben il 37.3% dei siti investigati presenta contaminazione da parte di metalli pesanti, seguiti da oli minerali (33.7%) e da idrocarburi policiclici aromatici (13.3%) (Figura 1-13).

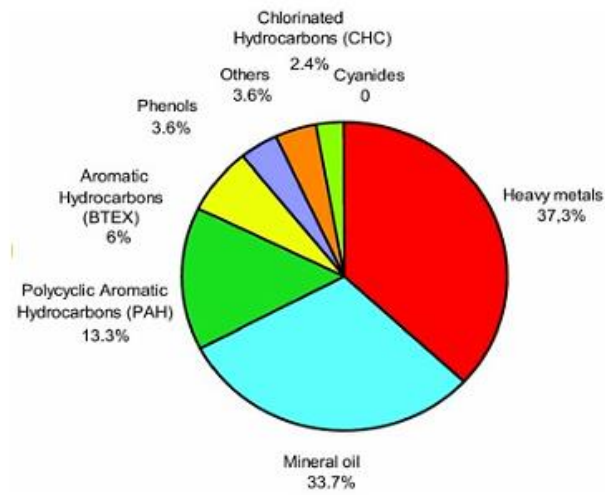


Figura 1-13 Principali contaminanti rilevati nei siti visionati in Europa (Rapporto EEA, 2019).

2. SCOPO DELLA TESI

La ricerca oggetto di tesi nasce dalla collaborazione con la compagnia italiana Sadam S.p.A., sub-holding del Gruppo Maccaferri di Bologna (comparto agroalimentare) e responsabile della filiera di produzione saccarifera (Clusterspring – Eridania S.p.A).

La compagnia fu coinvolta nel progetto di recupero ambientale dell'ex cava Quercetti Terenzio e Lanfranco S.n.c., situata nei terreni di proprietà "Tenimenti Angelini S.p.A." (località di Ponte Pio - Comune di Monte Roberto, Ancona). Il progetto di recupero aveva l'obiettivo di rimodellare la morfologia della cava per permetterne l'uso agronomico, utilizzando come materiale di riempimento le calci provenienti dalla raffinazione dello zucchero. In particolare, vennero utilizzate per la costituzione dell'abbancamento le calci di carbonatazione prodotte nella campagna saccarifera del 2004. Durante le valutazioni di conformità del sito condotte dall'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche (ARPAM) emerse la presenza di inquinanti chimici nelle calci ed in particolare, all'interno di un'area del sito, il superamento del limite legale della concentrazione di nichel (Ni) solubile ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). La società, con l'obiettivo di evitare i costi elevati delle metodologie di bonifica fisiche e chimiche, si è rivolta alla Sezione di Chimica Agraria del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona) che da tempo studia e supporta l'applicazione di tecniche di fitorisanamento per la bonifica di siti inquinati.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la capacità di fitorimediazione di quattro specie di piante coltivate, ai fini dell'abbattimento della frazione solubile del Ni al di sotto del limite di legge stabilito nel D.M. n. 186 (05/04/2006) ed in tempi conciliabili con le necessità ambientali. La prova ha previsto l'impostazione di due casi studio: il primo riguardante la coltivazione di spinacio (*Spinacia oleracea*) e colza (*Brassica napus*) in serra ed il secondo realizzato all'aperto con sorgo (*Sorghum vulgare*) e girasole (*Helianthus annuus*). La scelta delle specie da utilizzare si è basata sulla loro capacità di soddisfare le proprietà richieste per l'applicazione reale della tecnica di fitorisanamento, in particolare: facilità di coltivazione e di gestione agronomica, ampia disponibilità, economicità (Keller et al., 2003; Ciura et al., 2005;

Meers et al., 2005). La durata breve dei cicli biologici di queste colture (110 giorni per le autunno -vernine e 90 giorni circa per le primaverili-estive) e la possibilità di utilizzarle in rotazione ha permesso di ottenere velocemente dati sull'andamento della prova e di garantire una copertura vegetale del sito durante tutto l'anno. Tutto ciò ha portato a preferire l'impiego di piante coltivate rispetto alla vegetazione già presente e adattata alle condizioni del sito contaminato.

Spinacio, colza, sorgo e girasole sono specie già da tempo note in campo scientifico per la loro capacità di tollerare ed accumulare i metalli pesanti presenti nel substrato di crescita (capacità iperaccumulatrice), requisiti fondamentali per il successo della bonifica (Solhi et al., 2005; Revathi et al., 2011; Chaturvedi et al., 2019).

I limiti principali che caratterizzano questa modalità biologica di bonifica sono i lunghi tempi richiesti e la difficoltà di previsione del comportamento della coltura in condizioni di pieno campo. Per avere risultati attendibili si è deciso di lavorare in “mesocosmo” (riproduzione dell'ambiente reale in piccola scala) e con il monitoraggio continuo di tutti i possibili fattori d'influenza esterni, in particolare delle condizioni climatiche.

Le piante sono in grado di estrarre dal substrato il metallo biodisponibile, ovvero quello presente nella soluzione circolante (frazione solubile) e quello che vi può entrare grazie all'instaurarsi di scambi ionici con le superfici colloidali organiche e inorganiche. La frazione solubile, oltre ad interessare la biodisponibilità, è strettamente legata al rischio di inquinamento e quindi alla contaminazione ambientale. La soluzione circolante, infatti, specialmente se non richiamata dalle piante (grazie agli essudati radicali e all'effetto dell'evapotraspirazione) può andare incontro a percolazione profonda e raggiungere le falde acquifere, diventando dannosa per l'ecosistema e l'ambiente in generale. Importante è stata quindi la quantificazione del nichel solubile e biodisponibile prima e dopo la presenza delle colture sulle calci. Le capacità di estrazione e mobilitazione del metallo da parte delle specie iperaccumulatrici scelte per la prova sono state di importanza centrale per permettere un successivo allontanamento dell'inquinante dal sito. Proprio per questo si è provveduto all'analisi dei tessuti delle parti epigee ed ipogee in post raccolta e allo studio della ripartizione e dello stoccaggio del nichel nei vari organi vegetali. La fitoestrazione sarà tanto più efficiente quanto più la pianta riesce ad assorbire, traslocare e stoccare il metallo nelle porzioni epigee.

La raccolta delle piante e la loro termo-valorizzazione permetterà poi il recupero del metallo per altri scopi.

Nella prova in serra con colza e spinacio sono state condotte due tipologie di prove in contemporanea, la prima di sola fitoestrazione, mentre la seconda di co-remediation, una tecnica che combina i vantaggi dell'utilizzo di sequestranti naturali e del fitorimediaio.

Basandosi su un precedente studio condotto dall'Università Politecnica delle Marche si è deciso di utilizzare come sequestrante naturale la bentonite attivata, un minerale argilloso che presenta una buona capacità di ritenzione del nichel quando viene aggiunto al substrato a dosi del 5% (p/p) (Casucci et al., 2020).

L'utilizzo della bentonite permette di sottrarre rapidamente una parte del metallo dalla soluzione circolante grazie alla sua capacità di immobilizzarlo e di integrarlo nella sua rete cristallina. Tuttavia, se venisse impiegata nella bonifica esclusivamente bentonite, il nichel, pur essendo meno pericoloso per l'ambiente, rimarrebbe nelle calci, e la quota non coinvolta nell'immobilizzazione verrebbe persa per percolazione profonda, insieme alla parte che annualmente potrà essere restituita alla soluzione dalle altre frazioni del metallo (complessata, chelata e precipitata). La presenza contemporanea delle piante permetterà di allontanare fisicamente il nichel dal sito contaminato attraverso una continua sottrazione dal substrato nel tempo. Come sostenuto da Armishaw (1992), la combinazione di più tecnologie di bonifica può portare ad una maggiore efficacia dell'intervento.

3. MATERIALI E METODI

La prova sperimentale condotta è stata strutturata in due precisi casi studio: il primo ha previsto la coltivazione in serra di piante a ciclo autunno-vernino, mentre il secondo ha riguardato specie primaverili-estive fatte crescere in box posti nel sito contaminato. Il substrato sul quale sono state fatte crescere le colture è stato campionato nell'area contaminata segnalata dall'ARPAM (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente regione Marche), in seguito ad una campagna di sondaggi ambientali, nella località Ponte Pio (Comune di Monte Roberto, Ancona – Marche), dove calci di carbonatazione (residuo del processo di depurazione del sugo zuccherino greggio, proveniente dallo stabilimento saccarifero Eridania Sadam di Jesi) sono state impiegate nell'ambito di un progetto di recupero ambientale, come materiale di riempimento di una cava in disuso (ex-cava Quercetti Terenzio e Lanfranco S.n.c. nei terreni di proprietà "Tenimenti Angelini S.p.A.") (Figura 3-1).

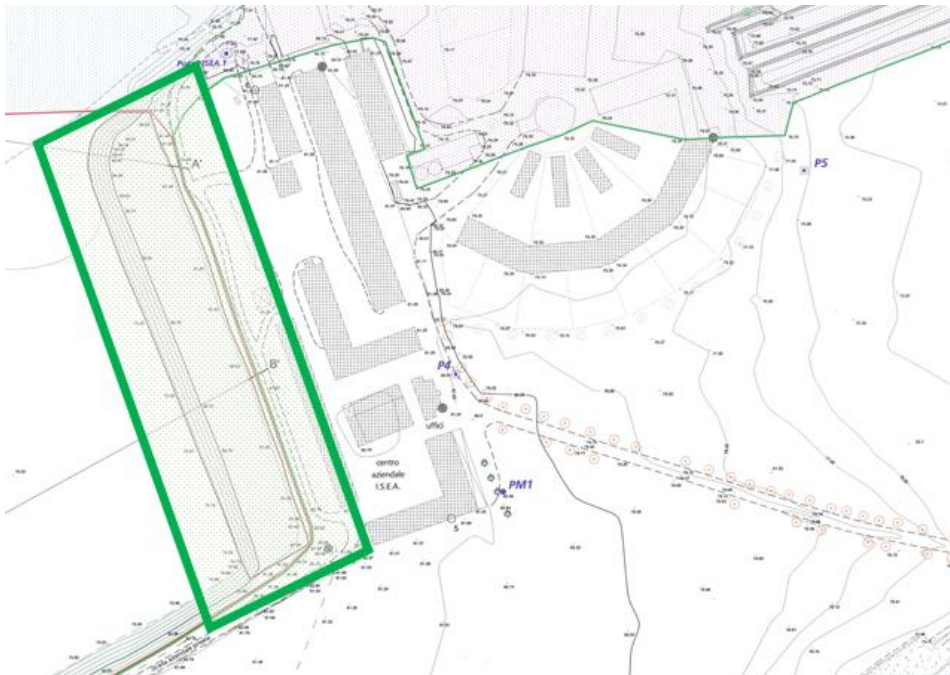


Figura 3-1 Pianta area di contaminazione individuata dall'ARPAM.

Grazie ai report analitici forniti dal laboratorio ARPAM di Ancona e dal laboratorio incaricato da Eridania Sadam si è potuta individuare un'area di contaminazione omogenea, dove la concentrazione di nichel solubile risulta essere, in punti e profondità note, superiore al valore limite del metallo sull'eluato del test di cessione (Metodo UNI1082), stabilito per legge pari a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Allegato 3 del D.M. 186 del 05/04/2006).

Le indagini in campo si sono svolte in due periodi differenti: la prima a novembre del 2017, dove è stato campionato il materiale per le prove in serra, e la seconda a maggio del 2018, dove è stato prelevato il substrato per la preparazione dei box per le prove in campo.

Delle calci di carbonatazione non contaminate (concentrazione di Ni solubile inferiore a $2 \mu\text{g L}^{-1}$) sono state campionate nello stesso abbancamento di Monte Roberto, ma al di fuori dell'area contaminata mappata dall'ARPAM. Tali calci non contaminate sono state utilizzate per la coltivazione di piante "controllo", al fine di ottenere valori di riferimento con cui confrontare i dati risultanti dalle piante cresciute su calci contaminate.

3.1 Prelievo dei campioni nel sito contaminato

L'area di contaminazione omogenea individuata, di superficie pari a 600 m^2 , è stata sottoposta ad un'operazione di sbancamento, in modo tale da poter raggiungere la profondità alla quale si sono individuati i punti di contaminazione da nichel al di sopra dei limiti di legge (profondità media 3.00-3.20 m). Si è poi proceduto alla delimitazione di quattro parcelle di forma quadrata (lato 2 m), poste fra loro equidistanti lungo un transetto ricoprente l'intera lunghezza dell'area contaminata mappata dall'ARPAM (Figura 3-2).



Figura 3-2 Parcelle individuate nell'area contaminata omogenea di Ponte Pio.

Il metodo di campionamento adottato è il seguente: in ognuna delle parcelle individuate nell'area contaminata, sono stati prelevati 5 sub-campioni (20 in totale) da 3.5 kg ciascuno, seguendo lo schema riportato in Figura 3-3 e ad una profondità di circa 20 cm.

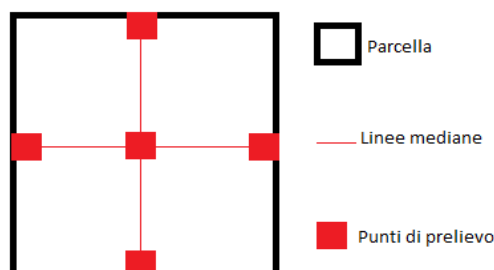


Figura 3-3 Schema adottato per il prelievo dei cinque campioni in ogni parcella.

3.2 Determinazione del pH, della sostanza organica e del nichel totale nelle calci di carbonatazione

Le calci sono state essiccate in stufa a 40°C per 24 ore, poi sono state macinate manualmente con mortaio e vagliate a 2 mm (UNI10802).

Le calci in questione sono costituite per il 90% da carbonato di calcio (CaCO_3) (Casucci et al., 2020), presentano reazione alcalina e un alto contenuto di sostanza organica (Tabella 3-1).

Tabella 3-1 Caratteristiche del substrato impiegato nei due casi studio.

Parametro	Valori
pH	8.36±0.10 ¹
Sostanza organica (%)	7.2
Ni totale (mg kg ⁻¹)	2.62±0.63 ¹

¹ I valori riportati di pH e concentrazione di Ni sono medie ottenute da quindici repliche, ± la deviazione standard.

Il pH è stato determinato con l'immersione di un pHmetro in una sospensione realizzata con una parte di substrato e due parti e mezzo di acqua distillata (rapporto 1:2.5), mentre per la misurazione della sostanza organica è stato impiegato il metodo Walkley-Black (1934).

Per la determinazione della concentrazione di nichel totale, sono state prelevate aliquote pari a 0.25 g da utilizzare nel processo di digestione acida per dissoluzione totale della matrice utilizzando un forno a microonde. Il trattamento di ogni aliquota, condotto in tutte le sue fasi a potenza (1000 W) e pressione (massimo 120 bar) note, ha previsto l'aggiunta di 10 ml di

soluzione contenente HNO_3 (28 L kg^{-1}) e H_2O_2 (8:2 v/v), il riscaldamento per 30 minuti a 200°C e infine la filtrazione. Le concentrazioni di nichel totale sono state determinate utilizzando uno spettrometro ad emissione al plasma ICP-OES Agilent 5100 VDV. Durante l'analisi operativa del sistema sono stati utilizzati: Potenza della Radiofrequenza 1.4 kW, Flusso di gas al plasma 12 L min^{-1} , Flusso di gas ausiliario 1.0 L min^{-1} , Flusso del nebulizzatore 0.7 L min^{-1} , Vista di osservazione assiale, 3 Letture replicate, Lunghezze d'onda selezionate per il nichel 231.604 nm.

3.3 Prova in serra

Le condizioni climatiche avverse perdurate nei mesi autunnali ed invernali, hanno reso necessario condurre la prova all'interno della serra dell'Università Politecnica delle Marche. Le due specie impiegate sono state *Spinacia oleracea* L. (spinacio) e *Brassica napus* L. (colza), considerate in diversi studi scientifici interessanti per l'applicazione del fitorisanamento in siti contaminati con metalli pesanti (nichel in particolare) (Giordani et al., 2005; Vamerali et al., 2010; Brunetti et al., 2011). I campioni di substrato prelevati in campo nell'autunno del 2017, da ciascuna delle quattro parcelle, sono stati accuratamente miscelati, essiccati all'aria e setacciati a due millimetri; nove sub-campioni sono stati poi prelevati per la determinazione della concentrazione iniziale di nichel solubile e biodisponibile, in modo da valutare l'omogenea distribuzione delle due frazioni nel substrato.

Il substrato è stato poi ripartito in diciotto vasi di plastica dotati di fori sul fondo ed aventi volume pari a 3 litri ciascuno. In questi sono state fatte crescere separatamente le due specie. In particolare, sono state realizzate sei prove (tre repliche per ciascuna):

- *Brassica* senza bentonite (B);
- *Brassica* con bentonite al 5% (p/p) (B+);
- *Brassica* di controllo (BC);
- *Spinacia* senza bentonite (S);
- *Spinacia* con bentonite al 5% (p/p) (S+);
- *Spinacia* di controllo (SC).

La bentonite attivata impiegata nelle prove è composta per l'85-90% da montmorillonite e per l'1-4% da silice inerte. Il prodotto, oltre a presentare una tessitura compresa fra i 100 e i 500 μm , è caratterizzato dal punto di vista chimico-fisico da una superficie specifica di 88 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, una capacità di scambio cationico (CSC) pari a 150 meq/100 g ed un pH di 9.5 (soluzione al 5%).

In ciascun vaso, sono stati seminati inizialmente dieci semi al fine di ovviare al rischio di mancata emergenza. Si è poi provveduto ad una selezione delle piantine, lasciandone quattro in ciascun vaso per la colza e sei per lo spinacio. Le condizioni di crescita in serra hanno previsto: temperatura diurna di $24\pm 3^{\circ}\text{C}$ e notturna di $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo naturale, umidità relativa del $60\pm 2\%$ ed irrigazione manuale dal momento della semina al momento della raccolta, evitando condizioni di stress idrico (Figura 3-4).

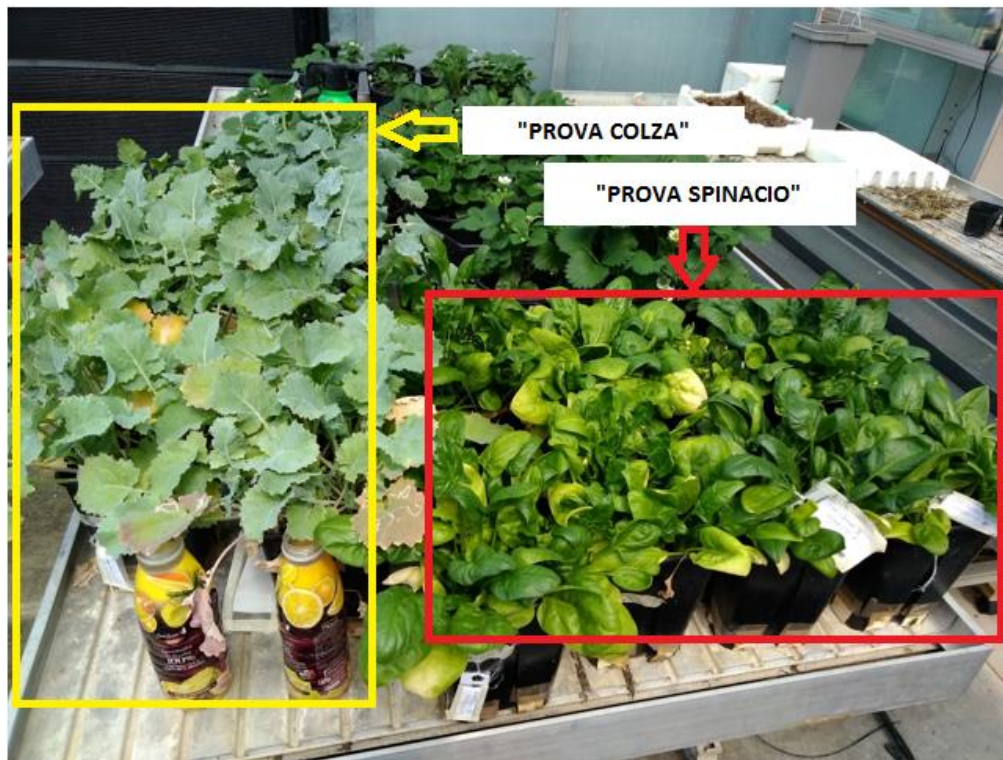


Figura 3-4 Prova condotta in serra su colza e spinacio.

Al termine del ciclo biologico delle colture, di durata pari a 110 giorni, tutte le piante di ciascun vaso sono state raccolte, campionate, lavate accuratamente con acqua distillata, separate in parte ipogea ed epigea, asciugate completamente in stufa ad una temperatura di 70°C , pesate, macinate e analizzate per valutare la concentrazione di nichel nei tessuti.

Infine, dal substrato presente in ciascun vaso, sono stati prelevati tre campioni (per un totale di nove campioni per prova), ognuno dei quali oggetto nuovamente della procedura di analisi per la determinazione della concentrazione di nichel solubile e biodisponibile.

3.4 Prova outdoor

Il substrato prelevato durante il campionamento di maggio 2018 da ciascuno delle quattro parcelle individuate nell'area contaminata è stato utilizzato per riempire quattro box in plastica numerati (da 1 a 4) di volume pari ad 1 m³ ciascuno. Il riempimento di ogni box ha previsto l'utilizzo di campioni provenienti da una diversa parcella, al fine di rappresentare l'eterogeneità spaziale della distribuzione di nichel nel sito. I box, infine, sono stati posizionati direttamente nel sito contaminato di Monte Roberto, esposti alle naturali condizioni climatiche. Analogamente a quanto fatto per i vasi in serra, prima di procedere alla semina, si son prelevati nove sub-campioni da ogni box, per la determinazione delle frazioni di nichel solubile e biodisponibile all'inizio della prova. I sub-campioni sono stati prelevati lungo percorsi indipendenti a zig zag e a differenti profondità in modo da garantire la casualità del prelievo.

Le colture scelte per la prova outdoor sono state *Helianthus annuus L.* (girasole), seminato nei box 1 e 3 (nove piante lasciate crescere per ciascun box), e *Sorghum vulgare L.* (sorgo), seminato nei box 2 e 4 (quindici piante lasciate crescere per ogni box) (Figura 3-5 a,b).



(a)



(b)

Figura 3-5 prova condotta outdoor con girasole (a) e sorgo (b).

Anche in questo caso la scelta delle specie si è basata su risultati ottenuti da studi riguardanti la loro capacità di fitodepurazione nei confronti di matrici inquinate da metalli pesanti (Schmidt, 2003; Giordani et al., 2005; Angelova et al., 2011). L'unico intervento di irrigazione manuale è stato effettuato subito dopo la semina, per favorire il germogliamento e l'emergenza delle plantule.

Al termine del ciclo colturale (durato circa 90 giorni) un terzo delle piante presenti in ogni box sono state raccolte, divise nelle diverse porzioni (radici, steli, foglie e infruttescenze), essiccate in stufa a 70 °C, pesate, macinate e analizzate per determinare la concentrazione di nichel nei tessuti.

Al fine di valutare la distribuzione nel substrato delle due frazioni del metallo contaminante (nichel solubile e biodisponibile) dopo la coltivazione delle specie selezionate, sono state eseguite le procedure di analisi sia sul materiale adeso intimamente alla superficie radicale (materiale rizosferico, campionato all'eradicazione della pianta), sia su sub-campioni di calci prelevati a due differenti profondità (0-30 cm e 30-60 cm) in ogni box.

3.5 Estrazione del nichel solubile e biodisponibile e analisi degli eluati

Substrato

Come previsto nei criteri ufficiali del test di cessione (D.M. 186 del 05/04/06, norma UNI 10802), l'estrazione della frazione solubile di nichel viene eseguita in due fasi:

- Fase di lisciviazione: per ciascun campione di calci, di peso e umidità note, si aggiunge acqua distillata (agente lisciviante) in proporzione 1 g/10 ml, in modo tale da ottenere un rapporto liquido/solido di $10 \text{ L kg}^{-1} \pm 2\%$. Successivamente i campioni opportunamente sigillati vengono posti in agitazione ($120 \text{ giri min}^{-1}$) per 24 ore.
- Fase di separazione liquido/solido: ogni campione, dopo essere stato centrifugato per cinque minuti, viene filtrato e portato a volume (25 ml) con l'agente lisciviante.

La frazione biodisponibile è stata estratta seguendo la procedura indicata nella Gazzetta Ufficiale (n.248 del 21/10/99 metodo XII), la quale prevede l'utilizzo di una soluzione di acido dietilentriamminopentacetico (DTPA), calcio cloruro ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.01 M e trietanolamina 0.1 M a pH 7,3 (metodo Lindsay-Norwell). In particolare, la soluzione estraente è stata realizzata miscelando 1.97 g di DTPA 0.005 M, 14.92 g di trietanolamina e 1.46 g di cloruro di calcio. Il pH 7.3 è stato infine raggiunto con l'aggiunta di HCl ed il tutto è stato portato ad un volume pari a 1 L con dell'acqua deionizzata. L'analisi degli eluati è stata eseguita utilizzando uno spettrometro ad emissione al plasma ICP-OES Agilent 5100 VDV. Durante l'analisi operativa del sistema sono stati utilizzati: Potenza della Radiofrequenza 1.4 kW, Flusso di gas al plasma

12 L min⁻¹, Flusso di gas ausiliario 1.0 L min⁻¹, Flusso del nebulizzatore 0.7 L min⁻¹, Vista di osservazione assiale, 3 Letture replicate, Lunghezze d'onda selezionate per il nichel 231.604 nm.

Piante

Dai tessuti, una volta asciugati e macinati, si è prelevato un campione di peso 250 mg, al quale sono stati addizionati 7 ml di HNO₃ (rapporto: 28 L kg⁻¹) al 65%. Trascorse le 12 ore previste per la digestione acida si è provveduto ad aggiungere alla miscela 2 ml di H₂O₂ al 30%. Dopo 6 ore, il tutto è stato portato ad una temperatura di 90°C per 90 minuti, per poi essere raffreddato fino a temperatura ambiente, filtrato sottovuoto con filtri di Teflon da 0.45 µm e portato a volume con 15 ml di acqua distillata (Huang et al., 2004). L'analisi degli eluati è stata eseguita utilizzando uno spettrometro ad emissione al plasma ICP-OES Agilent 5100 VDV. Durante l'analisi operativa del sistema sono stati utilizzati: Potenza della Radiofrequenza 1.4 kW, Flusso di gas al plasma 12 L min⁻¹, Flusso di gas ausiliario 1.0 L min⁻¹, Flusso del nebulizzatore 0.7 L min⁻¹, Vista di osservazione assiale, 3 Letture replicate, Lunghezze d'onda selezionate per il nichel 231.604 nm.

3.6 Analisi statistica

A causa dell'assenza di una distribuzione normale dei dati sono stati impiegati test non parametrici. In particolare, si sono utilizzati il test Kruskal-Wallis ed il test post-hoc di Dunn per calcolare le differenze significative nel contenuto di nichel nei diversi tessuti delle piante e nei campioni di substrato. Come suggerito in letteratura (Bender et al., 2001; Chen et al., 2017), sono stati scelti due diversi aggiustamenti del p-value, *Benjamini-Hochberg* o *Hochberg*, a seconda del numero di test eseguiti. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software R (R versione 3.5.2).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Prova in serra

4.1.1 Nichel nel substrato

Nella Figura 4-1 vengono riportate le concentrazioni di nichel solubile e biodisponibile rilevate nelle calci di carbonatazione prima e dopo la coltivazione delle piante sul substrato. Prima della semina si è riscontrata una concentrazione di nichel simile tra i campioni, con valori di scarto interquartile pari a 3.0 (mediana 15.0) per la frazione solubile e a 21.7 (mediana 331.0) per la biodisponibile.

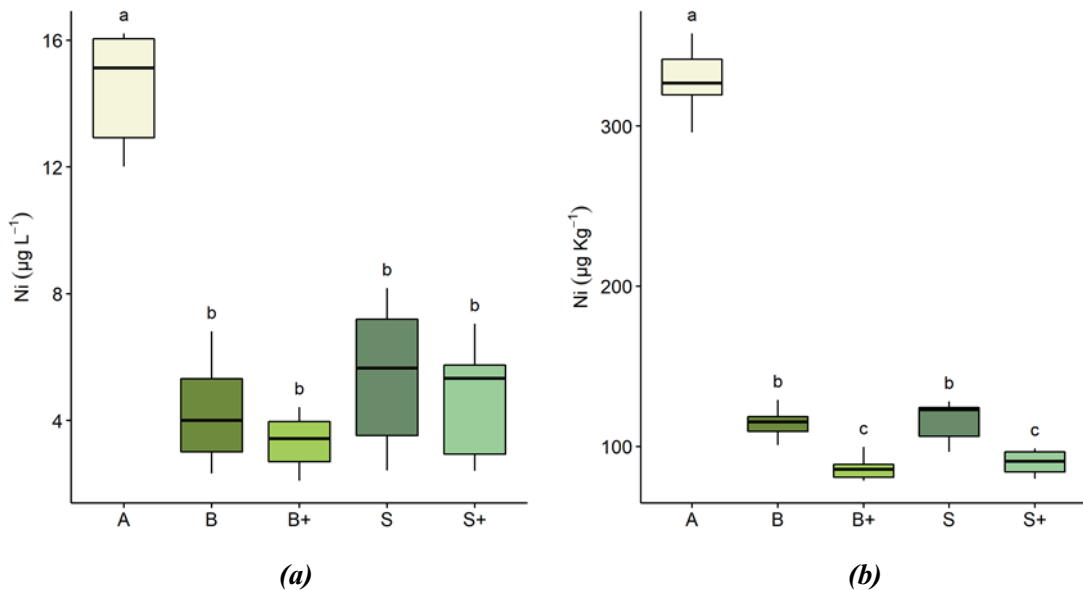


Figura 4-1 Concentrazioni di nichel nelle calci prima e dopo la coltivazione. (a) Ni solubile ($\mu\text{g L}^{-1}$) nei campioni di calce; (b) Ni biodisponibile ($\mu\text{g kg}^{-1}$) nei campioni di calce. Le lettere sull'asse delle ascisse fanno riferimento alla concentrazione prima della semina (A) e dopo la raccolta di: colza senza bentonite (B) e con bentonite (B+); spinacio senza bentonite (S) e con bentonite (S+). Le lettere minuscole si riferiscono ai confronti multipli Kruskal-Wallis e Dunn (aggiustamenti del p-value Benjamini-Hochberg, α -level=0.05).

Successivamente alla raccolta delle piante, è stata ripetuta la procedura di analisi delle calci e si è osservata una riduzione significativa della concentrazione mediana di nichel solubile rispetto alla concentrazione iniziale (Figura 4-1a). Tra le prove non si sono riscontrate differenze significative, neanche in quelle in cui era stata aggiunta bentonite alle calci contaminate. Come mostrato in Figura 4-1b, anche la concentrazione di nichel biodisponibile è risultata ridotta in modo significativo in tutte le prove, con un calo ulteriore laddove era stata aggiunta bentonite al substrato, indipendentemente dalla coltura presente. I dati ottenuti nel complesso hanno dato esito soddisfacente con riduzioni notevoli delle due quote di nichel e con l'ulteriore effetto di riduzione del biodisponibile nei test con aggiunta di bentonite. Non si riscontrano invece differenze significative tra le due specie vegetali utilizzate, ma l'analisi del contenuto di nichel nel vegetale potrebbe fornire indicazioni molto importanti sulla quantità di metallo asportata e sulla distribuzione nelle varie parti della pianta.

4.1.2 Nichel nelle piante

La Figura 4-2 mostra le concentrazioni di nichel rilevate nelle parti ipogee (4-2a) ed epigee (4-2b) delle piante. La concentrazione del metallo nelle radici è risultata significativamente maggiore rispetto al controllo nelle due prove con aggiunta di bentonite e comunque sempre più elevata per la colza rispetto allo spinacio. Per quanto riguarda la porzione epigea per la colza non si riscontrano differenze significative rispetto al controllo per le due prove con e senza aggiunta di bentonite mentre per lo spinacio gli aumenti di concentrazione di nichel rispetto al controllo per i due casi con e senza bentonite risultano altamente significativi e mostrano maggiore capacità di accumulo rispetto alla colza nella parte epigea. L'aggiunta di bentonite, quindi, sembra influenzare l'accumulo nella parte ipogea ma non in quella epigea.

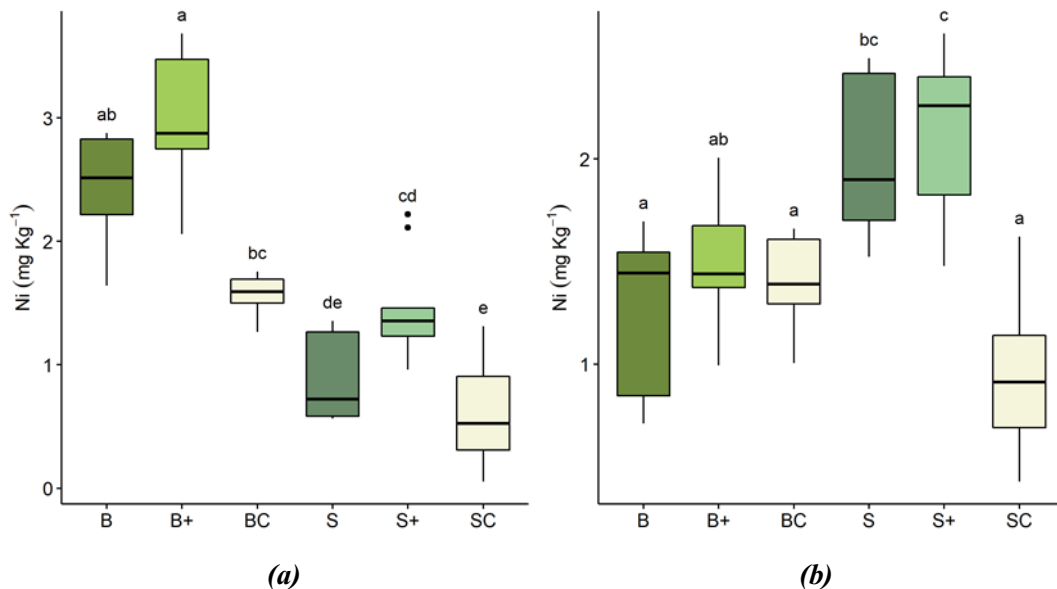


Figura 4-2 Concentrazione di nichel (mg kg^{-1} di sostanza secca) nelle piante. (a) Porzione ipogea; (b) Porzione epigea. Le lettere sull'asse delle ascisse si riferiscono alla concentrazione di Ni in: piante di colza cresciute su calci contaminate senza bentonite (B), con bentonite (B+) e piante di colza cresciute su calci non contaminate come prova controllo (BC); piante di spinacio cresciute su calci contaminate senza bentonite (S), con bentonite (S+) e piante di spinacio cresciute su calci non contaminate come prova controllo (SC). Le lettere minuscole si riferiscono ai confronti multipli Kruskal-Wallis e Dunn (aggiustamenti del p-value Benjamini-Hochberg, $\alpha\text{-level}=0.05$).

Il fattore di traslocazione (TF) delle piante cresciute nella prova in serra (Tabella 4-1) è stato calcolato come il rapporto tra la concentrazione di nichel ottenuta dall'analisi dei tessuti epigei e la concentrazione dello stesso ottenuta dai tessuti ipogei.

Tabella 4-1 Fattore di traslocazione per il nichel nelle piante cresciute nella prova in serra (sono riportati i valori delle mediane di sei repliche e l'intervallo interquartile).

Prova	TF
B	0.57 (0.14)
B+	0.51 (0.12)
BC	0.83 (0.07)
S	2.70 (0.99)
S+	1.67 (0.70)
SC	1.52 (0.54)

La biomassa prodotta dalle colture cresciute sulle calci contaminate è stata simile a quella misurata nelle piante controllo appartenenti alla stessa specie; in particolare, il peso medio delle porzioni ipogee ed epigee delle piante di colza sono state rispettivamente 4.48 ± 0.75 e 14.97 ± 1.16 g, mentre per le piante di spinacio i pesi medi sono stati 0.57 ± 0.21 g per la porzione ipogea e 5.54 ± 0.74 g per l'epigea. I valori medi di nichel fitoestratto per pianta, tenendo conto della concentrazione di Ni nei vari tessuti e della biomassa prodotta, sono stati 30.9 ± 6.4 (B), 34.3 ± 4.6 (B+), 28.3 ± 3.5 (BC), 12.5 ± 0.8 (S), 10.7 ± 2.1 (S+) e 5.9 ± 0.2 μg (SC).

La capacità di fitoestrazione delle due specie erbacee e l'effetto dell'aggiunta di sequestranti, come la bentonite, nel ridurre la forma disponibile di un elemento potenzialmente tossico (EPT), sono già da tempo oggetto di studio (Purakayastha et al., 2008; Alia et al., 2015; Chaves et al., 2017; Casucci et al., 2020). Al termine della sperimentazione, dopo la raccolta delle colture e l'analisi del substrato, si è osservato un calo significativo della frazione di nichel solubile nelle calci, con il raggiungimento in tutte le prove di una concentrazione al di sotto del limite legale di $10 \mu\text{g L}^{-1}$, previsto dal D.M. n. 186 (05/04/2006) (Figura 4-1a). Anche la frazione biodisponibile ha subito un notevole calo, accentuato dalla presenza di bentonite per entrambe le specie. Dall'analisi dei tessuti vegetali effettuata post raccolta si è potuta osservare nella colza una maggiore concentrazione del metallo nella porzione ipogea, mentre per lo spinacio l'accumulo di nichel è avvenuto prevalentemente nella parte epigea (Figura 4-2). Entrambi i modelli di distribuzione erano già stati rilevati in lavori scientifici precedenti (Brunetti et al., 2011; Pathak et al., 2013; Farraji et al., 2014; Adiloğlu et al., 2016). Dai risultati ottenuti sembra quindi che lo spinacio sia adatto alla fitoestrazione del nichel, mentre il basso fattore di traslocazione della colza la rende particolarmente indicata per la tecnica della fitostabilizzazione.

Tuttavia, nell'ottica dell'applicazione pratica della tecnica di fitorimediazione, è necessario prendere in considerazione anche la diversa produzione di biomassa da parte delle due specie oggetto di studio e questa, come sopra riportato, è considerevolmente più alta per la colza.

La capacità della bentonite di adsorbire e stabilizzare il metallo nei suoi siti interni ed esterni permette di ridurre significativamente il nichel biodisponibile nelle calci e di ottenere, quindi, un miglioramento dei risultati del fitorisanamento (Akpomie & Dawodu, 2015; Wasilkowski et al., 2017). Il sequestrante è inoltre in grado, grazie ai suoi siti di adsorbimento, di entrare in competizione con il nichel adsorbito dalla componente organica (Casucci et al., 2020).

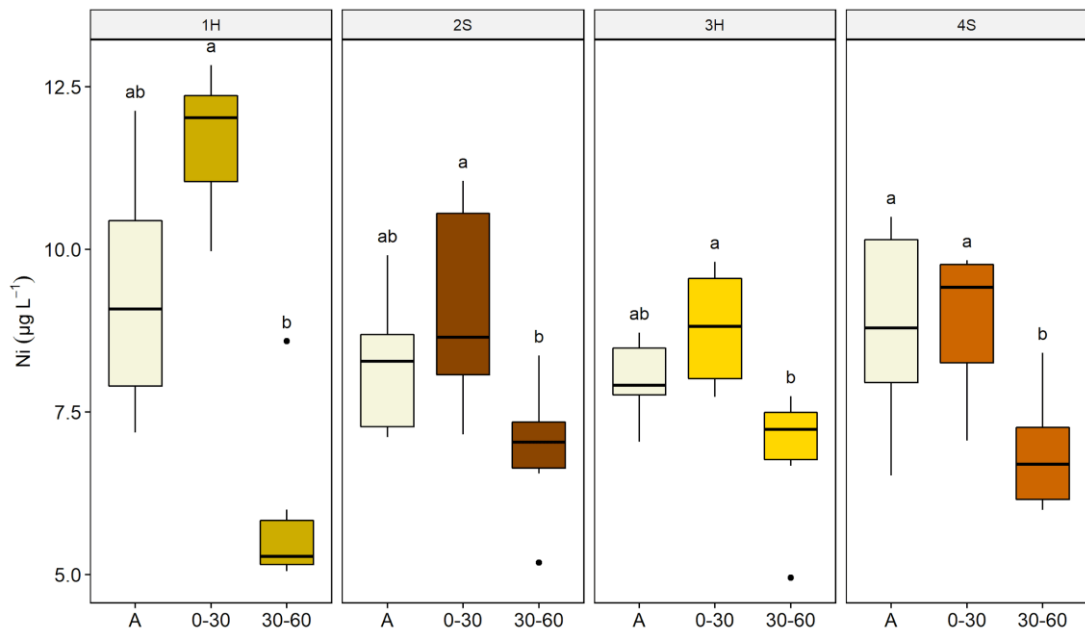
I risultati ottenuti nella prova supportano l'utilizzo combinato di piante e sequestranti nell'applicazione pratica del biorimediazione.

4.2 Prova outdoor

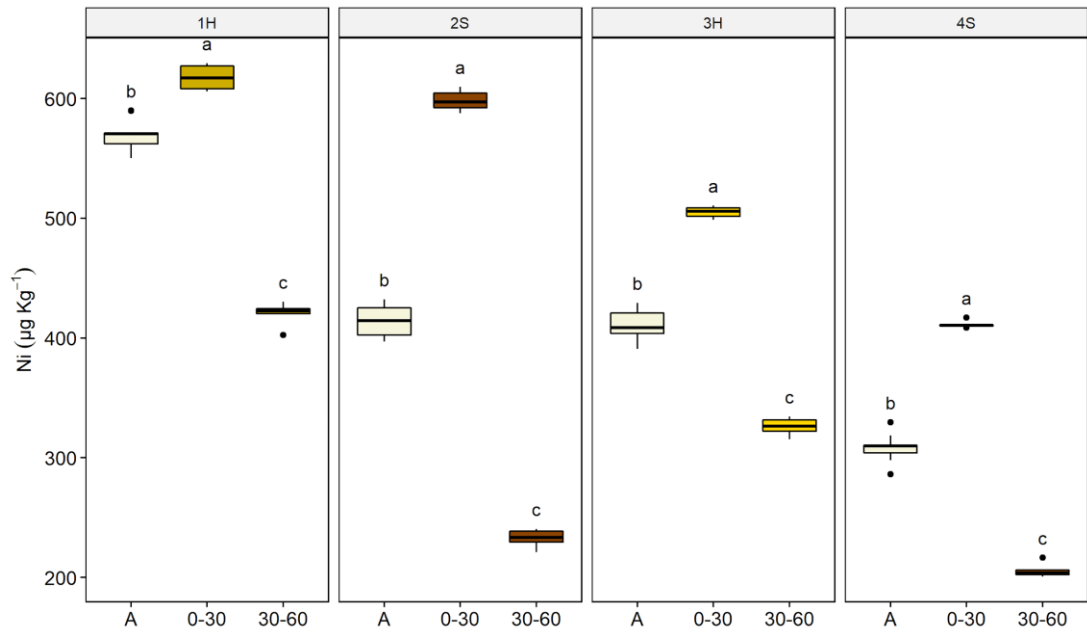
4.2.1 Nichel nel substrato

Le concentrazioni di nichel solubile e biodisponibile, rilevate prima della semina delle colture nei quattro box utilizzati per la prova all'aperto, sono riportate nella Figura 4-3.

Anche in questo caso le concentrazioni iniziali di nichel solubile nelle calci di carbonatazione dei quattro box sono risultate simili, con un intervallo di mediane fra $7.9 \mu\text{g L}^{-1}$ (Box 3) e $9.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Box 1) e senza l'evidenza di differenze significative utilizzando il test Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Viceversa, per quanto riguarda la concentrazione iniziale della frazione biodisponibile di nichel, il box 1 ha presentato il valore di mediana più alto ($570.7 \mu\text{g kg}^{-1}$) mentre il box 4 il più basso ($309.9 \mu\text{g kg}^{-1}$), con la presenza di differenze significative fra le coppie a confronto (test di Dunn). Solamente i box 2 e 3 hanno mostrato concentrazioni iniziali di nichel simili per entrambe le frazioni. È possibile osservare che le concentrazioni di nichel pre e post coltivazione hanno un modello di distribuzione simile in tutti i box (Figura 4-3). Nell'analisi post raccolta delle calci si è riscontrata una concentrazione di nichel significativamente più alta alla profondità compresa tra 0 e 30 cm rispetto a quella presente fra i 30 e 60 cm, sia per il nichel solubile che, soprattutto, per quello biodisponibile (Figura 4-3b). Infine, dopo la raccolta, un confronto fra i box non ha mostrato differenze significative nel nichel solubile e biodisponibile fra il box 2 coltivato con sorgo ed il box 3 coltivato con girasole, ad entrambe le profondità di campionamento.



(a)



(b)

Figura 4-3 Concentrazioni di nichel presenti nelle calci dei quattro box (1-4) prima e dopo la coltivazione delle piante. (a) Ni solubile ($\mu\text{g L}^{-1}$); (b) Ni biodisponibile ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Sull'asse delle X sono indicate la concentrazione iniziale di Ni (A) e le concentrazioni dello stesso, dopo la raccolta della pianta, raggruppate per profondità di campionamento (0-30 cm, 30-60 cm). Nei box 1 e 3 è stato coltivato girasole (1H; 3H); nei box 2 e 4 si è coltivato sorgo (2S; 4S). Le lettere minuscole fanno riferimento ai confronti multipli per ciascun box (test Dunn e Kruskal-Wallis, aggiustamenti del p-value Benjamini-Hochberg, α -level=0.05).

La Tabella 4-2 mostra la concentrazione di nichel solubile e biodisponibile nella rizosfera delle piante alla fine della prova. Per il nichel solubile non si sono trovate differenze rilevanti tra piante e box, mentre la frazione biodisponibile è risultata alta in tutti i casi, in particolare nel box 4, coltivato con sorgo. Nei campioni rizosferici è stato misurato un valore di pH inferiore (7.84 ± 0.04) rispetto agli altri campioni (Tabella 3-1).

Tabella 4-2 Concentrazione di Ni solubile ($\mu\text{g L}^{-1}$) e biodisponibile ($\mu\text{g kg}^{-1}$) nella rizosfera (sono riportati i valori delle mediane di nove repliche e l'intervallo interquartile). Test comparativo multiplo di Dunn e Kruskal-Wallis (aggiustamenti del p-value Benjamini-Hochberg, $\alpha\text{-level}=0.05$).

Box	Pianta	Ni solubile	Ni biodisponibile
1	<i>Helianthus annuus</i>	10.2 (0.7) ^{ns}	681.2 (74.4) ^{ab}
2	<i>Sorghum vulgare</i>	8.0 (0.6) ^{ns}	637.9 (10.3) ^a
3	<i>Helianthus annuus</i>	10.3 (1.7) ^{ns}	692.2 (78.9) ^{ab}
4	<i>Sorghum vulgare</i>	8.4 (1.5) ^{ns}	763.1 (15.7) ^b

Le concentrazioni di nichel solubile e biodisponibile misurate prima della semina nei quattro box sono risultate differenti rispetto ai valori osservati nelle calci campionate nell'indagine precedente ed utilizzate poi per la prova in serra. Questo scostamento non è stato una sorpresa considerando i sei mesi trascorsi tra le due campagne di campionamento, durante i quali il sito è rimasto esposto agli eventi climatici e alla possibile speciazione e mobilizzazione del metallo.

Le basse concentrazioni di nichel solubile rilevate a maggio 2018 hanno fornito le condizioni adatte per l'attuazione di una prova di fitorisanamento reale, che, solitamente, vede come principali limiti di realizzazione le alte concentrazioni del metallo (incompatibili con la vita delle colture) e la mancanza di tempo (Marchiol et al., 2007).

Dopo la raccolta, si è osservata in tutti i box (indipendentemente dalla specie presente) una chiara tendenza delle due frazioni del metallo, solubile e biodisponibile, a spostarsi verso i primi 30 cm di profondità (Figura 4-3), ovvero lo strato di calci in cui si sono sviluppati gli apparati radicali. Questa distribuzione delle due frazioni nei box potrebbe essere indice dell'attrazione esercitata dalle radici e dai loro essudati nei confronti del metallo. La funzione di attrazione e di sequestro dell'apparato radicale nei confronti di elementi potenzialmente tossici è già stata evidenziata in molti lavori scientifici, i quali concordano su un aumento della produzione degli essudati (ad esempio acidi organici a basso peso molecolare, che permettono l'immobilizzazione delle forme biodisponibili dell'inquinante) indotto dalla presenza del metallo (Chen et al., 2017). Un'ulteriore dimostrazione della capacità dell'apparato radicale di attrarre la forma disponibile di nichel è riportata in Tabella 4-2, dove la concentrazione del nichel biodisponibile nella rizosfera delle piante si è sempre dimostrata più alta rispetto a quella presente dopo la raccolta nello strato di calci 0-30 cm.

I Box 2 e 3, che inizialmente presentavano nelle calci concentrazioni di nichel simili, non hanno mostrato differenze significative nei livelli di nichel solubile e biodisponibile nemmeno nell'analisi effettuata dopo la raccolta rispettivamente di sorgo e girasole.

4.2.2 Nichel nelle piante

La quantità di nichel accumulata nelle diverse parti delle piante, sia quelle cresciute nei box (con calci contaminate) che quelle cresciute sul substrato non contaminato (prova in bianco), è illustrata in Figura 4-4. Differenze significative rispetto al controllo si sono trovate per il sorgo nelle radici e nelle infruttescenze e per il girasole nelle foglie. Il sorgo ha accumulato nelle radici e nello stelo una quantità di nichel superiore rispetto al girasole (Figura 4-4 a-b) mentre si sono trovate concentrazioni di nichel simili per le due specie nelle foglie e nelle infruttescenze (Figura 4-4 c-d).

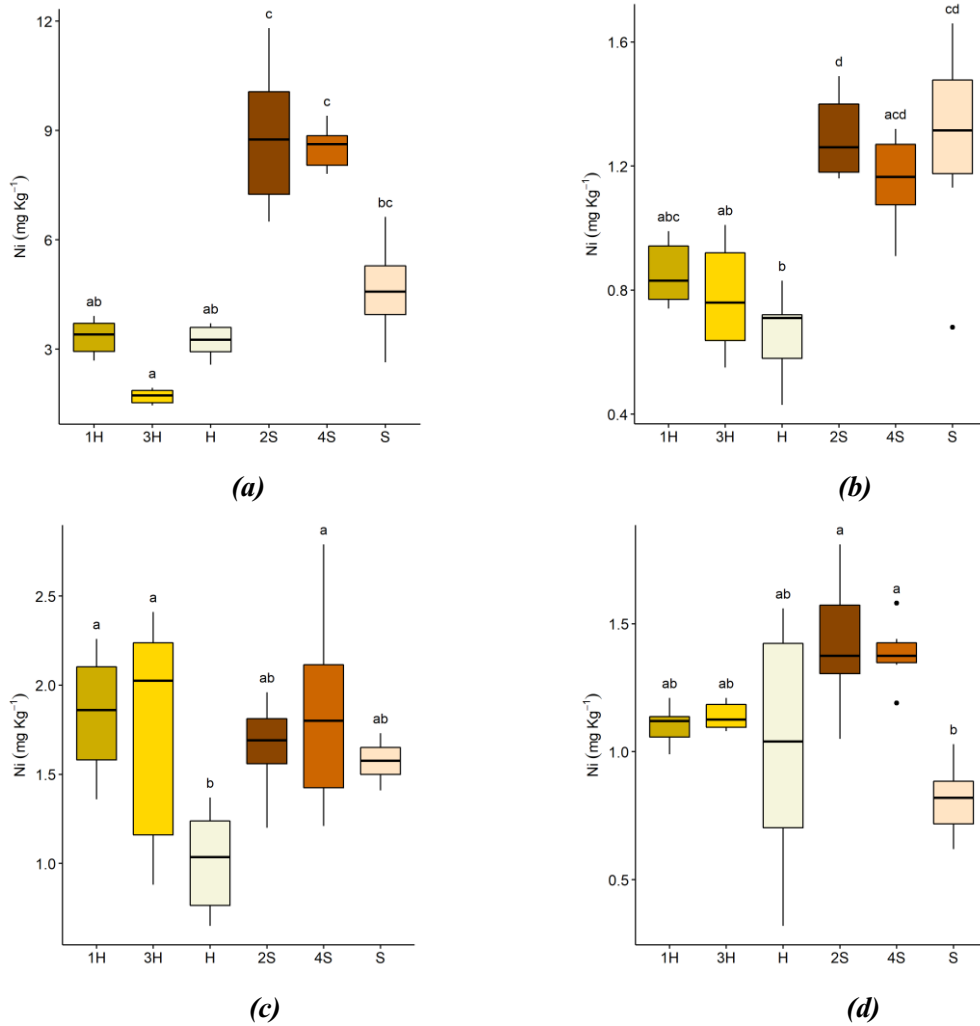


Figura 4-4 Concentrazione di Ni (mg kg^{-1} di sostanza secca) nelle diverse porzioni delle piante. (a) Radici, (b) Steli, (c) Foglie, (d) Infruttescenze. I codici sull'asse X si riferiscono alle concentrazioni in: girasole nel box 1 (1H), girasole nel box 3 (3H); girasole controllo su calci incontaminate (H); sorgo nel box 2 (2S); sorgo nel box 4 (4S); sorgo controllo su calci incontaminate (S). Le lettere minuscole si riferiscono ai confronti multipli Kruskal-Wallis e Dunn (aggiustamenti del p-value Benjamini-Hochberg, $\alpha\text{-level}=0.05$).

Il fattore di traslocazione (TF) calcolato per le piante della prova all'aperto è riportato in Tabella 4-3. Come si può notare il girasole, diversamente dal sorgo, ha mostrato un TF maggiore di 1 in entrambi i box di coltivazione (1 e 3).

Tabella 4-3 Fattore di traslocazione per il Ni nelle piante cresciute nella prova all'aperto (sono riportati i valori delle mediane di sei repliche e l'intervallo interquartile).

Box	TF
1H	1.07 (0.26)
3H	2.04 (0.30)
H	0.84 (0.23)
2S	0.52 (0.13)
4S	0.51 (0.05)
S	0.83 (0.31)

La biomassa prodotta dalle piante di sorgo e girasole cresciute nei box con calci contaminate è stata simile a quella misurata nelle piante controllo appartenenti alla stessa specie. I pesi medi (g di sostanza secca) ottenuti per radici, steli, foglie e infruttescenze sono stati rispettivamente 25.55 ± 3.31 , 85.75 ± 4.86 , 37.66 ± 8.44 e 35.86 ± 3.25 g per il girasole e 15.74 ± 2.16 , 38.57 ± 2.34 , 21.37 ± 2.38 e 14.16 ± 2.64 g per il sorgo.

I valori medi di nichel fitoestratto per pianta sono stati i seguenti: 230.2 ± 11.3 (1H), 234.9 ± 21.4 (3H), 223.2 ± 9.3 (H), 231.1 ± 27.0 (2S), 246.3 ± 10.2 (4S) e 165.3 ± 27.8 μg (S).

Nei tessuti degli steli e delle radici del sorgo, la concentrazione di nichel è risultata notevolmente maggiore rispetto alle piante di girasole (Figura 4-4 a-b), le quali, alla fine delle prove, hanno compensato questa differenza nella capacità di estrazione con una maggiore produzione di biomassa.

La notevole capacità del sorgo di accumulare metalli nelle radici è stata riportata anche in altri studi scientifici, nei quali si suggerisce l'utilizzo di sorghum spp. per prove di fitostabilizzazione piuttosto che di fitoestrazione (Angelova et al., 2011; Soudek et al., 2014; Naeini et al., 2018).

Sebbene le piante di girasole abbiano accumulato una considerevole quantità di nichel nella porzione radicale, il loro fattore di traslocazione ha mostrato in tutte le prove valori superiori a 1, rendendo pertanto possibile il loro utilizzo per gli scopi di fitoestrazione su queste calci.

Infine, la presenza di un alto contenuto di sostanza organica (SO) nel substrato potrebbe aver contribuito al sequestro del metallo, grazie alla formazione di complessi SO-Ni ed alla produzione di essudati da parte delle radici delle piante (Montiel-Rozas et al., 2016).

5. CONCLUSIONI

Al termine delle sperimentazioni condotte in serra e all'aperto le due specie risultate più adatte per la fitoestrazione del nichel dalle calce di carbonatazione sono state spinacio e girasole, mentre il basso fattore di traslocazione di sorgo e colza le ha rese particolarmente appropriate per le tecniche di fitostabilizzazione.

L'aggiunta di bentonite al substrato può migliorare gli esiti del fitorisanamento, grazie ad una riduzione della disponibilità del metallo (sia della frazione solubile che, soprattutto, della biodisponibile) legata alla capacità del minerale di adsorbirlo.

I risultati ottenuti supportano l'uso combinato di piante e sequestranti in un caso pratico di biorisanamento.

Dai dati della prova all'aperto si può notare che il sorgo presenta un buon potenziale di fitostabilizzazione, dovuto alle sue capacità di accumulare il nichel principalmente a livello radicale e di attrarre quantità significative della frazione biodisponibile del metallo nella rizosfera.

In entrambe le prove si sono osservate poche differenze fra la biomassa prodotta dalle piante cresciute su calce contaminate e la biomassa prodotta dalle piante nella prova in bianco. Questo probabilmente è dovuto alla concentrazione di nichel nei tessuti che era, in entrambi i casi, inferiore al limite di fitotossicità (50 mg kg^{-1}) indicato per le specie moderatamente tolleranti al nichel (Sengar et al., 2008). È infatti importante ricordare che la risposta delle piante alla presenza di elementi potenzialmente tossici varia in funzione degli elementi stessi e della concentrazione delle loro forme biodisponibili.

Per le future ricerche l'obiettivo dovrebbe essere tenere in considerazione i diversi problemi irrisolti riguardanti l'uso del biorisanamento per i siti inquinati da EPT (elementi potenzialmente tossici), studiando il possibile utilizzo di piante con una migliore efficienza di iperaccumulo ed in grado di sviluppare un apparato radicale ampio e profondo.

Eventuali studi condotti sulla possibilità di risolvere casi reali di contaminazione con alte concentrazioni di metalli potrebbero includere anche l'uso di diversi minerali sequestranti in grado di immobilizzare il metallo a livello degli apparati radicali.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adilođlu, S.; Turgut Sađlam, M.; Adilođlu, A. & Süme, A., 2016. "Phytoremediation of nickel (Ni) from agricultural soils using canola (*Brassica napus* L.)". *Desalin. Water Treat.*, 57, 2383–2388.
- Adriano D.C., 1986. "Trace elements in the terrestrial environment", Springer-Verlag, New York.
- Adriano D.C., 2001. "Trace Elements in Terrestrial Environments; Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals". New York: 2nd Ed. Springer.
- Akpomie, K.G. & Dawodu, F.A., 2015. "Potential of a low-cost bentonite for heavy metal abstraction from binary component system". *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.*, 4, 1–13.
- Alia, N.; Sardar, K.; Said, M.; Salma, K.; Sadia, A.; Sadaf, S.; Toqeer, A. & Miklas, S., 2015. "Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in spinach (*Spinacia oleracea*) grown in a controlled environment". *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 7400–7416.
- Aller A.J., Bernal J.L., Del Nozal M.J. & Deban L., 1990. "Effects of selected trace elements on plant growth". *J Sci Food Agric* 51:447-479
- Alloway B.J., 1990 "Soil processes and the behaviour of metals", 1990. In: Alloway BJ (ed) *Heavy metals in soils*. Blackie, London. pp.7-28
- Alloway B.J., 1995. "Heavy metals in soils". London: Blackie Academic and Professional, pp. 5-197.
- Anderson T.A., Guthrie E.A. & Walton B.T., 1993. "Bioremediation in the rhizosphere, plant roots and associated microbes clean contaminated soil". *Environmental Science and Technology* 27, 2630-2636.
- Angelova, V.R.; Ivanova, R. V; Delibaltova, V.A. & Ivanov, K.I., 2011. "Use of Sorghum Crops for in Situ Phytoremediation of Polluted Soils". *J. Agric. Sci. Technol.*, 1, 693–702.

- Ansari A.A., Gill S.S., Gill R., Lanza G.R. & Newman L., 2015. "Phytoremediation", Vol. Management.
- Antoniadis V., Levizou E., Shaheen S.M., Okc S.Y., Sebastiao A., Baume C., Prasadd M.N.V., Wenzel W.W.W. & Rinklebe J., 2017. "Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review". *Earth-Science Reviews* 171: 621-645.
- Armshaw R., Bardos R.P., Dunn R.M., Hill J.M., Pearl M., Rampling T. & Wood P.A., 1992. "Review of innovative contaminated soil cleanup processes". Warren Springs, Stevenage.
- Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J., 2018. "The multi-regulatory properties of melatonin in plants". In *Neurotransmitters in Plants*; Roshchina, V.V., Ramakrishna, A., Eds.; Taylor&Francis-CRC: New York, NY, USA, 2018; pp.71–101.
- Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J., 2019 a. "Role of Melatonin to Enhance Phytoremediation Capacity". *Appl. Sci.*, 9.
- Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J., 2019 b. "Melatonin: A new plant hormone and/or a plant master regulator?". *Trends Plant Sci.*, 24, 38–48.
- Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J., 2013. "Growth conditions determine different melatonin levels in *Lupinus albus* L." *J. Pineal Res.*, 55, 149–155.
- Baker A.J.M., 1981. "Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals". *J. Plant Nutr.* 3(1–4), 643.
- Baker A.I.M. & Brooks R.R., 1989. "Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry". *Biorecovery* 1: 81-126.
- Barbafieri M., 2005. "Phytoremediation in Bonifica dei siti contaminati", McGraw-Hill
- Barrow N.J., 1985. "Reactions of anions and cations with variable-charge soils". *Adv Agron* 38:183–230.
- Basta N. T., Ryan J. A. & Chaney R. L., 2005. "Trace Element Chemistry in Residual-Treated Soil: Key Concepts and Metal Bioavailability", Madison USA: *J. Environ. Qual.* 34:49–63.
- Bedini S., Pellegrino E., Argese E. & Giovanetti M., 2004. "Miglioramento del suolo e biostabilizzazione di metalli pesanti mediati da glomalina". XIV Congresso della Società Italiana di Ecologia.

- Bender R. & Lange S., 2001. "Adjusting for multiple testing - When and how?", *J. Clin. Epidemiol.*, 54, 343–349.
- Berry W.L. & Wallace A. 1981. "Toxicity: the concept and relationship to the dose response curve". *J Plant Nutr* 3:13-19
- Bradl H.B., 2005. "Heavy metals in the Environment". London: Elsevier Ltd. Chapter 1-3.
- Brooks R.R., 1998. "Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining". CAB International: Wallingford, UK, pp. 289-312.-
- Brugnoli E. & Massarelli C., 2014. "Tecnologie di bonifica dei siti contaminati: principi di funzionamento ed esempi di applicazione", Casucci editore s.a.s, Bari, pp. 67-71.
- Brunetti G., Farrag K., Soler-Rovira P., Nigro F. & Senesi N., 2011. "Greenhouse and field studies on Cr, Cu, Pb and Zn phytoextraction by *Brassica napus* from contaminated soils in the Apulia region, Southern Italy". *Geoderma*, 160(3–4), 517–523.
- Casucci C., De Bernardi A., D'Amato R., Businelli D. & Vischetti C., 2020. "Zeolite and bentonite as nickel sequestrants in carbonation lime coming from the sugar industry". *Environ. Sci. Pollut. Res.*
- Chanu L.B. & Gupta A., 2016. "Phytoremediation of lead using *Ipomoea aquatica* Forsk in hydroponic solution". *Chemosphere* 156, 407–411.
- Chaturvedi, R.; Favas, P.J.; Pratas, J.; Varun, M. & Paul, M.S., 2019. "Metal(loid) induced toxicity and defense mechanisms in *Spinacia oleracea* L.". *Ecological hazard and Prospects for phytoremediation. Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019, 183, 109570.
- Chaves, L.H.G.; Tito, G.A. & De Brito Chaves, I., 2017. "Bentonite application in the remediation of zinc contamination soil". *Chem. Eng. Trans.*, 58, 745–750.
- Chen S.Y., Feng Z. & Yi X., 2017. "A general introduction to adjustment for multiple comparisons". *J. Thorac. Dis.*, 9, 1725–1729.
- Chen, Y.T.; Wang, Y. & Yeh, K.C., 2017. "Role of root exudates in metal acquisition and tolerance". *Curr. Opin. Plant Biol.*, 39, 66–72.
- Chien H.F. & Kao C.H., 2000. "Accumulation of ammonium in rice leaves is response to excess cadmium", *Plant Sci*, 156: pp. 111-5.

- Ciura, J.; Poniedziałek, M.; Sekara, A. & Jedrzejczyk, E., 2005. "The possibility of using crops as metal phytoextractants". *Polish J. Environ. Stud.*, 14, 17–22.
- Cosio C., De Santis L., Frey B., Diallo S. & Keller C., 2005. "Distribution of cadmium in leaves of *Thalassia caerulescens*". *J. Exp. Bot.* 56, 565-575.
- Cuypers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K., Nair A.R., Munters E., Artois T.J., Nawrot T., Vangronsveld J. & Smeets K., 2010. "Cadmium stress: an oxidative challenge". *Biomaterials* 23:927–940.
- D'Aprile L., Tatàno F. & Musmeci L., 2007. "Development of quality objectives for contaminated sites: state of the art and new perspectives". *Int. J. Environment and Health*, Vol 1, No 1.
- Elder J.F., 1989, "Metal biogeochemistry in surface-water systems—A review of principles and concepts". U.S. Geological Survey Circular 1013, 43.
- Ente Nazionale Italiano di Unificazione Rifiuti-Campionamento manuale, preparazione del campione ed analisi degli eluati. UNI 10802 2013, 54.
- Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C. & Schat H., 1992. "Metal tolerance in plants", *Acta Botanica Neerlandica*, 41 (3), pp:229-248.
- Essington M.E., 2004. "Soil and water chemistry: An integrative approach". Boca Raton FL: CRC Press.
- Evangelou M.W.H, Ebel M. & Schaeffer A., 2007. "Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents". *Chemosphere* 68: pp. 989–1003.
- Farraji, H.; Aziz, H.A.; Tajuddin, R.M. & Mojiri, A., 2014. "Optimization of Phytoremediation of Lead-contaminated Soil by Spinach (*Spinacia oleracea* L)". *Int. J. Sci. Res. Knowl.*, 2, 480–486.
- Ferguson C.C., 1999. "Assessing Risks from Contaminated Sites: Policy and Practice in 16 European Countries". *Land Contamination & Reclamation* 7: 33-54.
- Frey B., Keller C., Zierold K. & Schulin R., 2007. "Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells in the hyperaccumulator *Thalassia caerulescens*". *Plant Cell Environ.* 23, 675-687.

- Genard H., Le Saos J., Hillard J., Tremolieres A. & Boucaud J., 1991. "Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritime*". *Plant Physiol Biochem* 29:421–427.
- Giordani C., Cecchi S. & Zanchi C., 2005. "Phytoremediation of soil polluted by nickel using agricultural crops". *Environmental Management*, 36(5), 675–681.
- Gorkem A. & Duyusen E.G., 2010. "Bioleaching of heavy metals contaminated sediment by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp". Elsevier, *Desalination* 268 (2011) 221–226.
- Gratão P. L., Alves L.R. & Lima L.W., 2019. "Heavy Metal Toxicity and Plant Productivity: Role of Metal Scavengers". In *Plant-Metal Interaction*, Springer: pp. 49-61.
- Hakeem K. R., Öztürk M. & Sabir M., 2014. "Soil Remediation and Plants". Academic Press (Vol. Soil Remed).
- Hall J.L., 2002. "Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance". *Journal of experimental botany* 53: 1-11.
- Hanjun G., Shenglian L., Liang C., Xiao X., Qiang X., Wanzhi W., Guangming Z., Chengbin L., Yong W., Jueliang C. & Yejuan H., 2010. "Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14". Elsevier, *Bioresource Technology* 101: 8599–8605.
- Huang L., Bell R.W., Dell B. & Woodward J., 2004. "Rapid Nitric Acid Digestion of Plant Material with an Open-Vessel Microwave System". *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 35, 427–440.
- Jhon D.A., Leventhal J.S., 1995. "Bioavailability of metals". Du Bray EA, Preliminary Compilation of Descriptive Geoenvironmental Mineral Deposit Models. U.S. Department of the Interior. U.S. Geological survey.
- Kagi J.H.R., 1991. "Overview of metallothionein". *Methods Enzymol* 205:613–626.
- Keller, C.; Hammer, D.; Kayser, A.; Richner, W.; Brodbeck, M. & Sennhauser, M., 2003. "Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field". *Plant Soil*, 67–81.
- Kensa M.V., 2011. "Bioremediation: an overview". *J. Ind Pollut Control* 27: 161–168.
- Khan F.I., Husain T. & Hejazi R., 2014. "An overview and analysis of site remediation technologies". 71, 95–122.

- Khawar J. & Bhagirath S.C., 2018. "Non-Chemical Weed Control". In *Weed Research, an International Journal of Weed Biology, Ecology and Vegetation Management*. Chapter 5, pp. 73-96.
- Kimbrough D.E., Cohen Y., Winer A.M., Creelman L. & Mabuni C., 1999. "A critical assessment of chromium in the environment" *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*, 29: pp. 1-46.
- Kneer R. & Zenk M.H., 1992. "Phytochelatin protect plant enzymes from heavy-metal poisoning". *Phytochemistry* 31 :2663-2667.
- Kokyo O.H., Tiehua C., Tao L. & Hongyan C., 2014. "Study on Application of Phytoremediation Technology in Management and Remediation of Contaminated Soils". *Journal of Clean Energy Technologies*, Vol. 2, No. 3: pp. 216-220.
- Kumar C. & Mani D., 2012. "Advances in bioremediation of heavy metals: a tool for environmental restoration". LAP LAMBERT Academic Publishing AG & Co. KG, Saarbru.
- Kumar D., Singh D.P., Barman S.C. & Kumar N., 2016. "Heavy Metal and Their Regulation in Plant System: An Overview". *Plant Responses to Xenobiotics*. Springer Singapore: pp. 19-38.
- Lasat M.M., 2002. "Phytoextraction of toxic metal: a review of biological mechanisms". *J. Environ. Qual.* 31, 109–120.
- Leitenmaier B. & Küpper H., 2013. "Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants". *Front. Plant Sci* 4: 374.
- Liu D, Zou J, Wang M & Jiang W., 2008. "Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis*". *L. Bioresour Technol* 99: 2628–2636.
- Mani D. & Kumar C., 2013. "Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation". *Int. J. Environ. Sci. Technol.* (2014) 11:843–872.
- Marchiol, L.; Fellet, G.; Perosa, D. & Zerbi, G., 2007. "Removal of trace metals by *Sorghum bicolor* and *Helianthus annuus* in a site polluted by industrial wastes: A field experience". *Plant Physiol. Biochem.*, 45, 379–387.

- Marschner H., 1995. "Mineral nutrition of higher plants". San Diego CA, Academic Press 2nd edn.
- Martens S.N., Boyd R.S., 1994. "The ecological significance on nickel hyperaccumulation: a plant chemical defence". *Oecologia* 98: 379-384.
- Meers, E.; Ruttens, A.; Hopgood, M.; Lesage, E. & Tack, F.M.G., 2005. "Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils". *Chemosphere*, 61, 561–572.
- Ministero delle politiche agricole e forestali D.M. Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo." Gazz. Uff. della Repubblica Ital. 1999, doi:Supplemento ordinario n.248.
- Mohanty M., Pattnaik M.M., Mishra A.K. & Patra H.K., 2012. "Bio-concentration of chromium- an in situ phytoremediation study at South Kaliapani chromite mining area of Orissa, India". *Environ Monit Assess* 184:1015–1024.
- Montiel-Rozas, M.M.; Madejón, E. & Madejón, P., 2016. "Effect of heavy metals and organic matter on root exudates (low molecular weight organic acids) of herbaceous species: An assessment in sand and soil conditions under different levels of contamination." *Environ. Pollut.*, 216, 273–281.
- Nadeem, S.; Muhammad, I.; Muhammad, R.S.; WajidIshaqa, A.K.; Amar, M. & Abdur, R.; Saddam, H., 2017. "Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives", *Chemosphere*, Volume 171, J. Elsevier March, pp. 710-721.
- Naeini, J.; Yousefi Rad, M. & Rad, M.Y., 2018. "Phytoremediation capability of nickel and manganese polluted soil by *Sorghum bicolor*". *L. Plant Physiol.*, 8, 2427–2435.
- Nanthi S.B., Adriano D.C. & Naidu R., 2003. "Role of Phosphorus in (Im)mobilization and Bioavailability of Heavy Metals in the Soil–Plant System". New York: Springer-Verlag *Rev Environ Contam Toxicol* 177:1–44.
- Pal S., Singh H.B. & Rakshit A., 2013. "Potential of Different Crop Species for Nickel and Cadmium Phytoremediation in Peri-Urban Areas of Varanasi District (India) with more than Twenty Years of Wastewater Irrigation History", *Italian Journal of Agronomy* (8), pp. 58-64.

- Pathak, C.; Chopra, A.K. & Srivastava, S., 2013. "Accumulation of heavy metals in *Spinacia oleracea* irrigated with paper mill effluent and sewage". *Environ. Monit. Assess.*, 185, 7343–7352.
- Pearson R.G., 1968. "Hard and soft acids and bases". *J. Chem. Educ.* 45: Chapter: 1. Fundamental principles 581–587.
- Poonam, Bhardwaj R., Sharma R., Handa N., Kaur H., Kaur R., Sirhindi G. & Thukral A.K., 2014. "Prospects of Field Crops for Phytoremediation of Contaminants". P. Ahmad (Ed): *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*, Volume 2: pp. 449-470.
- Prasad, M.N.V. & Hagemeyer, J., 1999. "Heavy Metal Stress in Plants from Molecules to Ecosystems", New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Prasad M.N.V. & Oliveira Freitas H.M., 2003. "Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology". *Electron. J. Biotechnol.* v.6 n.3.
- Prajapati S.K. & Meravi N., 2014. "Heavy metal speciation of soil and *Calotropis procera* from thermal power plant area". *International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4(2): 68-71.
- Pulford I.D. & Waston C., 2003. "Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by tree a review". *Environ. Int.* 29, 592-540.
- Purakayastha, T.J.; Viswanath, T.; Bhadraray, S.; Chhonkar, P.K.; Adhikari, P.P. & Suribabu, K., 2008. "Phytoextraction of zinc, copper, nickel and lead from a contaminated soil by different species of Brassica". *Int. J. Phytoremediation* 2008, 10, 61–72.
- Rascio N. & Navari-Izzo F., 2010. "Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?", Elsevier, *Plant Science* 180, 169-181.
- Raskin I., Smith R.D. & Salt D.E., 1997. "Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment". *Biotechnology*, 8:221–226.
- Rausser W.E., 1995. "Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis, and function". *Plant Physiol* 109:1141-1149.
- Revathi, K.; Haribabu, T.E.; Sudha, P.N., 2011. "Phytoremediation of Chromium contaminated soil using Sorghum plant". *Int. J. Environ. Sci.*, 2, 429–440.

- Robinson B.H., Millis M., Petit D., Fung L.E., Green S.R. & Clothier B.E., 2000. "Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implications for phytoremediation". *Plant Soil* 227, 301–306.
- Robinson B.H., Green S., Mills T., Clothier B., Van Der Velde M., Laplane R., Fung L., Deurer M., Hurst S., Thayalakumaran T. & Van Den Dijssel C., 2003. "Phytoremediation: using plants as biopumps to improve degraded environments". *Australian Journal of Soil Research*, 41: pp. 599-611.
- Ross S.M., 1994. "Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils". In: Ross SM (ed) *Toxic metals in soil-plant systems*. Wiley, Chirchester, Rovira, pp 63-151
- Salomons W., 1995. "Environmental impact of metals derived from mining activities: Processes, predictions, prevention". *Journal of Geochemical Exploration*, v. 52, p. 5-23.
- Salt, D.E.; Blaylock, M.; Kumar, N.P.; Dushenkov, V.; Ensley, B.D.; Chet, I. & Raskin, I. , 1995. "Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants", *Biotechnology (N.Y)* 13, 468–474.
- Salt D.E. & Rauser W.E., 1995. "Mg ATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots". *Plant Physiol* 107:1293–1301.
- Salt D.E., Smith R.D. & Raskin I., 1998. "Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiol". *Plant Mol. Biol.* 49, 643.
- Sarafi, E.; Tsouvaltzis, P.; Chatzissavvidis, C.; Siomos, A. & Therios, I., 2017. "Melatonin and resveratrol reverse the toxic effect of high boron (B) and modulate biochemical parameters in pepper plants (*Capsicum annuum* L.)". *Plant Physiol. Biochem.*, 112, 173–182.
- Sarma, H., 2011. "Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology". *J. Environ. Sci. Technol.*, 4, 118–138.
- Schmidt U., 2003. "Enhancing phytoextraction". *Journal of Environmental Quality*, 32(6), 1939-1954.
- Sczekan S.R. & Joshi J.G., 1989. "Metal binding properties of phytoferritin and synthetic iron cores". *Biochim Biophys Acta* 990:8-14.
- Sengar, R.S.; Gupta, S.; Gautam, M.; Sharma, A. & Sengar, K., 2008. "Occurrence, uptake, accumulation and physiological responses of Nickel in plants and its effects on environment." *Res. J. Phytochem.*, 2, 44–60.

- Solhi, M.; Hajabbasi, M.A. & Shareatmadari, H., 2005. "Heavy Metals Extraction Potential of Sunflower (*Helianthus annuus*) and Canola (*Brassica napus*)". *Casp. J. Environ. Sci. Casp. J. Env. Sci* 2005, 3, 35–42.
- Soudek, P.; Petrová, Š.; Vaňková, R.; Song, J. & Vaněk, T., 2014. "Accumulation of heavy metals using *Sorghum sp*". *Chemosphere*, 104, 15–24.
- Sposito G., 1984. "The Surface Chemistry of Soils". New York: Oxford University Press.
- Sposito G., 1989. "The chemistry of soils". New York: Oxford University Press.
- Sun, Q.; Zhang,N.; Wang,J.; Cao,Y.; Li,X.; Zhang,H.; Zhang,L.; Tan,D.X.; Guo,Y.D., 2016. "A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato." *J. Pineal Res.*, 61, 138–153.
- Tack, F.M. & Verloo, M.G., 1995. "Chemical speciation and fractionation in soil and sediment heavy metal analysis: a review". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 59, pp. 225-238.
- Tack F.G., 2010. "Trace elements: general soil chemistry, principles and processes.". In: Hooda, P.S. (Ed.), *Trace Elements in Soils*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 9–37.
- Taylor G.J., 1991. "Current views of the aluminum stress response; the physiological basis of tolerance". *Curr Topics Plant Biochem Physiol* 10, pp:57–93.
- Tangahu B.V., Abdullah S.R.S., Basri H., Idris M., Anuar N. & Mukhlisin M., 2011. "A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation". *International Journal of Chemical Engineering*.
- Tice K.R., Parker D.R. & DeMason D.A., 1992. "Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat". *Plant Physiol.* 100, pp:309–318.
- Tomaszewska B., Tukendorf A. & Baralkiewicz D., 1996. "The synthesis of phytochelatin in lupin roots treated with lead ions". *Sci Legum* 3:206–217.
- Vamerali T., Bandiera M. & Mosca G., 2010. "Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review". *Environmental Chemistry Letters*, 8(1), 1–17.

- Van Assche F. & Clijsters H., 1986. "Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase I oxygenase". *J Plant Physiol* 125:355-360.
- Van Assche F. and Clijsters H., "Effects of metals on enzyme activity in plants", 1990. *Plant Cell Environ* 13: 195-206.
- Vatamauniuk O.K., Mari S., Lu Y.P. & Rea P.A., 2000. "AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7110–7115.
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H., 2009. "Molecular mechanism of metal hyperaccumulation in plants". *New Phytol*, 181, 759-776.
- Vierling, E., 1991. "The roles of heat shock proteins in plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 579–620.
- Violante A., Cozzolino V., Perelomov L., Caporale A.G. & Pigna M., 2010. "Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments". *J. Soil. Sci. Plant Nutr.* 10 (3): 268 - 292.
- Wise D.L., Trantolo D.J., Cichon E.J., Inyang H.I & Stottmeister U, 2000. "Bioremediation of contaminated soils", New York Basel, Marcel Dekker, Inc: pp.731.
- Walkley A. & Black I.A., 1934. "An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method". *Soil Sci.*, 37, 29–38.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. & Altman A., 2004. "Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response". *Trends. Plant. Sci.* 9 (5), 244-252.
- Wasilkowski, D.; Nowak, A.; Plaza, G. & Mroziak, A., 2017. "Effects of pulp and Na-bentonite amendments on the mobility of trace elements, soil enzymes activity and microbial parameters under ex situ aided phytostabilization". *PLoS One*, 12, 1–23.
- Waters E.R., G.J. Lee & E. Vierling, 1996. "Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants". *J. Exp. Bot.* 47, 325–338.
- Yamamoto F. & Kozłowski T.T, 1987. "Effect of flooding, tilting of stem, and ethrel application on growth, stem anatomy, and ethylene production of *Acer platanoides* seedlings". *Scand J. For. Res.* 2, 141-156.

- Yang X.E., Jin X.F., Feng Y. & Islam E., 2005. "Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants". *J Integr Plant Biol* 47(9):1025–1035.
- Zerbi G. & Marchiol L., 2004. "Fitoestrazione di metalli pesanti, contenimento del rischio ambientale e relazioni suolo-microrganismi- pianta". Udine, Wd. Forum: 9-36.
- Zhang L. & Chen C., 2002, "On the general characteristics of plant diversity of Gurbantunggut sandy desert", *Acta Ecol. Sinica*, 22: 1923-32.
- Zhang, N.; Sun, Q.; Li, H.; Cao, Y.; Zhang, H.; Li, S.; Zhang, L.; Qi, Y.; Ren, S.; Zhao, B.; et al., 2016. "Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage". *Front. Plant Sci.*, 7, 197.
- Zhou Y., Ning X., Liao X., Lin M., Liu J. & Wang J., 2013. "Characterization and environmental risk assessment of heavy metals found in fly ashes from waste filterbag obtained from a Chinese steel plant". *Ecotoxicol Environ Saf* 95:130–136.
- Zhou G., Xu Y., Li J., Yang L. & Liu J.L., 2006. "Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.)". *J Biochem Mol Biol* 39(5):595–606.
- Zhu Y.G., Ralf K. & Tong Y.P., 2004. "Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation". *Trends Plant Sci* 9(1):7–9.

7 SITOGRAFIA

<https://www.opensciencepublications.com/>

<https://www.romanambiente.it/servizi/bonifica-siti-inquinati/normativa/>

https://www.arpae.it/cms3/documenti/_cerca_doc/ecoscienza/ecoscienza2010_3/daprilees3_2010.pdf

<https://annuario.isprambiente.it/sites/default/files/pdf/2018/Annuario-in-cifre.pdf>

https://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/statistiche_ambientali/rsa_2016_1.pdf

<https://www.economyup.it/innovazione/che-cos-e-la-circular-economy-e-perche-puo-mantenere-l-europa-competitiva/>

<https://www.eea.europa.eu/themes/soil/soil-threats>

<http://www.isprambiente.gov.it/it/temi/suolo-e-territorio/siti-contaminati/siti-di-interesse-nazionale-sin>

<http://www.clusterspring.it/luoghi/eridania-sadam-s-p-a/>