



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Linee guida scientifiche per la bonifica biologica delle zone agricole del SIN Brescia-Caffaro

Antonio Di Guardo
Elisa Terzaghi
Elisabetta Zanardini
Cristiana Morosini

Università degli Studi dell'Insubria
Dipartimento di Scienza ed Alta Tecnologia
(DSAT)
Como

Sara Borin
Francesca Mapelli
Lorenzo Vergani

Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la
Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS)
Milano

Giuseppe Raspa

Sapienza Università di Roma
Dipartimento di Ingegneria Chimica Materiali Ambiente
Roma

19 dicembre 2018

Indice

Introduzione	4
1. Metodi di indagine	6
1.1 Metodi di indagine chimica	6
1.2 Metodi di indagine microbiologica	6
2. Caratterizzazione chimico-microbiologica del sito	8
2.1 Caratterizzazione dei suoli	9
2.2.1 FASE 1	9
2.2.2 FASE 2	13
2.2.3 FASE 3	23
2.3 Caratterizzazione delle comunità microbiche autoctone	29
2.3.1 Struttura delle comunità batteriche e correlazione con il profilo di contaminazione	29
2.3.2 Attività delle comunità microbiche e correlazione con il profilo di contaminazione	33
3. Scelta della tecnica di bonifica biologica da applicare sui suoli Caffaro	35
4. Sperimentazioni di <i>phyto-rhizoremediation</i>	36
4.1 Schema sperimentale	37
4.2 Risultati dell'esperimento di phyto-rhizoremediation	39
4.2.1 Risultati delle analisi chimiche	40
4.2.1.1 Concentrazioni nel suolo	40
4.2.1.2 Concentrazioni nelle biomasse	43
4.2.1.3 Riduzione delle concentrazioni tra controlli e trattamenti	48
4.2.1.3 Riduzione delle concentrazioni tra controlli e trattamenti	53
4.2.2 Risultati delle analisi microbiologiche	56
4.2.2.1 Influenza della piantumazione sulla struttura delle comunità microbiche nel suolo circostante le radici	57
4.2.2.2 Effetto dei diversi trattamenti nella biostimolazione della comunità microbica totale e di potenziali degradatori	59
4.3 Conclusioni	62
5 Esperimento in campo	64
5.1 Schema sperimentale	64
5.2 Risultati di rhizoremediation ottenuti nella sperimentazione in campo	67
5.3 Risultati ottenuti dall'analisi delle comunità microbiche (batteriche e fungine) del suolo	67
5.4 Conclusioni	70

6. Mobilità dei contaminanti.....	71
6.1 Biodisponibilità e bioaccessibilità delle sostanze organiche	71
6.2 Speciazione dei Metalli.....	72
6.2.1 Speciazione dell'Arsenico	72
6.2.3 Speciazione del Mercurio	73
7 Modellizzazione del destino ambientale	76
7.1 Modello SoilPlusVeg	76
8 Metaboliti di PCB nel suolo e nelle piante	82
9 Esperimento con colonne di suolo: verifica mobilità e presenza di metaboliti... 85	
10. Tempi di <i>remediation</i> per le aree a diversa contaminazione (contaminanti organici).....	94
10.1 Metodo di calcolo delle rhizoremediation half-lives per contaminanti organici	94
10.2 Valori di rhizoremediation HL ottenuti.....	94
10.3 Valori di natural attenuation half-lives derivati dalla letteratura	96
10.4 Criteri di selezione dei valori di half-life per la costruzione delle mappe	98
10.5. Stima dell'evoluzione temporale delle concentrazioni per le aree a diversa contaminazione.....	100
11. Mappe dei tempi di <i>remediation</i>	101
12 Conclusioni complessive.....	114
13. Questioni aperte e prospettive.....	117
13.1 Interventi di messa a punto generale.....	118
13.2 Indagine sulla presenza e destino dei metaboliti polari.....	118
13.3 Messa a punto della fitoestrazione del Mercurio	119
13.4 Messa a punto della fitoestrazione dell'Arsenico	119
13.5 Miglioramento della rhizoremediation mediante bioaugmentation	119
Pubblicazioni scientifiche prodotte durante questo progetto.....	120
Presentazioni a convegni scientifici, nazionali ed internazionali.....	121
BIBLIOGRAFIA	124

Introduzione

ERSAF è stata incaricata da Regione Lombardia (lettera di incarico n. 17688/RCC del 14 marzo 2013) della “Realizzazione delle attività finalizzate alla messa in sicurezza di emergenza e progettazione della bonifica dei terreni delle aree agricole nel Sito di Interesse Nazionale di Brescia – Caffaro, come definite all’art. 3, punto E del relativo Accordo di Programma”.

In seguito a tale incarico ERSAF ha stipulato accordi di collaborazione con il Dipartimento di Scienza ed Alta Tecnologia (DSAT) dell’Università degli Studi dell’Insubria, sede di Como e con il Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l’Ambiente (DeFENS) dell’Università degli Studi di Milano per la collaborazione tecnico-scientifica finalizzata al biorimedio dei terreni delle aree agricole del SIN Brescia-Caffaro e loro successiva bonifica. Il DSAT e il DeFENS ed ERSAF istituiscono una cooperazione scientifica finalizzata alla comune realizzazione delle attività di ricerca e sperimentali necessarie a fornire idonei supporti di conoscenze sui temi del destino ambientale dei contaminanti e della microbiologia dei suoli nel SIN Brescia-Caffaro. Come recita l’accordo di collaborazione, la cooperazione è funzionale alla definizione di una metodologia finalizzata alla sperimentazione di tecniche di biorimedio nei terreni agricoli del SIN e alla progettazione della loro bonifica mediante estensione delle tecniche risultate migliori per i fini proposti. Il DSAT si avvale inoltre della collaborazione con il Prof. Giuseppe Raspa del Dipartimento di Ingegneria Chimica Materiali Ambiente (DICMA) di Sapienza Università di Roma (per le competenze di carattere geostatistico e di analisi spaziale).

Oggetto del presente rapporto

Oggetto del presente rapporto è la predisposizione delle linee guida per la bonifica biologica (*bioremediation*) dei terreni agricoli del sito di interesse nazionale (SIN) Brescia Caffaro.

Sebbene altre sostanze siano state trovate, nelle varie fasi di caratterizzazione (fase 1, 2, 3, vedi capitolo 2), a concentrazioni superiori alle CSC, il presente rapporto si limita a trattare in dettaglio le categorie di sostanze previste dall’Accordo di Programma (AdP) (Accordo di Programma del 29.09.2009 tra il Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, la Regione Lombardia, la Provincia di Brescia, il Comune di Brescia, il Comune di Castegnato e il Comune di Passirano per la definizione degli interventi di messa in sicurezza e successiva bonifica nel Sito di Interesse Nazionale di Brescia – Caffaro) ovvero policlorobifenili (PCB), diossine e furani (PCDD e PCDF), e mercurio (Hg). Tuttavia in seguito all’emergere di concentrazioni rilevanti di arsenico nei suoli campionati come anche riportato nell’incipit dell’allegato tecnico dell’AdP, per le “evidenze di contaminazione diffusa principalmente da PCB, PCDD-PCDF, arsenico e mercurio”, si è deciso di aggiungere l’arsenico (As) fra le sostanze oggetto di studio e di bonifica in considerazione del potenziale effetto fitotossico di dette concentrazioni, tale da potenzialmente inficiare la crescita delle piante da utilizzare per la *bioremediation* delle aree.

Verranno illustrate le attività eseguite in collaborazione con ERSAF per valutare le migliori condizioni e le specie vegetali da selezionare per la *phyto-rhizoremediation* delle aree, ovvero l’ausilio di piante ed in particolare della capacità del loro apparato radicale di instaurare rapporti con i microrganismi dei suoli tali da facilitare la degradazione delle sostanze organiche oggetto di studio (PCB, PCDD e PCDF). Alcune specie di piante possono altresì fitoestrarre con maggiore efficacia i metalli dal suolo e concentrarli nella biomassa vegetale (*phytoextraction* o *fitoestrazione*) in modo da potere efficacemente abbassare il tenore di metalli e metalloidi come le sostanze oggetto di studio, mercurio (Hg) e arsenico (As).

Oltre ai positivi risultati delle sperimentazioni, verranno riportati i problemi incontrati e i suggerimenti per potere efficacemente proseguire nella messa a punto della *bioremediation*.

Questo rapporto è **chiuso per la parte scientifica al giorno 3 dicembre 2018** in ragione della richiesta di ERSAF di consegnare i risultati delle linee guida al fine di predisporre quanto richiesto dall'Accordo di Programma entro il 31 dicembre 2018.

1. Metodi di indagine

1.1 Metodi di indagine chimica

Le analisi chimiche sono state appaltate a diversi istituti ed aziende, elencate qui sotto.

Le analisi di Fase 1 sono state eseguite nel giugno 2014 presso il Dipartimento Ambiente & Salute dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Milano, sotto la supervisione del Dott. Enrico Davoli.

Le analisi di Fase 2 e 3 sono state eseguite da Theolab S.p.A. (ora Mérieux NutriSciences) di Volpiano (TO). Sono stati forniti dai consulenti specifici protocolli di campionamento e trasporto dei campioni. I risultati delle analisi di Fase 2 sono pervenute nel febbraio del 2015, mentre quelli di Fase 3 nel marzo del 2015.

Le analisi dei suoli degli esperimenti in serra ed in campo sono state eseguite da INDAM LABORATORI S.r.L., di Castelmella (BS). I risultati delle analisi in campo del t0 sono pervenuti nel 2017. I risultati delle analisi in serra sono stati consegnati in via ufficiosa da maggio a dicembre 2018.

Le analisi di speciazione dell'arsenico sono state eseguite dal Prof. Marco Grotti del Dipartimento di Chimica e Chimica industriale dell'Università di Genova nel 2017.

Le analisi di speciazione del mercurio sono state eseguite dal Prof. Stefano Covelli del Mercurilab del Dipartimento di Matematica e Geoscienze dell'Università di Trieste nel 2017.

I risultati completi delle analisi di cui sopra sono disponibili sul sito di ERSAF, nella sezione "SIN Brescia-Caffaro" che appare sulla home page (Dicembre 2018).

Le analisi degli eluati delle colonne di suolo per i PCB sono state eseguite dal gruppo di Modellistica Ambientale (EMG) del Dipartimento di Scienza ed Alta Tecnologia dell'Università degli Studi dell'Insubria, sede di Como. Le analisi sono state eseguite filtrando i campioni di acqua con filtro GF/F (per separare il particolato) ed estraendo la frazione acquosa con dischi Empore-Disk C18, eluiti con cicloesano, acetone ed etilacetato. Anche i campioni dei filtri sono stati estratti con gli stessi solventi usando la tecnica di estrazione con bagno ad ultrasuoni. Le analisi sono state effettuate con GC-MS (Agilent GC 7890 e MS 5977) usando standard interni marcati ¹³C.

1.2 Metodi di indagine microbiologica

Tutti i campioni di suolo analizzati chimicamente per la valutazione della concentrazione degli inquinanti sono anche stati analizzati microbiologicamente presso il laboratorio di Microbiologia e Biotecnologie Ambientali del Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente dell'Università di Milano (responsabile Prof.ssa Borin), impiegando metodi consolidati nel gruppo di ricerca e/o pubblicati su riviste scientifiche internazionali. I risultati delle analisi chimiche e microbiologiche in ciascun campione sono quindi stati sottoposti ad analisi statistica, al fine di evidenziare una correlazione tra presenza di inquinanti e comunità microbiche residenti nel suolo.

Le seguenti metodologie di caratterizzazione microbiologica sono state applicate ai suoli:

a) Profilazione delle comunità batteriche e fungine presenti nel suolo. La metodica molecolare si basa sull'analisi, mediante tecniche di PCR-fingerprinting (in particolare il metodo utilizzato è l'ARISA-fingerprinting), del DNA totale estratto dal suolo. La tecnica produce per ciascun

campione un profilo di picchi (*fingerprint*) che indica la presenza/assenza delle diverse popolazioni batteriche o fungine presenti nei campioni. Le comunità batteriche/fungine possono quindi essere confrontate applicando programmi statistici all'analisi dei *fingerprint* ottenuti, quantificandone il grado di similarità. L'analisi statistica permette inoltre di confrontare il *fingerprint* della comunità microbica con quello degli inquinanti misurati nello stesso campione di suolo, evidenziando l'eventuale esistenza di correlazioni con significatività statistica.

b) Catalogo massivo dei gruppi batterici presenti nel suolo. Alcuni campioni relativi alla fase 1 e 2 di caratterizzazione dell'area (capitolo 2.3), sono stati anche analizzati mediante ulteriori tecniche molecolari che permettono di identificare migliaia di gruppi batterici presenti nel campione, ottenendo un dettagliato catalogo dei gruppi più abbondanti. Tale analisi, che ha un livello di sensibilità più elevato rispetto alla profilazione tramite *fingerprint*, è stata applicata su un ristretto numero di campioni dettato da limitazioni di budget, ed i risultati sono stati valutati a conferma di quelli ottenuti dalla profilazione tramite *fingerprint*.

c) Quantificazione dell'attività della comunità microbica del suolo. È stata quantificata *in vitro* nei campioni di suolo l'attività idrolitica nei confronti della sostanza organica, come indicazione della vitalità (attività metabolica) della comunità residente. L'idrolisi della sostanza organica ha particolare attinenza con la potenzialità dei microrganismi del suolo di aumentare la biodisponibilità dei PCB che, per via della loro intrinseca natura idrofobica, si ipotizza che si trovino nei suoli del SIN Brescia Caffaro inglobati nella frazione organica del suolo che li rende poco accessibili alla biodegradazione. A tal fine è stato applicato il test biochimico di idrolisi della fluorescina diacetato (FDA). In questa analisi è stata addizionata FDA ai suoli, quale molecola indicatrice della sostanza organica, e successivamente è stato quantificato tramite analisi spettrofotometrica il prodotto fluorescente della sua idrolisi.

d) Quantificazione di batteri e funghi nel suolo. La concentrazione di batteri e funghi è stata stimata nei suoli applicando un metodo molecolare basato sulla quantificazione tramite qPCR di geni specifici (geni ribosomali), presenti in tutte le cellule, rispettivamente batteriche o fungine, nel DNA estratto da un grammo di suolo. Il numero di geni rilevato può essere considerato un indicatore della concentrazione dei microrganismi.

e) Quantificazione dei batteri potenzialmente in grado di degradare in ambiente aerobico i PCB. In letteratura sono noti pochi batteri in grado di degradare in condizioni aerobiche i PCB, e per alcuni di questi la degradazione segue la stessa via metabolica e vede l'intervento di uno stesso specifico enzima (bifenile diossigenasi). Basandoci sulle conoscenze attuali, è stato misurato mediante qPCR il numero di copie del gene relativo a questo enzima (gene *bphA*) presenti nel DNA estratto da un grammo di suolo. Tali valori di concentrazione, seppur considerando solo i geni noti dei batteri noti in grado di degradare i PCB, sono attualmente la migliore stima ottenibile per la valutazione dell'entità della popolazione degradatrice. Il dato ottenuto potrebbe ragionevolmente essere una sottostima della popolazione degradatrice in quanto non considera i batteri ancora sconosciuti, che i) degradano i PCB con vie metaboliche diverse da quella che coinvolge l'enzima bifenile diossigenasi, e/o ii) possiedono geni con sequenze nucleotidiche non note, diverse da *bphA*, e pertanto non rilevabili tramite qPCR.

2. Caratterizzazione chimico-microbiologica del sito

Durante i primi due anni di collaborazione sono stati predisposti i protocolli per la valutazione spaziale della contaminazione in tre aree agricole rappresentative (Figura 2.1). La caratterizzazione delle tre aree selezionate ha un duplice scopo. Il primo è quello di orientare la sperimentazione della tecnologia di bonifica, ovvero fornire gli elementi perché si tenga debitamente conto della natura dei contaminanti, delle loro concentrazioni e della loro variabilità spaziale. Il secondo è quello di trasferire i risultati della sperimentazione condotta su una sola tipologia di suolo su tutta l'area in maniera tale da ottenere una mappa della decontaminazione attesa in funzione del tempo.

I contaminanti oggetto di attenzione e i cui valori misurati da ARPA superavano le soglie di Tabella A della legge 152/2006 (per le aree residenziali), erano PCB, diossine e furani, mercurio e arsenico. I PCB sono stati prodotti industrialmente presso la Caffaro per circa 50 anni (Di Guardo et al., 2017) e sono rappresentati da famiglie di congeneri a diverso numero di atomi di cloro (da mono a decacloro), per un totale di 209 congeneri (Figura 2.1 a). Generalmente poco mobili, estremamente persistenti (xenobiotici) nell'ambiente e bioaccumulabili. Alcuni di essi (12), per la loro struttura chimica planare hanno tossicità analoga a quella di diossine furani (PCB-DL). Le diossine e i furani (Figura 1.1 b e c) sono prodotti indesiderati di alcune produzioni industriali e combustioni e constano in 75 congeneri per le diossine e 135 per i furani. Solo 7 congeneri per le diossine e 12 per i furani hanno tossicità elevata e vengono espresse valutando le concentrazioni naturali moltiplicate per il rispettivo fattore di tossicità (TEF), ottenendo per sommatoria un valore di tossicità equivalente (TEQ) per esprimere la tossicità. Diossine e furani sono anche essi generalmente poco mobili, estremamente persistenti nell'ambiente (xenobiotici) e bioaccumulabili.

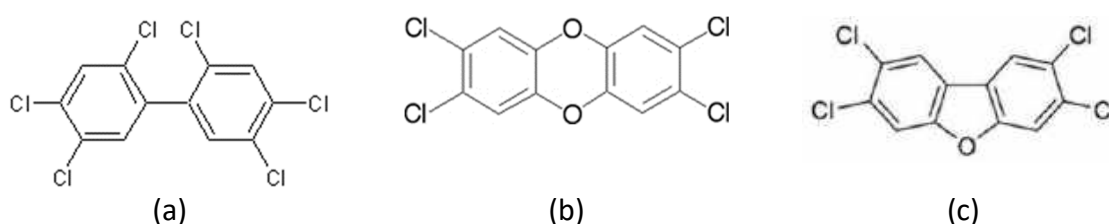


Figura 2.1 – Esempio di PCB (PCB 153) (a), diossina (2,3,7,8-TCDD) e furano (2,3,7,8-TCDF)

Mercurio e arsenico sono rispettivamente un metallo pesante e un metalloide, nell'ambiente si trovano generalmente a causa di emissioni da lavorazioni industriali ma possono provenire anche da fonti naturali. Sono presenti nell'ambiente in diverse forme (specie), a vari livelli di biodisponibilità. La mobilità dipende dalle specie, alcune sono generalmente poco mobili, altre molto di più (alcune sono volatili).

Per la caratterizzazione chimica del sito sono state definite tre fasi:

- Fase 1: valutazione qualitativa dei contaminanti: tale fase ha permesso di ottenere un elenco aggiornato dei contaminanti presenti a livello di congeneri: policlorobifenili (PCB), diossine (PCDD), furani (PCDF) oltre che dei metalli presenti (mercurio, arsenico, cromo ecc.)
- Fase 2: ricostruzione della distribuzione dei contaminanti con la profondità (0-1 m). È stato possibile ricostruire il gradiente verticale in diversi punti per le tre aree e valutare le profondità raggiunte dai contaminanti.

- Fase 3: la disponibilità di informazioni della distribuzione dei contaminanti sul piano xy ha permesso di ottenere le informazioni necessarie per la ricostruzione tridimensionale della contaminazione.

Tali fasi verranno dettagliate nella sezione 2.2.

2.1 Caratterizzazione dei suoli

All'interno delle aree agricole del SIN sono state selezionate da ERSAF per la sperimentazione tre aree di circa 5 Ha ciascuna, per le quali sono stati realizzati accordi con i proprietari. Le aree (di seguito chiamate "A", "R" e "T" sono mostrate in Figura 2.2.



Figura 2.2 – Perimetro del SIN Brescia Caffaro e collocazione spaziale delle aree "A", "R" e "T".

In tali aree sono state effettuate una serie di campionamenti e determinazioni analitiche al fine di meglio definire, a risoluzione più elevata rispetto ai dati dell'indagine ARPA (ARPA, 2002), l'andamento spaziale della contaminazione e quindi ipotizzare interventi per la bonifica biologica.

I suoli campionati hanno generalmente basso scheletro (generalmente <2-4%) tranne le profondità > 60 cm per l'area A dove sale fino al 60% circa. La tessitura prevalente è franco sabbiosa con qualche campione franco o franco-limoso. Il carbonio organico si attesta fra 1.5-3 % negli strati più superficiali (0-10 e 10-20 cm) per abbassarsi rapidamente sotto i 40 cm a 0.6-1.2 %. 2.2 Caratterizzazione della contaminazione

2.2.1 FASE 1

Come ricordato precedentemente i campionamenti e le analisi di Fase 1 sono stati predisposti per ottenere un primo elenco dei contaminanti, ovvero valutare la presenza dei contaminanti facendo un'analisi ad ampio spettro, che comprendesse oltre a PCB, diossine e furani, arsenico e mercurio anche sostanze volatili, altre molecole clorurate e altri metalli

Al fine di ottenere campioni rappresentativi delle tre zone sono stati raccolti nel marzo 2014 per ogni area 15 sottocampioni della parte superiore (0 - 20 cm) del terreno e 15 sottocampioni di terreno più profondo (50 – 70 cm), utilizzando uno schema casuale a griglia stratificata, (Figura 2.3) con un campionatore da 40 mm (Bipartite gouge auger set SASA, Eijkelkamp, Giesbeek, Paesi Bassi). L'obiettivo era raccogliere alcuni campioni rappresentativi delle concentrazioni medie nei terreni per catturare i contaminanti nello strato arabile (0-30 cm) e quelli che potevano essere migrati verso il basso durante il lungo periodo di contaminazione. I trenta i sottocampioni per ogni area (A, T e R in Figura 2.2) sono stati accuratamente miscelati per ottenere un campione medio rappresentativo per ognuna delle aree da destinare alle analisi chimiche e microbiologiche.

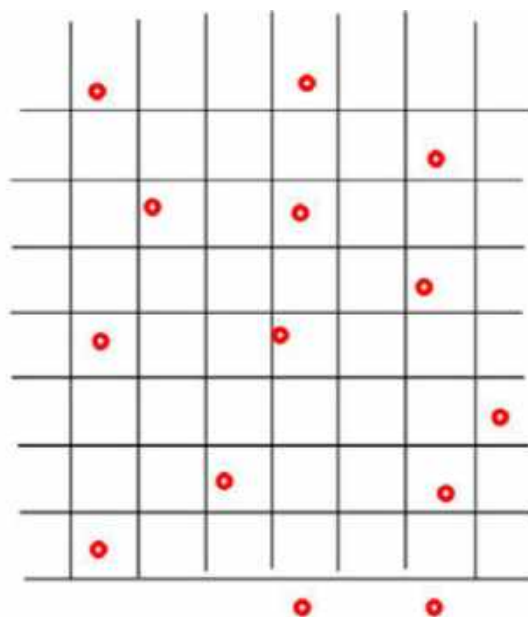


Figura 2.3 – Schema di campionamento per la selezione dei punti di campionamento per la fase 1.

Le analisi sono state eseguite nel giugno 2014 presso il Dipartimento Ambiente e Salute dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Milano, sotto la supervisione del Dott. Enrico Davoli. Di seguito sarà riportato e commentato un estratto sintetico dei dati presenti in tale rapporto, mentre i dati tabulati per le principali classi di sostanze ritrovate sono presenti sul sito ERSAF. I dati prodotti in fase 1 sono stati inoltre discussi e pubblicati nella rivista scientifica *Environmental pollution* (Di Guardo et al., 2017).

Le analisi di PCB (78 congeneri) hanno mostrato livelli compresi tra circa 1 e 2 mg/kg nel suolo. Il PCB 209 (decaclorobifenile) è risultato il congenere più abbondante (compreso fra il 10 ed il 27% del totale dei PCB), compreso fra 0.14 e 0.43 mg/kg. Il PCB 209 deriva probabilmente dalla produzione da parte di Caffaro del Fenclor DK (che conteneva prevalentemente PCB 209). Tale congenere si può così considerare un marker del sito BS-Caffaro. La figura 2.4 riporta i *fingerprint* dei PCB dei singoli campioni, ovvero la concentrazione dei PCB appartenenti alle varie famiglie, dai quali si evince che, a parte il PCB 209, la contaminazione è centrata prevalentemente a carico dei congeneri esa-, penta- ed eptaclorurati, con scarse concentrazioni di congeneri a basso numero di atomi di cloro. Tale *fingerprint* potrebbe indicare la derivazione dei PCB da miscele di PCB ad alto peso molecolare o processi di *weathering*, ovvero di degradazione/volatilizzazione/lisciviazione di composti bassoclorurati (meno persistenti e più mobili) con conseguente permanenza di molecole più persistenti e dotate di minore mobilità. Valori dei singoli congeneri si possono trovare sul sito ERSAF.

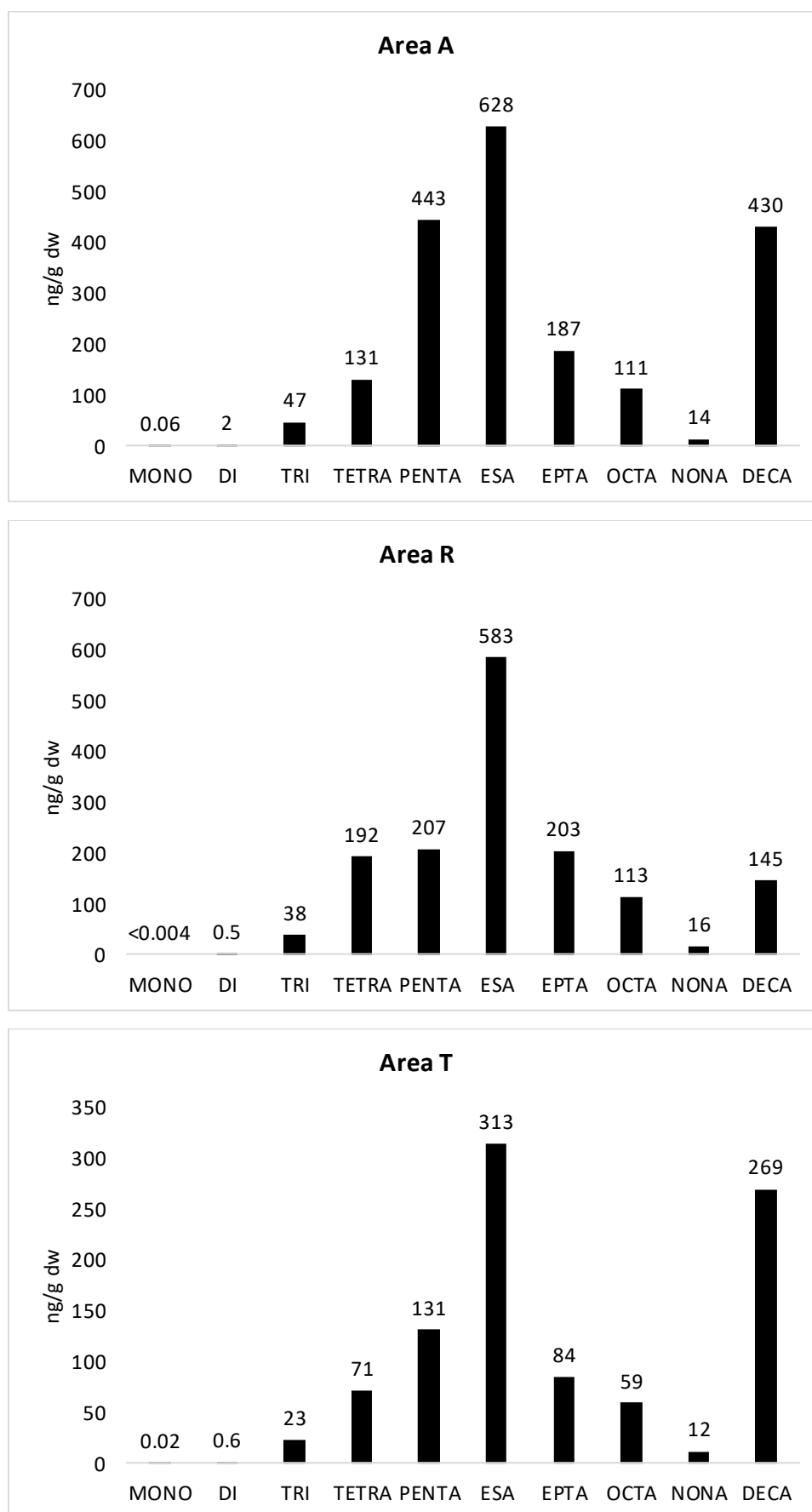


Figura 2.4 – Somma dei congeneri delle classi misurati nelle tre aree A, R, T.

Per quanto riguarda diossine e furani (Figura 2.5) i valori misurati si collocano tra 19 e 60 pg WHO05-TEQ / g (26-77 pg I-TEQ / g). Inoltre, il maggior contributo ai TEQ è in gran parte dovuto a PCDF (87 - 97%) che sono ben note impurità nella produzione di PCB (IARC, 2015; UNEP, 2003). I PCB diossino-simili (PCB-DL) hanno un'importanza minore, tra 2 e 6 pg WHO05-TEQ / g. Tuttavia, tali concentrazioni sono vicine o superiori ai PCDD/Fs I-TEQ misurati in Regione Lombardia in zone non direttamente impattate da fonti puntuali (Vives et al., 2008).

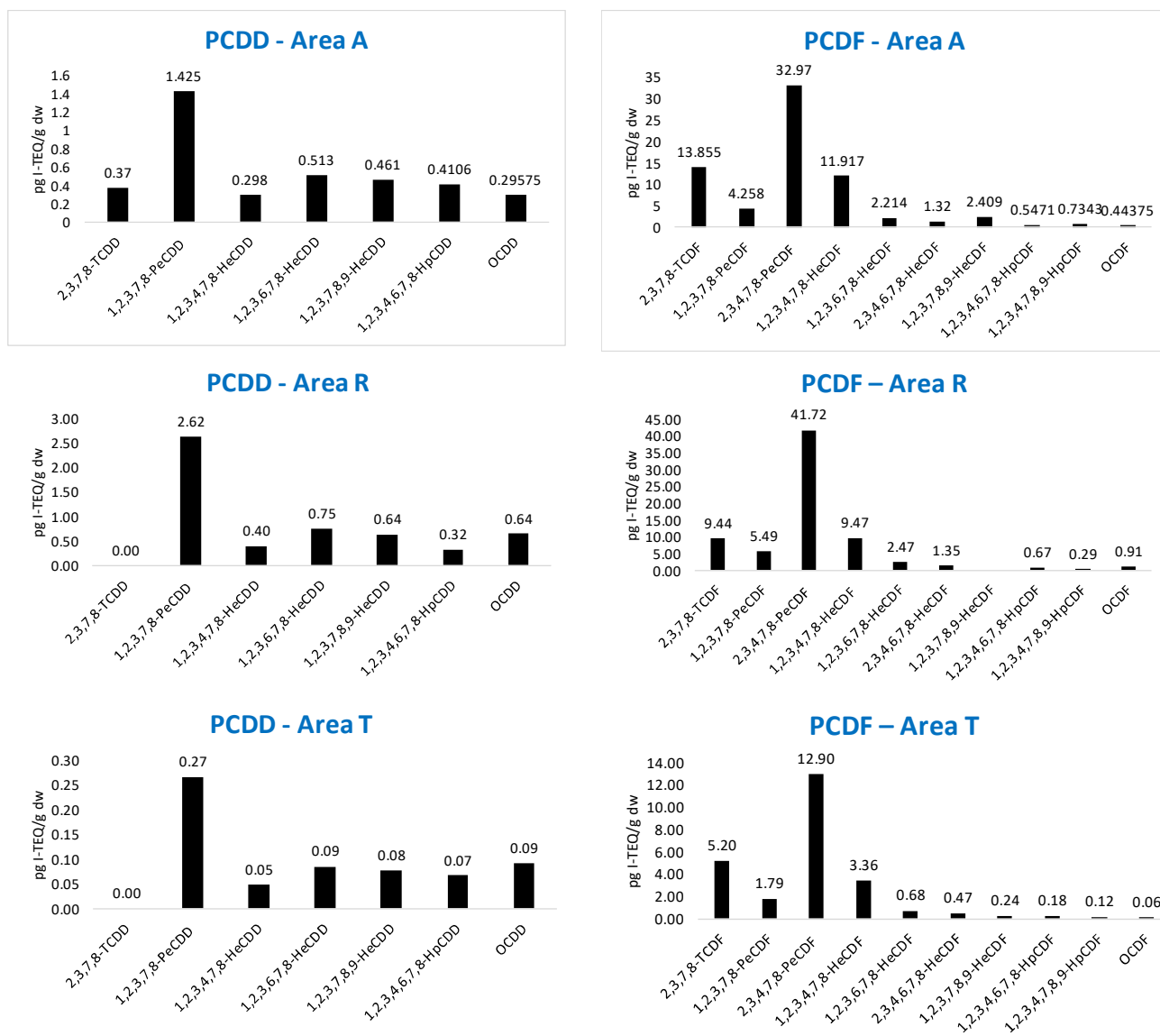


Figura 2.5 – Contributo dei congeneri con un TEF per diossine (PCDD) e furani (PCDF) nelle tre aree.

Più specificamente, per l'area A il contributo in TEQ (I-TEQ) è pari a 3.36 pg/g per le diossine e a 70.67 pg/g per i furani; per l'area R il contributo in TEQ (I-TEQ) è pari a 5.37 pg/g per le diossine e a 71.81 pg/g per i furani; per l'area T il contributo in TEQ (I-TEQ) è pari a 0.63 pg/g per le diossine e a 24.98 pg/g per i furani.

Il contributo dei PCB (principalmente derivante da PCB 118) al totale dei TEQ (WHO05-TEQ) corrisponde a 6 pg/g per l'area A, 4 pg/g per l'area R e 2 pg/g per l'area T.

Tra i composti organici volatili, sono state trovate quantità significative di tetraclorometano (191 - 1077 mg/kg), cloroformio (15 - 22 mg/kg) e tracce di di- e tri-clorobenzeni. Il tetraclorometano nel

suolo potrebbe derivare dal degassamento delle falde acquifere, poiché un pennacchio di tetraclorometano nelle acque sotterranee, originato dallo stabilimento Caffaro è stato trovato dalle autorità ambientali (ARPA Lombardia Dipartimento di Brescia, 2015). Tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini per confermare tale possibilità. Un'analisi qualitativa ha anche mostrato la presenza di DDE, PCN (policloronaftaleni), PCT (policlorotrifenili) e lindano.

Fra gli elementi in traccia (Tabella A 1.6) sono stati misurati, ad un livello relativamente alto concentrazioni in particolare di piombo (200 - 400 mg/kg), arsenico (27 - 79 mg/kg), manganese (circa 800 mg/kg), mercurio (mercurio totale, fino a 4 mg/kg). La loro presenza può essere correlata alla produzione di pesticidi dall'impianto di Caffaro e dalla tecnologia cloro-soda degli impianti As e Hg possono essere presenti nell'ambiente in diverse forme (specie), a vari livelli di biodisponibilità. La mobilità dipende dalle specie: in generale, risultano poco mobili, ma esistono anche forme molto mobili (ad esempio quelle volatili).

Durante Fase 1, le analisi di caratterizzazione sono state affidate all'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri. Per i metalli, le analisi sono state effettuate su uno strumento ad assorbimento atomico (Analyst 600 PerkinElmer) ed i risultati ottenuti (13 giugno 2014) sono sintetizzati nella Tabella sottostante (Tabella 2.1):

Tabella 2.1 – Concentrazione degli elementi nelle aree A, R e T (mg/kg)

	Area A	Area R	Area T
Ti	<0.5	<0.5	<0.5
Mn	800.96	813.13	898.48
Cd	0.79	0.58	0.54
Hg	<0.01	4.12	<0.01
Pb	273.5	265.65	447.27
V	40.0	51.3	51.3
Cr	51.8	51.3	48.5
Co	0.19	0.13	0.20
Ni	61.62	49.89	49.21
Cu	81.94	49.06	58.20
As	79.14	27.53	38.26
Sn	5.10	3.76	2.90

Dall'analisi della Tabella, si evince come le concentrazioni di Hg, As, Pb e Sn risultino maggiori dei limiti previsti dalla normativa vigente. Essi, infatti, superano le rispettive concentrazioni soglia di contaminazione – CSC, pari a 1 e 20 mg/kg ss, riportate nella Tabella 1, Colonna A (siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale), dell'Allegato 5 alla Parte IV, Titolo V, del D.Lgs 152/06.

2.2.2 FASE 2

La Fase 2 ha indagato l'approfondimento verticale della contaminazione, a carico delle sostanze oggetto poi di *bioremediation* come previsto dall'Accordo di Programma, ovvero PCB, diossine e furani, mercurio oltre ad alcune categorie di sostanze rilevate nella fase 1. La scelta dei composti da ricercare per la fase 2 e 3 è stata quindi fatta per valutare per le diverse sostanze mostrate in Fase1:

1) Superamento della o delle CSC

2) Livelli di tossicità delle sostanze verso i microrganismi o le piante

Il modello concettuale sviluppato dagli enti di controllo regionali prevede che la distribuzione dei contaminanti abbia seguito prevalentemente un percorso rogge- acqua di irrigazione- terreni. Tale modalità può prevedere una diversa segregazione e distribuzione di contaminanti a seconda dell'uso del suolo (prato stabile verso terreno arato e lavorato annualmente), distanza dalle rogge, tessitura nei vari orizzonti superficiali del suolo, quantità di sostanza organica nel suolo, caratteristiche di ripartizione e mobilità delle sostanze (coefficiente di ripartizione suolo/acqua, volatilità, emivita degradativa biologica ed abiotica, speciazione ecc.). Per tale motivo, viste le particolari condizioni del sito, ovvero:

- lunga emissione di sostanze nel tempo (> 50 anni)
- spettro ampio di contaminanti con varie caratteristiche legate al destino ambientale e alla degradazione
- necessità di individuare soluzioni di biorisanamento che non causino successive contaminazioni di altre fasi (es. lisciviazione di metaboliti più polari o di specie più mobili)
- probabile presenza di zone a diverso livello di contaminazione (sia per spettro di sostanze che concentrazione)

si è reso necessario procedere ad una ricerca ad ampio spettro dei contaminanti evidenziati nella Fase 1. Più in particolare, fra le sostanze individuate si è suggerita l'analisi delle seguenti sostanze:

1) PCB: L'analisi dei dati prodotti nella fase 1 ha evidenziato una notevole presenza dei PCB nelle varie classi di clorurazione. In particolare nei tre campioni integrati i congeneri presentano una notevole abbondanza fra i congeneri normalmente non ricercati nei campioni ambientali. Tale presenza potrebbe essere legata da un lato a specifiche composizioni delle miscele di partenza prodotte da Caffaro (fenclor ed apioli), a produzioni caratteristiche della Caffaro (ad esempio il Fenclor DK, ovvero il decaclorobifenile, PCB 209). Si segnala ad esempio che il PCB 209, responsabile di una quota importante dei PCB presenti in Fase 1 non era stato esplicitamente misurato nelle analisi di ARPA per la caratterizzazione del SIN. Per tale motivo si è ritenuto di misurare i circa 80 congeneri misurati in Fase 1.

2) PCDD e PCDF (congeneri con TEF e classi di clorurazione)

3) DDT e metaboliti

4) Lindano (gamma-HCH)

5) Policlorotrifenili (PCT), prodotti dalla Caffaro

6) Sostanze organiche volatili:

- a) Tetracloruro di carbonio
- b) Cloroformio
- c) 1,2 diclorobenzene
- d) 1,3 diclorobenzene
- e) 1,4 diclorobenzene
- f) 1,2,4 triclorobenzene
- g) 1,2,3 triclorobenzene
- h) esaclorobutadiene

7) Metalli e metalloidi

- a) Mercurio
- b) Manganese
- c) Piombo
- d) Cromo (in particolare la quota del cromo esavalente)
- e) Nickel
- f) Rame
- g) Arsenico
- h) Stagno
- i) Zinco (non misurato in Fase 1 ma trovato nei suoli a sud a concentrazioni maggiori di CSC (tabella 1)

Fra i contaminanti sopra menzionati e frequentemente trovati sopra le CSC per i suoli residenziali vi sono DDT, DDE, tetracloruro di carbonio, arsenico, piombo, rame e zinco. Si rimanda al sito ERSAF per le tabelle relative. Tuttavia, come ricordato precedentemente, il presente rapporto si limita a trattare in dettaglio le categorie di sostanze previste dall'Accordo di Programma (AdP) ovvero policlorobifenili (PCB), diossine e furani (PCDD e PCDF) e mercurio (Hg). Tuttavia in seguito all'emergere di concentrazioni rilevanti di arsenico nei suoli campionati, come anche riportato nell'incipit dell'allegato tecnico dell'AdP, per le "evidenze di contaminazione diffusa principalmente da PCB, PCDD-PCDF, arsenico e mercurio.", si è deciso di aggiungere l'arsenico (As) fra le sostanze oggetto di studio e di bonifica in considerazione del potenziale effetto fitotossico di dette concentrazioni, tale da potenzialmente inficiare la crescita delle piante da utilizzare per la bioremediation delle aree.

L'obiettivo è stato quello di caratterizzare le varie subaree presenti nelle aree A, R e T al fine di identificare situazioni tipiche di uso del suolo e poter correlare l'uso del suolo (ad. esempio la storia colturale delle diverse aree, la frequenza di aratura, le colture impiegate, ecc.) al potenziale approfondimento verticale delle sostanze in indagine. A tal scopo è stata necessaria un'analisi delle foto aeree storiche disponibili, integrata da interviste ai proprietari delle aree.

Grazie alle conoscenze ottenute analizzando le foto aeree disponibili (1963, 1974, 1982, 1988, 2000, 2013) (Armiraiglio, Comune di Brescia, comunicazione personale) è stato possibile, almeno per gli anni disponibili, classificare le aree secondo i seguenti usi del suolo:

- a. **Prato stabile:** coltura permanente dove le lavorazioni del suolo sono generalmente assenti nel periodo di vita della coltura
- b. **Seminativi/erbai:** colture che richiedono periodicamente lavorazioni del suolo (come aratura, erpicatura ecc., che comportano generalmente la miscelazione ciclica dello strato arabile del suolo)
- c. **Incolto:** stato di non lavorazione del suolo che tende, nel breve periodo, verso le condizioni del prato.

La classificazione ottenuta ha mostrato che generalmente non sono individuabili tutte le tre tipologie nella stessa area, anzi spesso la rotazione lungamente applicata nel corso del tempo ha ridotto il tempo di "permanenza" della coltura, comportando, sulla quasi totalità delle aree almeno dei periodi di aratura dei suoli, con conseguente rimescolamento dello strato arabile.

Nel contempo, (grazie al lavoro eseguito a cura di Simone Anelli, ERSAF Brescia) sono stati individuati i percorsi delle rogge, i campi (subaree) trattati nelle aree A, R e T, la loro giacitura, la provenienza e la direzione dell'acqua di irrigazione (per scorrimento) e altre informazioni derivate dall'intervista diretta con i conduttori. Tali interviste hanno evidenziato caratteristiche e problemi dei singoli campi, come ad esempio la profondità dello strato arabile, pari al massimo a 30 cm (vedi figura 2.6).

Area A



Area R



Area T



Legenda



Figura 2.6 – Percorsi delle rogge e direzione dell'acqua di irrigazione per scorrimento nelle tre aree A, R, T (Fonte ERSAF, rilievi di Simone Anelli)

Al fine di procedere alla selezione delle subaree per i campionamenti della Fase 2, le informazioni su esposte sono state integrate e sono state prodotte delle valutazioni quantitative. Tali valutazioni risentono di numerose incertezze, quali ad esempio la ridotta numerosità delle foto aeree e la diversa distanza temporale tra le stesse, la mancanza dell'indicazione del periodo esatto dell'acquisizione dell'immagine e quindi la possibile errata attribuzione del momento fenologico e culturale rappresentato nella foto. Alla fine del processo di selezione sono state scelte le aree in cui sono stati effettuati i campionamenti di fase 2 (figura 2.7):

AREA A: i punti selezionati sono in una subarea che rappresenta condizioni intermedie fra prato e seminativo e inoltre riceveva acqua di irrigazione continuamente in inverno grazie alla sua trasformazione in marcita. Tale situazione di continua irrigazione avrebbe potuto aumentare di parecchio le ore di saturazione idrica del suolo, riducendo il contenuto di ossigeno nel suolo. Inoltre, in tale subarea è stato effettuato un campionamento nel 2013 dall'Università dell'Insubria in tre punti (nord, centro, sud) che ha evidenziato un gradiente nord/sud della contaminazione di PCB. Tale gradiente mostrato potrà essere confrontato in futuro con i risultati delle analisi di fase 2 e 3.

AREA R: i punti selezionati sono in una subarea che rappresenta condizioni di prato quasi permanente (44 anni), quasi speculare nei due periodi durante e dopo la fine della produzione di PCB, con una breve interruzione a seminativo nel periodo della produzione.

AREA T: i punti selezionati sono in una subarea che rappresenta condizioni di aratura intensa, con continuo rimescolamento dello strato arato (29 anni contro 21 di prato). Sebbene altre subaree avessero caratteristiche di maggiore durata del seminativo (39 anni), avevano subito dei lavori di livellamento del suolo che potrebbero avere alterato il profilo di contaminazione del suolo in modo non facilmente interpretabile e generalizzabile.



Figura 2.7 – Punti campionati per le analisi di fase 2.

In questa fase, è stato indagato il profilo di concentrazione di PCB, PCDD/F, As e Hg lungo la verticale. Per ognuna delle tre aree di cui sopra (A, R; T;), sono stati selezionati tre punti di prelievo (A1, A2, A3; R1, R2, R3; T1, T2, T3;) e, mediante tre carotaggi ravvicinati per ogni punto, sono stati prelevati (il 27/10/2014) 7 campioni, lungo la stessa verticale, a diversi intervalli di profondità: 0-10 cm; 10-

20 cm; 20-30 cm; 30-40 cm; 40-60 cm; 60-80 cm; 80-100 cm, per un totale di 63 campioni. Ciascuno di questi 63 campioni è stato confezionato miscelando le tre aliquote corrispondenti al medesimo intervallo di profondità delle tre carote di terreno prelevate per ogni singolo punto. Gli esiti delle analisi commissionate a THEOLAB S.p.A., pervenuti in data 06/02/2015, sono riportati nei grafici sottostanti per PCB (somma), PCDD/PCDF (espressi in I-TEF), arsenico e mercurio.

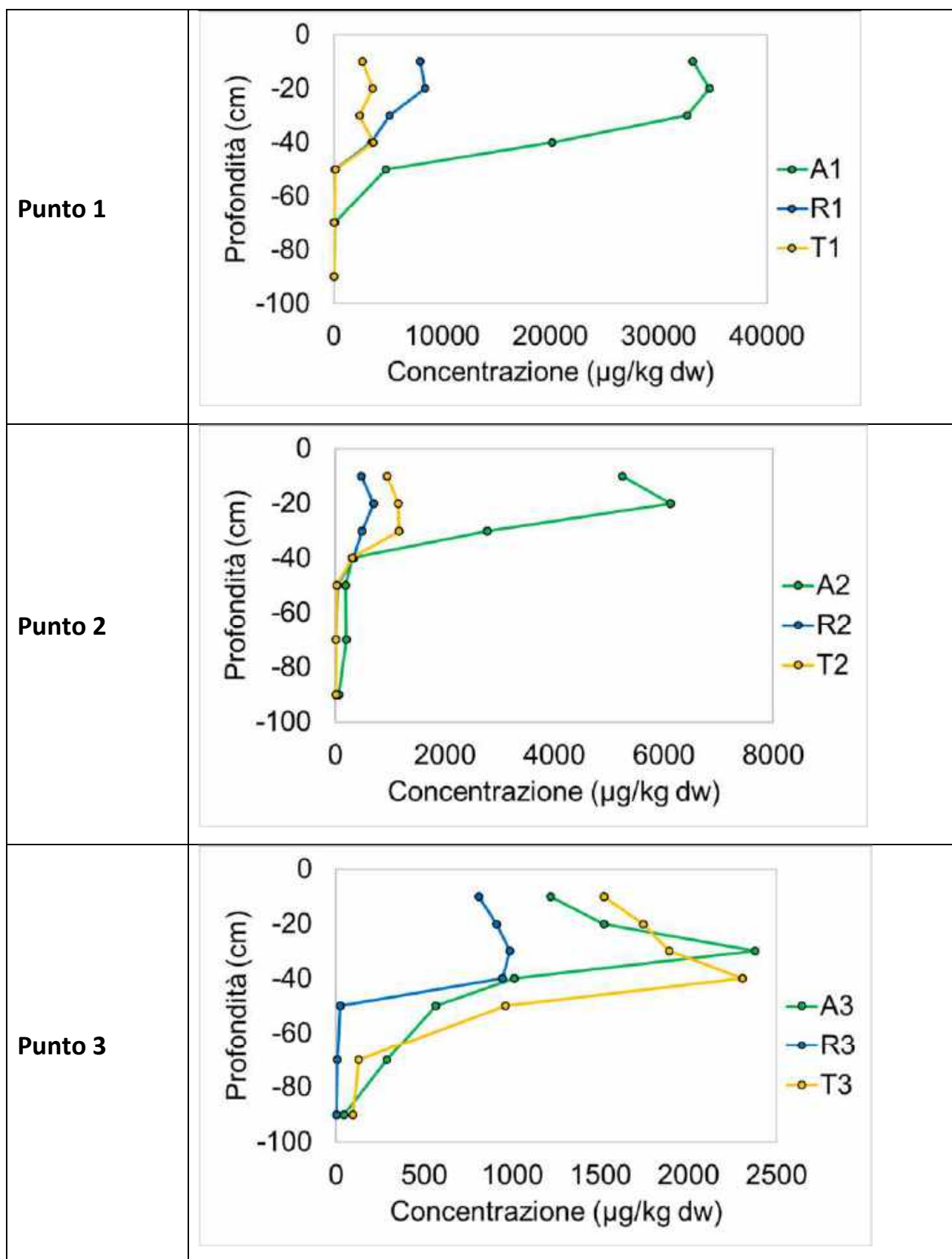


Figura 2.8 – Andamento della concentrazione della somma dei PCB con la profondità nei tre punti (1,2,3) (vedi figura precedente) nelle aree A, R e T.

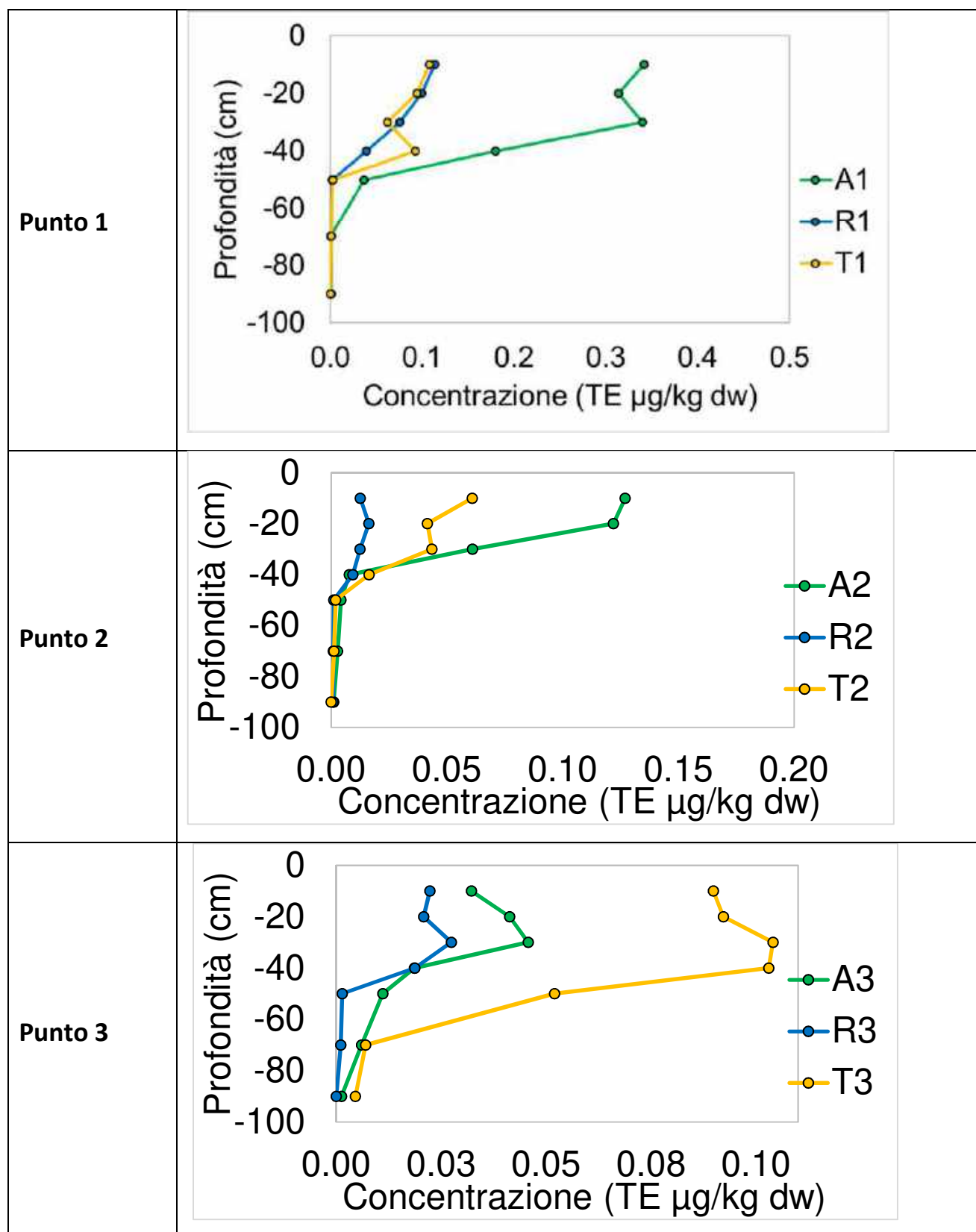


Figura 2.9 – Andamento della concentrazione con la profondità di diossine e furani (esprese in Toxic Equivalents secondo lo schema I-TEF) nei tre punti (1,2,3) (vedi figura precedente) nelle aree A, R e T.

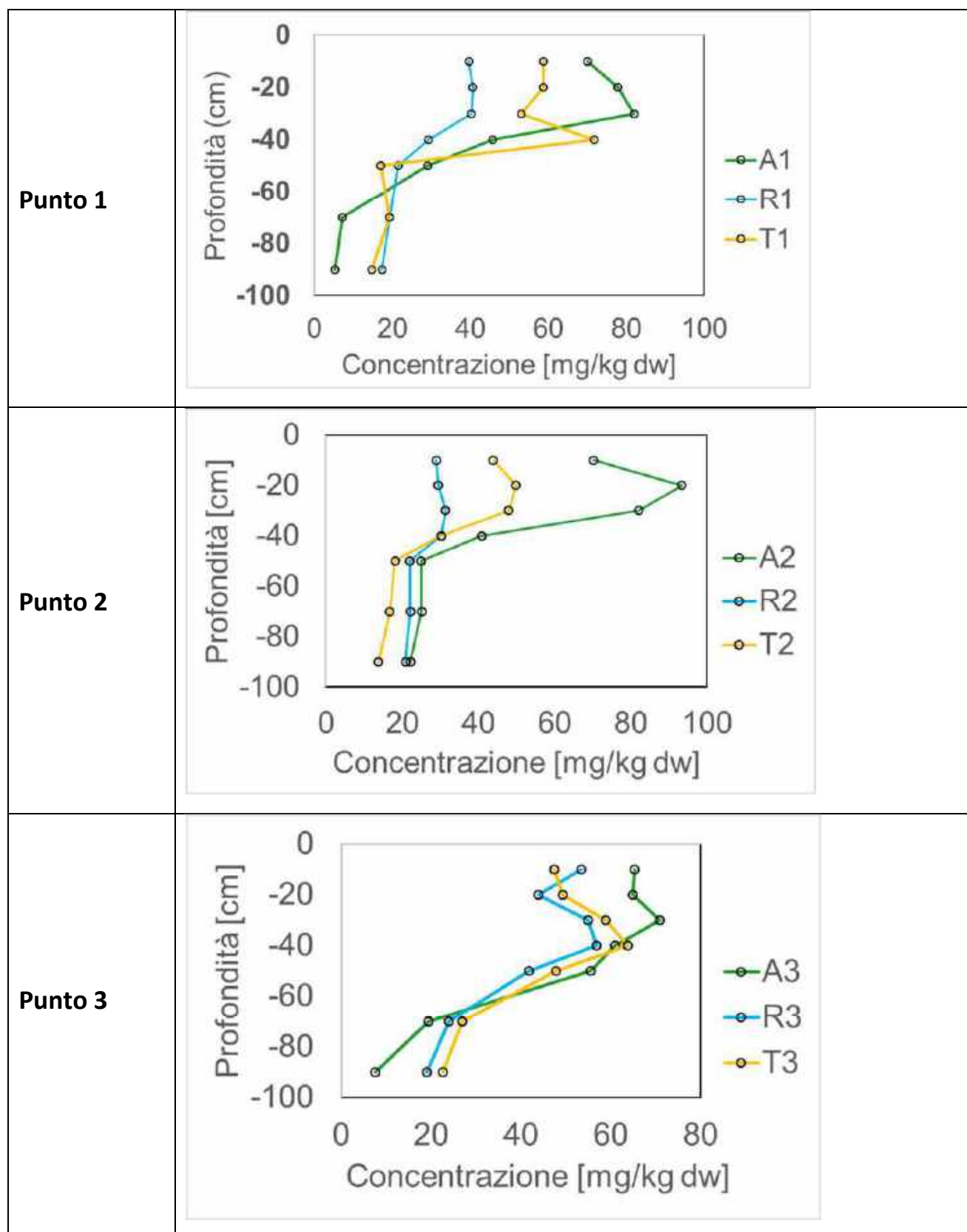


Figure 2.10 – Andamento della concentrazione dell'arsenico con la profondità nei tre punti (1,2,3) nelle aree A, R e T.

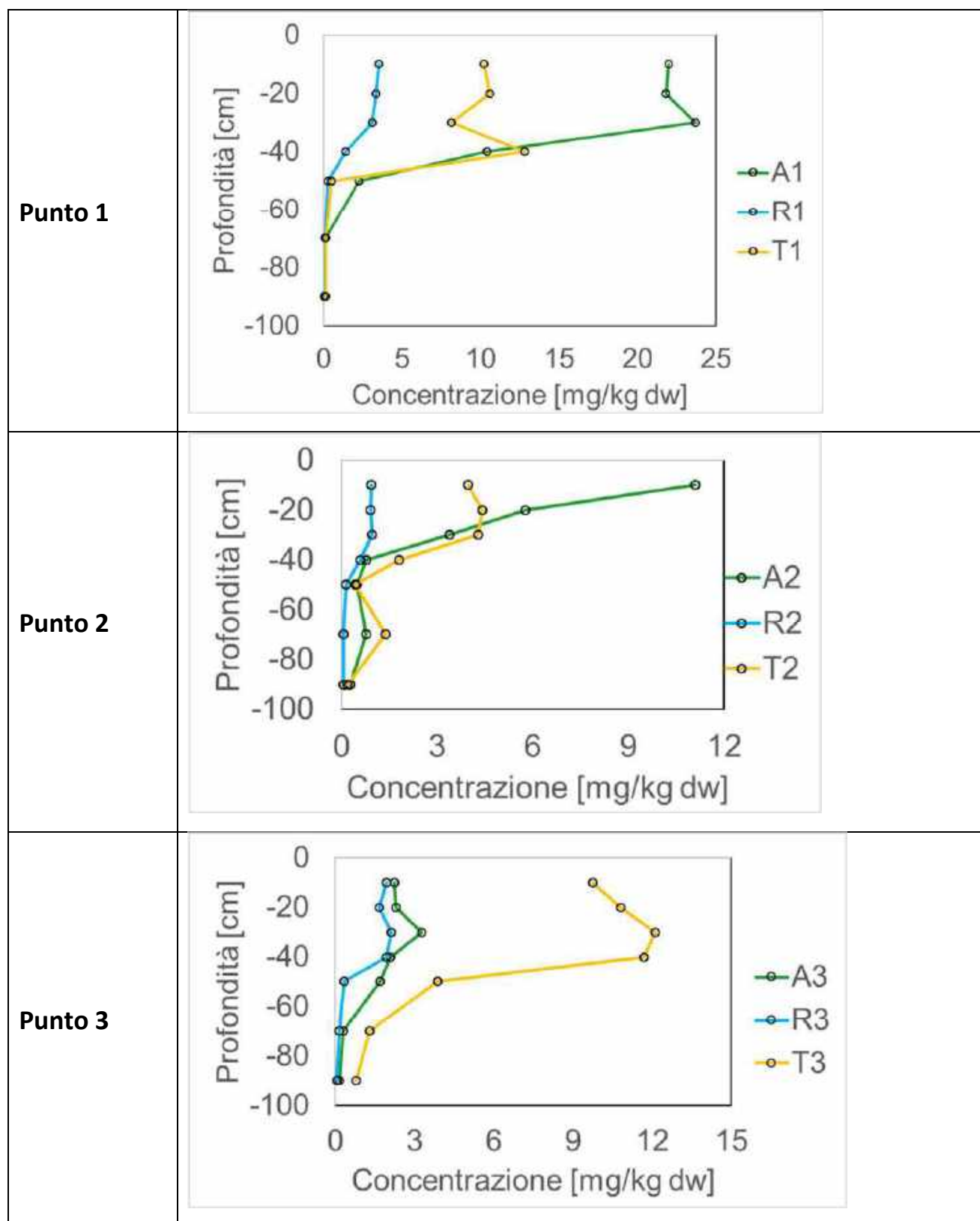


Figura 2.11 – Andamento della concentrazione del mercurio con la profondità nei tre punti (1,2,3) nelle aree A, R e T.

I grafici mostrati nelle figure (2.9-2.11) permettono di effettuare alcune considerazioni:

Esiste un gradiente nord-sud della contaminazione: i punti più contaminati sono generalmente i punti 1, situati in prossimità del punto di adacquamento. L'irrigazione dei campi avveniva, come citato, per scorrimento superficiale e veniva prelevata dalle rogge situate in prossimità della porzione nord dei campi. Questo determina un carico di sostanze contaminanti portate passivamente dall'acqua (e per le sostanze idrofobiche probabilmente legato prevalentemente al trasporto di solidi sospesi) che man mano che si spostavano verso sud cedevano contaminanti, progressivamente “depurandosi” muovendosi verso sud.

Sostanzialmente la contaminazione è principalmente situata nella porzione superiore (0-40 cm) del suolo, corrispondente in buona sostanza con lo strato arabile. In taluni casi alcune sostanze si trovano a concentrazioni più elevate (talvolta superando la concentrazione soglia di contaminazione (CSC) anche a profondità maggiori ma la cosa appare sporadica.

2.2.3 FASE 3

I risultati di FASE 2 hanno evidenziato che la massima concentrazione dei contaminanti organici è generalmente contenuta entro i primi 40 cm di suolo, con brusca riduzione sotto tale profondità, mentre quelli inorganici (metalli) hanno concentrazioni elevate anche al di sotto. Si è quindi deciso di limitare il prelievo di terreno dei campioni di Fase 3 allo strato 0-40 cm, con una densità e distribuzione dei punti differenti nelle 3 aree R, T ed A, ritenendo adeguata la costituzione di 64 campioni di suolo. Ogni punto è composto da 5 prelievi di terreno ai quattro vertici e al centro di un quadrato di lato 1 m, quest'ultimo punto coincidente con il punto predeterminato (in totale 320 perforazioni). Ognuno dei 64 campioni è stato costituito dalla miscelazione dei 5 sub-campioni corrispondenti. Il campionamento è stato effettuato tra il 19 ed il 24 dicembre 2014. I risultati analitici del laboratorio THEOLAB S.p.A. sono pervenuti in data 09/03/2015.

La Tabella 2.2 riporta i numeri di campioni prelevati nelle diverse aree.

Tabella 2.2 - Numero campioni prelevati nelle tre aree

Area	Numero campioni
A	17
R	19
T	28

Come visto in precedenza, la contaminazione dei terreni agricoli oggetto dell'indagine è derivata principalmente dalle acque di irrigazione, che rilasciano i contaminanti fluendo dalle rogge ai campi. Il processo determina una distribuzione delle concentrazioni che presenta un trend in diminuzione (più o meno accentuato) nella direzione di scorrimento delle acque. Una mappatura realistica della distribuzione dei contaminanti nei terreni necessita di una ricostruzione della rete delle rogge che hanno portato le acque di irrigazione. La metodologia di mappatura adottata prevede di trattare separatamente i campi delimitati da canali, in quanto l'andamento delle concentrazioni, tra un campo e l'altro, è indipendente presentando pertanto delle discontinuità.

Le mappe delle concentrazioni e dei tempi (capitolo 11) sono state effettuate mediante stima utilizzando il metodo del *kriging intrinseco* con identificazione automatica della *covarianza generalizzata*. La stima ha interessato separatamente i singoli campi, usando di volta in volta, i dati disponibili dei campioni al loro interno (tra prelievi di fase2, fase3 e indagini sulle parcelle di

sperimentazione in area A). Sono state stimate delle concentrazioni nei punti di una griglia, per ogni campo. Le griglie sono poi state unite, tracciando delle linee iso-valore

Le stime di Diossine/Furani e PCB riguardanti il campo 4 dell'area A (estremità EST) sono state effettuate non considerando il dato del campione F3A11, in quanto fortemente contrastante con il marcato *trend* a diminuire delle concentrazioni (nella direzione del flusso delle acque di irrigazione), evidenziato dai restanti dati. Il dato del campione F3A11 avrebbe compromesso la modellazione del trend e quindi della variabilità spaziale delle concentrazioni, su cui è basata la stima.

Le mappe illustrate nelle figure seguenti (2.12 – 2.19) mostrano in maniera evidente che la concentrazione dei diversi contaminati è tutt'altro che omogenea e presenta gradienti riferibili presumibilmente sia alle modalità di irrigazione delle aree (per scorrimento), alla loro frequenza temporale oltre all'uso del suolo, così come già visto nei punti di Fase 2. Anche i contaminanti inorganici, (arsenico e mercurio) mostrano nelle diverse aree comportamenti e distribuzione non eccessivamente dissimili da quelle dei contaminanti organici (PCB, diossine e furani), a sottolineare l'origine comune della contaminazione, sebbene le loro proprietà chimico fisiche non siano assimilabili a quelle dei contaminanti organici, molecole idrofobiche.

Fra gli altri contaminanti misurati in fase 3 e frequentemente trovati sopra le CSC per i suoli residenziali vi sono DDT, DDE, tetracloruro di carbonio, piombo, rame e zinco. Si rimanda al sito ERSAF per le tabelle relative.

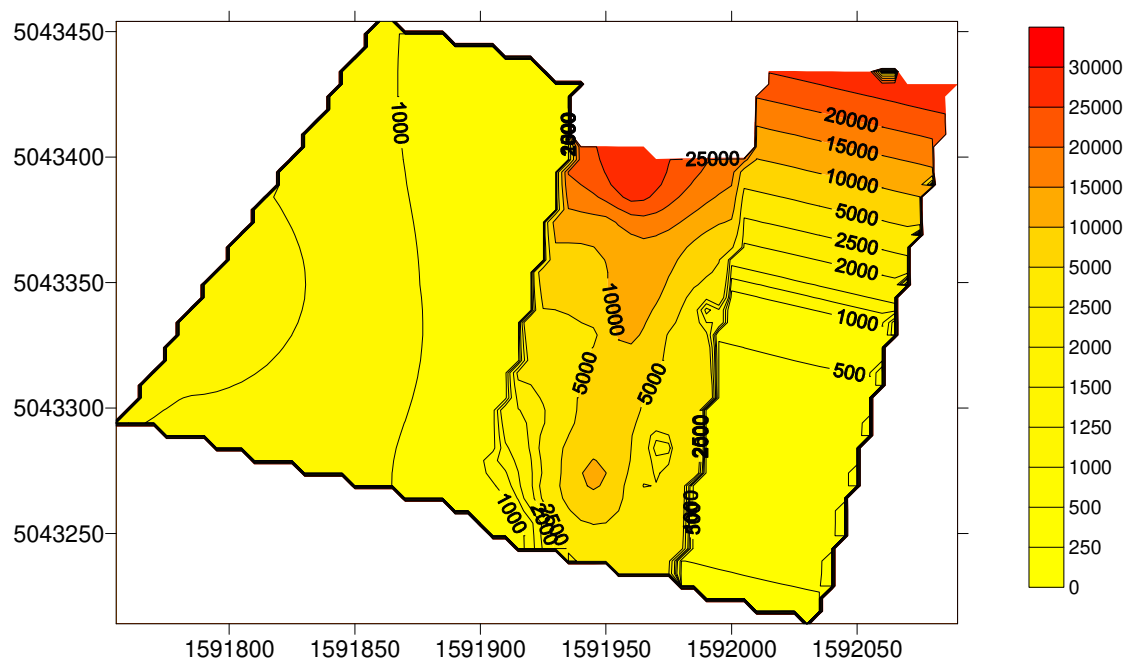


Figura 2.12 - Andamento delle concentrazioni nello spazio dei PCB totali ($\mu\text{g/kg}$) per l'area A

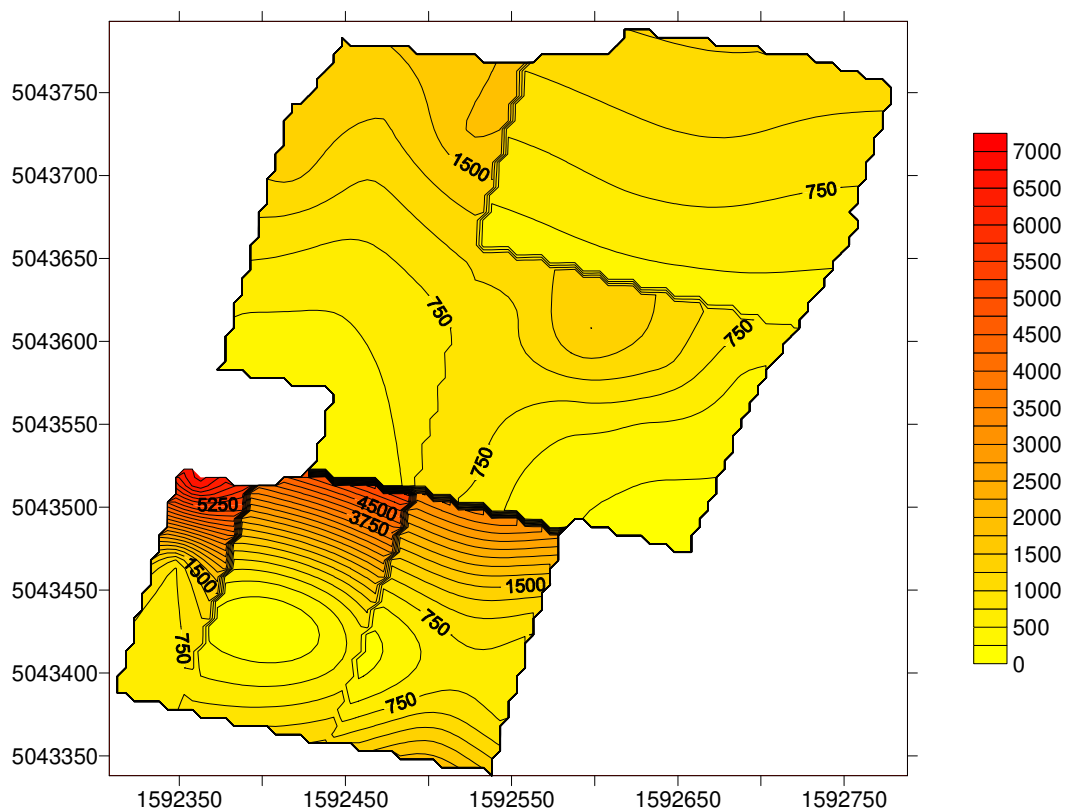


Figura 2.13 - Andamento delle concentrazioni nello spazio dei PCB totali ($\mu\text{g/kg}$) per le aree R e T

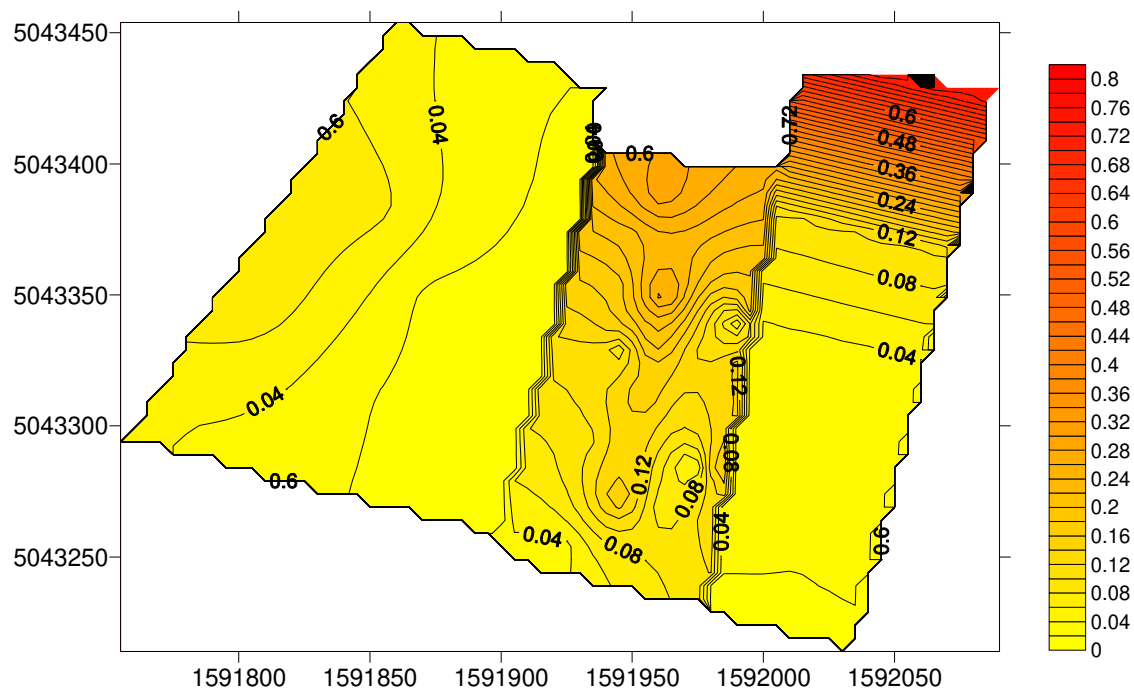


Figura 2.14- Andamento delle concentrazioni nello spazio di diossine e furani (TEQ) ($\mu\text{g/kg}$) per l'area A

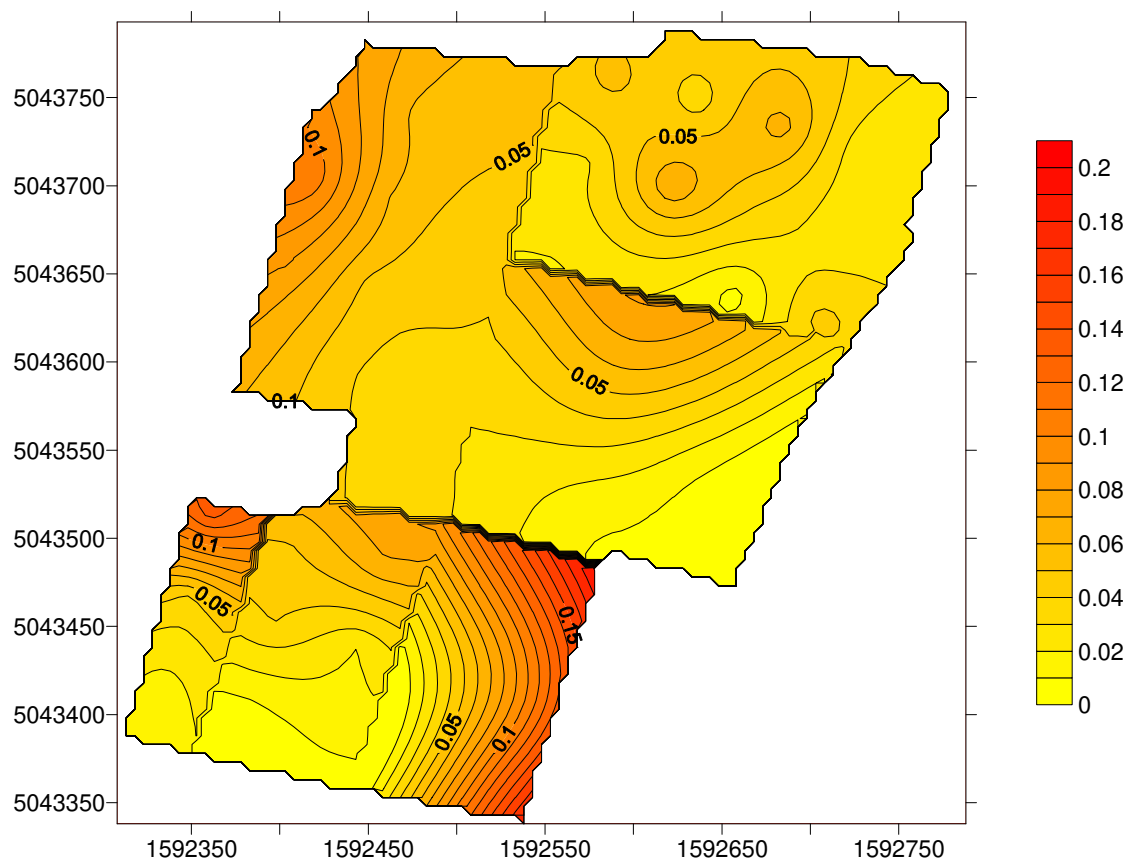


Figura 2.15 - Andamento delle concentrazioni nello spazio di diossine e furani (TEQ) ($\mu\text{g/kg}$) per le aree R e T

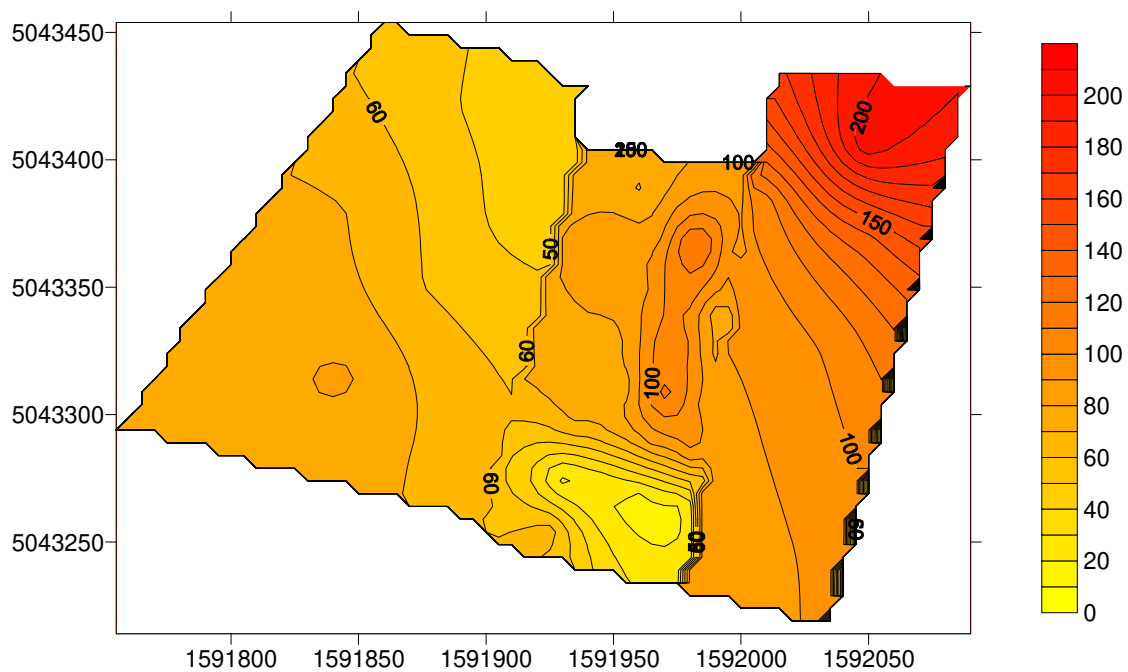


Figura 2.16 – Mappa di isoconcentrazione di As relativa all'area A

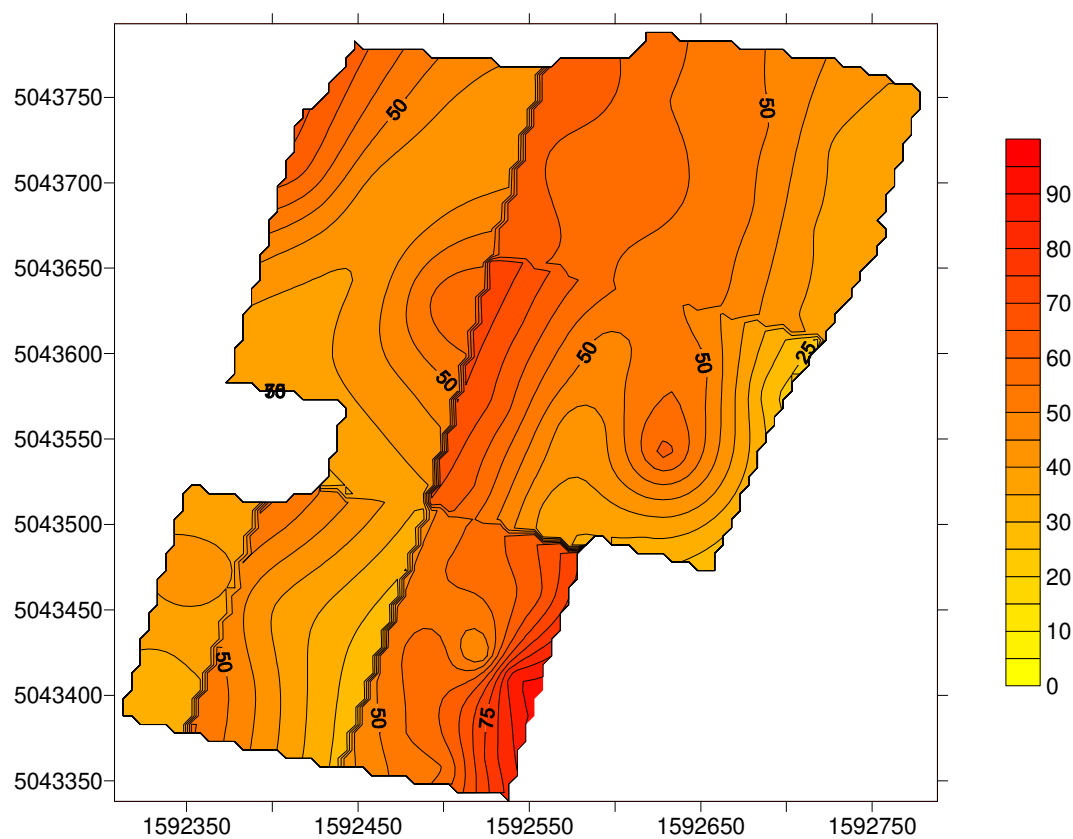


Figura 2.17– Mappa di isoconcentrazione di As relativa alle aree R+T

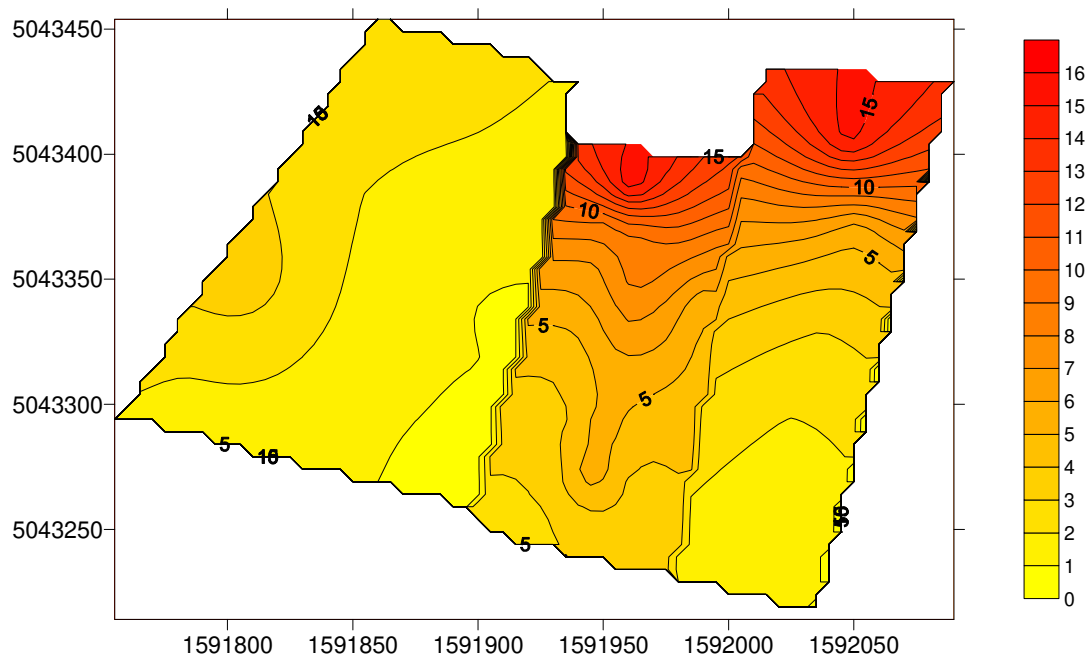


Figura 2.18– Mappa di isoconcentrazione di Hg relativa all'area A

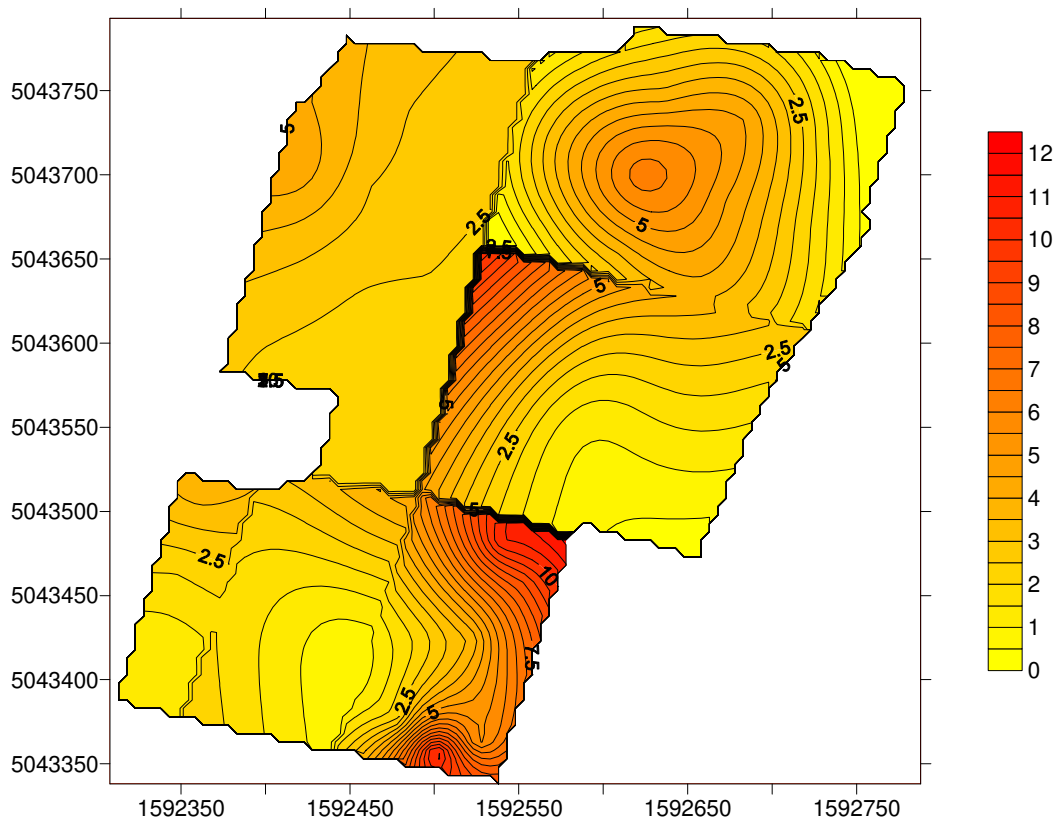


Figura 2.19 – Mappa di isoconcentrazione di Hg relative alle aree R+T

2.3 Caratterizzazione delle comunità microbiche autoctone

Tutti i campioni di suolo analizzati chimicamente sono stati sottoposti a caratterizzazione microbiologica, in particolare: 3 campioni relativi alla fase 1 (un campione composito per ciascuna area A, R, T), 63 campioni relativi alla fase 2 (sette campioni raccolti lungo un gradiente tra 0 e 100 cm di profondità in tre stazioni di campionamento per ciascuna delle tre aree A, R, T), 64 campioni relativi alla fase 3 (campioni composti raccolti nello strato di suolo tra 0 e 40 cm su tutta la superficie delle tre aree A, R, T).

I 3 campioni di fase 1, data la natura esplorativa di questa fase, sono unicamente stati analizzati mediante catalogo massivo dei gruppi batterici presenti nel suolo. I campioni di fase 2 e 3 sono stati tutti analizzati tramite a) profilazione delle comunità batteriche presenti, b) quantificazione dell'attività idrolitica della comunità microbica. Un'opportuna selezione dei campioni di fase 2 è stata anche analizzata tramite catalogo massivo dei gruppi batterici presenti, effettuato a supporto dei dati ottenuti dalla profilazione.

2.3.1 Struttura delle comunità batteriche e correlazione con il profilo di contaminazione

Fase 1. I risultati dell'analisi del catalogo di taxa batterici riscontrati nei 3 campioni composti analizzati hanno evidenziato che i) le 3 aree indagate ospitano comunità batteriche diverse, seppur con un analogo valore di ricchezza in specie; ii) la similarità tra i campioni nella composizione della comunità residente è correlata alla similarità della composizione degli inquinanti, in particolare le aree R e T risultato più simili tra loro -sia per profilo di contaminanti sia per profilo di specie batteriche- se confrontate con quelle dell'area A; iii) le comunità residenti sono composte da popolazioni tipiche del suolo, ed alcune di esse comprendono specie studiate in letteratura per la loro capacità di degradare gli inquinanti organici. Tali risultati sono stati riportati e discussi in una pubblicazione scientifica su rivista internazionale (Di Guardo et al., 2017).

Fase 2. La profilazione delle comunità batteriche effettuata su campioni di suolo raccolti successivamente (Fase 2 e 3) ha dimostrato che le comunità batteriche dei suoli sono significativamente correlate ai dati chimici e fisici misurati negli stessi campioni. Come indicato in Figura 2.20 A, l'analisi statistica dei *fingerprint* della comunità batterica mostra che il suolo prelevato nelle tre diverse aree (A, R, T) ospita comunità batteriche significativamente differenti in funzione della profondità di prelievo. In particolare, è possibile suddividere le comunità batteriche presenti nei suoli prelevati a profondità maggiore o minore di 40 cm, profondità a cui corrisponde una forte variazione di concentrazione di diversi inquinanti. Ulteriori analisi statistiche hanno mostrato una correlazione significativa tra i parametri chimico-fisici dei campioni di suolo, incluse le principali classi di inquinanti (quali PCB, arsenico e mercurio) ed il *fingerprint* batterico (Figura 2.21 A). I risultati ottenuti dalla profilazione batterica sono stati anche confermati dai risultati ottenuti dall'analisi del catalogo massivo di taxa batterici effettuato su una selezione di 9 campioni provenienti dalle 3 diverse aree, a diverse profondità (Figura 2.22). L'analisi ha dimostrato la presenza nei suoli di gruppi batterici che nella letteratura scientifica comprendono specie in grado di degradare i PCB. L'effettiva capacità degradativa da parte dei microrganismi autoctoni rimane da dimostrare, tuttavia questa analisi, unitamente all'esistenza di una correlazione tra contaminazione e composizione della comunità batterica residente (Figura 2.23), può portare a speculare che nei suoli il contatto di lungo termine tra gli inquinanti ed i microrganismi autoctoni abbia influito sulla selezione di popolazioni in grado di utilizzarli come substrato con il risultato di ridurre la concentrazione.

Fase 3. La realizzazione di un campionamento più dettagliato per ciascuna area, contemplando esclusivamente l'orizzonte di suolo compreso fra 0-40 cm di profondità, mediante la preparazione di un campione composito per ciascun punto di prelievo, ha permesso di mappare con maggiore dettaglio la struttura delle comunità batteriche nella porzione più contaminata delle aree A, R, T. I risultati mostrano che i suoli superficiali di tali aree ospitano comunità significativamente diverse, dato particolarmente evidente nel caso dell'area A (Figura 1.C.1B), che risulta essere quella maggiormente inquinata. Ulteriori analisi statistiche hanno mostrato una correlazione significativa tra i parametri chimico-fisici del suolo, incluse le principali classi di inquinanti (quali PCB, arsenico e mercurio) ed il *fingerprint* batterico (Figura 2.21 B), rafforzando la speculazione emersa dai risultati di fase 2, cioè che gli elevati livelli di contaminazione abbiano portato all'arricchimento nei suoli di microrganismi degradatori.

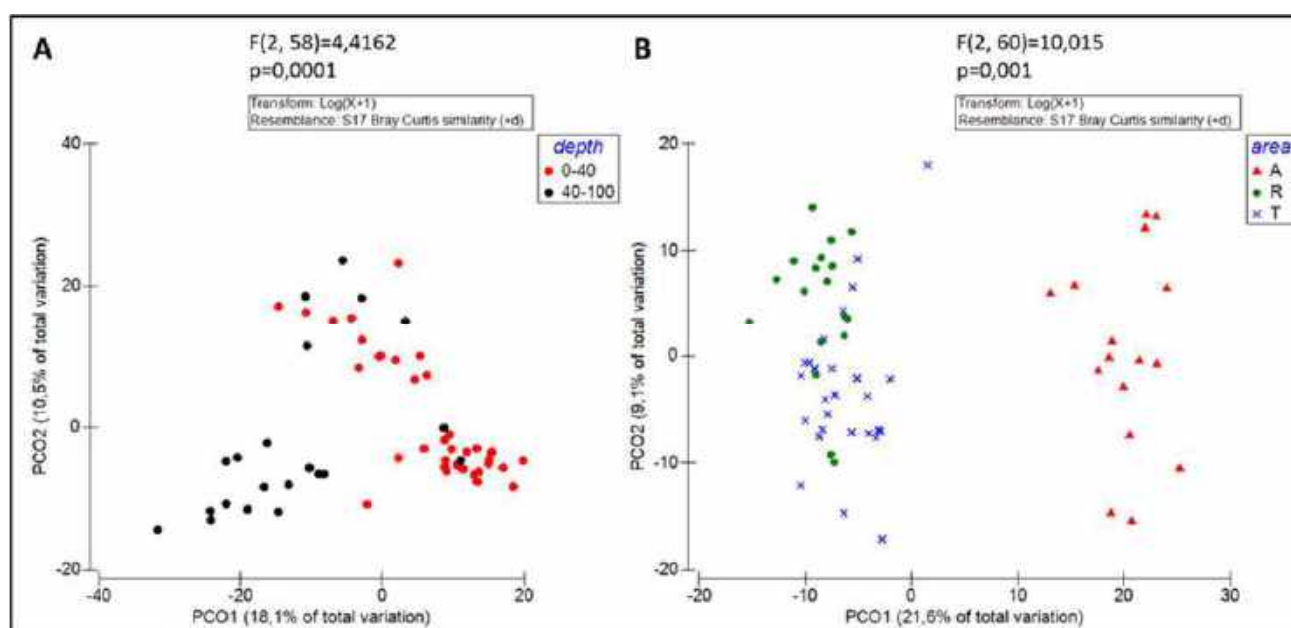


Figura 2.20 - Distribuzione dei campioni di suolo ottenuta mediante analisi statistica (Principal Coordinate Analysis, PCoA) dei fingerprint batterici. Ogni punto del tracciato rappresenta un campione, e la distanza tra i punti è proporzionale alla diversità delle comunità batteriche. (A) comparazione della composizione batterica in base alla profondità (fase 2), che indica che i suoli superficiali (punti rossi) hanno comunità batteriche residenti diverse dai suoli profondi (punti neri); (B) comparazione della composizione batterica nei suoli superficiali (0-40 cm) in base alla distribuzione spaziale A, R, T (fase 3), che indica che i suoli dell'area T (triangoli rossi) sono nettamente diversi da quelli delle altre aree, con una certa differenziazione anche tra area R (punti verdi) e T (croci blu).

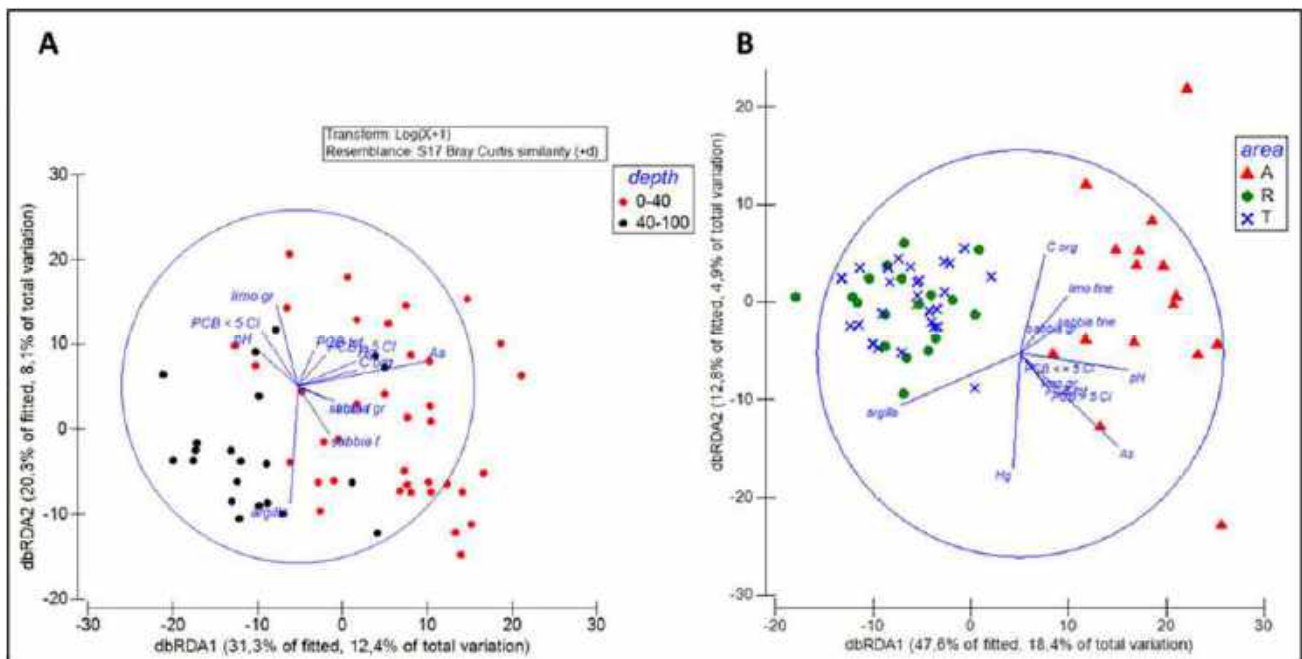


Figura 2.21. Correlazioni tra i fingerprint delle comunità batteriche e i parametri fisico-chimici dei suoli lungo il gradiente di profondità (Fase 2, pannello A della figura) e la superficie (0-40 cm) delle tre aree (Fase 3, pannello B della figura) calcolate con il metodo statistico “Distance-based multivariate analysis” (DistLM). Ogni punto del tracciato rappresenta un campione, e la distanza tra i punti è proporzionale alla diversità delle comunità batteriche. I parametri chimico-fisici riportati in carattere blu nella figura sono quelli risultati statisticamente correlati con la composizione delle comunità batteriche. Pannello A: La concentrazione di PCB ed As, ed alcune caratteristiche del suolo (pH, contenuto di carbonio organico, percentuale di sabbia e limo) risultano influire significativamente sulla differenziazione delle comunità batteriche dei suoli superficiali (punti rossi), mentre la percentuale di argilla dei suoli risulta influire significativamente sulla differenziazione delle comunità batteriche dei suoli profondi (punti neri). Pannello B: La concentrazione di PCB ed As, ed alcune caratteristiche del suolo (pH, contenuto di carbonio organico, percentuale di sabbia e limo) risultano influire significativamente sulla differenziazione delle comunità batteriche dei suoli superficiali dell’area A (triangoli rossi), mentre la percentuale di argilla risulta influire significativamente sulla differenziazione dei suoli superficiali delle altre aree. Hg, pur essendo una variabile significativamente correlata alla differenziazione delle comunità batteriche, non impatta in particolare i campioni di una singola area.

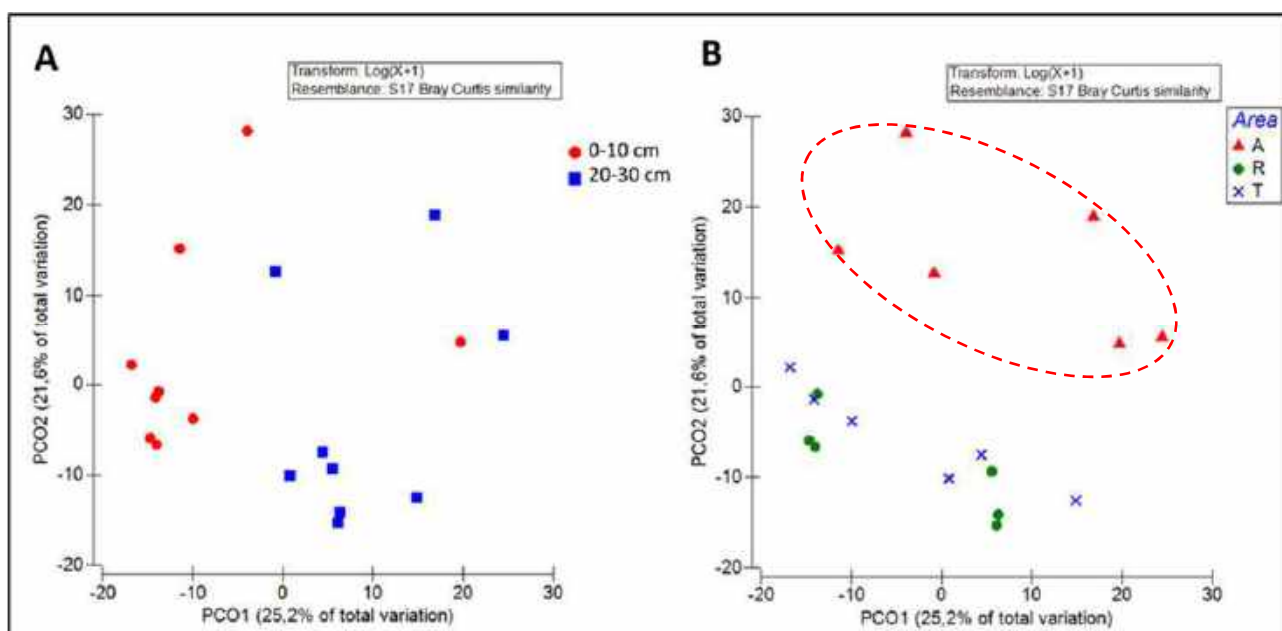


Figura 2.22 Distribuzione dei campioni di suolo ottenuta mediante analisi statistica (Principal Coordinate Analysis, PCoA) del catalogo massivo dei taxa batterici riscontrati in una selezione di campioni. Ogni punto del tracciato rappresenta un campione, e la distanza tra i punti è proporzionale alla diversità delle comunità batteriche. (A) comparazione della composizione batterica in base alla profondità, che indica che i suoli superficiali (punti rossi) hanno comunità batteriche residenti diverse dai suoli profondi (quadrati blu); (B) comparazione della composizione batterica nei suoli in base alla distribuzione spaziale, che indica che i suoli dell'area T (triangoli rossi) sono nettamente diversi da quelli delle altre aree.

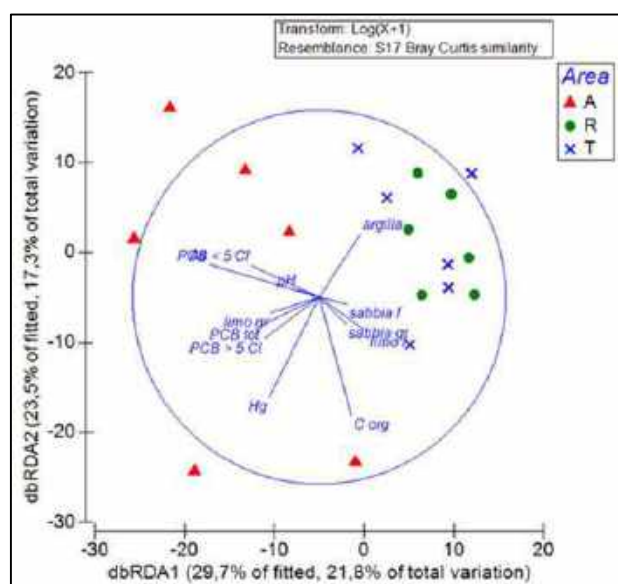


Figura 2.23 Correlazioni tra la composizione delle comunità batteriche (rilevata dal catalogo massivo di taxa batterici su una selezione di campioni) e i parametri fisico-chimici dei suoli calcolate con il metodo statistico "Distance-based multivariate analysis" (DistLM). Ogni punto del tracciato rappresenta un campione, e la distanza tra i punti è proporzionale alla diversità delle comunità batteriche. I parametri chimico-fisici riportati in carattere blu nella figura sono quelli risultati statisticamente correlati con la composizione delle comunità batteriche. La concentrazione di PCB, Hg ed As, ed alcune caratteristiche del suolo (pH, contenuto di carbonio organico, percentuale di limo) risultano influire significativamente sulla differenziazione delle comunità

batteriche dei suoli superficiali dell'area A (triangoli rossi), mentre la percentuale di argilla risulta influire significativamente sulla differenziazione delle comunità batteriche dei suoli superficiali nelle altre aree.

2.3.2 Attività delle comunità microbiche e correlazione con il profilo di contaminazione

Tutti i campioni di suolo ottenuti in fase 2 e fase 3 sono stati analizzati quantificandone l'attività idrolitica nei confronti di una molecola organica indicatore (FDA). Tale misura fornisce un'indicazione relativa a i) attività metabolica generale (vitalità) dei microrganismi del suolo (batteri e funghi), ii) potenziale dei microrganismi di degradare la sostanza organica del suolo, potenzialmente aumentando la biodisponibilità delle molecole ad essa complessate come i PCB. L'analisi statistica dei risultati del test ha dimostrato in tutte le aree una generale diminuzione dell'attività microbica all'aumentare della profondità (Figura 2.24). I suoli superficiali (0-40 cm, prelevati in fase 3) mostrano che le tre aree presentano tra di loro valori diversi di attività (tabella 2.3). Questi risultati evidenziano come i suoli contengano microrganismi attivi metabolicamente sulle sostanze organiche. L'entità dell'attività idrolitica registrata segue, oltre che la profondità, anche la distribuzione dei contaminanti, suggerendo un aumento del potenziale di *natural attenuation* negli strati di suolo superficiali più inquinati, dove la maggiore degradazione della sostanza organica potrebbe risultare in una mobilizzazione dei contaminanti organici (PCB), aumentandone la biodisponibilità per le popolazioni microbiche degradatrici.

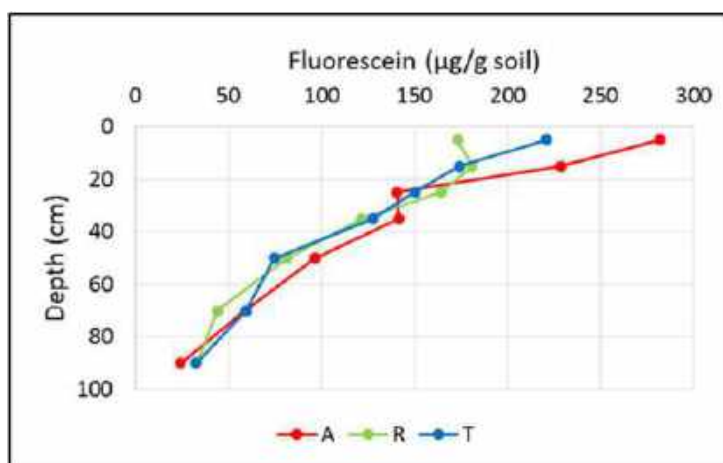


Figura 2.24 Test di idrolisi della fluoresceina diacetato (FDA). Il grafico riporta la quantità del prodotto di idrolisi della FDA (fluorescina) ottenuto da 1 grammo di suolo. I valori di attività sono riportati in base alla profondità del suolo nelle tre aree A, R e T, calcolati come media tra le tre stazioni di campionamento in ogni area (fase 2).

Tabella 2.3: Analisi statistica comparativa (PERMANOVA) dei risultati del test di attività idrolitica effettuato sui campioni di suolo raccolti tra nei primi 40 cm di suolo nelle tre aree A, R e T (Fase 3). Il valore P indica il livello di significatività della differenza tra le aree. Le aree dimostrano una differenza significativa nell'attività idrolitica quando P risulta $<0,05$: tutte le aree risultano significativamente differenti in base all'attività dei microrganismi presenti nei suoli.

Aree a confronto	P
A, R	0,0001
A, T	0,038
R, T	0,0003

Nell'insieme i dati microbiologici ottenuti supportano l'ipotesi che l'alto livello di inquinamento dei suoli del SIN Caffaro costituisca un fattore chiave per la composizione del microbiota del suolo, e che gruppi filogenetici diversi, non escluse le popolazioni di batteri PCB degradatori, siano stati selezionati negli strati di suolo superficiali più inquinati. In generale questi dati consentono di valutare positivamente le potenzialità di un processo di biorisanamento in questo sito.

3. Scelta della tecnica di bonifica biologica da applicare sui suoli Caffaro

La scelta della tecnica di bonifica, da applicare sui suoli Caffaro, si è basata sulle indicazioni contenute nell'Accordo di Programma (sottoscritto nel settembre 2009) “*Per la definizione degli interventi di messa in sicurezza e successiva bonifica nel Sito d'Interesse Nazionale Brescia-Caffaro*” e, in particolare, su quanto riportato al Punto E, Fase 1, Azione B: “Sperimentazione tecnologie di *bioremediation* per 3 lotti di circa 5 ettari per una superficie totale di intervento pari a 15 ettari”.

Tale indicazione ha portato aprioristicamente all'esclusione di tecniche alternative a quelle biologiche, quali quelle termiche e/o chimico-fisiche. Queste ultime, infatti, pur risultando potenzialmente applicabili ai principali composti target individuati nel SIN (PCBs, Diossine, Furani, As e Hg), presentano una serie di limiti, non trascurabili, che le rendono, di fatto, non utilizzabili in questo contesto. Esse, infatti:

- si prestano, se considerate singolarmente, solo alla rimozione di specifiche classi di composti e non di una miscela di contaminanti (caratterizzati da comportamenti ambientali molto differenti fra loro – contaminazione multipla), come quelli rinvenuti nel SIN BS-Caffaro;
- risultano economicamente non sostenibili, data l'estensione della contaminazione ed i livelli di concentrazione riscontrati nei suoli;
- non appaiono coerenti con le linee guida ministeriali che, nell'Allegato 3 al D.Lgs 152/06, suggeriscono di adottare (fra gli altri), nella selezione delle tecniche di bonifica, criteri che privilegino interventi volti alla “permanente e significativa riduzione... degli effetti tossici e della mobilità delle sostanze inquinanti”, nonché caratterizzati dalla “tendenza a trattare e riutilizzare il suolo nel sito, trattamento in-situ ed on-site del suolo contaminato, con conseguente riduzione dei rischi derivanti dal trasporto e messa a discarica di terreno inquinato”.

In questa ottica, la *phytoremediation* risulta essere la tecnica di bonifica biologica che, sfruttando l'azione sinergica di piante e microrganismi associati alla rizosfera, meglio si presta per rispondere ai requisiti ministeriali e per essere applicata ad un sito con estensione ed eterogeneità di contaminazione come quello di BS-Caffaro.

Le specie vegetali, selezionate e testate dopo un approfondito ed analitico studio della letteratura esistente, infatti, risultano essere potenzialmente in grado di degradare alcuni composti (PCBs, Diossine e Furani), grazie ad un meccanismo di *rhizoremediation*, e/o di accumularne altri (As e Hg) nelle parti ipogee ed epigee, attraverso un processo di *phytoextraction*. Il fitorimediazione, inoltre, è un trattamento relativamente economico, in-situ, ad energia solare e ecologicamente sostenibile. Le piante, infatti, oltre a rendere piacevole, da un punto di vista meramente estetico-organolettico, il paesaggio nel quale si collocano, hanno l'importante funzione di stabilizzare, grazie al loro apparato radicale, il terreno, proteggendolo da fenomeni erosivi (con conseguente sollevamento di polveri) e di lisciviazione meteorica (possibili veicoli di diffusione della contaminazione). Inoltre, l'impiego di specie vegetali, selezionate anche sulla base delle caratteristiche pedologiche e climatiche dell'area di interesse, può rappresentare un futuro settore occupazionale per la popolazione residente. Infine, a differenza delle tecniche termiche, che possono alterare totalmente o parzialmente le caratteristiche originarie dei terreni (rendendoli, a volte, non più fruibili per scopi agronomici), quelle biologiche ben si prestano per incrementare la flora microbica ed il contenuto di sostanza organica, con conseguente aumento della fertilità del suolo.

4. Sperimentazioni di *phyto-rhizoremediation*

Le specie vegetali e i trattamenti da applicare durante la sperimentazione di *rhizoremediation* in serra (figura 4.1) sono riportati nella tabella 4.1. Sono stati scelti sulla base di un'estesa ricerca bibliografica volta a identificare i risultati positivi di sperimentazioni precedenti, condotte da gruppi di ricerca a livello internazionale, su suoli che naturalmente o artificialmente presentassero i contaminanti rilevati nel SIN Brescia Caffaro (in particolare quelli selezionati nella sezione 2.2.2, ovvero PCB, PCDD, PFDF, As e Hg). I risultati di questa approfondita ricerca sono riportati analiticamente e dettagliatamente nel documento "*Background document* per la messa a punto di un protocollo per gli esperimenti di *rhizoremediation*" (2015) (vedi sito ERSAF) e divulgati alla comunità scientifica internazionale in due lavori di rassegna pubblicati su riviste scientifiche internazionali (Vergani et al. 2017; Terzaghi et al. 2018). Le più promettenti specie vegetali da applicare durante la sperimentazione sono state quindi selezionate in base ai seguenti criteri:

- impiego delle specie vegetali in più di una sperimentazione, ed i risultati pubblicati su riviste di elevato prestigio (utilizzando il parametro bibliografico "*Impact factor*" della rivista come indicatore di riproducibilità e rigore metodologico delle sperimentazioni).
- Efficaci nell'induzione della degradazione di composti organici clorurati (PCB, diossine e furani) e/o nella fitoestrazione di metalli (mercurio) e metalloidi (arsenico) dal suolo.
- Preferenza per specie filogeneticamente imparentate con le piante spontanee già presenti nelle aree agricole del SIN.
- disponibilità commerciale dei semi.
- coltivabilità in condizioni di serra.

Considerando le limitazioni imposte dal budget e dal conseguente dimensionamento massimo dell'esperimento, sono state selezionate un totale di 10 tesi. Sono state selezionate 7 specie, piantate singolarmente o in consociazione, o associate a specifici trattamenti:

- *Medicago sativa*, *Phalaris arundinacea*, *Festuca arundinacea* e *Brassica juncea* sono state selezionate per la capacità di favorire la riduzione di PCB nel suolo durante prove di fitodepurazione rispetto ai controlli non piantati, riportata in diversi studi.
- *Medicago sativa* è stata coltivata con l'inoculo di rizobi simbiotici azotofissatori e micorrize in grado di: a) promuoverne la crescita migliorando la nutrizione della pianta, b) aumentare la concentrazione di funghi e rizobi nel suolo, in qualche studio associati alla rimozione dei PCB.
- *Athyrium filix-foemina* è stata selezionata per la capacità di accumulare arsenico, oltre che per la sua rapida crescita ed elevata biomassa che la rendono una specie appropriata per la fitodepurazione di suoli. Armiraglio (comunicazione personale) riferiva poi della presenza di questa specie nell'area del SIN (Martini, 2012). Tale specie è stata coltivata in associazione con *Salix caprea* per la sua efficacia dimostrata nella riduzione dei PCB oltre alla capacità ombreggiante potenzialmente in grado di creare un microclima più favorevole per la felce.
- *F. arundinacea* è stata associata con *Cucurbita pepo pepo* con l'obiettivo di migliorare la fitoestrazione dei PCB, dato che le specie appartenenti alla famiglia delle *Cucurbitaceae* sono note per la capacità di traslocare PCB dalla rizosfera alla parte aerea.
- *F. arundinacea* è stata coltivata anche in un suolo addizionato a compost in quanto la sua degradazione permette la produzione di carbonio organico disciolto (DOC) che aumenta la biodisponibilità dei contaminanti organici.

- *P. arundinacea* e *F. arundinacea* sono state anche sottoposte a ripetuti cicli di allagamento, in modo da creare un ciclo di ossidoriduzione “*redox*” finalizzato ad accoppiare il processo di dechlorurazione anaerobica dei PCB con la degradazione aerobica, con l’obiettivo di favorire la rimozione dei congeneri altamente clorurati, che in letteratura è riportato a carico di microrganismi anaerobi.
- *Brassica juncea* è stata anche coltivata aggiungendo al suolo tiosolfato d’ammonio, un composto che secondo letteratura migliora la fitoestrazione del mercurio da parte di questa specie.

Per consentire di valutare lo specifico contributo della pianta alla rimozione degli inquinanti, sono state allestite 7 diverse tesi di controllo senza piante ma con i diversi trattamenti del suolo al fine di confrontare ciascuna tesi piantumata con il relativo controllo mantenuto nelle identiche condizioni tranne che per la presenza della pianta. È stato inoltre allestito un controllo con suolo non contaminato e piantato con *Festuca arundinacea* e *Medicago sativa* per valutare la contaminazione crociata via aria nella serra. Prima della semina in vaso, è stato condotto un test ecotossicologico (germinazione dei semi e sviluppo del germoglio) con semi di cetriolo (*Cucumis sativus*) per saggiare la fitotossicità del suolo oggetto di studio su una specie sensibile. Dal test non è emerso un effetto fitotossico del suolo nei confronti della specie testata.

Tabella 4.1 - Elenco dei dieci trattamenti piantati e dei rispettivi controlli non piantati allestiti durante la sperimentazione di *rhizoremediation* in serra.

Trattamenti	Controlli
P1 <i>Phalaris arundinacea</i>	C2 suolo non piantato e fertilizzato
P2 <i>Phalaris arundinacea</i> + ciclo redox	C3 suolo non piantato e fertilizzato + ciclo redox
P3 <i>Festuca arundinacea</i>	C2 suolo non piantato e fertilizzato
P4 <i>Festuca arundinacea</i> + <i>Cucurbita pepo</i> spp <i>pepo</i>	C2 suolo non piantato e fertilizzato
P5 <i>Festuca arundinacea</i> + ciclo redox	C3 suolo non piantato e fertilizzato + ciclo redox
P6 <i>Festuca arundinacea</i> + compost	C5 suolo non piantato e fertilizzato + compost
P7 <i>Medicago sativa</i> + AMF + rizobio	C2 suolo non piantato e fertilizzato
P8 <i>Salix caprea</i> + <i>Athyrium filix-foemina</i>	C7 suolo non piantato e fertilizzato + panetto
P9 <i>Brassica juncea</i>	C2 suolo non piantato e fertilizzato
P10 <i>Brassica juncea</i> + tiosolfato	C4 suolo non piantato e fertilizzato + tiosolfato
C1 suolo non piantato non fertilizzato	
C6 suolo non contaminato piantato con <i>Medicago sativa</i> + <i>Festuca arundinacea</i>	

4.1 Schema sperimentale

Il suolo utilizzato per la sperimentazione in serra è stato raccolto all’interno di zone scelte in seguito ad elaborazione geostatistica dei dati di concentrazione di arsenico (As), mercurio (Hg), PCB e diossine/furani (PCDD/F (I-TEF)) contenuti nello strato 0-40 cm (fase 3, capitolo 1), in modo da selezionare un suolo caratterizzato dalla concentrazione media rilevata nelle tre aree (A, R, T) per queste quattro classi di contaminanti. In particolare, sono state individuate zone per il prelievo che soddisfacessero contemporaneamente i seguenti vincoli:

- Concentrazioni di As comprese tra 50 e 80 mg/kg
- Concentrazioni di Hg comprese tra 3.5 e 5.4 mg/kg
- Concentrazioni di PCDD/F I-TEF comprese tra 0.05 e 0.08 µg/kg
- Concentrazioni di PCB comprese tra 1000 e 2000 µg/kg

Il suolo è stato preparato, miscelato e omogeneizzato estensivamente con il metodo *Japanese slab cake* (vedi “Protocollo preparazione vasi”, reperibile sul sito ERSAF) al fine di rendere minima la variabilità del suolo iniziale contenuto nei vasi. Il suolo è stato quindi trasferito in vasi di polipropilene da 6 litri ciascuno. Sono stati previsti 4 tempi di campionamento distruttivo (prelievo del contenuto totale del vaso per analisi chimiche e microbiologiche) per ciascuna tesi e ciascun controllo analizzati in tre vasi replicati indipendenti. Sono stati pertanto allestiti 15 vasi (figura 4.2) per ciascuna tesi controllo (comprendenti anche il tempo pre-semina) e 12 per ciascuna tesi piantata, per un numero totale di 225 vasi. Tutti i trattamenti ed i rispettivi controlli sono stati allestiti in triplicato per consentire un’analisi statistica e valutare la significatività dei dati chimici e microbiologici. Ogni trattamento fertilizzato è stato trattato con ENNEKAPPA (Ilsagroup) e NutriLeaf® 20-20-20 (Biograd). Il ciclo di ossidoriduzione è stato ottenuto nei vasi alternando sette giorni di allagamento per il primo anno (quattordici per il secondo) con acqua di rete a sette giorni (quattordici per il secondo) di asciutta per tutta la durata dell’esperimento. Il tiosolfato d’ammonio (SIGMA ALDRICH) è stato addizionato al suolo in soluzione acquosa ad una concentrazione finale di 8g/Kg.

Le specie vegetali sono state seminate nei seguenti periodi:

- 9/11 maggio 2015: trapianto di felci e salici e semina di tutte le altre specie.
- agosto 2015: nuova semina di *Brassica* (trattamenti P9 e P10) per un secondo ciclo di crescita.
- maggio 2016: nuova semina di *Brassica* e di *Cucurbita pepo pepo* (P4) e trapianto di nuove piante di felce (P8).
- agosto 2016: nuova semina di *Brassica*.

I campioni di suolo sono stati raccolti all’inizio della sperimentazione (T0, 13-20 maggio 2015; solo controlli non piantati) e quindi a diversi intervalli di tempo: 13-29 luglio 2015 (T1), 9-10 dicembre 2015 (T2), 4-20 luglio 2016 (T3), 24 ottobre-16 novembre 2016 (T4). Il suolo contenuto in ogni vaso, dopo la separazione della componente vegetale, è stato setacciato e omogeneizzato e i campioni di suolo e delle parti vegetative sono stati raccolti in triplicato per ogni vaso e conservati a 4°C o -20°C per le successive analisi microbiologiche e chimiche.

Per una descrizione dettagliata dei metodi di sperimentazione e campionamento si rimanda al “Protocollo sperimentazione in serra” (2015) reperibile sul sito ERSAF.



Figure 4.1 – Impianto sperimentale nella serra dell'esperimento di *rhizoremediation*



Figura 4.2 – Allestimento vasi per i diversi trattamenti e repliche.

4.2 Risultati dell'esperimento di phyto-rhizoremediation

Prima della piantumazione (T0), e dopo 2 mesi (T1), 7 mesi (T2), 14 mesi (T3), 18 mesi (T4), suoli e biomasse sono stati prelevati e due identiche aliquote sono state destinate i) alle analisi chimiche, volte a valutare l'eventuale diminuzione nella concentrazione degli inquinanti, ii) (solo il suolo) alle analisi microbiologiche, volte a valutare la biostimolazione delle popolazioni microbiche del suolo. I risultati sono stati ottenuti confrontando statisticamente ciascuna tesi piantumata con il relativo

controllo non piantato (tabella 4.1). Per vincoli di budget i campioni prelevati alle fasi T1 e T3 (rispettivamente 2 e 14 mesi dalla prima semina) sono stati prelevati ed opportunamente conservati per eventuali esigenze future, ma non sono stati analizzati.

4.2.1 Risultati delle analisi chimiche

In questa sezione vengono riportati i risultati della sperimentazione di in serra. Verranno discussi i dati relativi alle concentrazioni delle varie famiglie chimiche (As, Hg, PCB, PCDD, PCDF) nel suolo e nelle biomasse vegetali (radici e fusto) dei vari controlli e trattamenti considerati. In particolar modo, per i dati del suolo verranno mostrati in forma grafica solo quelli relativi ad un trattamento selezionato (P4 - *Festuca arundinacea* + *Cucurbita pepo spp pepo*) a titolo di esempio, mentre un confronto dettagliato fra i vari trattamenti verrà effettuato in 10.2 mediante il calcolo della riduzione percentuale delle concentrazioni tra i controlli al t0 e i trattamenti al t4. I dati delle biomasse vegetali verranno invece mostrati per tutti i trattamenti in forma grafica in modo comparativo; nello stesso grafico verranno inoltre riportati i valori misurati per il controllo C6 (suolo non contaminato con pianta e fertilizzato (*Medicago sativa* + *Festuca arundinacea*) come riferimento delle concentrazioni di “background”.

4.2.1.1 Concentrazioni nel suolo

Le figure 4.3-4.6 mostrano i livelli e gli andamenti delle concentrazioni nel suolo per il trattamento selezionato e relativo controllo ai vari tempi della sperimentazione considerando As e Hg, PCB, PCDD, PCDF.

As e Hg mostrano concentrazioni di circa 50 mg/kg ss e 10 mg/kg ss, rispettivamente, sia nei vasi controllo che in quelli trattati durante tutta la sperimentazione. Questo andamento indica che nessuna delle specie saggiate è stata in grado di fitoestrarre in modo importante questi metalli dal suolo e di ridurne quindi la concentrazione. Anche le specie selezionate appositamente per la fitoestrazione dei metalli (felce e senape indiana con aggiunta di tiosolfato d'ammonio) non hanno dato dei risultati soddisfacenti in termini di riduzione di concentrazione nel suolo. È da sottolineare tuttavia che per entrambe queste specie si sono rivelati problemi di tipo agronomico: la felce ha dimostrato scarsissima crescita nelle condizioni di serra non termostata, mentre la senape indiana ha sofferto l'addizione del tiosolfato, il cui dosaggio necessita di messa a punto.

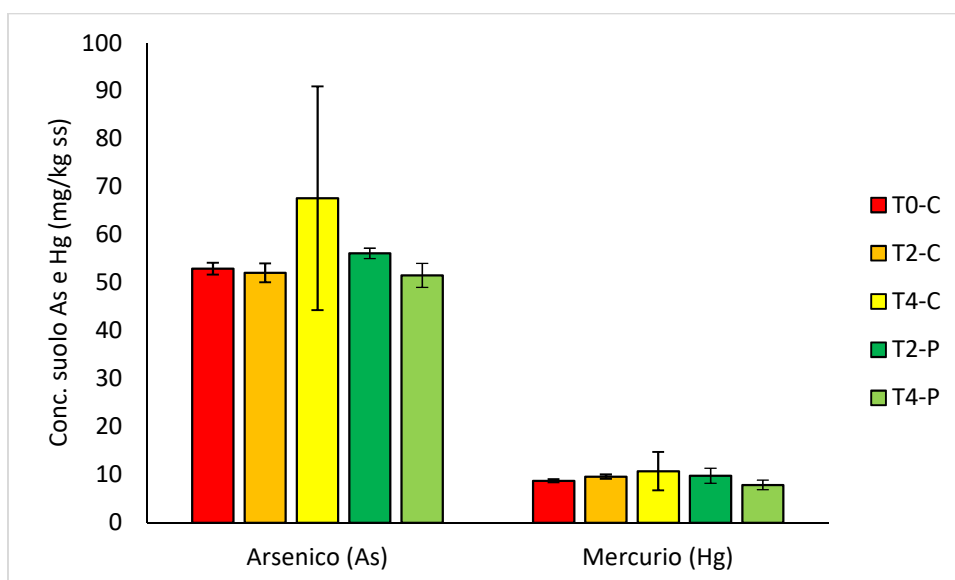


Figura 4.3 – Concentrazioni di As e Hg nel suolo dei controlli (C) e trattamento (P) ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4) (T0-C, non fertilizzato; T2-C e T4-C fertilizzato; T2-P4 e T4-P4, *Festuca arundinacea* + *Cucurbita pepo spp pepo*)

I PCB mostrano concentrazioni intorno agli 11000 $\mu\text{g/kg ss}$ se considerati come somma dei 76 congeneri misurati. Il *fingerprint* è predominato dai tetra, penta, esa, epta e deca PCB che rappresentano circa il 10%, 20%, 20%, 15% e 15% dei PCB misurati rispettivamente; le altre famiglie rappresentano ciascuna meno del 5%. Per alcune famiglie si può osservare una diminuzione statisticamente significativa delle concentrazioni fra controllo al t0 e trattamento al t4, in particolar modo per i tri, tetra, esa e epta-PCB. Si rimanda alla sezione 4.2.1.3 per il confronto con gli altri trattamenti.

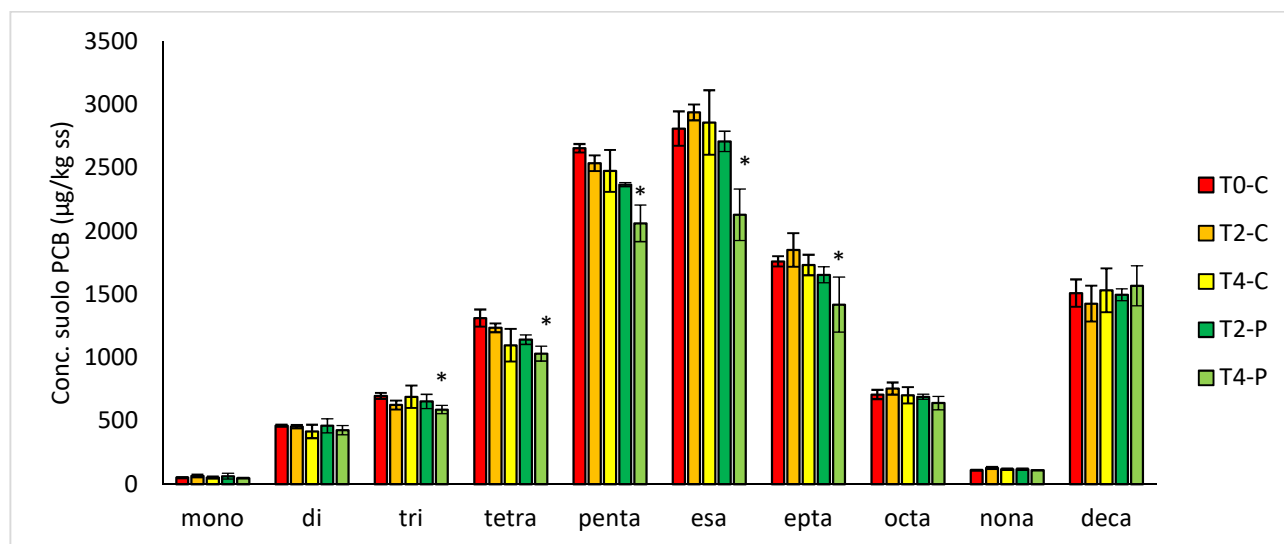


Figura 4.4 – Concentrazioni di PCB nel suolo dei controlli (C) e trattamento (P) ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4) (T0-C, non fertilizzato; T2-C e T4-C fertilizzato; T2-P4 e T4-P4, *Festuca arundinacea* + *Cucurbita pepo spp pepo*). L'asterisco (*) indica che vi è una differenza statisticamente significativa tra controllo al t0 e trattamento al t4 (test T-student, α 0.1)

Le PCDD mostrano concentrazioni intorno ai 1500 ng/kg ss (somma concentrazioni naturali 7 PCDD). Il fingerprint è predominato dalla OCDD che rappresenta più del 90% del fingerprint. Per alcuni

congeneri, in particolar modo 2,3,7,8 TCDD e 1,2,3,4,7,8 HxCDD si può osservare una diminuzione statisticamente significativa delle concentrazioni fra controllo al t0 e trattamento al t4. Si rimanda alla sezione 4.2.1.3 per il confronto con gli altri trattamenti.

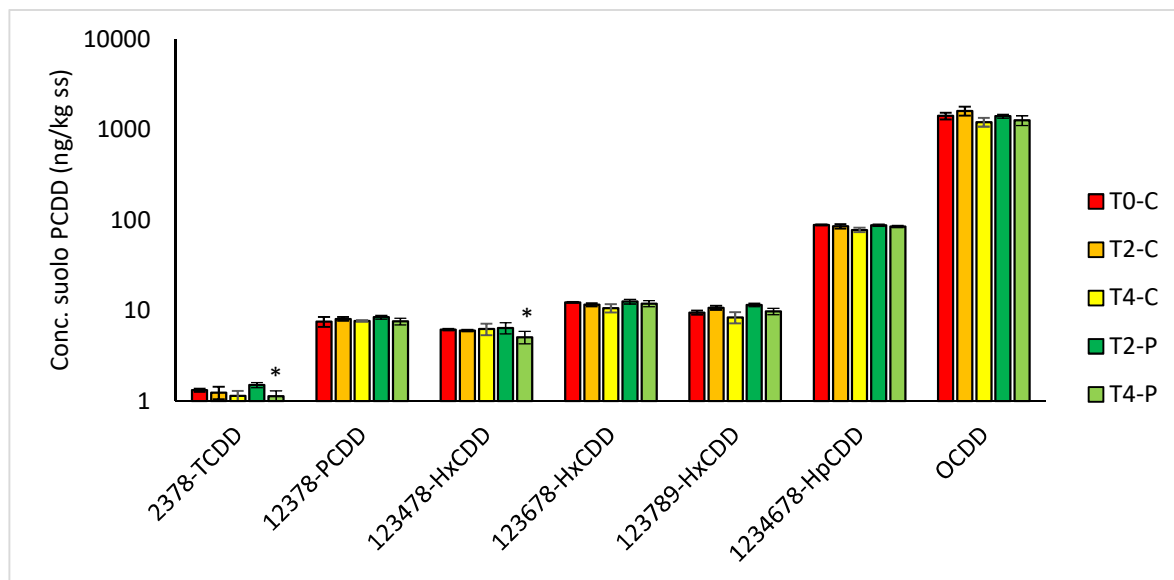


Figura 4.5 – Concentrazioni di PCDD nel suolo dei controlli (C) e trattamento (P) ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4) (T0-C, non fertilizzato; T2-C e T4-C fertilizzato; T2-P4 e T4-P4, *Festuca arundinacea* + *Cucurbita pepo* spp *pepo*). L'asterisco (*) indica che vi è una differenza statisticamente significativa tra controllo al t0 e trattamento al t4 (test T-student, α 0.1)

I PCDF mostrano concentrazioni intorno ai 3500 ng/kg ss (somma concentrazioni naturali 10 PCDF). Il fingerprint è predominato da 2,3,7,8 TCDF, 1,2,3,4,7,8 HxCDF e OCDF che rappresentano circa il 20%, 15% e 30% rispettivamente. Per alcuni congeneri, in particolar modo 1,2,3,7,8 PCDF e tutti gli HxCDF, si può osservare una diminuzione statisticamente significativa delle concentrazioni fra controllo al t0 e trattamento al t4. Si rimanda alla sezione 4.2.1.3 per il confronto con gli altri trattamenti.

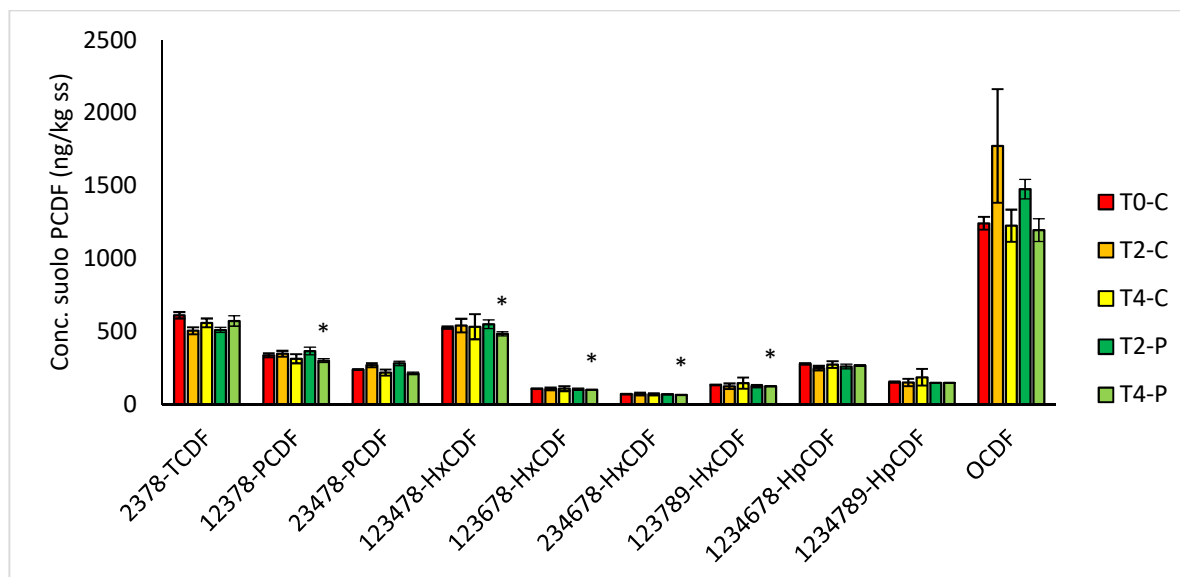


Figura 4.6 – Concentrazioni di PCDF nel suolo dei controlli (C) e trattamento (P) ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4) (T0-C, non fertilizzato; T2-C e T4-C fertilizzato; T2-P4 e T4-P4, *Festuca arundinacea* + *Cucurbita pepo* spp *pepo*). L'asterisco (*) indica che vi è una differenza statisticamente significativa tra controllo al t0 e trattamento al t4 (test T-student, α 0.1)

4.2.1.2 Concentrazioni nelle biomasse

Le specie dei trattamenti mostrano concentrazioni di As nelle radici simili fra loro e di quasi un ordine di grandezza superiori rispetto al controllo. Fanno eccezione le tesi P2 e P5, ovvero *Phalaris arundinacea* e *Festuca arundinacea* sottoposte a ciclo redox, che al t4 mostrano concentrazioni di un ordine di grandezza superiore, indicando un possibile effetto di questo trattamento sulla “biodisponibilità” di questo metallo. Tuttavia, la quantità di As accumulata nelle radici rappresenta meno del 5% della quantità totale di As presente nel suolo del vaso. Questo andamento si riflette anche per le concentrazioni nel fusto/foglie: P2 e P5, insieme anche a P8 (felce, ma solo 1 valore) mostrano livelli di As più elevati rispetto alle altre specie. Tuttavia la quantità di As accumulata nel fusto/foglie per P2 e P5) rappresenta meno dello 0.3% della quantità totale di As presente nel suolo del vaso, indice di una scarsa traslocazione di questo metallo.

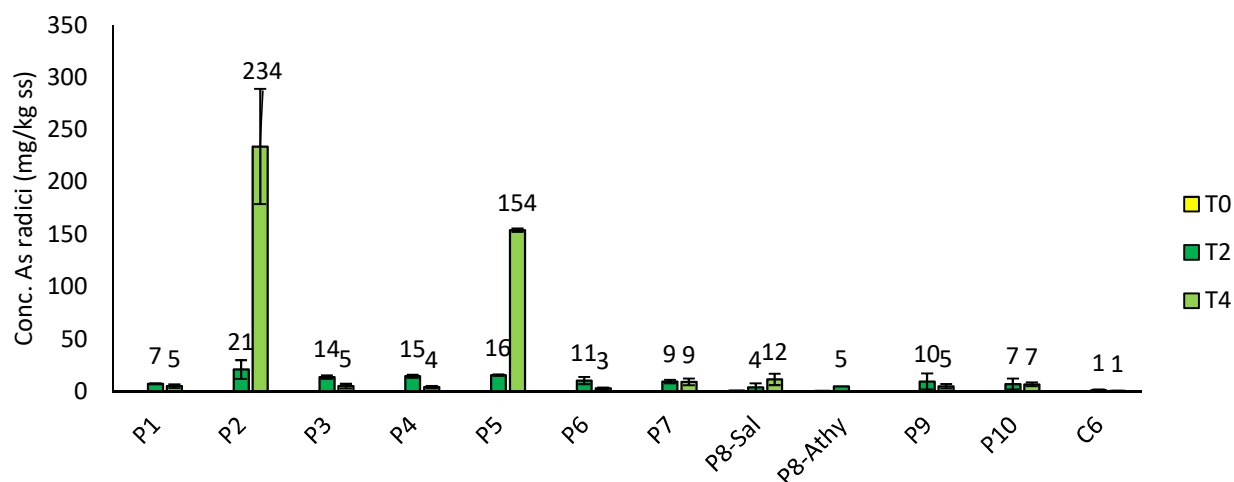


Figura 4.7 – Concentrazioni di As nelle radici delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4)

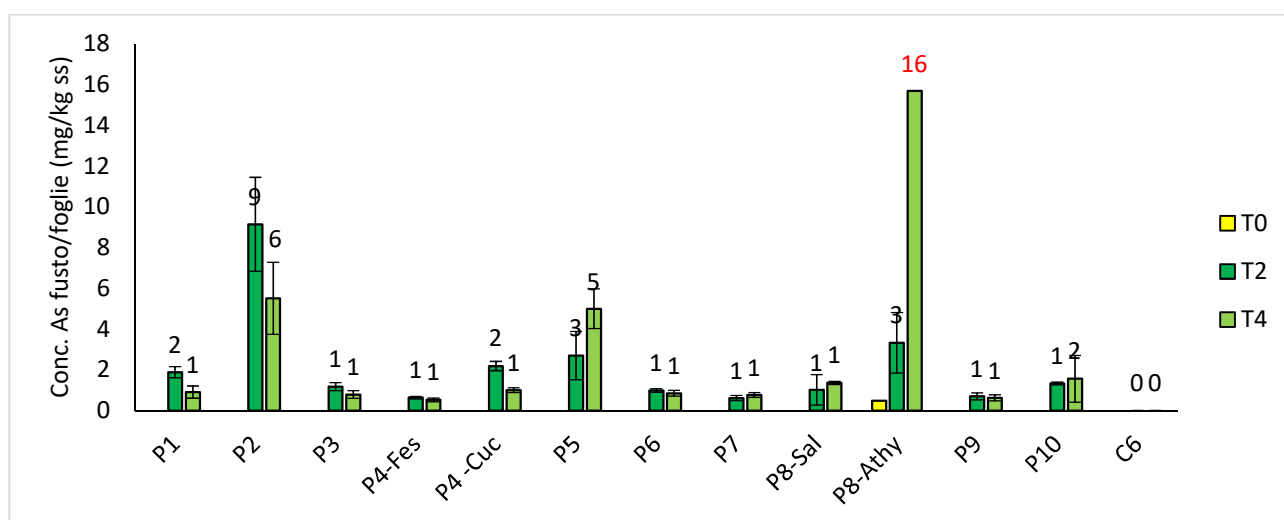


Figura 4.8 – Concentrazioni di As nel fusto/foglie delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 (suolo non contaminato) ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4) Il valore in colore rosso si riferisce alla singola replica disponibile

Anche per il mercurio i trattamenti P2 e P5 mostrano concentrazioni nelle radici e nelle foglie/fusto più elevate rispetto alle altre specie. P8 (felce) e P10 (*Brassica juncea* + tiosolfato) per un solo tempo mostrano livello più elevati di P2 e P5 nelle foglie/fusto (non ci sono repliche). In questo caso mentre la quantità accumulata nelle radici rappresenta circa il 10% della quantità presente nel suolo, quella accumulate nelle foglie/fusto è irrisoria rispetto alla quantità presente nel vaso.

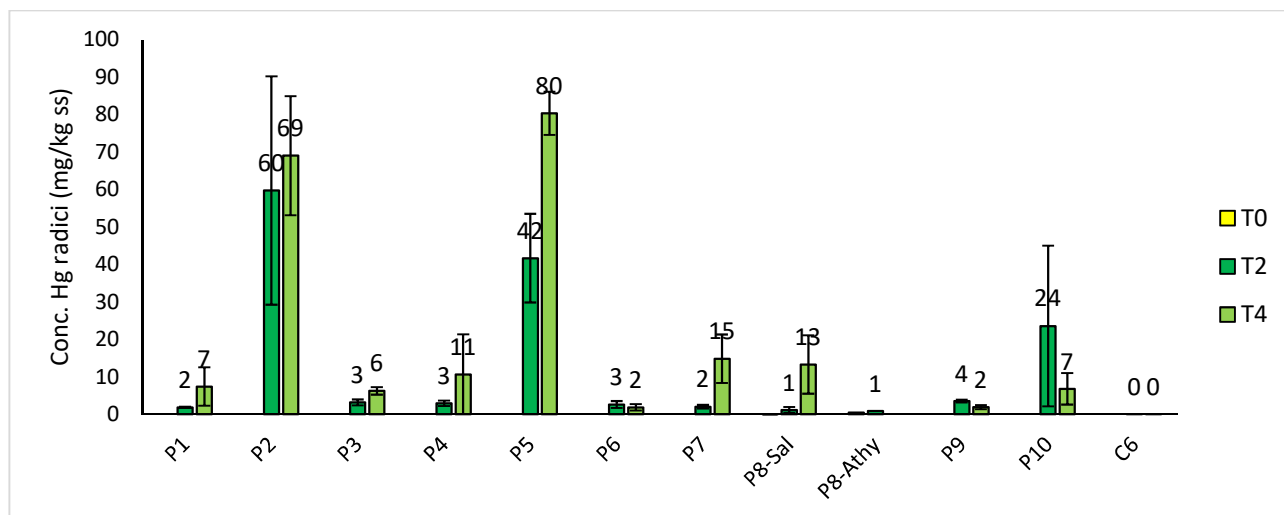


Figura 4.9 – Concentrazioni di Hg nelle radici delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4)

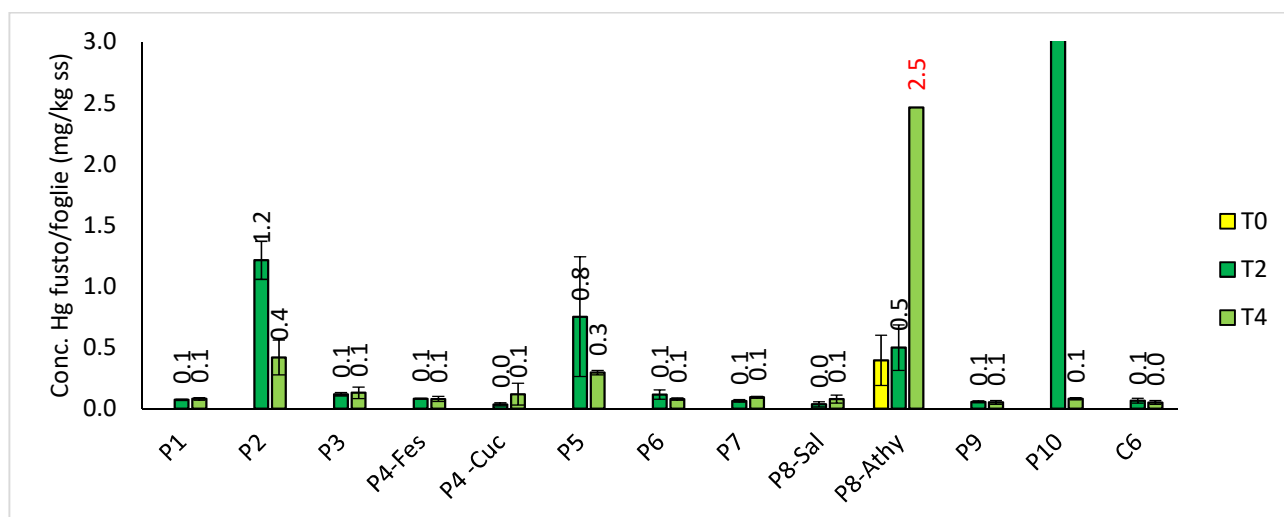


Figura 4.10 – Concentrazioni di Hg nel fusto/foglie delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4). Il valore in colore rosso si riferisce alla singola replica disponibile

Per quanto riguarda i contaminanti organici le concentrazioni nelle radici dei vari trattamenti possono essere fino a 2-3 ordini di grandezza più elevati rispetto a quelle del controllo per PCB e PCDF, mentre per le PCDD i trattamenti mostrano valori simili o superiori (ma entro un ordine di grandezza) a quelli dei controlli. Se invece si osserva la biomassa epigea (fusto/foglie) il trattamento P4 e in particolar modo la zucca mostra livelli di PCB e PCDF (ma non di PCDD) di 2 e 1 ordine di grandezza rispettivamente superiori rispetto a quelli degli altri trattamenti e del controllo.

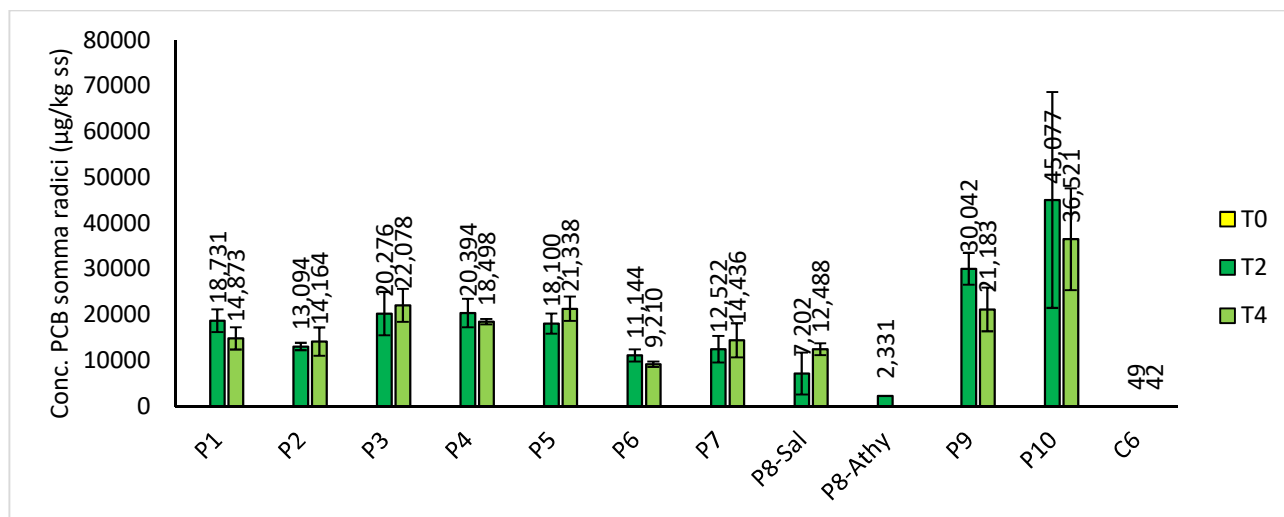


Figura 4.11 – Concentrazioni di PCB (somma) nelle radici delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4)

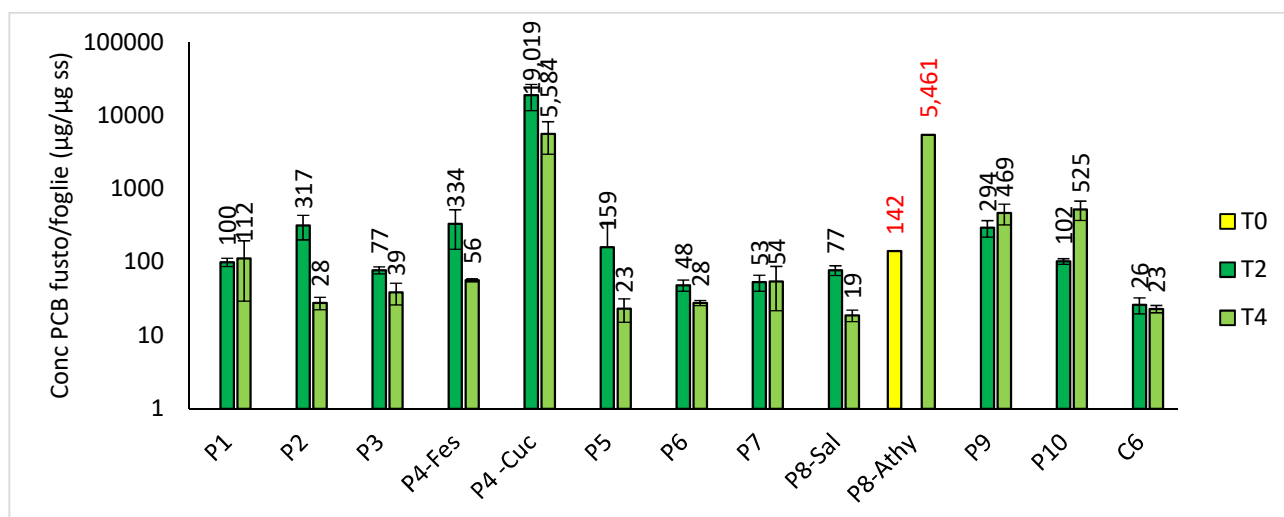


Figura 4.12 – Concentrazioni di PCB nel fusto/foglie delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4) I valori in colore rosso si riferiscono alla singola replica disponibile

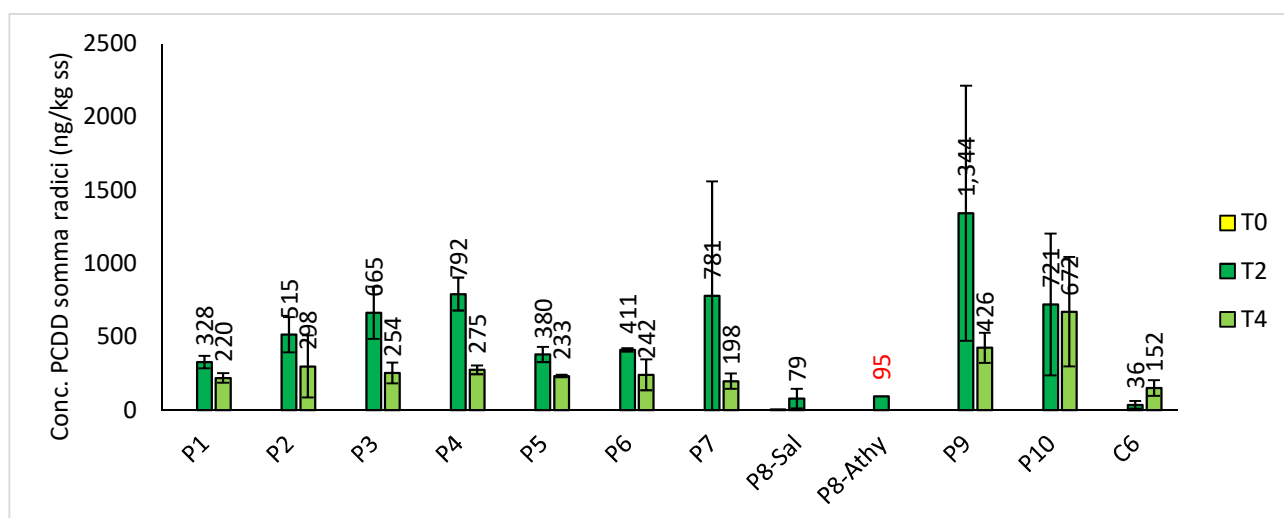


Figura 4.13 – Concentrazioni di PCDD (somma) nelle radici delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4). Il valore in colore rosso si riferisce alla singola replica disponibile

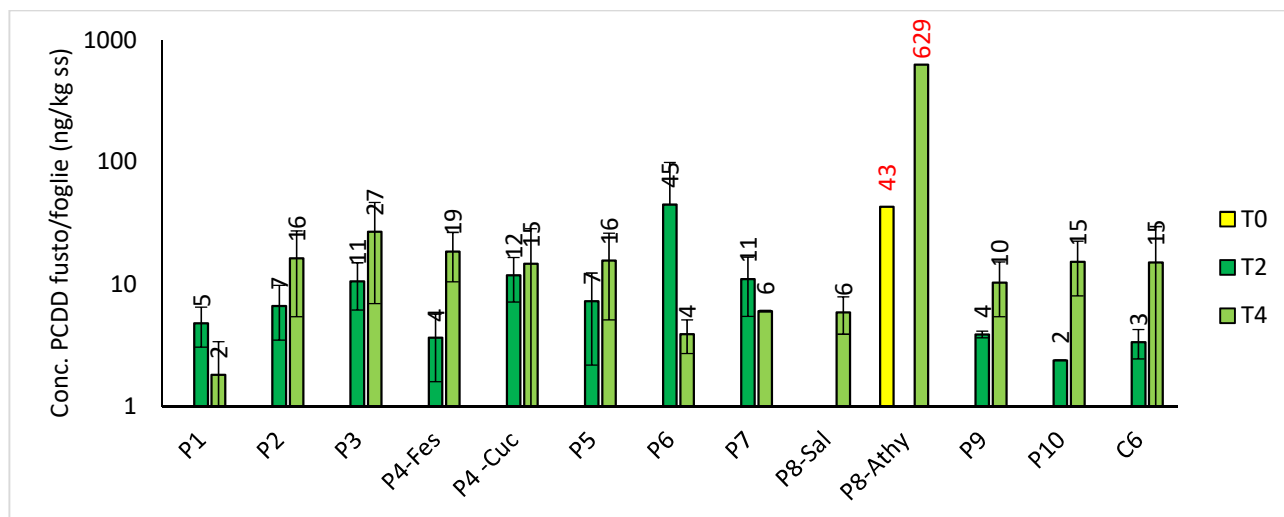


Figura 4.14 – Concentrazioni di PCDD (somma) nel fusto/foglie delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4). Il valore in colore rosso si riferisce alla singola replica disponibile

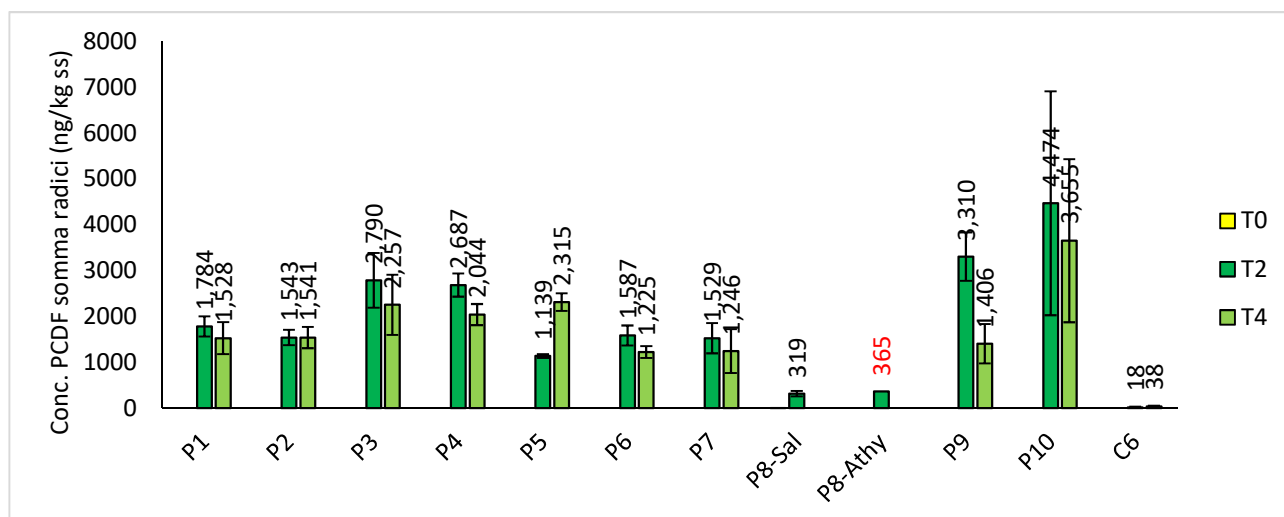


Figura 4.15 – Concentrazioni di PCDF (somma) nelle radici delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4). Il valore in colore rosso si riferisce alla singola replica disponibile

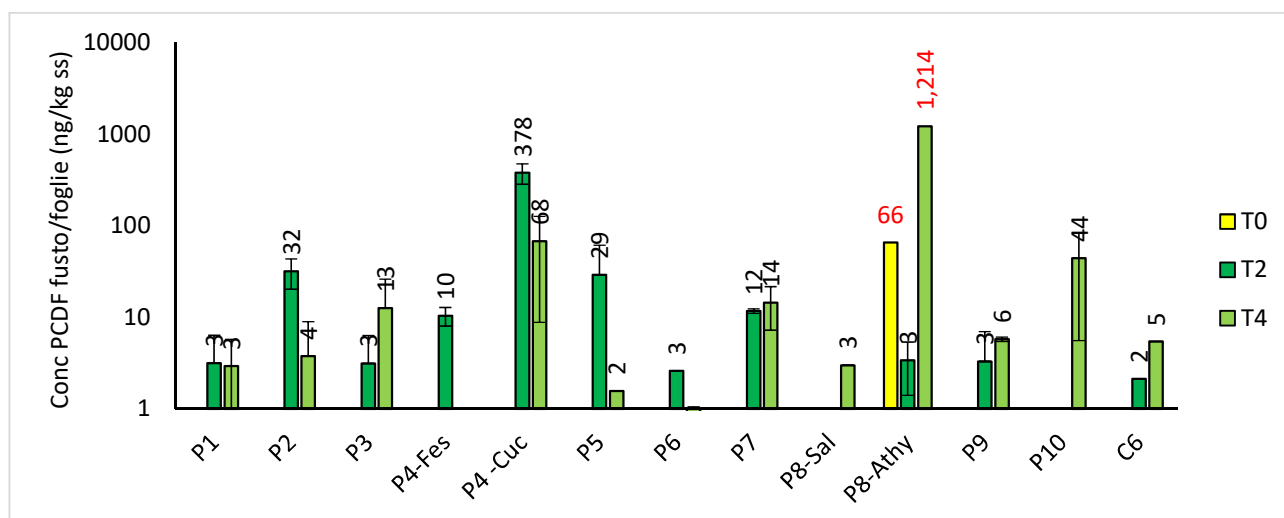


Figura 4.16 – Concentrazioni di PCB nel fusto/foglie delle specie dei trattamenti (P) e del controllo C6 ai vari tempi dell'esperimento (T0, T2, T4). I valori in colore rosso si riferiscono alla singola replica disponibile

4.2.1.3 Riduzione delle concentrazioni tra controlli e trattamenti

Per ogni trattamento e per ogni famiglia di molecole (PCB, PCDD, PCDF) sono state calcolate le percentuali di riduzione delle concentrazioni nei trattamenti rispetto ai controlli nel seguente modo:

1. Le concentrazioni dei controlli al t0 (C_{t0}) (Maggio 2015) sono state confrontate con quelle dei trattamenti al t4 (P_{t4}) (Ottobre/Novembre 2016) calcolando una % di riduzione secondo la seguente formula:

$$\% \text{ riduzione} = ((P_{t4} - C_{t0}) / C_{t0}) * 100 \quad \text{Eq.1}$$

2. E' stato applicato un test statistico (T-student, due code, uguale varianza) per verificare la significatività statistica della riduzione delle concentrazioni considerando un livello di significatività (α) pari allo 0.05 e 0.1.
3. Per le tesi NORM, RED, TIO il confronto è stato fatto con le 12 repliche dei controlli C1, C2, C3, C4 al t0 in quanto da considerarsi tutte come "suolo non piantato e non fertilizzato" (l'inizio del ciclo redox e dell'aggiunta di tiosolfato si colloca dopo il campionamento del t0), mentre per le tesi PAN e COM il confronto è stato fatto con i rispettivi controlli C5 (suolo non piantato, non fertilizzato con aggiunta di compost) e C7 (suolo non piantato, non fertilizzato con aggiunta di panetto) (Tabella 4.2).

Tabella 4.2 – Controlli e trattamenti utilizzati per l'analisi statistica

Controlli -t0	Trattamenti-t4
C1 - No Plant No Fer	P1-PhaNORM, P2-PhaRED, P3-FesNORM, P4-Fes+Cuc, P5-FesRED P7-Med, P9-BrasNORM, P10-BrasTIO
C2- No Plant No Fer	
C3- No Plant No Fer	
C4- No Plant No Fer	
C5- No Plant No Fer COM	P6- FesCOM
C6- No Plant No Fer CLEAN	
C7- No Plant No Fer PAN	P8- Sal + Athy

Le tabelle 4.3 - 4.5 riassumono i risultati ottenuti per PCB, PCDD, PCDF. Le percentuali sono da intendersi negative ovvero indicazione di riduzione di concentrazione nel suolo dei vasi alla fine della sperimentazione (T4) rispetto al suolo iniziale (T0). Il simbolo "+" indica che invece di una riduzione, si è verificato un aumento delle concentrazioni.

Per quanto riguarda i PCB diversi trattamenti sono stati in grado di ridurre le concentrazioni di tri, tetra, penta PCB; solo alcuni (P2 e P3) sono stati efficienti nei confronti di mono e di PCB, mentre solo P4 ha mostrato degli effetti significativi per esa e epta-PCB. Per due trattamenti (P4 e P7) è stata osservata una riduzione statisticamente significativa di circa il 20% dei PCB somma. Nessun trattamento è stato in grado di ridurre le concentrazioni di octa, nona e deca PCB. Occorre precisare che sebbene per alcune famiglie di PCB non sia stata osservata una riduzione di concentrazione

statisticamente significativa tra controlli al t0 e trattamenti al t4, all'interno di ciascuna famiglia ci sono congeneri per cui la riduzione è risultata essere significativa (Tabella 4.6). I pochi valori significativi di riduzione rilevati per i congeneri più biodegradabili aventi bassa clorurazione (mono-, di-, PCB), si spiegano ipotizzando che i microrganismi degradatori delle molecole alto-clorurate possano avere avuto nei 18 mesi dell'esperimento un effetto di parziale dechlorurazione, piuttosto che di completa mineralizzazione, con la comparsa di congeneri basso-clorurati.

Tabella 4.3- Percentuale di riduzione di concentrazione di PCB

Riduzione % concentrazione PCB: C-T0 vs P-T4											
	Mono	Di	Tri	Tetra	Penta	Esa	Epta	Octa	Nona	Deca	Somma
% in suolo	0.5	4	6	10	21	22	14	5	1	12	100
P1_PhaNORM	ns (8%)	ns (16%)	s (18%)	s (17%)	s (17%)	ns (7%)	ns (+5%)	ns (+3%)	ns (4%)	ns (5%)	ns (13%)
P2_PhaRED	ns (9%)	s (22%)	s (21%)	s (21%)	s (16%)	ns (8%)	ns (0.1%)	ns (3%)	ns (7%)	ns (6%)	ns (15%)
P3_FesNORM	s (23%)	s (19%)	ns (6%)	s (19%)	s (17%)	ns (8%)	ns (8%)	ns (2%)	ns (8%)	ns (2%)	ns (15%)
P4_Fes+Cuc	ns (15%)	ns (12%)	s (19%)	s (22%)	s (25%)	s (24%)	s (19%)	ns (9%)	ns (7%)	ns (+5%)	s (22%)
P5_FesRED	ns (14%)	ns (11%)	ns (14%)	s (20%)	s (20%)	ns (9%)	ns (4%)	ns (4%)	ns (4%)	ns (6%)	ns (16%)
P6_FesCOM	ns (8%)	ns (1%)	s (18%)	s (15%)	ns (13%)	ns (12%)	ns (15%)	ns (1%)	ns (5%)	ns (3%)	ns (11%)
P7_Med	ns (7%)	ns (11%)	s (19%)	s (27%)	s (25%)	ns (11%)	ns (4%)	ns (7%)	ns (+0.4%)	ns (6%)	s (19%)
P8_SalAthy	ns (+14%)	ns (+6%)	ns (13%)	ns (7%)	ns (5%)	ns (1%)	ns (2%)	ns (+7%)	ns (3%)	ns (1%)	ns (3%)
P9_BraNORM	ns (+2%)	ns (6%)	s (21%)	s (17%)	ns (9%)	ns (1%)	ns (+1%)	ns (4%)	ns (1%)	ns (1%)	ns (11%)
P10_BraTIO	ns (+2%)	ns (11%)	ns (11%)	s (18%)	s (12%)	ns (0.1%)	ns (+5%)	ns (1%)	ns (+5%)	ns (0.2%)	ns (10%)

NOTE: in verde riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.05

in bianco riduzione % tra C-t0 e P-t4 non significative

Per quanto riguarda PCDD e PCDF (Tabelle 4.4 – 4.5) sono due i trattamenti che hanno mostrato di ridurre in modo statisticamente significativo la concentrazione di un buon numero di congeneri, ovvero P3 e P4 le quali mostrano riduzioni tra circa il 10% e 20% a seconda del congenere (Tabella 4.8).

Tabella 4.4- Percentuale di riduzione di concentrazione dei PCDD

Riduzione % concentrazione PCDD: C-T0 vs P-T4							
	2378-TCDD	12378-PCDD	123478-HxCDD	123678-HxCDD	123789-HxCDD	1234678-HpCDD	OCDD
I-TEF	1	0.5	0.1	0.1	0.1	0.01	0.001
WHO98-TEF	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.0001
WHO05-TEF	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.0003
% in suolo	0.1	0.5	0.4	1	1	5	92
P1_PhaNORM	ns (7%)	ns (8%)	ns (11%)	ns (3%)	ns (8%)	s (9%)	ns (5%)
P2_PhaRED	ns (2%)	ns (+2%)	ns (11%)	ns (2%)	ns (+2%)	ns (7%)	ns (11%)
P3_FesNORM	s (24%)	s (16%)	s (21%)	s (17%)	s (12%)	s (15%)	ns (18%)
P4_Fes+Cuc	s (14%)	ns (5%)	s (21%)	ns (1%)	ns (+2%)	ns (6%)	ns (17%)
P5_FesRED	ns (12%)	ns (2%)	ns (9%)	s (15%)	ns (4%)	s (11%)	ns (15%)
P6_FesCOM	ns (12%)	ns (4%)	s (22%)	ns (12%)	ns (4%)	ns (15%)	ns (+0.5%)
P7_Med	ns (+1%)	ns (+3%)	ns (6%)	ns (7%)	ns (4%)	ns (8%)	ns (19%)
P8_SalAthy	ns (+8%)	ns (+10%)	ns (+10%)	ns (+6%)	ns (5%)	s (6%)	ns (3%)
P9_BraNORM	ns (2%)	ns (3%)	ns (3%)	ns (5%)	ns (+4%)	ns (9%)	ns (15%)
P10_BraTIO	ns (+2%)	ns (8%)	ns (8%)	ns (7%)	ns (4%)	ns (3%)	ns (+12%)

NOTE: in verde riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.05

in bianco riduzione % tra C-t0 e P-t4 non significative

Tabella 4.5- Percentuale di riduzione di concentrazione dei PCDF

	Riduzione % concentrazione PCDF: C.T0 vs P.T4									
	2378-TCDF	12378-PCDF	23478-PCDF	123478-HxCDF	123678-HxCDF	234678-HxCDF	123789-HxCDF	1234678-HpCDF	1234789-HpCDF	OCDF
ITEF	0,1	0,05	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,01	0,001
WHO98-TEF	0,1	0,05	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,01	0,0001
WHO05-TEF	0,1	0,03	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,01	0,0003
% in suolo	17	9	6	14	3	2	4	8	4	33
P1_PhaNORM	s (15%)	s (12%)	ns (10%)	s (11%)	s (11%)	ns (10%)	s (9%)	ns (7%)	ns (6%)	ns (10%)
P2_PhaRED	ns (8%)	ns (7%)	ns (8%)	ns (4%)	ns (2%)	ns (4%)	ns (5%)	ns (4%)	ns (4%)	ns (5%)
P3_FesNORM	ns (11%)	s (19%)	s (16%)	s (15%)	s (16%)	s (15%)	s (14%)	s (12%)	s (13%)	s (23%)
P4_Fes+Cuc	ns (0%)	s (12%)	ns (12%)	s (11%)	s (10%)	s (10%)	s (10%)	ns (7%)	ns (7%)	ns (6%)
P5_FesRED	ns (7%)	s (11%)	ns (11%)	ns (9%)	ns (8%)	ns (8%)	ns (9%)	ns (8%)	ns (8%)	ns (9%)
P6_FesCOM	ns (+6%)	ns (+0,1%)	ns (+0,3%)	ns (4%)	ns (5%)	ns (4%)	ns (5%)	s (6%)	s (7%)	ns (2%)
P7_Med	ns (9%)	ns (6%)	ns (7%)	ns (4%)	ns (7%)	ns (4%)	ns (5%)	ns (4%)	ns (3%)	ns (+0,4%)
P8_SaiAlth	ns (0,3%)	ns (+1%)	ns (+4%)	ns (5%)	ns (4%)	ns (3%)	ns (9%)	ns (4%)	ns (8%)	ns (3%)
P9_BraNORM	ns (7%)	ns (4%)	ns (2%)	ns (5%)	ns (6%)	ns (3%)	ns (+2%)	ns (5%)	ns (1%)	ns (6%)
P10_BraTIO	ns (8%)	ns (5%)	ns (6%)	ns (4%)	ns (2%)	ns (3%)	ns (3%)	ns (3%)	ns (0,1%)	ns (+4%)

NOTE: in verde riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.05

in bianco riduzione % tra C-t0 e P-t4 non significative

Si rimanda al capitolo 10 per l'utilizzo di queste percentuali di riduzione della concentrazione nel calcolo delle *rhizoremediation* half-lives.

Tabella 4.6- Percentuali di riduzione della concentrazione e *rhizoremediation* half-lives per i singoli congeneri di PCB (mono-penta)

Congener	N in iso	n° specie efficient	P1_PuNHOM			P2_PuReD			P3_FeNHOM			P4_FesCuc			P5_FesRED			P6_FesCOM			P7_Med			P8_Saithy			P9_BaNHOM			P10_BaIO			C2-NoPlantNoF			C2-NoPlantSfer				
			delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value	delta%	HL (ann)	p-value					
PCB 1 (MonoCB)	0.37	1	-0.34	20.71	0.42	-13.02	7.38	0.281	-0.41	9.89	0.098	-11.84	5.38	0.148	1.70	-60.27	0.921	-10.08	9.07	0.58	-10.30	9.79	0.891	28.00	-8.34	0.201	1.00	-75.74	0.907	-10.28	84.88	0.93	-14.83	8.04	0.119	-7.98	12.87	0.83		
PCB 2 (MonoCB)	0.39	1	-0.27	20.17	0.44	-12.07	21.74	0.273	-0.38	4.88	0.934	-11.84	5.48	0.148	-12.22	9.26	0.296	-9.20	24.82	0.92	-11.38	88.92	0.892	7.80	-13.08	0.187	4.97	-21.63	0.548	7.28	-13.72	0.48	-14.84	8.48	0.281	-8.88	12.87	0.83		
MonoCB - Somma	0.48	1	-1.60	13.28	0.435	-14.58	10.53*	0.260	-12.84	1.41	0.740	-13.58	5.48	0.155	-1.58	38.85	0.771	-7.42	13.24	0.42	-1.31	15.38	0.92	13.85	-10.38	0.142	2.84	-17.38	0.781	3.32	-10.71	0.88	-12.88	8.07	0.134	-8.25	12.20	0.439		
PCB 4 (DiCB)	0.30	0	-0.37	3.32	0.240	-14.58	3.92	0.247	-0.42	2.34	0.984	-10.47	4.84	0.278	-32.76	3.87	0.237	-0.87	38.98	0.67	-22.28	9.87	0.940	10.18	-10.88	0.384	0.008	6.07	0.708	12.33	3.36	0.20	-12.88	4.04	0.284	-28.48	8.88	0.27		
PCB 6 (DiCB)	0.10	0	-1.05	4.35	0.101	-17.45	4.48	0.211	-12.30	4.18	0.121	-13.39	7.38	0.208	-13.31	8.75	0.418	0.38	-13.24	0.34	-13.56	7.82	0.367	10.30	-8.88	0.304	1.33	10.54	0.304	-18.39	10.64	0.51	-7.81	13.45	0.888	-33.41	8.37	0.271		
PCB 8 (DiCB)	0.32	0	-0.30	3.88	0.330	-12.58	3.58	0.289	-17.61	3.85	0.280	-11.30	8.40	0.201	-10.31	20.73	0.868	2.81	-18.83	0.78	-11.82	8.00	0.915	17.68	-8.88	0.310	-10.09	9.87	0.858	10.28	0.58	-10.38	39.27	0.718	-11.31	8.50	0.285			
PCB 10 (DiCB)	0.05	0	-0.27	4.32	0.288	-14.57	3.72	0.241	-18.34	3.47	0.205	-10.79	5.55	0.247	-11.89	8.30	0.561	1.00	-10.58	0.88	-11.62	8.50	0.917	20.32	-8.88	0.302	1.11	20.76	0.585	-14.89	6.82	0.47	-10.09	3.82	0.295	-10.43	8.43	0.259		
PCB 18 (DiCB)	2.38	4	-1.64	6.71	0.300	-12.58	3.58	0.289	-17.61	3.85	0.280	-11.30	8.40	0.201	-10.31	20.73	0.868	-1.78	-18.83	0.78	-12.87	0.828	1.40	-73.48	0.302	-10.38	10.28	0.58	-10.38	39.27	0.718	-11.31	8.50	0.285						
DiCB - Somma	2.79	2	-1.04	5.98	0.120	-13.02	4.22	0.287	-19.89	4.88	0.201	-11.32	8.27	0.231	-18.02	8.48	0.242	-0.82	-14.18	0.91	-10.48	9.80	0.392	6.31	-17.42	0.480	16.71	0.682	-10.98	0.2671	-7.29	13.87	0.462	-14.02	6.96	0.618				
PCB 18 (TriCB)	0.06	0	-0.12	4.45	0.478	-19.10	4.00	0.254	-18.45	5.78	0.568	-10.88	5.09	0.326	-10.88	5.09	0.531	-14.02	8.85	0.98	-14.83	5.73	0.407	-17.30	12.76	0.574	-10.55	5.91	0.407	-15.75	4.78	0.51	-11.63	5.98	0.697	-12.91	12.51	0.742		
PCB 28 (TriCB)	0.03	0	-0.44	4.75	0.256	-30.72	4.60	0.229	-18.40	4.80	0.385	-10.30	4.68	0.344	-10.48	4.88	0.342	-13.28	5.24	0.07	-27.08	5.20	0.397	-13.24	5.79	0.338	-10.44	1.54	0.234	-12.40	3.34	0.32	-12.97	5.90	0.403	-30.25	8.48	0.480		
PCB 29 (TriCB)	0.03	0	-0.45	5.41	0.301	-31.88	5.32	0.299	-19.77	5.34	0.371	-11.68	5.39	0.360	-10.44	5.35	0.644	-11.18	4.80	0.92	-14.70	5.20	0.467	-10.40	4.36	0.488	12.48	-8.93	-10.54	0.94	0.77	-15.64	5.80	0.923	-30.00	7.95	0.452			
PCB 22 (TriCB)	0.34	7	-1.31	7.97	0.220	-25.88	3.84	0.281	-26.00	3.90	0.287	-18.88	4.18	0.232	-13.10	4.38	0.276	-10.94	4.72	0.01	-23.01	4.01	0.384	-10.58	6.21	0.008	-26.79	3.85	0.022	-14.88	6.83	0.17	-11.00	7.64	0.584	-18.32	10.28	0.820		
PCB 28 (TriCB)	2.85	5	-1.88	3.97	0.220	-27.96	4.22	0.263	-31.38	4.73	0.800	-19.88	4.80	0.266	-13.50	7.12	0.138	-10.20	4.58	0.01	-18.76	5.05	0.344	-10.48	6.72	0.191	-10.00	4.11	0.030	-10.30	10.08	0.25	-8.87	12.64	0.363	-48.76	18.85	0.825		
PCB 33 (TriCB)	2.42	2	-1.02	4.48	0.288	-28.88	3.88	0.292	-19.78	3.72	0.289	-18.34	4.88	0.298	-16.87	5.48	0.242	-16.85	4.72	0.01	-26.95	3.80	0.393	-10.58	6.21	0.008	-26.79	3.85	0.022	-14.88	6.83	0.17	-11.00	7.64	0.584	-18.32	10.28	0.820		
PCB 33 (TriCB)	0.34	0	-0.46	5.92	0.812	-13.02	4.22	0.287	-19.89	4.88	0.201	-11.32	8.27	0.231	-18.02	8.48	0.242	-0.82	-14.18	0.91	-10.48	9.80	0.392	6.31	-17.42	0.480	16.71	0.682	-10.98	0.2671	-7.29	13.87	0.462	-14.02	6.96	0.618				
PCB 37 (TriCB)	0.03	0	-1.27	62.67*	0.798	-14.97	15.98	0.401	-8.30	26.18	0.026	-17.15	14.18	0.360	-1.97	107.78	0.802	-1.30	10.99	0.18	3.98	-28.88	0.907	4.41	-14.38	0.387	3.28	-10.02	0.489	0.51	-21.08	0.51	-10.46	38.91	0.888	1.84	-75.48	8.838		
TriCB - Somma	5.86	9	-1.81	11.38	0.294	-29.94	4.47	0.280	-16.72	5.42	0.824	-19.88	5.10	0.267	-13.50	7.12	0.137	-10.20	4.58	0.01	-18.76	5.05	0.344	-10.48	6.72	0.191	-10.00	4.11	0.030	-10.30	10.08	0.25	-8.87	12.64	0.363	-48.76	18.85	0.825		
PCB 42 (TetraCB)	0.05	8	-1.17	8.42	0.234	-12.82	8.02	0.287	-19.87	2.44	0.706	-10.88	2.85	0.611	-11.78	3.87	0.608	-10.70	4.70	0.02	-10.48	3.13	0.011	-18.94	11.02	0.447	-11.47	4.34	0.075	-12.76	3.50	0.13	-18.18	2.88	0.182	-10.85	3.16	0.117		
PCB 44 (TetraCB)	0.08	7	-0.54	39.29	0.888	-14.88	9.88	0.183	-16.38	2.81	0.910	-10.88	4.78	0.494	-12.35	3.84	0.608	-10.88	3.90	0.08	-10.48	3.00	0.011	-10.58	6.21	0.008	-26.79	3.85	0.022	-14.88	6.83	0.17	-11.00	7.64	0.584	-18.32	10.28	0.820		
PCB 45 (TetraCB)	0.31	8	-1.31	8.88	0.130	-13.78	7.98	0.303	-18.78	2.72	0.981	-11.38	4.48	0.313	-11.38	3.84	0.610	-12.78	3.35	0.01	-23.01	3.72	0.892	-18.18	11.15	0.399	-18.98	5.34	0.041	-10.88	8.09	0.08	-11.78	2.88	0.178	-10.85	4.38	0.181		
PCB 46 (TetraCB)	0.46	9	-1.31	8.88	0.130	-13.78	7.98	0.303	-18.78	2.72	0.981	-11.38	4.48	0.313	-11.38	3.84	0.610	-12.78	3.35	0.01	-23.01	3.72	0.892	-18.18	11.15	0.399	-18.98	5.34	0.041	-10.88	8.09	0.08	-11.78	2.88	0.178	-10.85	4.38	0.181		
PCB 52 (TetraCB)	2.45	9	-1.27	8.42	0.234	-12.82	8.02	0.287	-19.87	2.44	0.706	-10.88	2.85	0.611	-11.78	3.87	0.608	-10.70	4.70	0.02	-10.48	3.13	0.011	-18.94	11.02	0.447	-11.47	4.34	0.075	-12.76	3.50	0.13	-18.18	2.88	0.182	-10.85	3.16	0.117		
PCB 54 (TetraCB)	0.30	0	-1.05	7.48	0.387	-18.45	34.98	0.981	-13.02	6.48	0.488	-10.82	5.18	0.394	-13.71	0.717	PCB 57	0.019	-10.88	5.88	0.808	-11.30	7.48	0.981	4.48	-12.30	0.690	0.30	-18.92	0.88	-11.88	8.87	0.584	-10.38	3.92	0.689				
PCB 50 (TetraCB)	0.80	8	-1.17	7.97	0.220	-25.88	4.36	0.281	-26.00	3.90	0.287	-18.88	4.18	0.232	-13.10	4.38	0.276	-10.94	4.72	0.01	-23.01	4.01	0.384	-10.58	6.21	0.008	-26.79	3.85	0.022	-14.88	6.83	0.17	-11.00	7.64	0.584	-18.32	10.28	0.820		
PCB 56 (TetraCB)	2.88	8	-1.05	6.00	0.308	-18.78	3.87	0.309	-18.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100	-10.88	8.48	0.100		
PCB 58 (TetraCB)	2.38	3	-1.04	0.00	0.00	-11.28	-19.77	3.87	0.009	-12.82	8.02	0.287	-19.87	2.44	0.706	-10.88	2.85	0.611	-11.78	3.87	0.608	-10.70	4.70	0.02	-10.48	3.13	0.011	-18.94	11.02	0.447	-11.47	4.34	0.075	-12.76	3.50	0.13	-18.18	2.88	0.182	
PCB 74 (TetraCB)	1.18	8	-1.82	7.96	0.128	-18.40	3.27	0.510	-19.74	6.80	0.208	-10.44	5.88	0.468	-10.48	4.78	0.154	-18.48	1.14	0.04	-18.76	5.12	0.348	-10.88	2.85	0.611	-11.78	3.87	0.608	-10.70	4.70	0.02	-10.48	3.13	0.011	-18.94	11.02	0.447		
PCB 77 (TetraCB)	0.07	4	-1.24	0.04	0.288	-19.17	2.88	0.321	-18.78	3.17	0.088	-11.58	10.94	0.218	-15.88	8.10	0.069	-18.38	18.38	0.22	-15.00	8.10	0.069	6.10	0.068	2.38	-18.75	0.878	-14.48	13.50	0.388	-12.12	7.99	0.11	-18.48	29.84	0.697	-18.38	8.37	0.076
PCB 84 (TetraCB)	0.30	1	-1.88	10.21	0.607	-13.78	5.12	0.133	-18.88	4.48	0.847	-10.88	2.85	0.161	-13.83	6.22	0.198	-16.76	5.72	0.18	-14.48	15.78	0.113	5.88	-11.47	0.385	3.51	-10.12	0.702	-11.88	8.38	0.23	11.58	-15.88	0.309	-10.38	3.92	0.689		
TetraCB - Somma	10.88	8	-1.07	8.88	0.240	-18.40	3.27	0.510	-19.74	6.80	0.208	-10.44	5.88	0.468	-10.48	4.78	0.154	-18.48	1.14	0.04	-18.76	5.12	0.348	-10.88	2.85	0.611	-11.78	3.87	0.608	-10.70	4.70	0.02	-10.48	3.13	0.011	-18.94	11.02	0.447		
PC 54 (PentaCB)	0.41	9	-1.08	4.96	0.219	-17.88	5.50	0.280	-18.00	2.85	0.800	-14.18	1.98	0.990	-14.88	3.87	0.990	-15.30	3.57	0.08	-18.97	2.19	0.990	-12.84	3.88	0.141	-12.55	8.17	0.002	-12.13	4.42	0.01								

Tabella 4.7- Percentuali di riduzione della concentrazione e *rhizoremediation* half-lives per i singoli congeneri di PCB (esa-deca)

Congener	N in suolo	n° specie efficienti	P1_PhysORM			P2_RhizRED			P3_RhizORM			P4_FasCuc			P5_FasRED			P6_FasCOM			P7_Med			P8_SalAlky			P9_BioORM			P10_BioIO			C2-NoPlantioFer			C2-NoPlantioTer		
			delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value	delta %	HL (anni)	p-value			
PCB 123/EsacB	0.75	4	-12.82	7.86	0.000	-15.37	7.02	0.072	-4.78	21.48	0.205	-30.47	4.88	0.000	-6.85	26.17	0.029	-12.18	59.18	0.99	-12.98	7.82	0.081	1.96	-67.82	0.789	-1.43	213.30	0.941	-5.94	28.08	0.44	8.88	-18.28	0.018	-10.49	241.81	0.949
PCB 123/EsacB	0.10	3	1.03	-39.07	0.006	-0.02	473.22	0.998	-38.29	5.21	0.033	-27.15	5.21	0.033	-16.37	0.831	-1.86	-15.03	0.482	1.88	-87.38	0.887	10.33	-10.66	0.180	18.69	-7.21	0.07	1.70	-38.88	0.887	8.81	-11.58	0.137				
PCB 137/EsacB	0.54	2	-4.91	20.84	0.541	-5.00	25.02	0.541	-12.99	0.97	0.065	-23.66	5.89	0.001	-8.09	12.44	0.548	-13.99	0.07	0.54	-13.00	12.50	0.554	5.35	-92.78	0.707	2.08	-50.09	0.788	5.17	-20.53	0.81	-5.83	26.17	0.856	-1.53	67.90	0.828
PCB 137/EsacB	4.81	1	-8.71	17.85	0.476	-6.40	15.65	0.406	-11.33	17.48	0.426	-28.20	3.98	0.009	-10.23	9.88	0.232	-1.86	14.52	0.90	-7.38	13.78	0.399	1.80	-88.78	0.886	0.07	-1890.18	0.994	0.98	-108.07	0.90	-1.29	47.36	0.816	3.48	-25.02	0.437
PCB 141/EsacB	1.52	4	-6.00	12.59	0.317	-8.20	10.85	0.226	-15.81	5.71	0.033	-28.58	2.96	0.001	-11.78	9.38	0.148	-18.77	4.77	0.64	-14.08	6.92	0.083	-5.18	50.78	0.697	-1.78	57.43	0.821	-1.14	48.42	0.75	-4.70	21.81	0.588	-1.02	54.12	0.670
PCB 145/EsacB	0.88	1	-1.20	24.49	0.628	-3.78	27.83	0.660	-12.98	7.81	0.121	-28.11	4.00	0.010	-7.18	14.15	0.413	-14.87	5.79	0.10	-8.96	14.49	0.461	-0.48	213.00	0.982	4.49	-13.82	0.603	4.13	-24.93	0.63	-3.47	28.09	0.885	-0.07	223.41	0.952
PCB 148/EsacB	4.21	1	-8.89	9.98	0.502	-6.94	22.84	0.654	-14.37	0.67	0.129	-21.92	3.29	0.011	-18.55	12.04	0.370	-1.84	17.14	0.37	-10.00	12.55	0.423	5.90	-10.95	0.708	-0.54	194.55	0.985	3.96	-37.17	0.78	0.64	-164.42	0.951	1.38	-83.80	0.892
PCB 151/EsacB	2.86	2	-1.02	28.18	0.666	0.18	-84.00	0.986	-16.16	5.79	0.079	-24.94	3.99	0.011	-12.83	8.34	0.195	-7.88	18.11	0.48	-1.11	16.95	0.524	1.99	-61.28	0.882	1.88	-72.87	0.886	8.18	-12.52	0.49	-14.43	28.09	0.886	-1.78	35.09	0.848
PCB 151/EsacB	7.30	3	-0.59	18.89	0.534	-0.78	11.41	0.506	-10.71	148.35	0.975	-18.29	5.84	0.011	-18.52	11.50	0.377	-18.48	5.44	0.00	-18.07	5.78	0.073	-18.33	14.34	0.476	-1.47	39.78	0.702	-1.72	58.02	0.75	1.13	-81.57	0.871	6.82	-13.58	0.434
PCB 155/EsacB	0.97	3	-8.99	12.88	0.247	-1.97	40.02	0.115	-18.39	8.73	0.037	-32.08	8.88	0.008	-12.90	7.88	0.094	-10.15	16.81	0.19	-12.78	7.29	0.087	-1.18	48.94	0.659	-1.90	18.29	0.926	-1.18	7.82	0.907	8.17	-18.18	0.816	-8.09	11.84	0.239
PCB 157/EsacB	0.15	3	-12.51	8.79	0.029	-1.68	13.14	0.185	-14.47	8.72	0.033	-12.40	7.87	0.033	-11.71	8.45	0.066	1.70	27.14	0.94	-3.88	10.10	0.093	1.08	-77.40	0.742	-1.63	89.17	0.797	-4.70	14.67	0.24	1.99	-38.40	0.751	-1.32	11.38	0.153
PCB 158/EsacB	0.17	2	-1.29	40.61	0.729	1.14	-85.24	0.964	-11.25	9.48	0.069	-22.49	5.82	0.001	-9.44	18.77	0.518	-8.77	15.43	0.30	-10.75	37.30	0.71	5.54	-19.47	0.429	4.13	-13.84	0.577	3.31	-13.18	0.28	-4.00	23.58	0.620	1.10	-66.28	0.888
PCB 167/EsacB	0.28	4	-12.92	7.34	0.047	-12.02	8.20	0.083	-12.80	4.78	0.009	-30.78	9.90	0.019	-14.04	5.91	0.039	-1.26	12.18	0.10	-1.88	12.88	0.490	8.64	-19.58	0.460	-17.85	12.77	0.222	-8.07	12.47	0.19	0.10	-1081.28	0.987	-8.90	10.40	0.124
PCB 169/EsacB	0.00	5	-12.44	4.13	0.087	-10.02	2.84	0.034	-11.56	8.47	0.358	-17.07	14.31	0.815	-12.37	1.15	0.048	-10.49	2.88	0.34	-18.23	16.34	0.680	12.71	-6.78	0.331	-136.49	3.54	0.085	-17.19	2.19	0.01	3.34	-10.99	0.795	0.68	-152.87	0.942
BtaCB-Somma	21.87	1	-6.89	34.57	0.432	-6.71	18.12	0.427	-1.29	13.21	0.301	-28.49	5.82	0.010	-12.22	10.88	0.281	-11.39	8.88	0.18	-11.32	8.90	0.303	-1.18	91.88	0.888	-1.23	78.69	0.888	-0.34	781.90	0.99	-0.90	188.34	0.979	2.26	-40.28	0.744
PCB 170/EsacB	2.02	3	0.83	-123.49	0.915	2.00	-52.91	0.857	-11.43	8.89	0.087	-19.34	4.88	0.018	-8.84	14.80	0.417	-15.61	3.42	0.00	-4.52	23.75	0.693	-1.44	10.02	0.610	-4.85	12.51	0.548	0.08	-1238.30	0.99	-8.25	16.27	0.466	-1.40	41.87	0.713
PCB 171/EsacB	0.30	2	1.10	-23.89	0.394	8.88	-131.88	0.762	-12.87	7.08	0.028	-28.78	4.98	0.007	-6.85	18.88	0.441	-16.81	8.87	0.14	-10.98	106.46	0.913	-0.91	161.82	0.914	8.78	-18.78	0.688	8.77	-18.78	0.688	-0.28	128.82	0.882	-2.36	48.88	0.718
PCB 177/EsacB	1.01	2	6.58	-23.44	0.396	8.23	-10.38	0.377	-11.10	1.87	0.028	-21.14	4.42	0.010	-8.88	28.00	0.687	-13.43	7.27	0.12	-10.02	170.18	0.967	0.78	-164.89	0.898	11.18	-8.81	0.178	7.67	-14.58	0.61	-18.35	16.01	0.412	-1.42	71.80	0.847
PCB 180/EsacB	8.97	1	2.88	-37.86	0.782	-13.23	11.89	0.734	-1.90	28.84	0.664	-120.85	4.88	0.007	-8.88	28.80	0.709	-13.82	8.10	0.18	-18.40	10.18	0.818	-16.47	11.88	0.279	-18.88	28.71	0.680	1.20	-88.18	0.69	-0.88	122.89	0.817	0.42	-17.05	0.828
PCB 181/EsacB	0.78	2	6.63	-14.38	0.469	-10.24	48.11	0.978	-17.87	0.20	0.078	-18.31	5.15	0.029	-2.05	10.68	0.836	-14.13	8.89	0.01	-2.70	18.11	0.768	8.21	-13.13	0.382	8.21	-17.32	0.478	9.98	-11.05	0.28	-7.46	13.84	0.467	-1.60	15.15	0.430
PCB 187/EsacB	0.34	1	1.13	-8.87	0.250	1.86	-87.58	0.818	-17.08	14.17	0.428	-29.58	2.98	0.007	-2.88	16.15	0.774	-1.86	11.67	0.11	8.02	-39.50	0.760	8.78	-12.48	0.311	8.98	-11.48	0.308	10.75	-10.18	0.28	-2.88	34.68	0.766	-1.23	64.88	0.838
PCB 189/EsacB	0.08	3	-8.80	10.40	0.222	-12.38	7.82	0.060	-17.00	8.83	0.017	-32.60	3.37	0.019	-15.13	9.24	0.011	-1.88	96.11	0.88	-12.29	7.37	0.061	-7.29	13.82	0.217	-14.11	8.90	0.050	-1.79	13.87	0.00	5.17	-10.69	0.642	-14.38	8.88	0.064
PCB 191/EsacB	0.08	2	-0.55	197.18	0.986	2.38	-48.15	0.785	-17.00	8.21	0.064	-17.88	5.90	0.016	-15.89	15.89	0.513	-18.13	8.88	0.00	-1.97	52.81	0.617	-8.92	15.35	0.560	-11.75	38.18	0.818	5.88	-18.87	0.43	-8.88	17.50	0.907	-1.88	10.68	0.78
PCB 193/EsacB	0.30	2	7.90	-13.86	0.416	8.85	-11.16	0.367	-10.45	8.33	0.173	-28.28	8.33	0.082	1.22	-36.70	0.897	-17.07	12.81	0.11	4.42	-14.24	0.718	-0.05	227.13	0.999	11.70	-1.88	0.426	18.29	-7.29	0.10	-2.11	18.17	0.823	-0.80	211.13	0.948
gprCB-Somma	13.48	1	4.78	-12.48	0.808	-10.10	1063.02	0.961	-1.78	11.18	0.318	-28.87	0.02	0.004	-8.80	28.88	0.871	-13.25	8.88	0.07	-4.42	23.21	0.688	-1.18	91.88	0.798	1.54	-19.05	0.878	4.54	-23.63	0.58	-5.17	12.56	0.713	-1.18	102.18	0.898
PCB 194/EsacB	1.61	2	2.18	-44.69	0.783	-5.90	10.37	0.272	-1.88	33.40	0.748	-7.11	18.75	0.190	-8.88	14.70	0.281	1.86	-18.89	0.34	-3.24	12.16	0.181	4.41	-14.26	0.172	-1.79	26.47	0.808	-1.04	100.34	0.87	10.81	-10.22	0.114	0.00	-14.83	0.788
PCB 196-205/DecaCB	1.13	0	4.04	-19.50	0.613	2.34	-47.36	0.729	-0.80	138.23	0.998	-7.11	14.75	0.198	-3.07	31.68	0.638	1.96	-18.09	0.38	-1.23	44.48	0.717	12.34	-9.02	0.301	-1.07	81.34	0.788	3.19	-44.47	0.78	7.87	-14.19	0.315	2.06	-51.35	0.936
PCB 198/EsacB	0.13	1	2.58	-11.07	0.168	-5.71	17.86	0.580	-1.90	28.54	0.610	-18.83	7.06	0.064	-8.90	17.25	0.570	5.13	-19.15	0.77	-1.86	10.01	0.165	5.88	-18.88	0.548	-18.59	38.71	0.888	-1.88	11.86	0.81	1.12	-46.51	0			

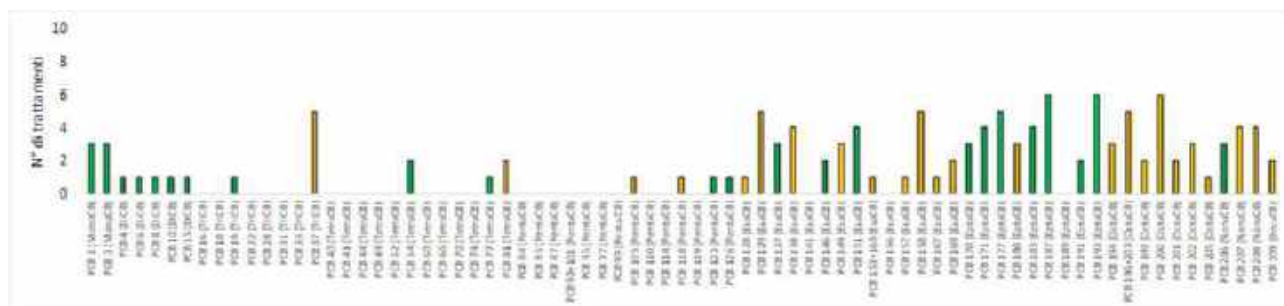


Figura 4.17 – Numero di trattamenti per i quali si vede un aumento di concentrazione (non significativa) per alcuni congeneri di PCB

La figura 4.17 mostra il numero di trattamenti per i quali si vede un aumento di concentrazione (non significativa) per alcuni congeneri di PCB confrontando i controlli al t0 e i trattamenti al t4. In arancione sono riportati quei congeneri che aumentano anche nel controllo fertilizzato e/o nel controllo non fertilizzato. Si ricorda che come spiegato per la riduzione delle concentrazioni, la non significatività del risultato potrebbe essere dovuto alla breve durata dell'esperimento.

Come si può notare, i congeneri per i quali la concentrazione aumenta appartengono principalmente alle famiglie penta, esa, epta, octa, nona e deca, minore è invece la quantità di mono, di tri, tetra. Inoltre, vi sono 24 congeneri (PCB 1, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 19, 54, 66, 70, 74, 77, 114, 123, 126, 137, 146, 151, 183, 187, 191, 193, 206) la cui concentrazione aumenta solo nei trattamenti e non nei controlli, indice che le piante potrebbero aver stimolato la degradazione di congeneri più clorurati con un processo di parziale dechlorurazione che ha portato all'aumento di molecole con un numero minore di clori. Alcuni di questi congeneri (es. PCB 1, 3, 4, 15, 70, 74, 77, 126, 137, 146, 191) sono stati visti essere degli intermedi nel pathway di dechlorurazione dei PCB in suolo e sedimenti (Demirtepe et al., 2015; Fagervold et al., 2007; Liang et al., 2015; Meggo et al., 2013)

4.2.1.3 Riduzione delle concentrazioni tra controlli e trattamenti

Per ogni trattamento e per ogni famiglia di molecole (PCB, PCDD, PCDF) sono state calcolate anche le percentuali di riduzione delle concentrazioni nei trattamenti rispetto ai controlli al t4 analogamente a quanto fatto per il confronto con i controlli al t0. In questo caso per le tesi NORM il confronto è stato fatto con il controllo C2 (fertilizzato) mentre per le altre tesi con i rispettivi controlli (Tabella 4.9).

Tabella 4.9 – Controlli e trattamenti utilizzati per l'analisi statistica

Controlli -t4	Trattamenti-t4
C1 - No Plant No Fer	
C2 - No Plant Si Fer	P1-PhaNORM, P3-FesNORM, P4-Fes+Cuc, P7-Med, P9-BrasNORM,
C3 - No Plant Si Fer RED	P2-PhaRED, P5-FesRED
C4 - No Plant Si Fer TIO	P10-BrasTIO
C5 - No Plant Si Fer COM	P6- FesCOM
C6 - No Plant Si Fer CLEAN	
C7 - No Plant SI Fer PAN	P8- Sal + Athy

Questo tipo di confronto permette di andare a scorporare il contributo della *natural attenuation* da quello della *rhizoremediation* rispetto alla riduzione delle concentrazioni. Infatti, mentre il confronto tra controlli al t0 e trattamenti al t4 permette di comprendere il contributo complessivo di *natural attenuation* e *rhizoremediation*, quello tra controlli al t4 e trattamenti al t4 permette di evidenziare il contributo della sola *rhizoremediation*. Quanto è detto è mostrato in Figura 4.18 per i penta-PCB e trattamento P4 a titolo esemplificativo. Occorre precisare che dovendo tenere in considerazione della significatività statistica delle differenze di concentrazione, può succedere che sebbene si noti una riduzione statisticamente significativa tra controlli al t0 e trattamenti al t4, non vi sia una differenza significativa tra controlli al t4 e trattamenti al t4, indicando apparentemente che le piante/condizioni del suolo utilizzate non hanno avuto alcun effetto aggiuntivo rispetto alla *natural attenuation* nel promuovere la riduzione delle concentrazioni. Tuttavia, se dal confronto tra controlli al t0 e al t4 emerge che non vi è una differenza statisticamente significativa si può affermare che il trattamento utilizzato ha avuto un effetto sulla riduzione delle concentrazioni. Per questo motivo che si è deciso di calcolare le *rhizoremediation half-lives* considerando il confronto tra controlli al t0 e trattamenti al t4.

Infatti se si considerano i PCB, solo per i tetra PCB si nota una differenza significativa (p , 0.041) tra controllo al t0 e al t4 (fertilizzato) (Tabella 4.6) mentre per tutte le altre famiglie non vi è una differenza statisticamente significativa, indicando che la sola *natural attenuation* non è sufficiente per indurre una riduzione delle concentrazioni nei 18 mesi di durata dell'esperimento; la riduzione delle concentrazioni è invece significativa se si confrontano i controlli al t0 e trattamenti al t4 (per alcune famiglie e alcuni trattamenti con spiegato precedentemente); inoltre per alcuni trattamenti e in particolar modo per P4 si ottengono dei risultati significativi (Tabella 4.10) anche dal confronto tra controllo al t4 e trattamento al t4 per 4 famiglie di PCB e PCB somma evidenziando l'effetto del trattamento.

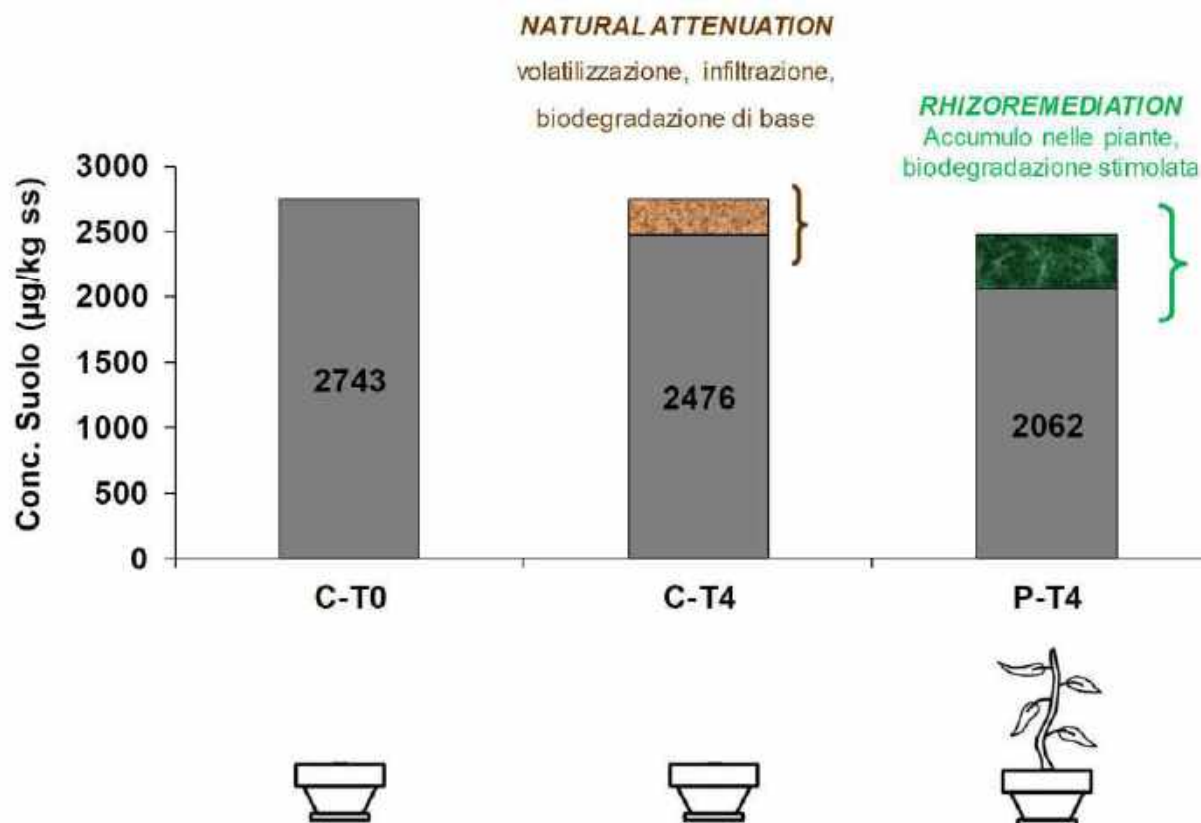


Figura 4.18- Contributo della *natural attenuation* e *rhizoremediation* alla riduzione delle concentrazioni dei penta-PCB nel suolo considerando il trattamento P4 (*Festuca arundinacea* + *Cucurbita pepo ssp pepo*)

Tabella 4.10- Percentuale di riduzione di concentrazione di PCB

Riduzione % concentrazione PCB: CT4 vs PT4											
	Mono	Di	Tri	Tetra	Penta	Esa	Epta	Octa	Nona	Deca	Somma
% in suolo	0.5	4	6	10	21	22	14	5	1	12	100
P1_PhaNORM	ns (+1%)	ns (2%)	ns (14%)	ns (+0.5%)	ns (8%)	ns (9%)	ns (+6%)	ns (+3%)	ns (+4%)	ns (7%)	ns (5%)
P2_PhaRED	ns (+1%)	ns (12%)	s (12%)	ns (12%)	ns (10%)	ns (1%)	ns (+7%)	ns (+2%)	ns (4%)	ns (8%)	ns (5%)
P3_FesNORM	ns (16%)	ns (6%)	ns (2%)	ns (2%)	ns (9%)	ns (10%)	ns (7%)	ns (2%)	s (8%)	ns (4%)	ns (7%)
P4_Fes+Cuc	ns (7%)	ns (+2%)	ns (15%)	ns (6%)	s (17%)	s (26%)	s (18%)	ns (9%)	s (7%)	ns (+2%)	s (14%)
P5_FesRED	ns (+7%)	ns (5%)	ns (3%)	s (11%)	s (15%)	ns (3%)	ns (+3%)	ns (+2%)	ns (+0.1%)	ns (8%)	ns (6%)
P6_FesCOM	ns (5%)	ns (+5%)	ns (+0.6%)	ns (12%)	ns (11%)	ns (18%)	ns (14%)	ns (10%)	ns (15%)	s (6%)	ns (11%)
P7_Med	ns (+2%)	ns (+4%)	ns (15%)	ns (11%)	s (17%)	ns (13%)	ns (3%)	ns (7%)	ns (+0.4%)	ns (8%)	ns (11%)
P8_SalAthy	ns (5%)	ns (+5%)	ns (13%)	ns (+1%)	ns (+0.5%)	ns (4%)	ns (2%)	ns (4%)	ns (1%)	ns (4%)	ns (2%)
P9_BraNORM	ns (+12%)	ns (+9%)	ns (17%)	ns (+0.4%)	s (+0.6%)	ns (1%)	ns (+5%)	ns (10%)	ns (1%)	ns (6%)	ns (3%)
P10_BraTIO	ns (+26%)	ns (6%)	ns (7%)	s (16%)	s (11%)	ns (4%)	ns (+5%)	ns (3%)	ns (1%)	ns (8%)	s (6%)

NOTE: in verde riduzione % tra C-t4 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione riduzione % tra C-t4 e P-t4 significativa allo 0.05

in bianco riduzione % tra C-t4 e P-t4 non significative

Un discorso analogo può essere fatto anche per PCDD e PCDF; infatti solo per 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD si nota una differenza significativa (p, 0.096, 0.084, 0.094, 0.017 rispettivamente) tra controllo al t0 e al t4 (fertilizzato) (Tabella 4.8) mentre per tutti gli altri congeneri non vi è una differenza statisticamente significativa. In questo caso solo per il trattamento P3 e un congenere (OCDF) si ottengono dei risultati significativi (Tabella

4.11-4.12) anche dal confronto tra controllo al t4 e trattamento al t4 evidenziando l'effetto del trattamento.

Tabella 4.11- Percentuale di riduzione di concentrazione di PCDD

Riduzione % concentrazione PCDD: CT4 vs PT4							
	2378TCDD	12378PCDD	123478HxCDD	123678HxCDD	123789HxCDD	1234678HpCDD	OCDD
ITEF	1	0.5	0.1	0.1	0.1	0.01	0.001
WHO98TEF	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.0001
WHO05TEF	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.0003
% in suolo	0.1	0.5	0.4	1	1	5	92
P1_PhaNORM	ns (+8%)	ns (5%)	ns (8%)	ns (+11%)	ns (+6%)	ns (+5%)	ns (+20%)
P2_PhaRED	ns (+11%)	ns (0.1%)	ns (2%)	ns (+6%)	ns (+4%)	ns (5%)	ns (19%)
P3_FesNORM	ns (11%)	ns (13%)	ns (18%)	ns (5%)	ns (+1%)	ns (1%)	ns (+3%)
P4_Fes+Cuc	ns (0.3%)	ns (1%)	ns (19%)	ns (+12%)	ns (+17%)	ns (+9%)	ns (+4%)
P5_FesRED	ns (1%)	ns (4%)	ns (+1%)	ns (7%)	ns (2%)	ns (9%)	ns (23%)
P6_FesCOM	ns (+6%)	ns (14%)	ns (13%)	ns (6%)	ns (+1%)	ns (6%)	ns (+49%)
P7_Med	ns (+18%)	ns (+6%)	ns (4%)	ns (+6%)	ns (+10%)	ns (+7%)	ns (+2%)
P8_SalAthy	ns (+18%)	ns (+3%)	ns (+14%)	ns (+14%)	ns (+17%)	ns (+6%)	ns (+2%)
P9_BraNORM	ns (+13%)	ns (+2%)	ns (0.1%)	ns (+8%)	ns (+19%)	ns (+6%)	ns (+7%)
P10_BraTIO	ns (+13%)	ns (0%)	ns (+3%)	ns (2%)	ns (+17%)	ns (+4%)	ns (+21%)

NOTE: in verde riduzione % tra C-t4 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione riduzione % tra C-t4 e P-t4 significativa allo 0.05

in bianco riduzione % tra C-t4 e P-t4 non significative

Tabella 4.12- Percentuale di riduzione di concentrazione di PCDF

Riduzione % concentrazione PCDF: C-T4 vs P-T4										
	2378-TCDF	12378-PCDF	23478-PCDF	123478-HxCDF	123678-HxCDF	234678-HxCDF	123789-HxCDF	1234678-HpCDF	1234789-HpCDF	OCDF
ITEF	0.1	0.05	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.001
WHO98-TEF	0.1	0.05	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.0001
WHO05-TEF	0.1	0.03	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.0003
% in suolo	17	9	6	14	3	2	4	8	4	33
P1_PhaNORM	ns (4%)	ns (5%)	ns (+0.3%)	ns (9%)	ns (9%)	ns (4%)	ns (14%)	ns (3%)	ns (20%)	ns (6%)
P2_PhaRED	ns (8%)	ns (12%)	ns (12%)	ns (2%)	ns (1%)	ns (2%)	ns (4%)	ns (+4%)	ns (5%)	ns (+10%)
P3_FesNORM	ns (0.3%)	ns (11%)	ns (6%)	ns (13%)	ns (14%)	ns (10%)	ns (19%)	ns (8%)	ns (26%)	ns (20%)
P4_Fes+Cuc	ns (+2%)	ns (4%)	ns (2%)	ns (9%)	ns (7%)	ns (5%)	ns (14%)	ns (3%)	ns (21%)	ns (3%)
P5_FesRED	ns (7%)	ns (16%)	ns (19%)	ns (6%)	ns (6%)	ns (6%)	ns (8%)	ns (+0.2%)	ns (9%)	ns (+5%)
P6_FesCOM	ns (+8%)	ns (+3%)	ns (+2%)	ns (0.4%)	ns (0.1%)	ns (2%)	ns (0.03%)	ns (4%)	ns (10%)	ns (+6%)
P7_Med	ns (+2%)	ns (+3%)	ns (+4%)	ns (3%)	ns (5%)	ns (+2%)	ns (10%)	ns (+0.3%)	ns (17%)	ns (+4%)
P8_SalAthy	ns (+12%)	ns (+8%)	ns (+11%)	ns (8%)	ns (6%)	ns (2%)	ns (21%)	ns (0.2%)	ns (26%)	ns (+14%)
P9_BraNORM	ns (+5%)	ns (+5%)	ns (+10%)	ns (3%)	ns (4%)	ns (+3%)	ns (3%)	ns (1%)	ns (16%)	ns (3%)
P10_BraTIO	ns (19%)	ns (14%)	ns (27%)	ns (8%)	ns (7%)	ns (13%)	ns (9%)	ns (1%)	ns (+6%)	ns (+12%)

NOTE: in verde riduzione % tra C-t4 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione riduzione % tra C-t4 e P-t4 significativa allo 0.05

in bianco riduzione % tra C-t4 e P-t4 non significative

4.2.2 Risultati delle analisi microbiologiche

Il suolo circostante le radici di 3 vasi identici per, rispettivamente, ciascuna tesi piantumata e ciascun controllo non piantato alle fasi T0, T1, T2, T4 sono stati analizzati mediante metodi molecolari. Tutti i campioni sono stati analizzati per a) profilazione delle comunità batteriche, b) attività microbica di idrolisi della sostanza organica. All'inizio ed alla fine della sperimentazione (T0 e T4) sono stati valutati su tutti i campioni anche c) profilazione delle comunità fungine, d) quantificazione della popolazione batterica totale, e) quantificazione dei batteri potenziali degradatori dei PCB. L'obiettivo di tale caratterizzazione è quello di stabilire quali specie vegetali abbiano influito

maggiormente sui microrganismi del suolo inducendo la più significativa modificazione qualitativa e quantitativa nell'abbondanza relativa delle diverse popolazioni presenti, attivando maggiormente il metabolismo dei microrganismi e aumentando significativamente il numero di potenziali degradatori.

4.2.2.1 Influenza della piantumazione sulla struttura delle comunità microbiche nel suolo circostante le radici

L'analisi dei *fingerprint* delle comunità batteriche durante i 18 mesi di sperimentazione dimostra che la composizione dei consorzi batterici è cambiata in tutte le condizioni sperimentali adottate. La permanenza del suolo in serra, invasato e con regime irriguo, indipendentemente dalla piantumazione o dal trattamento del suolo, ha di per sé influito sui microrganismi del suolo, mutandone la composizione in specie in funzione del tempo di permanenza in queste condizioni (Figura 4.19 A). L'analisi statistica PERMANOVA ha dimostrato che tali differenze sono statisticamente significative. Valutando le differenze specifiche tra ciascuna tesi piantumata ed il rispettivo controllo non piantato alla fine della sperimentazione, risulta tuttavia che diverse piante hanno influito sui batteri del suolo, differenziando la composizione delle popolazioni se confrontate con il suolo dei vasi non piantumati (Figura 4.19 B).

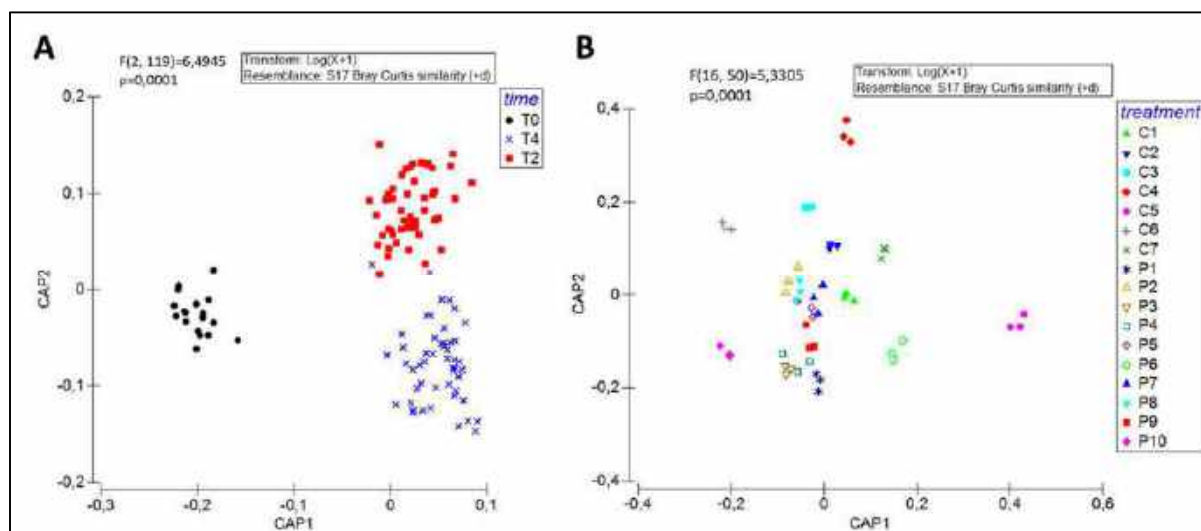


Figura 4.19. Distribuzione dei campioni di suolo ottenuta mediante analisi statistica (Constrained analysis of principal coordinates, CAP) del *fingerprint* delle comunità batteriche. Ogni punto del tracciato rappresenta un campione, e la distanza tra i punti è proporzionale alla diversità delle comunità batteriche. **A.** Distribuzione di tutti i campioni secondo il tempo di campionamento T0, T2, T4, dove emerge che i campioni di suolo pre-sperimentazione (T0, punti neri) ospitano una simile comunità batterica che cambia nella composizione in specie con il tempo (T2, quadrati rossi; T4, croci blu). **B.** Distribuzione dei campioni raccolti alla fine dell'esperimento (T4) secondo il trattamento applicato, dove emerge che il suolo circostante le radici di diverse piante (vedi legenda, campioni P) ospita una comunità batterica diversa rispetto al suolo nei vasi controllo non piantumati (vedi legenda, campioni C).

Confronti paralleli tra i trattamenti ed i relativi controlli a sei mesi dall'inizio dell'esperimento (T2), hanno mostrato che la maggior parte dei trattamenti piantumati ospita una diversa comunità batterica rispetto ai rispettivi controlli non piantati, ad eccezione dei trattamenti P2 (*Phalaris arundinacea* con ciclo redox), P3 (*Festuca arundinacea*), P5 (*Festuca arundinacea* con ciclo redox) e P10 (*Brassica juncea* con tiosolfato di ammonio). Alla fine dell'esperimento (T4) solo i trattamenti P2 (*Phalaris arundinacea* con ciclo redox) e P8 (*Salix caprea* e *Athyrium filix-foemina*) non sono risultati in grado di modificare significativamente la comunità batterica rispetto ai loro controlli, mentre tutte le altre condizioni del suolo hanno mostrato un effetto significativo.

La profilazione della comunità fungina è stata effettuata nei tempi di campionamento iniziale e finale, rispettivamente T0 e T4. I risultati ottenuti evidenziano, analogamente a quanto riscontrato sulla frazione batterica, un effetto del tempo di permanenza in serra in condizioni di regime irriguo su tutti i vasi, piantati e non, nell'indurre una modificazione della composizione della componente fungina (Figura 4.10). Tuttavia, al contrario di quanto osservato per la frazione batterica, nessun effetto statisticamente significativo è stato osservato al termine della sperimentazione (T4) quando sono state confrontate singolarmente le tesi piantumate con i loro rispettivi controlli non piantati (Figura 4.20).

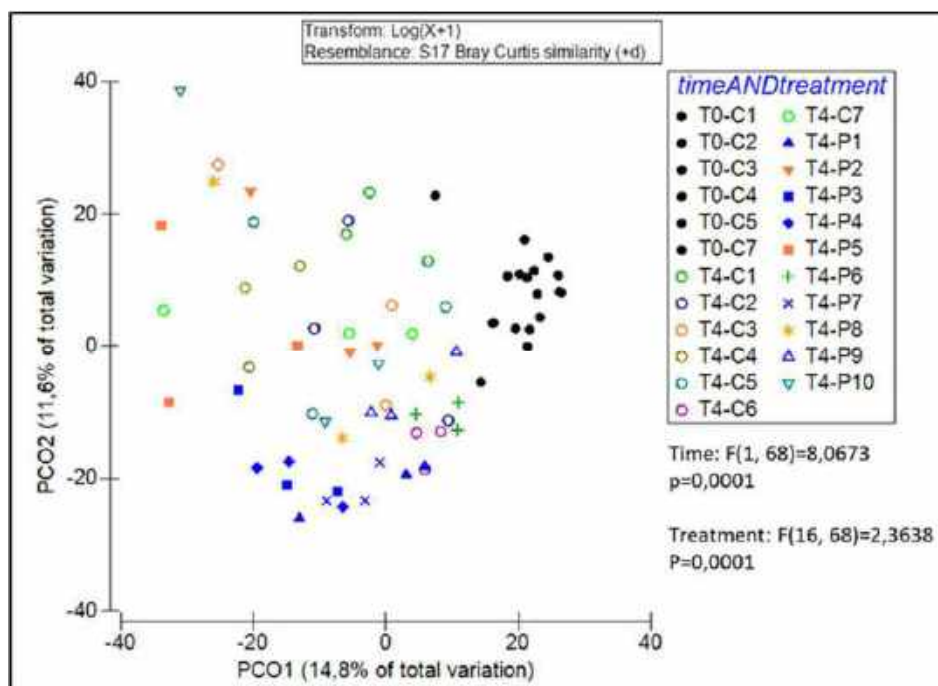


Figura 4.20 - Analisi statistica (Principal coordinate analysis, PCoA) del *fingerprint* delle comunità fungine. Ogni punto del tracciato rappresenta un campione, e la distanza tra i punti è proporzionale alla diversità delle comunità fungine. Dalla figura emerge che i campioni di suolo pre-sperimentazione (punti neri) ospitano comunità fungine abbastanza simili, con diversa composizione in specie rispetto al suolo circostante le radici alla fine della sperimentazione (vedi legenda, campioni T4). Confrontando le comunità fungine del suolo circostante le radici (vedi legenda, campioni P), non si notano differenze significative con i rispettivi controlli (vedi legenda, campioni C).

I risultati ottenuti dimostrano che la presenza delle piante e le diverse condizioni applicate al suolo (ciclo redox, fertilizzazione minerale, aggiunta di compost o tiosolfato di ammonio) hanno influito

sulla modificazione della composizione delle comunità batteriche alla fine dell'esperimento di *rhizoremediation* (T4), mentre non hanno avuto un effetto statisticamente significativo sulle comunità fungine.

4.2.2.2 Effetto dei diversi trattamenti nella biostimolazione della comunità microbica totale e di potenziali degradatori

La valutazione della biostimolazione nel suolo circostante le radici è stata condotta mediante misurazione dell'attività idrolitica nei campioni di suolo ai tempi di campionamento T0, T1, T2 e T4. Dopo tre mesi dalla semina iniziale (T1) solo il trattamento *Phalaris arundinacea* in condizioni di ciclo redox (P2) ha dimostrato una attività microbica nel suolo circostante le radici significativamente superiore rispetto al suolo nei vasi controllo sottoposto a ciclo redox ma non piantumato. Dopo sei mesi dall'inizio dell'esperimento (T2) due trattamenti hanno mostrato attività idrolitica maggiore rispetto al loro controllo, *Festuca arundinacea* associata a ciclo redox (P5) e *Brassica juncea* (P9). Al termine dell'esperimento dopo 18 mesi dalla semina iniziale (T4), tutte le specie vegetali hanno dimostrato la capacità di aumentare significativamente, rispetto al loro controllo non piantumato, l'attività idrolitica della comunità microbica nel suolo. I risultati mostrano che tutte le specie vegetali saggiate sono in grado, in un opportuno tempo di presenza nel suolo, di biostimolare la vitalità dei microrganismi presenti. È stata pertanto confermata la validità dell'approccio di *rhizoremediation* per la stimolazione della microflora. In particolare, si differenziano le tesi P6, P7 e P9 in quanto hanno indotto il più significativo aumento dell'attività microbica nel suolo circostante le radici (Figura 4.21).

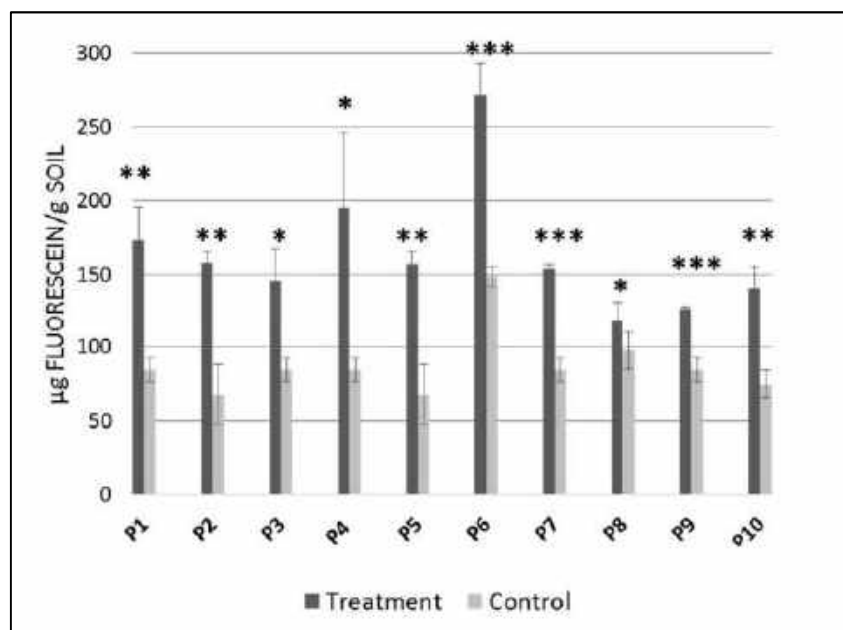


Figura 4.21. Risultati del test di attività idrolitica effettuato sui campioni di suolo prelevati alla fine dell'esperimento (T4). Gli istogrammi riportano la quantità di fluoresceina (μg per g di suolo) misurata per ciascun trattamento piantato e per il rispettivo controllo non piantato. Nel grafico sono riportati i livelli di significatività statistica della differenza: $*$ = $p<0.05$, $**$ = $p<0.01$, $***$ = $p<0.001$.

La stimolazione delle comunità batteriche da parte delle specie vegetali è stata confermata dai risultati della quantificazione batterica. L'analisi statistica ha infatti dimostrato come al termine dell'esperimento il numero di copie per grammo di suolo del gene batterico considerato fosse significativamente maggiore nella maggior parte dei suoli piantati rispetto ai controlli, indicando un aumento della popolazione batterica totale indotta dalla presenza delle piante (Figura 4.22). Solo le tesi P8 (*Salix caprea* + *Athyrium filix-foemina*) e P10 (*Brassica juncea*) non hanno aumentato significativamente la concentrazione batterica nel suolo circostante le radici.

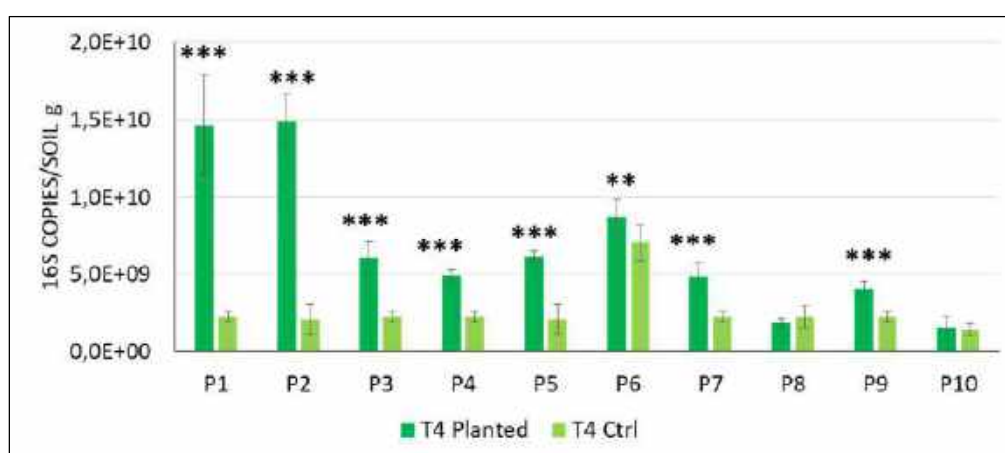


Figura 4.22. Quantificazione dei batteri nel suolo (calcolata come numero di copie del gene batterico rRNA 16S per grammo di suolo) per ogni trattamento piantumato (Planted) confrontato con il relativo controllo non piantato (Ctrl) alla fine dell'esperimento di *rhizoremediation* in serra (T4). Nel grafico sono riportati i livelli di significatività statistica della differenza: $*$ = $p<0.05$, $**$ = $p<0.01$, $***$ = $p<0.001$.

Anche la quantificazione delle popolazioni potenzialmente responsabili della degradazione dei PCB al termine della sperimentazione ha dimostrato un aumento del numero di copie del gene marcatore per questa attività nei suoli piantumati rispetto ai controlli non piantati. Differenze statisticamente significative sono state rilevate in tutti i casi ad eccezione delle tesi P8 (*Salix caprea* + *Athyrium filix-foemina*) e P10 (*Brassica juncea*), analogamente al dato di concentrazione batterica. Questo risultato dimostra che la biostimolazione della comunità batterica totale effettuata dalle diverse specie vegetali ha coinvolto anche le popolazioni di batteri potenzialmente degradatori (Figura 4.23). Le tesi P1, P2, P5 e P7 hanno dimostrato i maggiori livelli di significatività.

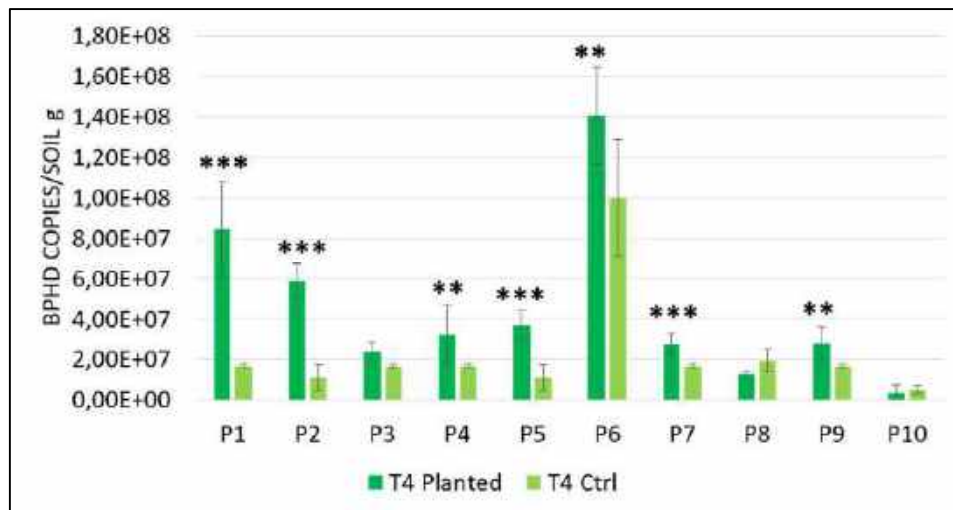


Figura 4.23. Quantificazione dei batteri potenziali degradatori dei PCB (numero di copie del gene *bphA* per grammo di suolo) per ogni trattamento piantumato confrontato con il relativo controllo alla fine dell'esperimento di *rhizoremediation* (T4). Nel grafico sono riportati i livelli di significatività statistica della differenza: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

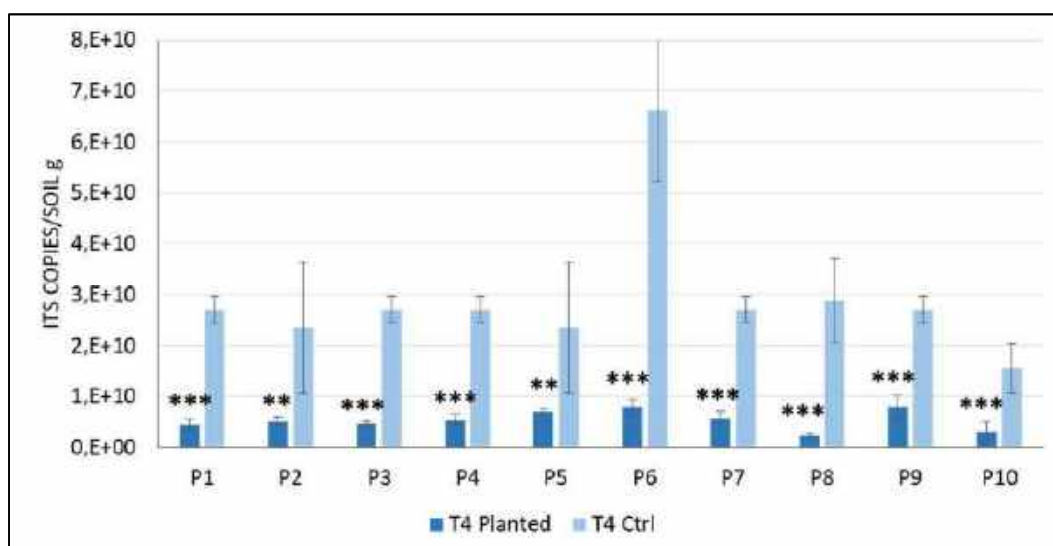


Figura 4.24. Quantificazione fungina totale (numero di copie del gene ITS per grammo di suolo) per ogni trattamento piantumato confrontato con il relativo controllo alla fine dell'esperimento di *rhizoremediation* in serra (T4). Nel grafico sono riportati i livelli di significatività statistica della differenza: *= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$

La quantificazione dei geni fungini nei diversi trattamenti e controlli ha rivelato come, a differenza di quanto avvenuto nel caso dei batteri, non ci sia stata stimolazione da parte delle piante nei confronti della popolazione fungina totale. L'analisi statistica ha dimostrato come ci sia un aumento della popolazione nel corso del tempo della sperimentazione nei suoli controllo, mentre si osserva una forte diminuzione dei funghi al termine dell'esperimento nei suoli piantumati rispetto ai relativi controlli (Figura 4.24). Questo risultato conferma quello ottenuto dalla profilazione della comunità fungina, che non ne rileva un impatto dei trattamenti sulla composizione.

4.3 Conclusioni

Lo studio della rimozione dei contaminanti dal suolo in condizioni controllate di serra ha mostrato che non esista un'unica specie capace di rimuovere in modo significativo tutte le classi dei composti organici. Tuttavia, i trattamenti che mostrano una maggiore efficacia nella *rhizoremediation* dei PCB sono P4 (Festuca + Cucurbita) e P7 (Medica). Per queste specie, tuttavia, la rimozione delle famiglie altoclorurate dei PCB (da octa- a deca-PCB) non appare statisticamente significativa. Ciò è probabilmente da imputare alla brevità dell'esperimento. In altri termini, sarebbe stato necessario un periodo più lungo per potere evidenziare differenze significative rispetto a suolo controllo non piantumato. Per quanto riguarda diossine e furani i trattamenti in cui si ha riduzione significativa sono P3 (Festuca) e P4 (Festuca + Cucurbita). P3 (Festuca) è efficace per quasi tutti i congeneri di furani, mentre P7 (Medica) non mostra particolare efficacia per diossine e furani.

Per quanto riguarda Arsenico e Mercurio, a causa dei problemi sperimentali insorti, felce e senape indiana non mostrano particolare efficacia nella fitoestrazione richiedendo perciò una successiva sperimentazione per la messa a punto delle migliori condizioni.

Lo studio delle comunità microbiche ha evidenziato come tutte le specie vegetali oggetto della sperimentazione abbiano avuto un ruolo nel selezionare specifiche comunità batteriche, mentre non hanno influenzato la struttura delle comunità fungine nel suolo inquinato proveniente dal SIN Caffaro. Inoltre è stato dimostrato come nel corso del tempo la rizostimolazione abbia favorito l'attività idrolitica della microflora del suolo ed indotto un aumento della popolazione batterica totale e dei potenziali degradatori; al contrario, la rizostimolazione non sembra avere favorito le popolazioni fungine, suggerendo il ruolo prominente dei batteri nella parziale rimozione degli inquinanti.

Questi risultati portano a ritenere che la riduzione significativa di PCB, diossine e furani osservata nel suolo circostante le radici possa effettivamente essere attribuita ad un'attivazione microbica indotta da alcune delle specie vegetali sperimentate.

5 Esperimento in campo

Scelta delle specie

Tre delle specie utilizzate nella sperimentazione in serra sono state selezionate per la sperimentazione in campo:

1. *Phalaris arundinacea* (scagliola palustre)
2. *Festuca arundinacea* (festuca falascona)
3. *Brassica juncea* (senape indiana)

Le tre specie sono state selezionate sulla base di i) valutazioni agronomiche legate all'epoca di semina delle varie specie in relazione alla tempistica prevista per l'inizio di questa fase della sperimentazione, e ii) i dati di caratterizzazione microbiologica dei suoli al T2 che hanno visto come le specie *Brassica juncea* e *Festuca arundinacea* fossero le uniche ad avere significativamente indotto un aumento dell'attività della microflora nel suolo circostante le radici rispetto al suolo controllo non piantumato.

5.1 Schema sperimentale

Lo schema sperimentale include 24 parcelle di 10 m² ciascuna nell'area A che rappresentano le 3 specie di piante più un controllo per 6 repliche ciascuno come mostrato in Figura 5.1.

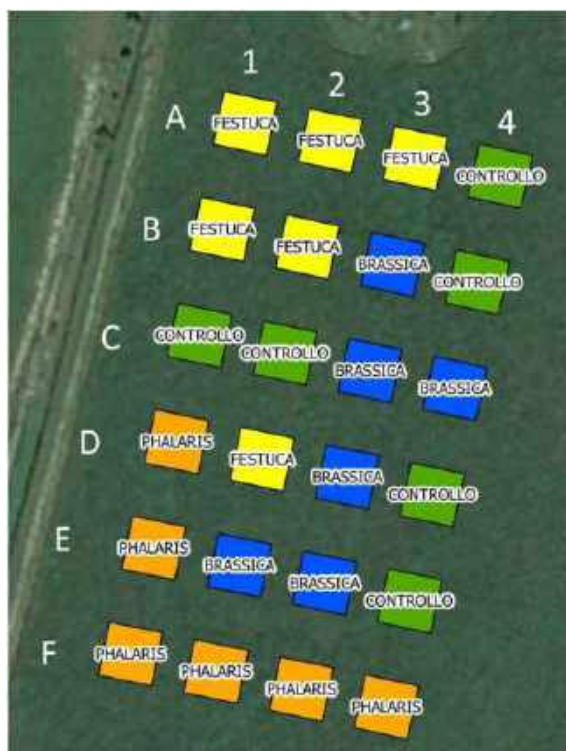


Figura 5.1- Disposizione delle parcelle in campo

La disposizione delle parcelle in campo è stata decisa basandosi su delle analisi geostatistiche di dati ottenuti in una fase precedente la sperimentazione in serra (Fase 3), oltre ad analisi dei suoli effettuate a bassa risoluzione. In tale lavoro sono state analizzate le concentrazioni disponibili per l'area selezionata e tale concentrazioni sono state utilizzate per selezionare 4 gruppi (tre specie più

un controllo) da sei repliche. È stata proposta quindi una disposizione spaziale delle parcelle (Figura 5.2) nell'area selezionata in modo da selezionare le sei repliche con concentrazioni medie più vicine per le diverse classi di molecole organiche e metalli.

	1	2	3	4
A	2	2	2	3
B	2	2	4	3
C	3	3	4	4
D	1	2	4	3
E	1	4	4	3
F	1	1	1	1

Figura 5.2 – Disposizione delle specie o controlli nell'area selezionata.



Figura 5.3- concentrazione di PCB in $\mu\text{g/kg dw}$ nelle parcelle in campo

In data 18 febbraio 2016 le parcelle sono state tracciate in campo e nei giorni successivi (22-24 febbraio 2016) sono stati prelevati i campioni per la determinazione di PCB, PCDD/F, As e Hg

all'inizio della sperimentazione (t_0). In ogni parcella sono stati raccolti 25 subcampioni secondo una maglia regolare a una distanza di 2 m ciascuno per formare un campione composito da analizzare, dopo prelievo tramite Japanese Slab Cake. Sono stati campionati i primi 40 cm di suolo, asportando preventivamente il cotico erboso.

In data 20 aprile 2016 si è proceduto con l'aratura e l'erpatura delle parcelle e il giorno successivo (21 aprile 2016) con la semina. A seconda della specie sono stati effettuati diversi cicli di coltivazione come mostrato in Tabella 5.1.

Tabella 5.1 – Cicli di coltivazione delle varie specie (#, mancato sviluppo; *, in parcelle C4 e E2 crescita ridotta o nulla per problemi alla semina)

		<i>Phalaris arundinacea</i>	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Brassica juncea</i>
Cicli di coltivazione	I	21/4/2016 - OTTOBRE 2016 (#)	21/4/2016 - OTTOBRE 2016 (#)	21/4/2016 - 28/6/2016
	II	12/10/2016 - 2017 (#)	12/10/2016 - PRESENTE	1/9/2016 - APRILE 2017 (#)
	III	19/10/2017 - 2018 (#)		9/9/2017 - 8/8/2017
	IV			20/10/2017-24/5/2018 (*)

Prima di ogni nuova semina le parcelle sono state nuovamente lavorate; le parcelle del controllo hanno seguito lo stesso piano di lavorazioni di quelle parcelle coltivate a festuca. Come si può notare dalla tabella, *Phalaris arundinacea* non si è sviluppata, *Festuca arundinacea* si è sviluppata solo dopo il I ciclo di coltivazione; *Brassica juncea* ha mostrato meno problemi di crescita, ma durante il II e III ciclo di coltivazione ha subito un attacco di larve di *Athalia rosae* che ne ha in parte compromesso la crescita.

La sperimentazione è terminata dopo circa 27 mesi in data 9 Luglio 2018 con il campionamento del suolo al tempo finale t_f con le stesse modalità del t_0 . In data 28/29 Giugno 2016, 8 Agosto 2017 e 24 Maggio 2018 è stata campionata anche la biomassa di *Brassica juncea*. In Tabella 5.2 vengono riassunti i principali interventi effettuati sulle parcelle durante la sperimentazione.

Tabella 5.2 – Interventi effettuati sulle parcelle

Data	Intervento
20/9/2016	distribuito METEOR (DELTAMETRINA) 150 ml in 200 l di H2O in tutte e 24 le parcelle
22/9/2016	distribuito METEOR (DELTAMETRINA) 500 ml e KARATE ZEON (LAMBDA-CIALOTRINA) 300 ml in 250 l di H2O in tutte e 24 le parcelle
11/10/2016	distribuito UREA 800 g/parcella in tutte e 24 le parcelle
29/6/2017	distribuito METEOR (DELTAMETRINA) 500 ml in 200 l di H2O in tutte e 24 le parcelle
11/10/2017	trinciatura di tutte le 24 parcelle (il materiale di risulta lasciato in campo)
21/5/2018	trinciatura delle parcelle festuca/phalaris/controllo (il materiale di risulta lasciato in campo)
30/5/2018	trinciatura delle parcelle brassica (il materiale di risulta lasciato in campo)
6/7/2018	trinciatura di tutte le 24 parcelle (il materiale di risulta lasciato in campo)
24/8/2018	trinciatura di tutte le 24 parcelle (il materiale di risulta lasciato in campo)

5.2 Risultati di rhizoremediation ottenuti nella sperimentazione in campo

Non essendo ancora pervenuti i risultati delle analisi finali, non siamo in grado di esprimere un giudizio su tali risultati.

5.3 Risultati ottenuti dall'analisi delle comunità microbiche (batteriche e fungine) del suolo

I campioni compositi di suolo prelevati prima della piantumazione (T0) ed al termine della sperimentazione (Tf) da ciascuna parcella in 6 repliche sono stati analizzati mediante metodologie molecolari, in particolare a) profilazione della comunità batterica e fungina, b) quantificazione dell'attività idrolitica della comunità microbica del suolo.

L'analisi del *fingerprint* delle comunità batteriche effettuato sui campioni di suolo ha evidenziato un cambiamento nel tempo nella struttura delle comunità in tutte le parcelle, indipendentemente dalla gestione agronomica delle stesse. In particolare, l'analisi statistica mostra come ci sia una differenza significativa tra il primo campionamento del 2016 (T0) e il secondo campionamento del 2018 (Tf, Figura 5.4), dovuta ad un effetto generico delle pratiche agronomiche sui microrganismi del suolo. Mettendo tuttavia a confronto, alla fine dell'esperimento, la composizione della comunità batterica nelle parcelle piantumate con le tre diverse specie vegetali e la parcella controllo non seminata, non emergono differenze significative (Tabella 5.3). Questo risultato indica che le pratiche agronomiche effettuate su tutte le parcelle hanno influito sui microrganismi del suolo, ma non si notano influenze significative da parte delle singole specie vegetali piantate. Le ipotesi che spiegano questo fenomeno, che differisce da quanto osservato nell'esperimento in serra, sono a) la variabilità del suolo e delle condizioni ambientali tra le tre parcelle replicate era troppo elevata ed ha mascherato l'effetto dovuto alla pianta, b) le piante in queste parcelle non hanno avuto un livello di sviluppo ottimale per motivi diversi (vedi sezione schema sperimentale), risultando in un ridotto effetto specifico sui microrganismi del suolo.

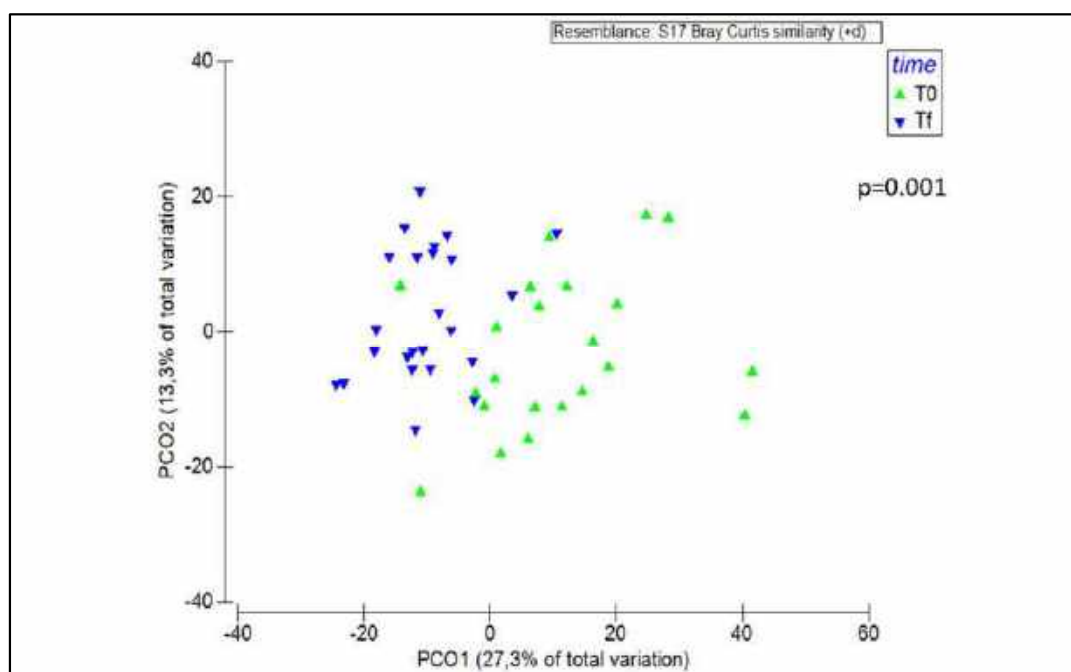


Figura 5.4. Distribuzione dei campioni di suolo ottenuta mediante analisi statistica (principal components analysis, PCOcoordinates) del *fingerprint* delle comunità batteriche. Ogni punto del tracciato rappresenta un campione, e la distanza tra i punti è proporzionale alla diversità delle comunità T0=primo campionamento, T1=secondo campionamento. Dalla figura emerge che il suolo all’inizio della sperimentazione (T0, triangoli verdi) ospita una comunità batterica eterogenea, che risulta comunque differenziata da quella rilevata alla fine della sperimentazione (T1, triangoli blu)

Tabella 5.3 - Analisi statistica comparativa (PERMANOVA) dei risultati del *fingerprint* delle comunità batteriche dei suoli sottoposti a diversi trattamenti al termine della sperimentazione in campo. Non sono state rilevate differenze significative (valori di $p < 0,05$) né tra i suoli piantumati con diverse specie vegetali, né confrontando ogni trattamento piantumato con il suolo controllo non seminato.

Trattamenti	P
<i>Festuca, Phalaris</i>	0,09
<i>Festuca, Brassica</i>	0,297
<i>Festuca</i> , controllo non piantato	0,057
<i>Phalaris, Brassica</i>	0,225
<i>Phalaris</i> , controllo non piantato	0,465
<i>Brassica</i> , controllo non piantato	0,097

Per quanto riguarda l’analisi del *fingerprint* effettuato sulle comunità fungine, anche in questo caso si osserva un’evoluzione delle comunità nel corso del tempo (Figura 5.5), mentre alla fine della sperimentazione emerge una differenza significativa tra i suoli piantati con *Brassica juncea* e il controllo non piantato e tra *Brassica juncea* e le altre due specie vegetali (Tabella 5.4). Tale risultato indica, contrariamente a quanto emerso dalla sperimentazione in serra, che *Brassica juncea* ha stimolato le comunità fungine del suolo modificando le proporzioni relative tra i gruppi presenti.

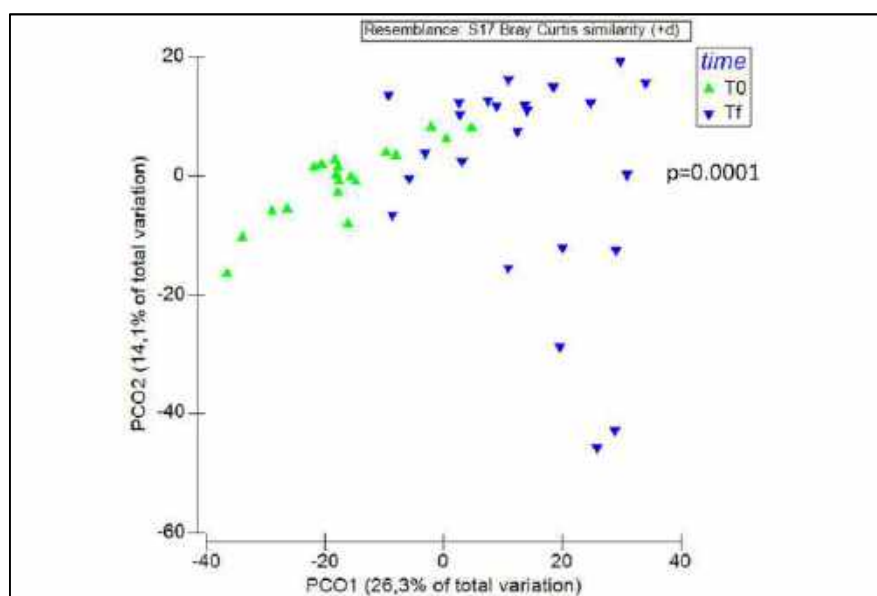


Figura 5.5. Distribuzione dei campioni di suolo ottenuta mediante analisi statistica (principal components analysis, PCOcoordinates) del *fingerprint* delle comunità fungine. Ogni punto del tracciato rappresenta un campione, e la distanza tra i punti è proporzionale alla diversità delle comunità T0=primo campionamento, Tf=secondo campionamento. Dalla figura emerge che il suolo all’inizio della sperimentazione (T0, triangoli verdi) ospita una comunità fungina eterogenea, che risulta comunque differenziata da quella rilevata alla fine della sperimentazione (Tf, triangoli blu)

Tabella 5.4. Analisi statistica comparativa (PERMANOVA) dei risultati del *fingerprint* delle comunità fungine dei suoli sottoposti a diversi trattamenti al termine della sperimentazione in campo. Le differenze significative ($p < 0.05$), relative al suolo piantumato con *Brassica juncea*, sono evidenziate in grassetto.

Trattamenti confrontati	P
<i>Festuca</i> , controllo non piantato	0,1507
<i>Festuca</i> , <i>Brassica</i>	0,003
<i>Festuca</i> , <i>Phalaris</i>	0,0987
controllo non piantato, <i>Brassica</i>	0,0272
controllo non piantato, <i>Phalaris</i>	0,4059
<i>Brassica</i> , <i>Phalaris</i>	0,0098

Su tutti i campioni di suolo ottenuti dall’esperimento in campo è stata misurata l’attività idrolitica a carico della sostanza organica. L’analisi statistica dei risultati ha mostrato come ci sia stato un incremento significativo dell’attività idrolitica tra l’inizio e la fine dell’esperimento in tutti i suoli, sia piantumati che controllo (Figura 5.6). Nessuna delle specie vegetali piantate ha tuttavia determinato alla fine della sperimentazione un incremento significativo dell’attività dei microrganismi del suolo rispetto alle parcelle non seminate.

Questo risultato potrebbe indicare che la biostimolazione microbica sia da attribuire alle pratiche agricole alle quali tutte le parcelle sono state sottoposte, piuttosto che ad una particolare specie vegetale utilizzata. Dato però che in condizioni controllate di serra è stato registrato un significativo effetto biostimolante indotto da queste specie vegetali, tale risultato negativo potrebbe verosimilmente essere dovuto alla elevata variabilità delle condizioni ambientali che ha mascherato

le differenze apportate dalle piante rispetto alle parcelle non seminate, unitamente al fatto che piante spontanee hanno colonizzato in larga misura sia le parcelle controllo non seminate sia quelle seminate, minimizzando pertanto l'effetto specifico della piantumazione.

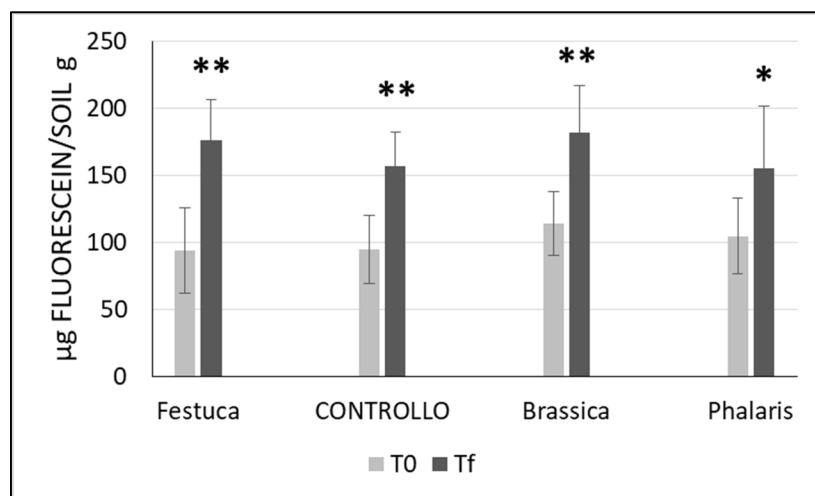


Figura 5.6. Risultati del test di attività idrolitica effettuato sui campioni di suolo prelevati all'inizio (T0) e alla fine dell'esperimento (Tf). Gli istogrammi riportano la quantità di fluoresceina (µg per g di suolo) misurata per ciascun trattamento piantato e per il controllo non piantato. Nel grafico sono riportati i livelli di significatività statistica della differenza: *= $p<0.05$, **= $p<0.01$.

In assenza dei dati di caratterizzazione chimica dei suoli al termine della sperimentazione, non è possibile trarre conclusioni circa il ruolo dei microrganismi nei confronti della biodegradazione degli inquinanti.

5.4 Conclusioni

Entro il 3 dicembre 2018, data di consegna del presente rapporto preliminare al committente ERSAF, non sono pervenuti ai consulenti scientifici i risultati delle analisi chimiche dei suoli delle parcelle delle sperimentazioni in campo (Tf). Non è pertanto possibile trarre conclusioni circa l'effetto delle specie vegetali piantate sulla riduzione dei contaminanti. In assenza dei dati di caratterizzazione chimica dei suoli al termine della sperimentazione, non è altresì possibile trarre conclusioni circa il ruolo dei microrganismi nei confronti della biodegradazione degli inquinanti.

Tutte le parcelle hanno visto in 27 mesi di sperimentazione un aumento dell'attività dei microrganismi del suolo, ed una modificazione della composizione quali-quantitativa della comunità batterica e fungina. Nessuna delle tre specie piantumate alla fine della sperimentazione ha modificato significativamente attività e composizione della microflora del suolo rispetto alla parcella controllo, fatta eccezione per la Brassica solo però nei riguardi della componente fungina. Questo risultato non conferma quanto ottenuto nelle condizioni controllate della sperimentazione in serra e potrebbe essere dovuto a due cause, i) una eccessiva variabilità dei livelli di contaminazione nelle parcelle replicate che ha mascherato le differenze apportate dalle piante rispetto alle parcelle non seminate, ii) la diffusa crescita di piante spontanee sia nelle parcelle controllo non seminate sia in quelle seminate può avere minimizzato l'effetto specifico della piantumazione.

6. Mobilità dei contaminanti

6.1 Biodisponibilità e bioaccessibilità delle sostanze organiche

Il concetto di biodisponibilità è generalmente usato per valutare l'esposizione degli organismi degli ecosistemi terrestri e acquatici (EC, 2013). Ciò è di fondamentale importanza in tossicologia e farmacologia perché l'effettiva biodisponibilità di una sostanza può indicare la quantità (o la dose) che effettivamente può raggiungere un tessuto o un organo (National Academy of Sciences, 2003). Tuttavia, il concetto è potenzialmente causa di fraintendimento perché quando riferito alla *bioremediation* dei suoli contaminati si intende la capacità dei microrganismi di entrare in contatto con i contaminanti stessi. Ovvero per la valutazione degli obiettivi di bonifica la frazione biodisponibile di un certo contaminante può essere vista come la frazione bioaccessibile, ovvero la frazione che è biodisponibile o potenzialmente biodisponibile (ad esempio un contaminante che si può desorbire rapidamente) (Semple et al., 2004) e come tale potenzialmente aggredibile dai microrganismi. In terreni contaminati da sostanze organiche idrofobiche come PCB, diossine e furani ($K_{OW} > 10^4$), ad esempio, è ben noto che le concentrazioni totali (compresa la frazione di molecole associate alla matrice solida e disciolte nella fase acquosa) sono scarsamente rappresentative della frazione immediatamente disponibile alla degradazione (Ortega-Calvo et al., 2015); in quanto la marcata affinità di tali sostanze chimiche idrofobiche per il particolato (POC) e carbonio organico disciolto (DOC), i processi di invecchiamento (es. formazione di residui legati) e la cinetica di desorbimento lento, riducono drasticamente la frazione di sostanze chimiche liberamente disciolte nella fase acquosa biodisponibile per l'assorbimento dei microrganismi. Tale fenomeno è parzialmente responsabile della difficoltà dei microrganismi a biodegradare tali sostanze, che non solo possiedono caratteristiche strutturali tali da risultare recalcitranti alla degradazione ma risultano poco presenti (bioaccessibili) nella soluzione circolante del suolo in quanto fortemente adsorbite alla frazione organica. Tale caratteristica ha tuttavia un risvolto positivo in quanto riduce il potenziale di lisciviazione verso la falda o di scorrimento superficiale verso le acque superficiali. La ridotta bioaccessibilità di queste sostanze può però condizionare la velocità di biodegradazione, in quanto il substrato della degradazione microbica viene a mancare. Per questo motivo sono state implementate soluzioni tecnologiche che favoriscono la *desorption* ed il movimento delle sostanze idrofobiche (ad esempio con l'uso di tensioattivi) verso i microrganismi degradatori. Tuttavia, tali impieghi se non ben calibrati possono indurre una eccessiva mobilitazione spaziale di queste sostanze, trasportate dall'acqua, ad esempio, verso la falda. Fra le alternative più adatte vi è quello dell'impiego di DOC (carbonio organico disciolto), che formandosi per mineralizzazione della sostanza organica presente o aggiunta al suolo può permettere di accoppiare il fenomeno di desorbimento ottenuto da tale frazione mobile di carbonio nel suolo alla sua produzione da parte della biomassa microbica, sincronizzando quindi i due momenti degradativi e permettendo quindi l'aumento della degradazione delle sostanze più idrofobiche. Questo si può raggiungere favorendo la mineralizzazione di carbonio organico nel suolo aggiungendo compost, trinciando la biomassa epigea per la successiva mineralizzazione e/o favorendo la crescita di biomassa vegetale radicale che in seguito darà origine a detrito e quindi DOC.

6.2 Speciazione dei Metalli

Il D.lgs 152/06 prevede la determinazione dei Metalli nel suolo intesi come “forme totali”. Tuttavia, questa indicazione non permette di avere informazioni utili ai fini della valutazione della reale capacità fitoestrattiva delle cosiddette piante accumulatrici. Anche quest’ultima, infatti, è strettamente legata alla biodisponibilità del metallo, ovvero alle sue forme potenzialmente più in grado di esercitare tossicità ma, al contempo, più mobili nell’ambiente (nel suolo, nel comparto aria - a valle di una loro trasformazione in specie volatili - e nella falda) e verso microrganismi, piante ed animali.

Sia As che Hg si configurano come sostanze specianti. La speciazione dell’arsenico può essere ottenuta misurando le diverse frazioni in campioni di suolo con frazionamento chimico, mediante una procedura in 5 steps secondo il Metodo McLaren/Shiowatana (McLaren et al., 1998; Shiowatana et al., 2001). Anche la speciazione del Hg prevede un’estrazione sequenziale, in 5 steps, su 6 campioni, con determinazione anche del Hg totale:

Il Mercurio può essere metilato anaerobicamente nei sedimenti, rendendolo più solubile, volatile e biodisponibile (metil-mercurio). Tuttavia, non è stato possibile misurare questa specie di mercurio nel presente lavoro.

Al fine di valutare la capacità fitoestrattiva delle diverse specie vegetali selezionate, si è dunque deciso di sottoporre ad analisi dei campioni di suolo, prelevati dagli esperimenti in serra in corrispondenza del tempo t4, ovvero a 18 mesi dall’inizio della sperimentazione.

Le analisi di speciazione, eseguite nel 2017, sono state affidate a due laboratori universitari:

- Arsenico: Prof. Marco Grotti, Università di Genova;
- Mercurio: Prof. Stefano Covelli, Università di Trieste.

6.2.1 Speciazione dell’Arsenico

La procedura utilizzata per separare le diverse specie chimiche dell’arsenico è illustrata in Tabella 6.1

Tabella 6.1 – Procedura utilizzata per la valutazione della speciazione dell’arsenico

Numero Frazione	Estraente	Tipologia di Frazione	Composti estratti
1	con acqua MilliQ	Frazione solubile	As solubile
2	sodio bicarbonato (0.5 M NaHCO ₃)	Frazione biodisponibile	As adsorbito
3	sodio idrossido (0.1 M NaOH)	frazione estraibile in condizioni basiche	As associato a Fe e Al;
4	acido cloridrico (1 M HCl):	frazione estraibile in condizioni acide	As associato ai carbonati
5	acqua regia (acido Nitrico + 3 acido Cloridrico)	Frazione residua	

Le prime due frazioni (As solubile e As adsorbito) risultano essere le due più bioaccessibili.

Di seguito, vengono invece illustrati i risultati ottenuti (Tabella 6.2).

Tabella 6.2 – Risultati della speciazione dell'arsenico ($\mu\text{g/g}$) nei diversi campioni

Campione		Concentrazione As ($\mu\text{g/g}$)					
n	Codice	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5	Totale
1	Medica	1.6	8.9	19.5	20.0	25.0	75
2	Felce+Salice	2.9	9.4	19.6	18.3	21.5	71.7
3	Brassica	2.7	9.3	18.9	17.7	27.4	76
4	Festuca (redox)	1.8	11.7	17.3	15.3	19.7	65.8
5	Brassica (tio)	2.1	8.8	18.2	15.9	22.4	67.4
6	Festuca	1.8	10.0	20.7	16.7	23.8	73
7	Suolo (controllo)	2.6	8.7	17.9	18.8	21.8	69.8

Quello che si evince immediatamente è che le frazioni più bioaccessibili dell'As, ovvero quella solubile e quella adsorbita (estraibili, rispettivamente, durante lo Step 1 e lo Step 2 della procedura di speciazione), rappresentano una percentuale molto bassa dell'As totale, pari al 14-21% (come sommatoria) a seconda della specie. Da un lato, questo significa che le forme più mobili dell'As, ovvero quelle potenzialmente più tossiche, sono presenti nel suolo in concentrazioni molto basse (pochi $\mu\text{g/g}$); di contro, però, questo limita molto l'uptake delle piante.

6.2.3 Speciazione del Mercurio

Il report contenente la descrizione dettagliata della procedura utilizzata per la speciazione del Mercurio, effettuata dal Laboratorio del Prof. Covelli secondo un'Estrazione Sequenziale Selettiva (Metodo di Bloom) (Bloom et al., 2003), si può reperire sul sito ERSAF.

In Tabella 6.3 è riportato lo schema operativo usato nell'Estrazione Sequenziale Selettiva (ESS).

Tabella 6.3 - Schema operativo usato nell'estrazione sequenziale selettiva

Frazione	Tipologia frazione	Specie estratte	Estraente
F1	Solubile in acqua	HgCl_2 , HgSO_4	Acqua deionizzata
F2	Solubile in "acidi gastrici umani"	HgO	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{HCl}$
F3	Complessi organici	Hg legato ad acidi umici, Hg_2Cl_2	KOH
F4	Complessi forti	Hg(0) , Hg(II)	HNO_3
F5	Cinabro	$\alpha\text{-HgS}$, $\beta\text{-HgS}$, HgSe , HgAu	<i>Aqua regia</i>

Gli estratti F1 e F2 rappresentano le frazioni più mobili e, quindi, più facilmente scambiabili dal suolo. La mobilità è tendenzialmente decrescente per le componenti F3, F4 e F5: quest'ultima

frazione rappresenta il Hg legato ai solfuri, principalmente cinabro e metacinabro, composti poco solubili e quindi più stabili nella fase solida.

Di seguito, vengono invece illustrati i risultati ottenuti.

Tabella 6.4 – Misura del mercurio totale con apparecchio DMA -80

Campione	Hg [mg/kg]	SD	CV
Festuca	11.07	0.64	6%
Felce+Salice	11.32	0.14	1%
Controllo	13.84	0.12	1%
Brassica (tio)	4.12	0.07	2%
Brassica	11.52	0.12	1%
Medica	11.24	0.27	2%
Festuca (redox)	9.38	0.32	3%
CRM	2.89	0.04	1%

Nota: CRM è il materiale certificato usato nelle analisi per garantire accuratezza e precisione. SD è la deviazione standard e CV è il coefficiente di variazione percentuale

Le concentrazioni del Hg totale nei suoli sono comprese tra un minimo di 4,12 ed un massimo di 13,84 µg/g.

Come si evince da quanto riportato nella relazione del Prof. Covelli, i risultati ottenuti dall'estrazione sequenziale selettiva, eseguita sui campioni di suolo normalizzati a cento, evidenziano come le frazioni F1 e F2, ovvero le più solubili, rappresentino una percentuale molto ridotta del Hg estratto, con prevalenza della frazione F1, soprattutto per quanto riguarda la specie *Medicago sativa*.

La frazione F3, indicativa del Hg legato alla sostanza organica e, in particolare, agli acidi umici, è risultata percentualmente sempre superiore alle prime due frazioni, F1 e F2, ad eccezione dei campioni di controllo, ovvero suolo non trattato (F3=1,7%), e di *Medicago sativa* (F3=3,0%). Decisamente preponderante, sulle altre frazioni, la percentuale riscontrata nella frazione F4, da un minimo di 84,3% (*Medicago sativa*) ad un massimo di 92,1% (controllo), con un valore medio di 88,2%.

La maggior parte del Hg estratto (mediamente il 95,4%) è risultata pertanto inclusa nelle ultime due frazioni di tutti i campioni analizzati, con un intervallo di valori, in termini di percentuale, superiore di un ordine di grandezza nella frazione F4 (84,3-92,1%) rispetto alla frazione F5 (4,0- 10,8%).

Tabella 6.5 – Risultati della speciazione del mercurio nelle diverse frazioni dei diversi campioni

Campione	% per frazione				
	F1	F2	F3	F4	F5
Festuca	0.5	0.0	2.3	88.8	8.4
Felce+Salice	0.9	0.1	2.1	90.2	6.8
Controllo	2.1	0.0	1.7	92.1	4.0
Brassica (tio)	1.3	0.1	4.4	89.1	5.2
Brassica	1.2	0.0	2.3	86.5	10.0
Medica	7.2	0.1	3.0	84.3	5.4
Festuca (redox)	1.0	0.0	2.0	86.2	10.8

Come evidenziato da diversi autori (Bloom et al., 2003; Issaro et al., 2009; Shi et al., 2005), le frazioni F1 e F2 rappresentano i composti più solubili del Hg, più mobili e facilmente scambiabili dai suoli/sedimenti. La somma delle frazioni F1 e F2 può, dunque, essere considerata un buon indicatore della percentuale di Hg potenzialmente accessibile agli organismi e, in particolare, ai batteri capaci di trasformare le forme inorganiche del Hg in metil-Hg, più tossico e facilmente accumulabile lungo la catena trofica e, come tale, degno di ulteriori approfondimenti. In una prospettiva futura, infatti, andrebbe investigato meglio questo aspetto, andando ad analizzare anche tale forma mercurifera per la quale, ad oggi, non sono disponibili informazioni sui suoli Caffaro. Per il campione di *Medicago sativa*, per il quale la sommatoria F1+F2 risulta abbastanza elevata (7,3%), il Hg presente potrebbe essere potenzialmente più biodisponibile rispetto agli altri suoli.

La frazione F3, indicativa del Hg legato alla sostanza organica ed in particolare agli acidi umici, è anch'essa poco presente nei suoli considerati. Seppur la mobilità di questa specie sia inferiore a quella delle frazioni F1 e F2, le percentuali estratte sono risultate superiori. Secondo diversi autori (Bloom et al., 2003; (Fernández-Martínez and Rucandio, 2014), questa forma chimica del Hg risulterebbe essere la più importante e la più correlabile con il potenziale di metilazione.

La mobilità e la biodisponibilità del Hg dipendono anche dalle condizioni redox del sistema. La netta prevalenza della frazione F4 (mediamente ≈88%), anche rispetto alla F5 (mediamente ≈7%), indica che le forme di Hg presenti nei suoli sono prevalentemente legate in “complessi forti”. Si tratta di composti normalmente poco solubili e poco bioaccessibili, che possono rilasciare significative quantità di Hg solo in casi eccezionali di anossia spinta e prolungata nel tempo. Le frazioni F4 e F5, costituendo complessivamente il 95% circa del Hg estratto, fanno ritenere che la mobilità del Hg dai suoli sia ridotta.

In conclusione, la distribuzione del Hg nelle diverse frazioni, ottenute dall'estrazione sequenziale selettiva, risulta fortemente associata alle frazioni meno mobili, inducendo a ritenere che l'eventuale biodisponibilità del Hg dai suoli analizzati non sia particolarmente spinta.

7 Modellizzazione del destino ambientale

7.1 Modello SoilPlusVeg

SoilPlusVeg è un modello dinamico del destino ambientale di contaminanti basato sul concetto di fugacità (Mackay, 2001) sviluppato presso il Gruppo di Modellistica Ambientale del Prof. Antonio di Guardo dell'Università degli Studi dell'Insubria (Terzaghi et al., 2017, 2018a)). Questo modello (Figura 7.1) considera due comparti aria chiamati “lower air” (LA) che rappresenta lo strato limite planetario (PBL) e “upper air” (UA) che rappresenta la free atmosphere. Inoltre include un comparto lettiera-suolo “layerizzato” e un comparto biomassa vegetale composto da radici, fusto e foglie. I contaminanti si muovono nei vari comparti secondo le frecce mostrate in Figura 7.1. In particolare, considerando il comparto suolo, una molecola può arrivare per emissione diretta al suolo, deposizione dall'aria e dalle foglie per caduta delle foglie, erosione delle cere e lavaggio delle foglie durante un evento piovoso; la molecola può lasciare il comparto suolo per volatilizzazione, runoff, infiltrazione mediata dal DOC o in fase solubile verso i *layers* sottostanti, diffusione, biodegradazione (di base e incrementata dovuto alla presenza delle piante, *rhizoremediation*) e accumulo da parte delle radici. Il modello richiede come parametri di input le proprietà chimico-fisiche delle molecole, lo scenario ambientale (biomasse/volumi dei comparti, tessitura, percentuale di carbonio organico, concentrazione di DOC nel suolo, tipologia di vegetazione, ecc.), parametri meteorologici (temperatura, piogge, velocità e direzione vento, radiazione solare, ecc). In SoilPlusVeg viene risolto un sistema di equazioni del bilancio di massa della molecola in ogni comparto (equazioni differenziali di 1° ordine) mediante un metodo numerico (Runge-Kutta del 5° ordine) con time step adattativo (ESDIRK) (Semplice et al., 2012). Vengono inoltre considerate equazioni per il bilancio di massa dell'acqua e del carbonio organico nel suolo. SoilPlusVeg è codificato in Visual Basic 6 e fornisce dei risultati su base oraria.

La Figura 7.2 mostra il flusso di dati e calcoli in SoilPlusVeg ovvero una simulazione inizia con l'inserimento delle proprietà chimico-fisiche della molecola e della sua emissione in aria e/o suolo (STEP1), dopodiché si passa alla costruzione dello scenario ambientale mediante le caratteristiche dei comparti e i parametri meteorologici (STEP 2); a questo punto vengono risolte le equazioni del bilancio di massa per molecola, acqua e carbonio organico (STEP 3) e terminato il tempo di calcolo è possibile plottare i risultati (STEP 4).

Il modello SoilPlusVeg può essere utilizzato come supporto alla messa a punto delle linee guida per la bonifica dei terreni del SIN Brescia-Caffaro per stimare ad esempio i tempi necessari per raggiungere il limite di legge, oppure l'entità dei processi di perdita nel suolo, la variabilità temporale dei processi di perdita nel suolo e altri fenomeni come l'accumulo nella biomassa vegetale e il bilancio di massa dei metaboliti, una volta note identità e caratteristiche chimico-fisiche degli stessi.

Il modello è stato utilizzato per effettuare delle simulazioni multianno (100 anni) per le 10 famiglie di PCB considerando un suolo rappresentativo del SIN Brescia-Caffaro in termini di livelli di concentrazione e fingerprint (Terzaghi et al., 2018). In particolar modo è stato simulato un suolo di 40 cm, con tessitura franco-sabbiosa, contenuto di carbonio organico dello 0.6% e una concentrazione media di DOC pari a 15 mg/L. Il dominio del modello è stato settato a 1 ha per riprodurre un campo coltivato con *Festuca arundinacea* caratterizzata da biomassa ipogea di 1.93kg/m², biomassa epigea di 0.9 kg/m², SLA (Area Fogliare Specifica) di 10 m²/kg e LAI (Indice di Area Fogliare) di 9 m²/m². In Figura 7.3 sono riportati i risultati della simulazione, in cui viene mostrata l'entità dei processi di perdita dal suolo per il primo anno di simulazione e per il primo

strato di suolo considerando le 10 famiglie di clorurazione dei PCB. Per maggiori dettagli si rimanda a Terzaghi et al., 2018. Il processo più importante per tutte le famiglie è la biodegradazione; solo per le famiglie meno clorate sono importanti anche diffusione e volatilizzazione anche se in misura minore; l'accumulo da parte delle radici è irrisorio (<2%). In talune circostanze, anche l'infiltrazione può assumere una certa rilevanza per epta-deca. Per questo motivo si è deciso di considerare per il calcolo dei tempi di risanamento delle aree considerate (A, R, T) (vedi capitolo 10) solo il processo di biodegradazione, essendo il fattore prioritario nella sparizione di questi contaminanti. In Figura 7.4 viene mostrato l'andamento temporale dei processi di perdita dal suolo per i penta-PCBs (a titolo di esempio) in relazione ai parametri meteorologici (temperatura e piogge) e alla concentrazione di DOC nell'acqua del suolo. La biodegradazione, infiltrazione e volatilizzazione mostrano una variabilità stagionale che è strettamente correlata alla variabilità dei parametri meteorologici e alla concentrazione del DOC, mentre l'*uptake* da parte delle radici è principalmente dipendente dall'andamento (diminuzione) delle concentrazioni del suolo. La volatilizzazione è elevata durante le ore più calde dell'anno (luglio), mentre l'infiltrazione è favorita durante gli eventi piovosi e i periodi con maggiori concentrazioni di DOC (luglio-settembre). La biodegradazione è influenzata sia dalla temperatura che dal contenuto di acqua del suolo mostrando i valori più elevati durante le ore caratterizzate da temperature elevate e piovose. Questi risultati possono essere rilevanti per la valutazione dell'esposizione a breve termine dell'ecosistema e dell'uomo a questi contaminanti organici durante la bonifica di un sito contaminato. Ovvero questi risultati mostrano che i processi di perdita dal suolo possono variare fino a due ordini di grandezza durante un anno in funzione della variazione di temperatura, delle condizioni di umidità del suolo e della concentrazione di DOC. Ad esempio il contributo della biodegradazione al totale delle perdite dal suolo può variare dall'8% al 99%, mentre l'infiltrazione dallo 0.3% al 92%. Tuttavia, per potere validare il contributo del trasporto per infiltrazione si dovranno integrare i risultati dell'esperimento con le colonne di suolo parametrizzando e successivamente validando un submodello DOC e particelle di suolo (vedi capitolo 9).

Per questo motivo, il modello SoilPlusVeg può essere utile per valutare la *performance* di un trattamento di *bioremediation* per diversi scenari considerando sia la variabilità spaziale che temporale di quei parametri che possono influenzare il destino ambientale dei contaminanti organici nel suolo (carbonio organico, DOC, POC, temperatura, acqua, biomassa radicale, ecc.). Esso permette inoltre di predire le fluttuazioni della capacità degradativa della comunità microbica del suolo durante un anno e la sua variabilità con la profondità del suolo. Con opportune modifiche e calibrazioni come ad esempio 1) aggiornamento delle *rhizoremediation* half-lives per specie/trattamenti selezionate, 2) miglioramento del bilancio di massa del carbonio organico, 3) ruolo del DOC e della sua composizione nel promuovere la mobilità e modulare la biodisponibilità dei contaminanti 4) creazione di scenari specifici per le condizioni di *bioremediation* che si vorrebbero adottare, il modello SoilPlusVeg potrà essere di supporto per confrontare specifiche opzioni di *bioremediation*.

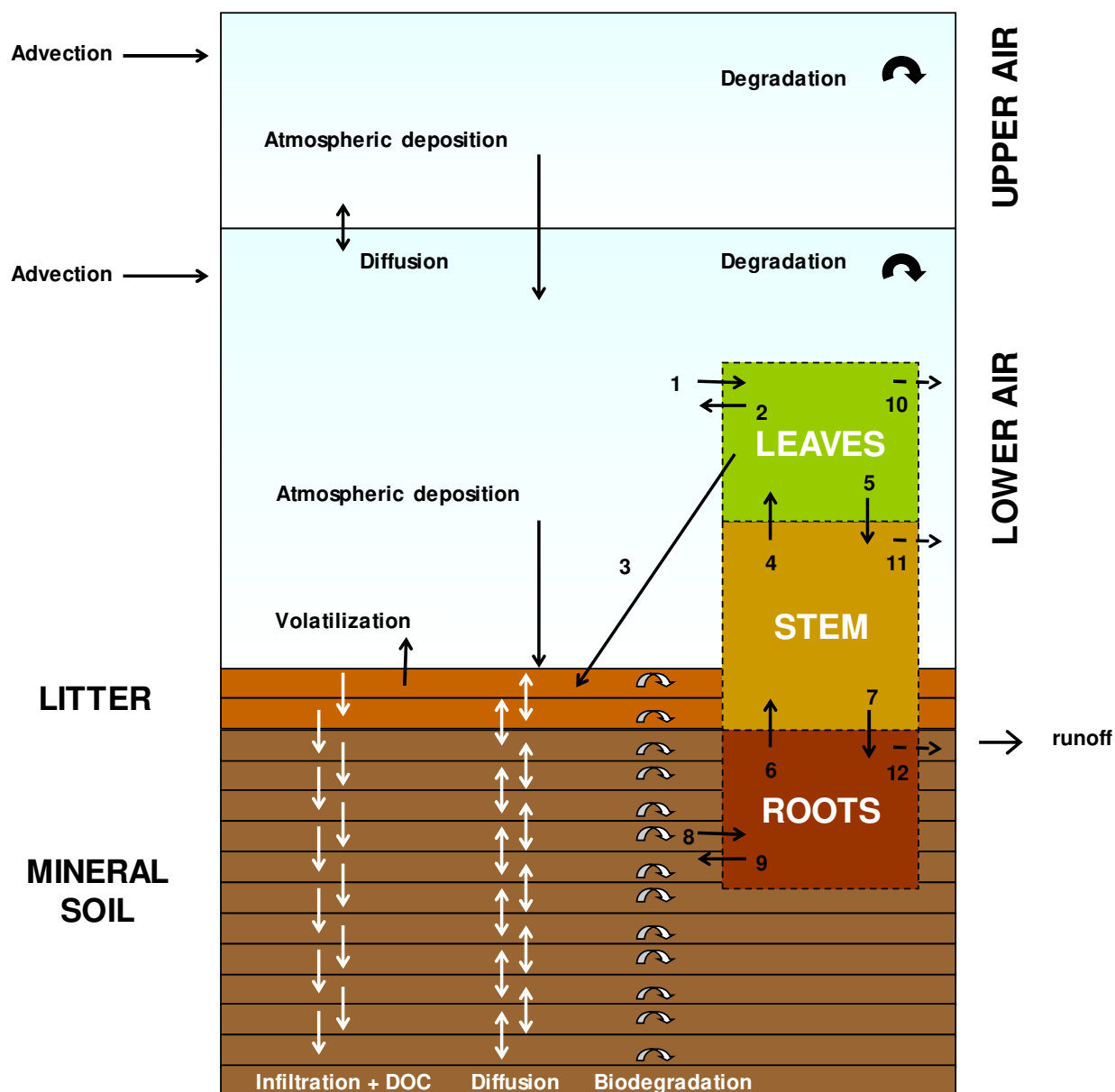


Figura 7.1 – Rappresentazione schematica del modello SoilPlusVeg. I numeri indicano i processi di scambio di molecola del comparto vegetazione: 1) scambio aria-foglia; 2) volatilizzazione; 3) trasferimento foglie-suolo (lavaggio delle foglie + erosione delle cere + caduta delle foglie); 4) trasferimento fusto-foglie; 5) trasferimento foglie-fusto; 6) trasferimento radici-fusto; 7) trasferimento fusto-radici; 8) trasferimento suolo-radici; 9) trasferimento radici-suolo; 10) degradazione nelle foglie; 11) degradazione nel fusto; 12) degradazione nelle radici.

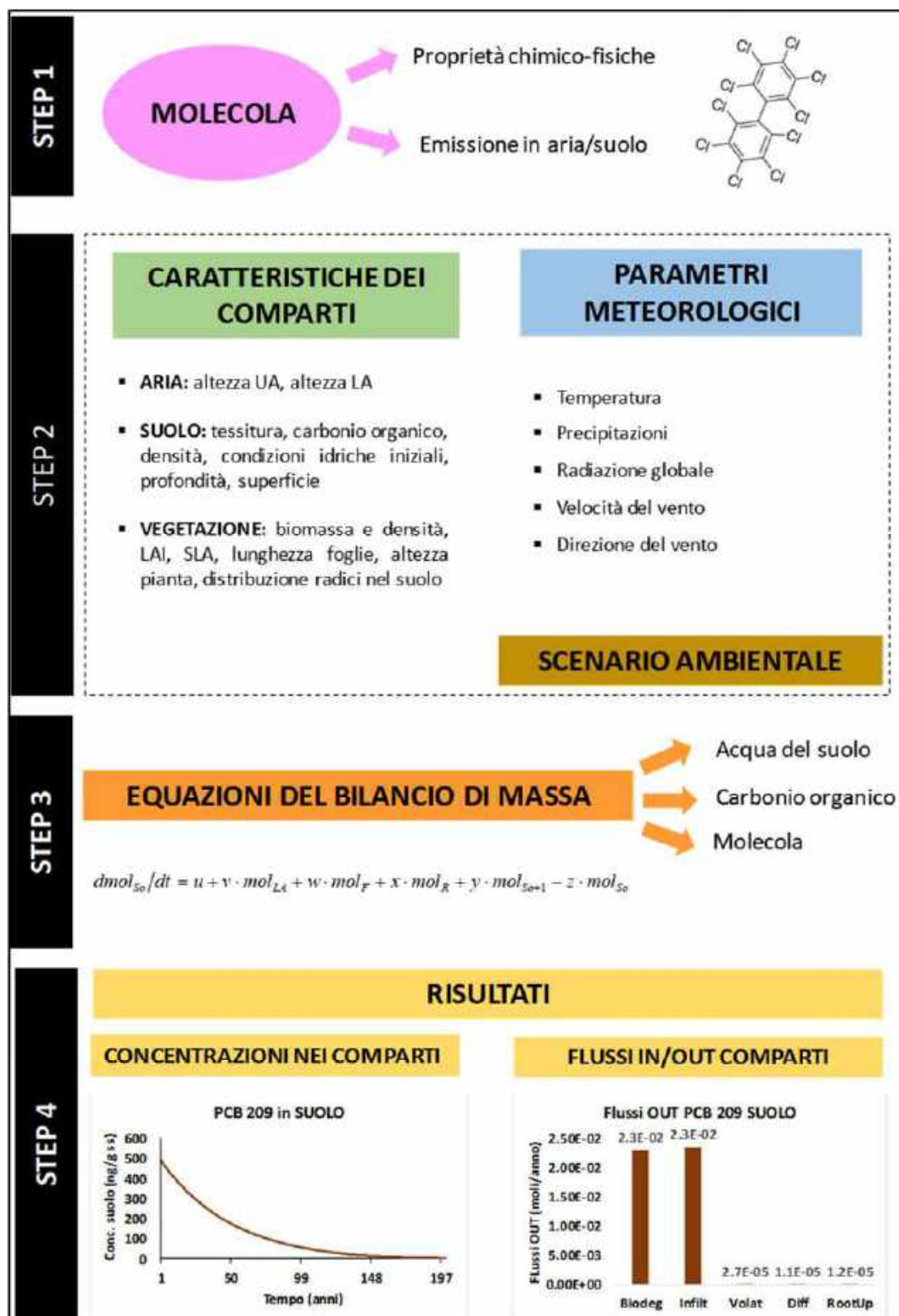


Figura 7.2 - Flusso di dati e calcoli in SoilPlusVeg

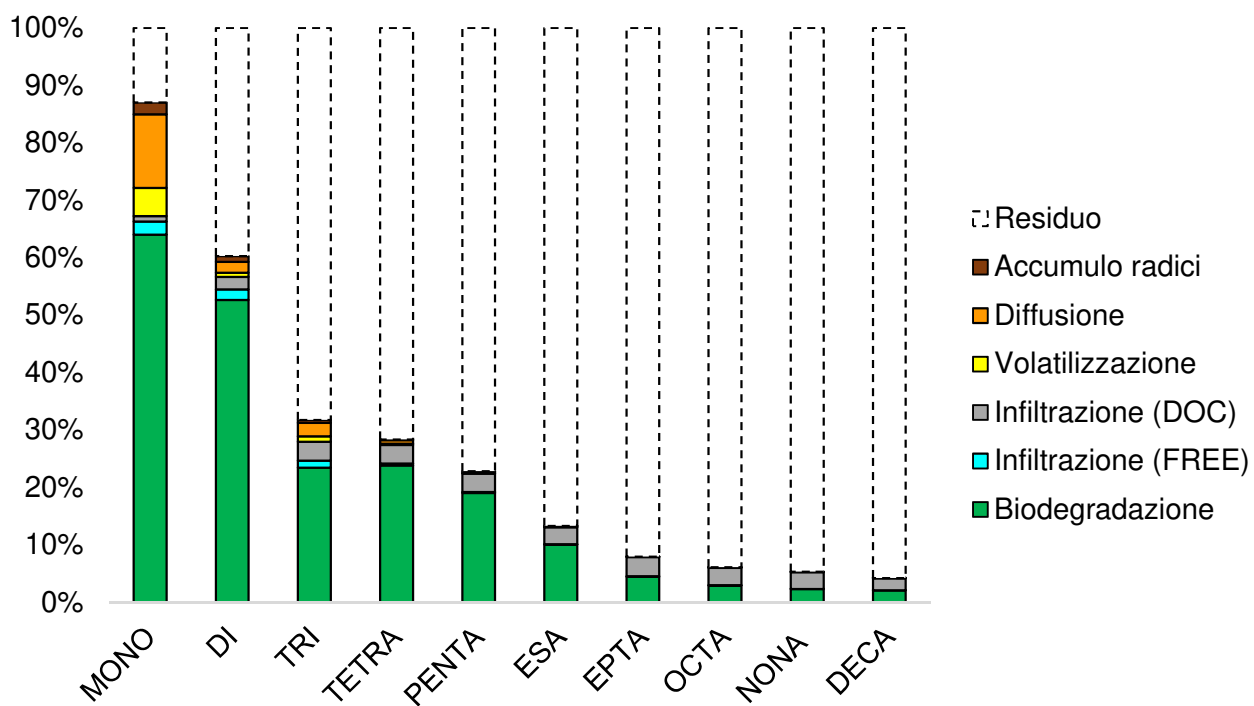


Figura 7.3 – Entità dei processi di perdita dal suolo (primo strato, primo anno) considerando le 10 famiglie di clorurazione dei PCB

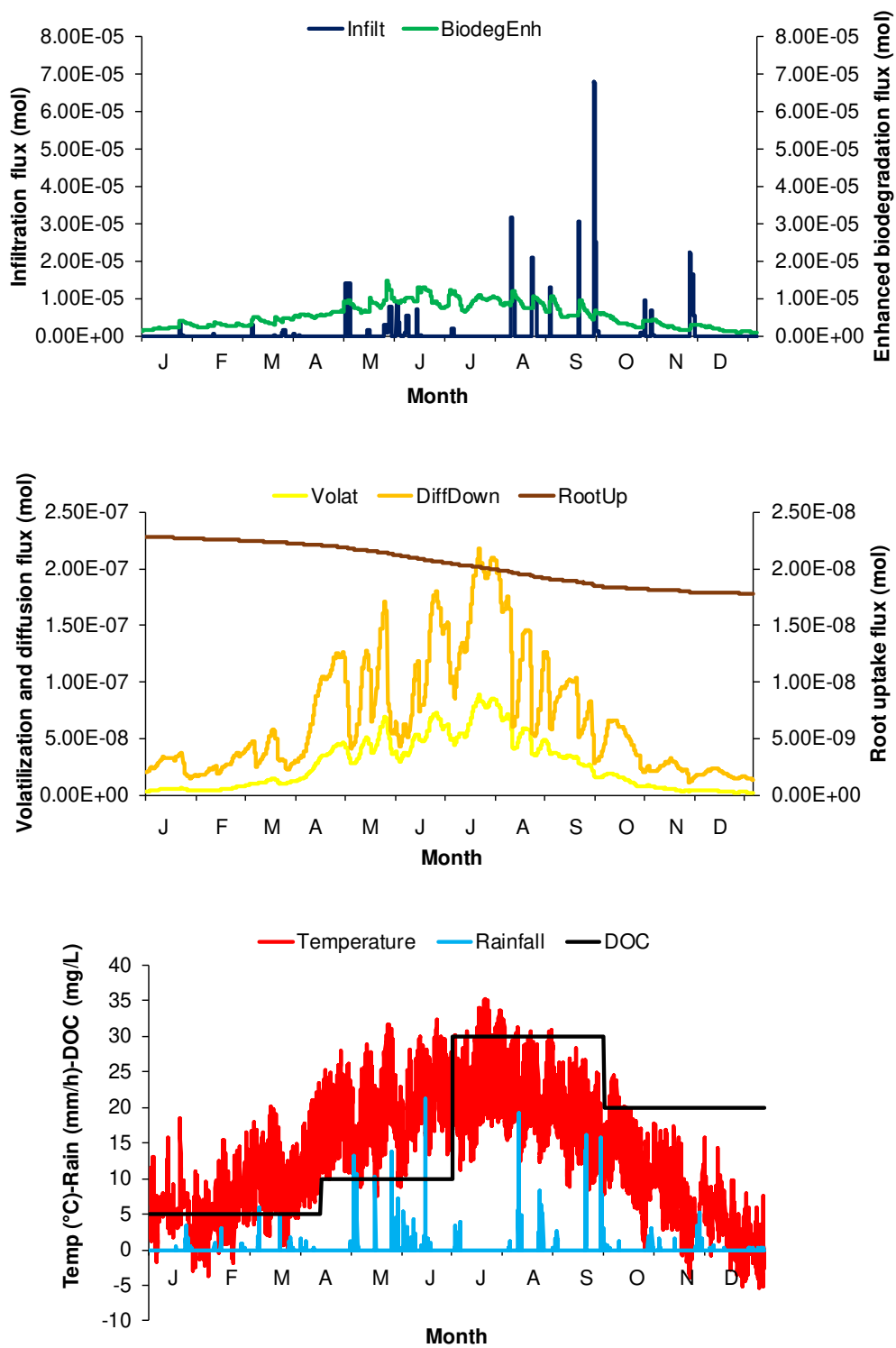


Figura 7.4 –Processi di perdita dal suolo per i penta-PCB su base oraria e parametri meteorologici (temperatura e piogge) e concentrazione di DOC

8 Metaboliti di PCB nel suolo e nelle piante

Durante il corso di una sperimentazione di *rhizoremediation* è di fondamentale importanza, valutare la formazione di prodotti intermedi. Questo per evitare di adottare delle tecniche di biorimediazione in campo che, se da una parte si mostrerebbero efficaci nel ridurre la concentrazione dei contaminanti nel suolo, dall'altra sposterebbero il problema della contaminazione ad un altro comparto ambientale, ovvero le acque di falda o la biomassa vegetale. Questo perché i composti di degradazione potrebbero non avere una ridotta tossicità ma potrebbero essere dotati di diverse caratteristiche chimico-fisiche (ad esempio polarità più elevata), che ne possono influenzare la mobilità e l'*uptake* nella biomassa.

In questo contesto si colloca la richiesta della Conferenza dei Servizi del dicembre 2014, che ha approvato il piano di sperimentazioni. In particolare, nel verbale della Conferenza dei Servizi si chiedeva di rispondere ad alcune domande:

- 1) la verifica dei percorsi di degradazione;
- 2) la verifica della formazione dei prodotti intermedi, con proprie caratteristiche di tossicità e mobilità;
- 3) l'esecuzione di bilanci di massa per identificare tutti o la gran parte dei prodotti di trasformazione per ottenere un'indicazione sullo stato di qualità dei suoli;
- 4) la verifica della ripartizione dei contaminanti nelle specie vegetali impiantate per la valutazione del destino dei contaminanti durante gli interventi;
- 5) la verifica della contaminazione da mercurio, e delle interazioni con la sperimentazione delle specie vegetali.

La letteratura scientifica sull'argomento è riportata in maniera dettagliata nel capitolo 8 del “*Background document per la messa a punto di un protocollo per gli esperimenti di rhizoremediation*” (Vedi Sito ERSAF). Di seguito vengono quindi riportati in breve gli studi di maggior rilevanza ed alcune pubblicazioni recenti non incluse nel documento citato.

È ben noto che esistono due distinti processi biologici in grado di trasformare i PCB: i processi aerobici ossidativi ed i processi anaerobici riduttivi. La dealogenazione riduttiva avviene rimuovendo preferenzialmente gli atomi di cloro in posizione meta e para ed è responsabile della conversione dei PCB alto clorurati nei congeneri basso clorurati (orto) e quindi della riduzione dei congeneri diossina-simili (non-orto). I prodotti di questo processo anaerobico sono degradabili successivamente da batteri mediante processi aerobici. Questi microorganismi, mediante il pathway della 2,3 diossigenasi convertono i PCB nei corrispondenti acidi clorobenzoici che a loro volta vengono degradati a CO₂ (Abramowicz, 1995; Field and Sierra-Alvarez, 2008; Seeger et al., 2010; Vergani et al., 2017).

Diversi studi sulla capacità delle piante di metabolizzare i PCB hanno mostrato la trasformazione di monoclorobifenili (PCB2, PCB3, PCB4) in monidrossiclorobifenili e in diidrossiclorobifenili e di diclorobifenili (PCB4, PCB7, PCB8, PCB10, PCB11, PCB13) in diversi monoidrossidiclorobifenili da parte di colture cellulari di radici di *Solanum nigrum* (Kučerová et al., 2000). Cellule della stessa specie sono state testate per metabolizzare 12 dicloro-, 7 triclورو-, 5 tetracloro- e 1 pentaclorobifenili. I metaboliti dei dicloro-PCB e triclورو-PCB testati sono risultati rispettivamente i diclorobifeniloli e i triclوروbifeniloli, mentre non sono stati trovati metaboliti dei tetra e penta PCB ad eccezione del PCB77 (tetraclorobifenilolo) (Rezek et al., 2007).

Colture cellulari di radici di *Nicotiana tabacum* sono risultate in grado di metabolizzare sei diclorobifenili (PCB4-9) producendo tre tipi di metaboliti: idrossi-PCB, metossi-PCB, idrossi-metossi-PCB (Rezek et al., 2008).

Altri studi invece riportano i pathway degradativi di alcuni congeneri di PCB nel suolo (Meggo et al., 2013; Meggo and Schnoor, 2013a). Le informazioni che si traggono complessivamente da questi studi, oltre alla percentuale di riduzione della concentrazione nel tempo, sono che la degradazione è favorita per i congeneri basso clorurati rispetto a quelli alto clorurati e che la degradazione di congeneri alto clorurati è favorita in condizioni riduttive da parte dei microrganismi avviene prima rimuovendo i sostituenti in meta e in para (Meggo et al., 2013; Meggo and Schnoor, 2013b; Secher et al., 2013; Smith et al., 2007).

Recentemente alcuni studi hanno rilevato la presenza di vari metaboliti dei PCB quali OH-PCB, MeO-PCB, MeSO₂-PCB, PCB solfati in campioni biotici ed abiotici (aria, precipitazioni, acque superficiali, suolo e sedimenti) suggerendo la loro possibile provenienza da impianti di trattamento delle acque e da deposizione atmosferica oppure direttamente da contaminazione da parte dei prodotti commerciali Aroclors (Marek et al., 2013; Ueno et al., 2007).

In una review di (Tehrani and Van Aken, 2014) i diversi meccanismi che portano alla formazione di OH-PCB in campioni di diversa provenienza, quali tessuti animali, acqua e sedimenti, sembrano imputabili a trasformazioni metaboliche in organismi viventi e reazioni abiotiche con radicali idrossili, ma viene evidenziata la necessità di approfondire ulteriormente i possibili processi di biodegradazione, comportamento, destino e gli eventuali effetti tossici di tali composti.

Diversi studi a seguire hanno evidenziato in animali e piante la presenza e distribuzione di OH-PCB e MeSO₂-PCB prodotti mediante processi metabolici catalizzati dalla citocromo P450 monossigenasi a dare OH-PCB e possibile coniugazione a dare PCB solfati o PCB glucuronidi (Dhakal et al., 2018; Grimm et al., 2015; Quinete et al., 2014).

OH-PCB e MeO-PCB sono stati rilevati in campioni provenienti da impianti di trattamento delle acque in Cina; nella sperimentazione condotta per evidenziare i possibili meccanismi di trasformazione da parte della comunità microbica presente nei fanghi, dopo esposizione a CB-101 e CB-65, sono stati rilevati i metaboliti 4'-OH-CB-101 e 4'-MeO-CB-101 (Sun et al., 2016b, 2016a) (Sun et al. 2016a). Successivamente lo stesso gruppo di ricerca ha condotto uno studio al fine di approfondire i meccanismi biologici coinvolti nel metabolismo di OH-PCB e MeO-PCB ed ha dimostrato la produzione di OH-PCB (metabolita principale 4'-OH-CB-61) e di MeO-PCB (4'-MeO-CB-61) e la loro interconversione da parte di un ceppo di *B. subtilis* esposto a CB-61 per 24 ore. I geni coinvolti suggeriscono una iniziale trasformazione a OH-PCB mediante citocromo P450 e la successiva trasformazione di OH-PCB a MeO-PCB da parte di metiltrasferasi (Sun et al., 2018b).

(Mizukami-Murata et al., 2016) hanno studiato la biodegradazione di 4OH-3CB da parte di un ceppo batterico di *Sphingomonas* sp. N-9 ed hanno evidenziato la trasformazione di OH-3CB a 3-chloro-4-hydroxybenzoic acid (4OH-3CBA), composto a minor tossicità, mostrando la capacità del ceppo di degradare OH-PCB basso clorurati rispetto agli alto clorurati.

Recentemente sono stati anche studiati i meccanismi di uptake, traslocazione e metabolismo di OH-PCB e MeO-PCB in piante di mais, frumento e riso ed è stata evidenziata un'interconversione tra OH-PCBs e MeO-PCB e la prevalenza di processi di demetilazione di MeO-PCB rispetto a quelli di metilazione di OH-PCB. In riso è stato riscontrato come la pianta abbia un ruolo chiave nell'intero processo, mentre funghi endolitici intervengano nei processi di idrossilazione e di demetilazione dei

PCB, ma non nella produzione di MeO-PCB come metaboliti finali dei PCB o OH-PCB (Sun et al., 2016a, 2018a).

Nel pioppo, pianta scelta come modello poiché utilizzata in molti studi di fitorimediazione, è stata evidenziata la trasformazione del 4-monoclorobifenile (PCB3) in metaboliti idrossilati (OH-PCB3) e la successiva trasformazione di tali composti, ad opera di sulfotrasferasi, a dare PCB3 solfati.

Nelle radici sono stati identificati come metaboliti prevalenti 2'-PCB3 solfato e 4'-PCB3 solfato e sono stati rilevati possibili processi di traslocazione di tali composti all'interno della pianta (Guangshu Zhai et al. 2013).

La dealogenazione del tetraclorobifenile PCB 77 è stata studiata in ambiente riducente all'interno dei noduli radicali nella simbiosi tra *Medicago sativa* e *Sinorhizobium meliloti* e sono stati evidenziati come metaboliti principali idrossi- e metil-bifenili (Wang et al., 2018).

9 Esperimento con colonne di suolo: verifica mobilità e presenza di metaboliti

Lo studio della mobilità dei contaminanti nel suolo può essere effettuato in laboratorio mediante colonne di suolo (Figura 9.1) alle quali viene aggiunta acqua per simulare eventi piovosi o di irrigazione. L'acqua di percolazione viene poi raccolta ed analizzata per la ricerca dei contaminanti richiesti.



Figura 9.1 – Colonne di suolo contaminato per studiare in laboratorio la mobilità di PCB e prodotti intermedi

In questo caso sono state allestite in laboratorio esperimenti con colonne di suolo con i due trattamenti di *rhizoremediation* più efficaci nel ridurre le concentrazioni di PCB, ovvero P4 (*Festuca arundinacea* e *Cucurbita pepo spp* coltivate in consociazione) e P7 (*Medicago sativa* con aggiunta di funghi micorrizici). Per ogni tesi e rispettivo controllo (C2, suolo senza pianta fertilizzato) sono state allestite tre repliche con il suolo campionato alla fine della sperimentazione (t_4 , 18 mesi); inoltre sono state allestite tre repliche con il suolo del controllo campionato all'inizio della sperimentazione (C1, t_0 , 0 giorni) in modo tale da studiare l'evoluzione nel tempo della produzione di metaboliti oltre che le loro caratteristiche di mobilità (Figura 9.2).

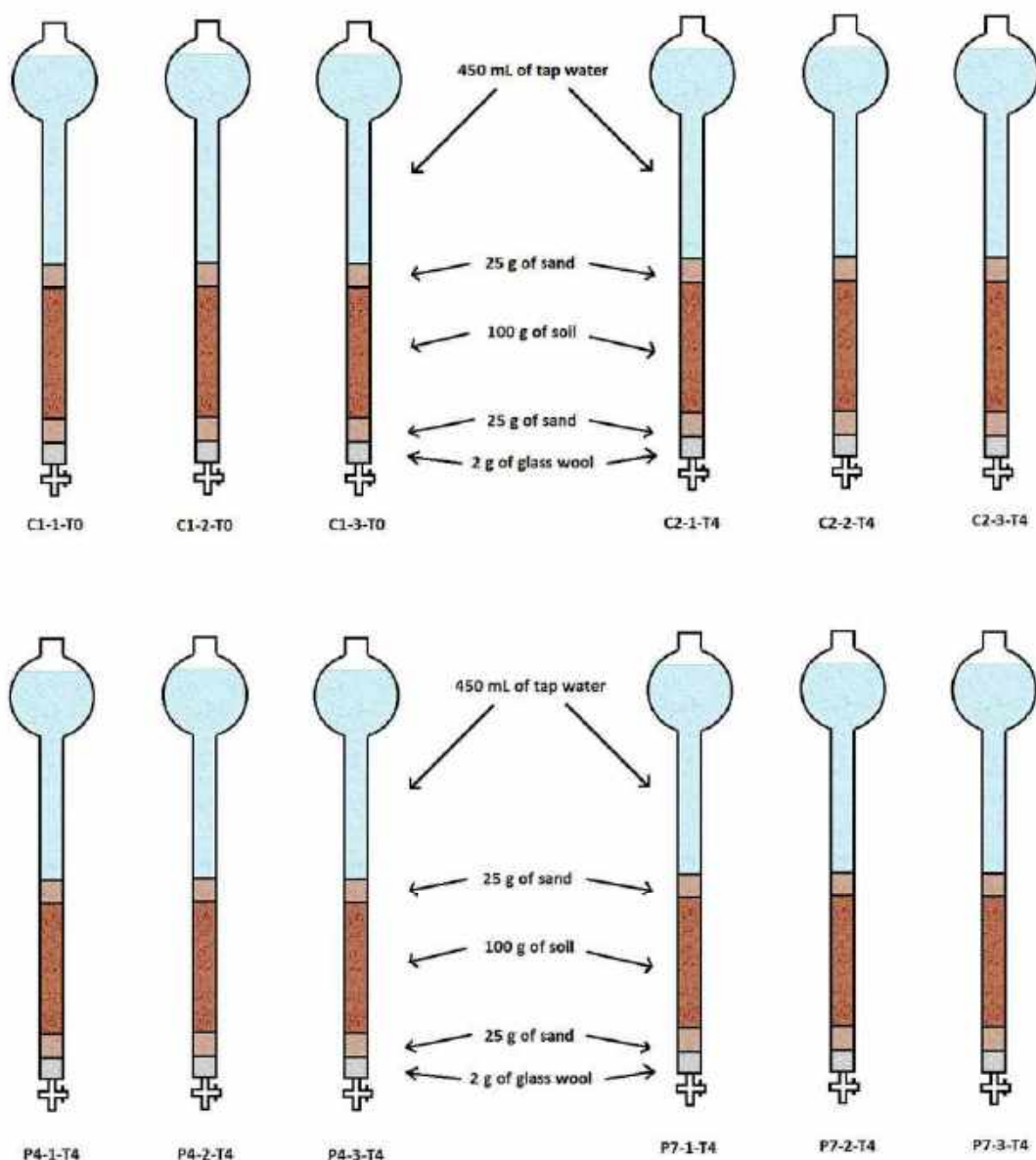


Figura 9.2 – Disegno sperimentale dell'esperimento

Le colonne di vetro (diametro interno di 2.7 cm, lunghezza di 50 cm e reservoir di 300 mL, per un volume totale di 580 mL) munite di rubinetto in teflon sono state riempite con 2 g di lana di vetro, 25 g di sabbia, 50 g di suolo e altri 25 g di sabbia. Come soluzione lisciviante è stata utilizzata acqua di rete (pH, 7; conducibilità 216-221 $\mu\text{S cm}^{-1}$; temperatura, 22°C; DOC 0.4 mg/L). In particolar modo sono stati aggiunti ad ogni colonna 450 mL di acqua; di questi 450 mL circa 30 mL sono rimasti in contatto con il suolo per tutto il tempo dell'esperimento ovvero 7 giorni (tempo per il raggiungimento dell'equilibrio fra PCB nel suolo e l'acqua, (Vitale et al. 2018)), mentre i rimanenti sovrastavano la colonna di suolo, rappresentando dell'acqua "pulita" (pioggia o irrigazione). Dopo 7 giorni, l'acqua di percolazione è stata raccolta e filtrata con filtro GF/F (0.7 μm). Il filtro è stato estratto in ultrasuono con una miscela di cicloesano/etilacetato 1/1 per determinare i PCB e prodotti intermedi associati al particolato (POC), mentre l'acqua filtrata è stata estratta mediante estrazione solido/liquido utilizzando Empore Disk C18 e cicloesano, etilacetato e acetone come solventi di estrazione per determinare i PCB e prodotti intermedi disciolti (free + DOC). I PCB e i prodotti

intermedi (derivanti da perdita progressiva di un cloro) sono stati determinati in GC-MS. Parte del campione d'acqua è stato inoltre utilizzato per determinare pH, conducibilità, temperatura e concentrazione di DOC.

La Tabella 9.1 riassume i valori di pH, conducibilità, temperatura e concentrazione di DOC (mediante spettrofotometro UV-VIS) per le acque raccolte dalle diverse colonne e per la soluzione lisciviante

Tabella 9.1 – Valori di temperatura, pH, conducibilità e DOC per le acque di percolazione dalle colonne dei controlli e dei trattamenti.

Campione	Descrizione	T (°C)	pH	Conducibilità (µS cm ⁻¹)	DOC (mg/L)
Soluzione lisciviante	Acqua di rete	22	7	219	0.4
C1-1-T0	Controllo T0 non fertilizzato	19	7	382	11.36
C1-2-T0	Controllo T0 non fertilizzato	18	7	287	11.04
C1-3-T0	Controllo T0 non fertilizzato	19	7	391	10.52
C2-1-T4	Controllo T4 fertilizzato	21	7	2490 (*)	41.74 (*)
C2-2-T4	Controllo T4 fertilizzato	19	7	1386	26.03
C2-3-T4	Controllo T4 fertilizzato	20	7	1241	24.04
P4-1-T4	Festuca + Cucurbita T4	22	7	674	30.47
P4-2-T4	Festuca + Cucurbita T4	22	7	684	28.93
P4-3-T4	Festuca + Cucurbita T4	22	7	604	25.26
P7-1-T4	Medicago T4	21	7	530	17.80
P7-2-T4	Medicago T4	22	7	705	17.73
P7-3-T4	Medicago T4	21	7	660	25.78

NOTE: (*) valore non considerato in quanto non confrontabile con gli altri per problemi nel campionamento

Le Figure 9.3 e 9.4 mostrano l'andamento della conducibilità e della concentrazione di DOC dei controlli e dei trattamenti. Il controllo al t4 mostra valori elevati di conducibilità rispetto al controllo al t0 dovuti alla fertilizzazione e all'assenza delle piante, mentre non c'è differenza fra la conducibilità dei trattamenti. Per quanto riguarda la concentrazione di DOC essa varia tra 20 e 28 mg C/L per il controllo e i trattamenti al t4, mentre è quasi la metà per il controllo al t0 indice di un effetto della fertilizzazione e della coltivazione sulla quantità di carbonio organico nel suolo.

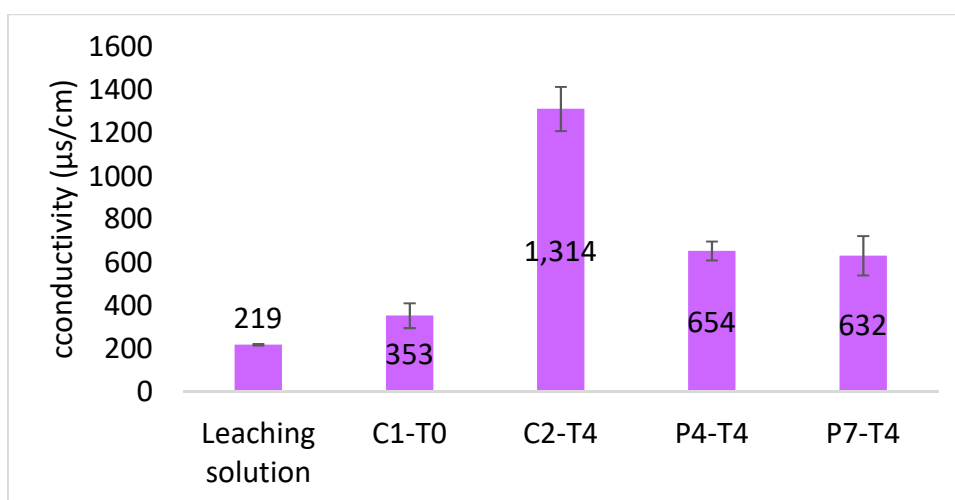


Figura 9.3 - Conducibilità

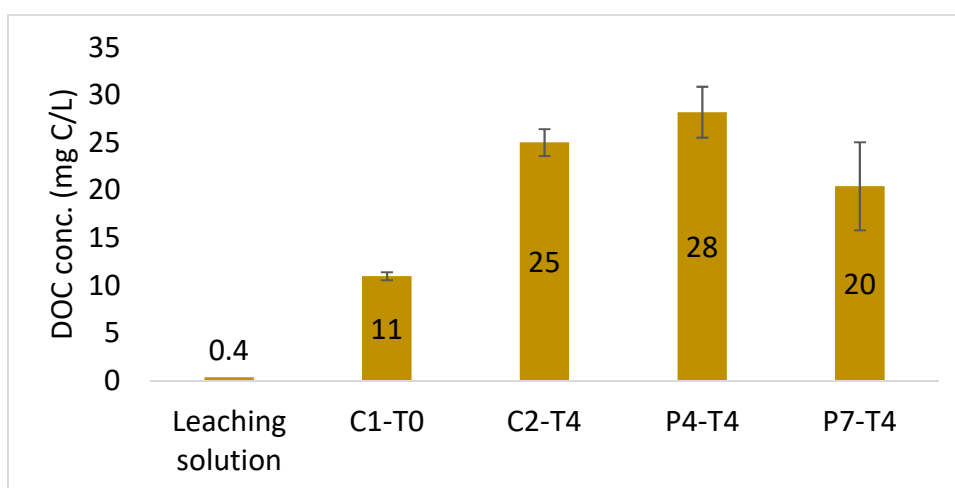


Figura 9.4 – Concentrazione di DOC

Sono stati ricercati 82 congeneri di PCB. Di questi è stato possibile quantificare quei congeneri presenti nel suolo ad una concentrazione vicina o superiore a 100 ng/g s.s. e con più di due atomi di cloro ovvero PCB 28/31, 52, 66, 70, 74, 90/101, 95, 99, 105, 110, 118, 138/158, 149, 153/168, 170, 180/193, 187, 209. Questi 23 congeneri nel suolo rappresentano quasi più del 70% dei PCB somma misurati. Gli altri congeneri, così come i possibili prodotti intermedi derivanti da perdita progressiva di un cloro erano al di sotto del limite di rilevabilità strumentale.

La Figure 9.5 - 9.7 mostrano le concentrazioni di PCB totali misurati nella fase disciolta, particolata e la concentrazione bulk data dalla somma delle due frazioni precedenti. Le concentrazioni nella fase disciolta variano tra 15 ng/L nel controllo al t0 a 42 ng/L nel trattamento P7. Mentre i due trattamenti non sono diversi rispetto al controllo al t4, solo P7 differisce dal controllo al t0. Le concentrazioni nella fase particolata variano tra 5 ng/L nel controllo al t0 a 135 ng/L nel trattamento P7. In questo caso entrambe i trattamenti differiscono dal controllo al t0, ma solo P7 differisce dal controllo al t4. Sommando le concentrazioni di PCB in fase disciolta e particolata si ottengono concentrazioni bulk che variano tra 20 ng/L per il controllo al t0 e 170 ng/L per il trattamento P7. Il trend tra controlli e trattamenti è simile a quello della fase particolata in quanto è la fase predominante come mostrato in Figura 9.8.

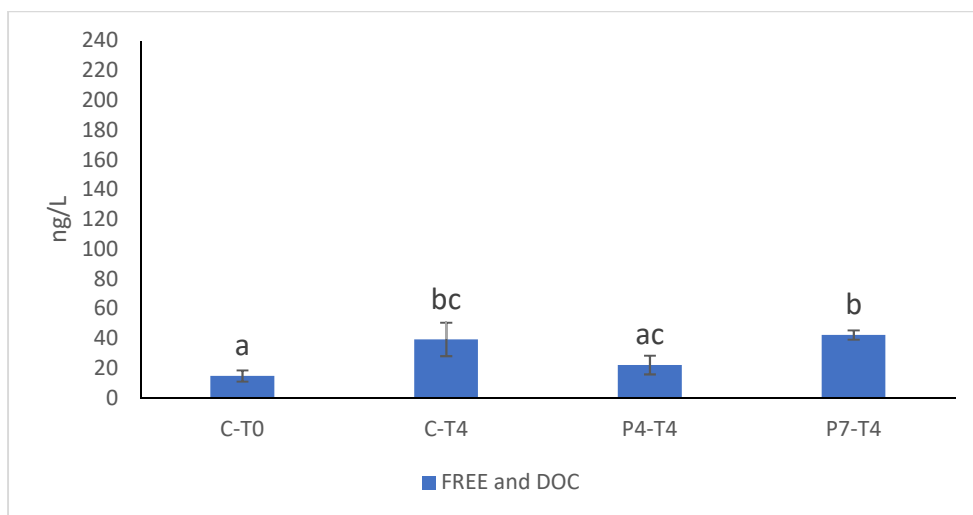


Figura 9.5 – Concentrazioni totali di PCB nella fase disciolta (free + DOC)

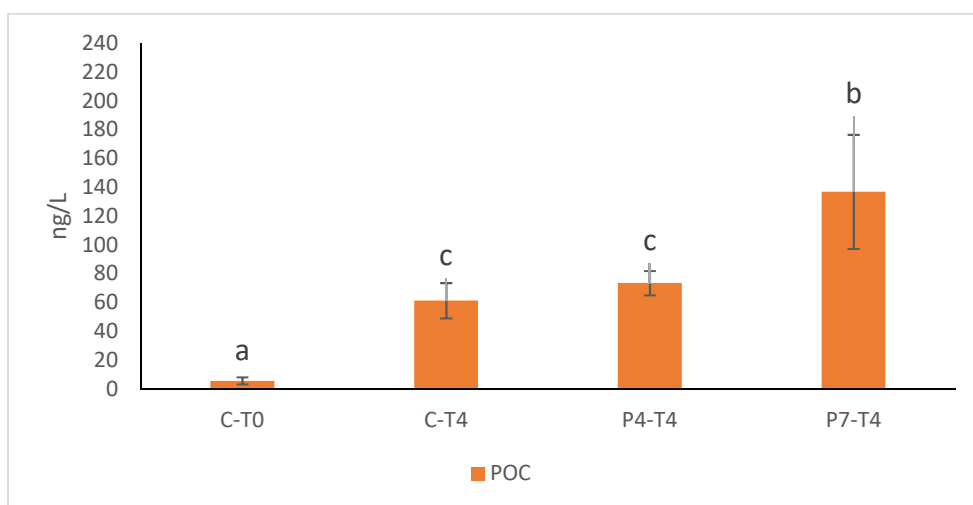


Figura 9.6 – Concentrazioni totali di PCB nella particolata (POC)

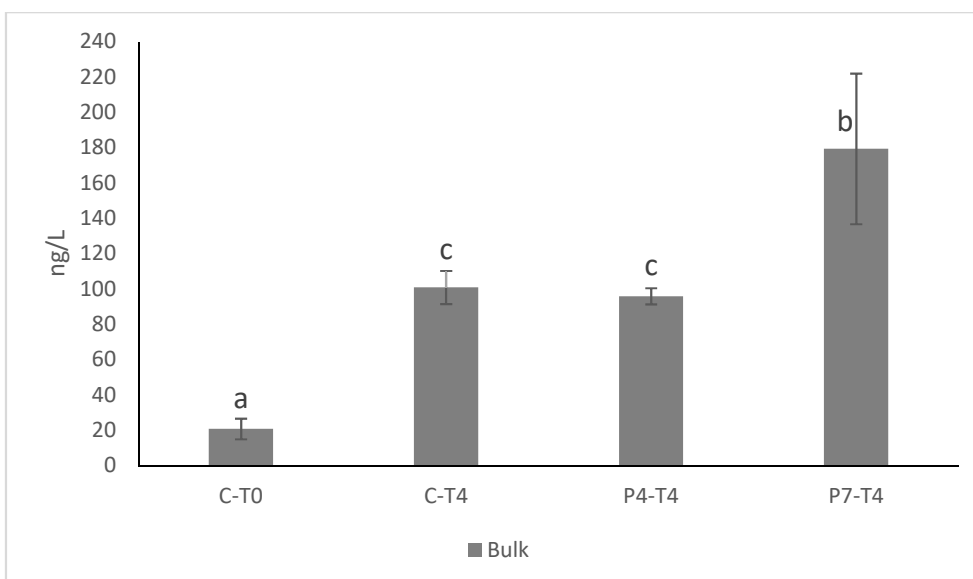


Figura 9.7 – Concentrazioni totali di PCB nella fase disciolta e particolata (bulk)

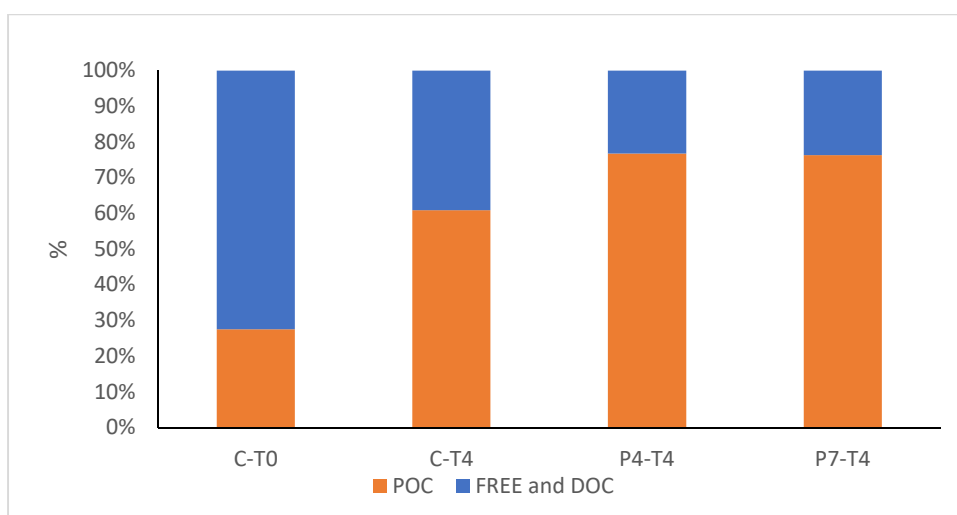


Figura 9.8 – Distribuzione percentuale delle concentrazioni di PCB totali tra fase disciolta e fase particolata

Come si vede in Figura 9.8 per C1-T0 la percentuale di PCB associata al particolato è inferiore rispetto a C2-T4, P4-T4 e P7-T4. Questo è dovuto a una minore quantità di particolato nel controllo al t0 come confermato dall'analisi visiva dei filtri (Figura 9.9).

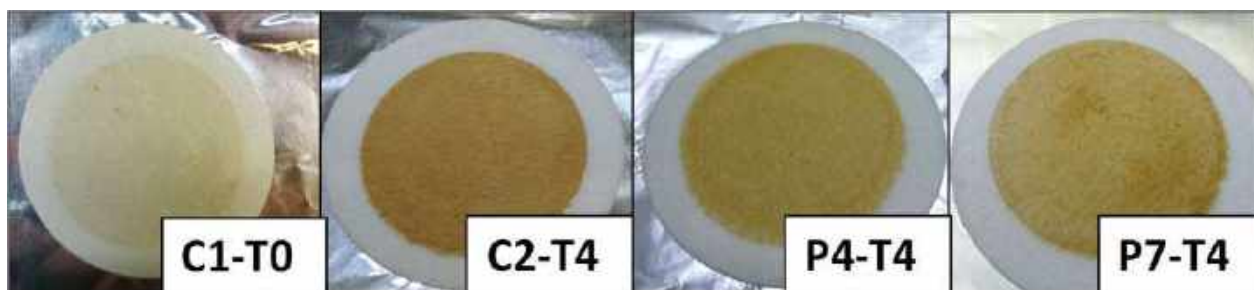


Figura 9.9- Foto dei filtri dei diversi campioni

Le figure 9.10 e 9.11 mostrano le concentrazioni delle famiglie di PCB nel suolo e nell'acqua (concentrazioni bulk) per i controlli e i trattamenti selezionati. Nei campioni di acqua, le concentrazioni di mono-, di-, octa- e nona-PCB sono al di sotto del limite di rilevabilità data la loro bassa concentrazione nei campioni di suolo; tri-, tetra-, penta-, esa-, epta- e deca-PCB rappresentano rispettivamente circa il 5, 15, 20, 30, 20, 15 % del fingerprint totale similmente al suolo.

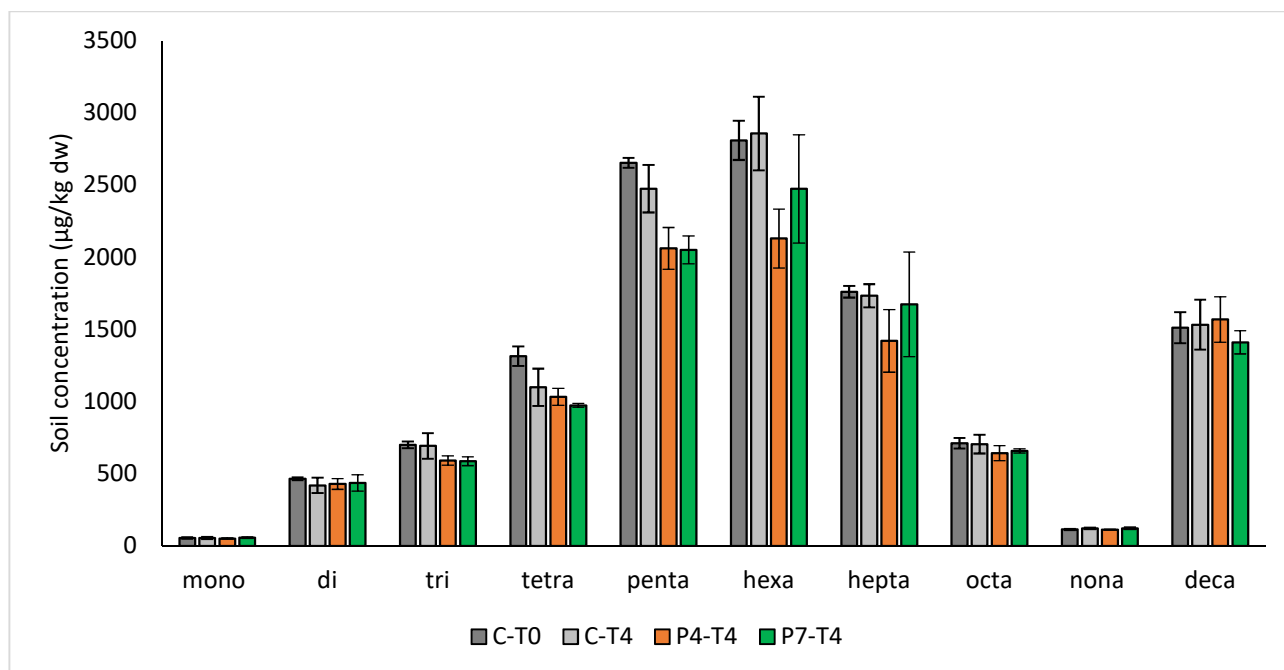


Figure 9.10 – Concentrazioni delle famiglie di PCB nel suolo

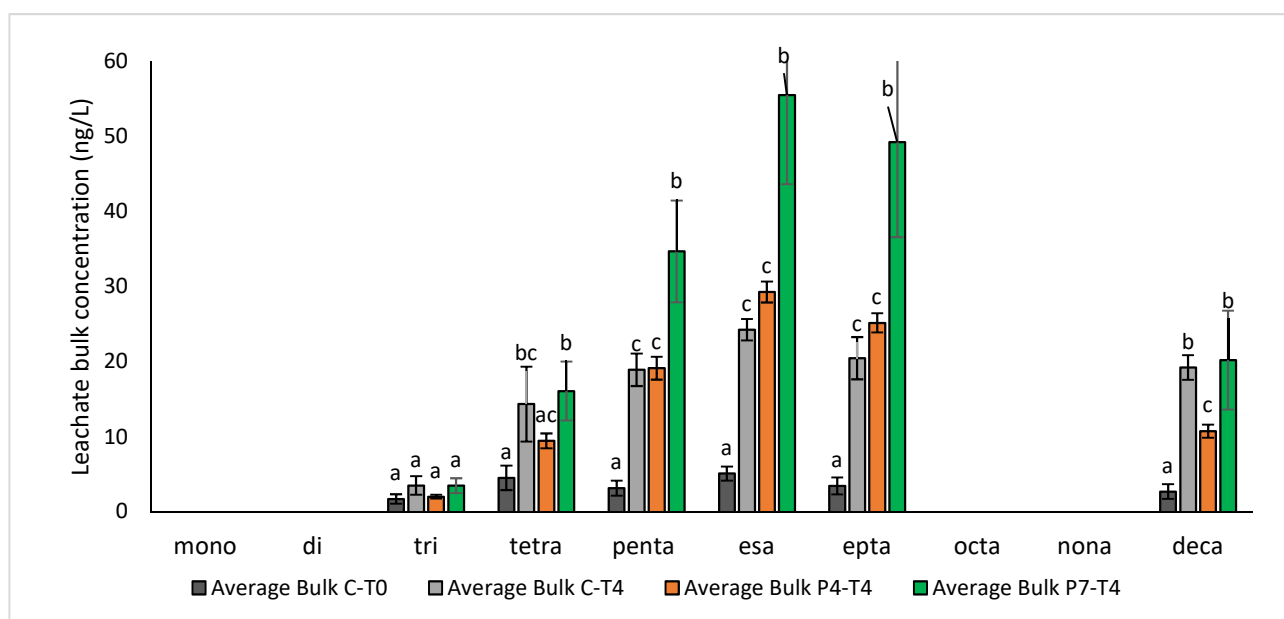


Figure 9.11 – Concentrazioni delle famiglie di PCB nell'acqua

Anche in questo caso si può notare come per P7 le concentrazioni siano più elevate rispetto al controllo al t4 e P4, soprattutto per penta-, esa- e epta-PCB.

I risultati hanno mostrato come i campioni di percolato sono stati arricchiti in PCB alto clorurati dai tetra agli epta, mentre il PCB deca ha mostrato un contributo inferiore; le concentrazioni di mono, di, octa e nona PCB erano inferiori al limite di rilevabilità a causa delle loro basse concentrazioni nel suolo. Entrambi i trattamenti (P4 e P7) hanno mostrato una concentrazione di PCB nella fase disciolta simile rispetto al controllo al t4, mentre l'acqua lisciviata dal terreno trattato con *Medicago*

sativa (P7) ha mostrato concentrazioni di PCB associati al particolato un fattore di circa 2 volte superiore a quelle del controllo al t4 e dell'altro trattamento (P4). Controllo e trattamenti al t4 hanno mostrato concentrazioni superiori rispetto al controllo al t0. Ciò indica che le specie vegetali selezionate, durante il trattamento di *rhizoremediation*, hanno agito in modo diverso su uno dei flussi più importanti che influenzano il movimento dei contaminanti organici nel suolo, ovvero il carbonio organico particolato (POC). Questi risultati sottolineano inoltre l'effetto della fertilizzazione del suolo e dei fenomeni di *weathering* oltre a quelli del trattamento con le piante sul rilascio di PCB nella acqua del suolo. In particolare le specie vegetali selezionate, durante l'esperimento di *rhizoremediation*, hanno arricchito il terreno (o contribuito a frazionare le particelle esistenti, in particelle più piccole) di particolato, con la conseguenza di una maggiore lisciviazione di PCB in acqua. P7 ha mostrato di influenzare l'associazione delle particelle di suolo probabilmente grazie alla presenza dei funghi micorrizici.

Per gli stessi campioni delle colonne, un'indagine preliminare è stata condotta ricercando i metaboliti polari dei PCB con analisi in LC-MS ad alta risoluzione effettuata presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" di Milano. Le analisi, di tipo sostanzialmente qualitativo hanno permesso di identificare metaboliti idrossilati dei PCB (PCB-OH) nelle famiglie da dicloro a nonacloro, a concentrazioni dell'ordine di 1-10 µg/kg, oltre ad altri metaboliti polari che abbisognano di ulteriori indagini per la loro identificazione. Tali risultati sono importanti perché possono indicare, da un lato l'effettiva presenza di prodotti di degradazione dei PCB (confermando l'efficacia della degradazione biologica), dall'altro la necessità di verificare il loro destino ambientale per evitare fenomeni di lisciviazione verso la falda.

Conclusioni

I risultati ottenuti in questo esperimento mostrano che le pratiche agricole (applicate nel vaso controllo C4) e la crescita delle piante provocano un maggiore dissoluzione e rilascio in fase particolata di PCB. Mentre il trattamento P4 (*Festuca* + *Cucurbita*) non mostra risultati complessivamente diversi rispetto al controllo al tempo 4 dopo 18 mesi di coltivazione, il trattamento P7 (*Medicago*) mostra di essere in grado di raddoppiare circa le concentrazioni di PCB totali (bulk) rilasciate nel percolato, principalmente a carico della frazione particolata. In condizioni reali (ovvero in campo) tale fenomeno è probabilmente meno rilevante, a causa delle condizioni di generale non saturazione del suolo (che come visto è ben drenante a causa della tessitura prevalentemente franco sabbiosa) e circoscritto a situazioni transienti causate da flussi di acqua dopo abbondanti precipitazioni. Tuttavia, alcuni autori (Vitale et al., 2018) hanno mostrato che la risposta di un suolo avente le stesse caratteristiche di quello degli esperimenti in oggetto tenuto prima a capacità di campo e poi a condizioni di saturazione per 7 giorni è quella di raddoppiare le concentrazioni di PCB rispetto all'ultima frazione (FF) dell'acqua gravitazionale dopo condizioni di saturazione, probabilmente a causa delle mutate condizioni nei pori dovuta alla transizione a condizioni più aerobie e alla probabile degradazione del carbonio organico e probabile cambio di caratteristiche del DOC.

Questi studi hanno mostrato che il suolo contaminato è in grado di lisciviare PCB a concentrazioni che vanno da circa 100 a circa 180 ng/L in condizioni di saturazione. Assumendo queste condizioni come caso peggiore, si può affermare che tale fenomeno di lisciviazione possa perdurare per tutta la durata della degradazione delle molecole. Mentre da un lato questo movimento verticale può indicare uno spostamento degli inquinanti verso la falda, dall'altro può indicare che i PCB (i loro metaboliti e le altre sostanze idrofobiche presenti nel suolo come PCDD e PCDF) possano spostarsi

nel suolo, agevolandone l'interazione con i microrganismi residenti nel suolo, con il risultato positivo di aumentandone il potenziale di biodegradazione.

L'importanza reale della lisciviazione in queste condizioni andrà successivamente misurata con esperimenti ad hoc con i suoli in presenza della biomassa vegetale (e dell'apparato radicale) delle specie selezionate, per valutare il comportamento in tali condizioni. La biomassa vegetale, trattenendo l'acqua del suolo con la suzione dell'apparato radicale, può infatti efficacemente contrastare la perdita per lisciviazione, riducendo il flusso verticale dell'acqua verso la falda.

10. Tempi di *remediation* per le aree a diversa contaminazione (contaminanti organici)

I dati ottenuti dalla sperimentazione in serra sono stati elaborati al fine di ottenere delle *rhizoremediation* half-lives (emivite) da poter utilizzare per predire i tempi di remediation per le aree a diversa contaminazione. Di seguito vengono riportati: 1) metodo di calcolo delle half-lives, 2) i valori di *rhizoremediation half-life* ottenuti, 3) i valori di *natural attenuation* half-lives riportati in letteratura, 4) i criteri di selezione dei valori di *half-life* per la costruzione delle mappe, 5) il metodo di stima dell'evoluzione temporale delle concentrazioni per le aree a diversa contaminazione, 6) le mappe dei tempi di remediation per le aree a diversa contaminazione.

10.1 Metodo di calcolo delle *rhizoremediation half-lives* per contaminanti organici

Per le molecole per le quali è stata osservata una riduzione statisticamente significativa (vedi 4.2.1.3) è stata calcolata una *rhizoremediation half-life* considerando una cinetica del I ordine secondo la seguente formula (Terzaghi et al., 2018b):

$$k_D = - ((\ln(P_{t_4}/C_{t_0}))/t) \quad \text{Eq.2}$$

$$HL = 0.693/k_D \quad \text{Eq.3}$$

Dove k_D è rate di degradazione (giorni^{-1}), $\ln$ è il logaritmo naturale, HL (half-life) è l'emivita della sostanza in giorni e t è il tempo (giorni) che intercorre tra t_0 e t_4 ovvero 540 giorni (13 Maggio 2015 – 16 Novembre 2016)

- 1) Mentre per i PCB le HL sono state calcolate considerando le famiglie dei PCB, per PCDD e PCDF è stata calcolate delle HL per singolo congenere.

10.2 Valori di *rhizoremediation HL* ottenuti

Le tabelle seguenti (10.1 – 10.3) riportano i valori di *rhizoremediation HL* (anni) ottenuti per le varie tesi sperimentali per PCB, PCDD e PCDF.

Tabella 10.1 – Valori di *rhizoremediation* HL (anni) per le 10 famiglie di PCB

PCB HL (anni) C-T0 vs P-T4										
Treatment	Mono	Di	Tri	Tetra	Penta	Esa	Epta	Octa	Nona	Deca
P1_PhaNORM			5	6	6					
P2_PhaRED		4	4	4	6					
P3_FesNORM	4	5		5	5					
P4_Fes+Cuc			5	4	4	4	5			
P5_FesRED				5	5					
P6_FesCOM			5	6						
P7_Med			5	3	4					
P8_SalAthy										
P9_BraNORM			4	6						
P10_BraTIO				5	8					

NOTE: in verde HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.05

in grigio HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 non significative

Tabella 10.2 – Valori di *rhizoremediation* HL (anni) per i 7 congeneri di PCDD

PCDD HL (anni) C-T0 vs P-T4							
	2378-TCDD	12378-PCDD	123478-HxCDD	123678-HxCDD	123789-HxCDD	1234678-HpCDD	OCDD
I-TEF	1	0.5	0.1	0.1	0.1	0.01	0.001
WHO98-TEF	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.0001
WHO05-TEF	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.0003
P1_PhaNORM						11	
P2_PhaRED							
P3_FesNORM	4	6	5	6	8	7	
P4_Fes+Cuc	7		4				
P5_FesRED				7		9	
P6_FesCOM			4				
P7_Med							
P8_SalAthy						16	
P9_BraNORM							
P10_BraTIO							

NOTE: in verde HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.05

in grigio HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 non significative

Tabella 10.3 – Valori di *rhizoremediation* HL (anni) per i 10 congeneri di PCDF

PCDF HL (anni) C-T0 vs P-T4										
	2378-TCDF	12378-PCDF	23478-PCDF	123478-HxCDF	123678-HxCDF	234678-HxCDF	123789-HxCDF	1234678-HpCDF	1234789-HpCDF	OCDF
LTEF	0.1	0.05	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.001
WHO98-TEF	0.1	0.05	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.0001
WHO05-TEF	0.1	0.03	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.0003
P1_PhaNORM	7	8		9	9		11			
P2_PhaRED										
P3_FesNORM		5	6	7	6	6	7	8	8	4
P4_Fes+Cuc		8		9	11	10	11			
P5_FesRED		9								
P6_FesCOM								16	15	
P7_Med										
P8_SaIAthy										
P9_BraNORM										
P10_BraTIO										

NOTE: in verde HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.1

in arancione HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 significativa allo 0.05

in grigio HL derivate da calcolo riduzione % tra C-t0 e P-t4 non significative

Occorre precisare che sebbene per alcune famiglie di PCB non sia stata osservata una riduzione di concentrazione statisticamente significativa tra controlli al t0 e trattamenti al t4, all'interno di ciascuna famiglia ci sono congeneri per cui la riduzione è risultata essere significativa e per i quali è quindi possibile calcolare una *rhizoremediation half-lives* specifica. Considerando altresì l'ipotesi che non sia stata rilevata rimozione significativa delle classi più biodegradabili (mono- e di- cloroPCB) non perché non ci sia stata attività di biodegradazione, ma piuttosto perché le concentrazioni rilevate sono il risultato netto dei processi di rimozione e contemporaneamente produzione di metaboliti parzialmente dechlorurati da parte delle classi a più alta clorurazione, è possibile ritenere che all'aumentare del tempo di rhizoremediation avverrà, con un processo dinamico, la rimozione anche delle classi di PCB basso-clorurati. Questo scenario trova piena conferma nei dati di letteratura di seguito riportati.

10.3 Valori di natural attenuation half-lives derivati dalla letteratura

Le tabelle seguenti (10.4 - 10.6) riportano per confronto i valori di *natural attenuation* HL (anni) PCB, PCDD e PCDF ottenuti dalla letteratura. In particolar modo sono stati presi in considerazione i lavori di (Paasivirta and Sinkkonen, 2009) per PCB e (Sinkkonen and Paasivirta, 2000) per PCDD/F. I valori per PCDD/F riportati ad una temperatura di 7°C sono stati converti a 25°C per coerenza utilizzando la regola del Q10 (un aumento di 10°C della temperatura porta ad una riduzione delle emivite di un fattore 2):

$$HL(25^{\circ}\text{C})=HL(7^{\circ}\text{C})/2^{((25-7)/10)}$$

Eq.4

Tabella 10.4 – Valori di *natural attenuation* HL per le 10 famiglie di PCB (da Paasivirta e Sinkkonen, 2009, media dei congeneri di ogni famiglia)

PCB	Half-lives (anni)	
	<i>Natural attenuation</i>	<i>Rhizoremediation</i> (min-max)
Mono	1	4
Di	1	4-5
Tri	2	4-5
Tetra	5	3-6
Penta	4	4-8
Esa	7	4
Epta	11	5
Octa	16	-
Nona	21	-
Deca	23	-

Tabella 10.5 – Valori di *natural attenuation* HL per i 7 congeneri di PCDD (da Sinkkonen e Paasivirta, 2000, aggiornate alla temperatura di 25°C)

PCDD	Half-lives (anni)	
	<i>Natural attenuation</i>	<i>Rhizoremediation</i> (min-max)
2378-TCDD	30	4-7
12378-PCDD	33	6
123478-HxCDD	79	4-5
123678-HxCDD	18	6-7
123789-HxCDD	23	8
1234678-HpCDD	30	7-16
OCDD	43	-

Tabella 10.6 – Valori di rhizoremediation HL per i 10 congeneri di PCDF da Sinkkonen e Paasivirta, 2000, aggiornate alla temperatura di 25°C)

PCDF	Half-lives (anni)	
	<i>Natural attenuation</i>	Rhizoremediation (min-max)
2378-TCDF	18	7
12378-PCDF	15	5-9
23478-PCDF	18	6
123478-HxCDF	20	7-9
123678-HxCDF	23	6-11
234678-HxCDF	15	6-10
123789-HxCDF	16	7-11
1234678-HpCDF	11	8-16
1234789-HpCDF	10	8-15
OCDF	8	4

10.4 Criteri di selezione dei valori di half-life per la costruzione delle mappe

Le mappe dei tempi di remediation delle aree a diversa contaminazione verranno costruite considerando le *rhizoremediation* HL di due tesi sperimentali selezionate, oltre che le half-lives di *natural attenuation*. Queste due tesi, ovvero P4-Fes+Cuc e P7-Med sono state selezionate in base alla loro capacità di ridurre in modo statisticamente significativo le concentrazioni dei PCB somma rispetto al controllo al t0 del 22% e del 19% rispettivamente. In caso di assenza di half-lives per una certa famiglia o un determinato congenere è stato deciso di considerare:

- 1) Dato relativo ad un'altra tesi dell'esperimento (se presente) perché riflette meglio le condizioni di campo (ovvero la copresenza di altri contaminanti) ed è quindi da preferirsi rispetto a quelle generiche riportate in letteratura riferite a condizioni "ideali".
- 2) Dato derivato dalla letteratura

Le Tabelle 10.7 – 10.9 mostrano i dati di *rhizoremediation* HL selezionati.

Tabella 10.7 – Valori di *rhizoremediation* HL selezionati per PCB

PCB	P4_Fes+Cuc		P7_Med	
	HL (anni)	Note	HL (anni)	Note
Mono	4	FesNORM	4	FesNORM
Di	5	FesNORM	5	FesNORM
Tri	5	Fes+Cuc	5	Med
Tetra	4	Fes+Cuc	3	Med
Penta	4	Fes+Cuc	4	Med
Esa	4	Fes+Cuc	4	Fes+Cuc
Epta	5	Fes+Cuc	5	Fes+Cuc
Octa	8	Letteratura	8	Letteratura
Nona	10	Letteratura	10	Letteratura
Deca	11	Letteratura	11	Letteratura

Come si può vedere dalla tabella i dati mancanti per le due specie selezionate sono stati completati con quelli relativi alla tesi P3_FesNORM per mono e di-PCB per entrambe le tesi. Per Esa e Epta PCB sono stati considerati solo i dati della tesi P4_Fes+Cuc, mentre i valori per Octa, Nona, Deca PCB sono stati ricavati da dati di *rhizoremediation* HL riportati in letteratura (Terzaghi et al., 2018b). In mancanza di specifici dati di letteratura per Octa, Nona e Deca PCB i valori di emivita sono stati stimati da Terzaghi et al., (2018) dai valori di *natural attenuation* half-lives riportate in (Paasivirta and Sinkkonen, 2009) dividendo il valore per 2. Tale assunzione è conservativa

Tabella 10.8 – Valori di *rhizoremediation* HL selezionati per PCDD

PCDD	P4_Fes+Cuc		P7_Med	
	HL (anni)	Note	HL (anni)	Note
2378-TCDD	7	Fes+Cuc	4	FesNorm
12378-PCDD	6	FesNorm	6	FesNorm
123478-HxCDD	4	Fes+Cuc	5	FesNorm
123678-HxCDD	6	FesNorm	6	FesNorm
123789-HxCDD	8	FesNorm	8	FesNorm
1234678-HpCDD	7	FesNorm	7	FesNorm
OCDD	6	Letteratura	6	Letteratura

Anche in questo caso i dati mancanti per le due specie selezionate sono stati completati con quelli relativi alla tesi P3_FesNORM; in particolar modo per la tesi P7_Med, non avendo dimostrato di ridurre in modo statisticamente significativo le concentrazioni per nessuna delle PCDD investigate,

è stato deciso di prendere i dati relativi alla tesi P3_FesNORM. Per OCDD i dati sono stati ricavati dalla letteratura (Mackay, et al., 2006). Questo valore di 6 anni si riferisce ad un dato di *natural attenuation half-life*; esso è quasi un fattore 7 più basso rispetto a quello proposto da (Sinkkonen and Paasivirta, 2000) pari a 43 anni; è stato deciso di utilizzare il valore di 6 anni in quanto molto simile al valore di *half-life* ottenuto confrontando la riduzione di concentrazione di questo congenere nel controllo al t4 rispetto al controllo al t0 (HL pari a 5-8 anni ma riduzione non statisticamente significativa)

Tabella 10.9 – Valori di *rhizoremediation* HL selezionati per PCDF

	P4_Fes+Cuc		P7_Med	
PCDF	HL (anni)	Note	HL (anni)	Note
2378-TCDF	7	PhaNorm	7	PhaNorm
12378-PCDF	8	Fes+Cuc	5	FesNorm
23478-PCDF	6	FesNorm	6	FesNorm
123478-HxCDF	9	Fes+Cuc	7	FesNorm
123678-HxCDF	11	Fes+Cuc	6	FesNorm
234678-HxCDF	10	Fes+Cuc	6	FesNorm
123789-HxCDF	11	Fes+Cuc	7	FesNorm
1234678-HpCDF	8	FesNorm	8	FesNorm
1234789-HpCDF	8	FesNorm	8	FesNorm
OCDF	4	FesNorm	4	FesNorm

Anche in questo caso i dati mancanti per le due specie selezionate sono stati completati con quelli relativi alla tesi P3_FesNORM e P1_PhaNORM (solo per 2378-TCDF). Analogamente alle PCDD per la tesi P7_Med, non avendo dimostrato di ridurre in modo statisticamente significativo le concentrazioni per nessuno dei PCDF investigati, è stato deciso di prendere i dati relativi alla tesi P3_FesNORM (a parte per 2378-TCDF). Nel caso dei PCDF non è stato necessario in nessun caso l'utilizzo del dato di letteratura.

10.5. Stima dell'evoluzione temporale delle concentrazioni per le aree a diversa contaminazione

Per stimare l'evoluzione temporale delle concentrazioni per le aree a diversa contaminazione sono state utilizzate le HL ottenute dalla sperimentazione in serra e i dati di concentrazione di suolo relativi alla FASE 3 e assumendo una cinetica di primo ordine come mostrato dalla formula seguente:

$$C_t (\mu\text{g/kg dw}) = C_{t0} (\mu\text{g/kg dw}) * \exp(-k_D * t) \quad \text{Eq.5}$$

Dove k_D è il rate di degradazione (anni^{-1}) e t è tempo (anni) necessario per raggiungere il limite di legge.

11. Mappe dei tempi di *remediation*

Il calcolo dei tempi di remediation è stato implementato in un programma scritto in Fortran sulla base delle mappe di Fase 3. Il programma applica il rate per ogni famiglia e definisce quindi il tempo necessario per raggiungere la CSC (60 µg/kg dw) e plottando quindi le mappe corrispondenti. Per PCDD e PCDF in calcolo è stato applicato alle concentrazioni naturali di ogni congenere con un TEF (I-TEF) che sono state poi convertite in TEQ per il confronto con il limite di legge (0.00001 mg/kg dw).

Occorre tenere presente che i tempi stimati saranno da considerarsi come dei valori indicativi, che risentono dell'extrapolazione del dato di campo dal dato di serra e quindi soggetti all'influenza di diversi fattori (meteorologici, ambientali, ecologici ecc.).

Le seguenti mappe mostrano i tempi teorici necessari per raggiungere le CSC della tabella A del D. Lgs 152/2006 per PCB, PCDD e PCDF per le aree A e R+T. Esse sono ottenute con i valori stimati di velocità di degradazione con *rhizoremediation* a partire dalle emivite selezionate nel capitolo precedente.

Verranno mostrate le mappe per:

- Natural attenuation (A, R+T)
- P4 - Fes+Cuc (A, R+T)
- P7 - Med (A, R+T)

Dopo ogni mappa è riportato il grafico cumulato delle frequenze di area corrispondente ad un certo tempo necessario per la bonifica, dal quale è possibile ricavare la quota di area (es. 30%) corrispondente al tempo necessario per riportarla alla CSC. Ciò è rilevante per potere selezionare l'intensità dello sforzo di bonifica e/o la specie, la densità di impianto ecc.

Per arsenico e mercurio le mappe non sono state prodotte in quanto i dati ottenuti in serra non permettono di ottenere delle stime affidabili e necessitano di ulteriori indagini.

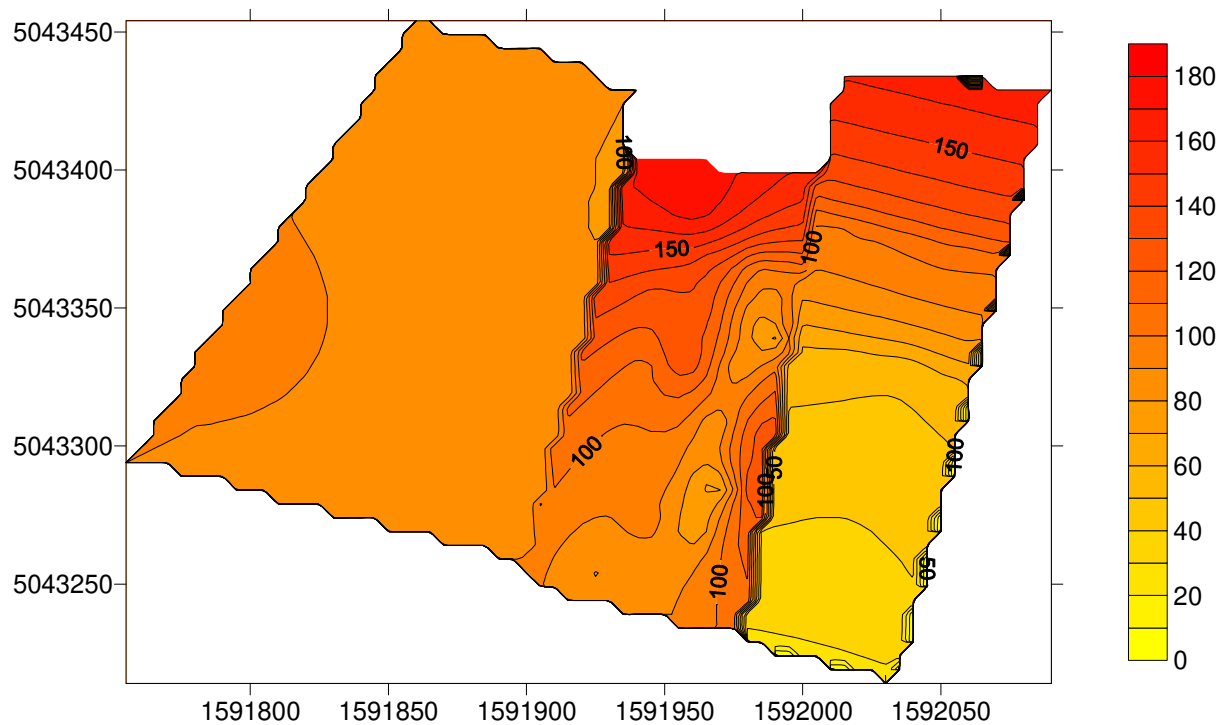


Figura 11.1 – Tempi per raggiungere CSC (60 µg/kg) per l'area A (attenuazione naturale)

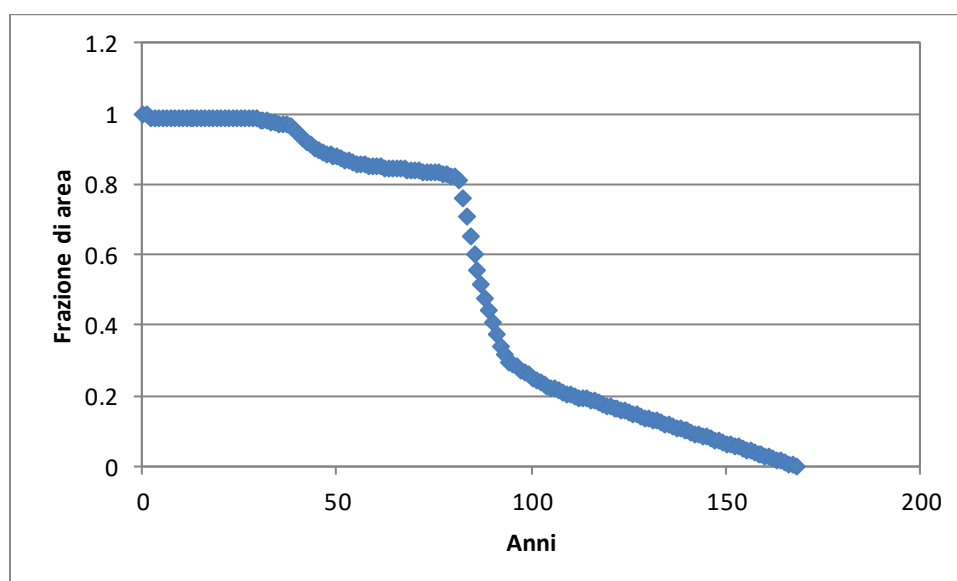


Figura 11.2 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area A (attenuazione naturale)

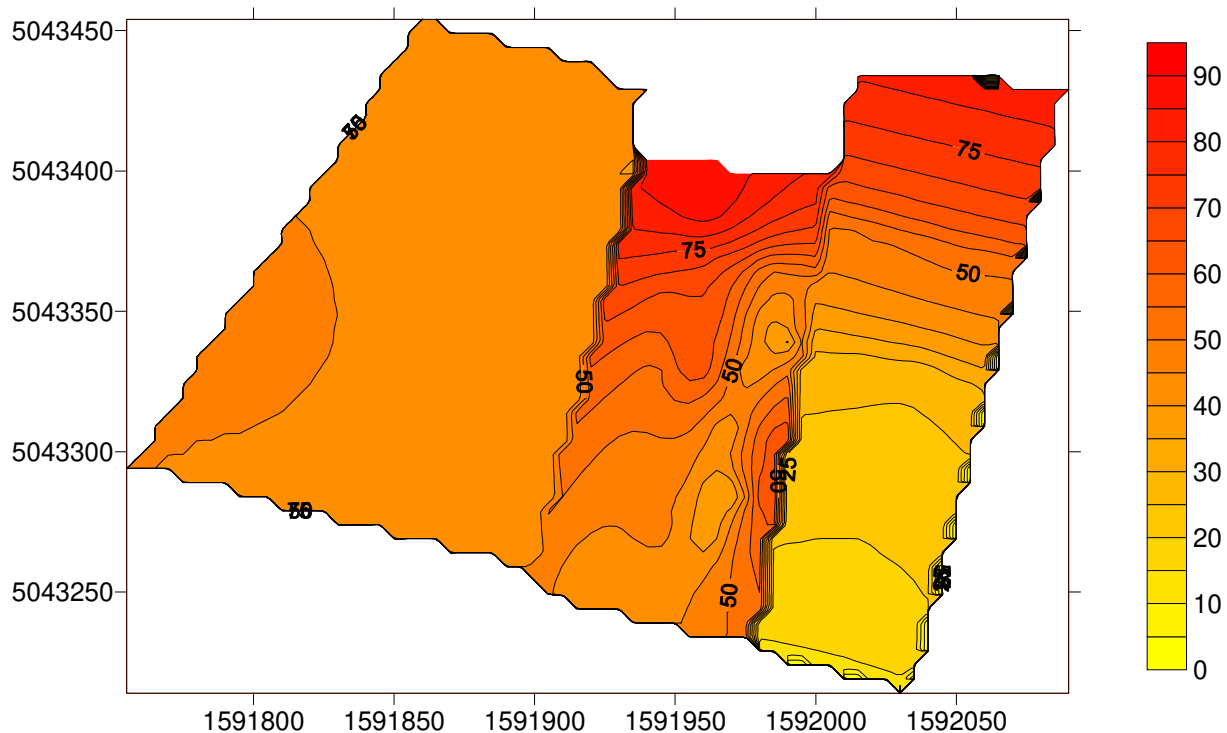


Figura 11.3 – Tempi per raggiungere CSC (60 µg/kg) per l'area A (P4 – Festuca + Cucurbita)

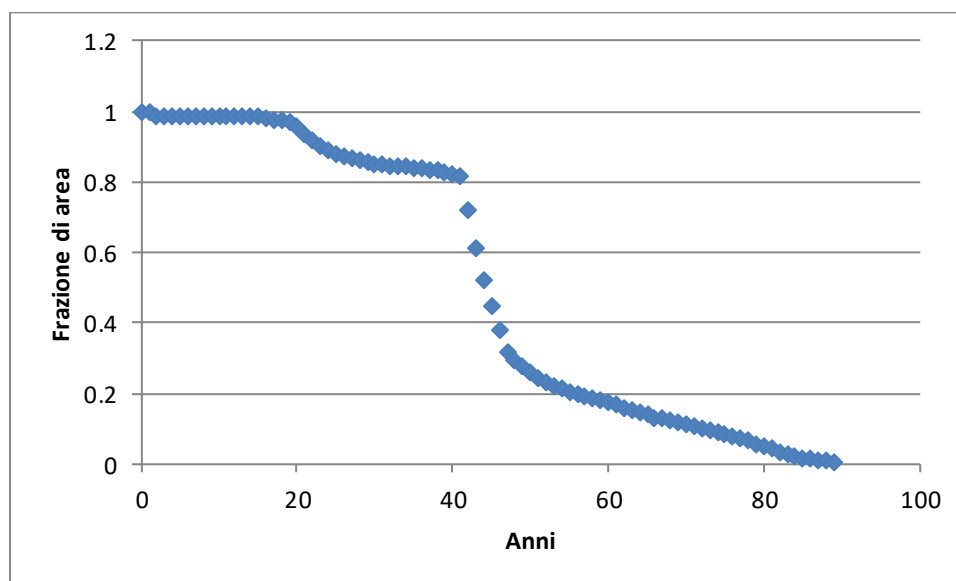


Figura 11.4 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area A A (P4 – Festuca + Cucurbita)

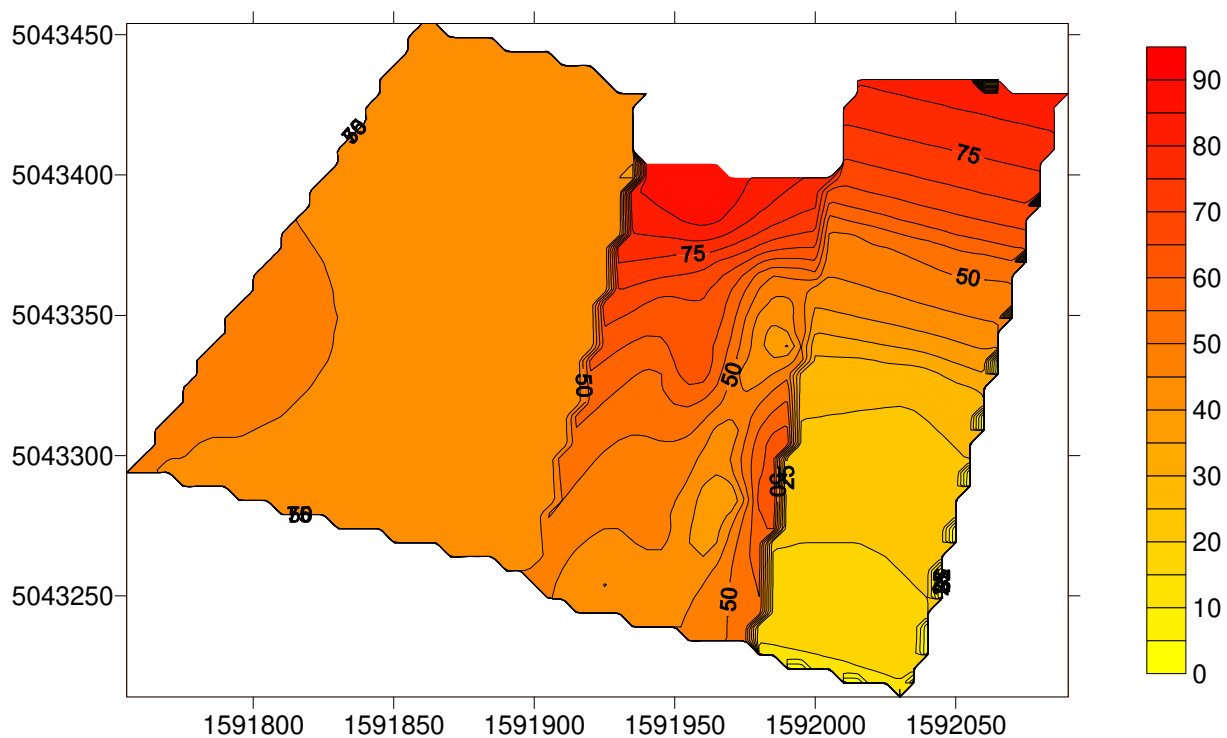


Figura 11.5 – Tempi per raggiungere CSC (60 µg/kg) per l'area A (P7 - Medica)

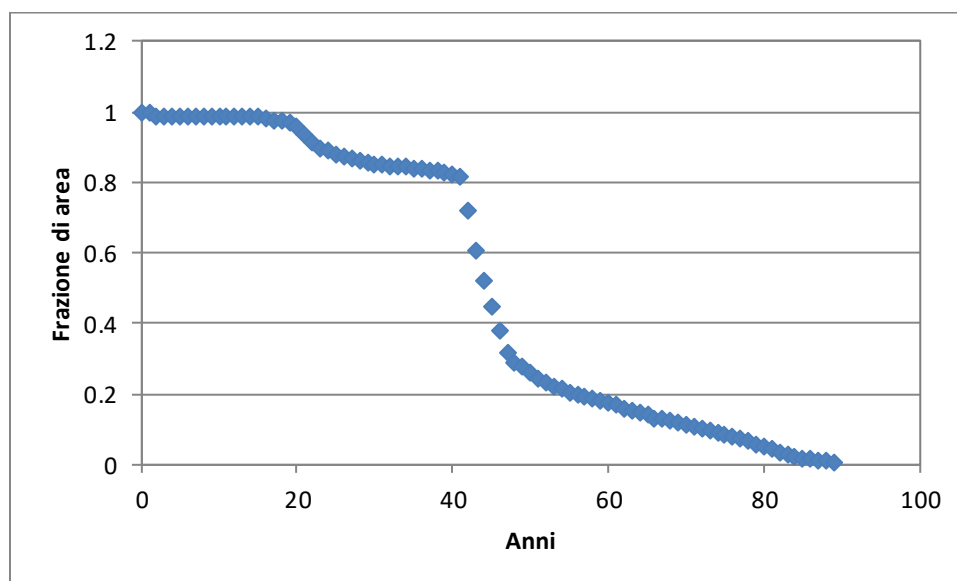


Figura 11.6 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area A (P7 - Medica)

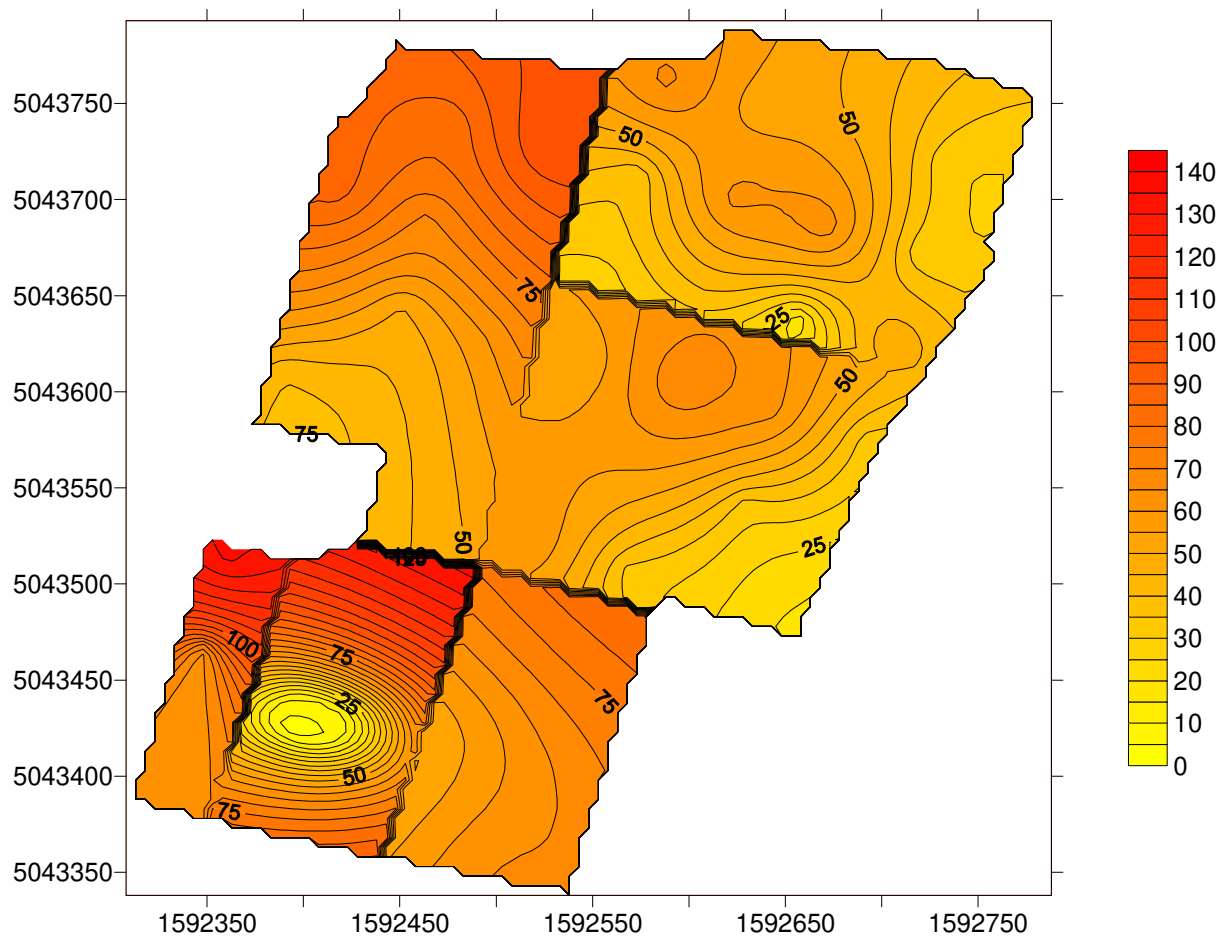


Figura 11.7 – Tempi per raggiungere CSC (60 µg/kg) per aree R+T (attenuazione naturale)

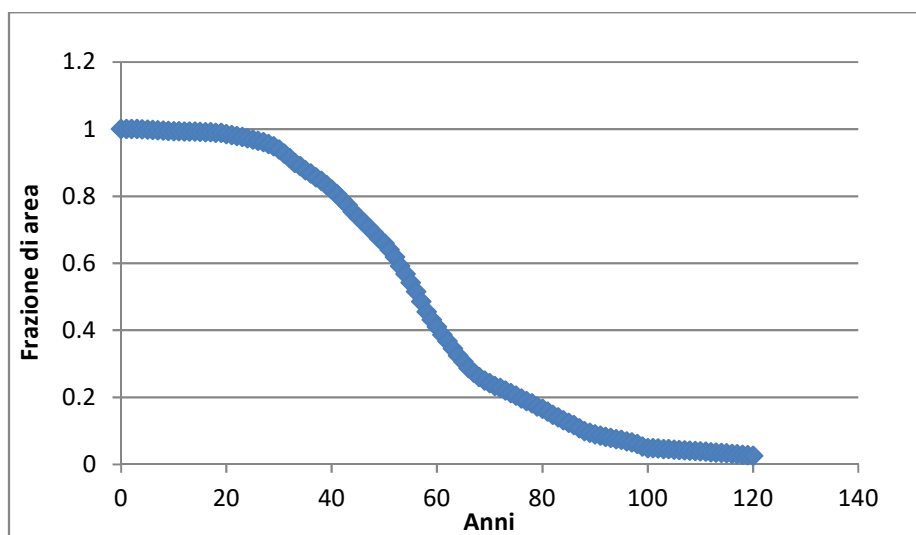


Figura 11.8 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area R+T (attenuazione naturale)

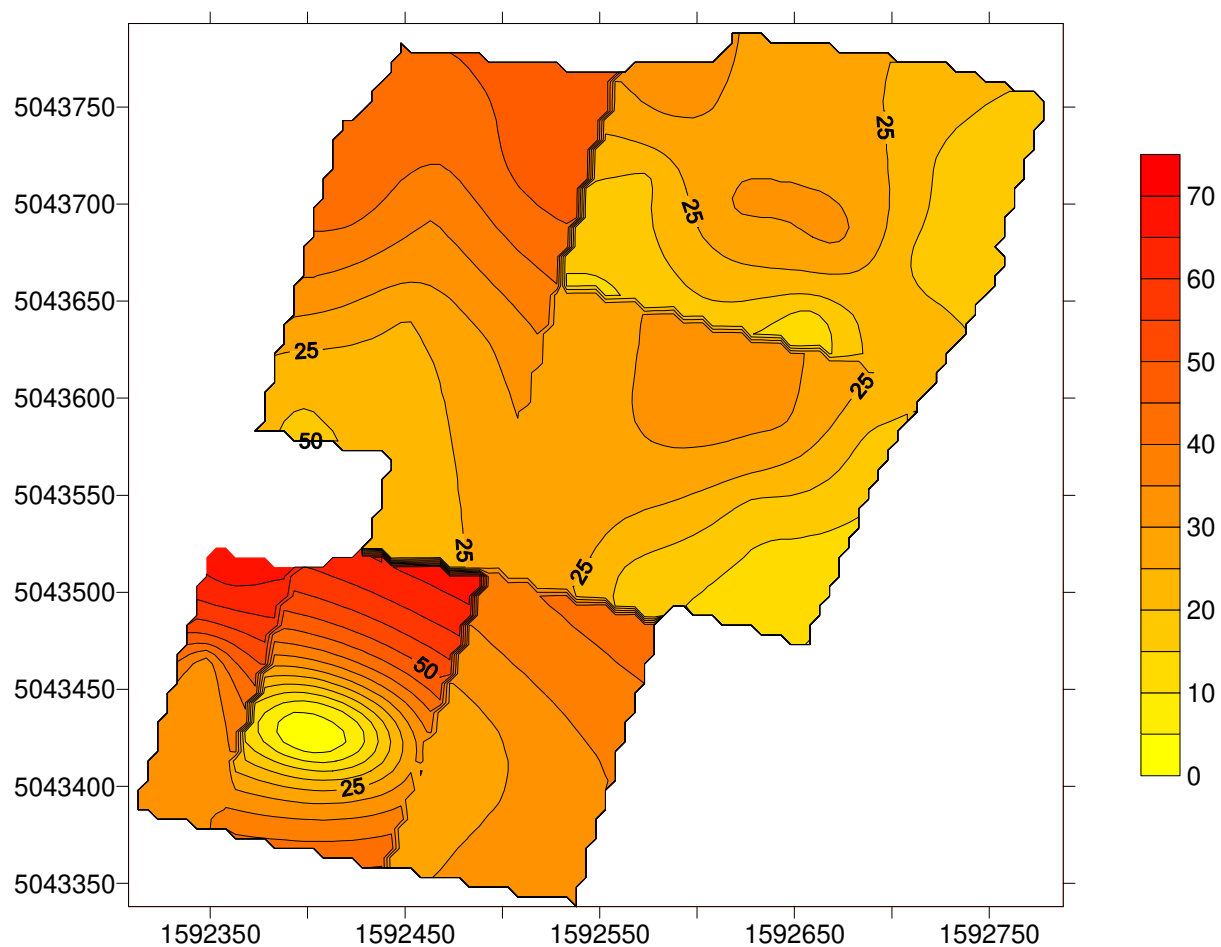


Figura 11.9 – Tempi per raggiungere CSC (60 µg/kg) per aree R+T (P4 – Festuca + Cucurbita)

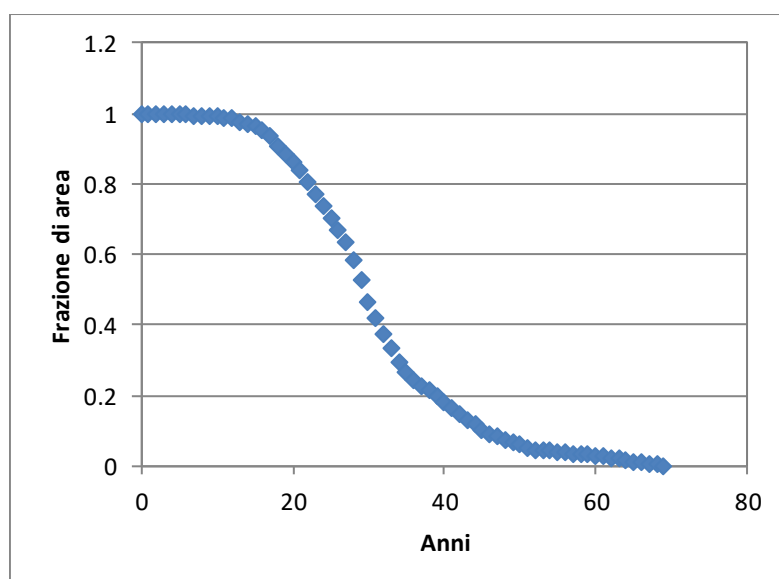


Figura 11.10 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area R+T (P4 – Festuca + Cucurbita)

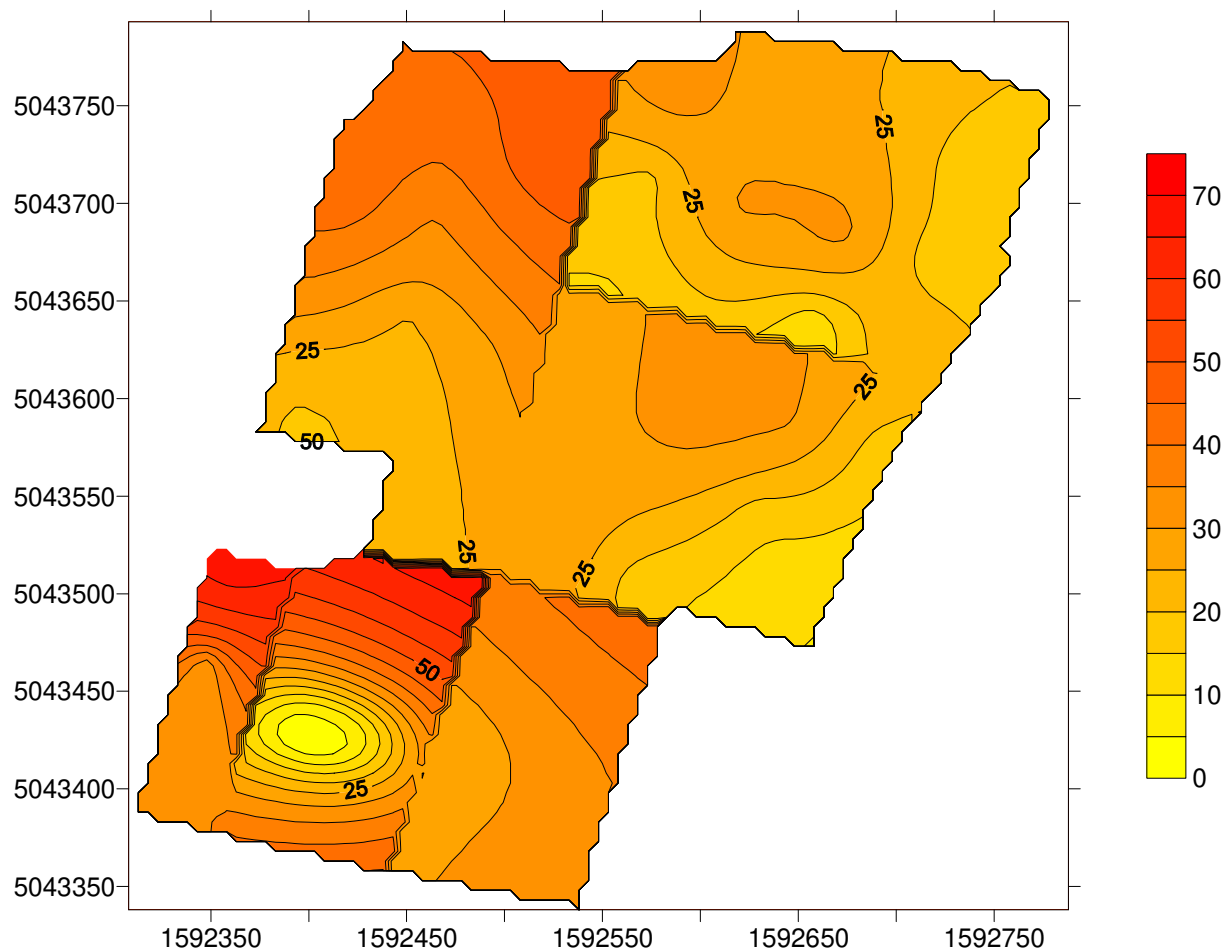


Figura 11.11 – Tempi per raggiungere CSC (60 µg/kg) per aree R+T (P7 - Medica)

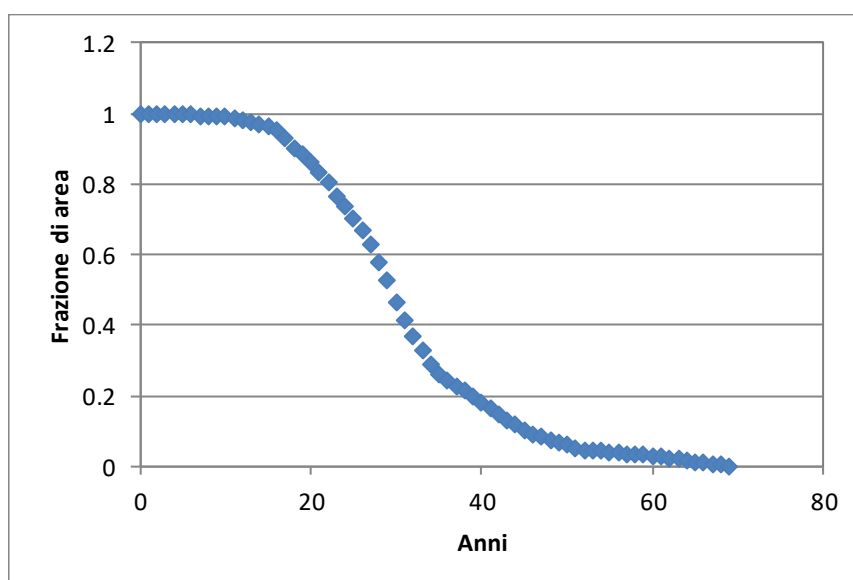


Figura 11.12 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area R+T (P7 - Medica)

Diossine e Furani

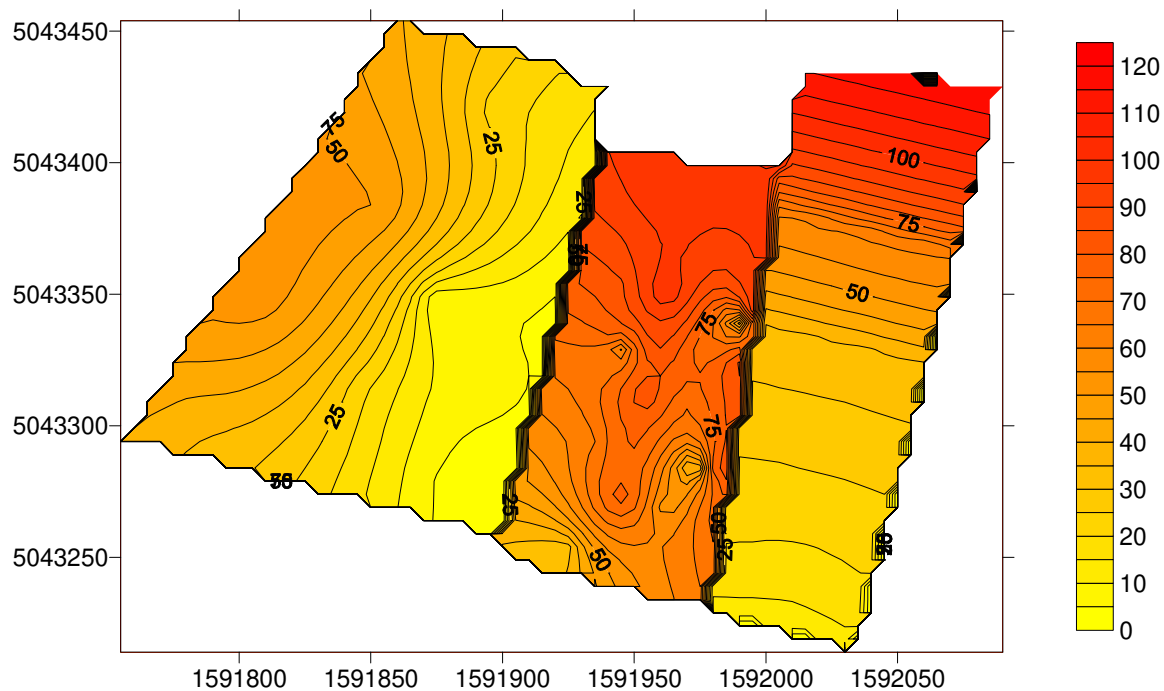


Figura 11.13 – Tempi per la riduzione di diossine e furani ai valori di CSC (10 ng/g TE) nell'area A (attenuazione naturale)

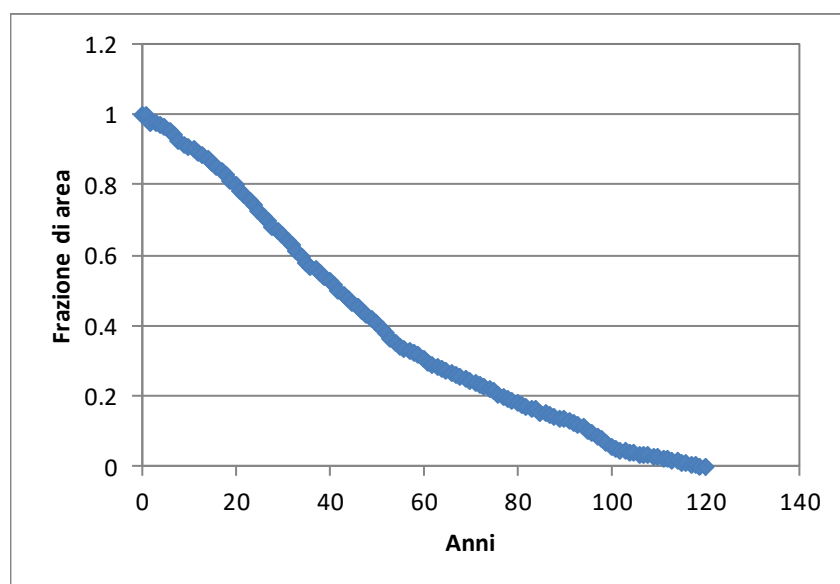


Figura 11.14 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area A (attenuazione naturale)

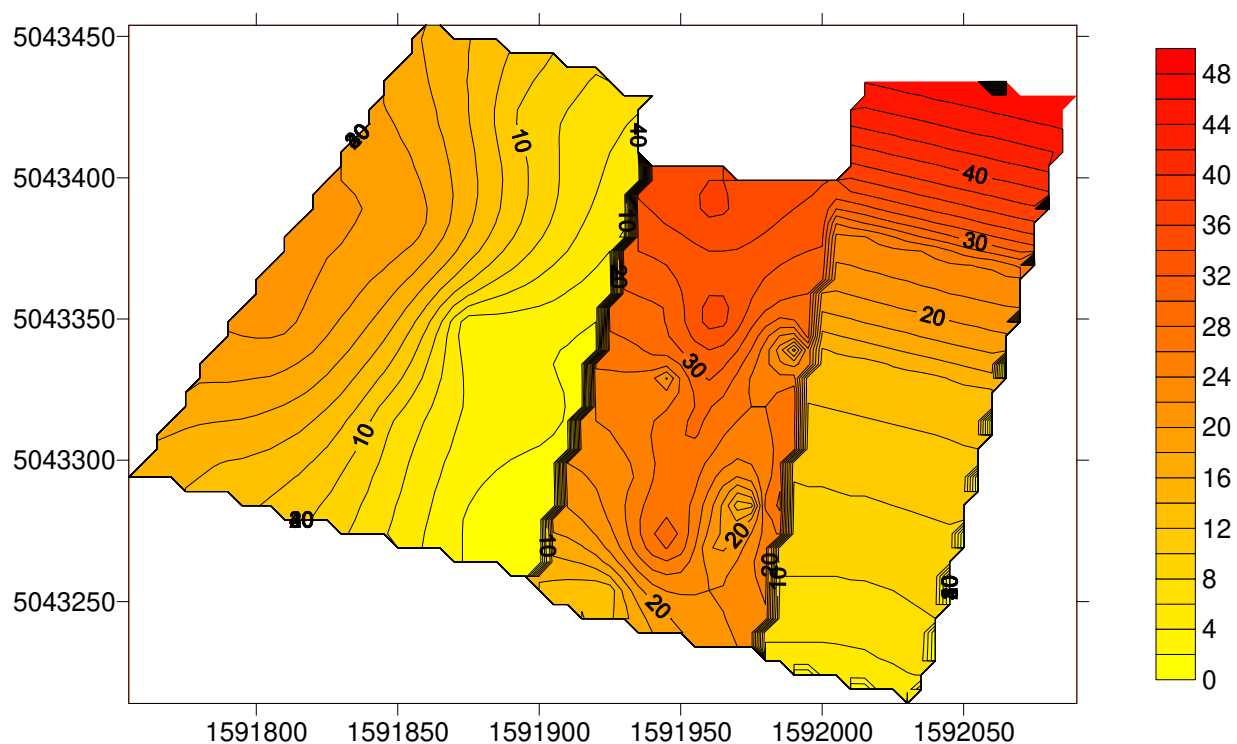


Figura 11.15 – Tempi per la riduzione di diossine e furani ai valori di CSC (10 ng/g TE) nell'area A (P4 – Festuca + Cucurbita)

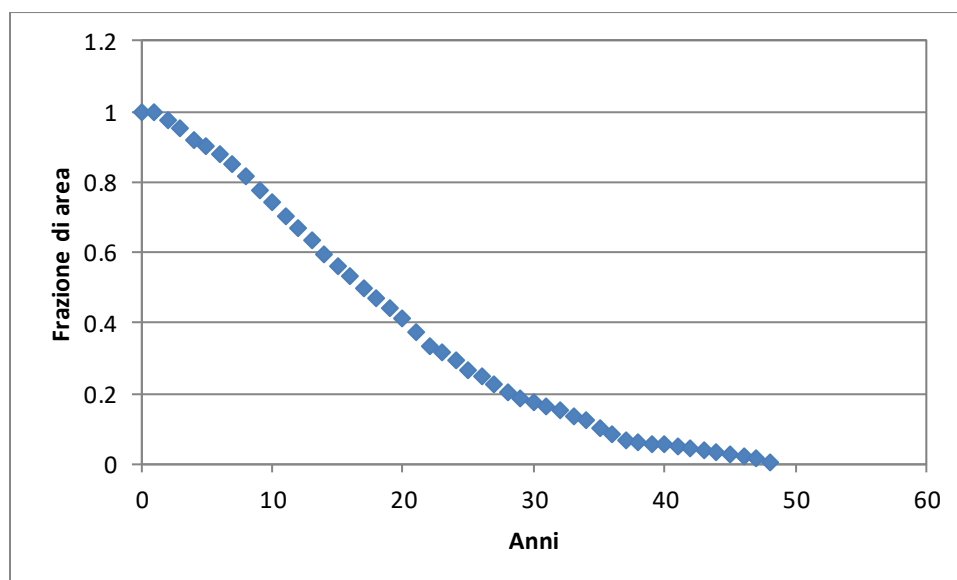


Figura 11.16 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area A (P4 – Festuca + Cucurbita)

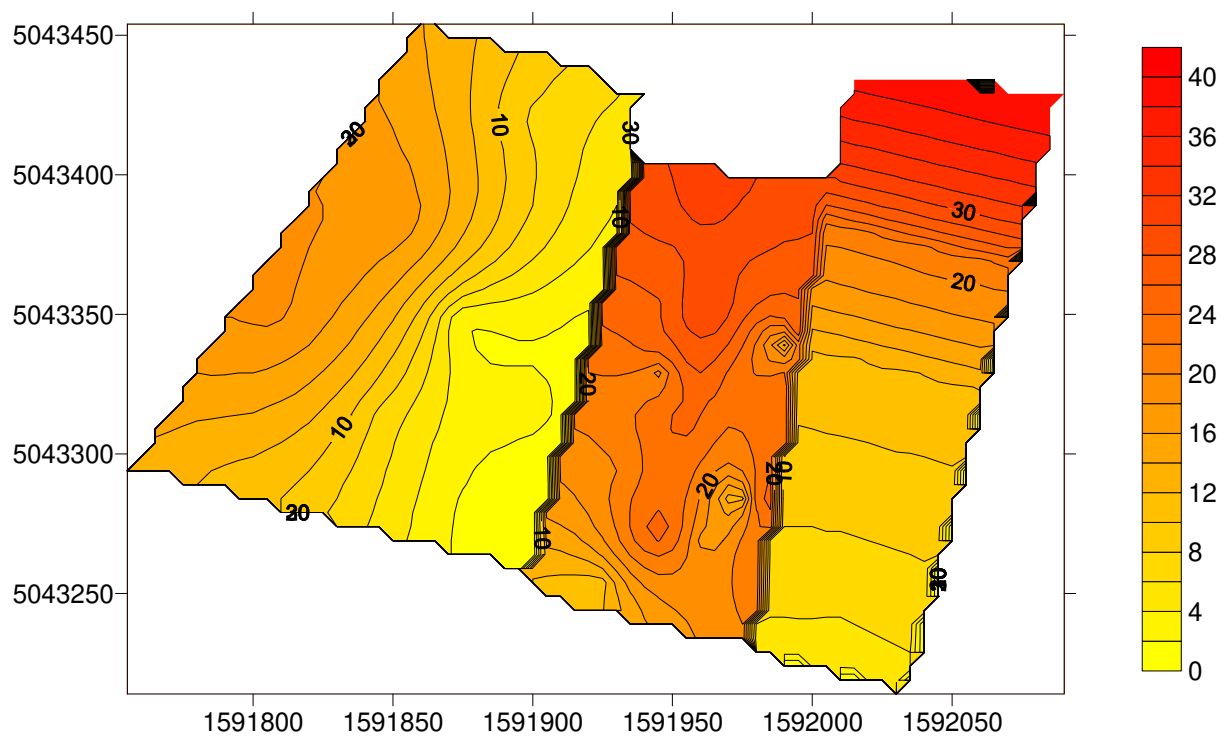


Figura 11.17 – Tempi per la riduzione di diossine e furani ai valori di CSC (10 ng/g TE) nell'area A (P7 - Medica)

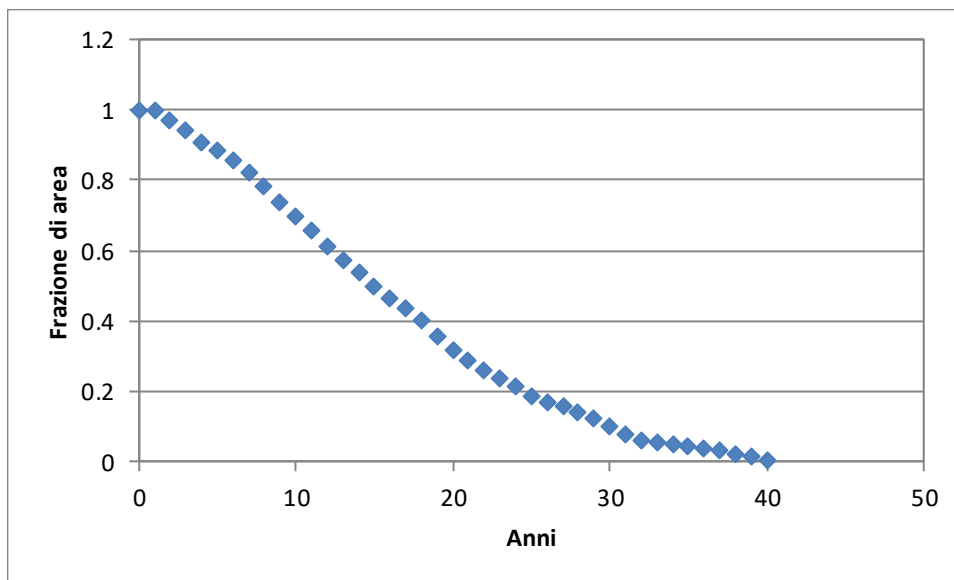


Figura 11.18 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area A (P7 - Medica)

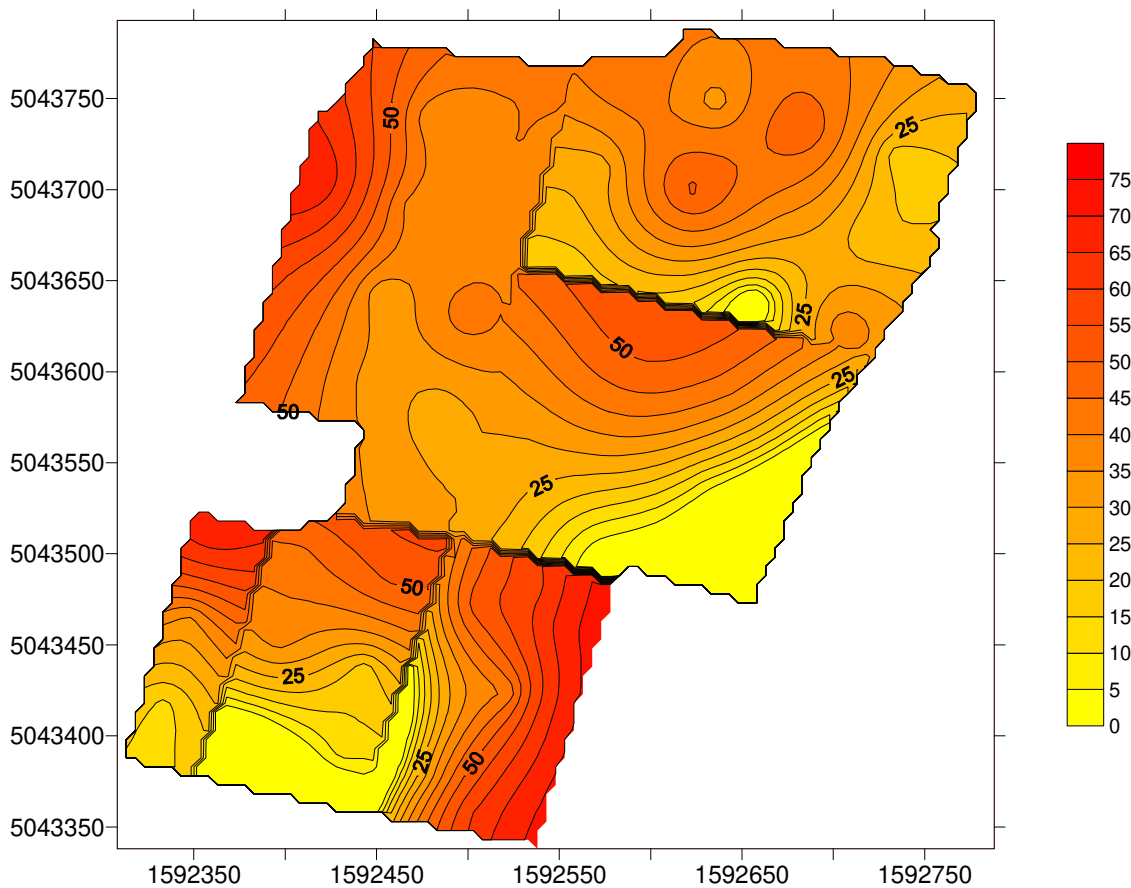


Figura 11.19 – Tempi per la riduzione di diossine e furani ai valori di CSC (10 ng/g TE) nelle aree R+T (attenuazione naturale)

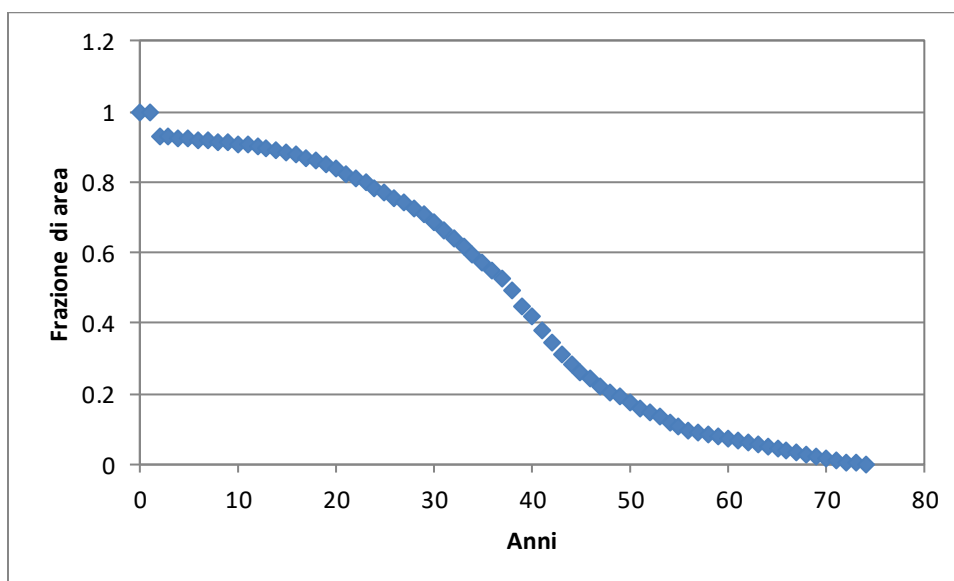


Figura 11.20 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area R+T (attenuazione naturale)

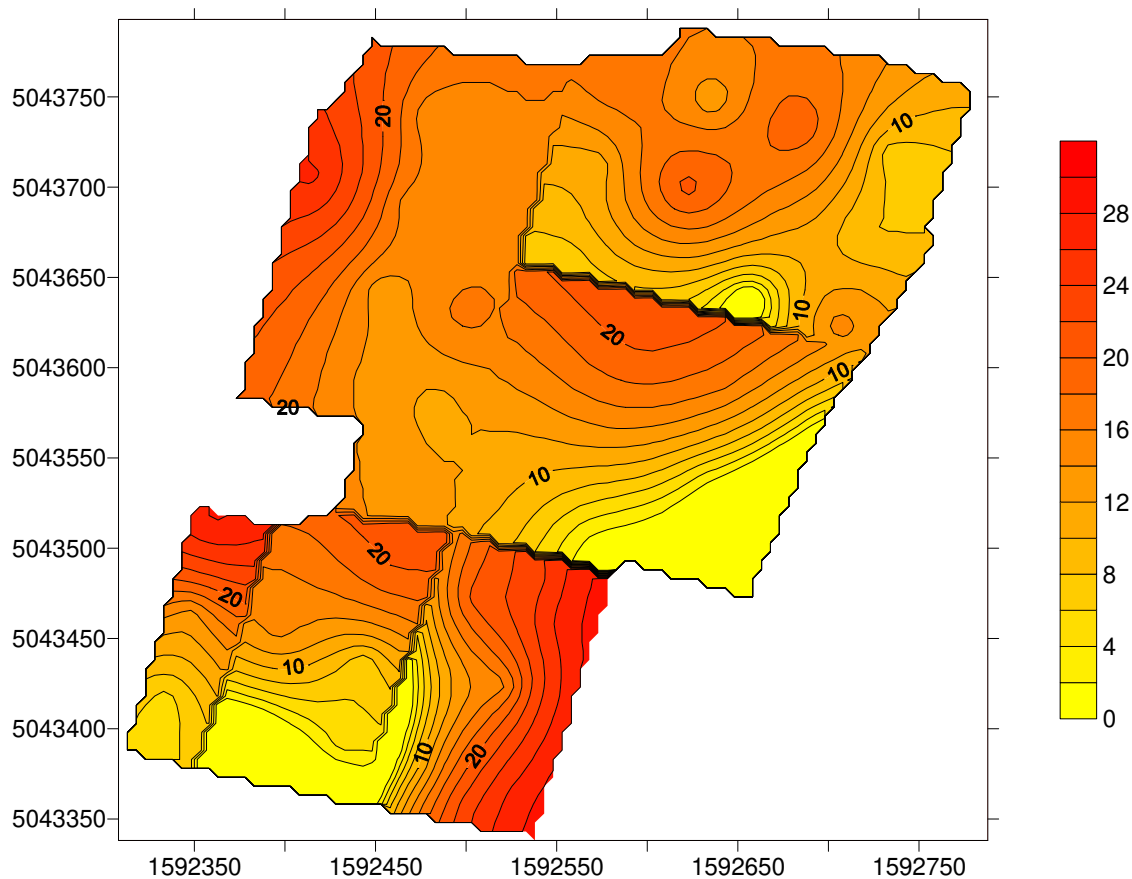


Figura 11.21 – Tempi per la riduzione di diossine e furani ai valori di CSC (10 ng/g TE) nelle aree R+T (P4 – Festuca + Cucurbita)

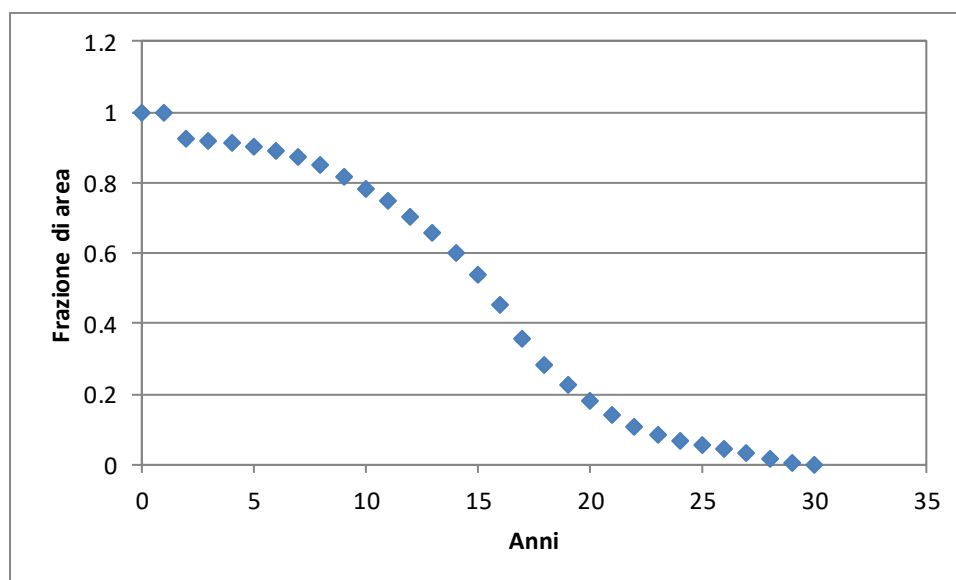


Figura 11.22 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area R+T (P4 – Festuca + Cucurbita)

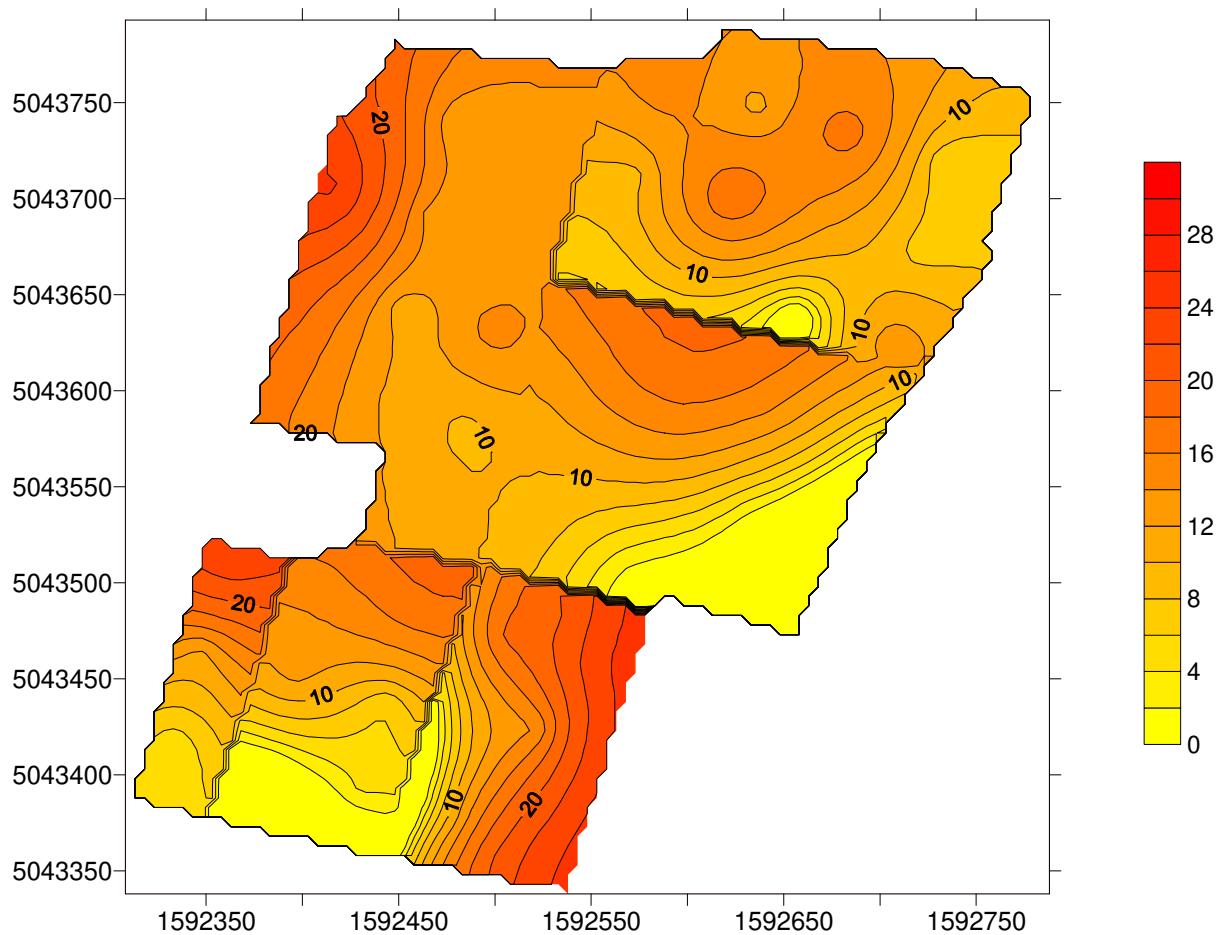


Figura 11.23 – Tempi per la riduzione di diossine e furani ai valori di CSC (10 ng/g TE) nelle aree R+T (P7 – Medica)

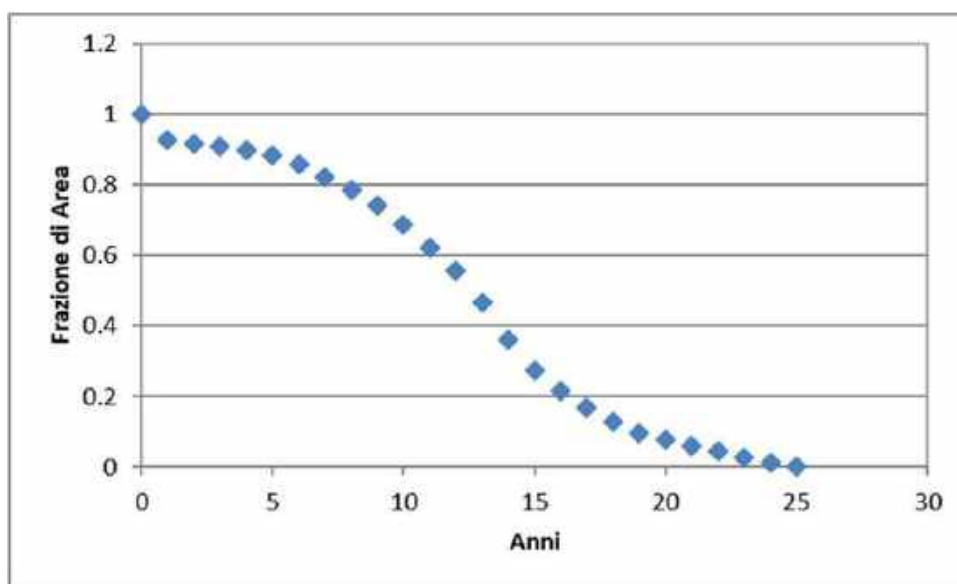


Figura 11.24 – Curva cumulata dei tempi e delle frazioni di area per l'area R+T (P7 - Medica)

12 Conclusioni complessive

L'attività dei consulenti scientifici, insieme al gruppo ERSAF, è servita a impostare le linee guida scientifiche come base per potere attuare azioni di *bioremediation* sulle aree del SIN e potenzialmente anche su altre aree caratterizzate da una contaminazione simile. Per raggiungere tale scopo, sono state implementate numerose attività:

Caratterizzazione della contaminazione in aree campione (A, R e T), prima individuando i contaminanti in modo esaustivo (Fase 1), poi valutando l'approfondimento della contaminazione (Fase 2), e la distribuzione spaziale nei primi 40 cm di suolo predisponendo mappe dettagliate delle concentrazioni spazializzate (Fase 3). Ciò ha permesso di comprendere e quantificare le modalità di distribuzione dei contaminanti in seguito agli eventi di irrigazione oltre a individuare aree a diversi livelli di contaminazione e le associazioni fra i contaminanti. Sono state inoltre determinate in tutte le fasi e nella sperimentazione in serra le altre sostanze che superano la CSC dei terreni residenziali (principalmente DDT, DDE, arsenico, piombo, rame, zinco, oltre al tetracloruro di carbonio, misurato in fase 1,2, 3). Queste sostanze non erano presenti fra quelle oggetto nell'Accordo di Programma (PCB, PCDD, PCDF, mercurio) per le aree agricole. Tuttavia, è stato incluso l'arsenico nelle valutazioni e sperimentazioni, in virtù della sua potenziale fitotossicità alle concentrazioni riscontrate, tali da potenzialmente inficiare la bonifica.

La caratterizzazione microbiologica dei suoli nelle aree campione ha dimostrato l'esistenza di una correlazione tra il profilo della contaminazione e la comunità batterica che si è venuta a selezionare nei suoli, in termini di attività e composizione in specie. Questo dato, unitamente alla rilevazione di batteri potenzialmente in grado di degradare i PCB, dimostra che i suoli nelle aree studiate hanno una potenzialità autodepurativa e potrebbero pertanto, supportare la *bioremediation* mediante *phyto-rhizoremediation*.

Sperimentazione di specie e condizioni di trattamento (dopo esaustiva indagine bibliografica) al fine di impostare un esperimento di *rhizoremediation* in condizioni controllate (in serra) che ha permesso di saggiare l'effetto di *bioremediation* in condizioni realistiche e confrontabili con i suoli del sito. Ciò ha portato alla selezione di alcune specie e condizioni agronomiche che hanno efficacemente stimolato abbondanza, diversità ed attività delle comunità microbiche del suolo e mostrato una maggiore efficacia degradativa per PCB, PCDD e PCDF. Si è altresì dimostrata la necessità di ulteriori indagini e test per migliorare l'efficacia delle specie da utilizzare per la fitoestrazione dei metalli.

I risultati ottenuti in merito all'attivazione microbica e la rimozione delle diverse classi di inquinanti da parte delle specie vegetali saggiate non sono sempre coerenti e soprattutto non risulta un'unica specie avente le migliori potenzialità di *rhizoremediation*. Questo può essere dovuto al fatto che la degradazione di PCB e PCDD/Fs è un processo lento e complesso ed a carico di una minoranza dei microrganismi presenti nel suolo. L'attivazione microbica può pertanto essere registrata prima rispetto alla effettiva misurabile rimozione degli inquinanti, che, in aggiunta, può avvenire con tempistiche diverse per le varie classi chimiche. La validazione di queste ipotesi richiederebbe pertanto un tempo di monitoraggio più lungo rispetto ai 18 mesi della presente sperimentazione.

In base ai risultati ottenuti è stato stabilito il sotto riportato elenco di specie vegetali, con un ordine di rilevanza che tenesse conto del maggior numero di classi di inquinanti rimosse in 18 mesi e come seconda priorità del maggior numero di indicatori microbiologici attivati (in particolare la potenziale capacità degradatrice). L'ordine di rilevanza ha anche tenuto conto di possibili effetti negativi dovuti

alla produzione di particelle mobili in particolare rilevata nel suolo circostante le radici della specie *Medicago*, la cui rilevanza dovrà essere successivamente valutata criticamente.

In base ai risultati della sperimentazione in serra, i trattamenti più promettenti per l'effetto di phyto-rhizoremediation degli inquinanti organici sono risultati i seguenti:

- 1) consociazione *Festuca arundinacea* e *Cucurbita* spp., che ha mostrato di raggiungere i migliori risultati per la rimozione di PCB e PCDD/Fs
- 2) *Medicago sativa*, che ha mostrato di raggiungere i buoni risultati per la rimozione di PCB e attivazione microbica
- 3) *Festuca arundinacea*, che ha mostrato di raggiungere i migliori risultati per la rimozione di PCDD/Fs

In base ai dati ottenuti nella presente sperimentazione non è possibile avere indicazione in merito alla rimozione di metalli e metalloidi, in quanto le piante adottate per questo scopo non sono efficacemente cresciute. Riteniamo tuttavia prioritario ripetere una sperimentazione ad hoc che risolva le problematiche emerse. Riteniamo infatti che una fase di rimozione dei metalli tramite fitoestrazione, oltre a rimuovere questi contaminanti inorganici, possa decisamente migliorare una successiva fase di *rhizoremediation* degli inquinanti organici, riducendo la fitotossicità dei suoli e di conseguenza migliorando la crescita delle piante, collegata positivamente all'attivazione dei microrganismi degradatori.

Tenendo conto della presenza di Arsenico e Mercurio e del loro potenziale fitotossico, si può ipotizzare un trattamento di fitoestrazione iniziale di almeno un paio di anni, almeno nelle aree più contaminate.

Per ristabilire condizioni di fertilità e favorire la *rhizoremediation* per le sostanze organiche uno schema da sperimentare potrebbe essere la seguente rotazione:

- 1) coltivazione di *Medicago sativa* in sovescio per almeno un anno
- 2) semina di *Cucurbita* spp. (poi trinciata prima della produzione di frutti) per favorire una relativa mobilitazione delle sostanze più idrofobiche per renderle più bioaccessibili ai microrganismi degradatori.
- 3) impianto di prato permanente per almeno 4-5 anni con *Festuca arundinacea*.

Una volta messe a punto le condizioni di coltivazione e di smaltimento delle parti aeree contaminate per le piante adatte alla fitoestrazione dei metalli, la loro coltivazione potrebbe essere alternata negli appezzamenti sottoposti alle colture 1) - 3), in modo da costituire un ciclo *rhizoremediation-phytoextraction*. A tal proposito si ricorda l'importanza dell'irrigazione con acqua non contaminata, da dosare eventualmente con impianto a goccia (se tecnicamente fattibile) al fine di minimizzare il flusso di percolazione e da fornire in modo da non limitare la crescita delle piante e dei batteri.

Sviluppo di un modello del destino ambientale che ha permesso di valutare l'importanza dei diversi fenomeni e condizioni che regolano la *rhizoremediation* e il cui adattamento e sviluppo successivo potranno essere un importante ausilio nella valutazione di specifiche opzioni di *bioremediation*.

Valutazione del movimento verticale di PCB e della presenza di metaboliti polari, che necessiteranno di successive indagini per meglio caratterizzare la loro identità, concentrazione, destino ambientale, degradabilità e potenziale di movimento verso le fasi ambientali oltre l'*uptake* nella biomassa vegetale ed animale.

Predisposizione di mappe dei tempi teorici di *rhizoremediation* per le tre aree (per PCB, PCDD e PCDF) a partire dalle mappe di distribuzione di Fase 3 e dalle emivite di degradazione selezionate dai dati ottenuti dall'esperimento in serra. Tali risultati hanno mostrato la capacità della *rhizoremediation* di almeno dimezzare i tempi di bonifica per i PCB rispetto all'attenuazione naturale. Anche per diossine e furani i tempi di bonifica vengono ridotti di due terzi rispetto all'attenuazione naturale. Ciò mostra la fattibilità concreta degli interventi e la potenzialità di un effettivo intervento di messa a punto per ulteriori riduzioni.

Tutto ciò permette di affermare che è possibile, in tempi ragionevoli, ottenere la effettiva *bioremediation* di un sito contaminato così complesso e caratterizzato da una contaminazione da parte di sostanze note per essere fra le più recalcitranti e dotate di caratteristiche importanti in termini di tossicità ed ecotossicità. Tale risultato è importante sia in termini specifici (per la realtà del SIN BRESCIA CAFFARO), che in termini generali perché è uno dei pochi esempi al mondo in cui si dimostra la potenzialità della *rhizoremediation* su una scala così rilevante.

I risultati ottenuti permetteranno di predisporre specifici interventi colturali con le specie selezionate così da verificare e successivamente implementare su scala di campo la *rhizoremediation* al fine di ottimizzare i tempi e gli sforzi necessari.

Tuttavia, così come schematizzato nella sezione seguente, i problemi emersi dall'attività finora effettuata richiederanno ulteriori sforzi e ricerche al fine di mettere a punto le condizioni concrete ed operative della *rhizoremediation* ed affrontare in modo sostenibile la *bioremediation* delle aree:

- Interventi di messa a punto generale
- Indagine sulla presenza e destino dei metaboliti polari
- Messa a punto della fitoestrazione di Mercurio ed Arsenico
- Miglioramento della *rhizoremediation* mediante bioaugmentation

I risultati della sperimentazione, in particolar modo quella condotta in condizioni di serra, descritti nel presente documento supportano la fattibilità di un intervento di *bioremediation* nell'area del SIN Caffaro. Costituiscono inoltre una base per la progettazione di una successiva sperimentazione su scala pilota nelle aree indagate, che potrà gettare le basi per l'applicazione su aree più estese. Si ritiene però doverosa la prosecuzione della sperimentazione in un'attività di "laboratorio permanente", effettuata in campo ed in condizioni di laboratorio, finalizzata a risolvere una molteplicità di problematiche emerse e precedentemente riportate.

13. Questioni aperte e prospettive

Le attività di caratterizzazione e di sperimentazione in serra ed in campo hanno mostrato che le tecniche biologiche, in particolare la *rhizoremediation*, investigate e sperimentate in condizioni controllate di serra, si sono dimostrate efficaci nel ridurre le concentrazioni di PCB, diossine e furani presenti nei suoli. Tali risultati sono importanti se si pensa che le molecole in questione sono POPs (Persistent Organic Pollutants), note per essere particolarmente recalcitranti alla degradazione. I risultati ottenuti hanno tuttavia anche evidenziato alcuni problemi, in particolare relativi alla fitoestrazione dei metalli, mostrando la necessità di procedere a successive indagini.

I risultati della sperimentazione, a causa di limitazioni di budget, sono inoltre stati ottenuti su un numero molto ristretto di tesi sperimentali (combinazioni di piante e trattamenti del suolo) e su un'unica tipologia di suolo, seppur rappresentativo della maggioranza delle aree, caratterizzato da un solo specifico livello di contaminazione. Queste considerazioni ci portano pertanto a ritenere che ci sia la necessità di ulteriori sperimentazioni volte a definire i) più nel dettaglio le condizioni migliori per l'effettiva bonifica dei suoli dell'intera area contaminata, ii) la messa a punto di condizioni più efficaci di fitoestrazione, iii) l'eventuale possibilità di migliorare la *rhizoremediation* mediante bioaugmentation con selezionati batteri degradatori, iv) il destino degli inquinanti e di eventuali metaboliti prodotti dalla biodegradazione.

Tra queste necessità si colloca la richiesta della Conferenza dei Servizi del dicembre 2014, inquadrabile nella valutazione globale del destino ambientale e della degradabilità delle sostanze organiche oggetto di sperimentazione, mentre vi sono aspetti, legati al solo destino ambientale dei metalli (in particolare del mercurio) ed alla possibile interazione con le specie vegetali oggetto di sperimentazione, riferibili a due possibili filoni: aspetti legati alla fitotossicità ed aspetti legati al potenziale accumulo nella biomassa stessa, con eventuale passaggio a forme più mobili e/o bioaccumulabili (es. metil mercurio).

Alcuni dei punti sollevati dalla Conferenza dei Servizi, come la verifica della ripartizione dei contaminanti nelle specie vegetali impiantate per la valutazione del destino dei contaminanti durante gli interventi, sono state già messe in atto, almeno per i contaminanti genitori. Altre, soprattutto quelle legate alla formazione e al destino dei metaboliti ed al ruolo dei metalli, necessitano di ulteriori studi e sperimentazioni in laboratorio ed in situ. Ad esempio, nei suoli contaminati da Hg, i comportamenti del metallo in termini di mobilità e biodisponibilità possono essere diversi, e non per esclusivo effetto della concentrazione totale presente, quanto piuttosto del contorno biogeochimico ambientale, che comprende granulometria del suolo, qualità e quantità della sostanza organica, condizioni redox del sistema, comunità microbica residente. Fra le attività più recenti, il ritrovamento di metaboliti polari dei PCB nel suolo ha mostrato la necessità di ulteriori studi per comprendere la loro natura e tossicità e le loro caratteristiche, in particolar modo per valutare la mobilità nel suolo (ad esempio, valutando la possibilità di percolazione verso la falda, considerando la natura generalmente porosa dei suoli agricoli del SIN) e l'uptake nelle piante, tenendo conto del fatto che i gruppi polari cambiano le proprietà idrofobiche delle sostanze di partenza, potenzialmente rendendo possibile l'uptake e la traslocazione.

Gli interventi di messa a punto e caratterizzazione, che riteniamo prioritari, sono elencati nelle sezioni sottostanti.

13.1 Interventi di messa a punto generale

1. Selezione finale delle specie da impiegare, valutando le efficienze di rimozione ottenibili dalla consociazione Cucurbita+Festuca, di difficile gestione agronomica, a confronto con quelle indotte dalla coltivazione delle singole specie che hanno dato risultati promettenti nella presente sperimentazione in serra: Cucurbita, Festuca, Medicago. Si potrà così valutare se coltivazioni più semplici nei riguardi della gestione agronomica dell'area potrebbero comunque apportare significativi benefici in termini di rimozione degli inquinanti.
2. Necessità di sperimentazioni per valutare l'applicabilità dell'approccio di fito-rhizoremediation sull'intera area del SIN, e su tutti gli inquinanti presenti. L'attuale sperimentazione infatti a) è stata condotta solo su una tipologia di suolo e pertanto non sono disponibili informazioni che consentono di ipotizzare l'efficienza della bioremediation in aree con diversi livelli di contaminazione, b) ha ottenuto risultati solo per gli inquinanti organici in quanto sono stati incontrati problemi legati alla coltivazione delle piante vocate alla fitoestrazione di metalli e metalloidi. Sugeriamo pertanto esperimenti aggiuntivi in scala di laboratorio ed in campo volti alla valutazione di:
 - a. efficienza della degradazione in suoli con diverse concentrazioni di inquinanti ed associazioni di sostanze organiche e metalli);
 - b. quale specie piantumare prioritariamente in campo per la rimozione rispettivamente di metalli e sostanze organiche.
3. Valutazione della distribuzione spaziale e delle tecniche di fitoestrazione/rhizoremediation per le altre sostanze eccedenti le CSC nel suolo (tetracloruro di carbonio, DDT, DDE, piombo, zinco e rame)

13.2 Indagine sulla presenza e destino dei metaboliti polari

1. Indagine sulla formazione e trasformazione di metaboliti polari nel suolo e loro movimento verticale, in scala di laboratorio in colonne di suolo. Infatti, sebbene vi siano diversi studi riguardanti la mobilità dei composti genitori (es. PCB), informazioni in merito ai metaboliti polari, caratterizzati da proprietà chimico-fisiche diverse, sono completamente assenti.
2. Ruolo della biomassa vegetale nella trasformazione degli inquinanti nei diversi metaboliti (uptake nelle radici e traslocazione), al fine di investigare la degradazione dei composti genitori e il passaggio dei metaboliti lungo la catena trofica.
3. Ruolo della biomassa animale (es. lombrichi) nell'uptake e nella trasformazione degli inquinanti, al fine di investigare la degradazione dei composti genitori e il passaggio dei metaboliti lungo la catena trofica.
4. Modellizzazione dell'uptake e del destino ambientale per avere uno strumento predittivo che permetta di stimare gli andamenti temporali e spaziali delle concentrazioni di composti genitori e metaboliti nei diversi comparti ambientali (aria, suolo, acqua, biomassa vegetale ecc.).
5. Verifica della produzione di metaboliti polari da parte di microrganismi degradatori dei PCB isolati dal suolo del SIN Caffaro per identificare i *pathway* degradativi di queste molecole.
6. Studio della tossicità dei metaboliti in confronto con le molecole originarie.
7. Mappatura dei suoli per la valutazione della presenza dei metaboliti naturalmente prodotti dalla *natural attenuation*.

13.3 Messa a punto della fitoestrazione del Mercurio

1. Determinazione del corretto dosaggio del tiosolfato per garantire costante ed efficiente solubilizzazione del mercurio e conseguente *uptake* nella Brassica piuttosto che percolazione mediante esperimenti in laboratorio in condizioni controllate e successivamente con delle prove in campo.
2. Misura della variabilità temporale delle biodisponibilità del mercurio attraverso esperimenti di laboratorio che permettano di valutare i meccanismi e i fattori che aumentano la biodisponibilità del mercurio e comprendere la cinetica di questo fenomeno.
3. Valutazione della formazione del metilmercurio e l'*uptake* nelle piante mediante esperimenti di laboratorio, per investigare il passaggio iniziale di contaminazione della catena trofica; sono infatti scarse le informazioni sul bioaccumulo del mercurio lungo la catena trofica terrestre rispetto a quella acquatica.
4. Misura della volatilizzazione del mercurio (metallico e metilmercurio) (esperimenti in laboratorio) per valutare i flussi e comprendere il suo destino ambientale.

13.4 Messa a punto della fitoestrazione dell'Arsenico

1. Valutazione condizioni di crescita e uptake con la felce *Pteris vittata* (in laboratorio e poi in campo) (specie iperaccumulatrice selezionata in letteratura)
2. Valutazione condizioni di crescita e uptake con la felce *Athyrium filix foemina* (in laboratorio e poi in campo)
3. Misura della variabilità temporale delle biodisponibilità dell'arsenico attraverso esperimenti di laboratorio che permettano di trovare i meccanismi e i fattori che aumentano la biodisponibilità dell'arsenico e comprendere la cinetica di questo fenomeno.

13.5 Miglioramento della rhizoremediation mediante bioaugmentation

1. Test in vaso con diverse piante (Cucurbita, Festuca, Medicago) inoculate (sul suolo e/o sul seme) con ceppi batterici selezionati autoctoni del suolo del SIN, aventi:
 - a. capacità di colonizzare le piante e promuoverne la crescita,
 - b. capacità di degradare i PCB dimostrata in vitro.

Nel caso di Medicago, lo studio dei livelli di colonizzazione da parte di batteri simbiotici azotofissatori e funghi simbiotici micorrizici potrebbe fornire indicazioni circa l'apporto della componente simbiotica all'effetto di *phyto-rhizoremediation*.

Pubblicazioni scientifiche prodotte durante questo progetto

- Di Guardo, A., Terzaghi, E., Raspa, G., Borin, S., Mapelli, F., Chouaia, B., Zanardini, E., Morosini, C., Colombo, A., Fattore, E., Davoli, E., Armiraglio, S., Sale, V.M., Anelli, S., Nastasio, P., 2017. Differentiating current and past PCB and PCDD/F sources: The role of a large contaminated soil site in an industrialized city area. *Environmental Pollution* 223, 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.033>
- Terzaghi, E., Morselli, M., Zanardini, E., Morosini, C., Raspa, G., Di Guardo, A., 2018a. Improving the SoilPlusVeg model to evaluate *rhizoremediation* and PCB fate in contaminated soils. *Environmental Pollution* 241, 1138–1145. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.039>
- Terzaghi, E., Zanardini, E., Morosini, C., Raspa, G., Borin, S., Mapelli, F., Vergani, L., Di Guardo, A., 2018b. Rhizoremediation half-lives of PCBs: Role of congener composition, organic carbon forms, bioavailability, microbial activity, plant species and soil conditions, on the prediction of fate and persistence in soil. *Science of The Total Environment* 612, 544–560. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.189>
- Vergani, L., Mapelli, F., Marasco, R., Crotti, E., Fusi, M., Di Guardo, A., Armiraglio, S., Daffonchio, D., Borin, S., 2017a. Bacteria Associated to Plants Naturally Selected in a Historical PCB Polluted Soil Show Potential to Sustain Natural Attenuation. *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01385>
- Vergani, L., Mapelli, F., Zanardini, E., Terzaghi, E., Di Guardo, A., Morosini, C., Raspa, G., Borin, S., 2017b. Phyto-rhizoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: An outlook on plant-microbe beneficial interactions. *Sci. Total Environ.* 575, 1395–1406. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.218>
- Vitale, C.M., Terzaghi, E., Zati, D., Di Guardo, A., 2018. How good are the predictions of mobility of aged polychlorinated biphenyls (PCBs) in soil? Insights from a soil column experiment. *Science of the Total Environment* 11.

Presentazioni a convegni scientifici, nazionali ed internazionali

2014

Di Guardo A, Raspa G, Borin S, Zanardini E, Morosini C, Armiraglio S, Sale V.M., Anelli S, Nastasio P, Addressing spatial variability of aged pollutants in a large site contaminated by PCBs and other POPs DIOXIN MADRID 2014, 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Maderid August 31st - September 5th 2014.

2015

Mapelli F, Vergani L, Marasco R, Fusi M, Daffonchio D, Borin S. “Spatial pattern of bacterial diversity in a site with mixed and uneven contamination, and assessment of rhizoremediation potential”. BAGECO13 Conference, Milan 14-18 June 2015.

Mapelli F, Vergani L, Marasco R, Chouaia B, Fusi M, Di Guardo A, Raspa G, Zanardini E, Morosini C, Armiraglio S, Anelli S, Nastasio P, Sale V M, Daffonchio D, Borin S. “Spatial pattern of bacterial diversity in a site with mixed and uneven contamination, and assessment of rhizoremediation potential”. Rhizosphere 4 Conference, Maastricht 21-25 June 2015.

Mapelli F, Vergani L, Marasco R, Fusi M, Daffonchio D, Borin S. “Spatial pattern of soil bacterial diversity in a mixed and uneven polluted site and assessment of rhizoremediation potential” Microbial Diversity Conference, Perugia 27-29 October 2015.

2016

Mapelli F, Vergani L, Marasco R, Borin S. “Spatial pattern of soil microbiome in a mixed, uneven and highly polluted site, and assessment of rhizoremediation potential”. 3rd Thünen Symposium on Soil Metagenomics, Braunschweig, 14-16 December 2016.

Vergani L, Mapelli F, Marasco R, Chouaia B, Di Guardo A, Zanardini E, Armiraglio S, Daffonchio D, Borin S. “Microbial facilitators for phytoremediation in PCB polluted soil”. XXI Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, Portici (NA) 14-16 September 2016.

Vergani L. “Pollutant profiles drive spatial pattern of soil bacterial communities” Cortona Procarioti 2016. Cortona, Italy 1 May 2016.

2017

Terzaghi E., Morselli M., Raspa G., Zanardini E., Morosini C., Mapelli F., Borin S., Armiraglio S., Sale V.M., Anelli S., Nastasio P., Di Guardo A. Role of rhizoremediation in modelling PCB fate in an Italian contaminated site, SITE 2017, Napoli, Italy, 12-15 September 2017.

Di Guardo A., Raspa G., Terzaghi E., Borin S., Mapelli F., Zanardini E., Morosini C., Armiraglio S., Sale V.M., Anelli S., Nastasio P. Rhizoremediation of an historical contaminated site in Brescia (Italy): comparing the current emission of PCBs and PCDD/F to air from soil and other sources. SETAC-Europe 2017, Brussels, Belgium, 7-11 May 2017.

Terzaghi E., Morselli M., Raspa G., Zanardini E., Morosini C., Mapelli F., Borin S., Armiraglio S., Sale V.M., Anelli S., Nastasio P., Di Guardo A. Role of rhizoremediation in a complex PCB soil contamination gradient, SETAC-Europe 2017, Brussels, Belgium, 7-11 May 2017.

Vergani L, Mapelli F, Marasco R, Crotti E, Fusi M, Daffonchio D, Borin S. “Bacteria associated to spontaneous plants in a historical PCB polluted soil show potential to sustain natural attenuation”. Microbial Diversity Conference, Bari 24-26 October 2017.

Vergani L, Mapelli F, Marasco R, Crotti E, Fusi M, Daffonchio D, Borin S. “Rhizosphere microbiota harboring PCB degrading potential is associated to spontaneous plants in a highly polluted site“. 6th International Symposium on Biosorption and Biodegradation/Bioremediation, Prague 25-29 June 2017.

Vergani L, Mapelli F, Marasco R, Daffonchio D, Borin S. “The rhizosphere of naturally selected plants shows the potential to sustain natural attenuation processes in an historical PCB polluted soil”. BAGECO 14 Conference, Aberdeen 6-8 June 2017.

2018

Di Guardo A., Raspa G., Terzaghi E., Borin S., Mapelli F., Zanardini E., Morosini C., Armiraglio S., Sale V.M., Anelli S., Nastasio P. Vertical movement of PCBs in agricultural soils impacted by an historical contaminated site: using SoilPlus model to predict discharge, dynamics of movement in soil, and rhizoremediation potential. SETAC-Europe 2018, Rome, Italy, 13-17 May 2018.

Mapelli F., Vergani L., Terzaghi E., Raspa G., Zanardini E., Morosini C., Di Guardo A., Borin S. Soil pollution and physico-chemical properties steer the bacterial community structure in the uneven highly polluted SIN-Caffaro site. SETAC-Europe 2018, Rome, Italy, 13-17 May 2018.

Vergani L., Mapelli F., Terzaghi E., Raspa G., Uhlik O., Zanardini E., Morosini C., Di Guardo A., Borin S. Evaluation of the plant-driven biostimulation of soil microbiota for the setup of a site-tailored rhizoremediation process in a historical PCB polluted soil, SETAC-Europe 2018, Rome, Italy, 13-17 May 2018.

Terzaghi E., Zanardini E., Morosini C., Raspa G., Borin S., Mapelli F., Vergani L., Di Guardo A. Are PCB half-lives obtained in rhizoremediation experiments reliable? Pitfalls in experimental design and suggested guidelines for conducting the experiments. SETAC-Europe 2018, Rome, Italy, 13-17 May 2018.

Vitale C.M., Terzaghi E., Morselli M., Di Guardo A. Dynamic modelling of fluxes of weathered polychlorinated biphenyls (PCBs) in soil: column experiments vs. modelling approaches in realistic environmental conditions. SETAC-Europe 2018, Rome, Italy, 13-17 May 2018.

Vergani L., Mapelli F., Terzaghi E., Raspa G., Ondrej U., Zanardini E., Morosini C., Di Guardo A., Borin S. Rhizoremediation of a historical PCB polluted soil: plant-driven biostimulation of the soil microbiome. 7th European Bioremediation Conference & 11th ISEB Conference, Chania, Greece, June 25 – 28, 2018.

2019

Terzaghi E, Raspa G, Zanardini E, Morosini C, Mapelli F, Vergani L, Borin S., , Armiraglio S, Sale V M, Anelli S, Iavazzo P., Nastasio P, Di Guardo A, SIN Brescia Caffaro: ruolo della rhizoremediation in aree

contaminate da PCB, Diossine e Furani - stima dei tempi di risanamento in presenza di un gradiente di contaminazione complesso, Inviato a SiCon, Brescia, Febbraio 2019.

Vergani L, Mapelli F, Terzaghi E, Raspa G, Zanardini E, Morosini C, Armiraglio S, Lavazzo P, Sale V M, Anelli S, Nastasio P, Di Guardo A, Borin S. “L’importanza del monitoraggio microbiologico nei processi di *bioremediation*: il caso studio della sperimentazione di tecniche di *rhizoremediation* nel SIN Brescia Caffaro”. Inviato a SiCon, Brescia, Febbraio 2019.

Morosini C., Terzaghi E., Zanardini E., Raspa G., Mapelli F., Vergani L., Borin S., Armiraglio S., Sale V.M., Anelli S., lavazzo P., Nastasio P., Di Guardo A. Soil vertical profiles and fate of Hg in different agricultural areas within a large historically contaminated site. Inviato a SETAC-Europe 2019, Helsinki, Finland, 26-30 May 2019.

Terzaghi E., Raspa G., Zanardini E., Morosini C., Mapelli F., Vergani L., Borin S., Armiraglio S., Sale V.M., Anelli S., lavazzo P., Nastasio P., Di Guardo A. Role of rhizoremediation in PCB contaminated areas: remediation time estimation from greenhouse experiment data. Inviato a SETAC-Europe 2019, Helsinki, Finland, 26-30 May 2019.

Terzaghi E., Salina G., Vitale C.M., Di Guardo A. Investigating PCB mobility in soil water after a rhizoremediation experiment: role of different plant species and soil conditions. Inviato a SETAC-Europe 2019, Helsinki, Finland, 26-30 May 2019.

Vitale C.M., Terzaghi E., Di Guardo A., Predicting mobility of hydrophobic organic chemicals in soil: exploring limits and reliability of multimedia fate models. Inviato a SETAC-Europe 2019, Helsinki, Finland, 26-30 May 2019.

Zanardini E., Terzaghi E., Raspa G., Morosini C., Mapelli F., Vergani L., Borin S., Armiraglio S., Sale V.M., Anelli S., lavazzo P., Nastasio P., Di Guardo A. Rhizoremediation half-lives of PCDDs and PCDFs obtained in a greenhouse experiment with seven plant species. Inviato a SETAC-Europe 2019, Helsinki, Finland, 26-30 May 2019.

BIBLIOGRAFIA

- Abramowicz, D.A., 1995. Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 5, 97-99
- ARPA, 2002. Piano di integrazione e approfondimento delle indagini sullo stato del suolo, sottosuolo, falde idriche e acque superficiali nella porzione Sud occidentale del Comune di Brescia in un intorno significativo dello Stabilimento Caffaro SpA. ARPA Lombardia.
- Arpa Lombardia Dipartimento di Brescia, 2015. Sito di interesse nazionale "Brescia – Caffaro" monitoraggio acque sotterranee. Risultati delle indagini geochimiche e Piezometriche. Campagna di giugno 2014. Brescia.
- Bloom, N.S., Preus, E., Katon, J., Hiltner, M., 2003. Selective extractions to assess the biogeochemically relevant fractionation of inorganic mercury in sediments and soils. *Analytica Chimica Acta* 479, 233–248. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01550-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01550-7)
- Demirtepe, H., Kjellerup, B., Sowers, K.R., Imamoglu, I., 2015. Evaluation of PCB dechlorination pathways in anaerobic sediment microcosms using an anaerobic dechlorination model. *Journal of Hazardous Materials* 296, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.033>
- Dhakal, K., Gadupudi, G.S., Lehmler, H.-J., Ludewig, G., Duffel, M.W., Robertson, L.W., 2018. Sources and toxicities of phenolic polychlorinated biphenyls (OH-PCBs). *Environ Sci Pollut Res* 25, 16277–16290. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9694-x>
- Di Guardo, A., Terzaghi, E., Raspa, G., Borin, S., Mapelli, F., Chouaia, B., Zanardini, E., Morosini, C., Colombo, A., Fattore, E., Davoli, E., Armiraglio, S., Sale, V.M., Anelli, S., Nastasio, P., 2017. Differentiating current and past PCB and PCDD/F sources: The role of a large contaminated soil site in an industrialized city area. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.033>
- Fagervold, S.K., May, H.D., Sowers, K.R., 2007. Microbial Reductive Dechlorination of Aroclor 1260 in Baltimore Harbor Sediment Microcosms Is Catalyzed by Three Phylotypes within the Phylum Chloroflexi. *Appl Environ Microbiol* 73, 3009–3018. <https://doi.org/10.1128/AEM.02958-06>
- Fernández-Martínez, R., Rucandio, I., 2014. Total mercury, organic mercury and mercury fractionation in soil profiles from the Almadén mercury mine area. *Environ. Sci.: Processes Impacts* 16, 333-341.
- Field, J.A., Sierra-Alvarez, R., 2008. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environmental Pollution* 155, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.016>
- Grimm, F.A., Hu, D., Kania-Korwel, I., Lehmler, H.-J., Ludewig, G., Hornbuckle, K.C., Duffel, M.W., Bergman, Å, Robertson, L.W., 2015. Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls. *Critical Reviews in Toxicology* 45, 245–272. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.999365>
- IARC, 2015. POLYCHLORINATED AND POLYBROMINATED BIPHENYLS VOLUME 107 (No. 107), IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France.
- Issaro, N., Abi-Ghanem, C., Bermond, A., 2009. Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction. *Analytica Chimica Acta* 631, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.020>
- Kučerová, P., Macková, M., Chromá, L., Burkhard, J., Tríska, J., Demnerová, K., Macek, T., 2000. Metabolism of polychlorinated biphenyls by *Solanum nigrum* hairy root clone SNC-90 and analysis of transformation products. *Plant and Soil* 225, 109–115.

- Liang, Y., Meggo, R., Hu, D., Schnoor, J.L., Mattes, T.E., 2015. Microbial community analysis of switchgrass planted and unplanted soil microcosms displaying PCB dechlorination. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 6515–6526. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6545-x>
- Mackay, D., 2001. *Multimedia Environmental Models: The fugacity approach*. CRC press.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, Kuo-Ching, Lee, S.C., 2006. *Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*, 2nd ed. ed. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- Marek, R.F., Martinez, A., Hornbuckle, K.C., 2013. Discovery of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Sediment from a Lake Michigan Waterway and Original Commercial Aroclors. *Environmental Science & Technology* 47, 8204–8210. <https://doi.org/10.1021/es402323c>
- Martini, F. (Ed.), 2012. *Flora vascolare della Lombardia centro-orientale*. LINT, Trieste.
- McLaren, R.G., Naidu, R., Smith, J., Tiller, K.G., 1998. Fractionation and distribution of arsenic in soils contaminated by cattle dip. *Journal of Environmental Quality* 27, 348–354.
- Meggo, R.E., Schnoor, J.L., 2013a. Rhizosphere redox cycling and implications for rhizosphere biotransformation of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners. *Ecological Engineering* 57, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.052>
- Meggo, R.E., Schnoor, J.L., 2013b. Rhizosphere redox cycling and implications for rhizosphere biotransformation of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners. *Ecological Engineering* 57, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.052>
- Meggo, R.E., Schnoor, J.L., Hu, D., 2013. Dechlorination of PCBs in the rhizosphere of switchgrass and poplar. *Environmental Pollution* 178, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.035>
- Mizukami-Murata, S., Sakakibara, F., Fujita, K., Fukuda, M., Kuramata, M., Takagi, K., 2016. Detoxification of hydroxylated polychlorobiphenyls by *Sphingomonas* sp. strain N-9 isolated from forest soil. *Chemosphere* 165, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.127>
- National Academy of Sciences, 2003. *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications*. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/10523>
- Ortega-Calvo, J.-J., Harmsen, J., Parsons, J.R., Semple, K.T., Aitken, M.D., Ajao, C., Eadsforth, C., Galay-Burgos, M., Naidu, R., Oliver, R., Peijnenburg, W.J.G.M., Römbke, J., Streck, G., Versnoren, B., 2015. From Bioavailability Science to Regulation of Organic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 49, 10255–10264. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02412>
- Paasivirta, J., Sinkkonen, S.I., 2009. Environmentally Relevant Properties of All 209 Polychlorinated Biphenyl Congeners for Modeling Their Fate in Different Natural and Climatic Conditions. *Journal of Chemical & Engineering Data* 54, 1189–1213. <https://doi.org/10.1021/jc800501h>
- Quinete, N., Schettgen, T., Bertram, J., Kraus, T., 2014. Occurrence and distribution of PCB metabolites in blood and their potential health effects in humans: a review. *Environ Sci Pollut Res* 21, 11951–11972. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3136-9>
- Rezek, J., Macek, T., Mackova, M., Triska, J., 2007. Plant metabolites of polychlorinated biphenyls in hairy root culture of black nightshade *Solanum nigrum* SNC-90. *Chemosphere* 69, 1221, Mackova, s://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.090
- Rezek, J., Macek, T., Mackova, M., Triska, J., Ruzickova, K., 2008. Hydroxy-PCBs, Methoxy-PCBs and Hydroxy-Methoxy-PCBs: Metabolites of Polychlorinated Biphenyls Formed In Vitro by Tobacco Cells. *Environmental Science & Technology* 42, 5746–5751. <https://doi.org/10.1021/es800445h>

- Secher, C., Lollier, M., Jézéquel, K., Cornu, J.Y., Amalric, L., Lebeau, T., 2013. Decontamination of a polychlorinated biphenyls-contaminated soil by phytoremediation-assisted bioaugmentation. *Biodegradation* 24, 549–562. <https://doi.org/10.1007/s10532-013-9625-6>
- Seeger, M., Hernández, M., Méndez, V., Ponce, B., Córdova, M., González, M., 2010. Bacterial degradation and bioremediation of chlorinated herbicides and biphenyls. *Journal of soil science and plant nutrition* 10, 320–332.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H., 2004. Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. *Environ. Sci. Technol.* 38, 228A–231A. <https://doi.org/10.1021/es040548w>
- Semplice, M., Ghirardello, D., Morselli, M., Di Guardo, A., 2012. Guidance on the Selection of Efficient Computational Methods for Multimedia Fate Models. *Environmental Science & Technology* 46, 1616–1623. <https://doi.org/10.1021/es201928d>
- Shi, J., Liang, L., Jiang, G., Jin, X., 2005. The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. *Environment International* 31, 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.08.008>
- Shiowatana, J., McLaren, R.G., Chanmekha, N., Samphao, A., 2001. Fractionation of arsenic in soil by a continuous-flow sequential extraction method. *Journal of environmental quality* 30, 1940–1949.
- Sinkkonen, S., Paasivirta, J., 2000. Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Chemosphere* 40, 943–949. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00337-9)
- Smith, K.E., Schwab, A.P., Banks, M.K., 2007. Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Contaminated Sediment. *Journal of Environment Quality* 36, 239. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0089>
- Sun, J., Pan, L., Chen, J., Li, K., Zhu, L., 2018a. Uptake, translocation, and metabolism of hydroxylated and methoxylated polychlorinated biphenyls in maize, wheat, and rice. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 12–17. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7724-8>
- Sun, J., Pan, L., Su, Z., Zhan, Y., Zhu, L., 2016a. Interconversion between Methoxylated and Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls in Rice Plants: An Important but Overlooked Metabolic Pathway [WWW Document]. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00266>
- Sun, J., Pan, L., Zhu, L., 2018b. Formation of hydroxylated and methoxylated polychlorinated biphenyls by *Bacillus subtilis*: New insights into microbial metabolism. *Science of The Total Environment* 613–614, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.063>
- Sun, J., Zhu, L., Pan, L., Wei, Z., Song, Y., Zhang, Y., Qu, L., Zhan, Y., 2016b. Detection of methoxylated and hydroxylated polychlorinated biphenyls in sewage sludge in China with evidence for their microbial transformation. *Scientific Reports* 6, 29782. <https://doi.org/10.1038/srep29782>
- Tehrani, R., Van Aken, B., 2014. Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls in the Environment: Sources, Fate, and Toxicities. *Environ Sci Pollut Res Int* 21, 6334–6345. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1742-6>
- Terzaghi, E., Morselli, M., Semplìce, M., Cerabolini, B.E.L., Jones, K.C., Freppaz, M., Di Guardo, A., 2017. SoilPlusVeg: An integrated air-plant-litter-soil model to predict organic chemical fate and recycling in forests. *Science of The Total Environment* 595, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.252>
- Terzaghi, E., Morselli, M., Zanardini, E., Morosini, C., Raspa, G., Di Guardo, A., 2018a. Improving the SoilPlusVeg model to evaluate rhizoremediation and PCB fate in contaminated soils. *Environmental Pollution* 241, 11380 evaluate rhizoremediation and PCB fate in

- contaminTerzaghi, E., Zanardini, E., Morosini, C., Raspa, G., Borin, S., Mapelli, F., Vergani, L., Di Guardo, A., 2018b. Rhizoremediation half-lives of PCBs: Role of congener composition, organic carbon forms, bioavailability, microbial activity, plant species and soil conditions, on the prediction of fate and persistence in soil. *Science of The Total Environment* 612, 544–560. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.189>
- Ueno, D., Darling, C., Alae, M., Campbell, L., Pacepavicius, G., Teixeira, C., Muir, D., 2007. Detection of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Abiotic Environment: Surface Water and Precipitation from Ontario, Canada. *Environmental Science & Technology* 41, 1841–1848. <https://doi.org/10.1021/es061539I>
- UNEP, 2003. Standardized toolkit for identification and quantification of dioxin and furan releases., UNEP CHEMICALS. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, Geneva, Switzerland.
- Vitale, C.M., Terzaghi, E., Zati, D., Di Guardo, A., 2018. How good are the predictions of mobility of aged polychlorinated biphenyls (PCBs) in soil? Insights from a soil column experiment. *Science of the Total Environment* 11.
- Vives, I., Müller, A., Umlauf, G., Christoph, E.H., Mariani, G., Skejo, H., Cenci, R.M., Sena, F., Beone, G.M., 2008. Levels of PCDD/Fs and trace elements in superficial soils of Pavia Province (Italy). *Environment International* 34, 994–1000. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.03.003>
- Wang, X., Teng, Y., Tu, C., Luo, Y., Greening, C., Zhang, N., Dai, S., Ren, W., Zhao, L., Li, Z., 2018. Coupling between Nitrogen Fixation and Tetrachlorobiphenyl Dechlorination in a Rhizobium–Legume Symbiosis [WWW Document]. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05667>



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

ADDENDUM

a

Linee guida scientifiche per la bonifica biologica delle zone agricole del SIN Brescia- Caffaro

Antonio Di Guardo

Elisa Terzaghi

Elisabetta Zanardini

Cristiana Morosini

Sara Borin

Francesca Mapelli

Lorenzo Vergani

Università degli Studi dell'Insubria

Dipartimento di Scienza ed Alta Tecnologia
(DSAT)

Como

Università degli Studi di Milano

Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la
Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS)

Milano

Giuseppe Raspa

Sapienza Università di Roma

Dipartimento di Ingegneria Chimica Materiali Ambiente
Roma

22 gennaio 2019

Indice

Introduzione

1. Esperimento in campo	3
1.1 Schema sperimentale	3
1.2 Risultati.....	4
1.2.1 Premesse	4
1.2.2 PCB	4
1.2.3 PCDD/F	5
1.2.4 As e Hg.....	6
1.3 Conclusioni	7

Introduzione

In questo documento vengono riportati i risultati finali (circa 27 mesi dalla semina iniziale) ottenuti dalla sperimentazione in campo, non ancora disponibili al momento della consegna del rapporto finale (19 Dicembre 2018). Per facilitare la lettura viene riassunto brevemente il disegno sperimentale. Per maggiori dettagli si rimanda alle pagine 64-70 delle “Linee guida scientifiche per la bonifica biologica delle zone agricole del SIN Brescia- Caffaro”.

1. Esperimento in campo

1.1 Schema sperimentale

Lo schema sperimentale della prova in campo include 24 parcelle di 10 m² ciascuna nell’area A che rappresentano 3 specie di piante erbacee (*Festuca arundinacea*, *Phalaris arundinacea* e *Brassica juncea*) più un controllo non seminato per 6 repliche ciascuno come mostrato in Figura 1.1. I suoli sono stati campionati per la determinazione di PCB, PCDD/F, As e Hg prima dell’inizio della sperimentazione (18 febbraio 2016) e dopo circa 27 mesi dalla semina iniziale (9 luglio 2018). In ogni parcella sono stati raccolti 25 subcampioni (profondità 0-40 cm) secondo una maglia regolare a una distanza di 2 m ciascuno per formare un campione composito, ovvero una sola determinazione per parcella. Ciò è stato fatto a causa delle limitazioni di budget iniziale.

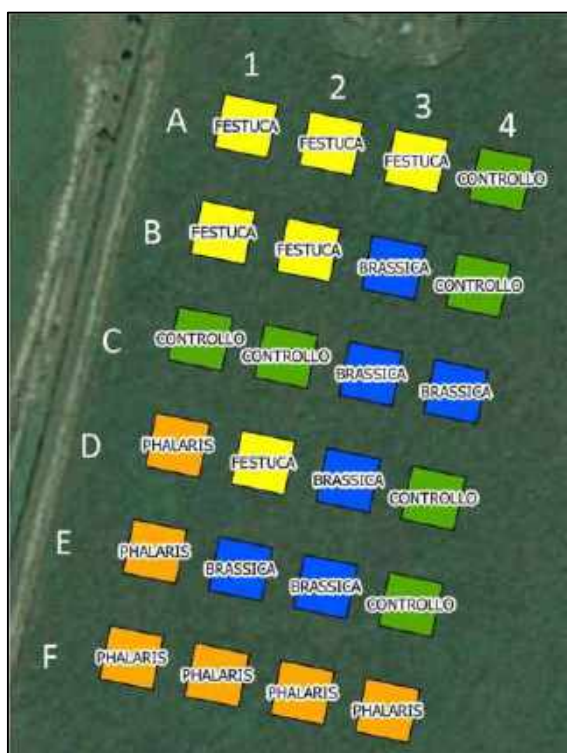


Figura 1.1- Disposizione delle parcelle in campo

1.2 Risultati

1.2.1 Premesse

I dati di concentrazione ottenuti per ogni famiglia di contaminante sono stati elaborati in due modi per verificare la riduzione delle concentrazioni tra tempo iniziale e finale:

1. mediando i singoli valori ottenuti dalle 6 parcelle di ogni trattamento e confrontando i valori medi all'inizio (I) e alla fine della sperimentazione (F);
2. confrontando valore iniziale e valore finale ottenuto per ogni singola parcella.

Nel primo caso è stato possibile applicare un test statistico (t-student) per verificare la significatività statistica o meno della riduzione delle concentrazioni tra tempo iniziale e finale, mentre nel secondo caso ciò non è stato possibile in quanto il confronto effettuato fra il campione iniziale (I) e quello finale (F) della stessa parcella non permette di verificare la significatività delle differenze, in quanto, come detto prima, si confrontano campioni composti ma senza repliche.

In linea generale si può affermare che:

1. quando si mediano i risultati delle 6 parcelle relativi ad ogni trattamento e controllo non si osservano delle riduzioni di concentrazione statisticamente significative in quanto l'elevata variabilità delle concentrazioni fra le repliche (deviazione standard percentuale fino all'80%, 49%, 69%, 76% e 45% per PCB totali, PCDD, PCDF, As e Hg rispettivamente) maschera le possibili diminuzioni.
2. Quando si confronta il dato iniziale e finale misurato nella stessa parcella si osservano delle riduzioni di concentrazione ma come riportato in precedenza nulla si può affermare sulla significatività statistica delle riduzioni stesse.

1.2.2 PCB

La **Figura 1.2** mostra le concentrazioni medie delle famiglie di PCB misurate all'inizio (I) e alla fine (F) della sperimentazione nelle parcelle relative ai 3 trattamenti (rispettivamente piantumati con Brassica, Phalaris, Festuca) e del controllo (non piantumato e non sottoposto ad alcun trattamento tranne le pratiche agricole iniziali di preparazione del suolo effettuate in tutte le parcelle in maniera analoga).

I risultati mostrano che in nessuno caso si può osservare una riduzione statisticamente significativa delle concentrazioni delle varie famiglie di PCB nel tempo (t-student, $\alpha:0.1$), anche eliminando i campioni "outlayer" (A1, A2 e B2 per Festuca, F2 per Phalaris, B3 ed E2 per Brassica e C2 per il controllo) che presentavano valori eccessivamente devianti dalla media.

La **Tabella 1** riporta le percentuali di riduzione (in rosso) della concentrazione tra inizio (I) e fine (F) della sperimentazione per ogni parcella. Sebbene, sia per i trattamenti che per i controlli, si notino in diverse parcelle delle riduzioni per tutte le famiglie di PCB (inclusi i PCB totali), senza differenze tra parcelle piantumate e non piantumate, nulla si può affermare sulla loro significatività statistica come riportato sopra. Ciò mostra la necessità di analizzare più campioni replicati all'interno della stessa parcella, presumibilmente più vicine come concentrazione iniziale, visto il gradiente di concentrazione presente fra le parcelle.

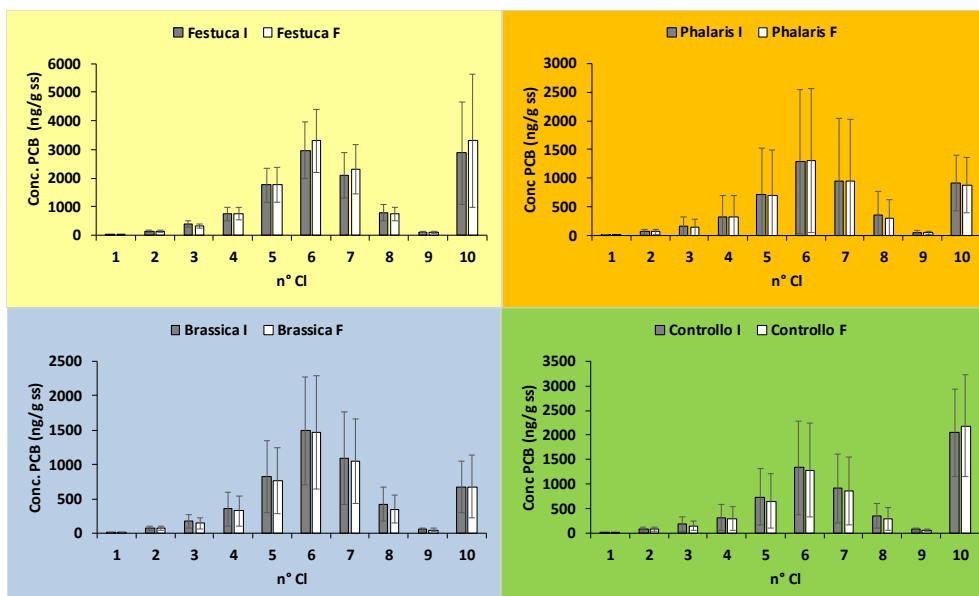


Figura 1.2 – Concentrazioni medie iniziali (I) e finali (F) delle famiglie di congeneri di PCB nelle parcelle dei 3 trattamenti e del controllo

Tabella 1 – Percentuali di riduzione della concentrazione delle famiglie di congeneri di PCB nelle parcelle dei 3 trattamenti e del controllo

	Festuca						Brassica						Phalaris						Controllo					
	A1	A2	A3	B1	B2	D2	B3	C3	C4	D3	E2	E3	D1	E1	F1	F2	F3	F4	A4	B4	C1	C2	D4	E4
PCB totali	21	-3	14	2	7	3	-4	-3	0	-10	-8	-3	6	6	-6	-3	-10	-9	-20	0	-4	-4	2	11
MonoCB totali	-4	-3	3	0	7	-4	-5	10	-17	-36	-10	-5	-10	-3	-12	-13	-10	-34	-27	53	4	18	-7	-26
DiCB totali	4	-6	12	5	5	-10	2	13	-8	-13	-7	-5	-1	0	-1	0	-5	-7	-22	11	-1	6	-6	-1
TriCB totali	-15	-23	-29	-19	-27	-10	-20	-8	-14	-25	-11	-16	-13	-5	-19	-10	-15	-27	-30	-6	-7	-25	-25	-3
TetraCB totali	14	2	2	2	-4	-3	-13	3	2	-14	-12	-7	4	8	-9	0	-5	-6	-24	-5	7	-5	-11	6
PentaCB totali	8	-2	2	-1	4	-1	-7	-7	-6	-11	-8	-3	-1	9	-6	-3	-13	-12	-31	-10	-6	-6	-13	-3
EsaCB totali	18	14	25	0	4	5	3	-2	-13	-9	-1	0	11	7	-3	0	-7	0	-22	-1	0	-1	0	3
EptaCB totali	17	5	26	1	6	5	-2	3	-12	-3	-9	0	10	11	-3	-1	-5	-9	-15	-9	-8	-3	4	-2
OctaCB totali	4	-14	0	-10	-6	-1	-11	-18	-19	-19	-21	-20	-8	4	-7	-19	-15	-12	-31	-19	-22	-13	-9	-6
NonaCB totali	-2	-16	1	-17	-6	-1	-8	-9	-3	-14	-7	-13	-6	6	-7	-8	-9	-20	-13	7	-16	-19	-15	-1
DecaCB	31	-20	17	9	36	15	-4	-5	15	-11	-8	5	9	2	-9	-6	-18	-10	-6	14	-2	1	7	18

1.2.3 PCDD/F

La **Figura 1.3** mostra le concentrazioni medie di PCDD e PCDF misurate all'inizio (I) e alla fine (F) della sperimentazione nelle parcelle dei 3 trattamenti e del controllo. Solo in un caso è stata osservata una riduzione statisticamente significativa delle concentrazioni alla fine della sperimentazione (1,2,3,7,8 PCDD in trattamento con Festuca). Anche eliminando i campioni "outlayer" (A1, A2 E B2 per Festuca, F2 per Phalaris, B3 ed E2 per Brassica e C2 per il controllo), non si osservano altre riduzioni statisticamente significative.

La **Tabella 2** riporta le percentuali di riduzione (in rosso) della concentrazione tra inizio (I) e fine (F) della sperimentazione per ogni parcella; sebbene, sia per i trattamenti che per i controlli, si notino in diverse parcella delle riduzioni per la maggior parte di PCDD e PCDF, anche in questo caso nulla si può affermare sulla loro significatività statistica per i motivi visti sopra.

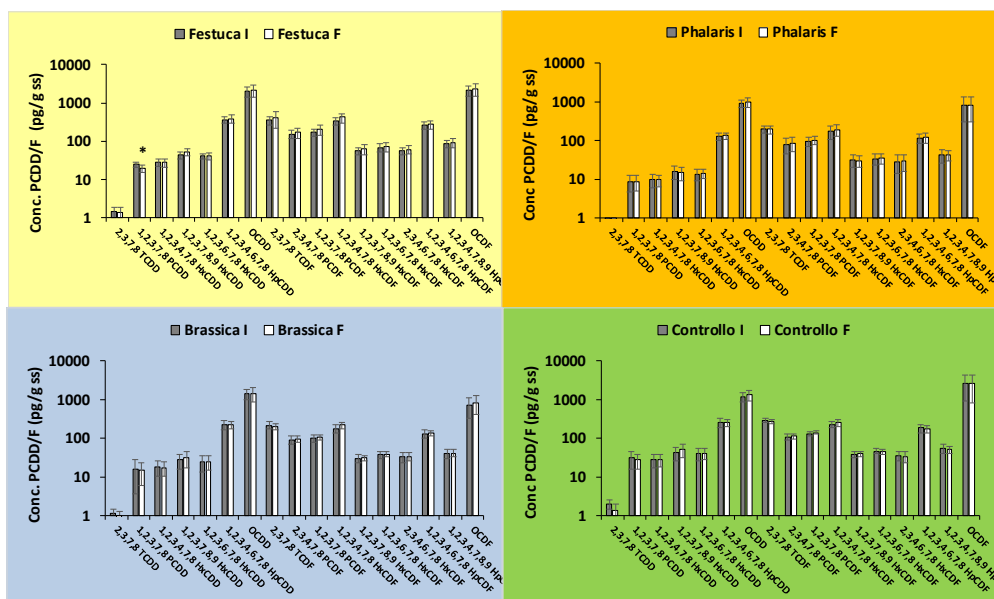


Figura 1.3 – Concentrazioni medie iniziali (I) e finali (F) di PCDD e PCDF (concentrazioni non espresse in TEF) nelle parcelle dei 3 trattamenti e del controllo. (*) riduzione statisticamente significativa tra inizio e fine della sperimentazione

Tabella 2 – Percentuali di riduzione della concentrazione di PCDD e PCDF (non espresse in TEF) nelle parcelle dei 3 trattamenti e del controllo

	Festuca						Brassica						Phalaris						Controllo					
	A1	A2	A3	B1	B2	D2	B3	C3	C4	D3	E2	E3	D1	E1	F1	F2	F3	F4	A4	B4	C1	C2	D4	E4
2,3,7,8 TCDD	44	1	14	-26	3	-42	-21	-51	-4	-9	-73	-13	-12	-26	9	15	-6	-16	-60	-15	-35	-13	-44	-14
1,2,3,7,8 PCDD	-18	-23	-14	-24	-4	-48	2	0	-19	5	-15	48	8	-33	25	18	-3	-5	-22	-17	-8	13	-13	-5
1,2,3,4,7,8 HxCDD	27	-10	1	-22	0	-11	-16	-11	-1	4	-3	5	-10	-2	15	-11	16	1	-8	12	8	-2	7	-1
1,2,3,7,8,9 HxCDD	46	-1	28	7	23	13	6	-5	27	18	16	24	-25	-14	-19	33	19	-12	3	28	35	12	30	6
1,2,3,6,7,8 HxCDD	31	-10	20	-12	2	-11	-9	5	1	3	3	30	-1	-2	10	16	17	0	-11	4	18	-8	18	5
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	26	1	3	-7	10	-3	-7	-4	2	6	4	10	-3	12	4	5	0	-5	-14	-1	2	-2	8	2
OCDD	21	5	13	-5	7	11	41	-16	18	9	-20	-10	16	11	10	9	-9	16	-6	-5	5	47	1	12
2,3,7,8 TCDF	19	-6	16	-9	47	-6	0	-6	-13	-16	-9	11	1	17	-5	-12	-10	-4	-12	1	-2	-18	-2	0
2,3,4,7,8 PCDF	21	-1	26	-2	20	0	8	2	-7	-8	-2	50	0	29	7	-1	4	15	-11	10	5	3	3	12
1,2,3,7,8 PCDF	31	12	35	8	27	-2	8	7	6	-10	0	28	15	23	7	0	-1	8	-8	15	12	4	7	7
1,2,3,4,7,8 HxCDF	37	11	41	11	35	21	25	24	10	22	8	57	23	5	23	8	8	12	0	16	12	18	17	9
1,2,3,7,8,9 HxCDF	33	3	27	-4	8	1	1	4	2	-8	-15	37	11	-20	8	-6	-11	7	2	3	6	-1	6	11
1,2,3,6,7,8 HxCDF	14	0	19	-1	11	-5	-3	2	3	0	-4	37	11	-4	4	-4	-3	12	-11	-4	-5	-7	2	2
2,3,4,6,7,8 HxCDF	18	3	19	4	7	2	5	-2	3	-4	-8	29	10	9	9	-4	-15	10	-15	-7	-2	3	-12	3
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	15	-2	14	0	12	-6	-1	-4	2	-2	-8	29	5	14	10	2	-10	3	-13	-7	5	-8	2	4
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	26	-1	21	-9	9	-6	-3	-2	11	-5	-9	20	9	-17	31	-9	7	-5	-6	3	-11	-11	5	2
OCDF	25	-5	18	-11	12	-2	-14	4	13	-15	5	203	7	7	-26	-1	12	-3	-2	-5	4	-26	-1	18

1.2.4 As e Hg

La **Figura 1.4** mostra le concentrazioni medie di As e Hg misurate all'inizio (I) e alla fine (F) della sperimentazione nelle parcelle dei 3 trattamenti e del controllo. In nessuno caso è stata osservata una riduzione statisticamente significativa delle concentrazioni di As e Hg nel tempo (t-student, $\alpha:0.1$), anche eliminando i campioni "outlayer" (A1, A2 E B2 per Festuca, F2 per Phalaris, B3 ed E2 per Brassica e C2 per il controllo).

La **Tabella 3** riporta le percentuali di riduzione (in rosso) della concentrazione tra inizio (I) e fine (F) della sperimentazione per ogni parcella; in questo caso solo per poche parcella si nota una diminuzione delle concentrazioni di As ed Hg alla fine della sperimentazione, senza differenze tra parcella piantumate e non piantumate. Nulla si può tuttavia affermare sulla loro significatività statistica per i motivi visti sopra.

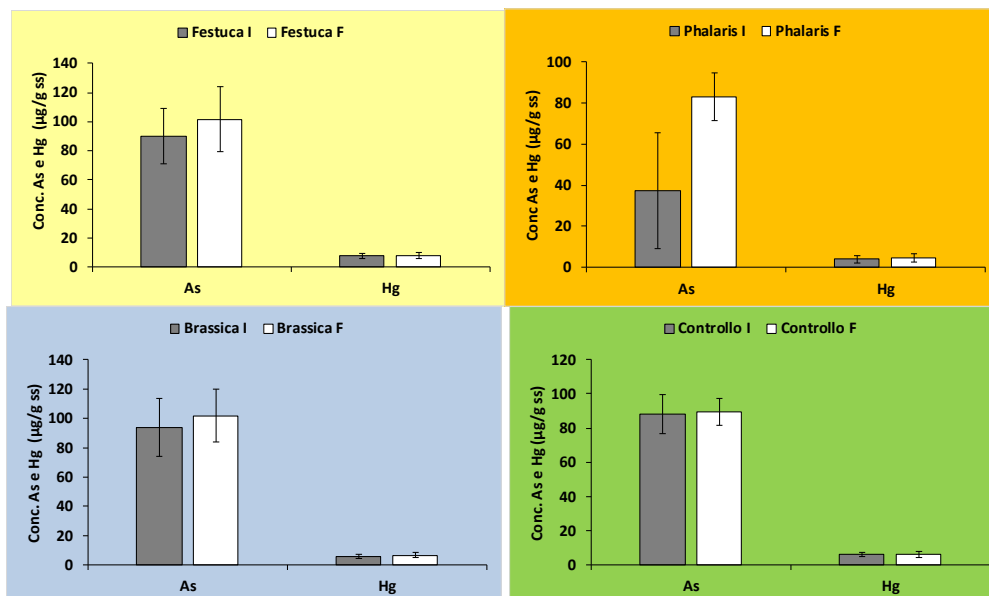


Figura 1.4 – Concentrazioni medie iniziali (I) e finali (F) di As e Hg nelle parcella dei 3 trattamenti e del controllo

Tabella 3 – Percentuali di riduzione della concentrazione di As e Hg nelle parcella dei 3 trattamenti e del controllo

	Festuca						Brassica						Phalaris						Controllo					
	A1	A2	A3	B1	B2	D2	B3	C3	C4	D3	E2	E3	D1	E1	F1	F2	F3	F4	A4	B4	C1	C2	D4	E4
As	17	16	13	17	8	7	6	6	14	-1	4	23	3	22	358	317	272	399	-3	3	10	2	5	-6
Hg	-2	-15	-7	-19	19	30	16	8	33	12	22	33	18	-3	41	10	24	5	-7	-1	12	10	17	-26

1.3 Conclusioni

L'elevata variabilità iniziale delle concentrazioni degli inquinanti nel suolo delle diverse parcella delle repliche non ha permesso di osservare delle riduzioni medie statisticamente significative tra l'inizio e la fine della sperimentazione per nessuna delle tesi sperimentate (tranne per 1,2,3,7,8 PCDD con Festuca). Confrontando le concentrazioni rilevate in ciascuna singola parcella all'inizio e alla fine della sperimentazione, si osservano delle riduzioni di concentrazione alla fine della sperimentazione in un numero elevato di parcella per gli inquinanti organici (PCB, diossine, furani) ed in un numero inferiore di parcella per As ed Hg. Non si rileva in nessun caso alcuna differenza tra parcella piantumate e non piantumate (controllo), coerentemente con i risultati ottenuti dall'analisi microbiologica dei suoli. Tuttavia, nulla si può affermare sulla significatività statistica delle riduzioni, dato che non sono stati analizzati campioni replicati di suolo all'interno della stessa parcella. Tuttavia i dati qui presenti potranno essere utili per programmare successive sperimentazioni con le specie selezionate per verificare l'effettiva riduzione in campo degli inquinanti.