



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE, GEOLOGICHE E AMBIENTALI
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE GEOLOGICHE, BIOLOGICHE E AMBIENTALI
XXIX CICLO

Tesi di dottorato

**Funghi filamentosi endofitici e prospettive di impiego
nella fitorimediazione dei suoli contaminati da metalli
pesanti e idrocarburi policiclici aromatici**

Dottorando: Antonio Cristaldi

Coordinatore

Chiar.ma Prof.ssa Agata Di Stefano

Tutor

Chiar.ma Prof.ssa Margherita Ferrante

Anno Accademico 2015-2016

Indice	Pag.
Riassunto	3
Abstract	4
1. Introduzione	6
2. L'inquinamento: generalità	8
2.1. L'inquinamento del suolo	8
2.2. I metalli pesanti	9
2.2.1. <i>Nichel</i>	10
2.2.2. <i>Cadmio</i>	11
2.2.3. <i>Rame</i>	12
2.2.4. <i>Arsenico</i>	13
2.2.5. <i>Zinco</i>	14
2.2.6. <i>Piombo</i>	15
2.2.7. <i>Vanadio</i>	16
2.2.8. <i>Cromo</i>	17
2.2.9. <i>Mercurio</i>	17
2.3. Gli idrocarburi policiclici aromatici	18
3. Biorimediazione	22
3.1 Phytoremediation	23
3.1.1 <i>Fitoestrazione</i>	27
3.1.2 <i>Fitostabilizzazione</i>	28
3.1.3 <i>Fitovolatilizzazione</i>	28
3.1.4 <i>Fitodegradazione</i>	29
3.1.5 <i>Rizofiltrazione</i>	29
3.1.6 <i>Rizodegradazione</i>	30
4. Normativa	32
4.1. Legislazione ambientale italiana	32
4.1.1 <i>I siti di interesse nazionale</i>	35
5. Materiali e metodi	36
5.1. Profilo degli organismi utilizzati	36
5.1.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	36
5.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
5.1.3 <i>Wicherhamomyces anomalus</i>	37
5.1.4 <i>Arundo donax</i>	38
5.2. Piano sperimentale	39
5.3. Prove di esposizione <i>in vitro</i> dei metalli nei confronti di <i>T. harzianum</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>W. Anomalus</i>	41
5.3.1. <i>Approccio microbiologico</i>	41
5.3.2. <i>Approccio chimico</i>	43
5.4. Prove di esposizione <i>in vitro</i> agli IPA nei confronti di <i>T. harzianum</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>W. Anomalus</i>	48
5.4.1. <i>Approccio microbiologico</i>	48

5.4.2. <i>Approccio chimico</i>	48
5.5. Analisi preliminare del suolo utilizzato per la messa a dimora di <i>A. donax</i>	52
5.6. Messa a dimora dei rizomi di <i>Arundo donax</i>	55
5.6.1. <i>Metalli</i>	55
5.6.2. <i>IPA</i>	57
5.7. Saggio ecotossicologico <i>Vibrio fischeri</i>	58
5.8. Analisi statistica	59
6. Risultati	60
6.1. Valori dei metalli assorbiti dai tre microrganismi utilizzati per le prove di esposizione <i>in vitro</i>	60
6.1.1. <i>T. harzianum</i>	60
6.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
6.1.3. <i>Wicheramomyces anomalus</i>	75
6.2. Valori di assorbimento dei metalli dopo fitorimediazione con <i>A. donax</i> e <i>A. donax</i> micorrizzata con <i>T. harzianum</i>	82
6.3. Valori degli IPA degradati dai tre microrganismi utilizzati per le prove di esposizione <i>in vitro</i>	100
6.4. Valori di degradazione degli IPA in seguito a fitorimediazione con <i>A. donax</i> e <i>A. donax</i> micorrizzata con <i>T. harzianum</i>	108
6.5. Saggio ecotossicologico e analisi delle componenti microbiologiche del suolo	116
7. Discussioni e conclusioni	119
Bibliografia	123

Riassunto

L'immissione intenzionale o accidentale nel suolo di sostanze inquinanti di natura organica o inorganica causa gravi conseguenze sia per l'ambiente che per la salute pubblica (tossicità e cancerogenicità). I metalli pesanti sono elementi non degradabili e quindi persistenti nell'ambiente e possono avere effetti teratogeni, mutageni e cancerogeni; gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono elementi difficili da trattare ed anch'essi possono causare cancerogenicità e tossicità nell'uomo. Diverse tecniche sono state utilizzate per la bonifica dei suoli contaminati, ma la fitorimediazione si propone come un'alternativa ecosostenibile e conveniente rispetto alle convenzionali tecniche chimico-fisiche. La fitorimediazione sfrutta le caratteristiche fisiologiche delle piante al fine di rimuovere o ridurre la presenza degli agenti inquinanti nel suolo. Per attuare tale tecnica è possibile impiegare diverse specie vegetali in grado di accumulare i contaminanti inorganici come i metalli pesanti o degradare, con l'aiuto dei microrganismi della rizosfera, diversi contaminanti organici; inoltre, la biomassa prodotta può essere utilizzata per altri scopi, quali la cogenerazione di energia e/o la produzione dei biocarburanti, ottenendo benefici per la salute, l'ambiente e la gestione dei costi. L'efficienza dei processi di fitorimediazione può essere incrementata grazie all'impiego di diversi microrganismi (funghi, lieviti, batteri) che popolano normalmente la rizosfera, instaurando rapporti simbiotici e facilitando così l'assorbimento e/o la degradazione dei contaminanti.

In questo lavoro è stata effettuata la sperimentazione *in vitro* con tre microrganismi (*Trichoderma harzianum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wicherhamomyces anomalus*) per testare la loro potenziale capacità bioaccumulatrice nei confronti di nove metalli pesanti (Ni, Cd, Cu, As, V, Pb, Zn, Cr e Hg) e di metabolizzazione dei sedici IPA definiti prioritari dalla U.S. EPA, al fine di valutare la loro possibile applicazione nei processi di fitorimediazione. Le prove di crescita controllata in serra hanno visto l'impiego della specie vegetale *Arundo donax* e di *A. donax* micorrizzata con *T. harzianum*, al fine di valutare la loro efficacia nell'accumulare e degradare rispettivamente i metalli pesanti e gli IPA a cui sono stati esposti. *T. harzianum* è stato valutato come microrganismo più idoneo alla sperimentazione, in particolare per la sua attività anti patogena verso altri funghi infestanti le colture, per la dimostrata capacità di bioaccumulo verso un maggior numero di metalli pesanti e per aver mostrato buone capacità a degradare e metabolizzare diversi IPA come naphthalene, phenanthrene, chrysene, pyrene e benzo(a)pyrene. *A. donax* è una specie vegetale che ben si presta all'impiego nei processi di recupero dei suoli contaminati da

metalli pesanti e IPA, in particolare perché produce una buona quantità di biomassa, non è appetibile per gli animali, resiste ai parassiti e agli stress idrici e, quindi, è in grado di adattarsi in ambienti inospitali.

Da questo studio è emerso come *A. donax* e i microrganismi utilizzati si prestino molto bene ad un eventuale impiego nei processi di fitorimediazione. *A. donax* sia micorrizzata che non, ha mostrato ottime capacità di sopravvivenza e di sviluppo nei confronti di un terreno contaminato sia con il mix di nove metalli pesanti, sia con il mix di sedici IPA. Ciò lascia intendere l'elevata resistenza ai contaminanti palesata da *A. donax*, e di conseguenza, potrebbero aprirsi nuove prospettive di studio e ricerca per un'applicazione di successo sul campo.

Abstract

Intentional or unintentional release of organic or inorganic pollutants in the soil causes serious consequences both for the environment and public health (toxicity and carcinogenicity). Heavy metals are non-degradable and persistent pollutants in the environment and they may have teratogenic, mutagenic and carcinogenic effects; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are elements difficult to treat and they can also cause carcinogenicity and toxicity in humans. Different techniques have been used for the remediation of contaminated soils, but the phytoremediation is proposed as an alternative environmentally friendly and cost-effective than conventional chemical-physical techniques. The phytoremediation exploits the physiological characteristics of the plants in order to remove or reduce the presence of pollutants in soil. It is possible to implement this technique using various plant species able to accumulate inorganic contaminants such as heavy metals or degrade, with the help of micro-organisms of the rhizosphere, various organic contaminants; furthermore, the biomass produced can be used for other purposes, such as cogeneration of energy and/or production of biofuels, obtaining benefits for the health, environment and cost management. The efficiency of the phytoremediation processes can be increased through the use of various microorganisms (fungi, yeasts, bacteria) that normally inhabit the rhizosphere, establishing symbiotic relationships and thus facilitating the absorption and/or degradation of the contaminants. In this research project was performed the *in vitro* experimentation with three microorganisms (*Trichoderma harzianum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wicherhamomyces anomalus*) to test their potential of bioaccumulation to nine heavy metals (Ni, Cd, Cu, As, V, Pb, Zn, Cr and

Hg) and their potential of metabolization to sixteen PAHs, defined as priority by the US EPA, in order to evaluate their possible application in phytoremediation processes. Tests in the greenhouse have seen the use of the plant *Arundo donax* (Giant reed) and *A. donax* in symbiotic relationship with *T. harzianum* to establish their ability to accumulate and degrade heavy metals and PAHs respectively. *T. harzianum* was evaluated as the most suitable microorganism for his anti-pathogenic activity towards other fungi, for the bioaccumulation towards heavy metals and for showing good ability to degrade and metabolize PAHs such as naphthalene, phenanthrene, chrysene, pyrene and benzo (a) pyrene. *A. donax* is a plant species that is well suited for the recovery process of contaminated soils by heavy metals and PAHs, because it produces a good quantity of biomass, it is not palatable to the animals, it is resistant to pests and stress water, therefore, it is able to adapt in inhospitable environments.

In this study has emerged as *A. donax* and the microorganisms used are suited to a possible use in phytoremediation processes. *A. donax* and *A. donax* in symbiotic relationship with *T. harzianum* have shown excellent capacity for survival and development against a contaminated soil with the mix of nine heavy metals and with the mix of sixteen PAHs. This suggests a high resistance to contaminants shown by *A. donax*, and consequently, a new perspective of study and research for a successful application in the field.

1. Introduzione

I processi di industrializzazione, affatto eco-compatibili, sono stati caratterizzati per tutta la metà del secolo scorso da un eccessivo impiego di sostanze chimiche inorganiche e organiche di sintesi sempre più complesse, con ripercussioni negative soprattutto sull'ambiente e, di conseguenza, sulla salute pubblica (tossicità e cancerogenicità). L'introduzione volontaria o accidentale di sostanze inquinanti presenta delle ripercussioni non soltanto ambientali, ma anche economiche visti gli ingenti sforzi finanziari necessari per la bonifica atta al ripristino del suolo e delle altre matrici ambientali interessate (aria, acqua, biota). A sua volta, il mancato intervento si tramuterebbe in una perdita di valore delle aree contaminate una volta ripristinate e, di conseguenza, riutilizzabili per altre attività, nonché dei loro eventuali prodotti [Sestili, 2013]. Diviene quindi tangibile la progettualità di bonifica del suolo, in quanto accettore finale di molte sostanze organiche e inorganiche rilasciate intenzionalmente o accidentalmente dalle attività antropiche [Das *et al.*, 2014].

L'Unione Europea, in virtù di una nuova politica ambientale, da diversi anni si prefigge di formare una società più consapevole, efficiente e competitiva, in grado di realizzare uno sfruttamento sostenibile delle risorse rinnovabili ai fini industriali, garantendo al contempo la salvaguardia dell'ambiente. Di conseguenza, anche l'Italia intende rilanciare un nuovo programma strategico per la politica industriale, in linea con i principi formulati dalle indicazioni comunitarie, volto alla riprogettazione dello stesso processo industriale e alla riqualificazione ambientale. Lo stato italiano ha identificato ben 57 siti inquinati, ridotti poi a 39 nel 2013, meglio noti come SIN (Siti di Interesse Nazionale), quasi tutti localizzati in centri industriali e che richiedono opere di bonifica del suolo, del sottosuolo e/o delle acque superficiali e sotterranee, per il recupero e la riqualifica del sito stesso evitando così ulteriori danni ambientali e alla salute pubblica [www.minambiente.it]. Attualmente, abbiamo a disposizione numerosi processi applicabili per la bonifica di un determinato sito e la scelta della migliore strategia deve essere valutata in funzione delle caratteristiche del sito e dei contaminanti ivi presenti. Il termine bonifica viene utilizzato per definire un'operazione o un insieme di operazioni effettuate per ottenere l'eliminazione, da una zona specifica, della fonte di inquinamento fino a raggiungere i valori limite per il riutilizzo della stessa area [Kumar *et al.*, 2011]. Negli ultimi anni si è assistito ad un nuovo percorso che ha visto il passaggio dalle classiche tecniche di tipo chimico-fisico (vetrificazione, escavazione e conferimento in discarica, separazione elettrochimica, etc.) verso altre

incentrate sull'applicazione dei processi biologici, i quali avvengono naturalmente e pertanto annullano l'utilizzo di sostanze sintetiche inserendosi più coerentemente nella logica della riqualificazione ambientale. Inoltre, evitano la produzione di grandi volumi di rifiuti solidi ed ulteriori possibili casi di inquinamento dovuti al rilascio delle sostanze impiegate attraverso l'utilizzo delle tecniche tradizionali.

Le tecniche di bonifica incentrate sull'applicazione di processi biologici *in situ* sono convenzionalmente identificate con il termine biorisanamento (dall'inglese bioremediation). Tra le diverse tecniche pertinenti a questo tipo di processo, la fitorimediazione (phytoremediation) si mostra favorevolmente applicabile a diversi trattamenti di bonifica poiché non interferisce negativamente con l'ecosistema, piuttosto lo migliora, conferisce all'area trattata un valore estetico mediante la copertura vegetale e quindi è ben accolta dalla comunità residente, richiede poca manodopera così da essere poco onerosa dal punto di vista economico, soprattutto se confrontata con le tecniche di bonifica chimico-fisiche. Inoltre, la biomassa prodotta, in seguito alla raccolta, può essere utilizzata nel campo delle energie rinnovabili attraverso la produzione di bioenergie [Jiang *et al.*, 2015; Tahir *et al.*, 2015]. Le condizioni estreme, dovute alla contemporanea presenza di più contaminanti nel suolo, limitano la potenziale crescita degli organismi biologici da poter utilizzare negli eventuali processi di fitorimediazione. Ciò, ad esempio, si può riscontrare nel limitato utilizzo di alcune specie vegetali superiori a differenza, invece, dei microrganismi del suolo (funghi e batteri), i quali riescono a colonizzare le aree fortemente inquinate poiché capaci di tollerare condizioni più estreme. Essi, infatti, sono in grado di assorbire i contaminanti, come i metalli pesanti o degradare i composti organici come gli idrocarburi, portando ad un miglioramento delle condizioni generali del suolo e consentendo così la piantumazione di specie vegetali superiori in grado di produrre biomassa ma, di base, meno tolleranti allo stress chimico. Molte sono le evidenze già acquisite circa la capacità di alcuni funghi di intervenire nei cosiddetti processi di micorimediazione, grazie ai quali sono in grado di accumulare i metalli pesanti e, di degradare a CO₂ ed acqua o metabolizzare in forme meno tossiche gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) a cui sono stati esposti [Wang e Chen, 2006; Fiorentino *et al.*, 2012; Winqvist *et al.*, 2014].

In quest'ottica, il presente lavoro di tesi vedrà nella prima parte la valutazione *in vitro* delle prospettive di impiego del fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* e di due lieviti molto comuni in natura, come *Saccharomyces cerevisiae* e *Wicherhamomyces anomalus*, per l'eventuale applicazione nei processi di bonifica di suoli contaminati da metalli pesanti e

IPA. L'eventuale dimostrata capacità di micorimediazione da parte di *S. cerevisiae* e *W. anomalus* verrà confrontata con quella del più noto *T. harzianum*, il quale rappresenterà nel nostro esperimento l'organismo di riferimento e di confronto. Una volta identificato il microrganismo più adatto al nostro modello sperimentale, la seconda parte vedrà l'esecuzione di prove in coltura controllata in serra con lo scopo di testare la capacità fitodepuratrice della specie vegetale superiore *Arundo donax* (Canna comune) in seguito all'esposizione ai contaminanti prescelti, includendola in un protocollo di "fitoestrazione assistita" tramite micorrizzazione con il microrganismo prescelto.

2. L'inquinamento: generalità

Il termine inquinamento indica un'alterazione delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche di un determinato ecosistema, tali da determinare un pericolo per la salute pubblica o per l'ambiente naturale o costruito (D.M. 471/99). Esso, infatti, produce disagi temporanei, patologie o danni permanenti per la vita in una data area e può porre la zona in disequilibrio con i cicli naturali esistenti. Diversi agenti possono esser definiti inquinanti quando la loro dispersione, intesa come immissione o emissione nell'ambiente, causa la perdita dell'intrinseco equilibrio instauratosi tra le componenti viventi e le risorse naturali. Tenendo conto della fonte da cui traggono origine, gli agenti inquinanti possono differenziarsi in naturali e antropici e, sebbene siano diverse le fonti naturali presenti sul pianeta (vulcani attivi, sorgenti termali che esalano H₂S, mofete) l'uso antropico di molte sostanze di sintesi rimane di fatto la principale causa di inquinamento.

2.1. L'inquinamento del suolo

Il suolo funge da accettore finale per quasi tutte le sostanze che vengono rilasciate nell'ambiente dalle attività antropiche, poiché diversi inquinanti possono accumularsi in esso a causa delle sue specifiche proprietà chimico-fisiche. Infatti, la contaminazione del suolo è dovuta non solo all'immissione diretta, ma anche al trasferimento degli agenti inquinanti da altre matrici come aria, acqua e biota [Shayler *et al.*, 2009]. A sua volta, la contaminazione del suolo può avere delle importanti ripercussioni nei confronti delle acque sotterranee a causa delle sostanze che percolano da terreni occupati da discariche, impianti zootecnici, industrie etc., a ulteriore riprova di quanto le varie matrici ambientali siano tra di loro collegate. Queste sostanze portano ad un'alterazione dell'equilibrio chimico, fisico e

biologico del suolo e, inoltre, possono entrare nella catena alimentare così da giungere fino all'uomo attraverso i processi di bioaccumulo e biomagnificazione. Quindi, la bonifica dei terreni diventa essenziale per proteggere l'ambiente dagli effetti tossici delle sostanze inquinanti al fine di garantire una migliore salute per la popolazione ed una migliore salvaguardia dell'ambiente per le generazioni future [Conceição Gomes *et al.*, 2016].

Quando la concentrazione di una determinata sostanza è superiore al valore limite stabilito dalla legge, essa rappresenta un potenziale rischio per la salute pubblica e l'ambiente in generale, considerando di conseguenza contaminato il suolo di una specifica area [Horta *et al.*, 2015]. Le fonti di inquinamento, come detto, possono essere anche di origine naturale, sebbene le fonti antropiche rappresentano il maggior problema a cui far fronte e in quest'ultime troviamo tra i principali inquinanti i metalli pesanti e gli idrocarburi policiclici aromatici.

2.2. I metalli pesanti

Sebbene non esista una definizione universalmente accettata basata sulle loro proprietà chimico-fisiche, i metalli pesanti sono convenzionalmente definiti come elementi con un numero atomico > 20 e che presentano caratteristiche quali duttilità, conduttività, stabilità [Lasat, 2000; Duffus, 2002; Jing *et al.*, 2007]. In base a quanto detto, vengono identificati come metalli pesanti elementi chimici come alluminio (Al), ferro (Fe), argento (Ag), bario (Ba), berillio (Be), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), manganese (Mn), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), stagno (Sn), titanio (Ti), tallio (Tl), vanadio (V) zinco (Zn) e il metalloide arsenico (As). In realtà, alcuni tra questi metalli, come ad esempio il rame, il ferro e il nichel, fanno parte anche dei cosiddetti metalli essenziali, cioè quegli elementi presenti in traccia nei fluidi biologici degli organismi viventi e implicati in importanti processi metabolici [Templeton, 2003]. I metalli sono costituenti naturali del suolo e possono essere presenti come ioni liberi in soluzione e complessi metallici solubili, in siti di scambio ionico, associati alla materia organica del suolo, in forma di ossidi, idrossidi, carbonati e incorporati nella struttura dei minerali silicati [Lasat, 2000].

La loro presenza è cresciuta esponenzialmente dall'inizio della rivoluzione industriale rendendoli così uno dei più importanti problemi ambientali di oggi, poiché possono entrare nel corpo attraverso l'ingestione e l'inalazione, causando, di conseguenza, problemi per la tutela della salute pubblica [Kabata-Pendias, 1989; Chaney *et al.*, 1997; Kos *et al.*, 2003; Jing *et al.*, 2007]. La loro tossicità è elevata perché tendono ad accumularsi all'interno

dell'organismo, ostacolando le normali attività vitali e non permettendone facilmente l'eliminazione [Copat *et al.*, 2012].

In questa tesi si discuterà in particolare delle caratteristiche e dei rischi legati alla contaminazione del suolo in seguito ad esposizione a Ni, Cd, Cu, As, Zn, Pb, V, Cr, Hg e dei possibili metodi di bonifica dei suoli contaminati da tali metalli mediante l'impiego di organismi biologici.

2.2.1. Nichel

È un componente ampiamente diffuso nella crosta terrestre così come nel nucleo, nelle profondità marine e nel suolo, con un range approssimativo di 3-200 mg/kg. Presenta un aspetto bianco-argenteo, è duro, malleabile e duttile; spesso si rinviene combinato con altri metalli quali Fe, Co, Cu o Mg [EFSA, 2015]. Tali proprietà lo rendono particolarmente adatto alla produzione di leghe e superleghe, in quanto ne aumentano notevolmente le proprietà anticorrosive e la resistenza meccanica ad alte temperature. Per tali ragioni, il nichel è diventato praticamente insostituibile nella produzione di gran parte degli acciai speciali e le sole industrie siderurgiche rappresentano oltre i 2/3 degli utilizzatori di questo metallo [www.csm.it]. Componenti a base di nichel o soggetti a trattamenti col nichel, sono impiegati nelle reti e nei sistemi di trasporto, come beni di largo consumo, nell'industria e nell'edilizia. Di conseguenza, il nichel è pressoché ubiquitario nell'ambiente e il tasso di emissione a mezzo antropico è chiaramente più elevato (1,4-1,8 volte) rispetto a quello naturale. Il nichel è presente in diversi stati ossidativi, ma generalmente lo si riscontra nella sua forma bivalente (Ni^{2+}) [IARC, 2012]. Sebbene con un'intensità inferiore rispetto ad altri metalli come Cu, Pb e Zn, il nichel viene trattenuto fortemente dalle particelle di suolo e fattori quali la tessitura del suolo, la quantità di materia organica, la qualità e quantità di cristalli minerali, il pH, il flusso d'acqua e la presenza di idrossidi, influenzano fortemente la ritenzione di nichel nel suolo [ATSDR, 2005a]. Come elemento in traccia, è considerato un micronutriente essenziale per moltissime piante e per alcune specie di animali. La tossicità dipende dai livelli di esposizione e dalla solubilità dei composti, i quali possono presentare effetti cancerogeni per inalazione o lesioni irritative per contatto con la cute; dunque sono stati spesso annoverati come agenti etiologici di numerose neoplasie del tratto respiratorio e di gravi dermatiti [IARC, 2012]. L'albumina è la proteina responsabile del suo trasporto nell'organismo umano come in quello animale e la maggior parte del nichel si deposita nel sangue, nei muscoli, nel grasso, nelle ossa e nei tessuti connettivi, mentre gli organi in cui può verificarsi un accumulo sono il fegato e i reni. Un'esposizione eccessiva

ai composti del nichel può causare effetti locali, ma l'unico composto che è in grado di provocare effetti sistemici nell'uomo è il nichel carbonile $\text{Ni}(\text{CO})_4$. Questo composto, altamente tossico per gli organismi viventi, viene assorbito rapidamente per via polmonare e successivamente decomposto in monossido di carbonio, il quale si lega all'emoglobina, mentre il nichel viene ossidato ed escreto attraverso i reni [Costantini *et al.*, 2004].

2.2.2. Cadmio

Il cadmio è un elemento con caratteristiche quali morbidezza, duttilità e una tipica colorazione bianco-argentea; raramente si ritrova allo stato puro. Generalmente presente nello stato ossidativo bivalente (Cd^{2+}), forma un certo numero di sali inorganici che presentano proprietà simili ai corrispondenti sali dello zinco. I suoi principali composti sono: l'acetato, il solfato, il cloruro, il solfuro, lo stearato, l'ossido e il carbonato; i primi tre si mostrano abbastanza solubili in acqua, invece l'ossido e il solfuro risultano insolubili [Costantini *et al.*, 2004]. Il cadmio si diffonde nel suolo tramite fonti sia naturali che antropiche. L'inquinamento atmosferico, i fertilizzanti e i fanghi di depurazione sembrano essere i maggiori attori della deposizione nei suoli agricoli. Nel suolo può presentarsi disciolto nelle acque oppure in complessi insolubili con composti inorganici ed organici. Inoltre, tende ad essere più disponibile a bassi valori di pH. Dai dati presenti in letteratura si evince che circa il 90% del cadmio riscontrato nei suoli, attraverso il processo di lisciviazione, non arriva a profondità maggiori di 15 cm [ATSDR, 2012a].

È adoperato in numerose applicazioni tecnologiche, infatti lo si ritrova in diverse leghe metalliche associato con Zn e, in misura minore, con Pb e Cu. Di conseguenza, viene rilasciato nell'ambiente tramite lo smaltimento di altri metalli, ma anche con la combustione di carburanti fossili e l'incenerimento di materiali di scarto. Quindi, è palese come la dispersione del cadmio nell'ambiente avvenga principalmente per via antropica e, in misura nettamente minore, per via naturale tramite le emissioni vulcaniche e la corrosione di sedimenti [EFSA, 2009]. Nelle acque, il cadmio, si deposita principalmente nei sedimenti oppure si diffonde tramite particelle sospese. La soglia di concentrazione non inquinante è solitamente bassa ($<1 \mu\text{g/L}$), tuttavia, fenomeni di contaminazione delle acque potabili possono avvenire previa presenza del metallo nelle condutture di zinco e nelle saldature. L'acqua di mare, di solito, presenta una concentrazione nell'ordine di $0,03\text{-}0,04 \mu\text{g/L}$, mentre l'impiego di fertilizzanti può causare una contaminazione del suolo. Le principali vie di ingresso nell'uomo sono dovute all'inalazione e all'ingestione (circa il 5% del cadmio ingerito viene assorbito), a differenza dell'assorbimento attraverso la pelle che

invece rimane trascurabile. Il cadmio trasportato nel sangue è in grado di legarsi a delle proteine a basso peso molecolare, come le metallotioneine. La loro produzione è stimolata dal cadmio stesso, ma anche dallo zinco, nonché da alcuni metalli bivalenti come il Cu e il Hg. L'interrelazione biochimica tra cadmio e metallotioneine rappresenta il fulcro della tossicità per il successivo accumulo del metallo nei tessuti. Un'esposizione a lungo termine può condurre a disturbi del metabolismo del calcio; inoltre, alcuni studi epidemiologici su lavoratori esposti, hanno evidenziato un incremento della genesi di neoplasie polmonari e prostatiche. L'etiologia delle neoplasie è ascrivibile alla lunga emivita dell'elemento soprattutto negli organi critici, quali reni, fegato e polmoni, provocando effetti irreversibili. La prevenzione, assistita dal monitoraggio ambientale e biologico, quindi, assume un ruolo fondamentale per la salute della popolazione e dell'ambiente [Costantini *et al.*, 2004].

2.2.3. Rame

Il rame è un elemento ampiamente rappresentato in natura, tanto nel suolo e nelle acque, quanto negli organismi viventi, siano essi vegetali o animali. È un metallo duttile, malleabile, con una caratteristica colorazione rossastra e comunemente presente con due diversi stati d'ossidazione quali il rameoso (Cu^+) e il rameico (Cu^{2+}); più rari gli stadi di ossidazione trivalente e tetravalente [Van Sprang *et al.*, 2008]. Il rame trova riscontro in diverse applicazioni industriali, basti pensare al suo utilizzo nella produzione di condutture elettriche e di leghe come bronzo (rame e stagno) ed ottone (rame e zinco). I suoi sali vengono tuttora adoperati come antifungini, insetticidi e rodenticidi [ECI, 2008]. Una volta introdotto nell'ambiente, il rame è in grado di legarsi, sotto forma di ione rameico (Cu^{2+}), ai composti inorganici ed organici presenti nelle acque, nei suoli e nei sedimenti, formando complessi ionici stabili con i gruppi amminico ($-\text{NH}_2$), sulfidrilico ($-\text{SH}$) e in misura minore, ossidrilico ($-\text{OH}$). In tutte le matrici ambientali, le affinità di legame dello ione rameico con la materia organica e inorganica sono condizionate dai valori di pH, dal potenziale di ossido-riduzione e dalla presenza di anioni. Il rame è anche un elemento essenziale per molti processi biologici, infatti, è richiesto per il funzionamento di numerosi enzimi, quali la superossido dismutasi, la citocromo-c ossidasi ed altre ossidasi, quali ammino-ossidasi, mono-ossigenasi e di-ossigenasi [Cass and Hill, 1980]. Normalmente presente nell'organismo umano, viene assorbito per circa il 50% attraverso il cibo (2 mg/die). L'esposizione al rame si riscontra comunemente nell'industria metallurgica, anche se non è stato documentato nessun effetto cronico a suo carico. In seguito all'assorbimento, il rame viene legato dalla proteina plasmatica ceruloplasmina che, a sua volta, lo trasporta

nel fegato, dove un suo eccesso può determinare uno stato patologico noto come malattia di Wilson; quantità minori possono accumularsi nel midollo, nel cervello, nel cuore, nei reni e nei muscoli [Costantini *et al.*, 2004].

2.2.4. Arsenico

A differenza degli altri elementi presi in considerazione e che rientrano pienamente tra i cosiddetti metalli pesanti, l'arsenico in verità è un metalloide che viene appunto incluso tra i metalli pesanti. È noto per la tossicità nella forma elementare, per quella dei suoi composti organici e dell'arsina (AsH_3) [ANPA, 1999]. Lo si ritrova in varie forme allotropiche quali: arsenico grigio cristallino, arsenico giallo e arsenico nero. I suoi stati di valenza sono -3, 0, +3, +5 [Costantini *et al.*, 2004].

L'arsenico è naturalmente presente nella crosta terrestre ($< 2 \text{ mg/kg}$), infatti lo rinveniamo in alcuni minerali come la pirite ed anche nei suoli non contaminati. Nell'acqua di mare le concentrazioni sono comprese tra 0,001 e 0,005 mg/L, a differenza dei laghi e dei fiumi dove le concentrazioni possono variare considerevolmente. La sua naturale presenza nelle acque sotterranee dipende dal contenuto di arsenico totale nelle rocce con cui essa viene a contatto [Costantini *et al.*, 2004]. Nel suolo può essere presente anche a causa dell'impiego di alcuni prodotti antiparassitari, erbicidi e fertilizzanti fosfatici ed organici; in passato è stato utilizzato come pigmento per pitture, nelle concerie, ed ha avuto grande importanza anche in campo medico [Alloway, 1995]. La tossicità, la biodisponibilità e il trasporto dipendono dalla specie presente, infatti, negli stati di ossidazione trivalente (As^{3+}) e pentavalente (As^{5+}), questo elemento presenta le maggiori caratteristiche di tossicità. Le due forme ioniche formando i rispettivi ossidi, i quali a loro volta hanno una moderata solubilità in acqua, trasformano quest'ultima in acqua arsenicale [Alloway, 1995; Costantini *et al.*, 2004]. La mobilità dell'elemento è fortemente favorita dall'acidità stessa del terreno, dato che all'aumentare del pH aumenta la dissoluzione dei composti presenti in abbondanza nei suoli come gli arseniati di Fe e Al. Oltre a ciò, la mobilità è influenzata anche dal potenziale redox, in quanto in ambienti riducenti l'arsenico passa dallo stato di ossidazione V al III, diventando così molto più solubile e, di conseguenza, più soggetto a fenomeni di lisciviazione. Quest'ultimi, però, non trasportano l'arsenico a grandi profondità poiché tende a concentrarsi negli strati più superficiali del suolo (20-40 cm) e a rimanervi indefinitamente [Kabata-Pendias e Pendias, 2001].

In seguito ad esposizione a questo elemento, ad esempio sottoforma di triossido di arsenico (As_2O_3), le particelle aerodisperse possono depositarsi nella regione naso-faringea e gran

parte dell'arsenico inalato viene così ingoiato ed assorbito nel tratto gastrointestinale. Dopo l'assorbimento da parte dei polmoni o del tratto gastrointestinale, l'arsenico viene trasportato attraverso il sangue nelle altre parti del corpo. Nell'uomo e in molte specie animali, si può avere un iniziale accumulo di arsenico nei reni, nel fegato e nei polmoni. In realtà, questi organi sono in grado di liberarsene abbastanza rapidamente, ma nonostante ciò se ne ha ritenzione a lungo termine nei capelli, nella pelle, nell'epitelio squamoso del tratto gastrointestinale alto, nella tiroide e nello scheletro [Costantini *et al.*, 2004].

2.2.5. Zinco

Lo zinco si presenta come un metallo cristallino bianco-bluastro, relativamente morbido e con la tendenza a reagire con composti inorganici quali ossidi, solfati e fosfati [Costantini *et al.*, 2004]. È un microelemento essenziale per la vita dell'uomo, degli animali e delle piante superiori, essendo indispensabile nella formazione di diversi enzimi. Le piante lo assorbono principalmente come catione bivalente (Zn^{2+}), ed è presente anche nelle rocce vulcaniche (graniti) e nelle rocce sedimentarie [Alloway, 1995]. Seppur la sua distribuzione globale terrestre sia relativamente bassa, lo zinco è ben conosciuto poiché in determinate zone è presente ad alte concentrazioni ed è facilmente isolabile dai suoi minerali [Costantini *et al.*, 2004]. Si riscontra naturalmente nei suoli, sebbene concentrazioni molto elevate siano dovute ad apporti antropici. Le principali fonti di zinco sono le miniere per l'estrazione di metalli, le industrie che li trattano (galvaniche, fonderie, etc.), le emissioni gassose generate dal traffico veicolare, ma anche le deiezioni zootecniche, i fanghi di depurazione, il compost, i fertilizzanti e i pesticidi [Alloway, 1995]. La mobilità dello zinco nel suolo dipende dalla solubilità della specie chimica a cui l'elemento è legato e dalle proprietà del suolo (pH, scambio cationico, etc.) [ATSDR, 2005b].

Lo zinco, essendo anche un microelemento essenziale per la vita degli organismi viventi, è implicato in diversi processi biologici: compare in moltissime classi di enzimi (ossidoreduttasi, transferasi, idrolasi, isomerasi e ligasi); entra a far parte delle metallotioneine e delle proteine regolatrici che facilitano o impediscono la trascrizione di un gene; è in grado di legarsi con i nucleotidi e, di conseguenza, lo si ritrova negli acidi nucleici; possiede affinità per i gruppi tiolici; infine è coinvolto nella modulazione del sistema immunitario [Venugopal e Luckey, 1978; Adams, 1999]. Nonostante ciò, concentrazioni elevate di zinco possono causare diversi effetti tossici come un'alterazione del metabolismo del Fe, favorendone così il suo turnover e diminuendone l'emivita negli

eritrociti e un'alterazione dell'accumulo del Fe come ferritina nel fegato [Settlemyre e Matrone, 1967 a, b]. Lo zinco, a concentrazioni molto elevate, diventa tossico per gli organismi perché i meccanismi che ne regolano l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione non sono molto efficienti. Tuttavia, possono verificarsi alterazioni dell'omeostasi di questo metallo sia a causa di un apporto eccessivo con la dieta che per malnutrizione [Settlemyre e Matrone, 1967 a, b].

2.2.6. Piombo

Il piombo si presenta con un colore bianco-azzurro, è un metallo duttile e malleabile. Si ritrova in numerosi minerali come ad esempio la galena che rappresenta la fonte primaria di piombo allo stato naturale. Presenta gli stati di ossidazione 0, +2, +4. Tra i sali di piombo, gli ossidi e il solfuro non sono solubili in acqua, ad eccezione dell'acetato, del clorato e, in alcuni casi, anche del cloruro. Tra i composti organici più utilizzati si evidenziano il piombo tetrametile e tetraetile, utilizzati fino al decennio scorso anche in Italia come antidetonanti nelle benzine [Costantini *et al.*, 2004].

Il piombo è un elemento mediamente diffuso nella litosfera, non svolge importanti funzioni fisiologiche, anzi è tossico per gli esseri viventi. Rispetto ad altri inquinanti presenta lunghi tempi di permanenza nel suolo a causa della bassa solubilità e del basso tasso di degradazione da parte dei microrganismi; di conseguenza, rimane accessibile alla catena alimentare e, dunque, al metabolismo umano [Alloway, 1995]. A livello atmosferico, in particolar modo prima che venisse messo al bando il suo utilizzo come additivo nelle benzine, i livelli di piombo erano piuttosto consistenti, con concentrazioni sensibilmente più elevate nelle aree industriali e suburbane rispetto alle aree agricole. Di fatto, i principali apporti antropici derivano dalle industrie, dagli scarti di miniere, dai fanghi di depurazione, dall'utilizzo di pesticidi e in passato una fonte consistente, come detto, era rappresentata dal traffico veicolare. Quindi, sebbene naturalmente presente, a causa dell'inquinamento diffuso, il suolo costituisce il maggiore accettore di questo elemento [Alloway, 1995].

Il piombo, in seguito ad esposizione cronica può agire come veleno presentando gravi fenomeni di intossicazione e, inoltre, può avere effetti mutageni, cancerogeni e teratogeni. Le principali vie di assorbimento sono rappresentate dal tratto gastrointestinale e dal sistema respiratorio. In seguito all'assorbimento, viene trasportato attraverso il sangue nei tessuti e, quindi, depositato nei compartimenti di accumulo, quali ossa, fegato, reni, corteccia cerebrale e midollo. L'accumulo di piombo, nel corso del tempo, può causare sia effetti acuti che cronici, a carico del sistema nervoso, gastrointestinale, renale ed

ematopoietico. Un tipico esempio di effetto cronico sul sistema ematopoietico è l'anemia micro o normocitica [Costantini *et al.*, 2004]. In seguito ad esposizione cronica, soprattutto in ambito professionale, si assiste al manifestarsi di una malattia denominata *saturnismo*, la quale comporta anemia, nefropatia, neuropatia. L'intossicazione acuta, per quanto rara, può portare ad encefalopatia e al coma.

2.2.7. Vanadio

Il vanadio è un elemento bianco lucente, duro e duttile, utilizzato per la produzione di diverse leghe metalliche. Chimicamente mostra un comportamento intermedio tra metallo e non metallo. Gli stati di ossidazione più frequenti nei composti del vanadio sono +2, +3, +4, +5; la forma pentavalente è quella che merita maggiore attenzione, poiché viene assorbita con un'efficienza superiore, dalle tre alle cinque volte, rispetto alla forma trivalente. È naturalmente presente nel suolo, dove si ritrova principalmente legato agli ossidi di ferro e, in misura minore, adsorbito nei minerali argillosi o legato come catione alla sostanza organica [Kabata-Pendias, 2001]. Le maggiori emissioni di vanadio nell'ambiente sono dovute ad alcuni impianti industriali come fonderie, cementifici e processi che portano alla combustione di carbone ed olio. Naturalmente presente nelle zone di origine vulcanica, ed infatti la Sicilia è una delle regioni italiane dove sono state riscontrate concentrazioni maggiori nelle acque, così come in Sardegna e nel Lazio. Il rilascio del vanadio nei suoli avviene in seguito all'erosione di rocce e minerali e per deposizione del particolato [ATSDR, 2012b]. L'azione tossica nell'uomo si esplica attraverso il tratto respiratorio, l'ingestione e il contatto, esplicando azione irritante per la pelle e gli occhi [Alloway, 1995]. Se ingerito attraverso la dieta, la maggior parte viene trasferito allo stomaco come VO^{2+} ed escreto con le feci. L'assorbimento gastrointestinale, quindi, è scarso, ma una volta assorbito e legatosi alla transferrina, verrà trasportato attraverso il sangue e distribuito in tutti i tessuti [Costantini *et al.*, 2004]. Anche l'acqua può contribuire notevolmente all'apporto di vanadio, tanto da superare la quantità potenziale assunta con l'alimentazione; una volta ingerito transita velocemente nell'organismo e viene eliminato con le urine. In generale la tossicità dei composti del vanadio è bassa, ma aumenta in relazione allo stato ossidativo, infatti, i composti pentavalenti sono quelli più tossici. I principali effetti, dovuti ad esposizione cronica, si riscontrano a livello ematico e renale, ma possono presentarsi anche danni a livello dell'apparato riproduttivo e allo sviluppo dell'individuo [Barceloux, 2000].

2.2.8. Cromo

Il cromo è un metallo di colore grigio acciaio, naturalmente presente nella crosta terrestre (fino 125 mg/Kg), nei fiumi e nei laghi (1-10 µg/L), nelle acque marine (< 0,1-5 µg/L). Difficilmente rinvenibile in natura come elemento puro, il cromo è maggiormente presente nella sua forma minerale conosciuta come cromite ed utilizzata per la produzione di leghe metalliche [Costantini *et al.*, 2004]. Presenta tre stati di ossidazione (+2, +3, +6), ma le forme più stabili sono la trivalente, comune in natura, e l'esavalente, di maggior interesse industriale [Alloway,1995]. Nel suolo, il cromo trivalente è un elemento stabile in quanto la sua solubilità decresce all'aumentare del pH, invece, il cromo esavalente è più instabile e mobilizzato facilmente sia in suoli acidi che alcalini [Kabata-Pendias e Pendias, 2001]. In presenza di sostanza organica, viene favorita la riduzione dalla forma esavalente alla trivalente [Baize, 1997]. Il contenuto nel suolo può aumentare a causa dell'emissione in acqua e in atmosfera degli impianti industriali, o dall'impiego di fertilizzanti organici o fosfatici minerali con elevato contenuto di cromo [Kabata-Pendias e Pendias, 2001].

Nell'uomo e negli altri animali, il cromo è un elemento essenziale per il metabolismo dell'insulina come fattore di tolleranza al glucosio (GTF). Il maggior accumulo di questo metallo avviene a livello del tessuto osseo, seguito da fegato, reni e milza; una volta assorbito e legato nei tessuti biologici, si ritrova nella forma trivalente la quale non sembra presentare particolare tossicità. I composti esavalenti, invece, sono molto tossici per l'uomo e possono causare intossicazioni acute e croniche [Costantini *et al.*, 2004]. Numerosi studi hanno dimostrato che il cromo esavalente induce stress ossidativi, causando danni al DNA, apoptosi cellulare ed alterata espressione genica [Bidya *et al.*, 2014; Ferrara *et al.*, 2014; Jun e Ju, 2016].

2.2.9. Mercurio

Il mercurio è l'unico metallo che a temperatura ambiente si presenta allo stato liquido. Di color argento, il mercurio è abbastanza diffuso in natura, infatti viene rilasciato nell'ambiente attraverso le esalazioni vulcaniche, le sorgenti termali e gli sfiati naturali della crosta terrestre. Le principali fonti antropiche sono legate all'attività di estrazione di rame e zinco, alla combustione dei combustibili fossili e dei rifiuti, a diversi processi industriali, ma anche all'utilizzo in agricoltura di fertilizzanti, fungicidi, liquami e fanghi di depurazione che hanno aumentato, in particolare in passato, la presenza di questo elemento nel terreno [Alloway,1995]. La forma cationica Hg^{2+} è quella predominante nel suolo, sottoforma di chelati e complessi organici ed inorganici adesi alle particelle di suolo. Ad

esempio, metil- e dimetilmercurio si presentano saldamente adesi alle particelle, ma essendo anche solubili in acqua, risultano essere particolarmente mobili e di conseguenza relativamente biodisponibili [ATSDR, 1999].

Il mercurio e i suoi composti non possiedono alcuna funzione biologica, anzi, è altamente tossico per l'uomo e gli animali superiori. I vapori di mercurio possono essere assorbiti dai polmoni provocando danni a livello del sistema nervoso centrale. I sali inorganici e i composti organici possono essere assorbiti a livello del tratto gastrointestinale e, attraverso il sangue, vengono distribuiti ai vari tessuti. Il metilmercurio è il composto organico più pericoloso a causa della sua stabilità, della solubilità nei grassi, delle sue qualità ioniche e produce effetti teratogeni, cancerogeni e mutageni [Alloway, 1995].

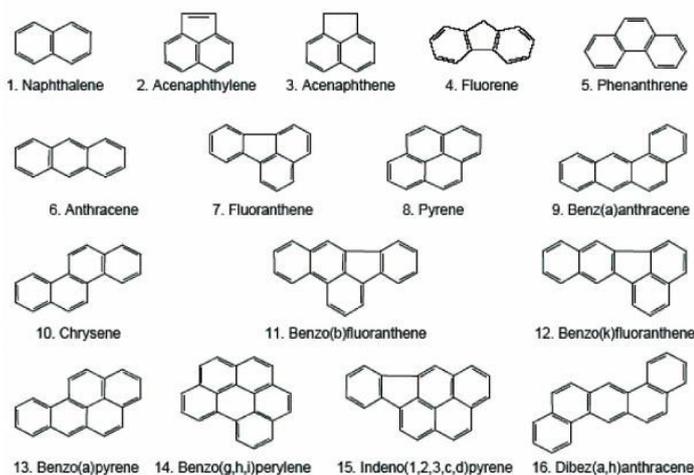
2.3. Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono un grande gruppo di composti organici semivolatili costituiti da atomi di carbonio e idrogeno, disposti a formare strutturalmente due o più anelli benzenici fusi fra loro in un'unica struttura generalmente planare [Miani *et al.*, 2007; Marquès *et al.*, 2016]. Occasionalmente possono includere anche altri elementi, come azoto, cloro, ossigeno e zolfo, formando i cosiddetti composti eterociclici aromatici. Gli IPA sono contaminanti ubiquitari in tutti i comparti ambientali. La loro presenza è dovuta sia a fonti naturali come il carbon fossile, il petrolio, le eruzioni vulcaniche, sia alle attività umane legate ai processi industriali, al traffico veicolare, al riscaldamento domestico [Venkata Mohan *et al.*, 2006]. Si stima che negli ultimi 100 anni circa, la loro concentrazione in tutti i comparti ambientali della biosfera (acqua, aria, suolo) sia in continuo aumento [Jones *et al.*, 1989] e questo incremento sarebbe maggiormente imputabile alle emissioni antropiche. Gli IPA ad alto peso molecolare, come il benzo(a)pirene, sono presenti in elevate quantità in catrami, bitumi, pece e carboni nonché nei prodotti correlati come gli asfalti. Inoltre possono derivare da nerofumo e fuliggine di legna o comunque si ricollegano a fonti pirogeniche. Gli IPA leggeri come naftalene e fluorene sono inquinanti ubiquitari che per la loro relativa maggiore solubilità in acqua, possono giungere ad inquinare le falde sotterranee. In condizioni normali gli IPA si presentano tutti allo stato solido e sono o relativamente poco solubili o del tutto insolubili in acqua; la solubilità, in generale, diminuisce all'aumentare del loro peso molecolare. La natura idrofobica degli IPA rappresenta il principale fattore che determina la loro persistenza nell'ambiente e, di conseguenza, si può avere un loro accumulo anche

all'interno della catena alimentare [Mollea *et al.*, 2005]. Gli IPA, oltre che nel suolo, presentano un'elevata distribuzione nell'atmosfera dove li ritroviamo sia allo stato solido, legati al particolato atmosferico, sia in fase di vapore, in particolare durante i mesi più caldi. Sono dei composti sensibili alla luce ed assorbono sia negli UVa che UVb, subendo due tipi di reazioni fotochimiche: fotosensibilizzazione e fotodegradazione. Nella prima si formano radicali liberi (ad es. superossidi), sostanze chimicamente molto reattive e pericolose per la salute umana, nella seconda subiscono mutazioni strutturali dando così origine a composti di degradazione la cui tossicità è in continua fase di studio [Miani *et al.*, 2007]. Gli IPA determinano diversi effetti negativi sull'ambiente naturale o costruito e di conseguenza esercitano la loro tossicità sugli organismi viventi presenti sia a livello terrestre che acquatico. La International Agency for Research on Cancer (IARC), già nel 1987, li ha dichiarati come probabili o possibili cancerogeni per l'uomo [IARC, 1987] e, nel 2008, il benzo(a)pirene è stato inserito nel gruppo 1 in quanto cancerogeno per l'uomo; quindi, è fondamentale avere a disposizione efficaci misure di controllo e di abbattimento delle emissioni di tali composti. Inoltre, il rischio per gli organismi viventi è associato alle loro proprietà mutagene, teratogene e cancerogene [Roy *et al.*, 2005].

Anche se esistono più di cento diversi IPA, gli ascritti nel causare i maggiori danni per la salute dell'uomo e degli animali sono: naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene. Tali composti, date le loro caratteristiche, sono stati definiti come prioritari dalla US EPA (United States Environmental Protection Agency).

Figura 1. Sedici IPA prioritari secondo la US EPA (www.elea.unisa.it).



Nell'organismo umano, gli IPA, possono essere introdotti attraverso il contatto con l'epidermide e con la respirazione in seguito all'ingresso di fuliggine e particolato atmosferico sui quali sono adsorbiti; anche la contaminazione degli alimenti gioca un ruolo fondamentale sul loro accumulo, perché una volta ingeriti vengono assorbiti dal tratto gastrointestinale a causa della loro elevata liposolubilità [Mueller e Cerniglia, 1996; Roy *et al.*, 2005]. Gli IPA possono essere rimossi dall'organismo come metaboliti idrosolubili, eliminabili attraverso l'escrezione. Tuttavia, questi prodotti metabolici sono responsabili degli effetti mutageni e cancerogeni per i mammiferi [Bamforth e Singleton, 2005].

Gli IPA, sebbene vadano incontro a fenomeni di fotosensibilizzazione e fotodegradazione, sono considerati dei contaminanti persistenti nell'ambiente a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche. Inoltre, sono dei composti generalmente resistenti alla degradazione microbica data la bassa solubilità in acqua e la loro complessa struttura. Nonostante ciò, vi sono alcuni batteri in grado di degradarli grazie ad un processo di assimilazione che permette loro di ottenere carbonio ed energia per la crescita, processo che a sua volta porta alla mineralizzazione del composto stesso. In generale, vari gruppi di batteri sia gram-positivi che gram-negativi sono in grado di degradare gli IPA grazie all'intervento di enzimi intracellulari. Ad esempio, il batterio Gram-negativo *Burkholderia* (β -proteobacteria) è in grado di degradare facilmente gli IPA aventi 2 o 3 anelli aromatici, invece, il batterio gram-positivo *Mycobacterium* è più efficiente nel degradare gli IPA con un maggior numero di anelli aromatici. In generale, però, la capacità biodegradativa dei microrganismi diminuisce con l'aumentare degli anelli aromatici e del numero di sostituenti nella molecola. Il processo degradativo si basa su una serie di riduzioni di ossido riduzione che avvengono a livello della catena di trasporto degli elettroni delle cellule; gli accettori comunemente più usati dai microrganismi sono l'ossigeno, i nitrati, il ferro, i solfati e la CO₂ [Delgado, 2013].

Altri microrganismi in grado di compiere i processi degradativi sono i funghi ligninolitici, i quali possono essere perfino più efficaci di alcuni batteri, perché possiedono particolari enzimi (*lignina perossidasi*, *manganese perossidasi*, *laccasi*) aventi un importante ruolo nell'attacco iniziale verso gli IPA ad alto peso molecolare presenti nel suolo. Ad esempio, è stato dimostrato come ceppi di *Trametes versicolor* siano in grado di degradare gli IPA presenti nel suolo grazie all'azione combinata dei tre enzimi sopra citati [Jang *et al.*, 2009]. Un altro esempio è dato da *Cordyceps militaris*, un fungo parassita in grado di degradare gli IPA attraverso idrossilazione, il quale ha evidenziato un'elevata capacità degradativa nei confronti di fenantrene, pirene e benzo(a)pirene [Mori *et al.*, 2015]. *T. harzianum* e *T.*

viride hanno mostrato efficacia nel degradare gli IPA presenti in diversi inquinanti ambientali come il petrolio e il catrame di carbone [Ravelet *et al.*, 2000]. Il tasso di degradazione degli IPA da parte degli enzimi fungini dipende da diversi fattori, come la disponibilità di ossigeno, l'accessibilità dei nutrienti, il pH, la temperatura, la struttura chimica del composto, le proprietà di trasporto delle cellule e la ripartizione chimica nel terreno [Kadri *et al.*, 2016].

Oggi, diverse strategie sono prese in considerazione per il biorisanamento di terreni contaminati da IPA, come l'impiego di vari tipi di compost o di tecniche di bio-augmentation che si avvalgono dell'utilizzo di varie specie fungine. La comunità scientifica supporta i processi di biorisanamento, non solo attraverso l'uso di batteri, ma anche attraverso l'uso di organismi fungini in quanto possiedono la capacità di degradare gli IPA efficacemente [Winqvist *et al.*, 2013].

In questa tesi valuteremo la possibile capacità degradativa da parte degli organismi biologici prescelti nei confronti dei 16 IPA definiti prioritari dalla US EPA e la loro applicabilità nei processi di bonifica dei suoli contaminanti da tali composti.

3. Biorimediazione

La biorimediazione, o biorisanamento, è un processo che si avvale dell'utilizzo di diversi organismi biologici con lo scopo di rimuovere o degradare gli inquinanti presenti nel suolo fino ad ottenere uno stato innocuo o, comunque, un livello inferiore rispetto ai limiti di concentrazione stabiliti dalle autorità competenti [Vidali, 2001]. Questa azione può essere effettuata sia da microrganismi come batteri e funghi, i quali sono in grado di attaccare e degradare enzimaticamente vari tipi di inquinanti presenti nel suolo, sia da diverse piante terrestri e acquatiche capaci di rimuovere gli stessi inquinanti assorbendoli attraverso l'apparato radicale e accumulandoli nelle parti aeree (germogli e foglie). Inoltre, le piante e i microrganismi coinvolti possono interagire tra loro, ad esempio mediante relazioni simbiotiche, rendendo il processo di risanamento ancor più efficiente [Vidali, 2001; McCutcheon e Jørgensen, 2008]. Quindi, è importante comprendere come operino i diversi microrganismi implicati nei processi di biorimediazione [Campos *et al.*, 2008] e vi è un'ampia varietà di tecniche che sono state sviluppate negli ultimi anni; alcune di queste sono riassunte nella Tabella 1 [Mueller e Cerniglia 1996; Kawamura e Esposito, 2010].

Tabella 1. Metodi utilizzati per i processi di biorimediazione [adattata da Kawamura e Esposito, 2010].

METODI	PRINCIPI
Natural attenuation	Presenza nel suolo di microrganismi indigeni capaci di degradare i contaminanti.
Bioaugmentation	Addizione di microrganismi non indigeni capaci di degradare i contaminanti resistenti all'azione dei microrganismi indigeni.
Biostimulation	Addizione di nutrienti che stimolano la crescita e lo sviluppo dei microrganismi indigeni così da aumentare la loro attività metabolica ed aumentare la degradazione dei contaminanti.
Bioleaching	Utilizzo di specifici microrganismi capaci di promuovere la solubilizzazione dei metalli.
Biofilters	Aggiunta di batteri in biofiltri utilizzati per la decontaminazione di acque contaminate e rifiuti liquidi.
Biopiling	Il materiale da trattare viene accumulato su un sistema areato e i nutrienti vengono aggiunti ad esso.
Biosorption	Adsorbimento di metalli e altri ioni presenti in soluzione acquosa mediante l'uso di materiali biologici.
Bioventing	Sistema che si avvale della ventilazione del terreno per la rimozione dei composti volatili grazie all'ossigeno che degrada i contaminanti.
Composting	Aggiunta di nutrienti nel terreno, che viene miscelato per aumentare l'aerazione e l'attivazione dei microrganismi autoctoni.
Phytoremediation	Utilizzo di piante in grado di estrarre o sequestrare sostanze inquinanti così da decontaminare ambienti terrestri e acquatici.
Landfarming	Il suolo viene impilato e regolarmente sottoposto a pratiche agricole al fine di stimolare la degradazione da parte dei microrganismi autoctoni.
Rhizoremediation	Le piante rilasciano essudati che favoriscono la crescita dei microrganismi della rizosfera che a loro volta contribuiscono alla crescita delle piante e alla degradazione dei contaminanti.

3.1. Phytoremediation

Sebbene i primi studi furono condotti già nei primi anni 50 del XX secolo, quando alcuni ricercatori osservarono che le piante semi-acquatiche *Eichhornia crassipes* e *Lemna minor* avevano la capacità di assorbire metalli tossici come Pb, Zn e Cd in acque contaminate, il termine "phytoremediation" fu utilizzato per la prima volta nel 1991 con lo scopo di descrivere un nuovo tipo di tecnologia in grado di sfruttare le caratteristiche fisiologiche delle piante al fine di rimuovere gli agenti inquinanti dal suolo, ma anche dalle acque sotterranee e dalle acque di scarico [Vidali, 2001; Kumar *et al.*, 2011; Sharma e Pandey, 2014]. Da qualche anno a questa parte, la phytoremediation sta attirando l'attenzione non solo dei ricercatori scientifici ma anche da parte degli enti governativi, in quanto lo sviluppo di tali metodi si basa sul bisogno sempre più impellente di ripristinare le matrici ambientali compromesse dalle attività antropiche. Infatti, la contaminazione ambientale pone seri rischi che si ripercuotono anche sulla salute umana: molti inquinanti sono cancerogeni, mutageni, teratogeni e dannosi per il sistema nervoso ed endocrino, in particolar modo nei bambini. Diviene, quindi, di fondamentale importanza intervenire con opere di bonifica, per evitare danni ambientali e alla salute pubblica. I tradizionali metodi fisici e chimici utilizzati per ripristinare le varie matrici, possiedono tuttavia molteplici limitazioni, in quanto essi sono costosi, richiedono un'eccessiva lavorazione e causano alterazioni nelle proprietà del suolo, disturbando la nativa microflora. In opposizione, la phytoremediation grazie all'utilizzo delle piante e ai microrganismi ad esse associati, si propone come una tecnologia recente, dai costi contenuti ed ecosostenibile [Hazrat *et al.*, 2013]. Nonostante presenti alcuni svantaggi (lentezza del processo, la porzione di suolo da trattare è abbastanza superficiale, diverse specie non possono essere piantumate in luoghi fortemente inquinati), essa è tuttavia applicabile a varie tipologie di bonifiche, in quanto non interferisce negativamente con l'ecosistema, anzi conferisce alla zona trattata un certo valore estetico attraverso la copertura vegetale, richiede poco lavoro ed è quindi poco costosa, è applicabile *in situ* e dunque è anche ben accettata dalle comunità residenti. Inoltre, la biomassa raccolta, in seguito al recupero dei contaminanti estratti, può essere utilizzata nel campo delle energie rinnovabili come produzione di biocarburanti, il che rappresenta un punto focale in un periodo storico dove si parla sovente di green economy [Jiang *et al.*, 2015; Tahir *et al.*, 2015].

Nei processi di phytoremediation possono essere utilizzate diverse piante, sia erbacee (ad es. *Thlaspi caerulescens*, *Brassica juncea*, *Helianthus annuus*) che legnose (ad es. *Salix spp*, *Populus spp*), poiché sono in grado di rimuovere, assorbire, o rendere innocui diversi

contaminanti ambientali come i metalli pesanti, i composti organici e i composti radioattivi presenti nel suolo o in acqua [Tahir *et al.*, 2015]. Inoltre, la phytoremediation impedisce l'escavazione dei siti contaminati, riducendo così il rischio di dispersione dei contaminanti e si mostra applicabile per il recupero dei siti in cui sono presenti anche più di un tipo di contaminante [Mudhoo *et al.*, 2010; Tahir *et al.*, 2015]. I meccanismi e l'efficienza della phytoremediation dipendono da diversi fattori come la natura del contaminante, la biodisponibilità e le proprietà del suolo [Cunningham e Ow, 2000], ma anche dalle specie vegetali utilizzate. Le piante ritenute più efficienti nei processi di fitorimediazione sono le cosiddette piante iperaccumulatrici, in quanto presentano determinate caratteristiche che permettono loro di tollerare e, allo stesso tempo, accumulare i metalli presenti nel terreno; di contro, come svantaggio vi è una bassa produzione di biomassa [Van Oosten and Maggio, 2014].

L'applicazione delle tecniche di phytoremediation e il suo mercato non sono ancora particolarmente diffuse in Europa come negli U.S.A., dove i ricavi superarono i 300 milioni di dollari già nel 2007 [Campos *et al.*, 2008]. Questi dati, però, dimostrano chiaramente la validità commerciale della phytoremediation e di fatto fu una delle tecnologie innovative promosse anche dalla Environmental Protection Agency degli Stati Uniti (U.S. EPA) dopo un'attenta valutazione delle prove su campo [U.S. EPA, 2001]. Le applicazioni delle tecniche di phytoremediation sono in aumento negli ultimi anni anche in Europa, perché vengono proposti come metodi alternativi e più economici rispetto alle tecniche tradizionali. Quest'ultimo aspetto fu già evidenziato negli anni passati da diverse analisi economiche [Lasat, 2000] che mostrarono come l'utilizzo di tali tecniche permetteva un notevole risparmio di capitali da impiegare rispetto a quanto richiesto dalle tecnologie convenzionali. In tabella 2 [Glass, 1999; Lasat, 2000] sono mostrati i costi stimati associati con l'uso di tecnologie convenzionali per la bonifica di terreni contaminati da metalli pesanti, ed è possibile notare un netto vantaggio economico a favore di alcune tecniche di phytoremediation come la fitoestrazione.

Tabella 2. Trattamento del suolo: costi [adattata da Glass, 1999; Lasat, 2000].

TRATTAMENTO	COSTI (\$/ton)	FATTORI ADDIZIONALI
Vetrificazione	75-425	Monitoraggio a lungo termine
Messa in discarica	100-500	Trasporto, escavazione, monitoraggio
Trattamenti chimici	100-500	Riciclo dei contaminanti
Elettrocinesi	20-200	Monitoraggio
Fitoestrazione	5-40	Monitoraggio

Anche in Italia diversi studi hanno descritto l'utilizzo delle tecniche di phytoremediation applicate a diversi siti contaminati presenti nelle regioni della nostra penisola (vedi Tab. 3).

Tabella 3. Stato attuale dell'impiego delle tecniche di fitorimediazione in Italia.

AUTORI	TITOLO	SITO	ANNO
Vamerali <i>et al.</i>	Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy)	Torviscosa (Udine)	2009
Baldantoni <i>et al.</i>	Macro- and trace-element concentrations in leaves and roots of <i>Phragmites australis</i> in a volcanic lake in Southern Italy	Napoli	2009
Fontana <i>et al.</i>	Preliminary observations on heavy metal contamination in soils and plants of an abandoned mine in Imperina Valley (Italy)	Imperina (Belluno)	2010
Barbafieri <i>et al.</i>	Uptake of Heavy Metals by Native Species Growing in a Mining Area in Sardinia, Italy: Discovering Native Flora for Phytoremediation	Ingurtosu-Arbus (Sardegna)	2011
Marchiol <i>et al.</i>	A decade of research on phytoremediation in north-east Italy: lessons learned and future directions	Cava del Predil (Udine)	2011
Farrag <i>et al.</i>	Effects of selected soil properties on phytoremediation applicability for heavy-metal-contaminated soils in the Apulia region, Southern Italy	Altamura and Gravina (Bari)	2012
Chiellini <i>et al.</i>	Temporal characterization of bacterial communities in a phytoremediation pilot plant aimed at decontaminating polluted sediments dredged from Leghorn harbor, Italy	Livorno	2013
Leto <i>et al.</i>	Effects of plant species in a horizontal subsurface flow constructed wetland-phytoremediation of treated urban wastewater with <i>Cyperus alternifolius</i> L. and <i>Typha latifolia</i> L. in the West of Sicily (Italy)	Piana degli Albanesi (Palermo)	2013
Andreolli <i>et al.</i>	Endophytic <i>Burkholderia fungorum</i> DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons	Livorno	2013
Badantoni <i>et al.</i>	Different behaviours in phytoremediation capacity of two heavy metal tolerant poplar clones in relation to iron and other trace elements	Salerno	2014
Fumagalli <i>et al.</i>	The rotation of white lupin (<i>Lupinus albus</i> L.) with metal-accumulating plant crops: A strategy to increase the benefits of soil phytoremediation	Ferrara	2014
Vigliotta <i>et al.</i> ,	Effects of heavy metals and chelants on phytoremediation capacity and on rhizobacterial communities of maize	Fisciano (Salerno)	2016
Agnello <i>et al.</i> ,	Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation	Not specified	2016
Fiorentino <i>et al.</i> ,	Giant reed growth and effects on soil biological fertility in assisted phytoremediation of an industrial polluted soil	Bagnoli-Fuorigrotta (Napoli)	2016

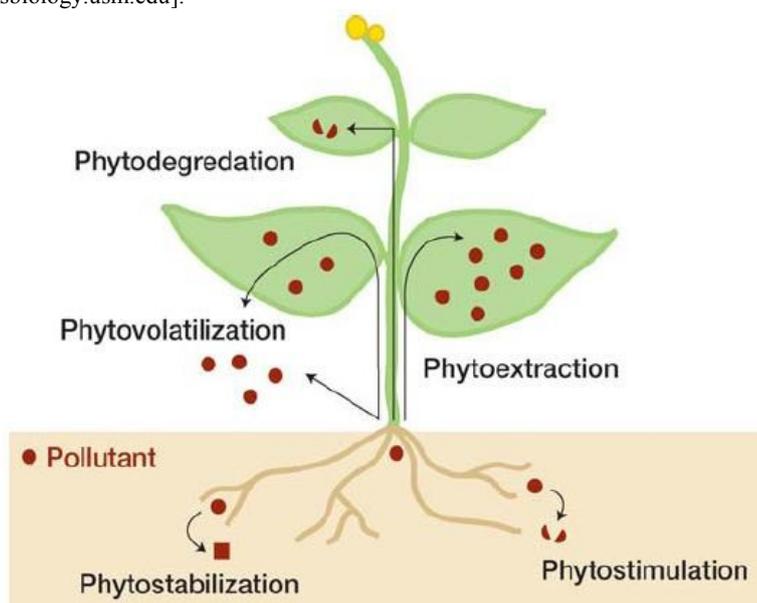
A seconda della natura dei contaminanti, sono diverse le tecniche di phytoremediation a disposizione (Tab. 4; Fig. 2): fitoestrazione, fitostabilizzazione, fitovolatilizzazione,

fitodegradazione, rizofiltrazione, rizodegradazione [Ali *et al.*, 2013; Barcelò e Poschenrieder, 2003]. Da qualche anno, è stata identificata un'altra tecnica, denominata fitodesalinizzazione, che impiega piante alofite per la rimozione dei sali presenti nel suolo favorendo la normale crescita delle piante [Ali *et al.*, 2013].

Tabella 4. Differenti tecniche di phytoremediation [Ali *et al.*, 2013].

TECNICHE	DESCRIZIONE
Phytoextraction	Gli inquinanti vengono assorbiti dalle radici, trasportati e accumulati nei germogli e nelle foglie.
Phytostabilization	Gli inquinanti sono immobilizzati nel sistema radicale così da ridurre la loro mobilità.
Phytovolatilization	Gli inquinanti vengono convertiti in forme meno tossiche e rilasciati in atmosfera.
Phytodegradation	Gli enzimi della pianta degradano i contaminanti organici.
Rhizofiltration	Rimozione delle sostanze inquinanti dalle acque superficiali o dalle acque reflue.
Rhizodegradation	Degradazione degli inquinanti presenti nella rizosfera attraverso l'azione dei microrganismi ivi presenti.
Phytodesalination	Rimozione dei sali da terreni salini attraverso le piante alofite.

Figura 2. Possibili tecniche di phytoremediation e destino dei contaminanti [www.systemsbiology.usm.edu].



3.1.1. Fitoestrazione

La fitoestrazione è una tecnica utilizzata *in situ* per il trattamento dei suoli contaminati [Barcelò and Poschenrieder, 2003; Newman and Reynolds, 2004; Kavamura and Esposito, 2010; Ali *et al.*, 2013; Van Oosten and Maggio, 2014]. Nel processo di fitoestrazione, i contaminanti inorganici vengono assorbiti a livello dell'apparato radicale, trasportati e accumulati nelle parti aeree della pianta come germogli e foglie [Sekara *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2006; Rafati *et al.*, 2011]. Le piante coinvolte in questo processo dovrebbero idealmente avere la capacità di accumulare i contaminanti e produrre un'elevata biomassa. Alcune piante definite come specie iperaccumulatrici (ad esempio *Thlaspi caerulescens*, *Alyssum bertholonii*, *Arabidopsis halleri*) sono in grado di accumulare contaminanti ma, di contro, producono poca biomassa e per questo motivo è preferibile utilizzare delle specie che accumulano meno, ma che producono più biomassa come ad esempio *Brassica spp.*, *Arundo donax*, *Typha spp.* [Barcelò e Poschenrieder, 2003; Fiorentino *et al.*, 2012]. In seguito, la rimozione dei contaminanti avviene con la raccolta delle piante e il processo continua con l'incenerimento e lo smaltimento in discarica. Una specie viene definita iperaccumulatrice quando mostra una capacità di tolleranza a concentrazioni cento volte maggiori rispetto ad altre specie vegetali, a cui si sommano un'elevata capacità di accumulo nelle parti superiori e una buona produzione di biomassa, sebbene quest'ultima caratteristica non si riscontra frequentemente [Brooks *et al.*, 1998]. Di fatto, l'esistenza di queste piante dimostra che esse possiedono naturalmente il potenziale per rimuovere i metalli dai suoli contaminati [Wuana *et al.*, 2010].

I metalli pesanti si presentano come i migliori candidati, tra i contaminanti inorganici, per la rimozione mediante fitoestrazione e vi sono circa 400 piante che mostrano una buona propensione a questo tipo di attività. Il costo relativo all'applicazione della fitoestrazione, è piuttosto basso rispetto ai metodi convenzionali, in quanto: il contaminante viene rimosso definitivamente dal terreno; la quantità di materiale di scarto da smaltire è minore (fino al 95%); in alcuni casi, il contaminante può essere riciclato dalla biomassa vegetale prodotta [EPA, 2000]. L'impiego delle specie iperaccumulatrici, però, è limitato da una crescita lenta, da un apparato radicale superficiale ed una quantità esigua di biomassa che deve essere raccolta e smaltita correttamente. Inoltre, bisogna tener conto di altri due fattori, come la biodisponibilità nella rizosfera e la tolleranza cellulare nei confronti dei vari metalli.

3.1.2. Fitostabilizzazione

La bonifica del suolo mediante fitostabilizzazione avviene grazie all'immobilizzazione dei contaminanti, attraverso assorbimento a livello delle radici, oppure tramite adsorbimento o precipitazione nella rizosfera. Questo processo riduce la mobilità del contaminante, impedendone la migrazione nelle acque sotterranee, oltre che la riduzione della biodisponibilità nella catena alimentare [Barcelò e Poschenrieder, 2003; Ali *et al.*, 2013; Sharma e Pandey, 2014; Van Oosten e Maggio, 2014]. Specie metallo-tolleranti vengono utilizzate per ripristinare la vegetazione in siti contaminati, diminuendo così il potenziale di migrazione degli inquinanti tramite l'erosione del vento e la lisciviazione alle acque sotterranee. La fitostabilizzazione si è dimostrata utile per il trattamento di suoli contaminati da Pb, As, Cd, Cr, Cu e Zn. Il vantaggio di tale metodo consiste nei cambiamenti della composizione chimica del suolo indotti dalla presenza della pianta stessa e tali cambiamenti possono favorire l'assorbimento o causare la precipitazione dei metalli sulle radici della pianta [Zhang *et al.*, 2009]. Inoltre, la presenza delle piante riduce anche l'erosione grazie allo sviluppo dell'apparato radicale. Tuttavia, anche questa tecnologia possiede alcuni svantaggi, come la presenza costante del contaminante nel suolo e l'utilizzo di ampi appezzamenti i quali necessitano di fertilizzazione, motivo per cui viene richiesto un monitoraggio obbligatorio.

3.1.3. Fitovolatilizzazione

Durante il processo di fitovolatilizzazione gli inquinanti vengono assorbiti a livello delle radici e, una volta convertiti in forme meno tossiche in seguito a modificazione metabolica, vengono rilasciati in atmosfera dalle parti aeree della pianta. Gli inquinanti, quindi, (degradati o meno in forme meno tossiche) non vengono rimossi ma bensì trasferiti da un comparto all'altro [Barcelò e Poschenrieder, 2003; Ali *et al.*, 2013; Sharma e Pandey, 2014; Van Oosten e Maggio, 2014] e la diffusione di tali sostanze nel comparto aria può avvenire anche ad opera di altre parti della pianta, in quanto attraversano tutto il corpo del vegetale prima di raggiungere foglie e germogli.

La fitovolatilizzazione può essere applicata per contaminanti presenti nel suolo, nei sedimenti o nell'acqua. Il mercurio è stato il primo metallo per cui tale tecnica è stata applicata, infatti, lo ione mercurio, può essere trasformato in una forma meno tossica e in seguito rilasciato nell'atmosfera. Ciò, però, comporta un alto rischio di reimmissione nell'ambiente di tale metallo; infatti, in seguito ai fenomeni di precipitazione può depositarsi in laghi e oceani formando, a causa all'azione dei batteri anaerobi, il composto

organico metilmercurio [Sharma e Pandey, 2014]. Ultimamente, l'applicazione di tale tecnica è stata verificata anche per composti organici volatili come il tricloroetene e, composti chimici inorganici che possiedono forme volatili, come il selenio e l'arsenico [Van Oosten e Maggio, 2014]. Chiaramente, il maggior vantaggio di tale tecnica consiste nella possibilità che il contaminante possa essere trasformato in una sostanza meno tossica, però, d'altro canto, lo svantaggio di tale applicazione è dato dalla possibilità che la sostanza modificata e ancora potenzialmente tossica, possa essere rilasciata nell'atmosfera e quindi depositarsi nuovamente nell'ambiente.

3.1.4. Fitodegradazione

Durante questo processo i contaminanti organici, in seguito ad assorbimento da parte dell'apparato radicale, vengono degradati grazie all'azione svolta dagli enzimi coinvolti nel metabolismo della pianta, oppure vengono incorporati all'interno dei tessuti vegetali [Barcelò e Poschenrieder, 2003; Trap *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2013; Sharma e Pandey, 2014; Van Oosten e Maggio, 2014]. Gli enzimi coinvolti nel processo di fitodegradazione sono: 1) dealogenasi (trasformazione di composti clorurati); 2) perossidasi (trasformazione di composti fenolici); 3) nitroreduccasi (trasformazione di esplosivi e di altri composti nitrati); 4) nitrilasi (trasformazione di composti aromatici cianati); 5) fosfatasi (trasformazione di pesticidi organofosforici) [Susarla *et al.*, 2002].

Inoltre, un'ulteriore azione viene svolta dai microrganismi presenti nella rizosfera e associati alla pianta, poiché favoriscano la biodegradazione dei contaminanti in composti parzialmente o totalmente non tossici, il che rappresenta rispettivamente il principale svantaggio e vantaggio. È stato dimostrato che la fitodegradazione può essere impiegata nei processi di bonifica di siti contaminati da alcuni contaminanti organici, come solventi clorurati, erbicidi [Bamforth e Singleton, 2005], IPA [Yin *et al.*, 2011], ed oltre ad essere impiegata per la bonifica del suolo, può essere applicata anche per il ripristino delle acque superficiali e sotterranee.

3.1.5. Rizofiltrazione

Mediante rizofiltrazione è possibile ottenere la rimozione di inquinanti organici ed inorganici dalle acque sotterranee, superficiali e dalle acque reflue tramite adsorbimento o precipitazione sulle radici, oppure per assorbimento dei contaminanti che circondano la zona radicale [Zhang *et al.*, 2009]. Possono essere impiegate sia piante terrestri che acquatiche, per applicazioni *in situ* o *ex situ*. Le piante terrestri, però, sono favorite perché

hanno un apparato radicale più sviluppato e fibroso e quindi presentano una maggior superficie di assorbimento. Le piante da poter utilizzare, oltre ad essere metallo tolleranti, devono avere una grande superficie di assorbimento e tollerare l'ipossia (ad es. *Salix spp*, *Populus spp*, *Brassica spp*).

Questa tecnica può essere usata per diversi metalli come Pb, Cd, Cu, Ni, Zn e Cr, poiché vengono trattenuti a livello delle radici, le quali, una volta sature di tali elementi, verranno raccolte. Tra gli svantaggi abbiamo la costante necessità di controllare il pH, una prima coltura in serra e la raccolta periodica nonché lo smaltimento degli impianti [Barcelò e Poschenrieder, 2003; Sharma e Pandey, 2014].

Questa tecnica viene utilizzata anche per la rimozione di elementi radioattivi. Uno dei casi più famosi riguarda i girasoli che sono stati utilizzati con successo per rimuovere i contaminanti radioattivi (cesio e stronzio) dall'acqua di uno stagno a Chernobyl, Ucraina. I ricercatori hanno visto che i girasoli erano stati in grado di accumulare Cs e Sr; il primo nelle radici, il secondo nei germogli [Prasad, 2007].

3.1.6. Rizodegradazione

La rizodegradazione consiste nella biodegradazione dei contaminanti a livello dell'apparato radicale della pianta, la cosiddetta rizosfera. Tale processo, in particolare, avviene ad opera di batteri e funghi (diversi studi hanno dimostrato che il numero di microrganismi nella rizosfera è 100 volte maggiore rispetto al quantitativo presente in superficie), i quali traggono nutrimento dagli essudati radicali della pianta [Barcelò e Poschenrieder, 2003; Gerhardt *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Van Oosten e Maggio, 2014]. I microrganismi sono maggiormente espressi nella rizosfera, per l'appunto, grazie a diverse sostanze nutritive quali zuccheri ed aminoacidi, ma anche enzimi ed altri composti sintetizzati dalla pianta e che ne stimolano la crescita. Le radici, a loro volta, forniscono una maggiore superficie disponibile per la crescita microbica e un quantitativo di ossigeno sufficiente. Tra i vari microrganismi del suolo, i funghi micorrizici sono in grado di interagire con le piante ospiti, costituendo un'associazione simbiotica. L'interazione avviene a livello delle radici della pianta e ci sono due categorie di micorrize, a seconda della localizzazione del fungo: se all'interno del tessuto radicale, endomicorrize, se all'esterno del tessuto radicale, ectomicorrize [Leung *et al.*, 2013]. Questo tipo di associazione è positiva per entrambi gli organismi coinvolti, poiché le piante attraverso le radici trasudano sostanze ricche di carbonio e azoto nella rizosfera e gli enzimi stimolano la proliferazione dei microrganismi stessi [Gerhardt *et al.*, 2009]. Inoltre, questi ultimi in

seguito ai processi metabolici riducono gli inquinanti a composti innocui che, a loro volta, migliorano le caratteristiche del suolo e fungono da nutrienti per le piante. Quindi, la rizodegradazione può essere considerata come un processo che agisce di concerto con la fitorimediazione [Zhuang *et al.*, 2005].

Tale tecnica si è dimostrata particolarmente utile per la bonifica dei suoli contaminati da una vasta gamma di prodotti chimici, compresi gli idrocarburi alifatici e policiclici aromatici (IPA), i solventi clorurati, i pesticidi, i policlorobifenili (PCB), i composti BTEX (benzene, toluene, etilbenzene, xilene). Inoltre, diversi studi [Jing *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2013] sono stati condotti al fine di verificare la capacità degli organismi della rizosfera di assorbire metalli pesanti come Cd, Cu, Pb, Ni, Zn, etc.

Ovviamente, la rizodegradazione, così come gli altri processi di fitorimediazione, presenta vantaggi e svantaggi. Tra i vantaggi [Shimp *et al.*, 1993; Cunningham and Ow, 1996]: è un processo che avviene *in situ*; la traslocazione dei contaminanti all'esterno della pianta è minore rispetto alle altre tecnologie di fitorimediazione; l'installazione e la manutenzione presentano bassi costi. Tra gli svantaggi [Shimp *et al.*, 1993; Cunningham and Ow, 1996]: è un processo che richiede dei lunghi tempi di bonifica ed è efficiente solo sulla contaminazione superficiale (20-25 cm di profondità); la profondità delle radici può essere limitata dalla struttura fisica del suolo; alcune piante potrebbero richiedere l'utilizzo di fertilizzanti.

4. Normativa

Con il passare degli anni, spesso a seguito di alcuni disastri ambientali, l'attenzione per la questione ambientale è aumentata, cercando di costruire un concetto giuridico unitario così da agevolare e promuovere la presa di coscienza riguardante i problemi ecologici con lo scopo di ottenere la risoluzione degli stessi, mediante l'elaborazione di normative ad hoc. In ecologia, con il termine ambiente si indica l'insieme delle matrici ambientali aria, acqua, suolo, ma anche il biota, i beni materiali ed il patrimonio culturale, ovvero l'insieme degli elementi che nella complessità delle loro relazioni costituiscono l'habitat e le condizioni di vita dell'uomo. Invece, a livello giuridico, un concetto di ambiente ritenuto valido e condiviso da più parti lo definisce come l'insieme dei fattori viventi (biotici) e non viventi (abiotici) di un ecosistema. La tutela del patrimonio ambientale deve essere un dovere di tutti i cittadini che va ben oltre i confini nazionali. Quindi, occorre utilizzare strumenti di carattere giuridico nazionale ed internazionale, basati su azioni preventive e collaborative, così da garantire un'adeguata tutela dell'ambiente stesso [www.msengineering.com].

La disciplina giuridica rivolta alla tutela dell'ambiente inizialmente è nata sul piano del diritto internazionale, tanto che si parla, per l'appunto, di diritto internazionale dell'ambiente. Si tratta di una produzione normativa che ha assunto dimensioni significative a partire dalla prima metà degli anni settanta con la Dichiarazione di Stoccolma del 1972, proseguita con la Dichiarazione di Rio de Janeiro del 1992 e che tutt'ora è in espansione. L'attenzione della Comunità Europea verso i problemi della questione ambientale nasce, anche in questo caso, solo intorno ai primi anni settanta e l'alto numero di atti normativi prodotti rende chiara l'idea del peso che ha assunto la produzione normativa comunitaria in materia di tutela ambientale. Nell'ultimo trentennio si contano più di duecento direttive, delle quali circa la metà a contenuto integrativo, modificativo o parzialmente sostitutivo di direttive precedenti. Tra l'altro, le istituzioni comunitarie utilizzano ampiamente la cosiddetta "direttiva dettagliata", quindi, è facile comprendere le difficoltà che si presentano agli ordinamenti nazionali nel recepire tali norme, ed è proprio sul piano del rapporto tra fonti comunitarie e fonti interne che si colloca uno dei nodi centrali della disciplina giuridica a tutela dell'ambiente [Cecchetti, 2006].

4.1. Legislazione ambientale italiana

La normativa attualmente vigente in Italia è rappresentata dal D.Lgs. n. 152 del 3 aprile, 2006 e s.m.i., ovvero il riordino della disciplina nel settore ambientale, nota come "Testo

unico ambientale” o “Codice dell’ambiente”. Il codice è suddiviso in sei parti, nelle quali si dispongono 318 articoli, 45 allegati e una decina di appendici. La parte prima, ovvero i primi tre articoli, contiene le disposizioni comuni, quali l’ambito di applicazione, le finalità ed i criteri per l’adozione dei provvedimenti successivi. Tra le finalità che il nuovo codice si pone, emerge l’articolo 2, il quale testualmente cita che: «la promozione dei livelli di qualità della vita umana, si realizza attraverso la salvaguardia ed il miglioramento delle condizioni dell’ambiente e l’utilizzazione accorta e razionale delle risorse naturali».

La parte seconda, articoli da 4 a 52, disciplina le procedure per la valutazione ambientale strategica, la c.d. V.A.S.; per la valutazione di impatto ambientale, la c.d. V.I.A; e per l’autorizzazione ambientale integrata o I.P.P.C.

La parte terza, che comprende gli articoli da 53 a 176, reca le norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, dei distretti idrografici, di tutela delle acque dall’inquinamento, di tutela dei corpi idrici e disciplina degli scarichi, di gestione delle risorse idriche, del relativo sistema sanzionatorio e degli annessi compiti di vigilanza assegnati agli organi di controllo. Nella parte terza del Testo Unico sono state introdotte anche delle norme sui piani di gestione e sui piani di tutela delle acque, sull’organizzazione del servizio idrico integrato e soprattutto è stata introdotta una nuova definizione di scarico che si discosta notevolmente da quella delineata dalle normative precedenti.

La parte quarta, che include gli articoli da 177 a 266, contiene le disposizioni in materia di gestione dei rifiuti, di gestione degli imballaggi, di bonifica dei siti inquinati, del relativo sistema sanzionatorio e dei connessi compiti di vigilanza assegnati agli organi di controllo. In materia di rifiuti sono state riformulate le definizioni di “sottoprodotto” e di “materie prime secondarie” che non sono più considerate rifiuti. Inoltre nella parte quarta del codice, si ritrova la definizione di “bonifica”, per cui ai sensi dell’articolo 240, per “bonifica” si intende: «l’insieme degli interventi atti ad eliminare in modo definitivo le fonti di inquinamento e le sostanze inquinanti o a ridurre le concentrazioni delle stesse nel suolo, nel sottosuolo e nelle acque sotterranee ad un livello uguale o inferiore ai valori di concentrazione soglia di rischio (CSR)». Quindi un sito, che è definito dal Testo Unico come una porzione di territorio geograficamente definita e determinata, intesa nelle diversi matrici ambientali (suolo, sottosuolo, acque superficiali e sotterranee), non è contaminato quando la contaminazione delle matrici ambientali risulti inferiore ai valori delle concentrazioni soglia di contaminazione (CSC) oppure, se superiori, risulti comunque inferiore ai valori di concentrazione soglia di rischio (CSR). Con la stesura del Testo Unico, inoltre, sono state definite le procedure specifiche per gli interventi nei siti, con

attività in esercizio, per cui è possibile effettuare una messa in sicurezza operativa in attesa dell'intervento di bonifica che sarà effettuato al momento della cessazione dell'attività stessa.

La parte quinta, articoli da 267 a 298, invece, reca le norme in materia di tutela dell'aria, di riduzione delle emissioni in atmosfera, di impianti termici civili, di combustibili, del relativo sistema sanzionatorio e dei connessi compiti di vigilanza assegnati agli organi di controllo. Il Testo Unico conferma le definizioni di inquinamento atmosferico e di emissione e rinnova, invece, la definizione di impianto. Conseguentemente, ai sensi dell'articolo 268 per "inquinamento atmosferico" si intende ogni modificazione dell'aria atmosferica, dovuta all'introduzione nella stessa di una o più sostanze in quantità e caratteristiche tali da ledere o da costituire un pericolo per la salute umana o per la qualità dell'ambiente oppure tali da ledere i beni materiali o compromettere gli usi legittimi dell'ambiente; per "emissione", invece, si intende qualsiasi sostanza solida, liquida o gassosa introdotta nell'atmosfera che possa causare inquinamento atmosferico; per "impianto", infine, si intende il macchinario o il sistema o l'insieme di macchinari o sistemi costituito da una struttura fissa e dotato di autonomia funzionale in quanto destinato ad una specifica attività; la specifica attività a cui è destinato l'impianto può costituire la fase di un ciclo produttivo più ampio.

La parte sesta, articoli da 299 a 318, infine, contiene le norme in materia di tutela risarcitoria contro i danni ambientali, di prevenzione e ripristino ambientale e di risarcimento del danno ambientale. Tra le varie novità introdotte dal Testo Unico si evidenzia la nuova definizione di danno ambientale. Ai sensi dell'articolo 300, per "danno ambientale" si intende qualsiasi deterioramento significativo e misurabile, diretto o indiretto, di una risorsa naturale o dell'utilità assicurata da quest'ultima. Costituisce danno ambientale anche il deterioramento, in confronto alle condizioni originarie, provocato alle specie e agli habitat naturali protetti dalla normativa nazionale e comunitaria; alle acque interne, alle acque costiere e alle acque ricomprese nel mare territoriale mediante azioni che incidano in modo significativamente negativo sullo stato ecologico, chimico e/o quantitativo delle acque interessate; al terreno, mediante qualsiasi contaminazione che crei un rischio significativo di effetti nocivi, anche indiretti, sulla salute umana a seguito della introduzione nel suolo o nel sottosuolo di sostanze, preparati, organismi o microrganismi nocivi per l'ambiente.

Tra le tante e varie disposizioni contenute all'interno del Testo Unico, però, sono stati segnalati anche diversi punti critici, poiché si rinvencono errori grossolani nella struttura

del testo: ad esempio, l'istituzione di una sorta di "condono" che paradossalmente costituisce una sorta di incentivo all'inquinamento, in quanto si stabilisce che, ai sensi dell'articolo 257, comma 4, «l'inquinatore, se bonifica il sito, non è più punibile per aver provocato l'inquinamento e per tutti gli altri reati ambientali connessi con il medesimo evento»; o ancora, secondo quanto disposto nell'articolo 311, soltanto allo Stato è riconosciuta la legittimazione esclusiva alla richiesta del risarcimento del danno ambientale e non più anche alle Regioni ed agli enti locali, i quali, ai sensi dell'articolo 309 possono limitarsi a presentare denunce e osservazioni nei procedimenti relativi all'adozione delle misure di prevenzione, precauzione o ripristino e possono, al massimo, sollecitare l'intervento statale a tutela dell'ambiente [Cerofolini, 2006].

4.1.1. I siti di interesse nazionale

La presenza di siti contaminati è una problematica comune a tutti i paesi industrializzati e trae origine dalla presenza di attività antropiche che possono determinare fenomeni di contaminazione locale del suolo per sversamenti, perdite di impianti/serbatoi o non corretta gestione dei rifiuti. In Italia, i fenomeni di contaminazione puntuale, ovvero in corrispondenza di sorgenti di contaminazione note, sono riconducibili principalmente alle industrie legate alla raffinazione di prodotti petroliferi, all'attività mineraria, all'industria chimica, a quella metallurgica, alla presenza di manufatti in amianto e ad alcune attività di gestione dei rifiuti [Sestili, 2014]. I siti fortemente contaminati, classificati pericolosi dallo Stato Italiano (D.Lgs 22/97; DM 471/99; D.Lgs 152/2006 e s.m.i.), sono stati inseriti nella lista dei Siti di Interesse Nazionale o SIN. Con l'art. 36 bis della Legge 134/2012, si è provveduto alla razionalizzazione dei criteri di individuazione dei SIN; in accordo a tale modifica normativa, la presenza attuale e/o pregressa di raffinerie, acciaierie e impianti chimici integrati è condizione necessaria affinché un sito possa essere identificato di interesse nazionale. Sulla base di tali criteri è stata effettuata una ricognizione dei 57 siti già classificati di interesse nazionale e, con il DM 11/1/2013, il numero dei SIN è stato ridotto a 39. La competenza amministrativa dei 18 siti che non soddisfano i nuovi criteri è tornata alle regioni. Oltre ai SIN, esistono poi circa 4.000 siti contaminati e circa 15.000 siti potenzialmente contaminati di competenza regionale che, sulla base della normativa vigente, dovrebbero essere inseriti in apposite "Anagrafe regionale dei siti da bonificare" [Sestili, 2014].

5. MATERIALI E METODI

5.1. Profilo degli organismi utilizzati

5.1.1. *Trichoderma harzianum*

T. harzianum è già stato utilizzato in diversi processi di biorisanamento in cui ha mostrato risultati incoraggianti [Fiorentino *et al.*, 2012; Zafra e Cortès-Espinosa, 2015]. È un fungo filamentoso endofitico (capace cioè di inserirsi nelle piante parassitate mediante l'apparato radicale e successiva diffusione ifale nel tessuto vascolare) ben adattato alle zone temperate, comunemente presente nella rizosfera e in grado di stabilire una simbiosi di tipo mutualistico con la porzione ipogea delle piante. *T. harzianum* esplica il compito di agente di controllo biologico in quanto limita fortemente l'eventuale crescita di funghi patogeni [Mollea *et al.*, 2005; Fiorentino *et al.*, 2012], contribuendo alla stabilità delle comunità microbiche presenti nella rizosfera [Benitez *et al.*, 2004] e, inoltre, stimola la crescita di altri gruppi fungini, naturalmente presenti nel suolo, in grado di degradare i contaminanti di origine organica [Matsubara *et al.*, 2006]. Di conseguenza, migliora la salute e lo sviluppo dell'apparato radicale e quindi dell'intera pianta [Fiorentino *et al.*, 2012]. Inoltre, si è dimostrato capace di degradare o tollerare una vasta gamma di inquinanti ambientali (idrocarburi, metalli, rifiuti cellulosici etc.) e ciò aumenta notevolmente l'efficacia delle piante utilizzate per i processi di fitorisanamento [Harman *et al.*, 2004; Fiorentino *et al.*, 2012].

Per questo progetto è stato utilizzato un bioregolatore commerciale, il Trianum-P prodotto dalla Koppert BV-Olanda, a base di spore di *Trichoderma harzianum* T22 (1×10^9 CFU per grammo di peso secco). La Koppert BV certifica che il Trianum-P non contiene sostanze chimiche nocive elencate nell'articolo I della direttiva CE 67/548 rendendo quindi il prodotto idoneo alla nostra sperimentazione. Il ceppo T22 si adatta molto bene a diverse condizioni, infatti tollera sia i terreni acidi che basici, sia quelli argillosi che sabbiosi e sia quelli ricchi di sostanze nutritive che quelli più poveri [Harman *et al.*, 2004].

5.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Appartenente al genere *Saccharomyces*, è uno dei microrganismi eucarioti più studiati in biologia cellulare e molecolare ed è uno dei maggiori microrganismi naturalmente presenti nel suolo. Alcuni studi [Kapoor e Viraraghavan 1997; Wang e Chen 2009; Machado *et al.*, 2010] hanno messo in luce la capacità di *S. cerevisiae* di assorbire e rimuovere diversi metalli pesanti presenti in soluzioni acquose, ma al contempo meno informazioni sono

disponibili per quanto riguarda l'eventuale capacità degradativa nei confronti di composti organici come gli IPA. La crescente attenzione del mondo scientifico è spiegata dalla facilità di coltivazione su larga scala, infatti, il lievito può essere agevolmente coltivato mediante basilari tecniche di fermentazione, con un'elevata resa di biomassa. Inoltre, grandi quantità di biomassa possono essere ottenute anche dalla lavorazione industriale, considerato che si configura come scarto facilmente gestibile rispetto ad altri microrganismi [Kapoor e Viraraghavan 1995]. *S. cerevisiae* è ben conosciuto ed è considerato un microrganismo sicuro, dunque, un eventuale impiego in azioni di biorisanamento verrebbe accettato facilmente dalle istituzioni e dall'opinione pubblica. Infine, secondo uno studio condotto da Wang e Chen [2006], *S. cerevisiae* si è dimostrato un ottimo modello per identificare i meccanismi coinvolti nel processo di bioassorbimento degli ioni metallici e, in particolare, per studiare le interazioni metallo-microrganismo a livello molecolare.

Il ceppo di *S. cerevisiae* BCA 61 impiegato per la realizzazione di questo progetto è stato gentilmente fornito dalla raccolta del Di3A (Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente) dell'Università degli Studi di Catania.

5.1.3. *Wickerhamomyces anomalus*

Conosciuto precedentemente come *Hansenula anomala* e *Pichia anomala*, *W. anomalus* è un lievito anch'esso appartenente alla famiglia dei *Saccharomycetes* con un ampio potenziale biotecnologico. Viene utilizzato tradizionalmente nel settore agro-alimentare come agente di bioconservazione, in quanto si è rivelato adatto per migliorare la sicurezza e la qualità degli alimenti [Cappelli *et al.*, 2014]. L'idoneità di *W. anomalus* come agente adatto alla bioconservazione è stata certificata dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), con l'attribuzione della "qualified presumption of safety status at level 1" (QPS-1). *W. anomalus* è altamente tollerante allo stress ambientale, infatti è in grado di svilupparsi anche a fronte di condizioni variabili di temperatura (3-37° C), pH (2-12) ed osmolarità. Tale robustezza rende questo lievito altamente competitivo in molti ambienti diversi. Un ulteriore ed importante carattere aggiuntivo mostrato da *W. anomalus* consiste in un ampio spettro di attività antimicrobica (caratteristica alquanto insolita nei lieviti), essendo attivo contro una varietà di microrganismi compresi altri lieviti, funghi filamentosi e batteri [Cappelli *et al.*, 2014].

Il ceppo di *W. anomalus* BS 91 utilizzato per la realizzazione di questo progetto è stato gentilmente fornito dalla raccolta del Di3A (Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente) dell'Università degli Studi di Catania.

5.1.4. *Arundo donax*

Tra le specie a rapido accrescimento da poter utilizzare nei processi di fitorimediazione, *Arundo donax* (conosciuta come canna comune o canna domestica) sembra essere una delle più interessanti. Si estende dal bacino del Mediterraneo al Medio Oriente fino all'India, ma la si può ritrovare sia coltivata che naturalizzata anche nelle regioni temperate e subtropicali. Rispetto alle specie annuali, le colture erbacee perenni come *Arundo* presentano importanti vantaggi energetici, permettendo di ammortizzare i costi d'impianto lungo l'intera durata della coltivazione, che può superare persino i 20 anni. È una specie che necessita di ben poche lavorazioni del terreno, ed inoltre, presenta un'intensa copertura del suolo e resistenza alla trazione delle radici; tutto ciò la rende capace di incrementare la sostanza organica del suolo e di ridurre i processi erosivi [Fiorentino *et al.*, 2012]. *A. donax*, presenta anche una bassa esigenza di elementi nutritivi, alta resistenza a patogeni/parassiti, a stress idrici e termici, essendo infatti in grado di adattarsi ad ambienti molto poco ospitali e marginali come i substrati a forte concentrazione salina o fortemente inquinati. Da qualche anno, diversi studi [Guo e Miao, 2010; Mirza *et al.*, 2011; Fiorentino *et al.*, 2012] hanno evidenziato le capacità di utilizzo di *A. donax* per il risanamento o la decontaminazione ambientale di siti fortemente inquinati da metalli pesanti o sostanze organiche mediante assorbimento, stabilizzazione e degradazione, proponendosi come soluzione efficace e sostenibile sia da un punto di vista economico che ambientale. Inoltre, *A. donax* presenta il vantaggio di non essere appetita dagli animali evitando di conseguenza la diffusione di eventuali sostanze tossiche e persistenti all'interno della catena alimentare. I ricercatori Guo e Miao [2010] hanno osservato come *A. donax* possieda una forte tolleranza nei confronti dei metalli pesanti, ed in presenza di forti concentrazioni di cadmio e nichel non sono stati osservati effetti depressivi a carico del tasso fotosintetico e della crescita della pianta, così come di altri importanti parametri fisiologici quali conduttanza stomatica, concentrazione intercellulare di CO₂, resistenza stomatica, contenuto e fluorescenza della clorofilla. Mirza *et al.*, [2011] hanno realizzato uno studio con lo scopo di valutare l'eventuale capacità di *A. donax* di poter essere impiegata nei processi di fitorimediazione per il recupero di suoli contaminati con l'arsenico. Attraverso il processo di fitoestrazione, *A. donax* ha evidenziato un buon grado di assorbimento del metallo a

livello del rizoma al fine di traslocarlo fino alle parti superiori (germogli e foglie) della pianta; inoltre, oltre al processo di bioaccumulo, è stato evidenziato anche un buon tasso di volatilizzazione (7.2-22%) raggiunto mediante il cosiddetto processo di fitovolatilizzazione [Fiorentino *et al.*, 2012]. Questi sono solo alcuni esempi dell'applicabilità di *A. donax* che, quindi, si propone come una possibile specie idonea ai diversi processi di fitorimediazione, soddisfacendo tutti i requisiti necessari per la realizzazione di tale processo in quanto:

- è una specie a rapidissima crescita, tra le migliori al mondo e, di conseguenza, in grado di produrre una notevole quantità di biomassa (fino a 40-50 t ha⁻¹);
- non necessita di particolari cure colturali;
- si adatta a quasi tutti i tipi di suolo;
- impedisce il pascolamento degli animali, essendo una specie non pabulare ed assicura una fitta copertura [Fiorentino *et al.*, 2012].

I rizomi di *A. donax* (clone Fiumefreddo) utilizzati per la realizzazione di questo progetto sono stati gentilmente forniti dall'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania.

5.2. Piano sperimentale

Il seguente progetto di ricerca si è sviluppato durante i tre anni di corso previsti dal XXIX ciclo di dottorato di ricerca in Scienze Geologiche, Biologiche e Ambientali. Il primo anno è stato impegnato da una prima fase di ricerca bibliografica e revisione di articoli internazionali e nazionali pertinenti all'argomento proposto, così da procedere alla messa a punto del metodo e di seguito all'inizio della prima fase sperimentale. Dopo un'attenta valutazione delle prove preliminari, le specie dei microrganismi oggetto di studio, come anticipato nel paragrafo precedente, sono state:

- *Saccharomyces cerevisiae* ceppo BCA 61;
- *Wicherhamomyces anomalus* ceppo BS 91;
- *Trichoderma harzianum* ceppo T22.

Il secondo anno ha visto la conclusione delle prove *in vitro* riguardanti l'esposizione dei microrganismi selezionati a 9 metalli pesanti (Ni, Cd, Cu, V, As, Pb, Cr, Zn, Hg) e ai 16 IPA definiti prioritari dalla US EPA: naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene.

L'eventuale dimostrata capacità di micorimediazione di *S. cerevisiae* e di *W. anomalus* è stata confrontata con quella del più noto ed utilizzato *T. harzianum*, che ha rappresentato, nella prima parte del progetto, l'organismo di riferimento e di confronto. Quindi, la capacità bioaccumulatrice nei confronti dei metalli pesanti e la capacità biodegradativa nei confronti degli IPA è stata inizialmente verificata grazie alla pratica in laboratorio, tramite l'esposizione controllata delle singole specie selezionate a concentrazioni crescenti dei singoli metalli e al mix di IPA oggetto dello studio. Le dosi di esposizione, per entrambe le tipologie di inquinanti, sono state stabilite rapportandole ai limiti di legge esposti nella tabella 1 dell'allegato 5, Titolo V, Parte IV del D.Lgs. n. 152/2006, recante i limiti in base alla destinazione dei siti, ovvero: uso verde pubblico, privato e residenziale e, uso commerciale e industriale. Le concentrazioni prese in esame nel presente progetto di ricerca si riferiscono a quest'ultima categoria.

Infine, durante il terzo anno, presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania sono state effettuate le prove in coltura controllata in serra di *A. donax* con e senza l'assistenza del microrganismo ritenuto più idoneo a tale processo (*T. harzianum*), così da valutare la capacità di fitorimediazione della pianta con e senza il microrganismo associato ad essa. A tal proposito, bisogna precisare che quando al suolo vengono aggiunti compost, agenti chelanti o, come in questo caso, microrganismi, il processo di fitorimediazione viene definito assistito e il genere *Trichoderma*, come già documentato da alcuni studi [Kos *et al.*, 2003; Matsubara *et al.*, 2006; Guo e Miao, 2010; Fiorentino *et al.*, 2012; Zafra e Cortès-Espinosa, 2015], sembra possedere la capacità di accumulare e metabolizzare rispettivamente alcuni contaminanti inorganici ed organici così da aumentare la capacità fitoestrattiva delle piante.

La determinazione della concentrazione dei metalli pesanti sia nelle prove *in vitro* che *in vivo* per gli organismi utilizzati è stata effettuata mediante tecnica ICP-MS; per quanto riguarda la determinazione degli IPA mediante tecnica HPLC UV/FL. Inoltre, è stata effettuata la valutazione ecotossicologica mediante saggio al *Vibrio fischeri* del suolo prima e dopo la contaminazione da metalli pesanti e da IPA, sia per i campioni in cui è stata effettuata la messa a dimora di *A. donax* che per i campioni in cui la pianta è stata micorrizzata con *T. harzianum*.

5.3. Prove di esposizione *in vitro* dei metalli pesanti nei confronti di *T. harzianum*, *S. cerevisiae* e *W. anomalus*

5.3.1. Approccio microbiologico

I tre microrganismi impiegati per le prove microbiologiche (*T. harzianum* T22, *S. cerevisiae* BCA61 e *W. anomalus* BS91) sono stati ritenuti idonei alla sperimentazione poiché non considerati fonti di rischio biologico. Il primo passo sperimentale consiste nella preparazione del terreno di coltura microbiologico idoneo alla crescita delle specie oggetto di sperimentazione. Sulla scorta dei risultati ottenuti dai primi esperimenti pilota, è stato scelto il MEB (Malt Extract Broth) prodotto dalla OXOID[®] - Regno Unito, a base di estratto di malto e peptone micologico, per la coltura di *S. cerevisiae* e *W. anomalus*, ed il PDB (Potato Dextrose Broth) prodotto dalla Sigma-Aldrich[®] - USA, a base di infuso di patata e destrosio, per la coltura di *T. harzianum*. I terreni di coltura, dopo ogni preparazione, sono stati sterilizzati in autoclave ad una temperatura di 121°C per 20 minuti e, una volta raffreddati, sono stati fortificati con i rispettivi metalli (Fig.3).

Figura 3. Terreni di coltura post-sterilizzazione, fortificati e pronti all'inoculo del microrganismo



La fortificazione, tenendo conto dei limiti di legge riportati sul D.Lgs 152/06, è stata eseguita prima dell'inoculo del microrganismo; inizialmente sono stati presi in considerazione solo due livelli di concentrazione di esposizione per ogni singolo metallo (limite di legge, >50% limite di legge), ma dopo il primo anno di sperimentazioni si è deciso di continuare le prove con quattro differenti concentrazioni di esposizione per comprendere meglio il meccanismo di estrazione e poter identificare, se esiste, una dose soglia di saturazione oppure di tossicità. Come mostrato in Tabella 5, quindi, i limiti di legge sono stati riadattati così da riprodurre in laboratorio quattro possibili variabili di

un'ipotetica condizione di inquinamento del suolo in seguito ad esposizione ai metalli pesanti.

Tabella 5. Valori di concentrazioni dei singoli metalli pesanti, tenendo conto dei limiti di legge imposti dal D.Lgs 152/06 (tabella 1, colonne A e B, Allegato 5, Titolo V, Parte IV D.Lgs. n. 152/2006).

Metallo	<20% L.I.* (mg/Kg)	Limite di legge (mg/Kg)	>50% L.I.* (mg/Kg)	>75% L.I.* (mg/Kg)
Ni	400	500	750	875
Cd	12	15	22.5	26.5
Cu	480	600	900	1050
V	200	250	375	437.5
As	40	50	75	87.5
Pb	800	1000	1500	1750
Cr totale	640	800	1200	1400
Zn	1200	1500	2250	2625
Hg	3.5	5	7.5	8.75

*L.I. Limite di legge D.Lgs 152/06

Per ciascun microrganismo, quindi, sono state effettuate tre repliche rispetto ad un controllo per ogni dose di esposizione al singolo metallo, per un totale di 432 campioni.

Nello specifico, per l'arrangiamento delle colture sono stati utilizzati:

- nitrato di nichel esaidrato, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$;
- cloruro di cadmio, CdCl_2 ;
- cloruro di rame diidrato, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$;
- metavanadiato di sodio, NaVO_3 ;
- triossido di arsenico, As_2O_3 ;
- nitrato di piombo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$;
- cloruro di cromo esaidrato, $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$;
- cloruro di zinco, ZnCl_2 ;
- acetato di mercurio, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$.

Per una buona riuscita della preparazione dei brodi di coltura, il pH (previa aggiunta del sale) doveva attestarsi a un valore di $5,4 \pm 0,2$ a 25°C (come indicato anche nella scheda tecnica del fornitore); il valore è stato rispettato ottenendo di fatto un pH di circa 5,20. Ulteriore fondamentale controllo ai fini sperimentali è stata la valutazione analitica dell'eventuale precipitazione del metallo testato aggiunto ai terreni e le prove condotte hanno dato conferma che tutti i metalli impiegati non tendono a precipitare. Inoltre, ulteriore condizione fondamentale era che in seguito all'aggiunta dello specifico metallo ad

ogni brodo di coltura, il pH di quest'ultimo non mostrasse eccessiva acidità ($< 3,5$) impedendo di conseguenza la crescita del microrganismo. Una volta pronto, 20 ml di ciascun brodo di coltura sono stati versati in provette BD Falcon[®] da 50 ml al quale poi è seguito l'inoculo dei rispettivi microrganismi. Per *S. cerevisiae* e *W. anomalus* è stata precedentemente preparata una soluzione McFarland in seguito aggiunta al rispettivo brodo di coltura così da ottenere una coltura da 10^8 CFU; diversamente, per *T. harzianum* è stato prelevato un quantitativo appropriato di spore dalla confezione originale, in modo da ottenere anche in questo caso una coltura da 10^8 CFU. All'inoculo è seguita l'incubazione in termostato sotto agitazione a 26°C per 96 ore. A fine incubazione, una volta accertata la crescita dei rispettivi microrganismi, le colture poste in provetta sono state centrifugate a 4400 giri per 12 minuti. Eliminato il surnatante, è stato eseguito il risciacquo del pellet con acqua ultrapura bidistillata Milli Q, in modo da eliminare l'eventuale metallo non assorbito dai microrganismi in questione. Proseguendo, il pellet contenuto in ogni provetta è stato posto in stufa a 95°C per 4 ore, fino a completa essiccazione e dopo di che, mediante bilancia analitica è stato rilevato il peso secco di ogni microrganismo sviluppatosi.

5.3.2. Approccio chimico

I campioni ottenuti sono stati sottoposti al cosiddetto processo di mineralizzazione mediante il quale è possibile "digerire" la parte organica della matrice complessa per determinare la concentrazione dell'eventuale metallo assorbito dai nostri microrganismi. La tecnica utilizzata per tutti i metalli ad esclusione del Hg è comunemente denominata mineralizzazione in vaso aperto ed è stata eseguita mediante DigiPrep Jr prodotto dalla SCP Science, USA (Fig. 4). Ad ogni campione contenuto nelle provette sono stati aggiunti 5 ml di HNO₃ al 65% e 1 ml di H₂O₂ al 30%; successivamente le provette, previo leggero svitamento del tappo, sono state poste negli appositi alloggi per 30 minuti ad una temperatura di 80°C.

Figura 4. Mineralizzatore DigiPrep Jr - SCP Science, USA.



Per quanto concerne i campioni contenenti il Hg, è stato effettuato il processo di mineralizzazione in vaso chiuso mediante l'utilizzo di un Microwave Digestion System Start D della Milestone Inc., USA (Fig.5); ciò è reso necessario in quanto il Hg è l'unico metallo naturalmente presente allo stato liquido e questa condizione lo rende fortemente volatile già a basse temperature. A tal proposito il digestore in vaso chiuso prevede l'utilizzo di appositi contenitori in PTFE (politetrafluoroetilene) dove allocare il campione, al quale anche in questo caso vengono aggiunti 5 ml di HNO₃ al 65% e 1 ml di H₂O₂ al 30% e, che seguirà un preciso programma termico. Terminato il ciclo di mineralizzazione, i contenitori vengono lasciati raffreddare a temperatura ambiente per una notte così da non perdere l'eventuale metallo presente attraverso i vapori formatisi durante il processo.

Figura 5. Microwave Digestion System Start D - Milestone, USA.



Eseguiti i processi di mineralizzazione (sia in vaso aperto che chiuso) ogni campione digerito è stato portato a volume con acqua ultrapura MilliQ® e sottoposto a filtrazione, onde eliminare eventuali residui della matrice organica, utilizzando filtri in nitrocellulosa da 0.45 µm. Ai campioni, opportunamente diluiti, è stato aggiunto secondo procedura strumentale, lo Standard Interno (Ittrio e Renio), così da poter eseguire la determinazione dei metalli pesanti mediante ICP-MS Elan DRCe - Perkin Elmer, USA (Fig. 6), secondo metodologia EPA 6020 B-2014, previa taratura a 7 punti avente campo di misura da 0.5 µg/L a 100 µg/L. Inoltre, sono state effettuate le prove di recupero per ogni analita ottenendo valori di recupero tra l'80 e il 120% e, la determinazione del limite di rilevabilità strumentale MDL o LOD (rispettivamente method detection limit e limit of detection) per ogni metallo per ogni specie con un range di valori compresi tra 0.008-0.015 mg/g.

Figura 6. ICP-MS Elan DRCe - Perkin Elmer, USA.



La tecnica ICP-MS è una tipologia di spettrometria di massa altamente sensibile e in grado di effettuare determinazioni di tipo quali-quantitativo su molteplici sostanze inorganiche, metalliche e non metalliche, presenti anche in concentrazioni inferiori a una parte per trilione. In ICP-MS, il plasma è utilizzato per atomizzare e ionizzare gli atomi del campione. Gli ioni ottenuti vengono fatti passare attraverso un sistema di aperture (coni) nell'analizzatore di massa, nell'ambito di un sistema che lavora sotto vuoto. Gli isotopi degli elementi vengono identificati in base al rapporto massa/carica (m/z) tramite un

analizzatore a quadrupolo e l'intensità di ogni picco è proporzionale alla quantità del particolare isotopo dell'elemento nel campione.

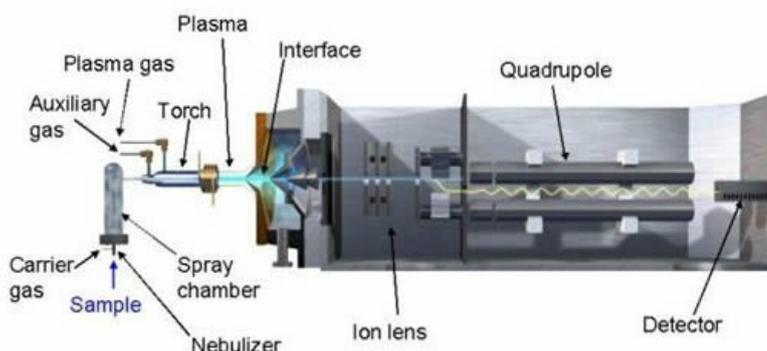
In sequenza sono riportate le componenti fondamentali del macchinario e i vari processi dell'analisi mediante ICP-MS:

- **Ionizzazione.** Una bobina di metallo, alimentata da un generatore di radiofrequenze (RF), genera un intenso campo magnetico. Nel centro di questo avvolgimento è posta la torcia che consiste di 3 tubi concentrici, in quarzo, che contengono 3 flussi separati di Ar. Il plasma è indotto dal flusso di Ar. Il campione, introdotto come fine aerosol o gas, viene trasportato attraverso il tubo più interno.

- **Torcia.** La torcia dell'ICP-MS è costruita in modo tale da permettere l'iniezione del campione direttamente nel cuore del plasma, dove esso collide con elettroni liberi, atomi di Ar e ioni Ar^+ subendo i processi di atomizzazione e ionizzazione. Gli ioni che si formano sono prevalentemente monovalenti (M^+) anche se possono formarsi specie M^{++} . Inoltre nel plasma alcuni di questi ioni possono ricombinarsi con altre specie producendo specie molecolari stabili (es. MAr^+ , MO^+ , ecc.), molte delle quali, essendo cariche positivamente, potrebbero essere trasmesse all'analizzatore di massa insieme agli ioni M^+ e M^{++} . Ai fini dell'analisi si preferisce avere la forma monocationica M^+ , pertanto si scelgono le condizioni sperimentali che ne aumentino la produzione a scapito delle altre.

- **Coni, lenti e campionamento degli ioni.** La zona critica dello strumento è quella dell'interfaccia tra il plasma, che opera a pressione ambiente, e lo spettrometro di massa, che necessita di alto vuoto (circa 10^{-7} mBa). L'interfaccia consiste di due coni con la punta rivolta verso il plasma, il sampler cone (cono di campionamento) più prossimo al plasma e lo skimmer cone (cono di scrematura) localizzato qualche millimetro dietro il sampler (Fig. 7).

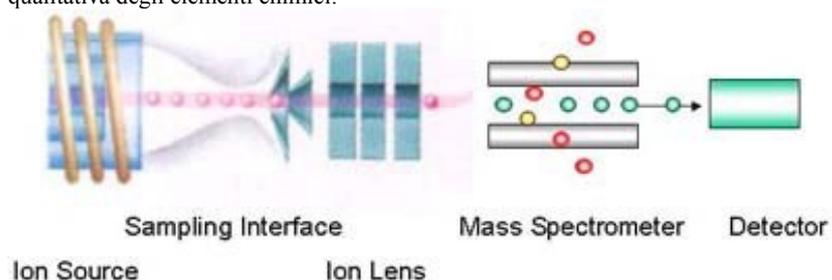
Figura 7. Sezione dell'interfaccia tra la torcia e il quadrupolo.



Subito dietro ai coni, il sistema di lenti focalizza gli ioni verso la regione del quadrupolo, attraverso il passaggio in un cilindro metallico carico che agisce da lente focalizzatrice; infatti dal momento che la carica della lente è la stessa degli ioni, essi sono respinti indietro andando a formare un fascio di ioni definito.

- **Quadrupolo e separazione degli ioni.** Lo spettrometro di massa separa i singoli ioni carichi in base alla massa, agendo come un filtro. Il quadrupolo consiste di quattro barre orizzontali parallele che vanno a delimitare uno spazio a sezione quadrata; alle coppie agli antipodi vengono applicate correnti continue di segno opposto. Questo campo elettrico fa muovere gli ioni, consentendo solo a quelli di una data massa di attraversare l'intero quadrupolo e giungere al rivelatore. Il quadrupolo, quindi, smista gli ioni sulla base del rapporto massa-carica.

Figura 8. Passaggi fondamentali che permettono di compiere l'analisi quantitativa e qualitativa degli elementi chimici.



- **Detector.** Gli ioni provenienti dallo spettrometro di massa colpiscono la superficie attiva del detector, generando un segnale elettronico misurabile. Tale superficie attiva, costituita da un dinodo, emette un elettrone ogni volta che risulta colpita da uno ione dando così vita ad un segnale amplificato; l'elettrone rilasciato dal primo dinodo colpisce il secondo che a sua volta emette più elettroni. La cascata di elettroni continua fin quando non si ottiene un impulso misurabile.

Ottenuti i valori delle concentrazioni per ognuno dei metalli oggetto di studio, è stato necessario convertire in mg/g il valore ottenuto dall'analisi all'ICP-MS, espresso in µg/L. A tal fine, il valore strumentale è stato moltiplicato per il prodotto del volume del campione mineralizzato (espresso in litri) e dell'eventuale fattore di diluizione (adimensionale), e diviso per il peso a secco del pellet (espresso in g).

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \cdot L \cdot \frac{1}{g} \cdot \frac{1}{1000} = \frac{\text{mg}}{g}$$

5.4. Prove di esposizione *in vitro* degli IPA nei confronti di *T. harzianum*, *S. cerevisiae* e *W. anomalus*

5.4.1. Approccio microbiologico

Per quanto concerne le prove di esposizione dei tre microrganismi agli IPA, anche in questo caso sono stati utilizzati i due terreni di coltura scelti in precedenza (MEB e PDB). Il protocollo di preparazione è stato eseguito come descritto nel *paragrafo 5.3.1.* ma chiaramente, in questo caso, i terreni sono stati fortificati mediante aggiunta dei 16 IPA prioritari. Una volta pronti, 20 ml di ciascun brodo di coltura sono stati versati in provette BD Falcon® da 50 ml alle quali poi è seguito l'inoculo dei rispettivi microrganismi (10^8 CFU per *T. harzianum*, *S. cerevisiae* e *W. anomalus*). Per la fortificazione dei campioni con i relativi IPA, sono state preparate due diverse concentrazioni di esposizione, utilizzando lo standard NIST 1647e (National Institute of Standards and Technologies, U.S.A.): la prima, utilizzando lo standard tal quale e, la seconda 1,5 volte lo standard tal quale (Tab. 6).

Tabella 6. Valori di concentrazione degli IPA dello standard mix NIST 1647e.

Standard NIST 1647e	Concentrazione 1 (µg/ml)	Concentrazione 2 (µg/ml)
Naphthalene	19,85	29,76
Acenaphthylene	15,34	23,01
Acenaphthene	20,50	30,75
Fluorene	4,74	7,11
Phenanthrene	3,52	5,28
Anthracene	0,79	1,18
Fluoranthene	7,58	11,37
Pyrene	8,47	12,71
Benzo(a)Anthracene	4,09	6,14
Chrysene	3,6	5,4
Benzo(b)Fluoranthene	4,19	6,28
Benzo(k)Fluoranthene	4,69	7,04
Benzo(a)Pyrene	4,87	7,31
DiBenzo(a,h)Anthracene	3,49	5,24
Benzo(g,h,i)Perylene	3,67	5,51
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	4,27	6,41

In seguito a diverse prove preliminari, i campioni sono stati incubati in termostato alla temperatura di 23°C per 14 e 21 giorni; per ciascun microrganismo sono state effettuate tre repliche, rispetto ad un controllo, per ogni dose di esposizione al mix di IPA, per un totale di 48 campioni analizzati.

5.4.2. Approccio chimico

Terminato il periodo di accrescimento dei tre rispettivi microrganismi impiegati, è stato effettuato il processo di estrazione degli eventuali IPA ancora presenti nel brodo di coltura

e quindi potenzialmente non degradati, così da ottenere per differenza la quantità metabolizzata di ogni idrocarburo da parte di *T. harzianum*, *S. cerevisiae* e *W. anomalus*.

Prima di iniziare l'estrazione degli IPA dai campioni, è stato necessario effettuare delle prove di recupero per dimostrare che il metodo scelto fosse in grado di garantire un'accettabile recupero degli analiti dalla matrice addizionata con standard mix. Il recupero non inferiore al 70% di ogni analita ha testimoniato la validità del metodo scelto. Una volta validato il metodo, si è proceduto al trattamento dei campioni oggetto di studio. Le provette contenenti il campione sono state poste in centrifuga per 12 minuti a 4400 giri ed a una temperatura di 6°C; il surnatante ottenuto da ogni campione è stato riposto in una provetta pulita e il pellet è stato risciacquato con una soluzione 1:1 di diclorometano e acetonitrile (2 ml) così da rimuovere eventuali residui di IPA presenti sulla superficie cellulare. A sua volta, la soluzione utilizzata è stata aggiunta al surnatante precedentemente prelevato. A questo punto il pellet contenuto nella provetta è stato portato a secco in stufa a 95°C per 4 ore ed in seguito pesato mediante bilancia analitica. Il processo di estrazione degli IPA dal surnatante ottenuto, ha visto l'utilizzo dei solventi organici diclorometano e acetonitrile in tre steps:

- Aggiunta di 20 ml di diclorometano ad ogni campione e sua collocazione in bagno ad ultrasuoni per 14 minuti a 20°C; raccolta del solvente utilizzato e suo travaso in una nuova provetta Falcon da 50 ml.
- Aggiunti ulteriori 20 ml di diclorometano al campione originario e ripetizione del processo di sonicazione con ulteriore travaso del solvente utilizzato nella provetta Falcon da 50 ml del primo step (20 ml + 20 ml).
- Aggiunti 10 ml di acetonitrile al campione originario e ripetizione del processo di sonicazione con ulteriore travaso finale del solvente utilizzato nella provetta Falcon per un totale di 50 ml di solvente di estrazione.

A seguire, il solvente di estrazione ottenuto è stato centrifugato a 4400 giri per 10 minuti ed a una temperatura di 6°C, così da eliminare eventuali residui biologici e trasferito lo stesso in un pallone di vetro da 250 ml per realizzarne l'evaporazione fino a circa 1 ml mediante evaporatore rotante Buchi Rotavapor® (Fig. 7). Recuperato il solvente di estrazione (1 ml), il pallone di vetro utilizzato è stato avvinato con un ulteriore ml di diclorometano, così da cogliere eventuali residui dalle pareti per poi trasferire il solvente in provette di vetro. Infine, viene effettuato l'essiccamento totale mediante corrente di azoto e il recupero dell'estratto con 1 ml di acetonitrile

Figura 7. Evaporatore rotante Buchi Rotavapor®.



La successiva lettura dei campioni è stata eseguita mediante HPLC Varian Pro Star 325 con doppia rivelazione UV-FL, dotato di colonna Phenomenex® Hyperclone 100 mm x 4.60 mm x 5 μ m e, con opportuna programmata di eluizione, lunghezza d'onda fissa a 255 nm per il detector UV, programmata a 6 lunghezze d'onda per il detector FL. Il sistema è stato precedentemente messo a punto, mediante taratura a 4 punti, con un R^2 medio di 0.9833 per le 16 molecole.

L'HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) è un tipo di cromatografia liquida che consente di separare i composti di una miscela, sfruttando la loro differente affinità nei confronti di una fase stazionaria, contenuta all'interno di una colonna cromatografica, attraverso cui fluisce la fase mobile inerte. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione) rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta affinità per la fase mobile. Quindi, ciò che consente di separare i composti è il loro differente tempo di ritenzione all'interno della colonna. Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è spinto attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere.

Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione, è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10 μm); per questo motivo, se si vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato, è indispensabile applicare un'elevata pressione. La presenza di un rivelatore, posto a valle della colonna, consente un'analisi in continuo delle sostanze separate e la loro quantificazione ed identificazione. Il grafico ottenuto è chiamato cromatogramma e riporta in ascissa il tempo di ritenzione ed in ordinata l'unità di misura correlata al tipo di rivelatore utilizzato.

I vantaggi principali di questa tecnica sono: la dimensione ridotta della colonna evita problemi di deviazioni longitudinali e di percorsi alternativi; la velocità di eluizione costante e regolabile; la velocità di esecuzione ridotta; la piccola quantità di composto necessaria all'analisi (nell'ordine dei μg e ng di campione solubilizzato in apposito solvente). Lo svantaggio principale dell'HPLC è, invece, il costo elevato. A causa delle elevate pressioni di esercizio, la strumentazione per HPLC è di norma più complessa rispetto a quella per altre tecniche cromatografiche.

I componenti principali di un'apparecchiatura per HPLC (Fig. 8a; 8b) sono:

- Contenitore per la fase mobile (a).
- Pompa (b).
- Sistemi di iniezione del campione (c).
- Colonna (d).
- Rivelatori (e).
- Computer (f) interfacciato con l'HPLC per l'acquisizione dei cromatogrammi.

Figura 8a. Componenti di un sistema HPLC.

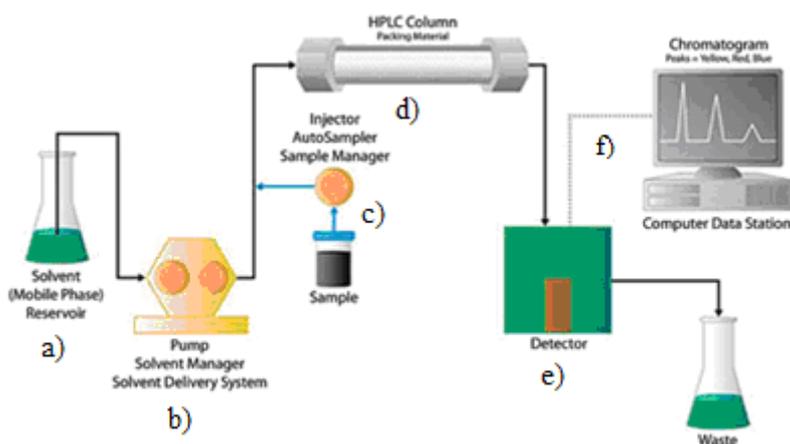


Figura 8b. HPLC Varian ProStar 325 con doppio rivelatore UV-FL.



I rivelatori più utilizzati sono: il rivelatore ad assorbanza ed il rivelatore a fluorescenza. Il rivelatore ad assorbanza misura la regione dello spettro dell'UV-Vis in misura minore della regione dell'infrarosso. I rivelatori a fluorescenza presentano un importante vantaggio, ovvero una maggiore sensibilità rispetto ai rivelatori ad assorbanza, pari a più di un ordine di grandezza. Possiedono certamente un minore campo di applicabilità e validità, poiché il numero delle specie fluorescenti è nettamente inferiore rispetto alla varietà di specie in grado di assorbire la radiazione. L'indubbia utilità del rivelatore a fluorescenza, utilizzato in parallelo al rivelatore ad assorbanza, viene consacrata nei casi in cui quest'ultimo non sia in grado di rilevare e discernere picchi con tempi di ritenzione molto vicini, evidenziati invece dal rivelatore a fluorescenza. Si definisce "a doppio canale" il set up che adopera contemporaneamente entrambi i tipi di rivelatore.

L'efficacia dell'utilizzo di un doppio canale si è palesata nella messa a punto di un nuovo protocollo per le necessità sperimentali di questa dissertazione.

5.5. Analisi preliminare del suolo utilizzato per la messa a dimora di *A. donax*

Mediante analisi preliminari, è stato selezionato un tipo di terreno a basso tenore di metalli e di idrocarburi, al quale sono state aggiunte specifiche quantità dei contaminanti prescelti, così da valutare alla fine del processo la capacità di fitorimediazione della specie vegetale utilizzata. Quindi, è stata eseguita l'analisi del terreno, da impiegare per le prove sperimentali, effettuando tre punti di campionamento sul sito di prelievo, in modo tale da avere un quadro generale riguardante le caratteristiche pedologiche (Tab. 7) e l'eventuale quantità di metalli pesanti e/o IPA già presenti (Tab. 8 e 9). I livelli riscontrati, per

entrambi i contaminanti, si attestano abbondantemente al di sotto dei limiti di legge previsti dal D. Lgs. 152/06.

Tabella 7. Caratteristiche del terreno utilizzato per le sperimentazioni.

Tipologia suolo	Franco argilloso
Azoto totale	0.9 g/Kg
Carbonio	10.1 g/Kg
Rapporto C/N	11.2
Fosforo assimilabile	20 mg/Kg
Potassio scambiabile	424 mg/Kg
pH	8.2
Conducibilità (25°C)	0.53 dS/m
Scambio cationico	16.3 meq/100 g
Nitrati solubili	0.3 meq/L

- La granulometria o tessitura rappresenta il rapporto percentuale tra le diverse frazioni del terreno. Un terreno cosiddetto franco argilloso presenta una certa percentuale di sabbia, così da permettere una buona circolazione idrica e buona ossigenazione, mentre l'argilla, avendo una buona ritenzione idrica, permette di mantenere un sufficiente grado di umidità anche nei periodi di siccità.
- La presenza di azoto, nel terreno, condiziona sensibilmente la crescita delle piante, poiché questo elemento è un componente essenziale delle proteine e, inoltre, interviene indirettamente sulla elaborazione degli zuccheri prodotti durante la fotosintesi, entrando così a far parte della clorofilla.
- La quantità di carbonio organico nel suolo è in relazione con la sostanza organica presente; quest'ultima, attraverso le sue componenti umiche, è in grado di influire sulla capacità di scambio cationico.
- La reazione del suolo, che sia di natura acida, neutra o alcalina viene espressa dal valore di pH che, a sua volta, influenza la produzione vegetale.
- La capacità di scambio cationico (CSC) fornisce un'indicazione sulla potenziale fertilità del suolo; è un parametro che dipende dalla presenza quali-quantitativa della frazione colloidale, sia essa organica o minerale. Sulla componente colloidale avente una determinata carica si andranno a legare cariche di segno opposto. Gli ioni adsorbiti sono in costante equilibrio con quelli presenti in soluzione nel suolo e quindi diventano

biodisponibili per le piante. I fattori che influenzano questo equilibrio dipendono dalle caratteristiche del colloide (detto scambiatore) e dagli ioni.

Tabella 8. Valori dei metalli pesanti riscontrati durante le analisi preliminari del terreno utilizzato per la sperimentazione.

METALLI	VALORI MEDI (µg/g) I PUNTO	VALORI MEDI (µg/g) II PUNTO	VALORI MEDI (µg/g) III PUNTO
Ni	30	30	26
Cd	0.2	0.2	0.1
Cu	21	21	22
V	63	65	61
As	5	5	4
Zn	63	61	66
Pb	16	15	18
Cr	55	58	54
Hg	0	0	0

*I valori riportati per ogni punto di campionamento sono dati dalla media di tre repliche del campione in analisi

Tabella 9. Valori degli IPA riscontrati durante le analisi preliminari del terreno da utilizzare per la sperimentazione.

IPA	VALORI MEDI (µg/g) I PUNTO	VALORI MEDI (µg/g) II PUNTO	VALORI MEDI (µg/g) III PUNTO
Naphthalene	0,1446	0,0484	0,0853
Acenaphthilene	0,8502	1,2864	1,0323
Acenaphthene + Fluorene	1,7779	3,2559	2,0047
Phenanthrene	0,5930	1,3413	1,3217
Anthracene	0,0104	0,0100	0,0111
Fluoranthene	0,0905	0,0487	0,0317
Pyrene	0,0852	0,5003	0,3397
Benzo(a)Anthracene	0,6431	0,7992	0,7228
Crysene	0,1040	0,0882	0,0780
Benzo(b)Fluoranthene	0,0824	1,0499	0,7350
Benzo(k)Fluoranthene	0,3154	0,1489	0,1380
Benzo(a)Pyrene	0,1760	0,1762	0,1746
DiBenzo(a,h)Anthracene	0,7184	0,5261	0,6022
Benzo(g,h,i)Perylene	0,1084	0	0,0620
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	0,0200	0,0598	0,0543

*I valori riportati per ogni punto di campionamento sono dati dalla media di tre repliche del campione in analisi

5.6. Messa a dimora dei rizomi di *Arundo donax*

5.6.1. Metalli

Le prove sperimentali in serra sono state realizzate presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania sita in località Primosole, contrada Reitana, Catania (Fig. 9).

Figura 9. Serra messa a disposizione dall'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università degli Studi di Catania.



A seguito della scelta del terreno da impiegare, 20 Kg di terra sono stati collocati in vasi idonei alla nostra sperimentazione (\varnothing 33 cm, h 40 cm) per un totale di 24 elementi (Fig. 10).

Figura 10. Vasi \varnothing 33 cm, h 40 cm, muniti di apposito sottovaso e disposti su un piano rialzato.



Anche in questo caso, mediante i sali elencati nel *paragrafo 5.3.1*, abbiamo fortificato il terreno impiegando due differenti concentrazioni così da ricreare due ipotetiche condizioni di inquinamento: la prima pari al limite di legge riportato dal D.Lgs. 152/06, la seconda >50% al limite di legge del suddetto decreto (Tabella 10). Tenendo conto di quest'ultimo, ogni sale, una volta pesato, è stato disciolto in un opportuno volume di acqua ultrapura bidistillata, così da poter effettuare la prima irrigazione per ogni rizoma messo a dimora nel rispettivo vaso.

Tabella 10. Valori di concentrazioni dei singoli metalli pesanti, tenendo conto dei limiti di legge imposti dal D.Lgs 152/06 (tabella 1, colonne A e B, Allegato 5, Titolo V, Parte IV D.Lgs. n. 152/2006) per i siti ad uso commerciale e industriale.

Metallo	Concentrazione 1 L.I. (mg/Kg)	Concentrazione 2 >50% L.I.* (mg/Kg)
Ni	500	750
Cd	15	22.5
Cu	600	900
V	250	375
As	50	75
Pb	1000	1500
Cr totale	800	1200
Zn	1500	2250
Hg	5	7.5

*L.I. = Limite di legge D.Lgs 152/06.

Ad ogni campione di terreno fortificato è stato associato un rispettivo campione di controllo. Di fatti, l'impianto è stato così realizzato:

- 3 repliche per la concentrazione 1 (denominate C1R1, C1R2, C1R3) e 3 controlli per ogni rizoma di *A. donax*.
- 3 repliche per la concentrazione 2 (denominate C2R1, C2R2, C2R3) e 3 controlli per ogni rizoma di *A. donax*.
- 3 repliche per la concentrazione 1 (denominate C1R1, C1R2, C1R3) e 3 controlli per ogni rizoma di *A. donax* micorrizzato con *T. harzianum*.
- 3 repliche per la concentrazione 2 (denominate C2R1, C2R2, C2R3) e 3 controlli per ogni rizoma di *A. donax* micorrizzato con *T. harzianum*.

L'impianto ha avuto un decorso di 7 mesi, precisamente da inizio dicembre 2015 a fine giugno 2016. L'irrigazione è stata effettuata regolarmente una volta a settimana, sebbene *A.*

donax sia in grado di resistere perfettamente agli stress idrici. Oltre al campionamento finale, è stato effettuato un campionamento intermedio delle foglie al terzo mese di impianto; eseguita la raccolta, i campioni di foglie sono stati essiccati e pesato 1 g per ogni campione così da effettuare la digestione mediante mineralizzazione in vaso chiuso. Al settimo mese, è stato eseguito l'espianto di *A. donax* da ogni vaso ed ogni pianta è stata suddivisa in rizoma, culmi e foglie; inoltre sono stati prelevati campioni di terra da ogni vaso. La mineralizzazione in vaso chiuso, mediante Microwave Digestion System Start D (Milestone Inc., USA), è stata eseguita per ogni componente della pianta e per il rispettivo terreno, adottando per ogni tipologia di campione uno specifico programma termico. Al termine della mineralizzazione, come descritto nel *paragrafo 5.3.2.*, sono state eseguite le analisi mediante ICP-MS DRCE Perkin Elmer.

5.6.2. IPA

Anche per le prove di esposizione agli IPA, la procedura per la messa a dimora delle piante, l'inoculo del microrganismo e la relativa realizzazione dell'impianto ha visto le stesse fasi di preparazione descritte nel precedente paragrafo. La fortificazione del terreno è stata effettuata utilizzando due differenti concentrazioni così da ricreare due ipotetiche condizioni di inquinamento: la prima pari al limite di legge riportato dal D.Lgs. 152/06, la seconda >50% al limite di legge del suddetto decreto (Tabella 11). Anche in questo caso, una volta preparati i due mix di IPA da aggiungere al terreno, la contaminazione è stata effettuata con la prima irrigazione.

Tabella 11. Valori di concentrazioni dei 16 idrocarburi policiclici aromatici, tenendo conto dei limiti di legge imposti dal D.Lgs 152/06 (tabella 1, colonne A e B, Allegato 5, Titolo V, Parte IV D.Lgs. n. 152/2006) per i siti ad uso commerciale e industriale.

IPA	Limite di legge (µg/g)	> 50% L.I. (µg/g)
Naphthalene	10	15
Acenaphthylene	10	15
Acenaphthene	10	15
Fluorene	10	15
Phenanthrene	10	15
Anthracene	10	15
Fluoranthene	10	15
Pyrene	10	15
Benzo(a)Anthracene	10	15
Chrysene	10	15
Benzo(b)Fluoranthene	10	15
Benzo(k)Fluoranthene	10	15
Benzo(a)Pyrene	10	15
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	15
Benzo(g,h,i)Perylene	10	15
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	15

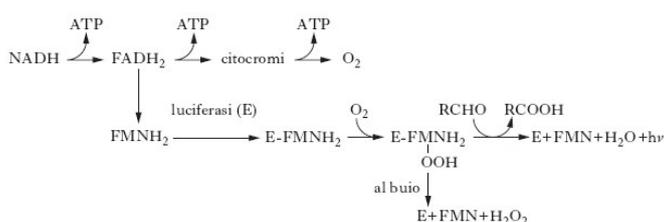
*L.I. Limite di legge D.Lgs 152/06.

In questo caso è stato effettuato il campionamento del terreno utilizzato alla fine dell'impianto così da valutare la quantità residua di IPA non degradati da parte di *A. donax* con e senza l'assistenza di *T. harzianum*. I campioni di terra sono stati passati al vaglio con maglia da 2 mm e preparati per le analisi; da ognuno di essi è stato pesato 0.5 g di terreno, a sua volta riposto in provette BD Falcon[®] da 50 ml, al quale sono stati aggiunti 5 ml di acetonitrile per eseguire l'estrazione in bagnetto a ultrasuoni a 20°C per 10 minuti, ripetendo due volte la procedura con un intervallo di 5 minuti. Dopo di che, i campioni sono stati posti in centrifuga a 4400 giri per 10 minuti a 6°C per far sì che eventuali residui di terra si depositassero sul fondo della provetta; prelevato il surnatante, è stato sottoposto a filtrazione, onde eliminare ulteriori eventuali residui di terra, utilizzando filtri in nitrocellulosa da 0.2 µm. A questo punto, 1 ml di campione filtrato è stato riposto in provette vials per cromatografia liquida ed è stata eseguita l'analisi mediante HPLC UV/FL Varian ProStar 325.

5.7. Saggio ecotossicologico *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri è un batterio marino Gram negativo presente in tutto il mondo. È un organismo che emette bioluminescenza grazie alla presenza della luciferina batterica, una riboflavina fosfato ridotta; questa viene ossidata dall'enzima luciferasi trasferendo elettroni all'ossigeno e producendo luce (Fig. 11).

Figura 11. Reazione chimica della luciferina batterica (www.lookfordiagnosis.com).



Con questo saggio ecotossicologico è possibile valutare la tossicità acuta di campioni provenienti da corpi idrici d'acqua dolce, marina o salmastra, ma anche da estratti ed eluati di sedimenti e fanghi, utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri. Quindi, il principio di questa metodologia si basa sulla capacità di una popolazione monospecifica di 10⁶ cellule di batteri Gram-negativi, appartenenti alla specie *Vibrio fischeri* ceppo NRRL-B- 11177, di emettere

bioluminescenza per un saggio a 15-30 minuti per la determinazione dell'EC50, dell'EC20 e della diluizione di non effetto.

Le analisi sono state eseguite secondo quanto riportato sul metodo Apat CNR IRSA 8030, 2003 utilizzando un fotometro Microtox[®] model 500 (Fig.12) per la misura della bioluminescenza emessa dai batteri. L'inibizione della vitalità batterica è stata espressa in valori percentuali.

Figura 12. Microtox model 500 - Modern Water, United Kingdom.



5.8. Analisi statistica

Per i dati ottenuti, è stato eseguito un accurato studio statistico descrittivo facendo uso di media (m) e deviazione standard (σ). I livelli di concentrazione dei metalli bioaccumulati dai microrganismi testati sono stati rappresentati graficamente, tramite istogramma e retta di regressione, al fine di constatare se all'aumento delle concentrazioni di esposizione ai singoli metalli il bioaccumulo da parte degli organismi prescelti aumenti proporzionalmente. È stato effettuato il calcolo del coefficiente di correlazione (Rho) di Spearman, in quanto rappresenta una misura di associazione tra variabili continue alquanto robusta e che risente poco di eventuali osservazioni atipiche. In sostanza, il coefficiente di correlazione di Spearman è un test non parametrico usato per misurare la forza di associazione tra due variabili, in cui il valore $r = 1$ denota una correlazione positiva perfetta e il valore $r = -1$ esprime una perfetta correlazione negativa. Per il calcolo di tale coefficiente è stato utilizzato l'apposito software online, disponibile sul sito internet:

<http://www.socscistatistics.com/tests/spearman/Default.aspx>

Tenendo conto della numerosità campionaria e avendo $\alpha = 0.05$, la significatività statistica del coefficiente di correlazione di Spearman sarà ottenuta per valori di $Rho \geq 0.8$ (in valore assoluto).

6. Risultati

6.1. Valori dei metalli assorbiti dai tre microrganismi utilizzati per le prove di esposizione *in vitro*

L'assorbimento percentuale nei confronti del metallo a cui il microrganismo è stato inizialmente esposto, è dato dalla media dei valori ottenuti dalle tre repliche indipendenti per ognuna delle quattro dosi di esposizione, in relazione alla concentrazione iniziale addizionata al brodo di coltura.

6.1.1. *T. harzianum*

Tabella 12. Peso a secco ($m \pm \sigma$) del micelio di *T. harzianum* in seguito ad esposizione ai metalli pesanti.

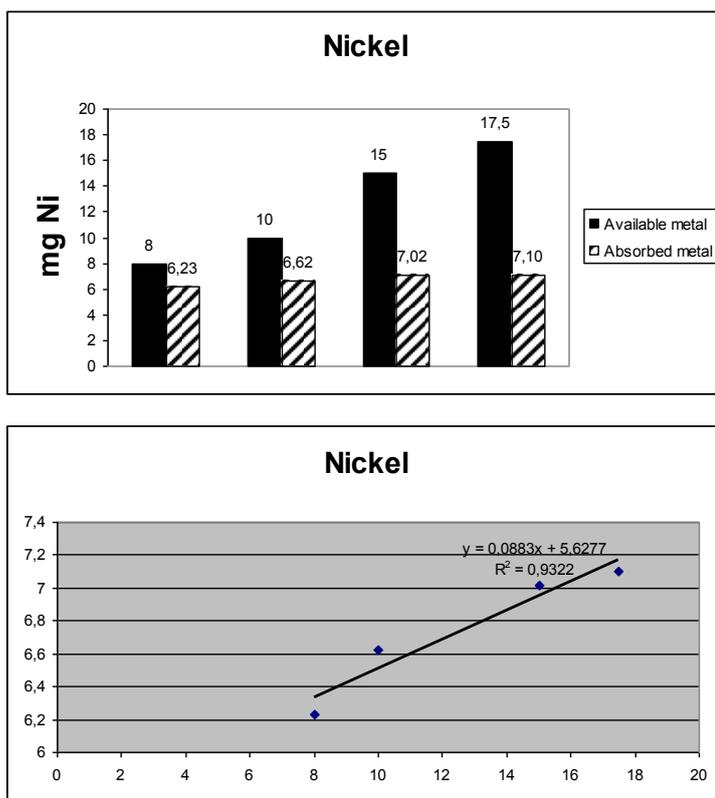
Metalli	Conc. 1 [*] (mg)	Conc. 2 ^{**} (mg)	Conc. 3 ^{***} (mg)	Conc. 4 ^{****} (mg)
Ni	66.67 ± 4.51	70.33 ± 5.13	67 ± 2	68 ± 7
Cd	75.33 ± 11.93	73.33 ± 1.53	79.67 ± 7.09	76 ± 3.61
Cu	57.67 ± 2.68	60 ± 2.65	55 ± 3.46	58.67 ± 4.62
V	81.33 ± 3.21	84 ± 6.08	89.33 ± 16.44	83 ± 3.61
As	45 ± 5.20	74.33 ± 3.21	72.67 ± 11.02	72 ± 3.61
Zn	90.33 ± 2.52	73.67 ± 5.51	82.67 ± 6.03	85.67 ± 3.51
Pb	91.67 ± 7.02	90 ± 6.08	92 ± 6.56	92.67 ± 3.06
Cr ^{**}	/	/	/	/
Hg	77 ± 4.58	69.67 ± 4.16	81.33 ± 11.37	87.33 ± 27.47
Controllo	77 ± 6.65	83.33 ± 8.14	79.67 ± 4.67	83 ± 7.24

* < 20% al L.I.; ** Limite di legge; *** > 50% L.I.; **** > 75% L.I.

** I campioni esposti al cromo non hanno mostrato vitalità.

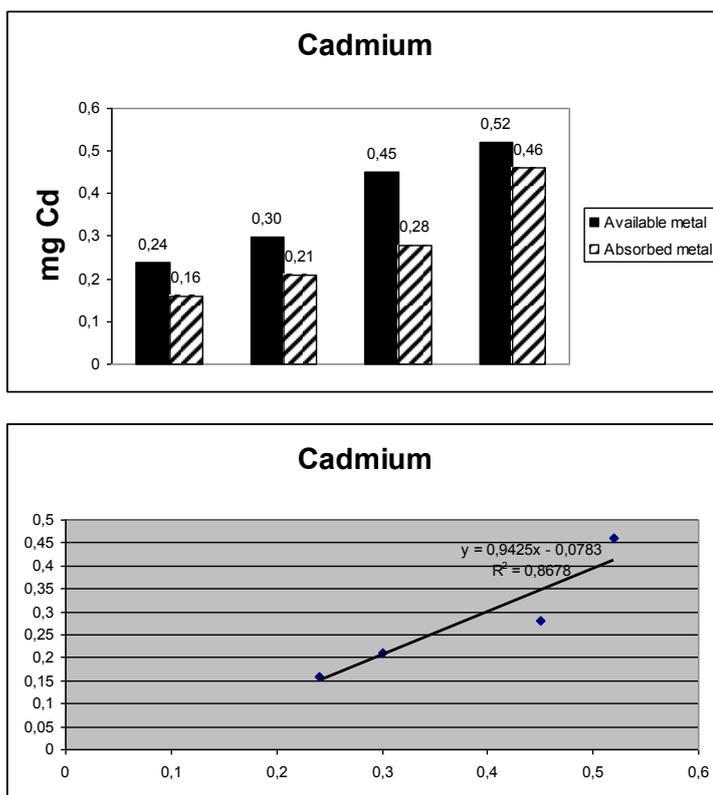
T. harzianum ha mostrato una costante capacità di bioaccumulo al crescere delle dosi di esposizione al Ni (Fig. 13), a fronte però di una riduzione percentuale media di assorbimento (77,88%; 66,2%; 46,8%; 40,57%) tenendo conto del rapporto metallo disponibile-metallo assorbito. Ciò, non è imputabile alla biomassa fungina che si è mantenuta più o meno costante in tutti e quattro i casi di esposizione. È stata rilevata una buona correlazione mediante il coefficiente di correlazione della retta di regressione ($R^2 = 0.9322$) ed una forte correlazione mediante la rho di Spearman ($\rho = 1$).

Figura 13. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *T. harzianum* nei confronti del Nickel.



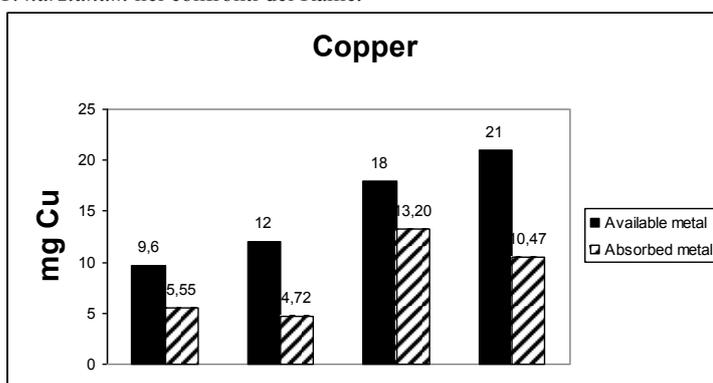
In seguito all'esposizione al Cd (Fig.14), il fungo mostra un assorbimento crescente al crescere delle dosi di esposizione e le percentuali di assorbimento (66.67%; 70%; 62.22%; 88.46%) palesano una buona capacità di assorbimento di questo metallo da parte del fungo. Il peso medio del micelio presenta un andamento più o meno costante in tutti e quattro i casi di esposizione, sebbene i valori delle deviazioni standard (± 11.93 ; ± 1.53 ; ± 7.09 ; ± 3.61) fanno apparire un grado di variazione non indifferente, considerando che per ogni casistica sono state fatte tre repliche. Il coefficiente di correlazione della retta di regressione ($R^2 = 0.8678$) indica una discreta correlazione tra le due variabili, la rho di Spearman ($\rho = 1$) indica una forte correlazione tra le due variabili.

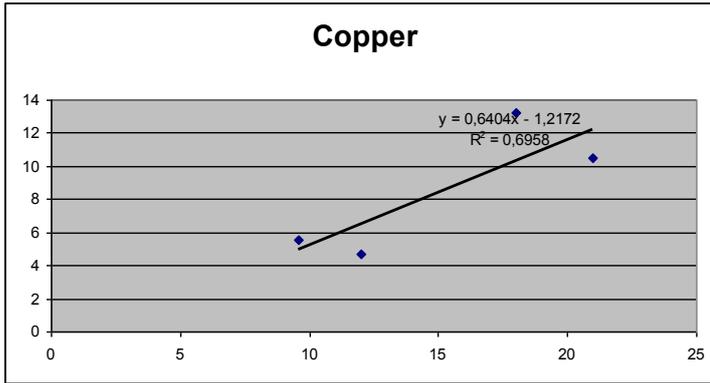
Figura 14. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *T. harzianum* nei confronti del Cadmio.



Nei confronti del Cu (Fig.15), *T. harzianum* esibisce una discreta capacità di bioaccumulo (57.81%; 39.33%; 73.33%; 49.86%). La resa un po' più bassa, rispetto agli altri metalli, potrebbe essere spiegata dal minor quantitativo di biomassa fungina che, comunque, si mantiene costante (Tab. 11). Il coefficiente di correlazione della retta di regressione indica una discreta correlazione tra le due variabili ($R^2= 0.6958$), e la rho di Spearman indica una debole correlazione (rho= 0.6).

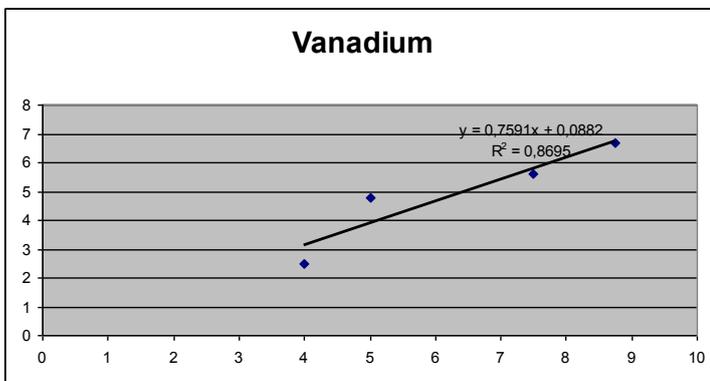
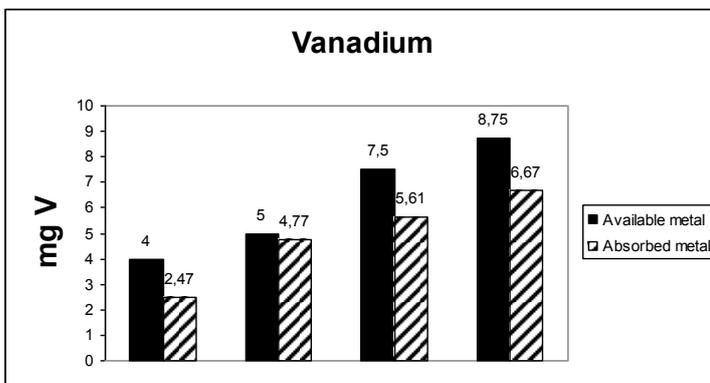
Figura 15. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *T. harzianum* nei confronti del Rame.





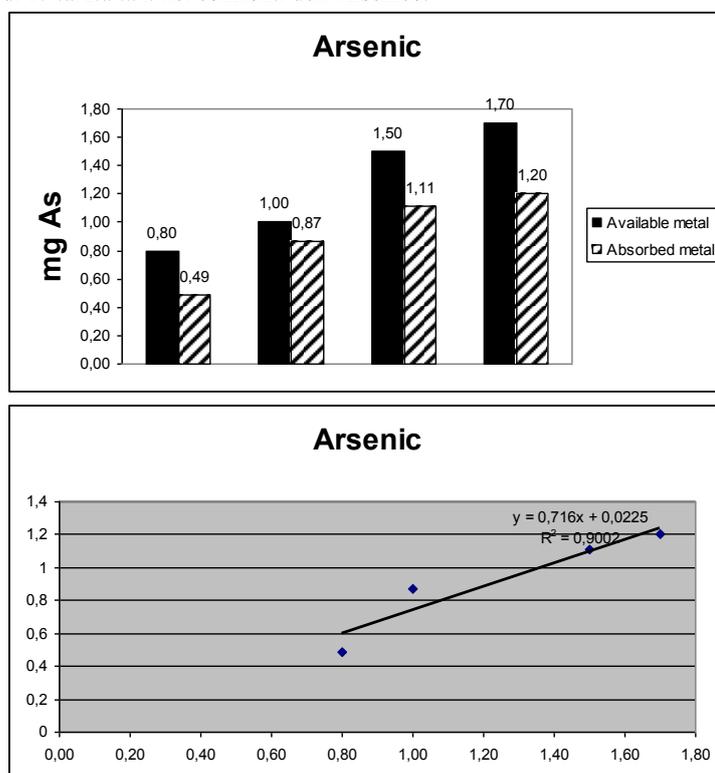
L'esposizione al V ha dato ottimi risultati. Infatti, *T. harzianum* ha mostrato una buona capacità di assorbimento del V all'aumentare delle concentrazioni dello stesso, con alti valori percentuali di assorbimento e un picco significativo in rapporto alla seconda dose di esposizione (61.75%; 95.4%; 74.8%; 76.23%). Il coefficiente di correlazione della retta di regressione presenta un valore $R^2 = 0.8695$, che indica una discreta correlazione; la rho di Spearman indica una forte correlazione tra le due variabili ($\rho = 1$).

Figura 16. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *T. harzianum* nei confronti del Vanadio.



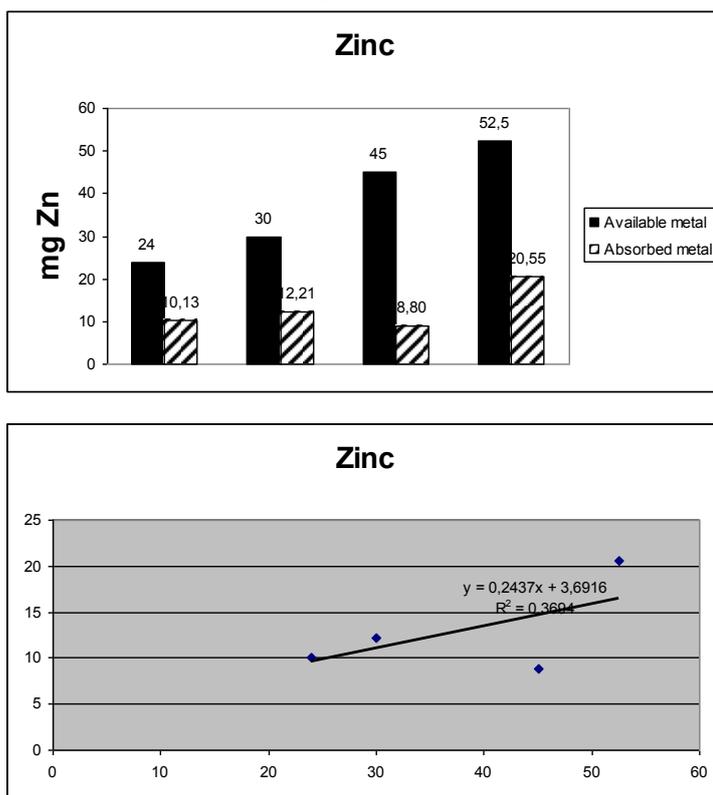
In seguito all'esposizione ad As, *T. harzianum* ha mostrato una capacità di assorbimento crescente all'incremento delle dosi di esposizione. Le percentuali di assorbimento presentano un andamento non proprio costante (61.25%; 87%; 74%; 70.58%), sebbene il valore ottenuto al primo livello (61.25%) va relazionato al minor peso medio del fungo. Per le rimanenti tre dosi di esposizione notiamo che a fronte del peso costante del micelio (Tab. 12), le percentuali di assorbimento diminuiscono al crescere delle dosi stesse, il che denota un certo livello di saturazione. Il coefficiente di correlazione della retta di regressione, riportato nel grafico in Figura 17, indica una buona correlazione tra l'aumento della concentrazione e la capacità di bioassorbimento ($R^2 = 0.9002$). La rho di Spearman indica una forte correlazione tra le due variabili ($\rho = 1$).

Figura 17. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *T. harzianum* nei confronti dell'Arsenico.



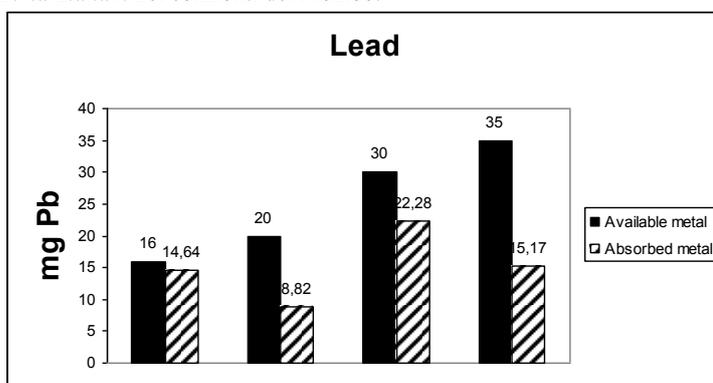
Nei confronti dello Zn (Fig.18), *T. harzianum* ha manifestato scarsa capacità di assorbimento (42.21%; 40.7%; 19.56%; 39.14) nonostante il micelio abbia dato degli ottimi segnali di crescita, quindi ha senso ipotizzare uno scarso potenziale di bioassorbimento del metallo da parte del fungo. Entrambi i coefficienti di correlazione indicano una correlazione pressoché nulla ($R^2 = 0.3694$; $\rho = 0.4$).

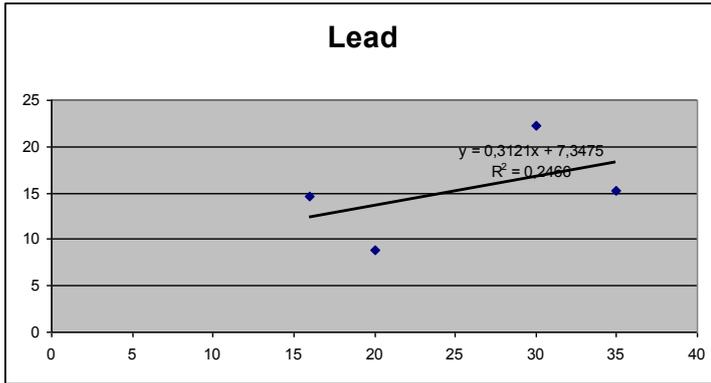
Figura 18. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *T. harzianum* nei confronti dello Zinco.



Per quanto concerne l'esposizione al Pb (Fig. 19), *T. harzianum* non ha manifestato una potenzialità costante di bioassorbimento (91.5%; 44.1%; 74.27%; 43.34%), nonostante, invece, la crescita fungina si sia mantenuta costante mostrando un'alta resa di biomassa in tutti e quattro i casi di esposizione (Tab. 12). Entrambi i coefficienti utilizzati indicano che c'è una correlazione praticamente nulla tra le due variabili. ($R^2 = 0.2466$; $\rho = 0.6$).

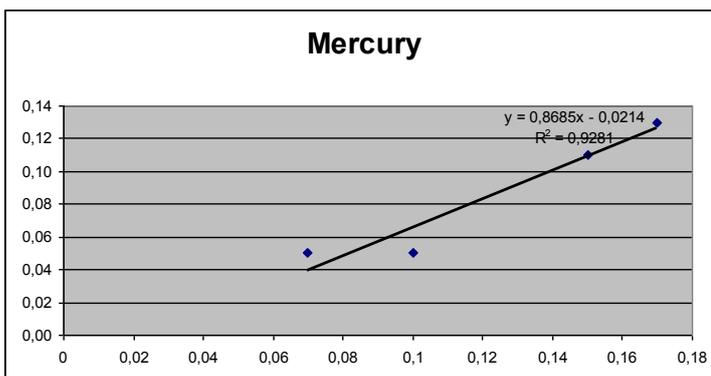
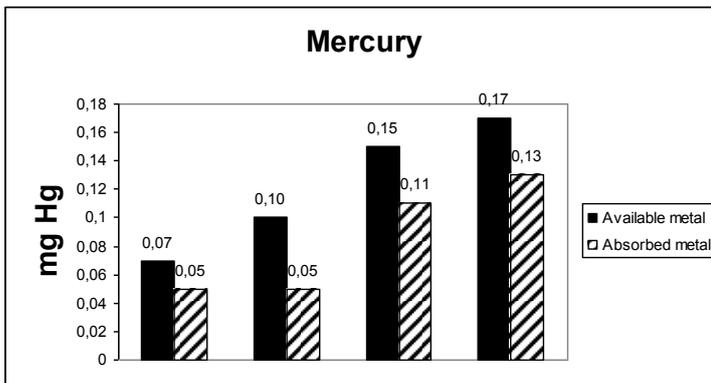
Figura 19. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *T. harzianum* nei confronti del Piombo.





L'esposizione al Hg ha manifestato una simile capacità di bioassorbimento tra le prime due e le ultime due concentrazioni (Fig.20). Le percentuali di assorbimento (71.43%; 50%; 73.33%; 76.47%), tenendo conto del rapporto metallo disponibile-metallo assorbito, si mostrano costanti tranne che per la seconda dose di esposizione, molto probabilmente a causa della riduzione della biomassa fungina rispetto agli altri tre casi. Il coefficiente di correlazione della retta di regressione indica una buona correlazione lineare ($R^2 = 0.9281$), la rho di Spearman indica una discreta correlazione ($\rho = 0.738$).

Figura 20. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *T. harzianum* nei confronti del Mercurio.



Nei confronti dell'esposizione al Cr da parte di *T. harzianum* abbiamo riscontrato un problema di crescita dovuto ad un pH eccessivamente basso (< 2) riportato dal brodo di coltura dopo averlo fortificato con il metallo oggetto della sperimentazione. Una possibile soluzione, sarebbe quella di aggiungere un adeguato tampone (es. tampone fosfato), in grado di non modificare le caratteristiche chimiche necessarie per permettere la crescita del microrganismo utilizzato così da poter eventualmente effettuare le prove di crescita ed esposizione.

6.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Tabella 13. Peso a secco ($m \pm \sigma$) del pellet di *S. cerevisiae* in seguito ad esposizione ai metalli pesanti.

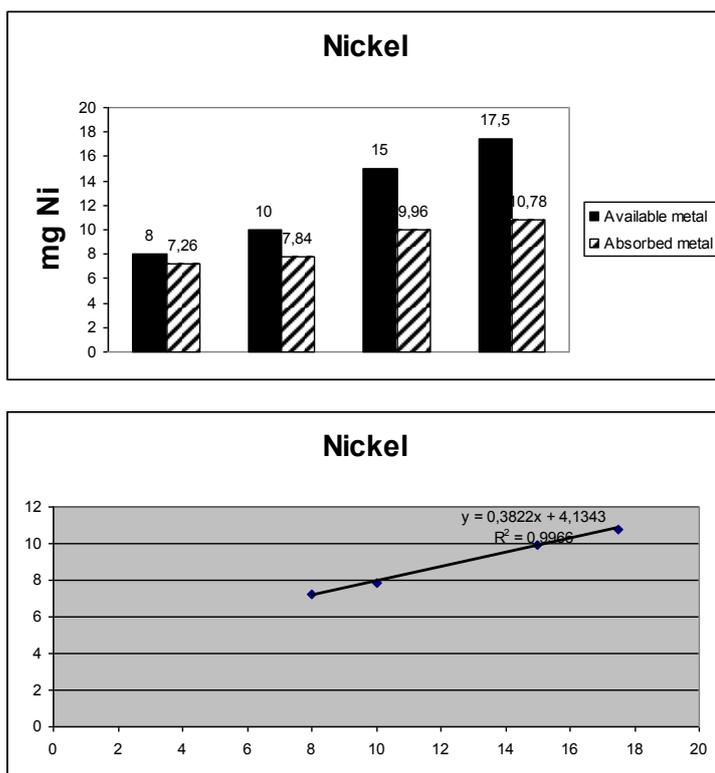
Metalli	Conc. 1 [*] (mg)	Conc. 2 ^{**} (mg)	Conc. 3 ^{***} (mg)	Conc. 4 ^{****} (mg)
Ni	73.33 ± 2.52	72.67 ± 4.16	72 ± 6	74 ± 4
Cd	73.67 ± 17.39	85.67 ± 11.59	63.33 ± 16.26	49.33 ± 6.66
Cu	71 ± 2.65	72.33 ± 1.53	75.67 ± 4.93	75 ± 4.36
V	61.67 ± 3.06	56.67 ± 3.06	53.33 ± 1.53	47.33 ± 3.79
As	62.33 ± 0.58	61.67 ± 2.08	64.33 ± 1.15	52.67 ± 2.52
Zn	57.33 ± 5.69	61.67 ± 4.63	67.33 ± 3.51	57.67 ± 0.58
Pb	50 ± 6.24	52 ± 5	54 ± 4.58	55.67 ± 4.73
Cr ^{**}	/	/	/	/
Hg	55 ± 4.36	56.33 ± 0.58	53 ± 3	51.33 ± 1.53
Controllo	80.22 ± 2.22	80.11 ± 4.82	80.89 ± 3.51	77.33 ± 5.56

* < 20% al L.I.; ** Limite di legge; *** > 50% L.I.; **** > 75% L.I.

** I campioni esposti al cromo non hanno mostrato vitalità.

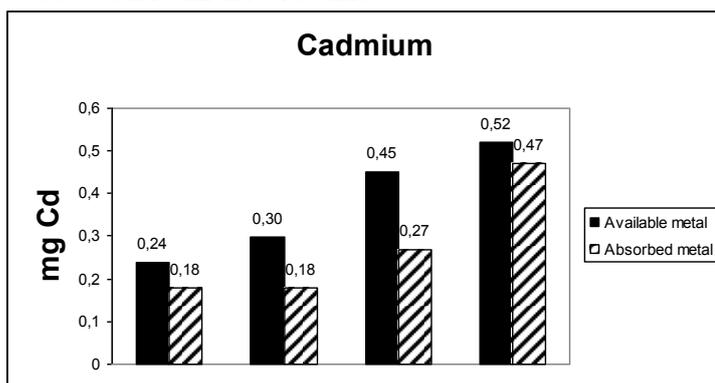
Per quanto riguarda l'esposizione al Ni nei confronti del lievito *S. cerevisiae*, notiamo un leggero ma costante incremento del bioassorbimento al crescere delle dosi di metallo disponibile (Fig.21); le percentuali di assorbimento, però, assumono valori decrescenti al crescere della dose di esposizione (90.75%; 78.4%; 66.4%; 61.6%), a fronte di un peso del lievito pressoché costante, il che denota un certo livello di saturazione. Sia il coefficiente di correlazione della retta di regressione ($R^2 = 0.9966$) che la rho di Spearman ($\rho = 1$) indicano una forte correlazione tra le due variabili.

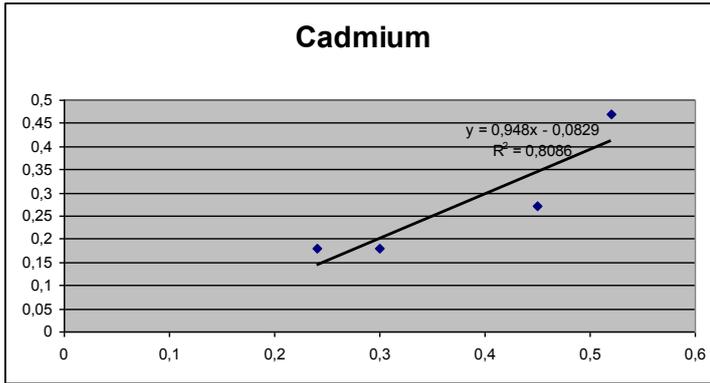
Figura 21. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *S. cerevisiae* nei confronti del Nickel.



S. cerevisiae ha manifestato un andamento costante per le prime due dosi di esposizione al Cd (Fig. 22), a differenza della terza e quarta dose dalle quali emerge un ulteriore aumento a fronte di un minor peso medio del lievito. Dalle percentuali di assorbimento (75%; 60%; 60%; 90.38%) si può notare come il lievito presenti un picco alla quarta dose di esposizione nonostante la riduzione della biomassa prodotta (vedi Tab. 13). Il coefficiente di correlazione della retta di regressione indica una discreta correlazione ($R^2 = 0.8086$) e la rho di Spearman indica una forte correlazione ($\rho = 0.949$).

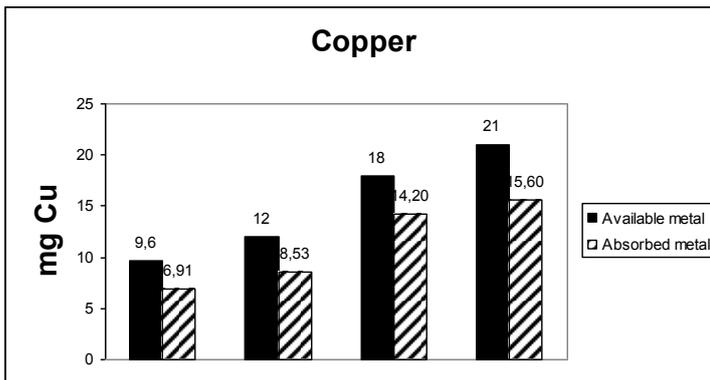
Figura 22. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *S. cerevisiae* nei confronti del Cadmio.

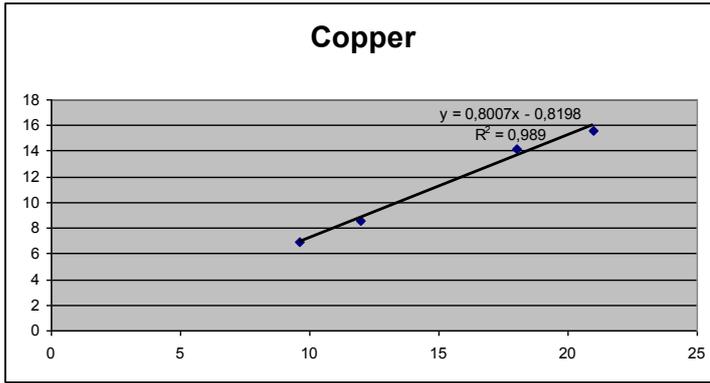




L'esposizione di *S. cerevisiae* al Cu ha fornito buoni risultati. Al crescere della biodisponibilità del metallo è cresciuta proporzionalmente la capacità di bioassorbimento del lievito (Fig. 23). Le percentuali di assorbimento si sono mantenute all'incirca costanti (71.98%; 71.08%; 78.89%; 74.29%), confermando quanto appena affermato; inoltre indicano una elevata capacità di assorbimento per questo metallo. Probabilmente, gli ultimi due valori percentuali, leggermente maggiori rispetto ai primi due, sono spiegabili con il leggero incremento di biomassa media negli ultimi due esperimenti. Sia il coefficiente di correlazione della retta di regressione ($R^2 = 0.989$) che la rho di Spearman ($\rho = 1$) segnalano una forte correlazione tra le due variabili.

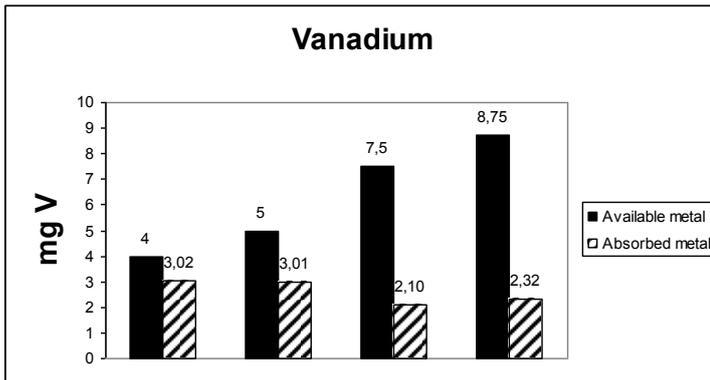
Figura 23. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *S. cerevisiae* nei confronti del Rame.

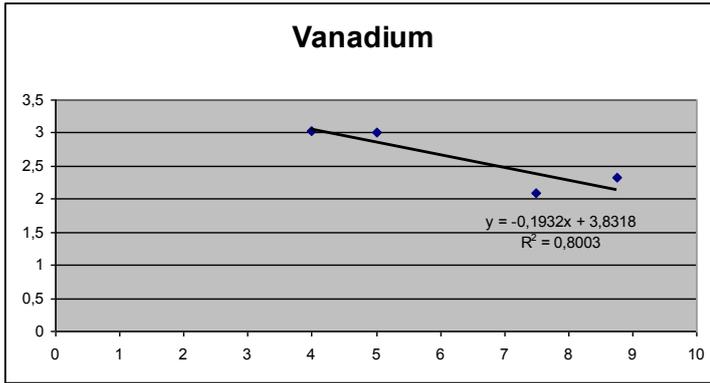




Per quanto riguarda l'esposizione al V da parte di *S. cerevisiae*, notiamo per le prime due dosi di esposizione dei valori di assorbimento all'incirca costanti, a differenza di un leggero decremento per la terza e la quarta dose (Fig. 24). A confermare quanto detto, vi sono anche i valori percentuali di assorbimento rapportati al metallo disponibile-metallo assorbito (75.5%; 60.2%; 28%; 25.51%). Probabilmente, una certa influenza sul decrescere della capacità di assorbimento del lievito è stata esercitata dalla quantità calante di biomassa ottenuta nei quattro casi (vedi Tab. 13) o anche da un possibile effetto di saturazione. I valori riportati da entrambi i coefficienti presi in esame, indicano una correlazione negativa tra le due variabili.

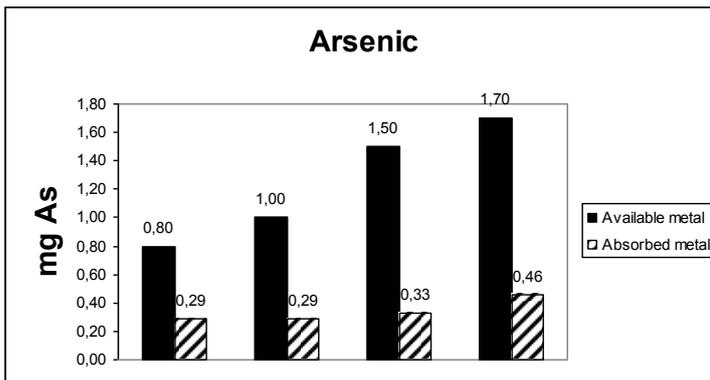
Figura 24. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *S. cerevisiae* nei confronti del Vanadio.

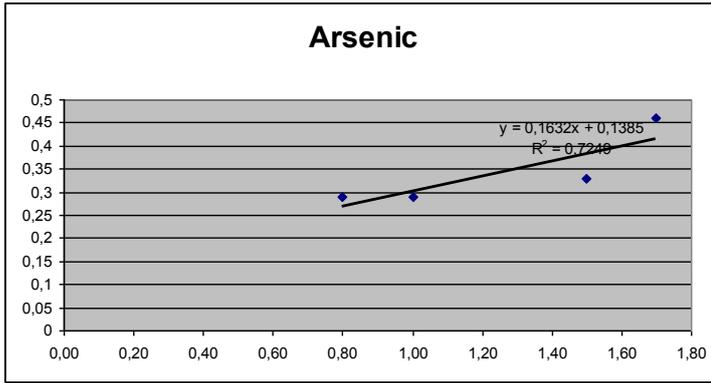




S. cerevisiae non ha mostrato un buon grado di assorbimento nei confronti dell'As (36.25%; 29%; 22%; 27.06%); infatti, osservando le percentuali di assorbimento, notiamo un decremento nei primi tre casi di esposizione con un lieve incremento a seguito dell'esposizione alla quarta dose (Fig. 25). Da notare, inoltre, che il peso del lievito si è mantenuto costante solo nei primi tre casi con un decremento importante al quarto (vedi Tab. 13). Il coefficiente di correlazione della retta di regressione evidenzia una discreta correlazione ($R^2 = 0.7249$), invece, la rho di Spearman indica una forte correlazione ($\rho = 0.949$).

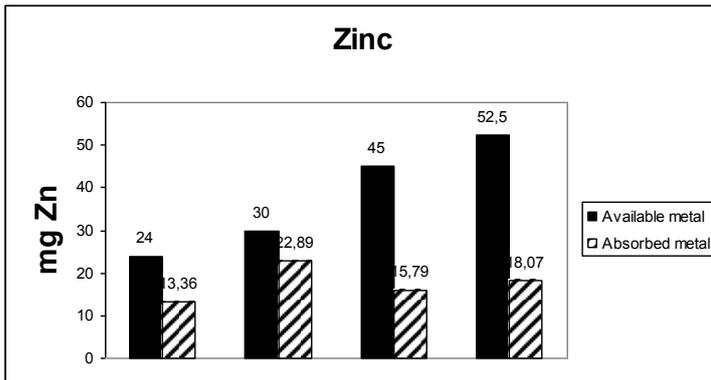
Figura 25. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *S. cerevisiae* nei confronti dell'Arsenico.

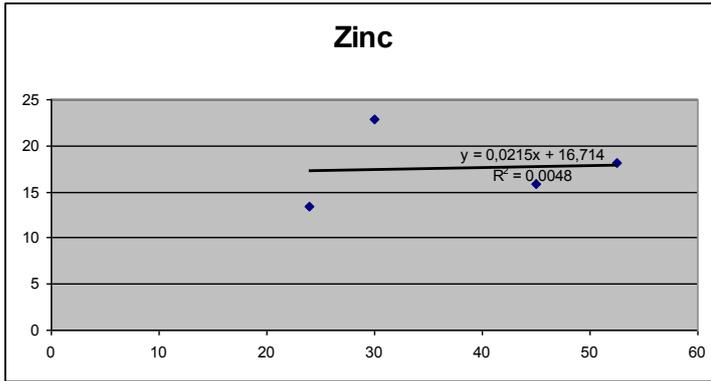




Nei confronti dell'esposizione allo Zn, *S. cerevisiae* ha mostrato una discreta capacità di bioassorbimento. I valori di assorbimento in rapporto al metallo biodisponibile, mostrano un accrescimento costante ad esclusione della seconda dose di esposizione; in termini di valori percentuali (55.67%; 76.3%; 35.09%; 34.42%) non si riscontra un andamento regolare (Fig. 26). Ciò si evince in maniera ancor più marcata se si considerano i quantitativi di biomassa ottenuti nei quattro casi (vedi Tab. 13): si nota chiaramente come ad un incremento di biomassa non è corrisposto un incremento della capacità di assorbire il metallo. Entrambi i coefficienti di correlazione hanno evidenziato assenza di correlazione ($R^2 = 0.0048$; $\rho = 0.4$).

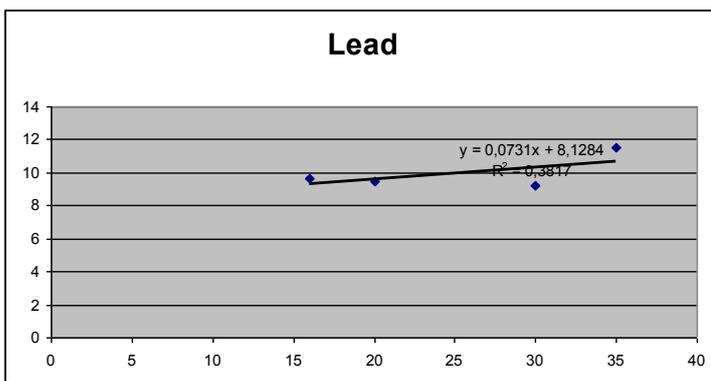
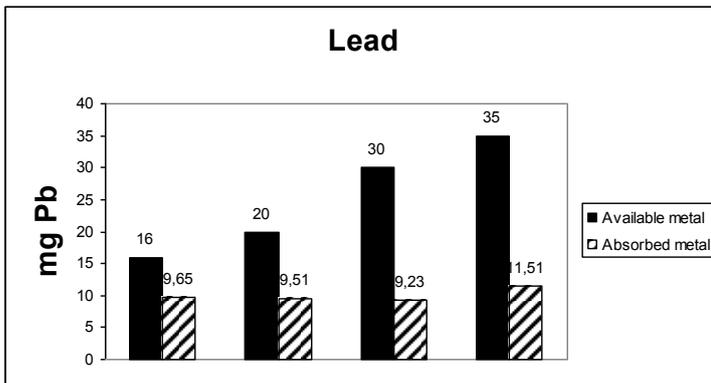
Figura 26. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *S. cerevisiae* nei confronti dello Zinco.





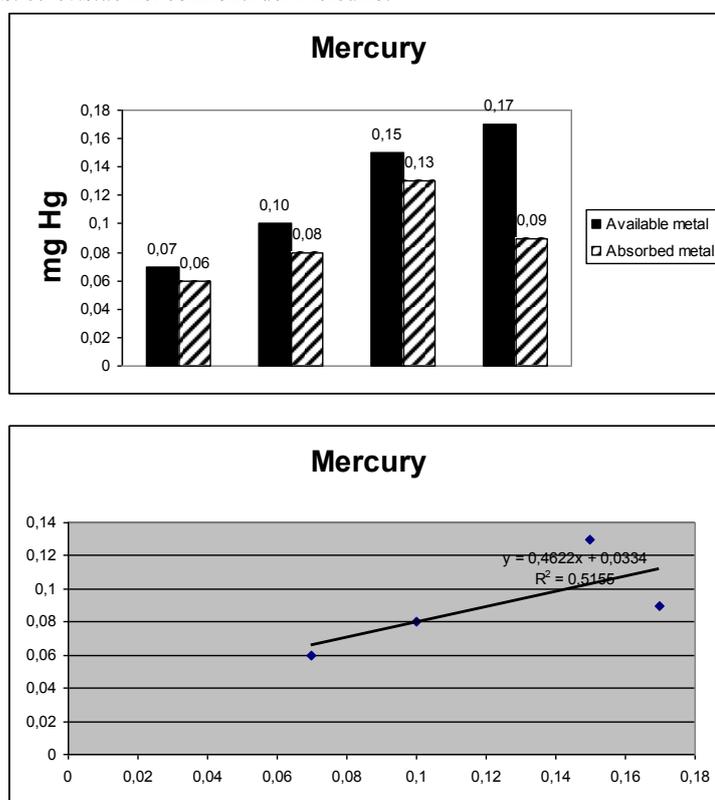
L'esposizione al Pb ha dato risultati approssimativamente costanti (Fig. 27). In relazione alla dose disponibile del metallo, dai valori percentuali osserviamo un valore decrescente di bioassorbimento (60.31%; 47.55%; 30.77%; 32.89%). Contrariamente a quest'ultimi, la biomassa del lievito ha mostrato un lieve ma costante incremento (vedi Tab. 13): dunque, al crescere della biomassa non è corrisposto un incremento di assorbimento. Sia il coefficiente della retta di regressione che la rho di Spearman indicano assenza di correlazione tra le due variabili ($R^2 = 0.3817$; $\rho = 0.2$).

Figura 27. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *S. cerevisiae* nei confronti del Piombo.



Nei confronti dell'esposizione al Hg, *S. cerevisiae* ha mostrato un apprezzabile potenziale di assorbimento nei primi tre casi, con un decremento significativo al quarto (Fig. 28), pur mantenendo in generale un buon valore di assorbimento (85.71%, 80%, 86.67% e 52.94%). Il risultato ottenuto alla quarta dose di esposizione può essere parzialmente spiegato dal leggero decremento della biomassa del lievito (vedi Tab. 13). Il coefficiente di correlazione della retta di regressione indica una scarsa correlazione ($R^2 = 0.5155$), mentre la rho di Spearman restituisce un valore di rho = 0.8, e dunque con dubbia significatività. Dato l'andamento dei valori di assorbimento, sarebbe più opportuno rifiutare l'ipotesi di una correlazione.

Figura 28. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *S. cerevisiae* nei confronti del Mercurio.



Anche in questo caso, come visto in precedenza per *T. harzianum*, abbiamo riscontrato un problema di crescita di *S. cerevisiae* in seguito all'esposizione al Cr, dovuto ad un pH eccessivamente basso (< 2) palesato dal brodo di coltura dopo averlo fortificato con il metallo oggetto della sperimentazione.

6.1.3. *Wicheramomyces anomalus*

Tabella 14. Peso a secco ($m \pm \sigma$) del pellet di *W. anomalus* in seguito ad esposizione ai metalli pesanti.

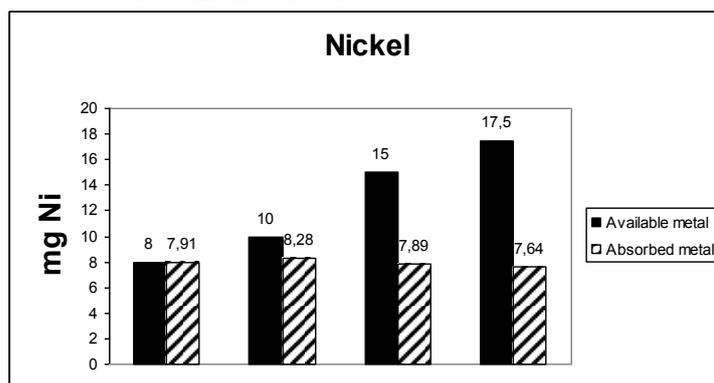
Metalli	Conc. 1 [*] (mg)	Conc. 2 ^{**} (mg)	Conc. 3 ^{***} (mg)	Conc. 4 ^{****} (mg)
Ni	41.33 ± 0.58	41.67 ± 1.53	40 ± 1	44 ± 1
Cd	59.67 ± 1.53	62.33 ± 1.15	56 ± 2.65	58.33 ± 2.31
Cu	49 ± 2.65	48.67 ± 5.51	47 ± 4.36	47.67 ± 4.73
V	71.67 ± 13.43	62 ± 2.65	33.67 ± 2.08	37 ± 2.65
As	64.33 ± 1.53	60.33 ± 1.15	58 ± 2.65	51.67 ± 1.53
Zn	71.33 ± 5.03	74 ± 1	76.33 ± 2.31	69 ± 2.65
Pb	45 ± 6.24	47.67 ± 6.51	48.67 ± 5.51	54 ± 13.23
Cr ^{**}	/	/	/	/
Hg	43 ± 1.73	37 ± 2	44.33 ± 2.08	42 ± 3
Controllo	81.67 ± 5.58	78.11 ± 4.68	80.44 ± 3.95	81.44 ± 3.10

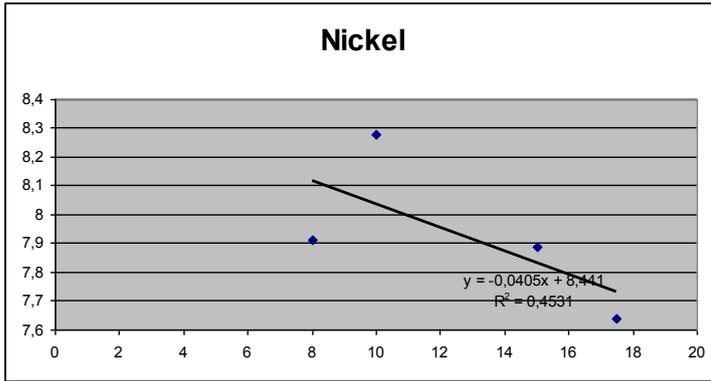
* < 20% al L.I.; ** Limite di legge; *** > 50% L.I.; **** > 75% L.I.

** 1 campioni esposti al cromo non hanno mostrato vitalità.

W. anomalus, in seguito ad esposizione al Ni, ha manifestato una capacità di assorbimento più o meno costante (Fig. 29) e con valori percentuali in decremento rispetto al rapporto metallo biodisponibile-metallo assorbito (98.88%; 82.28%; 52.6%; 43.66%), a fronte di un peso costante della biomassa prodotta (vedi Tab. 14). Il coefficiente di correlazione della retta di regressione indica mancanza di correlazione tra aumento della concentrazione del metallo e capacità di bioassorbimento ($R^2 = 0.4531$), mentre la rho di Spearman mostra un valore di -0.8. Poiché si osserva un andamento costante dell'assorbimento, a prescindere dalla concentrazione, viene rifiutata l'ipotesi della correlazione tra le due variabili.

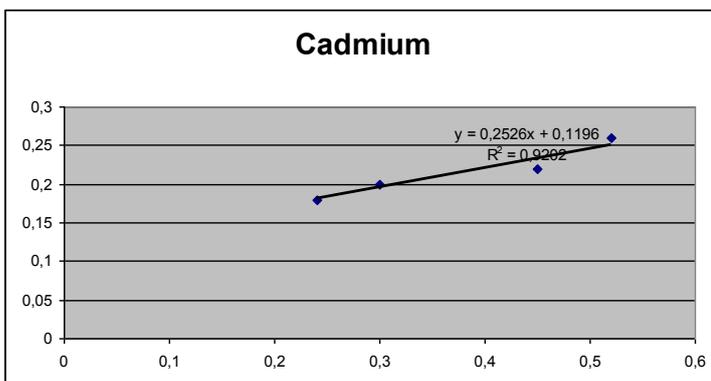
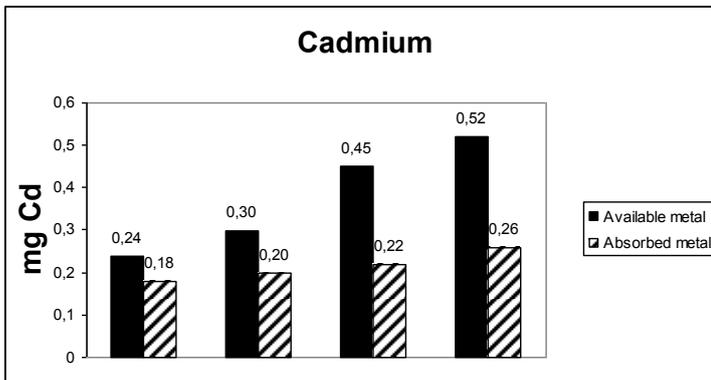
Figura 29. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *W. anomalus* nei confronti del Nickel.





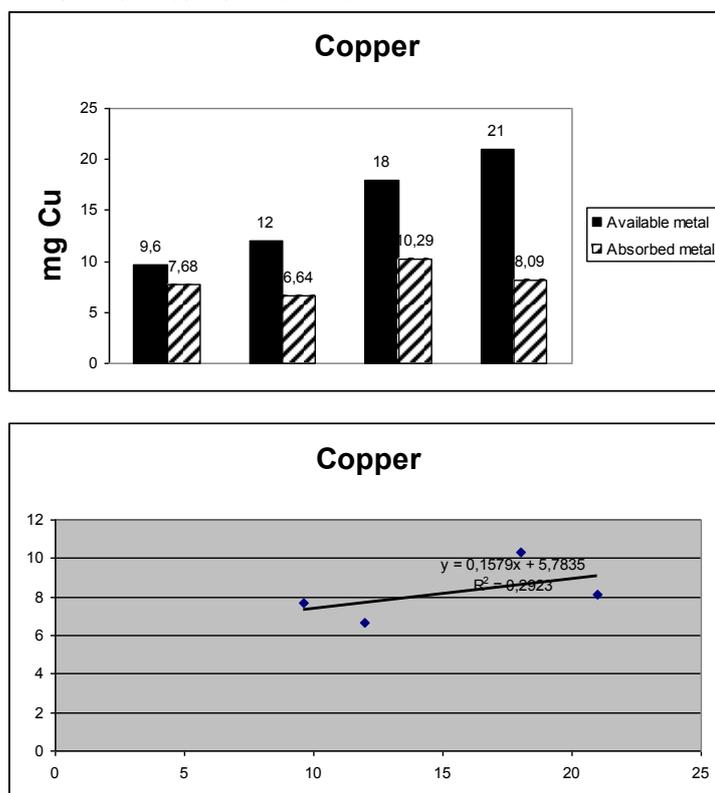
Per quanto riguarda l'esposizione al Cd, *W. anomalus* ha mostrato una buona capacità di assorbimento, con un leggero incremento, in termini di valori assoluti, dalla prima alla quarta concentrazione (Fig. 30). I valori percentuali mostrano un decremento dell'assorbimento (75%; 66.67%; 48.89%; 50%) al crescere delle dosi di esposizione, nonostante la biomassa prodotta abbia subito leggere variazioni nel corso degli esperimenti (vedi Tab. 14). Entrambi i coefficienti di correlazione indicano una forte correlazione ($R^2=0.9202$; $\rho=1$).

Figura 30. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *W. anomalus* nei confronti del Cadmio.



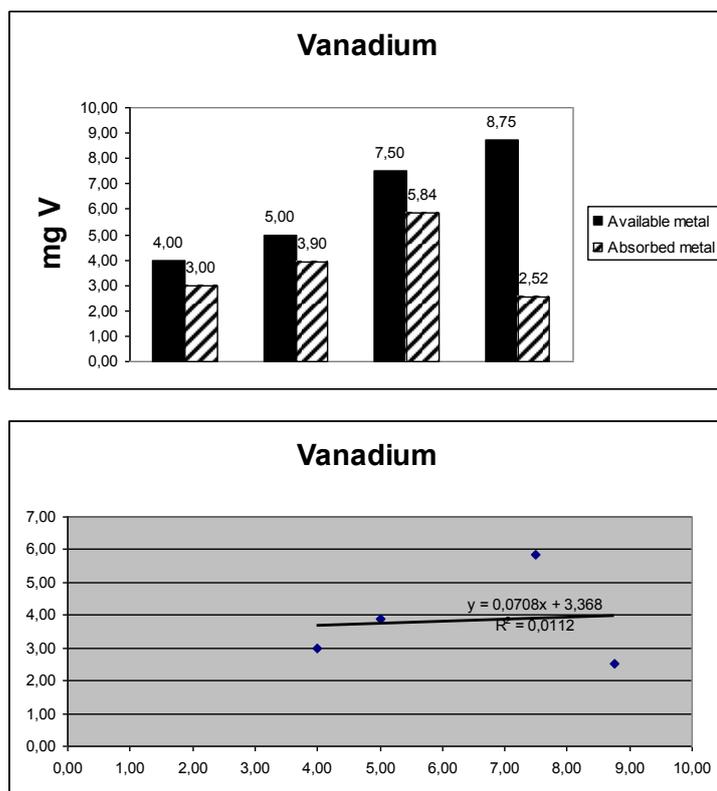
In seguito all'esposizione al Cu, *W. anomalus* mostra un andamento decrescente in termini di valori percentuali di assorbimento (80%; 55.33%; 57.17%; 38.52%) in riferimento al rapporto metallo biodisponibile-metallo assorbito (Fig. 31). Il peso della biomassa prodotta si mantiene praticamente costante nei quattro casi differenti (vedi Tab. 14). Il coefficiente della retta di regressione e la rho di Spearman segnalano una scarsa correlazione tra aumento della biodisponibilità e bioassorbimento ($R^2 = 0.2923$; $\rho = 0.6$).

Figura 31. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *W. anomalus* nei confronti del Rame.



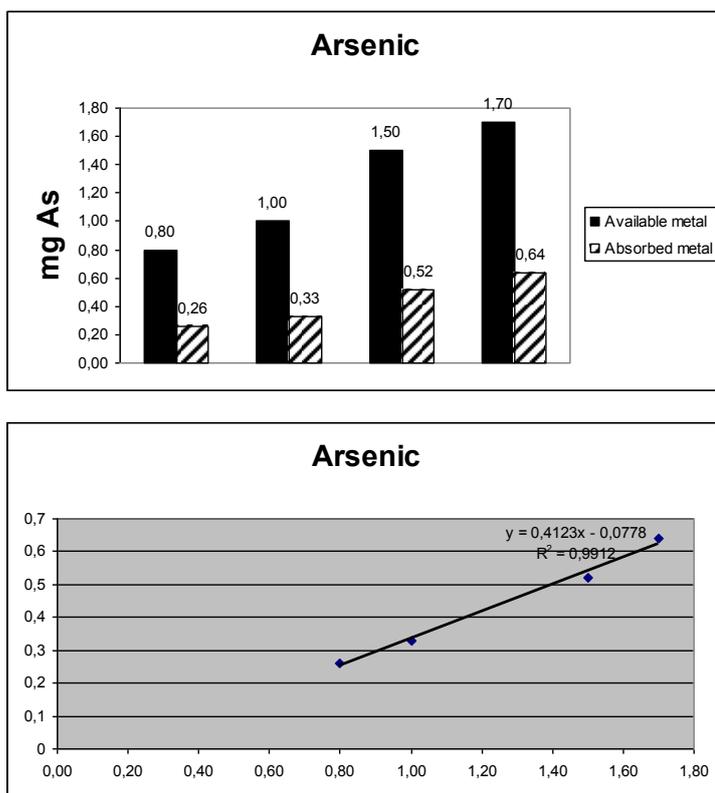
W. anomalus, in seguito ad esposizione al V, ha mostrato un'iniziale correlazione di proporzionalità diretta tra aumento della biodisponibilità del metallo e capacità di assorbimento, per poi subire un brusco decremento alla quarta dose di esposizione (Fig. 32). Ciò è rispecchiato anche dai valori percentuali di assorbimento (75%; 78%; 77.87; 28.8%). Mentre l'ultimo caso potrebbe essere spiegato dalla bassa resa di biomassa prodotta dal lievito, nel terzo caso, paradossalmente, assistiamo ad un incremento della capacità di bioassorbimento nonostante la bassa produzione di biomassa, che a sua volta è confrontabile con quella ottenuta nel quarto caso (vedi Tab. 14). Entrambi i coefficienti di correlazione evidenziano l'assenza di correlazione tra le variabili ($R^2 = 0.011$; $\rho = 0.2$).

Figura 32. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *W. anomalus* nei confronti del Vanadio.



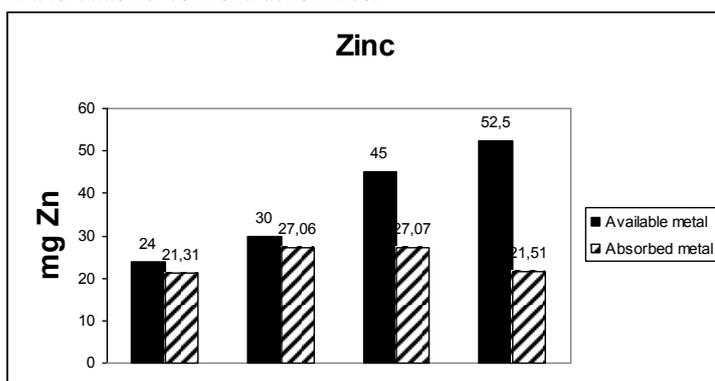
Nei confronti dell'As (Fig. 33), *W. anomalus* ha palesato una crescente capacità di assorbimento al crescere delle concentrazione di esposizione, con un leggero e graduale incremento dei valori percentuali della capacità di assorbimento (32.5%; 33%; 34.67%; 37.65%). Contrariamente a quanto è avvenuto per i valori di assorbimento, la biomassa fungina ha subito un decremento nel corso dei quattro esperimenti a concentrazioni diverse (vedi Tab. 14), pertanto, in questo caso, l'assorbimento appare principalmente influenzato da fattori che non riguardano la superficie disponibile. Il coefficiente della retta di regressione ($R^2 = 0.9912$) e la rho di Spearman ($\rho = 1$) evidenziano una forte correlazione tra le variabili.

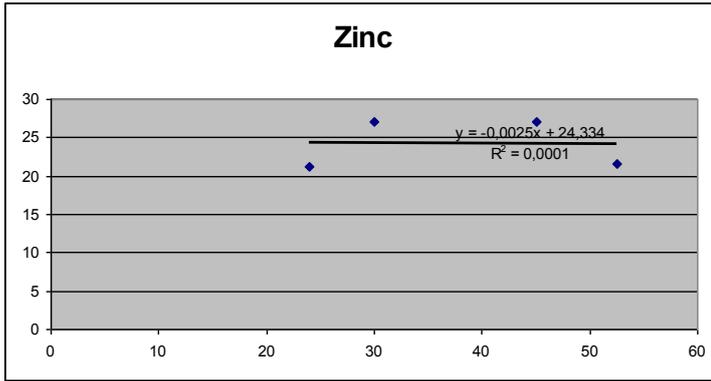
Figura 33. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *W. anomalus* nei confronti dell'Arsenico.



Le esposizioni allo Zn evidenziano un andamento percentuale decrescente (88.79%; 90.2%; 60.16%; 40.97%) riguardo l'assorbimento da parte del lievito (Fig. 34); osserviamo dei valori più alti per le prime tre concentrazioni a fronte di una quantità di biomassa prodotta più o meno stabile e un decremento alla quarta concentrazione con una relativa diminuzione della biomassa (vedi Tab. 14). Il coefficiente di correlazione della retta di regressione e la rho di Spearman mostrano assenza di correlazione ($R^2 = 0.0001$; $\rho = 0.4$).

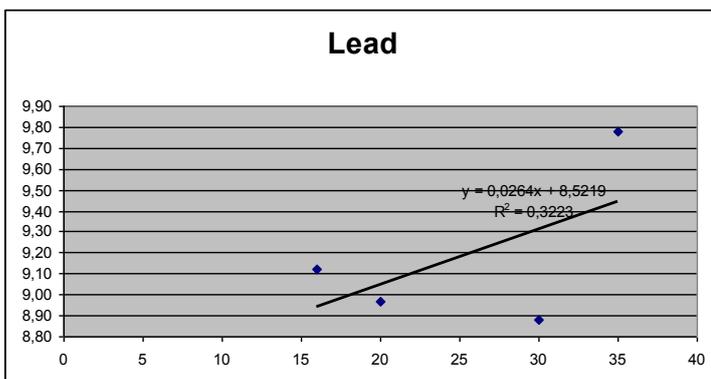
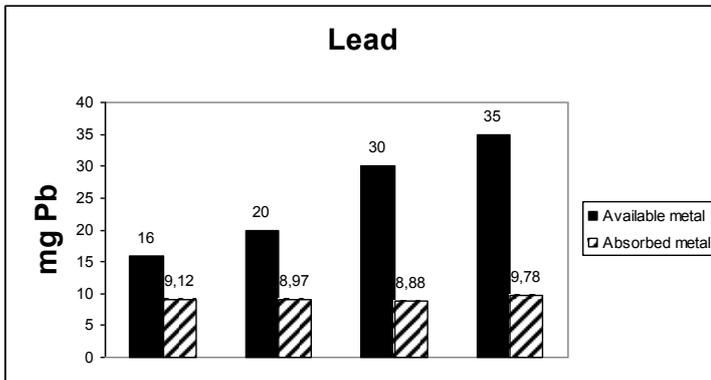
Figura 34. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *W. anomalus* nei confronti dello Zinco.





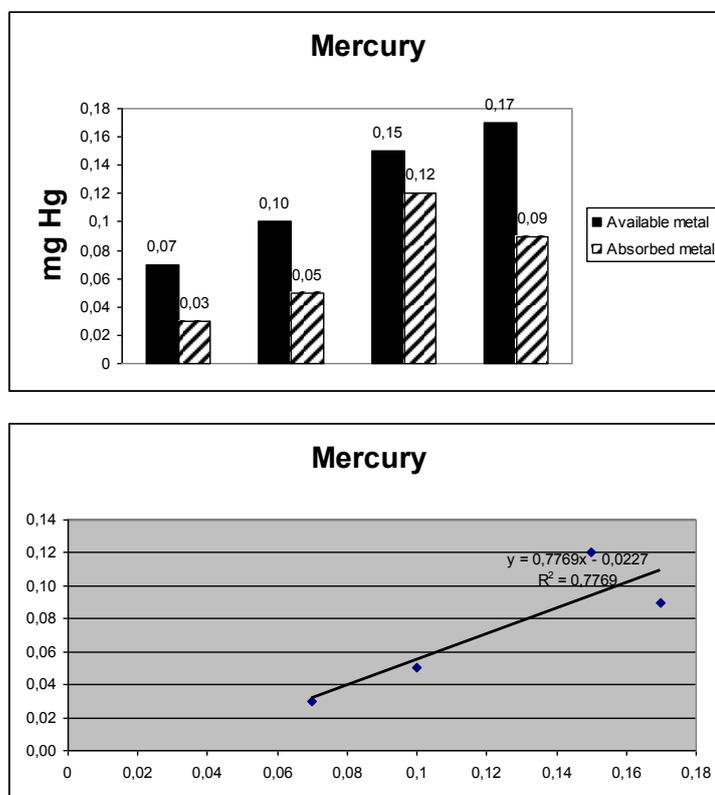
Nei confronti del Pb (Fig. 35), *W. anomalus* ha mostrato un leggero aumento della biomassa dalla prima alla quarta dose di esposizione (vedi Tab. 14), sebbene la capacità di assorbire il metallo è rimasta all'incirca costante in tutti e quattro i casi, restituendo dei valori percentuali di assorbimento via via decrescenti (57%; 44.85%; 29.3%; 27.94%). Quindi, anche nel caso del Pb, la capacità di bioassorbimento non sembra essere correlata all'aumento di biomassa del lievito. Entrambi i coefficienti di correlazione indicano assenza di correlazione tra le due variabili ($R^2 = 0.3223$; $\rho = 0.2$).

Figura 35. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *W. anomalus* nei confronti del Piombo.



L'esposizione al Hg, come si evince dai valori percentuali (42.86%; 50%; 80%; 52.94%) non ha mostrato un andamento regolare della capacità di assorbimento da parte di *W. anomalus* (Fig. 36). Tale andamento, inoltre, non è relazionabile ai valori della biomassa prodotta che, a parte il secondo caso di esposizione, si mantiene più o meno costante (vedi Tab. 14). Il coefficiente di correlazione della retta di regressione indica una discreta correlazione ($R^2 = 0.7769$), mentre la rho di Spearman ha un valore di rho = 0.8. Dato l'andamento dei valori di assorbimento, però, sarebbe più prudente rifiutare l'ipotesi di una correlazione tra le due variabili.

Figura 36. Grafici dei dati ottenuti dagli esperimenti di bioassorbimento di *P. anomala* nei confronti del Mercurio.



Anche in questo caso, come visto in precedenza per *T. harzianum* ed *S. cerevisiae*, abbiamo riscontrato un problema di crescita di in seguito all'esposizione al Cr, dovuto ad un pH eccessivamente basso (< 2) palesato dal brodo di coltura dopo averlo fortificato con il metallo oggetto della sperimentazione.

6.2. Valori di assorbimento dei metalli dopo fitorimediazione con *A. donax* e *A. donax* micorrizata con *T. harzianum*

Come riportato nel *paragrafo 5.2.*, la specie vegetale selezionata per il processo di fitorimediazione è stata *Arundo donax*; invece, per quanto concerne i microrganismi, a seguito dei test *in vitro*, la scelta è ricaduta su *T. harzianum*. Le prove sperimentali, quindi, hanno visto l'impiego di *A. donax* con e senza l'assistenza di *T. harzianum* così da valutare la capacità di fitorimediazione della pianta in entrambi i casi sperimentali (Fig. 37). Come mostrato nel *paragrafo 5.6.1.*, sono state effettuate tre repliche per ogni campione e per ogni dose di esposizione più i rispettivi controlli.

Figura 37. *A. donax* al II, IV e VI mese d'impianto.



In tabella 15 vengono riportati i valori di assorbimento per ogni metallo da parte di *A. donax* (rizoma, culmi, foglie e totale) e i valori di metallo residuo nel suolo. I campioni C1R1 e C2R2 non riportano valori poichè i rizomi posti a dimora non hanno mostrato crescita, probabilmente per lo shock subito durante la messa a dimora. Dalle analisi condotte sul lisciviato acquoso è emersa una perdita media del mix di metalli impiegati del 38.6%.

Tabella 15. Valori di assorbimento dei metalli da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

Ni	Concentrazione iniziale suolo ($\mu\text{g/g}$)	Concentrazione finale suolo ($\mu\text{g/g}$)	Uptake rizoma ($\mu\text{g/g}$)	Uptake culmo ($\mu\text{g/g}$)	Uptake foglie ($\mu\text{g/g}$)	Totale uptake ri+cu+foglio ($\mu\text{g/g}$)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	500	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	500	243.946	180.342	5.549	27.354	213.245	42.65	0.43	0.15
C1 R3	500	117.587	53.379	12.153	5.786	71.318	14.3	0.14	0.11

C2 R1	750	389.033	156.520	82.097	7.176	245.793	32.8	0.33	0.05
C2 R2	750	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	750	435.695	144.601	30.278	5.720	180.599	24.1	0.24	0.04

Cd	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+f o (µg/g)	Totale uptake ri+cu+f o (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	15	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	15	4.611	3.972	0.960	0.902	5.834	38.9	0.39	0.23
C1 R3	15	8.096	3.016	1.673	0.604	5.293	35.3	0.35	0.20
C2 R1	22.5	2.189	5.873	3.410	0.115	9.399	41.8	0.42	0.02
C2 R2	22.5	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	22.5	8.981	6.881	3.256	1.902	12.039	53.5	0.54	0.28

Cu	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+f o (µg/g)	Totale uptake ri+cu+f o (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	600	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	600	151.849	166.280	6.635	8.683	181.599	30.3	0.30	0.05
C1 R3	600	131.545	125.513	15.790	6.945	148.248	24.7	0.25	0.06
C2 R1	900	176.495	221.679	159.062	7.152	387.893	43.1	0.43	0.03
C2 R2	900	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	900	344.057	255.671	33.675	6.855	296.201	32.9	0.33	0.03

V	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+f o (µg/g)	Totale uptake ri+cu+f o (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	250	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	250	100.560	61.777	4.624	2.047	68.448	27.4	0.27	0.03
C1 R3	250	125.623	100.129	16.900	0.495	117.524	47	0.47	0.005
C2 R1	375	103.852	38.675	38.776	1.706	79.157	31.7	0.21	0.04
C2 R2	375	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	375	99.661	68.442	51.607	0.928	120.976	32.3	0.32	0.01

As	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+f o (µg/g)	Totale uptake ri+cu+f o (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	50	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	50	3.959	4.812	0.737	0.482	6.031	12.1	0.12	0.10
C1 R3	50	32.202	11.692	3.208	0.277	15.177	30.4	0.30	0.02
C2 R1	75	38.651	10.876	12.611	0.331	23.818	31.8	0.32	0.03
C2 R2	75	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	75	39.447	5.637	10.640	0.240	16.518	22	0.22	0.04

Zn	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+fo (µg/g)	Totale uptake ri+cu+fo (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	1500	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	1500	299.743	359.696	22.396	31.473	413.565	27.6	0.28	0.09
C1 R3	1500	194.374	105.739	28.243	23.913	157.895	10.5	0.11	0.23
C2 R1	2250	622.249	142.119	43.809	20.801	206.729	9.2	0.09	0.15
C2 R2	2250	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	2250	903.309	90.572	23.356	17.749	131.676	5.85	0.06	0.20

Pb	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+fo (µg/g)	Totale uptake ri+cu+fo (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	1000	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	1000	842.996	83.891	27.932	10.044	121.867	12.2	0.12	0.12
C1 R3	1000	408.596	111.553	165.90	2.539	279.995	27.9	0.28	0.02
C2 R1	1500	743.945	398.791	144.03	7.428	550.247	36.7	0.37	0.02
C2 R2	1500	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	1500	1087.293	85.806	48.503	3.414	137.723	9.2	0.09	0.04

Cr	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+fo (µg/g)	Totale uptake ri+cu+fo (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	800	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	800	51.289	45.999	1.072	0.676	47.747	6	0.06	0.01
C1 R3	800	50.797	27.519	3.564	0.542	31.626	4	0.04	0.02
C2 R1	1200	68.336	44.327	12.597	0.357	57.280	4.8	0.05	0.01
C2 R2	1200	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	1200	70.662	36.799	2.287	0.303	39.390	3.3	0.03	0.01

Hg	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+fo (µg/g)	Totale uptake ri+cu+fo (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	5	/	/	/	/	/	/	/	/
C1 R2	5	1.852	1.860	0.500	0.272	2.632	52.6	0.53	0.15
C1 R3	5	0.386	1.434	0.096	0.039	1.569	31.4	0.31	0.03
C2 R1	7.5	3.672	1.903	0.183	0.199	2.284	30.4	0.30	0.10
C2 R2	7.5	/	/	/	/	/	/	/	/
C2 R3	7.5	2.238	3.204	0.650	0.770	4.623	61.6	0.62	0.24

* ri = rizoma; cu = culmi; fo = foglie.

Osservando la tabella 15, è possibile notare come le maggiori percentuali di accumulo sono a carico dei rizomi, tenendo conto anche della maggiore biomassa prodotta da quest'ultimi rispetto ai culmi e soprattutto alle foglie. Sebbene l'andamento dell'assorbimento sia rizoma>culmi>foglie per la maggior parte dei metalli testati, riscontriamo un andamento rizoma>foglie>culmi per Ni e Zn alla concentrazione 1 e per il Hg alla concentrazione 2. L'assorbimento percentuale è dato dalla media dei valori ottenuti dalle tre repliche indipendenti per ognuna delle due dosi di esposizione, in relazione alla concentrazione iniziale addizionata al suolo. Il fattore di bioaccumulo (BAF) indica che tutte le piante hanno mostrato abilità nell'accumulare i metalli a cui sono state esposte; il fattore di traslocazione (TF), cioè l'abilità della pianta a trasferire i metalli dall'apparato radicale alle foglie, indica che comunque vi è stato un trasferimento, seppur modesto al VII mese di impianto, ma che potrebbe di certo aumentare con un maggiore tempo di esercizio. In generale, una specie può essere considerata traslocatrice quando presenta un $TF > 1$, invece, più basso è tale indice, più la specie può essere considerata una candidata per le tecniche di fitostabilizzazione [Andini, 2009]. Nei seguenti grafici, i valori di assorbimento di ogni metallo testato da parte della pianta sono dati dalla somma dei valori medi espressi da rizoma, culmi e foglie.

Figura 37. Valori di assorbimento del nichel da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

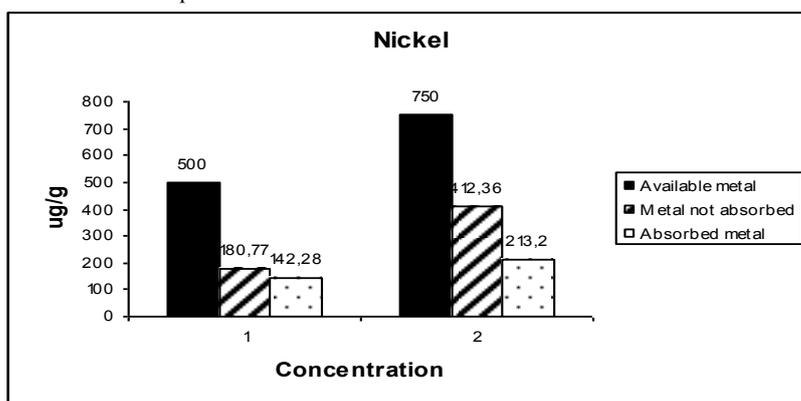
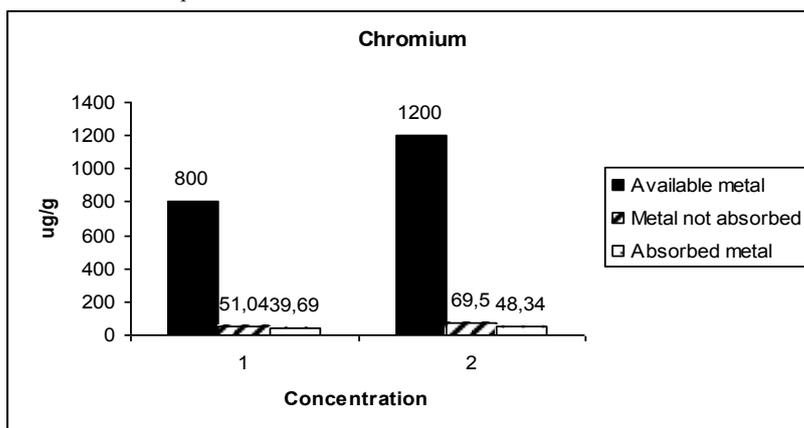


Figura 38. Valori di assorbimento del cromo da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.



Rapportando i valori dei metalli biodisponibili al momento dell'impianto con i valori dei metalli assorbiti da *A. donax* al settimo mese, notiamo che per il Ni e il Cr (Fig. 37 e 38) vi è un assorbimento medio costante in seguito ad esposizione alla I e alla II dose di esposizione (rispettivamente 28.5% e 28.4% per Ni; 4.6% e 4% per Cr).

Figura 39. Valori di assorbimento del cadmio da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

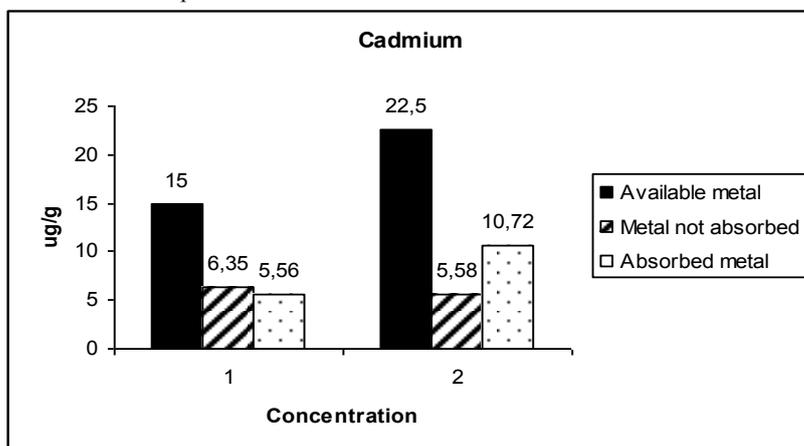


Figura 40. Valori di assorbimento del rame da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

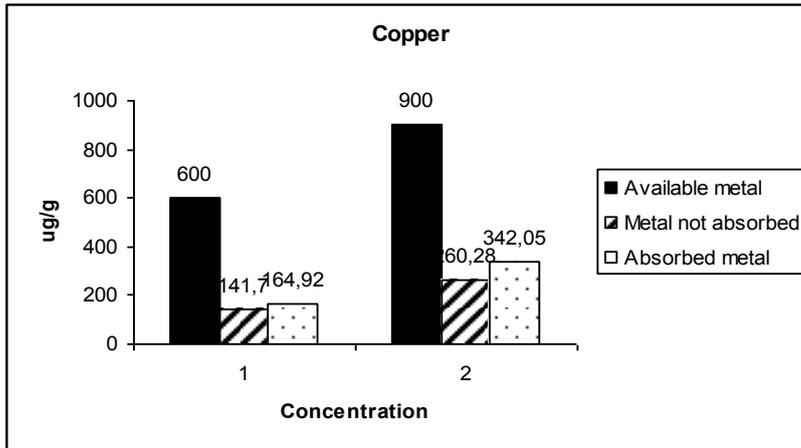


Figura 41. Valori di assorbimento dell'arsenico da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

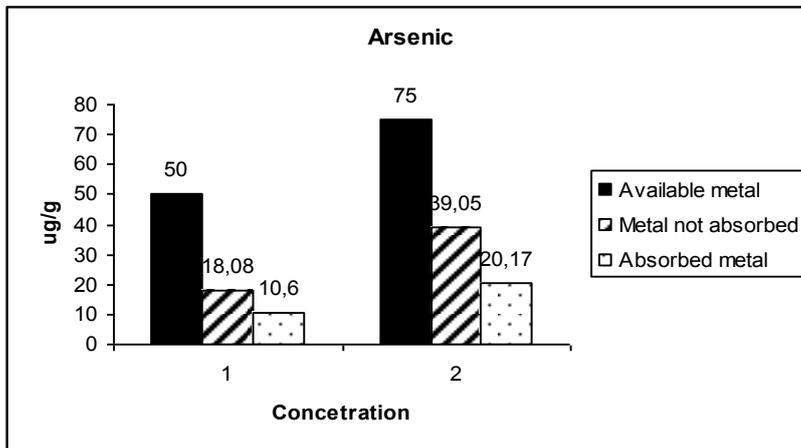


Figura 42. Valori di assorbimento del piombo da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

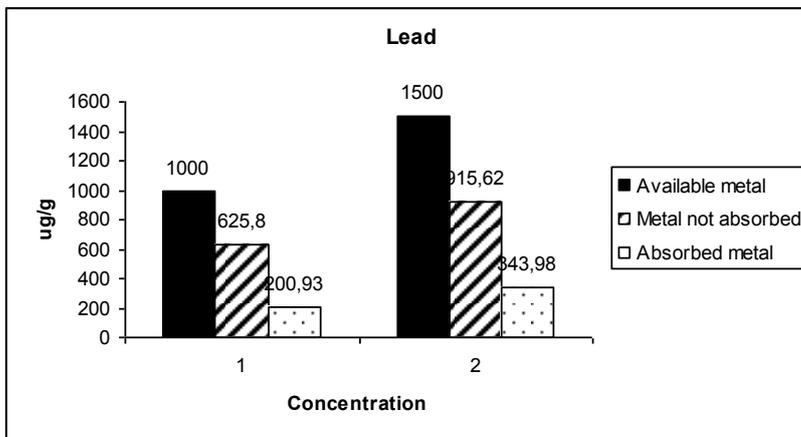
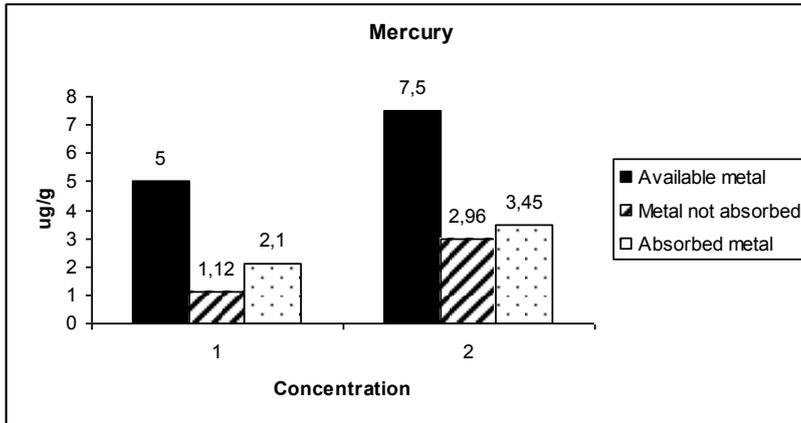


Figura 43. Valori di assorbimento del mercurio da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.



Nei confronti di Cd, Cu, As, Pb e Hg (Fig. 39-43), il rapporto metallo biodisponibile-metallo assorbito presenta un assorbimento medio percentuale crescente al crescere della dose di esposizione (rispettivamente 37.1% e 47.6% per Cd; 27.5% e 38% per Cu; 21.2% e 26.9% As; 20.1% e 22.9% per Pb; 42% e 46% per Hg).

Figura 44. Valori di assorbimento del vanadio da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

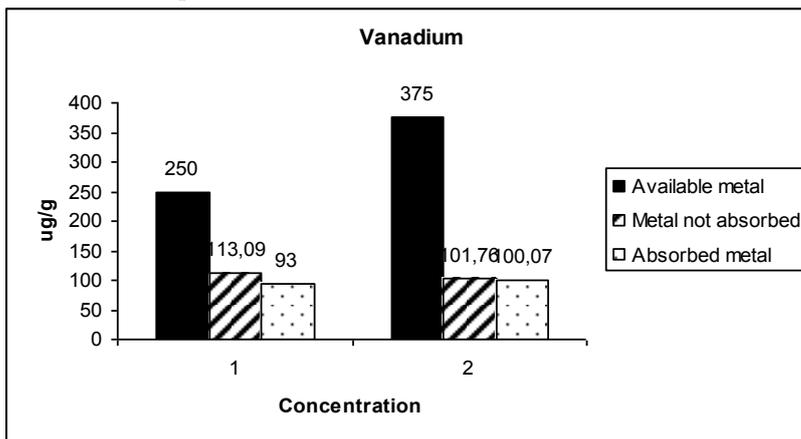
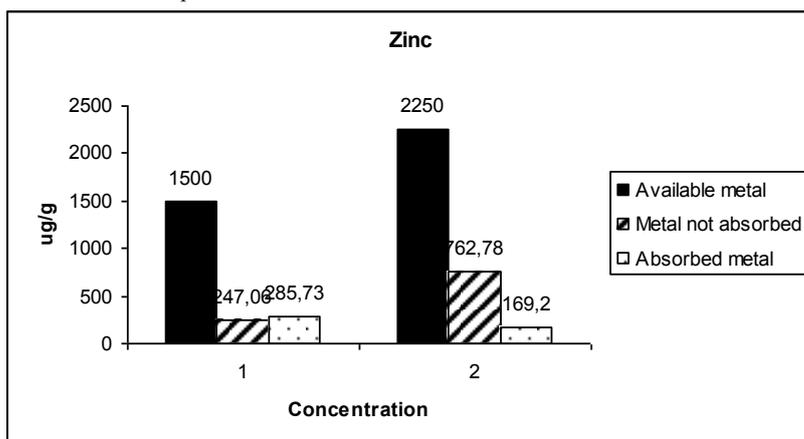


Figura 45. Valori di assorbimento dello zinco da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.



Solo nei confronti del V (37.2% e 26.8%) e dello Zn (19.05% e 7.5%) il rapporto metallo biodisponibile-metallo assorbito presenta un assorbimento medio percentuale decrescente al crescere della dose di esposizione (Fig. 44 e 45), probabilmente dovuto ad un effetto di saturazione nei confronti della seconda dose di esposizione.

In tabella 16 vengono riportati i valori di assorbimento per ogni metallo da parte di *A. donax* (rizoma, culmi, foglie e totale) micorrizata con *T. harzianum* e, i valori di metallo residuo nel suolo. In questo caso non abbiamo avuto nessuna mortalità dei campioni in esame. Dalle analisi condotte sul lisciviato acquoso è emersa una perdita media del mix di metalli impiegati del 45.5%.

Tabella 16. Valori di assorbimento dei metalli da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

Ni	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	500	311.037	22.793	15.895	9.117	47.805	9.6	0.10	0.40
C1 R2	500	316.494	123.433	7.020	2.087	132.539	26.5	0.27	0.02
C1 R3	500	245.670	184.785	19.511	26.188	230.485	46.1	0.46	0.14
C2 R1	750	185.230	192.269	61.103	13.958	267.330	35.6	0.36	0.07
C2 R2	750	110.142	196.816	79.895	18.709	295.420	39.4	0.39	0.10
C2 R3	750	134.677	197.331	80.140	24.239	301.710	40.2	0.40	0.12

Cd	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	15	5.543	3.048	2.456	1.223	6.727	44.8	0.45	0.40

C1 R2	15	6.833	5.021	1.496	0.173	6.690	44.6	0.45	0.03
C1 R3	15	8.134	3.435	1.323	1.723	6.481	43.2	0.43	0.50
C2 R1	22.5	8.795	8.135	2.691	1.076	11.902	52.9	0.53	0.13
C2 R2	22.5	11.236	4.047	3.659	3.836	11.542	51.3	0.51	0.95
C2 R3	22.5	16.916	1.867	1.152	1.884	4.903	21.8	0.22	1.01

Cu	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	600	227.295	208.90	7.966	5.862	222.726	37.1	0.37	0.03
C1 R2	600	313.946	174.53	10.170	4.262	188.964	31.5	0.31	0.02
C1 R3	600	208.249	204.55	32.762	7.262	244.571	40.8	0.41	0.04
C2 R1	900	223.071	201.09	64.867	23.588	289.548	32.2	0.32	0.12
C2 R2	900	208.390	131.25	72.632	14.350	218.229	24.2	0.24	0.11
C2 R3	900	229.012	211.12	54.367	10.648	276.132	30.7	0.31	0.05

V	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	250	159.075	32.198	7.501	0.759	40.458	16.2	0.16	0.02
C1 R2	250	184.855	38.032	7.873	0.360	46.266	18.5	0.19	0.01
C1 R3	250	194.730	23.448	7.385	6.721	37.103	14.8	0.15	0.29
C2 R1	375	96.832	81.210	12.683	8.393	102.286	27.3	0.27	0.10
C2 R2	375	82.283	30.244	15.789	10.551	56.584	15.1	0.15	0.35
C2 R3	375	83.071	37.816	21.383	9.753	68.952	18.4	0.18	0.26

As	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	50	20.313	8.155	1.452	0.260	9.866	19.7	0.20	0.03
C1 R2	50	20.574	5.591	1.751	0.157	7.499	15	0.15	0.03
C1 R3	50	39.066	3.281	3.252	0.946	7.480	15	0.15	0.29
C2 R1	75	17.174	3.201	1.862	4.199	9.262	12.3	0.12	1.31
C2 R2	75	9.968	9.452	14.332	1.900	25.684	34.2	0.34	0.20
C2 R3	75	18.106	9.707	4.721	1.578	16.006	21.3	0.21	0.16

Zn	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	1500	401.597	113.32	33.715	22.125	169.155	11.3	0.11	0.20
C1 R2	1500	663.730	216.18	25.237	18.263	259.675	17.3	0.17	0.08
C1 R3	1500	689.343	82.672	54.981	51	188.653	12.6	0.13	0.62
C2 R1	2250	112.072	102.41	27.090	27.275	156.773	7	0.07	0.27
C2 R2	2250	126.545	102.46	32.916	25.910	161.287	7.2	0.07	0.25

C2 R3	2250	116.715	98.575	54.795	23.737	177.107	7.9	0.08	0.24
--------------	------	---------	--------	--------	--------	----------------	------------	-------------	-------------

Pb	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	1000	241.393	236.55	49.392	5.326	291.267	29.1	0.29	0.02
C1 R2	1000	295.393	258.55	59.303	2.187	320.039	32	0.32	0.01
C1 R3	1000	301.393	376.55	285.55	43.672	705.774	70.6	0.71	0.12
C2 R1	1500	444.632	610.21	81.362	176.49	868.064	57.9	0.58	0.29
C2 R2	1500	416.806	741.06	95.038	79.701	915.795	61	0.61	0.11
C2 R3	1500	465.632	455.21	124.36	59.204	638.777	42.6	0.43	0.13

Cr	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	800	53.194	74.582	1.006	0.625	76.213	9.5	0.10	0.01
C1 R2	800	52.429	34.707	1.274	0.509	36.490	4.6	0.05	0.01
C1 R3	800	57.236	55.378	13.659	0.832	69.870	8.7	0.09	0.02
C2 R1	1200	72.180	45.958	5.980	2.247	54.186	4.5	0.05	0.05
C2 R2	1200	67.583	60.201	8.114	1.127	69.442	5.8	0.06	0.02
C2 R3	1200	72.348	75.038	7.708	0.884	83.629	7	0.07	0.01

Hg	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Concentrazione e finale suolo (µg/g)	Uptake rizoma (µg/g)	Uptake culmo (µg/g)	Uptake foglie (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (µg/g)	Totale uptake ri+cu+foglio (%)	Fattore di bioaccumulo (BAF)	Fattore di traslocazione (TF)
C1 R1	5	1.694	1.139	0.993	0.422	2.554	51.1	0.51	0.37
C1 R2	5	1.806	0.949	0.524	0.123	1.597	31.9	0.32	0.13
C1 R3	5	2.258	1.312	0.923	0.166	2.401	48.02	0.48	0.13
C2 R1	7.5	1.376	3.169	0.885	0.431	4.486	59.8	0.60	0.14
C2 R2	7.5	1.019	3.489	0.801	0.263	4.552	60.7	0.61	0.08
C2 R3	7.5	2.087	3.758	0.380	0.382	4.521	60.3	0.60	0.10

Esaminando la tabella 16, anche in questo caso, è possibile notare come le maggiori percentuali di accumulo sono a carico dei rizomi, tenendo conto anche della maggiore biomassa prodotta da quest'ultimi rispetto a culmi e soprattutto foglie. Sebbene l'andamento dell'assorbimento sia rizoma>culmi>foglie per la maggior parte dei metalli testati, riscontriamo per il Ni alla I concentrazione e il Cd alla II concentrazione, una percentuale di assorbimento delle foglie pressoché uguale a quella evidenziata dai culmi e, per il Pb alla II concentrazione, una percentuale di assorbimento delle foglie maggiore rispetto ai culmi. Inoltre, notiamo un netto aumento dell'assorbimento percentuale dei metalli impiegati da parte delle foglie e, in generale, di tutta la pianta micorrizzata. Infatti, il fungo

T. harzianum ha svolto a pieno il suo compito, migliorando le capacità di assorbimento e quindi fitoestrattive, da parte di *A. donax* nei confronti dei metalli testati. Solo nei confronti del Vanadio, *A. donax* micorrizata ha mostrato dei valori di assorbimento inferiori rispetto ad *A. donax* non micorrizata, nonostante le prove *in vitro* abbiano dimostrato una buona capacità di bioaccumulo del metallo da parte di *T. harzianum*.

L'assorbimento percentuale è dato dalla media dei valori ottenuti dalle tre repliche indipendenti per ognuna delle due dosi di esposizione, in relazione alla concentrazione iniziale addizionata al suolo. L'aumento riscontrato nelle piante micorrizzate viene confermato anche dai due indici BAF e TF; quest'ultimo, in particolare, dimostra come l'intervento di *T. harzianum* aiuti le capacità fitoestrattive della pianta favorendo una maggiore traslocazione dei metalli dall'apparato radicale alle foglie.

Nei grafici, i valori dell'assorbimento di ogni metallo testato da parte della pianta sono dati dalla somma dei valori medi espressi da rizoma, culmi e foglie.

Figura 46. Valori di assorbimento del nichel da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

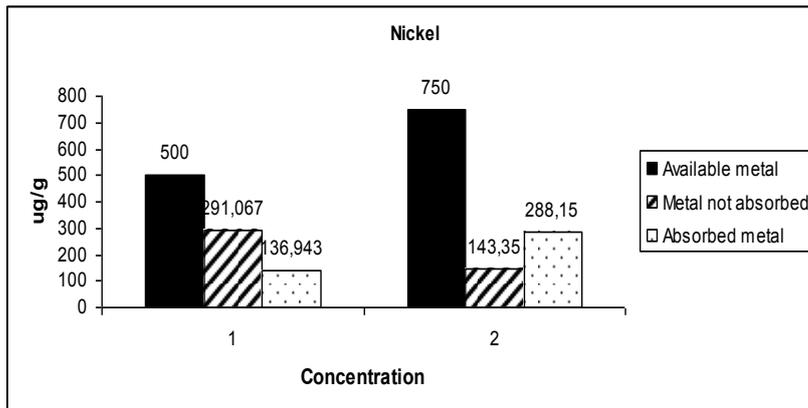


Figura 47. Valori di assorbimento del vanadio da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

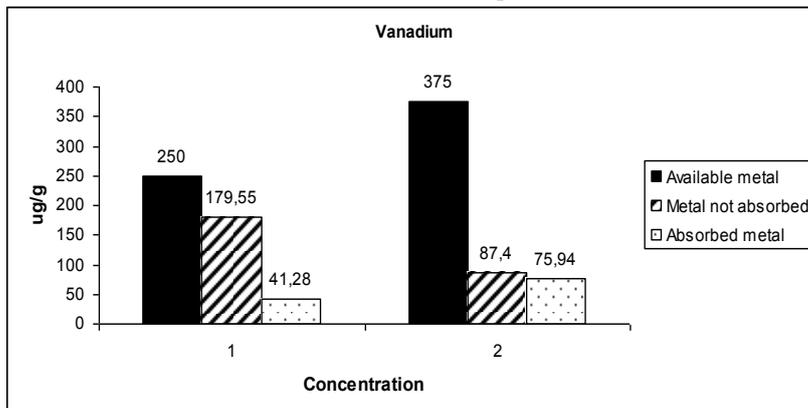


Figura 48. Valori di assorbimento dell'arsenico da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

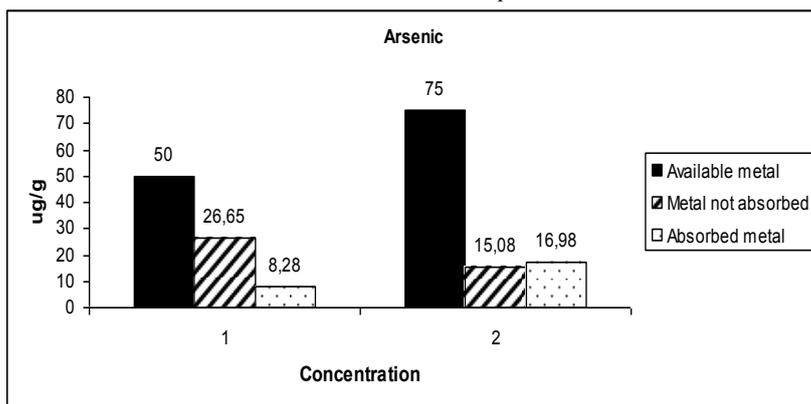


Figura 49. Valori di assorbimento del piombo da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

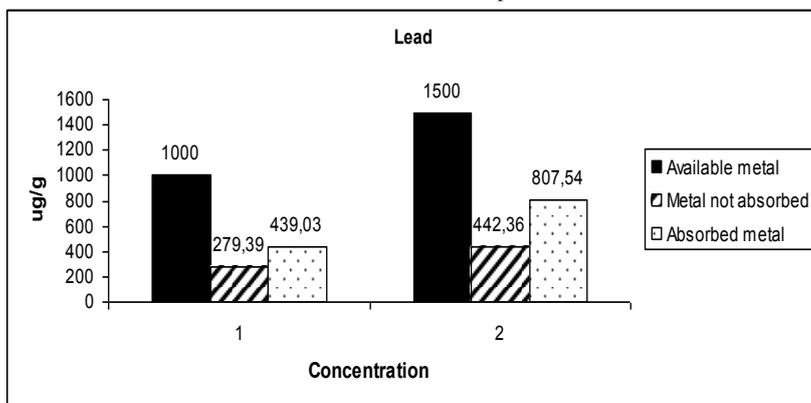
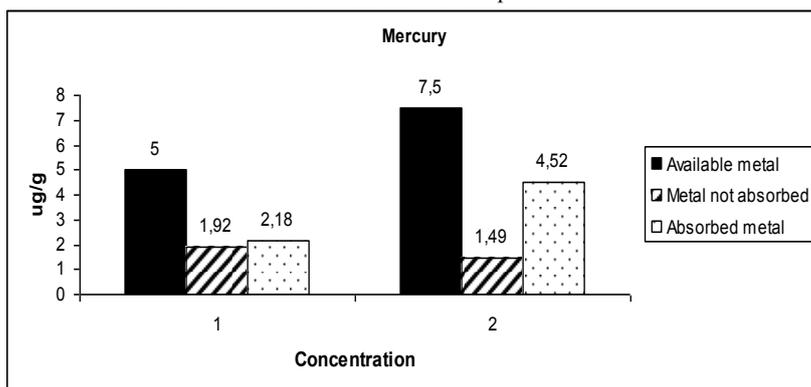


Figura 50. Valori di assorbimento del mercurio da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.



Nei confronti di Ni, V, As, Pb e Hg (Fig. 46-50) il rapporto metallo biodisponibile-metallo assorbito da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum*, presenta un assorbimento medio percentuale crescente al crescere della dose di esposizione (rispettivamente 27.4% e

38.4% per Ni; 16.5% e 20.2% per V; 16.6% e 22.6% per As; 43.9% e 55.8% per Pb; 43.6% e 60.3% per Hg).

Figura 51. Valori di assorbimento del cadmio da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

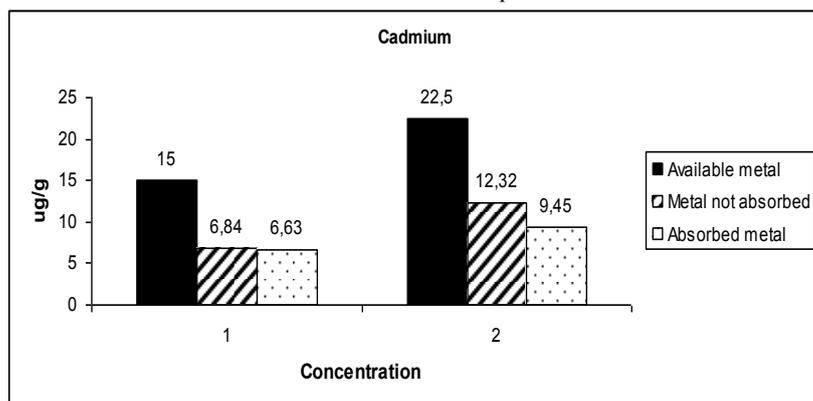


Figura 52. Valori di assorbimento del rame da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

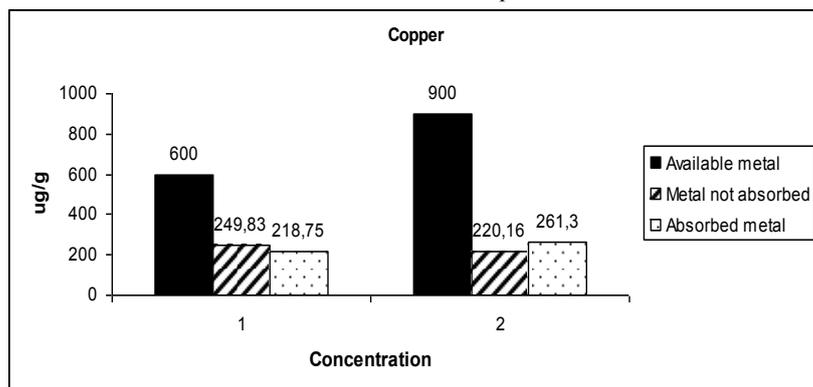


Figura 53. Valori di assorbimento dello zinco da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

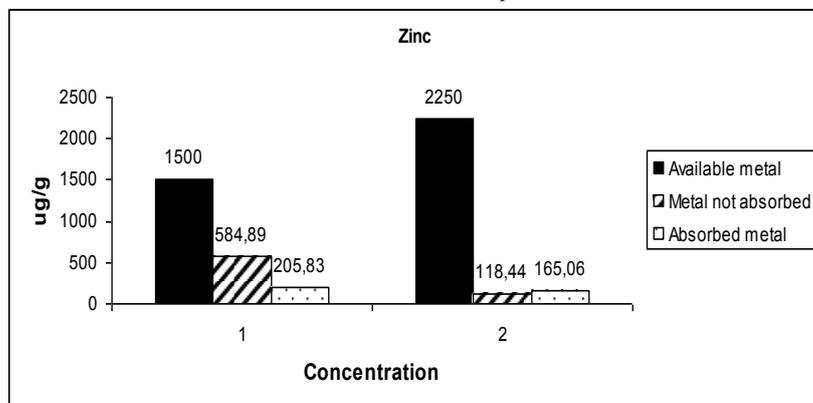
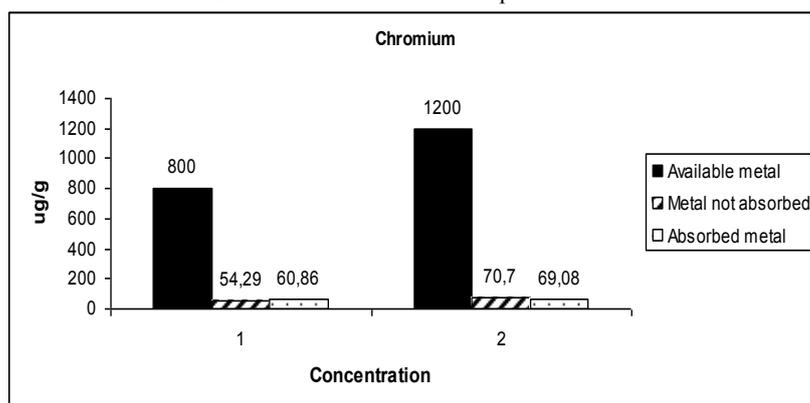


Figura 54. Valori di assorbimento del cromo da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.



Nei confronti di Cd, Cu, Zn e Cr (Fig. 51-54) il rapporto metallo biodisponibile-metallo assorbito da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum*, presenta un assorbimento medio percentuale decrescente al crescere della dose di esposizione (rispettivamente 44.2% e 42% per Cd; 36.4% e 29% per Cu; 13.7% e 7.3% per Zn; 7.6% e 5.8% per Cr) il che lascia pensare che ciò sia dovuto ad un effetto di saturazione nei confronti della seconda dose di esposizione.

Oltre al campionamento finale, è stato effettuato un campionamento intermedio al III mese dell'impianto, relativo alle foglie sia di *A. donax* che di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum*, così da poter monitorare il bioaccumulo dei metalli pesanti lungo il decorso dell'impianto. In tabella 17 e 18 vengono riportati i dati oggetto di studio con il relativo incremento percentuale rilevato alla fine dell'impianto.

Tabella 17. Valori di assorbimento dei metalli da parte di *A. donax* al terzo mese di impianto.

Ni	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	500	/	/	/	/
C1 R2	500	1.934	27.354	25.420	92.3
C1 R3	500	1.604	5.786	4.182	72.3
C2 R1	750	2.843	7.176	4.333	60.4
C2 R2	750	/	/	/	/
C2 R3	750	2.061	5.720	3.658	63.9

Cd	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	15	/	/	/	/
C1 R2	15	0.133	0.902	0.769	85.2
C1 R3	15	0.111	0.604	0.493	81.6
C2 R1	22.5	0.036	0.115	0.079	68.7

C2 R2	22.5	/	/	/	/
C2 R3	22.5	0.096	1.902	1.806	94.9

Cu	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	600	/	/	/	/
C1 R2	600	1.701	8.683	6.983	80.4
C1 R3	600	1.449	6.945	5.496	79.1
C2 R1	900	2.469	7.152	4.683	65.5
C2 R2	900	/	/	/	/
C2 R3	900	1.541	6.855	5.314	77.5

V	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	250	/	/	/	/
C1 R2	250	0.358	2.047	1.689	82.5
C1 R3	250	0.042	0.495	0.452	91.3
C2 R1	375	0.510	1.706	1.196	70.1
C2 R2	375	/	/	/	/
C2 R3	375	0.059	0.928	0.869	93.6

As	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	50	/	/	/	/
C1 R2	50	0.080	0.482	0.401	83.2
C1 R3	50	0.029	0.277	0.249	89.9
C2 R1	75	0.064	0.331	0.267	80.7
C2 R2	75	/	/	/	/
C2 R3	75	0.026	0.240	0.215	89.6

Zn	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	1500	/	/	/	/
C1 R2	1500	13.095	31.473	18.379	57.9
C1 R3	1500	9.402	23.913	14.511	60.7
C2 R1	2250	15.918	20.801	4.883	23.5
C2 R2	2250	/	/	/	/
C2 R3	2250	10.457	17.749	7.291	41.1

Pb	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	1000	/	/	/	/
C1 R2	1000	3.074	10.044	6.970	69.4
C1 R3	1000	0.119	2.539	2.421	95.4
C2 R1	1500	0.790	7.428	6.638	89.4
C2 R2	1500	/	/	/	/
C2 R3	1500	0.210	3.414	3.204	93.8

Cr	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	800	/	/	/	/

C1 R2	800	0.173	0.676	0.503	74.4
C1 R3	800	0.147	0.542	0.395	72.9
C2 R1	1200	0.144	0.357	0.213	59.7
C2 R2	1200	/	/	/	/
C2 R3	1200	0.128	0.303	0.175	57.8

Hg	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	5	/	/	/	/
C1 R2	5	0.048	0.272	0.223	82
C1 R3	5	0.036	0.039	0.003	7.7
C2 R1	7.5	0.069	0.199	0.129	64.8
C2 R2	7.5	/	/	/	/
C2 R3	7.5	0.106	0.770	0.664	86.2

Figura 55. Grafico riportante le percentuali medie di assorbimento al III e VII mese di impianto di *A. donax*.

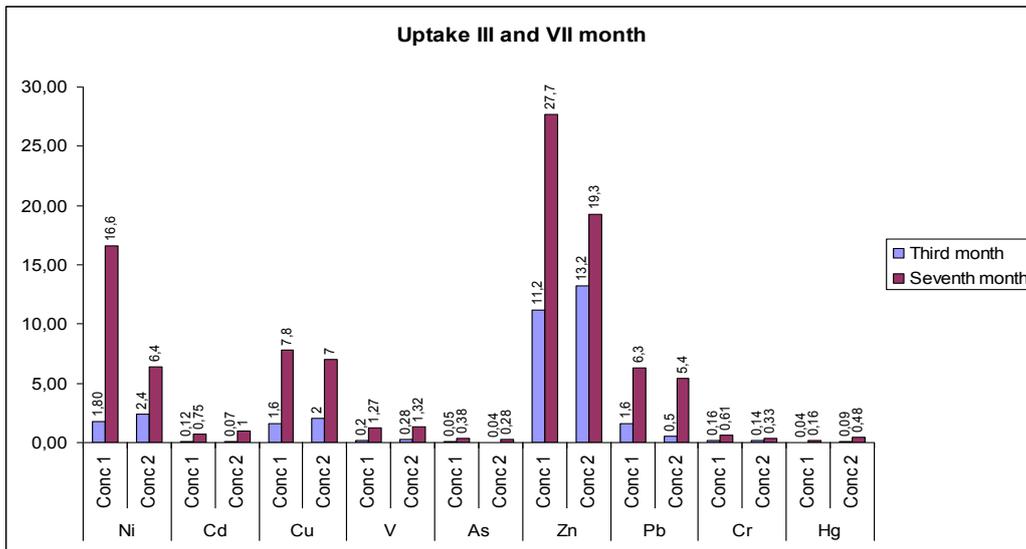


Tabella 18. Valori di assorbimento dei metalli da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al terzo mese di impianto.

Ni	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	500	1.603	9.117	7.514	82.4
C1 R2	500	1.850	2.087	0.238	11.4
C1 R3	500	8.852	26.188	17.606	67.2
C2 R1	750	0.919	13.958	13.039	93.4
C2 R2	750	0.494	18.709	18.215	97.4
C2 R3	750	7.096	24.239	17.143	70.7

Cd	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	15	0.460	1.223	0.763	62.4

C1 R2	15	0.094	0.173	0.079	45.7
C1 R3	15	0.211	1.723	1.512	87.8
C2 R1	22.5	0.351	1.076	0.725	67.4
C2 R2	22.5	0.018	3.836	3.818	99.5
C2 R3	22.5	0.380	1.884	1.504	79.8

Cu	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	600	3.235	5.862	2.627	44.8
C1 R2	600	2.612	4.262	1.650	38.7
C1 R3	600	2.233	7.262	5.029	69.2
C2 R1	900	2.022	23.588	21.565	91.4
C2 R2	900	2.392	14.350	11.958	83.3
C2 R3	900	3.728	10.648	6.920	65

V	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	250	0.225	0.759	0.534	70.4
C1 R2	250	0.135	0.360	0.226	62.8
C1 R3	250	1.868	6.721	4.403	65.5
C2 R1	375	0.075	8.393	8.318	99.1
C2 R2	375	0.087	10.551	10.465	99.2
C2 R3	375	2.078	9.753	7.675	78.7

As	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	50	0.080	0.260	0.180	69.2
C1 R2	50	0.076	0.157	0.081	51.6
C1 R3	50	0.336	0.946	0.610	64.5
C2 R1	75	0.031	4.199	4.168	99.3
C2 R2	75	0.042	1.900	1.858	97.8
C2 R3	75	0.453	1.578	1.125	71.3

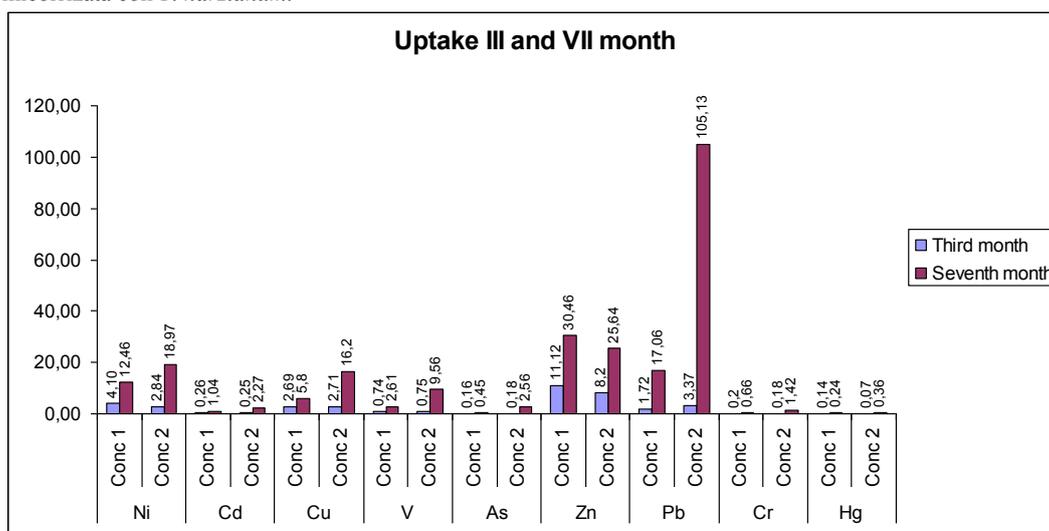
Zn	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	1500	6.645	22.125	15.480	70
C1 R2	1500	11.969	18.263	6.294	34.5
C1 R3	1500	14.736	51	36.264	71.1
C2 R1	2250	6.688	27.275	20.587	75.5
C2 R2	2250	8.971	25.910	16.939	65.4
C2 R3	2250	8.954	23.737	14.784	62.3

Pb	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	1000	1.077	5.326	4.250	79.8
C1 R2	1000	0.564	2.187	1.622	74.2
C1 R3	1000	3.525	43.672	40.147	91.9
C2 R1	1500	0.278	176.491	176.213	99.8
C2 R2	1500	0.262	79.701	79.439	99.7
C2 R3	1500	9.581	59.204	49.623	83.8

Cr	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	800	0.145	0.625	0.480	76.8
C1 R2	800	0.189	0.509	0.320	62.9
C1 R3	800	0.276	0.832	0.556	66.8
C2 R1	1200	0.131	2.247	2.116	94.2
C2 R2	1200	0.109	1.127	1.019	90.4
C2 R3	1200	0.294	0.884	0.590	66.7

Hg	Concentrazione iniziale suolo (µg/g)	Uptake foglie 3 mesi (µg/g)	Uptake foglie 7 mesi (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (µg/g)	Incremento uptake foglie al mese 7 (%)
C1 R1	5	0.184	0.422	0.238	56.4
C1 R2	5	0.122	0.123	0.001	0.81
C1 R3	5	0.118	0.166	0.049	29.5
C2 R1	7.5	0.077	0.431	0.355	82.4
C2 R2	7.5	0.032	0.263	0.230	87.4
C2 R3	7.5	0.114	0.382	0.269	70.4

Figura 56. Grafico riportante le percentuali di assorbimento al III e VII mese di impianto di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum*.



Dai grafici riportati nelle figure 55 e 56, è possibile notare l'aumento medio percentuale dell'assorbimento dei metalli da parte *A. donax* al VII mese di impianto e, in particolare, come *T. harzianum* favorisca un maggior accumulo da parte di *A. donax* nei confronti di Ni, Cd, V, As e Pb.

6.3. Valori degli IPA degradati dai tre microrganismi utilizzati per le prove di esposizione *in vitro*

Ogni microrganismo impiegato nella sperimentazione è stato esposto al mix di 16 IPA prioritari. Come da protocollo, sono state realizzate tre repliche per ognuna delle due dosi di esposizione a cui sono stati esposti *T. harzianum*, *S. cerevisiae* e *W. anomalus*. Ottenuta la percentuale media per ogni IPA non degradato, questa è stata sottratta al valore del rispettivo idrocarburo biodisponibile al momento della sua addizione al brodo di coltura, in modo da ottenere la percentuale media di degradazione per ognuno dei 16 IPA testati (Tabelle 20, 22 e 24). In tabella 19, invece, vengono riportati i pesi medi a secco dei microrganismi che si sono accresciuti in seguito ad esposizione agli IPA.

Tabella 19. Pesi medi (espressi in mg) e deviazione standard dei microrganismi esposti agli IPA.

MICROORGANISMI	CONC 1 14gg	CONC 2 14gg	CONC 1 21gg	CONC 2 21gg
<i>T. harzianum</i>	120 ± 5.72	85 ± 5.35	111 ± 12.36	103 ± 4.55
<i>S. cerevisiae</i>	58.7 ± 3.30	52 ± 2.45	59 ± 2.45	53 ± 7.41
<i>W. anomalus</i>	59 ± 4.32	57 ± 4.08	58 ± 6.16	57 ± 5.72

* Conc 1 = concentrazione 1; Conc 2 = concentrazione 2.

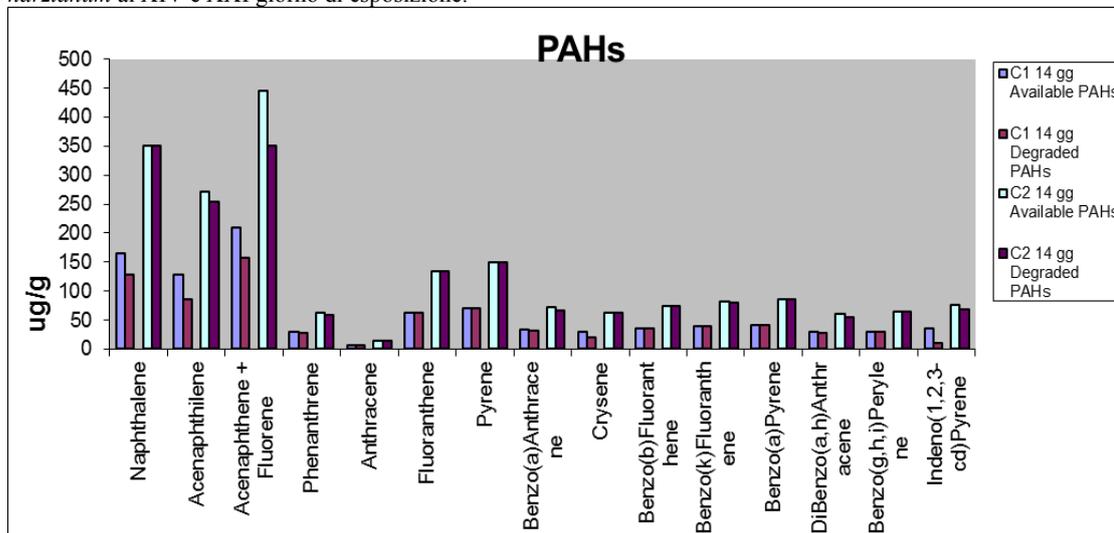
Tabella 20. Valori degli idrocarburi degradati da *T. harzianum* al XIV e XXI giorno di esposizione.

	C1 T 14 gg					C2 T 14 gg				
	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	165,417	36,433	22	128,983	78	350,294	0,000	0	350,294	100
Acenaphthilene	127,833	41,083	32,1	86,750	67,9	270,706	17,471	6,5	253,235	93,5
Acenaphthene + Fluorene	210,333	53,167	25,3	157,167	74,7	445,412	94,716	21,3	350,695	78,7
Phenanthrene	29,333	1,958	6,7	27,375	93,3	62,118	2,506	4,0	59,612	96,0
Anthracene	6,583	0	0	6,583	100	13,941	0,176	1,3	13,765	98,7
Fluoranthene	63,167	0	0	63,167	100	133,765	0,000	0,0	133,765	100
Pyrene	70,583	0	0	70,583	100	149,471	0,000	0,0	149,471	100
Benzo(a)Anthracene	34,083	1,658	4,9	32,425	95,1	72,176	5,635	7,8	66,541	92,2
Crysene	30,000	9,742	32,5	20,258	67,5	63,529	0,000	0,0	63,529	100
Benzo(b)Fluoranthene	34,917	0	0	34,917	100	73,941	0,000	0,0	73,941	100
Benzo(k)Fluoranthene	39,083	0,008	0	39,075	100	82,765	3,176	3,8	79,588	96,2
Benzo(a)Pyrene	40,583	0,000	0	40,583	100	85,941	0,000	0,0	85,941	100
DiBenzo(a,h)Anthracene	29,083	1,533	5,3	27,550	94,7	61,588	7,424	12,1	54,165	87,9
Benzo(g,h,i)Perylene	30,583	1,558	5,1	29,025	94,9	64,765	0,765	1,2	64,000	98,8
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	35,583	25,225	70,9	10,358	29,1	75,353	6,424	8,5	68,929	91,5

	C1 T 21 gg					C2 T 21 gg				
	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	178,829	53,994	30,2	124,835	69,8	289,078	13,624	4,7	275,453	95,3
Acenaphthilene	138,198	39,946	28,9	98,252	71,1	223,398	28,922	12,9	194,476	87,1
Acenaphthene + Fluorene	227,387	51,373	22,6	176,014	77,4	367,573	49,913	13,6	317,660	86,4
Phenanthrene	31,712	1,351	4,3	30,360	95,7	51,262	1,437	2,8	49,825	97,2
Anthracene	7,117	0,387	5,4	6,730	94,6	11,505	0,495	4,3	11,010	95,7
Fluoranthene	68,288	0,000	0	68,288	100	110,388	0	0,0	110,388	100
Pyrene	76,306	0,000	0	76,306	100	123,350	0	0,0	123,350	100
Benzo(a)Anthracene	36,847	0,000	0	36,847	100	59,563	0	0,0	59,563	100
Crysene	32,432	0,000	0	32,432	100	52,427	0	0,0	52,427	100
Benzo(b)Fluoranthene	37,748	0,000	0	37,748	100	61,019	20,942	34,3	40,078	65,7
Benzo(k)Fluoranthene	42,252	13,045	30,9	29,207	69,1	68,301	3,340	4,9	64,961	95,1
Benzo(a)Pyrene	43,874	0,000	0	43,874	100	70,922	0,505	0,7	70,417	99,3
DiBenzo(a,h)Anthracene	31,441	30,135	95,8	1,306	4,2	50,825	31,932	62,8	18,893	37,2
Benzo(g,h,i)Perylene	33,063	1,117	3,4	31,946	96,6	53,447	3,505	6,6	49,942	93,4
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	38,468	4,144	10,8	34,324	89,2	62,184	10,485	16,9	51,699	83,1

* I valori di ogni concentrazione sono ricavati dalla media delle tre repliche di esposizione.

Figura 57. Grafici che riportano l'andamento del rapporto IPA biodisponibile-IPA degradato da parte di *T. harzianum* al XIV e XXI giorno di esposizione.



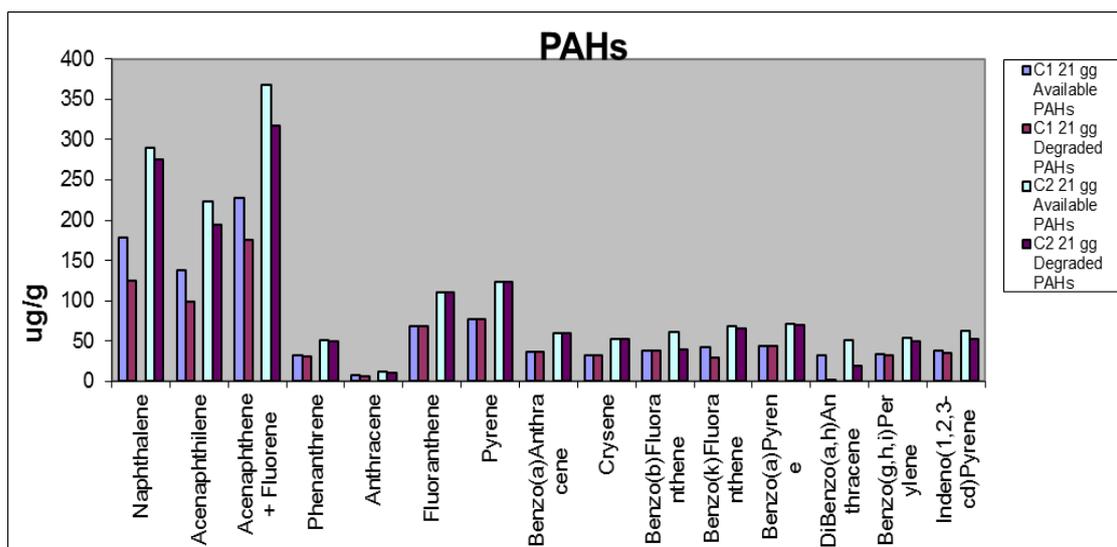


Tabella 21. Valori percentuali degli idrocarburi degradati da *T. harzianum* al XIV e XXI giorno di esposizione.

	C1 T 14 gg (%)	C2 T 14 gg (%)	C1 T 21 gg (%)	C2 T 21 gg (%)
Naphthalene	78,0	100,0	69,8	95,3
Acenaphthilene	67,9	93,5	71,1	87,1
Acenaphthene + Fluorene	74,7	78,7	77,4	86,4
Phenanthrene	93,3	96,0	95,7	97,2
Anthracene	100,0	98,7	94,6	95,7
Fluoranthene	100,0	100,0	100,0	100,0
Pyrene	100,0	100,0	100,0	100,0
Benzo(a)Anthracene	95,1	92,2	100,0	100,0
Crysene	67,5	100,0	100,0	100,0
Benzo(b)Fluoranthene	100,0	100,0	100,0	65,7
Benzo(k)Fluoranthene	100,0	96,2	69,1	95,1
Benzo(a)Pyrene	100,0	100,0	100,0	99,3
DiBenzo(a,h)Anthracene	94,7	87,9	4,2	37,2
Benzo(g,h,i)Perylene	94,9	98,8	96,6	93,4
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	29,1	91,5	89,2	83,1

* I valori di ogni concentrazione sono ricavati dalla media delle tre repliche di esposizione.

Tabella 22. Valori degli idrocarburi degradati da *S. cerevisiae* al XIV e XXI giorno di esposizione.

	C1 S 14 gg					C2 S 14 gg				
	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	336,441	0	0,0	336,441	100	572,596	0,000	0,0	572,596	100
Acenaphthilene	260	44,220	17,0	215,780	83,0	442,500	11,731	2,7	430,769	97,3
Acenaphthene + Fluorene	427,797	220,831	51,6	206,966	48,4	728,077	214,462	29,5	513,615	70,5
Phenanthrene	59,661	2,932	4,9	56,729	95,1	101,538	2,462	2,4	99,077	97,6

Anthracene	13,39 0	0,814	6,1	12,576	93,9	22,788	0,865	3,8	21,923	96,2
Fluoranthene	128,4 75	22,373	17,4	106,102	82,6	218,654	0,000	0,0	218,65 4	100
Pyrene	143,5 59	0	0,0	143,559	100	244,327	0,000	0,0	244,32 7	100
Benzo(a)Anthracene	69,32 2	0	0,0	69,322	100,0	117,981	0,000	0,0	117,98 1	100,0
Crysene	61,01 7	0	0,0	61,017	100,0	103,846	0,000	0,0	103,84 6	100
Benzo(b)Fluoranthene	71,01 7	6,932	9,8	64,085	90,2	120,865	21,212	17,5	99,654	82
Benzo(k)Fluoranthene	79,49 2	6,831	8,6	72,661	91,4	135,288	11,577	8,6	123,71 2	91,4
Benzo(a)Pyrene	82,54 2	0	0,0	82,542	100	140,481	0,000	0,0	140,48 1	100
DiBenzo(a,h)Anthracene	59,15 3	5,068	8,6	54,085	91,4	100,673	0,000	0,0	100,67 3	100,0
Benzo(g,h,i)Perylene	62,20 3	24,644	39,6	37,559	60,4	105,865	0,000	0,0	105,86 5	100,0
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	72,37 3	12,339	17,0	60,034	83,0	123,173	7,327	5,9	115,84 6	94,1
	C1 S 21 gg					C2 S 21 gg				
	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	336,4 41	0,000	0,0	336,441	100,0	561,792	0,000	0,0	561,79 2	100,0
Acenaphthilene	260,0 00	35,373	13,6	224,627	86,4	434,151	82,755	19,1	351,39 6	80,9
Acenaphthene + Fluorene	427,7 97	149,085	34,8	278,712	65,2	714,340	122,596	17,2	591,74 3	82,8
Phenanthrene	59,66 1	0,000	0,0	59,661	100,0	99,623	2,679	2,7	96,943	97,3
Anthracene	13,39 0	1,847	13,8	11,542	86,2	22,358	1,038	4,6	21,321	95,4
Fluoranthene	128,4 75	0,000	0,0	128,475	100	214,528	3	1,2	211,84 9	99
Pyrene	143,5 59	0,000	0,0	143,559	100	239,717	0	0,0	239,71 7	100
Benzo(a)Anthracene	69,32 2	0,780	1,1	68,542	99	115,755	0	0,0	115,75 5	100
Crysene	61,01 7	0,000	0,0	61,017	100	101,887	0	0,0	101,88 7	100
Benzo(b)Fluoranthene	71,01 7	21,407	30,1	49,610	70	118,585	13,189	11,1	105,39 6	88,9
Benzo(k)Fluoranthene	79,49 2	18,932	23,8	60,559	76,2	132,736	11,132	8,4	121,60 4	91,6
Benzo(a)Pyrene	82,54 2	0,000	0,0	82,542	100	137,830	0,000	0,0	137,83 0	100,0
DiBenzo(a,h)Anthracene	59,15 3	0,000	0,0	59,153	100,0	98,774	0,000	0,0	98,774	100,0
Benzo(g,h,i)Perylene	62,20 3	8,102	13,0	54,102	87,0	103,868	3,189	3,1	100,67 9	96,9
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	72,37 3	8,932	12,3	63,441	87,7	120,849	5,962	4,9	114,88 7	95,1

* I valori di ogni concentrazione sono ricavati dalla media delle tre repliche di esposizione.

Figura 58. Grafici che riportano l'andamento del rapporto IPA biodisponibile-IPA degradato da parte di *S. cerevisiae* al XIV e XXI giorno di esposizione.

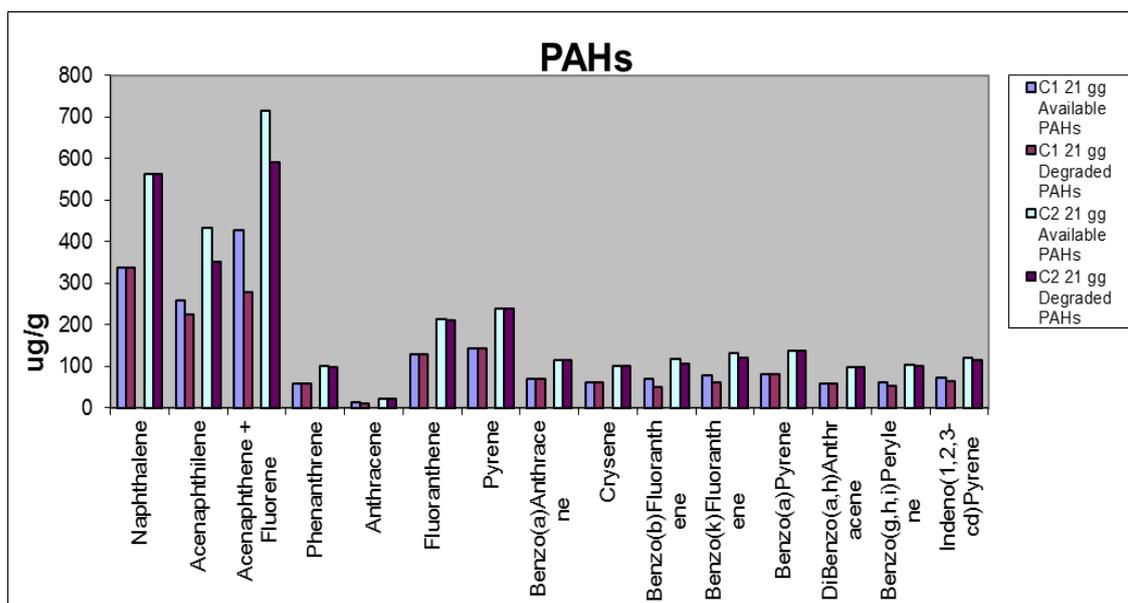
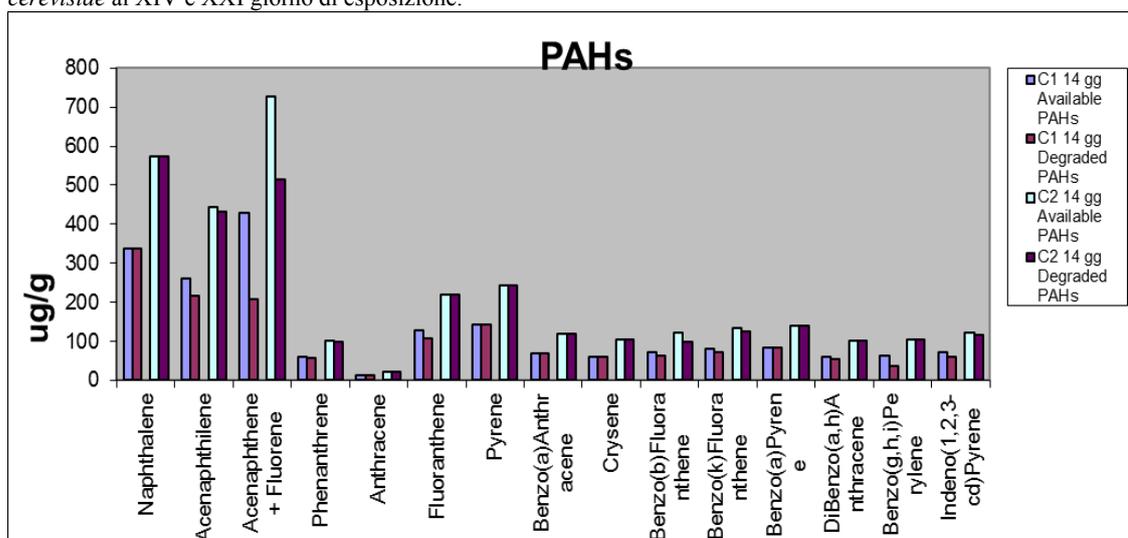


Tabella 23. Valori percentuali degli idrocarburi degradati da *S. cerevisiae* al XIV e XXI giorno di esposizione.

	C1 S 14 gg (%)	C2 S 14 gg (%)	C1 S 21 gg (%)	C2 S 21 gg (%)
Naphthalene	100,0	100,0	100,0	100,0
Acenaphthilene	83,0	97,3	86,4	80,9
Acenaphthene + Fluorene	48,4	70,5	65,2	82,8
Phenanthrene	95,1	97,6	100,0	97,3
Anthracene	93,9	96,2	86,2	95,4

Fluoranthene	82,6	100,0	100,0	98,8
Pyrene	100,0	100,0	100,0	100,0
Benzo(a)Anthracene	100,0	100,0	98,9	100,0
Crysene	100,0	100,0	100,0	100,0
Benzo(b)Fluoranthene	90,2	82,5	69,9	88,9
Benzo(k)Fluoranthene	91,4	91,4	76,2	91,6
Benzo(a)Pyrene	100,0	100,0	100,0	100,0
DiBenzo(a,h)Anthracene	91,4	100,0	100,0	100,0
Benzo(g,h,i)Perylene	60,4	100,0	87,0	96,9
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	83,0	94,1	87,7	95,1

* I valori di ogni concentrazione sono ricavati dalla media delle tre repliche di esposizione.

Tabella 24. Valori degli idrocarburi degradati da *W. anomalous* al XIV e XXI giorno di esposizione.

	C1 W 14 gg					C2 W 14 gg				
	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	336,441	86	25,7	250,017	74,3	522,368	0,000	0,0	522,368	100
Acenaphthilene	260	0,000	0,0	260,000	100,0	403,684	3,649	0,9	400,035	99,1
Acenaphthene + Fluorene	427,797	178,712	41,8	249,085	58,2	664,211	167,804	25,3	496,407	74,7
Phenanthrene	59,661	2,508	4,2	57,153	95,8	92,632	22,000	23,8	70,632	76,3
Anthracene	13,390	0,525	3,9	12,864	96,1	20,789	0,737	3,5	20,053	96,5
Fluoranthene	128,475	2,712	2,1	125,763	97,9	199,474	0,000	0,0	199,474	100
Pyrene	143,559	0	0,0	143,559	100	222,895	0,000	0,0	222,895	100
Benzo(a)Anthracene	69,322	0	0,0	69,322	100,0	107,632	6,351	5,9	101,281	94,1
Crysene	61,017	0	0,0	61,017	100,0	94,737	2,421	2,6	92,316	97,4
Benzo(b)Fluoranthene	71,017	30,034	42,3	40,983	57,7	110,263	40,684	36,9	69,579	63,1
Benzo(k)Fluoranthene	79,492	5,610	7,1	73,881	92,9	123,421	9,789	7,9	113,632	92,1
Benzo(a)Pyrene	82,542	4	4,5	78,864	95,5	128,158	0,000	0,0	128,158	100
DiBenzo(a,h)Anthracene	59,153	0,000	0,0	59,153	100,0	91,842	27,281	29,7	64,561	70,3
Benzo(g,h,i)Perylene	62,203	2,475	4,0	59,729	96,0	96,579	6,842	7,1	89,737	92,9
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	72,373	14,898	20,6	57,475	79,4	112,368	6,053	5,4	106,316	94,6
	C1 W 21 gg					C2 W 21 gg				
	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)	IPA nel micelio (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	342,241	20,722	6,1	321,519	93,9	522,368	0,000	0,0	522,37	100,0
Acenaphthilene	264,483	20,414	7,7	244,069	92,3	403,684	89,702	22,2	313,98	77,8
Acenaphthene + Fluorene	435,172	107,224	24,6	327,948	75,4	664,211	79,860	12,0	584,35	88,0
Phenanthrene	60,690	41,828	68,9	18,862	31,1	92,632	4,351	4,7	88,281	95,3
Anthracene	13,621	1,000	7,3	12,621	92,7	20,789	2,526	12,2	18,263	87,8

Fluoranthene	130,690	13,397	10,3	117,293	89,7	199,474	6,456	3,2	193,02	96,8
Pyrene	146,034	11,983	8,2	134,052	91,8	222,895	0	0,0	222,89	100
Benzo(a)Anthracene	70,517	0,000	0,0	70,517	100	107,632	0	0,0	107,63	100
Crysene	62,069	0,000	0,0	62,069	100	94,737	0	0,0	94,737	100
Benzo(b)Fluoranthene	72,241	10,879	15,1	61,362	84,9	110,263	14,281	13,0	95,982	87,0
Benzo(k)Fluoranthene	80,862	8,138	10,1	72,724	89,9	123,421	13,632	11,0	109,79	89,0
Benzo(a)Pyrene	83,966	0,000	0,0	83,966	100	128,158	0,000	0,0	128,16	100,0
DiBenzo(a,h)Anthracene	60,172	54,983	91,4	5,190	8,6	91,842	3,982	4,3	87,860	95,7
Benzo(g,h,i)Perylene	63,276	28,552	45,1	34,724	54,9	96,579	8,491	8,8	88,088	91,2
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	73,621	12,276	16,7	61,345	83,3	112,368	11,614	10,3	100,75	89,7

* I valori di ogni concentrazione sono ricavati dalla media delle tre repliche di esposizione.

Figura 59. Grafici che riportano l'andamento del rapporto IPA biodisponibile-IPA degradato da parte di *W. anomalus* al XIV e XXI giorno di esposizione.

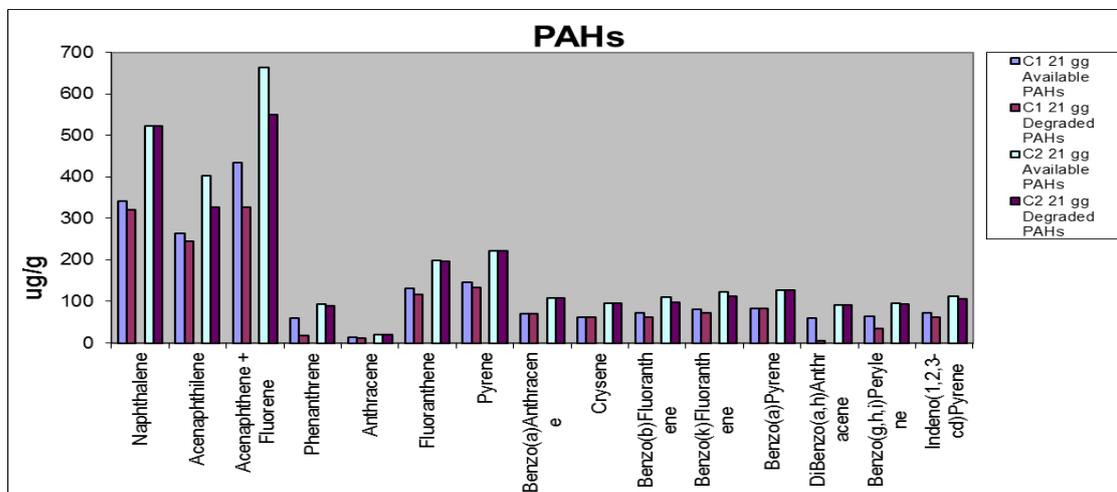
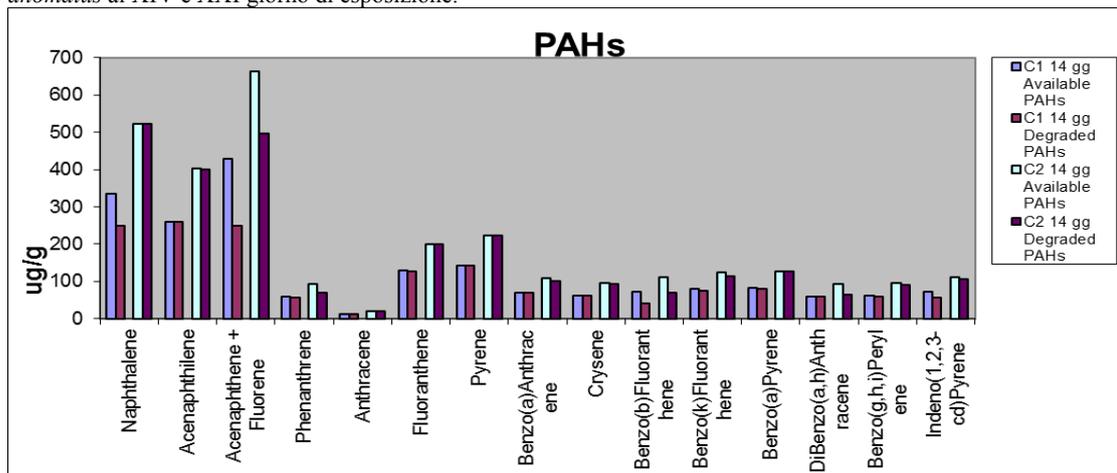


Tabella 25. Valori percentuali degli idrocarburi degradati da *W. anomalus* al XIV e XXI giorno di esposizione.

	C1 W 14 gg (%)	C2 W 14 gg (%)	C1 W 21 gg (%)	C2 W 21 gg (%)
Naphthalene	74,3	100,0	93,9	100,0
Acenaphthilene	100,0	99,1	92,3	77,8
Acenaphthene + Fluorene	58,2	74,7	75,4	88,0
Phenanthrene	95,8	76,3	31,1	95,3
Anthracene	96,1	96,5	92,7	87,8
Fluoranthene	97,9	100,0	89,7	96,8
Pyrene	100,0	100,0	91,8	100
Benzo(a)Anthracene	100,0	94,1	100,0	100
Crysene	100,0	97,4	100,0	100
Benzo(b)Fluoranthene	57,7	63,1	84,9	87,0
Benzo(k)Fluoranthene	92,9	92,1	89,9	89,0
Benzo(a)Pyrene	95,5	100,0	100,0	100,0
DiBenzo(a,h)Anthracene	100,0	70,3	8,6	95,7
Benzo(g,h,i)Perylene	96,0	92,9	54,9	91,2
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	79,4	94,6	83,3	89,7

* I valori di ogni concentrazione sono ricavati dalla media delle tre repliche di esposizione.

Osservando i grafici è possibile notare come in seguito ad esposizioni crescenti di IPA, i tre microrganismi rispondano bene al processo degradativo. Dai valori percentuali riportati nelle tabelle 21, 23 e 25 si denota come tutti i microrganismi impiegati siano dotati di una buona capacità degradativa nei confronti dei 16 IPA testati, sebbene, rispetto a *T. harzianum*, *S. cerevisiae* presenti delle percentuali medie di assorbimento più basse per acenaphthene, fluorene, anthracene, fluoranthene e benzo(b)fluoranthene e, *W. anomalus* per acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene benzo(b)fluoranthene, benzo(g,h,i)perylene. Inoltre, è possibile notare che le più alte percentuali di degradazione, generalmente, si palesano in seguito all'esposizione alla seconda dose e/o al XXI giorno di coltura. Come già anticipato nel *paragrafo 2.3.*, questi composti sono fotosensibili e quindi vanno incontro a fenomeni di fotodegradazione. Tenendo presente ciò, nonostante gli accorgimenti possibili per evitare l'esposizione diretta alla luce, una certa percentuale viene ugualmente persa e, a questa, si somma anche la durata dell'esposizione come dimostrato anche in altri studi internazionali [Marques *et al.*, 2016].

6.4. Valori di degradazione degli IPA in seguito a fitorimediazione con *A. donax* e *A. donax* micorrizata con *T. harzianum*

Anche in questo caso, una volta allestito l'impianto come da protocollo, sono state effettuate le prove di esposizione agli IPA nei confronti di *A. donax* con e senza l'assistenza di *T. harzianum*, così da valutare la capacità di fitorimediazione della pianta in entrambi i casi sperimentali (Fig. 60).

Figura 60. *A. donax* al II, IV e VI mese d'impianto.



Come descritto nel paragrafo 5.6.2., sono state effettuate tre repliche per ogni campione e per ogni dose di esposizione più i rispettivi controlli (Tab. 26), e sono state effettuate le analisi del terreno, mediante HPLC UV-FL, per quantificare gli IPA non degradati.

Tabella 26. Valori di degradazione degli IPA da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

<i>A. donax</i> C1 R1	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	0,014	0,1	9,986	99,9
Acenaphthilene	10	5,488	54,9	4,512	45,1
Acenaphthene + Fluorene	20	8,087	40,4	11,913	59,6
Phenanthrene	10	3,8455	38,5	6,1545	61,5
Anthracene	10	0,052	0,5	9,948	99,5
Fluoranthene	10	0,946	9,5	9,054	90,5
Pyrene	10	1,9785	19,8	8,0215	80,2
Benzo(a)Anthracene	10	0,9985	10,0	9,0015	90,0
Crysene	10	0,685	6,9	9,315	93,2
Benzo(b)Fluoranthene	10	13,52	135,2	-3,52	-35,2
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,5255	5,3	9,4745	94,7
Benzo(a)Pyrene	10	0,9185	9,2	9,0815	90,8
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0,3945	3,9	9,6055	96,1
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0,0735	0,7	9,9265	99,3
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,262	2,6	9,738	97,4

<i>A. donax</i> C1 R2	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	1,585	15,9	8,415	84,2
Acenaphthilene	10	3,4135	34,1	6,5865	65,9
Acenaphthene + Fluorene	20	8,3265	41,6	11,6735	58,4
Phenanthrene	10	2,3055	23,1	7,6945	76,9
Anthracene	10	0,027	0,3	9,973	99,7
Fluoranthene	10	0,3305	3,3	9,6695	96,7
Pyrene	10	0,5385	5,4	9,4615	94,6
Benzo(a)Anthracene	10	3,668	36,7	6,332	63,3
Crysene	10	0,9605	9,6	9,0395	90,4
Benzo(b)Fluoranthene	10	9,171	91,7	0,829	8,3
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,4	4,0	9,6	96,0
Benzo(a)Pyrene	10	1,0515	10,5	8,9485	89,5
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0,603	6,0	9,397	94,0
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0,2695	2,7	9,7305	97,3
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,729	7,3	9,271	92,7

<i>A. donax</i> C1 R3	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	1,5655	15,7	8,435	84,3
Acenaphthilene	10	13,2105	132,1	-3,211	-32,1
Acenaphthene + Fluorene	20	8,191	41,0	11,809	59,0
Phenanthrene	10	2,451	24,5	7,549	75,5
Anthracene	10	0,078	0,8	9,922	99,2
Fluoranthene	10	0,193	1,9	9,807	98,1
Pyrene	10	0,551	5,5	9,449	94,5
Benzo(a)Anthracene	10	3,438	34,4	6,562	65,6
Crysene	10	0,507	5,1	9,493	94,9
Benzo(b)Fluoranthene	10	4,727	47,3	5,273	52,7
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,8185	8,2	9,182	91,8
Benzo(a)Pyrene	10	0,699	7,0	9,301	93,0
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0,3765	3,8	9,624	96,2
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0,0205	0,2	9,980	99,8
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,764	7,6	9,236	92,4

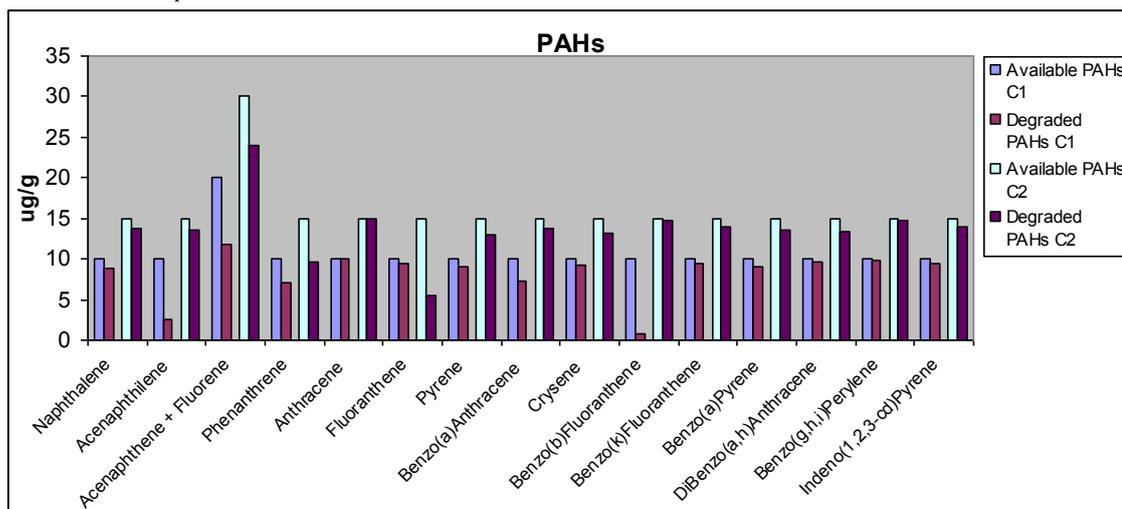
<i>A. donax</i> C2 R1	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	1,985	13,2	13,015	86,8
Acenaphthilene	10	1,5	10,0	13,5	90,0
Acenaphthene + Fluorene	30	0,935	3,1	29,065	96,9
Phenanthrene	10	8,395	56,0	6,605	44,0
Anthracene	10	0,07	0,5	14,93	99,5
Fluoranthene	10	16,85	112,3	-1,85	-12,3
Pyrene	10	3,2345	21,6	11,7655	78,4
Benzo(a)Anthracene	10	1,735	11,6	13,265	88,4

Crysene	10	3,7225	24,8	11,2775	75,2
Benzo(b)Fluoranthene	10	0,265	1,8	14,735	98,2
Benzo(k)Fluoranthene	10	1,435	9,6	13,565	90,4
Benzo(a)Pyrene	10	1,7875	11,9	13,2125	88,1
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	1,5825	10,6	13,4175	89,5
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0,831	5,5	14,169	94,5
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,315	2,1	14,685	97,9

<i>A. donax</i> C2 R2	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	1,1565	7,7	13,8435	92,3
Acenaphthilene	10	1,7655	11,8	13,2345	88,2
Acenaphthene + Fluorene	30	7,116	23,7	22,884	76,3
Phenanthrene	10	3,14	20,9	11,86	79,1
Anthracene	10	0,0215	0,1	14,9785	99,9
Fluoranthene	10	3,6675	24,5	11,3325	75,6
Pyrene	10	0,328	2,2	14,672	97,8
Benzo(a)Anthracene	10	0,231	1,5	14,769	98,5
Crysene	10	0,79	5,3	14,21	94,7
Benzo(b)Fluoranthene	10	0,3105	2,1	14,6895	97,9
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,6185	4,1	14,3815	95,9
Benzo(a)Pyrene	10	0,141	0,9	14,859	99,1
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	3,2515	21,7	11,7485	78,3
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0	0,0	15	100,0
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,867	5,8	14,133	94,2

<i>A. donax</i> C2 R3	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	0,735	4,9	14,265	95,1
Acenaphthilene	10	1,21	8,1	13,790	91,9
Acenaphthene + Fluorene	30	9,8025	32,7	20,198	67,3
Phenanthrene	10	4,32	28,8	10,680	71,2
Anthracene	10	0,07	0,5	14,930	99,5
Fluoranthene	10	8,1575	54,4	6,843	45,6
Pyrene	10	2,4205	16,1	12,580	83,9
Benzo(a)Anthracene	10	1,8125	12,1	13,188	87,9
Crysene	10	0,977	6,5	14,023	93,5
Benzo(b)Fluoranthene	10	0,416	2,8	14,584	97,2
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,96	6,4	14,040	93,6
Benzo(a)Pyrene	10	2,2025	14,7	12,798	85,3
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0	0,0	15,000	100,0
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0	0,0	15,000	100,0
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	1,695	11,3	13,305	88,7

Figura 61. Grafico riportante l'andamento del rapporto IPA biodisponibile-IPA degradato da parte di *A. donax* al settimo mese d'impianto.



Il grafico (Fig. 61) riporta i valori medi delle tre repliche effettuate per ognuna delle due dosi di esposizione; in generale possiamo dire che la quantità di IPA degradato aumenta al crescere della dose di esposizione. Analizzando ognuno dei 16 IPA in base al rapporto IPA biodisponibile-IPA degradato notiamo che i valori medi di IPA degradato in seguito ad esposizione alla seconda dose si presentano marcatamente più elevati rispetto alla prima per: acenaphthylene, acenaphthene e fluorene, benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene; invece per naphthalene, anthracene, pyrene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, benzo(g,h,i)perylene e indeno(1,2,3-cd)pyrene si presentano pressoché costanti (Tab. 27; Fig. 62).

Tabella 27. Valori medi percentuali di degradazione degli IPA da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

<i>A. donax</i>	Valori medi concentrazione 1 (%)	Valori medi concentrazione 2 (%)
Naphthalene	89,5	91,4
Acenaphthylene	26,3	90,1
Acenaphthene + Fluorene	59,0	80,2
Phenanthrene	71,3	64,8
Anthracene	99,5	99,6
Fluoranthene	95,1	36,3
Pyrene	89,8	86,7
Benzo(a)Anthracene	73,0	91,6
Crysene	92,8	87,8
Benzo(b)Fluoranthene	8,6	97,8
Benzo(k)Fluoranthene	94,2	93,3
Benzo(a)Pyrene	91,1	90,8
DiBenzo(a,h)Anthracene	95,4	89,3
Benzo(g,h,i)Perylene	98,8	98,2
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	94,2	93,6

* I valori di ogni concentrazione sono ricavati dalla media delle tre repliche di esposizione.

Figura 62. Grafico riportante i valori medi percentuali di degradazione degli IPA da parte di *A. donax* al settimo mese di impianto.

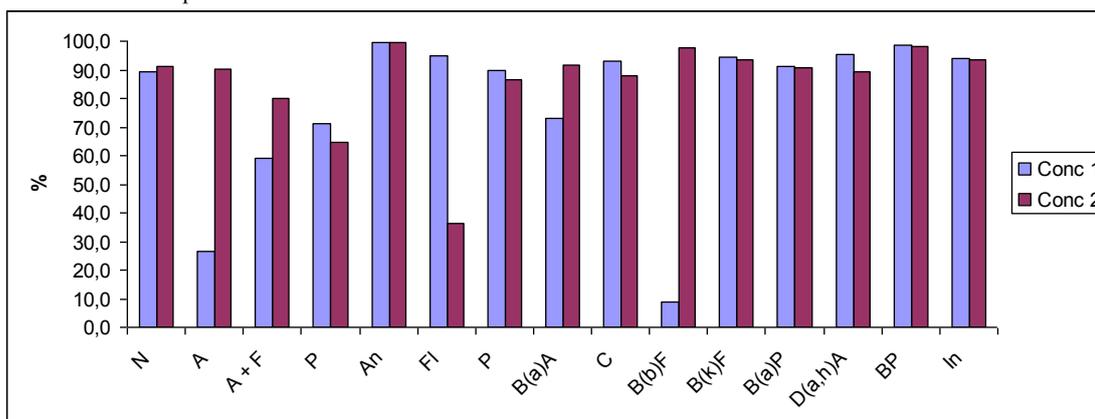


Tabella 28. Valori di degradazione degli IPA da parte di *A. donax* micorrizzata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

<i>A. donax</i> e <i>T. harzianum</i> C1 R1	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	0,8235	8,2	9,177	91,8
Acenaphthilene	10	3,514	35,1	6,486	64,9
Acenaphthene + Fluorene	20	9,9185	49,6	10,0815	50,4
Phenanthrene	10	0,4705	4,7	9,5295	95,3
Anthracene	10	0,1315	1,3	9,8685	98,7
Fluoranthene	10	1,794	17,9	8,206	82,1
Pyrene	10	0,71	7,1	9,29	92,9
Benzo(a)Anthracene	10	0,141	1,4	9,859	98,6
Crysene	10	0,606	6,1	9,394	93,9
Benzo(b)Fluoranthene	10	1,6925	16,9	8,3075	83,1
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,45	4,5	9,55	95,5
Benzo(a)Pyrene	10	0,039	0,4	9,961	99,6
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0,81	8,1	9,19	91,9
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0,0135	0,1	9,9865	99,9
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,1245	1,2	9,8755	98,8

<i>A. donax</i> e <i>T. harzianum</i> C1 R2	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	1,2985	13,0	8,7015	87,0
Acenaphthilene	10	4,9265	49,3	5,0735	50,7
Acenaphthene + Fluorene	20	9,084	45,4	10,916	54,6
Phenanthrene	10	2,9925	29,9	7,0075	70,1
Anthracene	10	0,117	1,2	9,883	98,8
Fluoranthene	10	1,604	16,0	8,396	84,0
Pyrene	10	1,4265	14,3	8,5735	85,7
Benzo(a)Anthracene	10	0,6715	6,7	9,3285	93,3
Crysene	10	0,544	5,4	9,456	94,6
Benzo(b)Fluoranthene	10	1,413	14,1	8,587	85,9
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,8725	8,7	9,1275	91,3
Benzo(a)Pyrene	10	0,024	0,2	9,976	99,8

DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0	0,0	10	100,0
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0,103	1,0	9,897	99,0
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,0335	0,3	9,9665	99,7

<i>A. donax e T. harzianum</i> C1 R3	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	0,619	6,2	9,381	93,8
Acenaphthilene	10	3,975	39,8	6,025	60,3
Acenaphthene + Fluorene	20	0,988	4,9	19,012	95,1
Phenanthrene	10	1,7835	17,8	8,217	82,2
Anthracene	10	0,63	6,3	9,370	93,7
Fluoranthene	10	0,306	3,1	9,694	96,9
Pyrene	10	0	0,0	10,000	100,0
Benzo(a)Anthracene	10	2,8465	28,5	7,154	71,5
Crysene	10	0,792	7,9	9,208	92,1
Benzo(b)Fluoranthene	10	0,207	2,1	9,793	97,9
Benzo(k)Fluoranthene	10	1,118	11,2	8,882	88,8
Benzo(a)Pyrene	10	0,4015	4,0	9,599	96,0
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0	0,0	10,000	100,0
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0,8725	8,7	9,128	91,3
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,0875	0,9	9,913	99,1

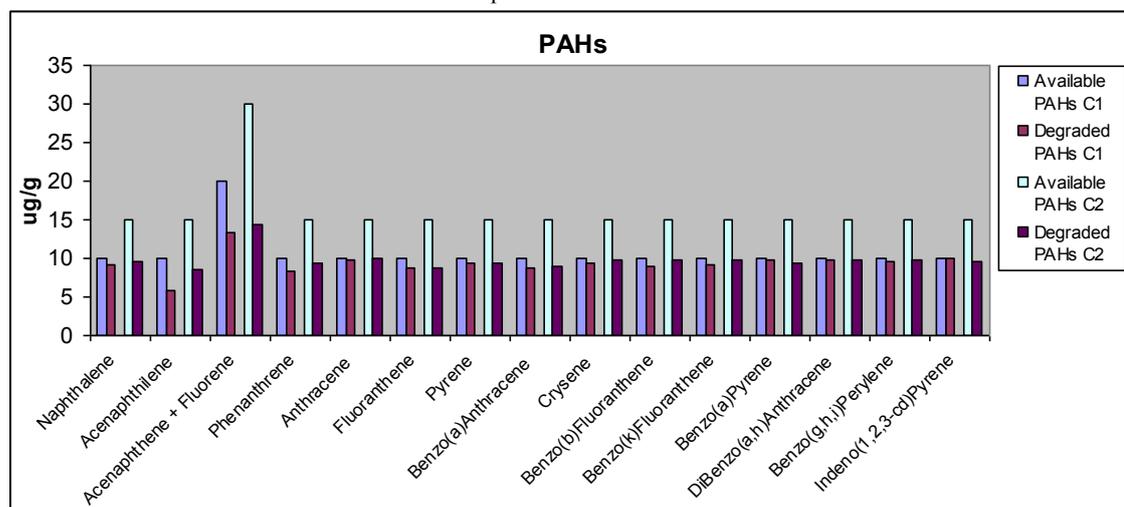
<i>A. donax e T. harzianum</i> C2 R1	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	1,3085	8,7	13,6915	91,3
Acenaphthilene	10	2,288	15,3	12,712	84,7
Acenaphthene + Fluorene	30	7,387	24,6	22,613	75,4
Phenanthrene	10	1,223	8,2	13,777	91,8
Anthracene	10	0,1545	1,0	14,8455	99,0
Fluoranthene	10	2,153	14,4	12,847	85,6
Pyrene	10	1,117	7,4	13,883	92,6
Benzo(a)Anthracene	10	1,7975	12,0	13,2025	88,0
Crysene	10	0,257	1,7	14,743	98,3
Benzo(b)Fluoranthene	10	0,181	1,2	14,819	98,8
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,5805	3,9	14,4195	96,1
Benzo(a)Pyrene	10	0,792	5,3	14,208	94,7
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0	0,0	15	100,0
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0,5565	3,7	14,4435	96,3
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,984	6,6	14,016	93,4

<i>A. donax e T. harzianum</i> C2 R2	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	0,2485	1,7	14,7515	98,3
Acenaphthilene	10	2,2325	14,9	12,7675	85,1
Acenaphthene + Fluorene	30	9,753	32,5	20,247	67,5
Phenanthrene	10	0,658	4,4	14,342	95,6

Anthracene	10	0,0545	0,4	14,9455	99,6
Fluoranthene	10	1,3465	9,0	13,6535	91,0
Pyrene	10	0,774	5,2	14,226	94,8
Benzo(a)Anthracene	10	1,1915	7,9	13,8085	92,1
Crysene	10	0,5045	3,4	14,4955	96,6
Benzo(b)Fluoranthene	10	0,607	4,0	14,393	96,0
Benzo(k)Fluoranthene	10	0,354	2,4	14,646	97,6
Benzo(a)Pyrene	10	0,825	5,5	14,175	94,5
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	0,8145	5,4	14,1855	94,6
Benzo(g,h,i)Perylene	10	0	0,0	15	100,0
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	0,2015	1,3	14,7985	98,7

<i>A. donax</i> e <i>T. harzianum</i> C2 R3	IPA aggiunto al suolo (µg/g)	IPA non degradato (µg/g)	IPA non degradato (%)	IPA degradato (µg/g)	IPA degradato (%)
Naphthalene	10	/	/	/	/
Acenaphthilene	10	/	/	/	/
Acenaphthene + Fluorene	30	/	/	/	/
Phenanthrene	10	/	/	/	/
Anthracene	10	/	/	/	/
Fluoranthene	10	/	/	/	/
Pyrene	10	/	/	/	/
Benzo(a)Anthracene	10	/	/	/	/
Crysene	10	/	/	/	/
Benzo(b)Fluoranthene	10	/	/	/	/
Benzo(k)Fluoranthene	10	/	/	/	/
Benzo(a)Pyrene	10	/	/	/	/
DiBenzo(a,h)Anthracene	10	/	/	/	/
Benzo(g,h,i)Perylene	10	/	/	/	/
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	10	/	/	/	/

Figura 63. Grafico riportante l'andamento del rapporto IPA biodisponibile-IPA degradato da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese d'impianto.



Il grafico (Fig. 63) riporta i valori medi delle tre repliche effettuate per ognuna delle due dosi di esposizione; in generale possiamo dire che anche in questo caso la quantità di IPA degradato cresce al crescere della dose di esposizione. Analizzando ognuno dei 16 IPA in base al rapporto IPA biodisponibile-IPA degradato notiamo che i valori medi di IPA degradato in seguito ad esposizione alla seconda dose si presentano più elevati rispetto alla prima per tutti i campioni ad esclusione di benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene e indeno (1,2,3-cd)pyrene. Questi valori vengono considerati per due delle tre repliche effettuate, poiché il campione C2R3 non ha mostrato accrescimento (Tab. 29; Fig. 64).

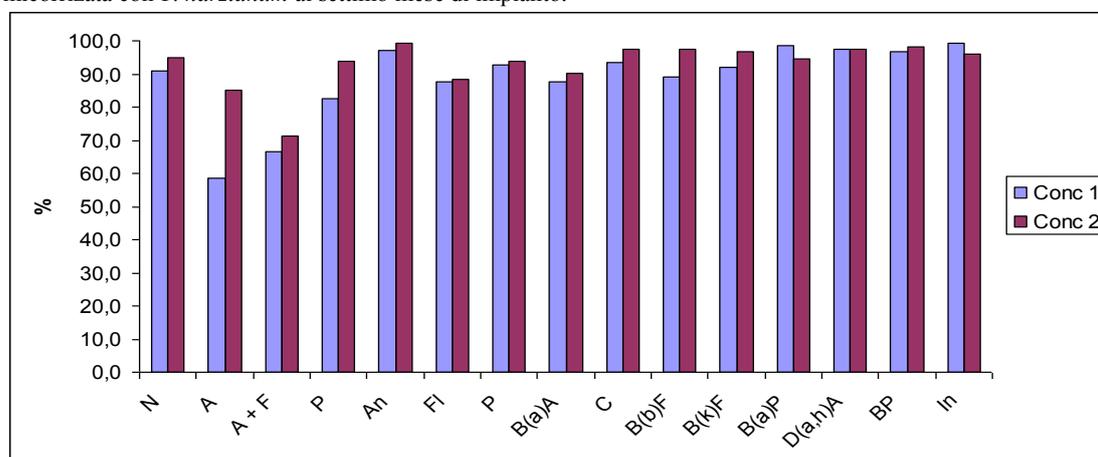
Tabella 29. Valori medi percentuali di degradazione degli IPA da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.

<i>A. donax</i> e <i>T. harzianum</i>	Valori medi concentrazione 1 (%)	Valori medi concentrazione 2 (%)
Naphthalene	90,9	94,8
Acenaphthilene	58,6	84,9
Acenaphthene + Fluorene	66,7	71,4
Phenanthrene	82,5	93,7
Anthracene	97,1	99,3
Fluoranthene	87,7	88,3
Pyrene	92,9	93,7
Benzo(a)Anthracene	87,8	90
Crysene	93,5	97,5
Benzo(b)Fluoranthene	89,0	97,4
Benzo(k)Fluoranthene	91,9	96,9
Benzo(a)Pyrene	98,5	94,6
DiBenzo(a,h)Anthracene	97,3	97,3
Benzo(g,h,i)Perylene	96,7	98,1
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	99,2	96

* I valori di ogni concentrazione sono ricavati dalla media delle tre repliche di esposizione.

** Il campione C2R3 non ha mostrato accrescimento.

Figura 64. Grafico riportante i valori medi percentuali di degradazione degli IPA da parte di *A. donax* micorrizata con *T. harzianum* al settimo mese di impianto.



Osservando le tabelle e i grafici, si nota che sia *A. donax* che *A. donax* micorrizzata con *T. harzianum* hanno evidenziato delle ottime capacità di resistenza nei confronti dell'esposizione agli IPA addizionati al terreno dove sono state poste a dimora; le piante micorrizzate hanno mostrato una capacità degradativa maggiore rispetto a quelle non micorrizzate, mediamente, per dieci dei sedici IPA testati (acenaphthylene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)-anthracene, crysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, indeno(1,2,3-cd)pyrene). In realtà, su questi incoraggianti risultati bisogna precisare, come già detto, che gli IPA sono soggetti a fotodegradazione e quindi una certa quantità, nonostante i dovuti accorgimenti, viene persa con la manipolazione del campione e, fattore ancor più importante, un'ulteriore degradazione avviene ad opera degli organismi naturalmente presenti nella rizosfera e che inoltre sono favoriti dalla presenza di *T. harzianum* [Harman *et al.*, 2004; Fiorentino *et al.*, 2012].

6.5. Saggio ecotossicologico e analisi delle componenti microbiologiche del suolo

Il saggio ecotossicologico con batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*, descritto nel paragrafo 5.7., è stato condotto su campioni di suolo pre-contaminazione, post-contaminazione e alla fine del processo di fitorimediazione. Una volta predisposto l'impianto, sono stati analizzati i campioni di suolo i quali non hanno riportato valori di tossicità particolarmente elevati. Dopo la contaminazione artificiale a cui sono state esposte le piante di *A. donax* e *A. donax* micorrizzata è stato nuovamente effettuato il saggio per i campioni di terreno contaminato, mostrando ovviamente un certo livello di tossicità, per poi rieffettuare il test alla fine dell'impianto dove i valori di tossicità sono diminuiti. I valori percentuali vengono dati al tempo $t = 15$ minuti e sono ottenuti dalla media delle due letture effettuate (Tab.30).

Tabella 30. Valori medi della percentuale di tossicità dei campioni di suolo analizzati mediante saggio ecotossicologico.

Campioni di suolo	Suolo pre-contaminazione (%)	Suolo post-contaminazione (%)	Suolo fitorimediato (%)
Arundo Met C1	-2.42	22.31	4.72
Arundo Met C2	-3.42	20.38	11.57
A + T Met C1	-1.58	20.36	2.20
A + T Met C2	6.12	20.03	6.35
Arundo IPA C1	6.03	9.38	9.05
Arundo IPA C2	3.89	9.08	8.27
A + T IPA C1	5.33	19.14	10.91
A + T IPA C2	2.87	19.55	12.1

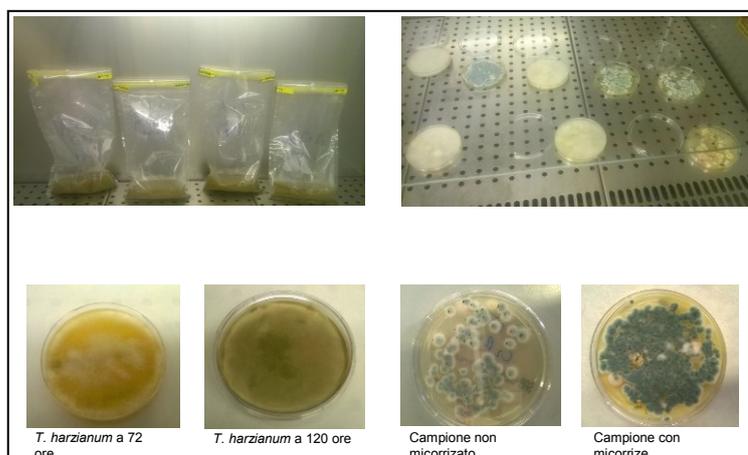
* Met = metalli; C1 = concentrazione 1; C2 = concentrazione 2;
A = *A. donax*; A+T = *A. donax* micorrizzata con *T. harzianum*.

Dalla tabella si evince come l'intervento di *T. harzianum* abbia assistito *A. donax* nel processo di fitoestrazione dei metalli pesanti, mostrando una minore tossicità alla fine del processo di fitorimediazione del suolo; nei campioni con *T. harzianum* è possibile notare una diminuzione percentuale di circa il 50% della tossicità rispetto ai campioni dove il fungo non è presente.

Per quanto concerne gli IPA, non abbiamo una differenza rilevante nei confronti dei campioni non micorrizzati, a differenza, invece, dei campioni micorrizzati dove alla fine del processo di fitorimediazione è stata rilevata una discreta riduzione della tossicità. Anche in questo caso, quindi, è possibile notare come *T. harzianum* abbia favorito i processi di degradazione a livello della rizosfera coadiuvando, di fatto, *A. donax* nel processo di fitodegradazione.

Alla fine del processo di fitorimediazione, inoltre, sono stati prelevati dei campioni di suolo per poter valutare la presenza di *T. harzianum*, così da avere un'ulteriore conferma che i campioni micorrizzati hanno avuto un maggior beneficio dal suo impiego durante le prove sperimentali. Dopo aver effettuato il campionamento del suolo, ne sono stati prelevati 10 g che sono stati immessi all'interno di un sacchetto Stomacher[®] contenente 90 ml di acqua peptonata; i campioni così preparati, sono stati omogeneizzati mediante Stomacher[®] 400. Dopo di che, da ogni campione sono stati prelevati 100 µl da spatolare uniformemente su piastre di Petri contenenti terreno di coltura Sabouraud Dextrose Agar e Cloramfenicolo; le piastre sono state incubate in termostato a 25°C per 72 e 120 ore (Fig. 65).

Figura 65. Colture microbiologiche dei campioni suolo



Dalla conta delle colonie presenti sulle piastre, nei campioni micorrizzati si notava una predominanza della tipica morfologia di *T. harzianum*, a conferma della sua presenza e del

suo accrescimento, insieme ad altri microrganismi della rizosfera. Per i campioni di suolo fortificati con i metalli e micorrizati abbiamo ottenuto un valore massimo di 5.4×10^3 UFC/ml (Unità Formanti Colonie), invece, per gli IPA un valore massimo di 9.2×10^3 UFC/ml.

7. Discussioni e conclusioni

L'idea di sviluppare questo lavoro è nata dall'attenzione crescente che la comunità scientifica e, da qualche anno, le istituzioni governative stanno mostrando nei confronti dell'utilizzo di nuove tecniche di bonifica dei suoli contaminati mediante l'utilizzo di organismi biologici. È già stato dimostrato da diversi studi nazionali e internazionali [Vamerali *et al.*, 2009; Wang e Chen, 2009; Guo e Miao, 2010; Machado *et al.*, 2010; Mirza *et al.*, 2011; Fiorentino *et al.*, 2012; Agnello *et al.*, 2016] come piante, funghi e batteri siano in grado di intervenire nei processi di accumulo e/o degradazione di contaminanti inorganici ed organici. In quest'ottica, si rammenta che il progetto proposto è stato allestito con lo scopo di andare ad individuare sia la potenziale capacità di bioaccumulare i nove metalli pesanti prescelti, sia la possibilità di degradare i sedici IPA prioritari secondo la US EPA, da parte di *T. harzianum*, *S. cerevisiae* e *W. anomalus* per valutarne così la possibile applicazione del più idoneo in un processo di fitorimediazione con la specie vegetale superiore *A. donax*.

Confrontando i risultati ottenuti dagli esperimenti *in vitro* con i dati presenti in letteratura, principalmente su *T. harzianum* ed *S. cerevisiae*, si possono rilevare sia congruenze che incongruenze. Ad esempio, i dati ottenuti in seguito all'esposizione di *T. harzianum* al Cu, suggeriscono che il fungo abbia una minore capacità di bioassorbimento nei suoi confronti e che, a sua volta, il Cu eserciti un'azione inibitoria verso l'espansione miceliare: ciò è confermato da alcuni dati di letteratura [Hajieghrari, 2010]. Invece, è possibile osservare una certa incongruenza riguardante *T. harzianum* esposto al Pb: mentre i dati qui presenti hanno restituito valori percentuali di assorbimento con andamento irregolare nel corso dei quattro esperimenti a concentrazioni diverse e scarsissima correlazione tra le due variabili considerate, diversi dati di letteratura riportano un'alta capacità di bioassorbimento del Pb da parte del fungo, con una forte correlazione tra aumento di biodisponibilità e capacità di bioassorbimento [Adebisi *et al.*, 2014]. Un simile confronto può esser fatto con i dati ottenuti per *S. cerevisiae* riguardo la buona percentuale di bioaccumulo mostrata nei confronti di Ni, Cd e Cu come riportato in letteratura, a differenza, invece, di quanto osservato per Pb e Zn [Wang e Chen, 2009; Machado *et al.*, 2010]. Riguardo a *W. anomalus*, ad oggi, vi sono pochissimi dati in letteratura, tuttavia da alcuni studi condotti da Wang e Chen [2009] è possibile osservare una corrispondenza di dati verso la capacità di bioaccumulo di Ni, Cd e Cu, a differenza, invece, di quanto riportato per As e Pb. In realtà, non stupisce ritrovare simili valori di bioaccumulo da parte dei due lieviti in quanto

appartenenti entrambi al genere *Saccharomyces*, sebbene *W. anomalus*, come riportato nel *paragrafo 5.1.3.*, abbia mostrato un ampio spettro di attività antimicrobica (qualcosa di molto insolito nei lieviti), essendo attivo contro una varietà di microrganismi compresi altri lieviti, funghi filamentosi e batteri [Cappelli *et al.*, 2014]; ciò potrebbe aprire una nuova alternativa all'utilizzo dei microrganismi nei processi di biorisanamento. Nonostante i due lieviti abbiano esibito una buona capacità di bioaccumulo nei confronti dei metalli pesanti a cui sono stati esposti, *T. harzianum*, per le sue caratteristiche elencate nel *paragrafo 5.1.1.* ed in particolare per la sua attività anti patogena verso altri funghi infestanti le colture e per la dimostrata capacità di bioaccumulo verso un maggior numero di metalli pesanti, è stato confermato come microrganismo più idoneo alla nostra sperimentazione, supportati anche dai dati presenti in letteratura [Kos *et al.*, 2003; Benitez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Mollea *et al.*, 2005; Guo e Miao, 2010; Fiorentino *et al.*, 2012].

Nei confronti dell'esposizione agli IPA, come descritto nel *paragrafo 6.3.*, i tre microrganismi impiegati hanno mostrato, in generale, delle ottime percentuali di degradazione. In particolare, come riscontrato anche in letteratura, *T. harzianum* ha mostrato buone capacità a degradare e metabolizzare diversi IPA come naphthalene, phenanthrene, chrysene, pyrene e benzo(a)pyrene [Zafra e Cortés-Espinoza, 2015]. Tuttavia, preme ricordare che gli IPA vanno incontro a fenomeni di fotodegradazione e, in particolare, quelli a più basso peso molecolare come naphthalene e acenaphthylene, sono soggetti anche a volatilizzazione. Tenendo presente ciò, nonostante gli accorgimenti possibili per evitare l'esposizione diretta alla luce, una certa percentuale viene ugualmente persa e a questa si somma anche la durata dell'esposizione come dimostrato anche in altri studi internazionali [Marques *et al.*, 2016]. Da quanto detto, è possibile ipotizzare che le percentuali dei composti degradati siano maggiorate dalle variabili appena esposte. Tuttavia, i dati riportati in letteratura hanno evidenziato come *T. harzianum* presenti non solo una discreta capacità degradativa [Harman *et al.*, 2004] ma anche e soprattutto la capacità di favorire lo sviluppo di altri microrganismi normalmente presenti nella rizosfera, i quali accelerano i processi di degradazione degli idrocarburi a carico di quest'ultimi [Harman *et al.*, 2004; Matsubara *et al.*, 2006; Machin-Ramirez *et al.*, 2010; More *et al.*, 2010; Fernandez, 2013].

Le prove di esposizione in serra hanno visto, quindi, l'utilizzo di *A. donax* micorrizata e non con il fungo *T. harzianum*. *A. donax*, date le caratteristiche descritte nel *paragrafo 5.1.4.*, si è rivelata essere una specie vegetale che ben si presta all'impiego nei processi di recupero dei suoli contaminati da metalli pesanti e IPA, in particolare perché produce una buona

quantità di biomassa, non è appetibile per gli animali, resiste ai parassiti e agli stress idrici e, quindi, è in grado di adattarsi in ambienti inospitali. Da quanto riportato nelle prove di esposizione al mix dei 9 metalli utilizzati, *A. donax* ha mostrato in generale una buona capacità di bioaccumulo dei metalli pesanti, maggiorata nei casi di simbiosi con *T. harzianum*, in particolare per Ni, Cd, As, Pb, Cr e Hg. Infatti, il fungo interagisce con la pianta favorendone la crescita delle radici e dei culmi [Harman *et al.*, 2004] e inoltre, mediante iperparassitismo, limita la crescita di funghi patogeni che potrebbero compromettere lo stato di salute della pianta [Fiorentino *et al.*, 2012]. A tal proposito, *A. donax*, non ha mostrato nessun segno di stress a carico dell'apparato fogliare, che si è presentato ben sviluppato e di un colore verde intenso; i culmi, anch'essi di ottimo aspetto, hanno mostrato una lunghezza media di 80 cm con un picco di 103 cm. Tutto ciò, quindi, dimostra come i campioni di *A. donax* testati, ad eccezione di due campioni non micorrizzati, in seguito ad esposizione alle due concentrazioni crescenti di metalli pesanti utilizzati, siano stati in grado di rispondere positivamente fornendo risultati incoraggianti per un eventuale proseguimento dell'attività di ricerca.

Anche nei confronti dell'esposizione al mix di IPA, *A. donax* ha beneficiato della simbiosi stabilita con *T. harzianum*, il quale favorendo i processi di degradazione a livello della rizosfera ha reso il suolo a disposizione della pianta sufficientemente idoneo allo sviluppo di quest'ultima; infatti, anche in questo caso non è stato notato nessun segno di stress né a livello dell'apparato fogliare, né dei culmi e neanche a livello dei rizomi.

In definitiva, è possibile affermare che la specie vegetale superiore e i microrganismi utilizzati per lo svolgimento di questo progetto si prestano molto bene ad un eventuale impiego nei processi di fitorimediazione. Sebbene, per alcuni metalli pesanti, questo è già stato riportato anche in altri studi scientifici [Kos *et al.*, 2003; Guo e Miao, 2010; Fiorentino *et al.*, 2012; Fiorentino *et al.*, 2016], preme evidenziare come nel nostro caso *A. donax* sia micorrizzata che non, ha mostrato ottime capacità di sopravvivenza e di sviluppo nei confronti di un terreno contaminato sia con il mix di nove metalli pesanti, sia con il mix di sedici IPA. Ciò lascia intendere l'elevata resistenza ai contaminanti palesata da *A. donax*, e di conseguenza, potrebbero aprirsi nuove prospettive di studio e ricerca per un'applicazione di successo sul campo. Alla luce di quanto detto, gli obiettivi futuri di una possibile ricerca potrebbero essere quelli di approfondire e potenziare i meccanismi di intervento da parte degli organismi impiegati, aumentando la numerosità delle prove di esposizione ai contaminanti di maggior rilievo e valutando anche quali potrebbero essere i destini alternativi della biomassa prodotta; quest'ultima, infatti, può avere un valore

economico di rilievo se impiegata per la produzione di energia sostenibile. Quindi, è possibile affermare che gli esperimenti condotti in questo lavoro di tesi rappresentano un importante “driver” per eventuali studi futuri atti al miglioramento delle tecniche di fitorimediazione per l'eventuale applicazione nei processi di recupero di suoli contaminati da metalli pesanti e idrocarburi policiclici aromatici.

Bibliografia

Adams R.H., 1999. *Farmacologia e Terapeutica Veterinaria*. Edizione Italiana a cura di C. Beretta, Emsi editore, Roma, pp. 793-823.

Adebisi M.S., Adebowale T.O., Adeniyi A.O., Ismail O.I., 2014. Bioaccumulation of Heavy Metals using Selected Heavy Metal Tolerant organisms Isolated from Dumpsite Leachate. *Nature and Science* 2014;12(10).

Agnello A.C., Bagard M., van Hullebusch E.D., Esposito G., Huguenot D., 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of The Total Environment*, Volumes 563–564, 1 September 2016, Pages 693-703.

Ali H., Khan E., Sajad M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881.

Alloway B.J., 1995. *Heavy metals in soils*. Blackie Academic & Professional, II edition, London.

Andini S., 2009. *la Phytoremediation: impiego di specie vegetali per la bonifica di suoli contaminati da metalli pesanti*. Università degli Studi di Napoli Federico II, 2009.

ANPA, 1999. *Il rischio in Italia da sostanze inorganiche*, Documenti 1/1999.

ATSDR, 1999. Toxicological profile for Mercury. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Report.

ATSDR, 2005a. Toxicological profile for Nickel. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Report.

ATSDR, 2005b. Toxicological profile for Zinc. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Report.

ATSDR, 2012a. Toxicological profile for Cadmium. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Report.

ATSDR, 2012b. Toxicological profile for Vanadium. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Report.

Baize D., (1997). *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols* INRA, Paris, pp.408.

Bamforth S.M. e Singleton I. (2005). Review - Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80:723-736.

Barceló J., Poschenrieder C., 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to science*, 2 (3): 333-344 (2003) Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.

- Barceloux D.G., 2000. Vanadium. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999;37(2):265-78.
- Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codon A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *INT. MICROBIOL.* 7 (2004), no. 4, pp. 249-260.
- Bidya D.S., Meghana K., Shriharsh R.B., Anudeep K., Ramakrishna S., 2014. Chromium-induced nephrotoxicity and ameliorative effect of carvedilol in rats: Involvement of oxidative stress, apoptosis and inflammation
- Brooks R.R., Chambers M.F., Nicks L.J., Robinson B.H., 1998. "Phytomining". *Trends Plant Sci.* 3, 359–362, 1998.
- Campos V.M., Merino I., Casado R., Pacios L.F., Gómez L., 2008. Review - Phytoremediation of organic pollutants. *Span. J. Agric. Res.* 6:38-47.
- Cappelli A., Ulissi U., Valzano M., Damiani C., Epis S., Gabrielli M.G., Conti S., Polonelli L., Bandi C., Favia G., Ricci I., 2014. A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. *PLOS ONE*, May 2014 | Volume 9 | Issue 5 | e95988.
- Cass A.E.G., Hill H.A.O., 1980. Copper proteins and copper enzymes. *Biological Roles of Copper*, chapter 5. Ciba foundation symposium 79 (new series), Excerpt Medica, Amsterdam, The Netherlands, 71-85, 1980.
- Cecchetti M., 2006. La disciplina giuridica della tutela ambientale come diritto dell'ambiente. Università LUISS Guido Carli, Facoltà di giurisprudenza, Corso di diritto dell'ambiente; *Federalismi*, rivista di diritto pubblico italiano, comunitario e comparato, 2006. Available at: [http:// www.federalismi.it](http://www.federalismi.it)
- Cerofolini A., 2006. "Brevi note sulle norme ambientali del nuovo testo unico". *Corpo Forestale dello Stato*, 2006. Available at: [http:// www.corpoforestale.it](http://www.corpoforestale.it)
- Chaney R.L., Malikz M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Bake A.J.M., 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 1997, 8:279-284.
- Copat C., Brundo M.V., Arena G., Grasso A., Oliveri Conti G., Ledda C., Fallico R., Sciacca S., Ferrante M., 2012. Seasonal variation of bioaccumulation in *Engraulis encrasicolus* (Linneaus, 1758) and related biomarkers of exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Vol. 86, 1 December 2012, Pages 31–37
- Conceição Gomes M.A., Hauser-Davis R.A., Nunes de Souza A., Vitória A.P., 2016. Metal phytoremediation: General strategies, genetically modified plants and applications in metal nanoparticle contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134(2016)133–147.
- Costantini S., Giordano R., Bodano L., D'Ilio S., 2004. Contaminazione ambientale da metalli pesanti connessa con attività mineraria dismessa in Sardegna. Studio preliminare. ISS, Istituto Superiore di Sanità. ISSN 1123-3117, Rapporti ISTISAN 04/28, 2004.
- CSM – Centro sviluppi materiali - www.csm.it

Cunningham, S. D., and Ow, D. W. "Promises and prospect of phytoremediation". *Plant Physiol.*, 110, 715-719, (1996).

Das S., Raj R., Mangwani N., Dash H.R., Chakraborty J., 2014. Heavy metals and hydrocarbons: adverse affects and mechanism of toxicity. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*.

Delgado Fernandez M.E., 2013. Selezione di isolati fungini utili per il biorisanamento di suolo inquinato da idrocarburi. Università degli Studi di Pavia, 2013.

Duffus J.H., 2002. "Heavy Metals" - A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 793–807, 2002.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *The EFSA Journal*, 980, 1-139, 2009.

European Food Safety Authority (EFSA). Contam Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. *EFSA Journal* 2015; 13(2):4002, 202 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4002, 2015.

European Copper Institute (ECI), 2008. La valutazione volontaria del rischio per il Cu. Available at: www.copperalliance.eu/vra/documents.

EPA (Environmental Protection Agency). "A Citizen's Guide to Phytoremediation", United States Environmental Protection Agency, 6, 2000.

Ferrara G., Buratta S., Fettucciari K., Chiaradia E., Dell'Omo M., Murgia N., Emiliani C., Muzi G., Gambelunghe A., 2014. Stress ossidativo e apoptosi indotti dal Cromo (VI): risultati a confronto tra due linee cellulari polmonari. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia*. IRIS - Res&Arch Institutional Research Information System - Research & Archive.

Fiorentino N., Fagnano M., Ventrino V., Pepe O., Zoina A., Impagliazzo A., Spigno P., 2012. Assisted phytoextraction of heavy metals: compost and *Trichoderma* effects on giant reed uptake and soil quality. *Plant Soil Environ* 2012.

Fiorentino N., Ventrino V., Rocco C., Cenvinzo V., Agrelli D., Gioia L., Di Mola I., Adamo P., Pepe O, Fagnano M., 2016. Giant reed growth and effects on soil biological fertility in assisted phytoremediation of an industrial polluted soil. *Sci Total Environ*. 2016 Oct 6.

Glass D.J., 1999. Economic potential of phytoremediation. In *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, eds. Raskin I., Ensley B.D., pp 15-31, John Wiley & Sons Inc, New York, NY.

Gerhardt K.E., Huang X.D., Glick B.R., Greenberg B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* 176 (2009) 20–30.

- Guo Z.H., Miao X.F., 2010. Growth changes and tissues anatomical characteristics of giant reed (*Arundo donax* L.) in soil contaminated with arsenic, cadmium and lead.
- Hajieghrari B., 2010. Effect of some metal-containing compounds and fertilizers on mycoparasite *Trichoderma* species mycelia growth response. *Afr J Biotechnol* 9:4025-4033.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2, 43-56.
- Hazrat A., Ezzat K., Muhammad A.S., 2013. "Phytoremediation of heavy metal – Concepts and applications". *Chemosphere* 91, Elsevier, (2013).
- Horta A., Malone B., Stockmann U., Minasny B., Bishop T.F.A., McBratney A.B., Pallasser R., Pozza L., 2015. Potential of integrated field spectroscopy and spatial analysis for enhanced assessment of soil contamination: A prospective review. *Geoderma* 241–242 (2015) 180–209.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1987. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data, Vol. 32. World Health Organization, Lyon, France, pp. 419-430.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), "Nickel and nickel compounds". IARC Monographs 100 C. World Health Organization, Lyon, 2012. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C.pdf>.
- Jang K.Y., Cho S.M., Seok S.J., Kong W.S., Kim G.H., Sung J.M., 2009. Screening of biodegradable function of indigenous ligno-degrading mushroom using dyes laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl Microbiol Biot* 46:313–317, doi:10.1007/s002530050823.
- Jiang Y., Lei M., Duan L., Longhurst P., 2015. Integrating phytoremediation with biomass valorisation and critical element recovery: A UK contaminated land perspective. *Biomass and Bioenergy* 83 (2015) 328e339.
- Jing Y., He Z., Yang X., 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 2007 8(3):192-207.
- Kabata-Pendias A., 1989. Trace elements in the soil and plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Jones K.C., Grimmer G., Jakob J., Johnston A.E., 1989. Changes in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of wheat frain and pasture grassland over last century from one site in the U.K. *Sci. Total Environ.* 78, 117-130.
- Jun H.K., Ju C.K., 2016. Oxidative stress, neurotoxicity, and metallothionein (MT) gene expression in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* under the different levels of dietary chromium (Cr⁶⁺) exposure Original. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 125, March 2016, Pages 78-84.

- Kabata-Pendias A., 2001. Trace elements in the soil and plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kadri T., Rouissi T., Brar S.K., Cledon M., Sarma S., Verma M., 2016. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Science* (2016) xxx – xxx (in press).
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1995. “Fungal biosorption: an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review”. *Bioresour. Technol.*, 1995; 53:195–206.
- Kavamura V.N., Esposito E., 2010. Biotechnological Strategies Applied to the Decontamination of Soils Polluted with Heavy Metals. *Biotechnology Advances*, Volume 28, pp 61–69.
- Kos B., Grčman H., Leštan D., 2003. Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant Soil Environ.*, 49, 2003 (12): 548–553.
- Kumar A., Bisht B.S., Joshi V.D., Dhewa T., 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Sciences*, Volume 1, No 6, 2011.
- Lasat M.M., 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, Vol. 2, (5): 1-25.
- Leung H.M., Wang Z.W., Ye Z.H., Yung K.L., Peng X.L., Cheung K.C., 2013. Interactions Between Arbuscular Mycorrhizae and Plants in Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils: A Review. *Pedosphere* 23(5): 549–563, 2013.
- Liu R., Xiao N., Wei S., Zhao L., An J., 2014. Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Science of the Total Environment* 473–474 (2014) 350–358.
- Luo D., Yf X., Tan Z.L., Li X.D., 2013. Removal of Cu²⁺ ions from aqueous solution by the abandoned mushroom compost of *Flammulina velutipes*. *J Environ Biol* 34:359–365.
- Marquès M., Mari M., Audi-Mirò C., Sierra J., Soler A., Nadal M., Domingo J.L., 2016. Photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils under a climate change base scenario. *Chemosphere* 148 (2016) 495-503.
- Machado M.D., Soares E.V., Soares H.M.V.M., 2010. Removal of heavy metals using a brewer’s yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: Chemical speciation as a tool in the prediction and improving of treatment efficiency of real electroplating effluents. *Journal of Hazardous Materials* 180 (2010) 347–353.
- Matsubara M., Lynch J.M., De Leij F.A.A.M., 2006. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 1365-1372.

- McCutcheon S.C., Jørgensen S.E., 2008. Phytoremediation. Ecological Engineering Phytoremediation, 2751-2766.
- Miani N., Skert N., Giorgini L., Falomo J., Grahonja R., 2007. Monitoraggio di IPA aerodispersi nella provincia di Trieste tramite Moss-Bags e quadrelli come accumulatori. Relazione ARPA FVG - Dipartimento di Trieste, 2007.
- Mirza N., Pervez A., Mahmood Q., Shah M.M., Shafqat M.N., 2011. Ecological restoration of arsenic contaminated soil by *Arundo donax* L. Ecological Engineering 37 (2011) 1949–1956.
- Mollea C., Bosco F., Ruggeri B., 2005. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. Chemosphere 60 (2005) 636–643.
- Mori T., Watanabe M., Taura H., Kuno T., Kamei I., Kondo R., 2015. Degradation of chlorinated dioxins and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and remediation of PAH-contaminated soil by the entomopathogenic fungus, *Cordyceps militaris*. Journal of Environmental Chemical Engineering 3 (2015) 2317–2322.
- Mudhoo A., Sharma S.K., Lin Z.Q., Dhankher O.P., 2010. “Phytoremediation of Arsenic-Contaminated Environment An Overview”, (Eds. Sharma S.K., Mudhoo A.), Green chemistry for environmental sustainability, Taylor and Francis Group, Boca raton London, New York, 127, (2010).
- Mueller J.G., Cerniglia C.E., Pritchard P.H., 1996. Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In Bioremediation: Principles and Applications, pp. 125–194, Cambridge University Press, Cambridge (1996).
- Newman L.A., Reynolds C.M., 2004. Phytodegradation of organic compounds, Curr Opin Biotechnol 15 (2004), pp. 225–230.
- Prasad, M.N.V., 2007. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) - A potential crop for environmental industry. HELIA, 30, Nr. 46, p.p. 167-174, (2007).
- Rafati M., Khorasani N., Moattar F., Shirvany A., Moraghebi F., Hosseinzadeh S., 2011. “Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil”. Int. J. Environ. Res. 5, 961–970, 2011.
- Roy S., Labelle S., Mehta P., Mihoc A., Fortin N., Masson C., Leblanc R., Cha G., Sura C., Gallipeau C., Olsen C., Delisle S., Labrecque M., Greerl C.W., 2005. Phytoremediation of heavy metal and PAH-contaminated brownfield sites. Plant and Soil 272: 277–290.
- Sekara A., Poniedzialek M., Ciura J., Jedrszczyk E., 2005. “Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation”. Pol. J. Environ. Stud. 14, 509–516, (2005)
- Sestili P., 2013. “Suolo e territorio”. Capitolo 9, Stato ambiente, Tematiche 2013, 2014. Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA). Available at:

http://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/statoambiente/tematiche2013/9_Suoloeterritorio.pdf.

Settlemyre C.T., Matrone G., 1967a. In Vivo Interference Of Zinc With Ferritin Iron In The Rat. *J Nutr* 92:153-158.

Settlemyre C.T., Matrone G., 1967b. In Vivo Effect Of Zinc On Iron Turnover In Rats And Life Span Of The Erythrocyte. *J Nutr* 92: 159-164.

Shailer H., McBride M., Harrison E., 2009. Sources and Impacts of Contaminants in Soils. Cornell Waste Management Institute. Department of Crop & Soil Sciences. <http://cwmi.css.cornell.edu>

Sharma P., Pandey S., 2014. Status of Phytoremediation in World Scenario. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2014, Vol. 2, No. 4, 178-191.

Shimp J.F., Tracy J.C., Davis L.C., Lee E., Huang W., Erickson L.E., 1993. Beneficial Effects of Plants in the Remediation of Soil and Groundwater Contaminated with Organic Materials *Crit. Rev. in Environmental Science and Technology* 23, 41-77.

Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18 (2002) 647–658.

Tahir U., Yasmin A., Khan U.H., 2015. Phytoremediation: Potential flora for synthetic dyestuff metabolism. *Journal of King Saud University – Science* (2015).

Tay C.C., Liew H.H., Yin C.Y., Abdul-Talib S., Surif S., Suhaimi A.A., Yong S.K., 2011. Biosorption of Cadmium ions using *Pleurotus ostreatus*: Growth kinetics, isotherm study and biosorption mechanism. *Korean J Chem Eng* 28:825–830, doi:10.1007/s11814-010-0435-9

Templeton D.M., 2003. The importance of trace element speciation in biomedical science. *Anal Bioanal Chem.* 2003 Apr;375(8):1062-6.

Trap, S., Kohler, A., Larsen, L. C., Zambrano, K. C., and Karlson, U., “Phytotoxicity of fresh and weathered diesel and gasoline to willow and poplar tree”s., *J. Soil Sediments*, 1, 71-76, (2005)

Vamerali T., Bandiera M., Coletto L., Zanetti F., Dickinson N.M., Mosca G., 2009. Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environmental Pollution*, Volume 157, Issue 3, March 2009, Pages 887-894.

Van Oosten M.J., Maggio A., 2014. Functional biology of halophytes in the phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Environmental and Experimental Botany* 111 (2015) 135–146.

Van Sprang P., Vangheluwe M., Van Hyfte A., Heijerick D., Vandebroele M., Verdonck F., 2008. Voluntary risk assessment of copper, copper (II) sulphate pentahydrate, copper (I)oxide, copper(II)oxide, dicopper chloride trihydroxide. Available at: European Chemicals Agency (ECHA), <http://echa.europa.eu/it/>

Venkata Mohan S., Kisa T., Ohkuma T., Kanaly R.A., Shimizu Y., 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev Environ Sci Biotechnol* (2006) 5:347–374.

Venugopal B., Luckey T.D., 1978. *Chemical Toxicity Of Metals And Metalloids. Metal Toxicity in Mammals 2* Plenum Press, New York And London.

Vidali M., 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl Chem* Vol. 73, No.7, pp. 1163–1172.

VV.AA., 2009. European Food Safety Authority (EFSA), “Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food”. *The EFSA Journal*, 980, 1-139, 2009.

VV.AA., 2015. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), “Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water”. *EFSA Journal* 2015; 13(2):4002, 202 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4002, 2015.

Wang J., Chen C., 2006. Biosorption of Heavy Metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A Review. *Biotechnology Advances* 24 (2006) 427–451.

Wang J., Chen C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances* 27 (2009) 195–226.

Winqvist E., Björklöf K., Schultz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., Cajthaml T., Steffen K.T., Jørgensen K.S., Tuomela M., 2013. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi - From laboratory to field scale. *International Biodeterioration & Biodegradation* 86 (2014) 238-247.

Wuana R.A, Okieimen F.E., Imborvungu J.A., 2010. Removal of heavy metals from contaminated soil using chelating organic acids. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 7, 485-496, (2010).

www.minambiente.it/comunicati/conferenza-di-servizi-istruttoria-il-sito-di-interesse-nazionale-sin.

www.mszengeering.com

Yin H., Tan Q., Chen Y Lv G., He D., Hou X., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution recorded in annual rings of ginkgo (*Ginkgo biloba* L.): Translocation, radial diffusion, degradation and modeling. *Microchemical Journal* 97 (2011) 131–137.

Yoon J., Cao X., Zhou Q., Ma L.Q., 2006. “Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site”. *Sci. Total Environ.* 368, 456–46, 2006.

Zafra G., Cortès-Espinosa D.V., 2015. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. *Environ Sci Pollut Res* (2015) 22:19426-19433.

Zhang H., Zheng L.C., Yi X.Y., 2009. "Remediation of soil co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L.)", *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 6, 249-258, (2009).

Zhuang, P., Ye, Z. H., Lan, C. Y., Xie, Z. W, and Hsu, W. S., "Chemically assisted phytoextraction of heavy metal contaminated soils using three plant species". *Plant Soil*, 276, 153-162, (2005).