

# AREA DI INTERESSE RILEVANTE BAGNOLI - COROGLIO (NA)

D.P.C.M. 15.10.2015

Interventi per la bonifica ambientale e rigenerazione urbana dell'area di Bagnoli - Coroglio.



Presidenza del Consiglio dei Ministri  
IL COMMISSARIO STRAORDINARIO DEL GOVERNO  
PER LA BONIFICA AMBIENTALE E RIGENERAZIONE URBANA  
DELL'AREA DI RILEVANTE INTERESSE NAZIONALE  
BAGNOLI - COROGLIO



ATTIVITA' TECNICHE



RESPONSABILE UFFICIO TECNICO:  
Dott. Ing. Massimo MATTEOLI

RESPONSABILE UNICO DEL PROCEDIMENTO: DOTT. ING. LORENZO MORRA  
CODICE DI COMMESSA : 2015E051INV

## PROGETTAZIONE AMBIENTALE :

Dott. Ing. Daniele BENOTTI  
Dott. Ing. Edoardo ROBORTELLA STACUL  
Dott. Ing. Massimiliano ZAGNI  
Dott.ssa Federica MERINGOLO  
Geom. Alessandro FABBRI  
Dott. Ing. Davide GRESIA

## ELABORATI GRAFICI:

Arch. Emanuela SALA

## RELAZIONE GEOLOGICA:

Dott. Geol. Marco DI PILLO

## COMPUTI E STIME :

Geom. Gennaro DI MARTINO

## PROGETTISTA DELLA SICUREZZA:

Dott. Ing. Daniele BENOTTI

COORDINAMENTO TECNICO SCIENTIFICO :  
**UNIVERSITA' DEL SANNIO**



## ESECUZIONE DI TEST PILOTA PER INTERVENTO DI BIO-PHYTOREMEDIATION

## RELAZIONE TECNICA

REVISIONE	DATA	AGGIORNAMENTI	SCALA	TAV.
			VARIE	RT
			CODICE FILE	DATA
				Luglio 2016

**PROGETTO DI SPERIMENTAZIONE PER L'APPLICAZIONE  
DELLA TECNICA DI BONIFICA DI BIO-/PHYTOREMEDIATION  
NEL SITO DI BAGNOLI-COROGGIO**



## SOMMARIO

1. INTEGRAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI CARATTERIZZAZIONE .....	5
1.1. Ricerca di ordigni bellici inesplosi .....	5
1.1.1. <i>Preparazione piazzole per perforazioni</i> .....	5
1.2. Ubicazione delle indagini e metodiche di campionamento .....	6
1.2.1. <i>Ubicazione dei punti di campionamento</i> .....	6
1.2.2. <i>Profondità di campionamento</i> .....	9
1.2.3. <i>Formazione dei campioni di terreno</i> .....	9
1.2.4. <i>Campionamento di specie vegetali (ipogei ed epigei) e suolo agronomico</i> .....	10
1.3. Analisi chimiche e agronomiche .....	11
1.3.1. <i>Caratterizzazione chimica dei terreni</i> .....	11
1.3.2. <i>Attività di analisi agronomiche su specie vegetali</i> .....	13
1.3.3. <i>Attività di analisi agronomiche del suolo</i> .....	13
2. ATTIVITÀ DI LABORATORIO .....	14
2.1. Caratterizzazione microbiologica e molecolare dei suoli .....	14
2.2. Caratterizzazione ecotossicologica dei suoli .....	16
2.2.1. <i>Test di germinazione e allungamento radicale</i> .....	17
2.2.2. <i>Verifica dell'attività di biodegradazione</i> .....	19
2.3. Sperimentazione in vaso - mesocosmo .....	20
2.4. Sperimentazione in campo (test pilota) .....	22
2.5. Analisi statistica .....	23
3. CRONOPROGRAMMA .....	24

## PREMESSA

I suoli dell'area di Bagnoli-Coroglio sono caratterizzati da una contaminazione mista (idrocarburi + metalli pesanti) in cui la sola applicazione di tecniche di *bioremediation* potrebbe non essere un approccio sufficiente in funzione della profondità e dell'elevato grado di contaminazione riscontrato, e della scarsa degradabilità di alcuni contaminanti. In questo caso la bonifica per via biologica dei suoli contaminati dai metalli può risultare efficace solo in seguito ad opportune e selezionate attività propedeutiche e attraverso l'integrazione di diverse tecniche biologiche di bonifica (come ad es. la *phytoremediation*, la *biostimulation*, la *bioaugmentation*, ecc.) superando così i limiti legati all'applicazione delle singole tecnologie.

Grazie ai dati di caratterizzazione sito specifici già disponibili (dal 1996 al 2013) e, quando disponibili, i dati derivanti dall'attuazione del nuovo Piano di Caratterizzazione (2016) si identificheranno le aree dove potenzialmente è possibile applicare queste tecnologie. Nello specifico, all'interno di tali aree identificate sarà necessario individuare alcune zone di test in presenza di livelli diversi di inquinamento su cui applicare rapidamente le sperimentazioni *in loco* (test pilota).

Pertanto, il presente documento rappresenta una proposta metodologica per l'esecuzione delle attività sperimentali finalizzate alla valutazione e alla successiva progettazione di tecniche biologiche di bonifica dei suoli contaminati attraverso il campionamento e analisi dei suoli da sottoporre a bonifica e delle specie vegetali insistenti sugli stessi analisi di laboratorio e prove di crescita a scala progressiva (mesocosmo) e quindi attraverso le prove di campo (test pilota).

Le attività di campo verranno svolte da Impresa qualificata individuata dall'Appaltante tramite apposita procedura di gara, mentre le attività di Mesocosmo ed analisi microbiologica e tossicologica verranno svolte dai laboratori del Dipartimento di Scienze e Tecnologie dell'Università del Sannio, che vanta diverse esperienze nell'applicazione della tecnica di Bio-Phytoremediation.

Le attività si possono così riassumere:

1. Integrazione dell'attività di caratterizzazione attraverso l'esecuzione di sondaggi e prelievo di campioni di terreno all'interno delle aree identificate come "Area Test" (Appaltatore);

2. Analisi chimiche e test di lisciviazione sui campioni di suolo prelevati durante le terebrazioni (Appaltatore);
3. Prelievo di Campioni di specie vegetali autoctone ed alloctone presenti nel sito (Appaltatore);
4. Prelievo di suolo agronomico in corrispondenza di ciascuna specie vegetale (Appaltatore);
5. Analisi microbiologiche ed ecotossicologiche sui campioni di terreno prelevati durante i sondaggi nelle "Aree Test" (Ente di Ricerca);
6. Attività in Mesocosmo (Ente di Ricerca):
  - Analisi su suolo agronomico al tempo  $T=0$  ed al tempo  $T=3$  mesi;
  - Analisi su specie vegetali, sia sull'apparato radicale che fogliare;
  - Test di lisciviazione su suolo agronomico;

Questi studi verranno progettati in modo da simulare nel modo più fedele possibile le condizioni che si riscontreranno in pieno campo e consentire così una valutazione ragionevole sulle potenzialità dell'applicazione di tecniche biologiche di bonifica ambientale dei suoli con la possibilità di raggiungere gli obiettivi di bonifica previsti.



## **1. INTEGRAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI CARATTERIZZAZIONE**

Di seguito si riporta la proposta metodologica per l'affinamento delle attività di caratterizzazione al fine di valutare e ottimizzare l'applicazione di tecniche biologiche di bonifica. Come specificato in precedenza tali attività verranno svolte da Impresa qualificata scelta tramite apposita procedura di gara dall'Appaltante.

Prima dell'inizio di qualsiasi attività sarà allestita l'area di cantiere predisponendo, se necessaria una recinzione provvisoria e sarà verificata l'accessibilità a tutte le aree di intervento, inoltre, preventivamente a tutte le attività verrà svolta una fase di ricerca di ordigni bellici inesplosi di cui si riportano di seguito le specifiche tecniche.

### **1.1. Ricerca di ordigni bellici inesplosi**

La ricerca di ordigni bellici sarà preceduta dal taglio di arbusti e vegetazione in genere per accedere alle aree e preparare il terreno alle operazioni di verifica.

Da un confronto con il personale tecnico del 10° Reparto Infrastrutture del Ministero della Difesa è emersa la necessità che, preventivamente all'avvio delle attività di cui al presente Contratto quadro, si proceda ad una indagine ai fini della sicurezza in linea con le norme tecniche ed amministrative dettate dal recente regolamento attuativo Decreto Ministeriale 11 maggio 2015, n. 82 "Regolamento per la definizione dei criteri per l'accertamento dell'idoneità delle imprese ai fini dell'iscrizione all'albo delle imprese specializzate in bonifiche da ordigni esplosivi residuati bellici, ai sensi dell'articolo 1, comma 2, della legge 1° ottobre 2012, n. 177".

#### *1.1.1. Preparazione piazzole per perforazioni*

A seguito delle attività di ricerca di ordigni bellici e delle autorizzazioni delle autorità competenti, in corrispondenza dell'ubicazione del sondaggio sarà effettuato, se necessario, uno scavo di pulizia generale eseguito con mezzi meccanici in terreno di qualsiasi natura e consistenza fino alla profondità di 0,4 m, compresa l'estirpazione d'erbe, arbusti e radici, la demolizione e rimozione di recinzioni, delimitazioni e simili in legno con la sola esclusione di manufatti in muratura o conglomerato. Al termine delle operazioni, se necessario, gli scavi verranno ritombati e si procederà all'esecuzione dei sondaggi.

## **1.2. Ubicazione delle indagini e metodiche di campionamento**

La scelta della modalità di campionamento, della localizzazione e del numero di prelievi di suolo devono perseguire lo scopo di ottenere un quadro chiaro del grado, della distribuzione e della mobilità dei contaminanti all'interno del sito. Pertanto, di seguito verranno illustrati i criteri e le modalità con cui si propone di eseguire le attività integrative di campionamento dei suoli inerenti l'applicazione di tecnologie di *bioremediation* con lo scopo finale di:

- valutare la biodisponibilità dei metalli presenti;
- analizzare la potenziale lisciviazione dei contaminanti in falda;
- verificare l'attività di biodegradazione e caratterizzare le popolazioni microbiche autoctone;
- studiare l'ecotossicità dei suoli.

### *1.2.1. Ubicazione dei punti di campionamento*

Sulla base dei dati di caratterizzazione del sito e delle caratteristiche geomorfologiche, l'area da campionare verrà suddivisa per aree omogenee. La scelta della localizzazione dei punti di campionamento avverrà mediante un criterio statistico in cui i campioni saranno prelevati secondo uno schema regolare in punti definiti da una griglia (griglia predefinita).

All'interno delle aree citate sono state individuate otto aree per la sperimentazione di test pilota per la bio/phytoremediation. Le stesse hanno un'estensione ognuna di circa 300 mq.

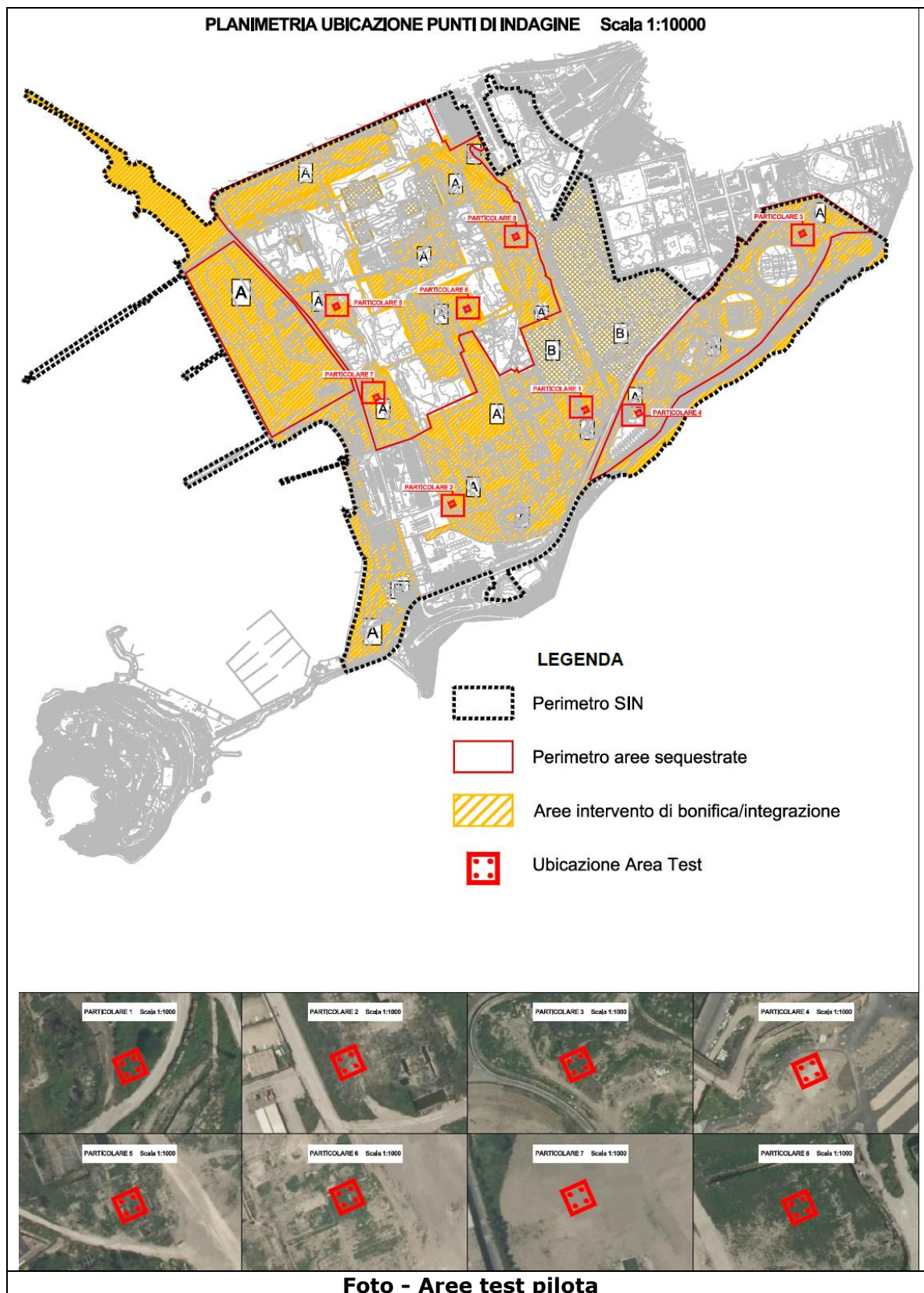
La prima area è ubicata nella sub-area denominata "Acciaieria" (Parcella 1), la seconda nella sub-area "LAM" (Parcella 2), la terza presso la sub-area "Parco dello sport – Arboreto" (Parcella 3), la quarta presso la sub-area "Parco dello sport – Campeggio" (Parcella 4), la quinta presso la sub-area "AFO COK" (Parcella 5), la sesta presso la sub-area "Morgan" (Parcella 6), la settima presso la sub-area "TNA" (Parcella 7) e l'ottava presso la sub-area "LAM-MESTA" (Parcella 8)

- La Parcella 1 è delimitata dai 4 punti di campionamento: ACC 14/10, ACC 14/11, ACC 14/15, VAR 17/12.
- La Parcella 2 è delimitata dai 4 punti di campionamento: LAM 1/5, LAM 1/6, LAM 1/1, LAM 8/7.
- La Parcella 3 è delimitata dai 4 punti di campionamento: CAM 1, CAM 17/4, CAM 17/2, CAM 17/11.
- La Parcella 4 è delimitata dai 4 punti di campionamento: OSS 9/13, OSS 9/8, OSS 9/7, OSS 9/12.
- La Parcella 5 è delimitata dai 4 punti di campionamento: LAM 19/1, LAM 19/2, LAM 19/5, LAM 19/6.
- La Parcella 6 è delimitata dai 4 punti di campionamento: LAM 42/5, LAM 42/9, LAM 42/10, LAM 36/8.
- La Parcella 7 è delimitata dai 4 punti di campionamento: LAM 10/5, LAM 10/6, LAM 10/9, LAM 17/12.
- La Parcella 8 è delimitata dai 4 punti di campionamento: ACC 10/4, ACC 20/3, ACC 20/10, ACC 20/11.

Le Parcelle 3,4,5,6,7 e 8 ricadono nelle aree poste sotto sequestro preventivo dal Tribunale di Napoli con Decreto del 8 aprile 2013 e successivo provvedimento del 21 novembre 2014.

Di seguito si riporta la localizzazione delle 8 aree di test pilota per la sperimentazione in oggetto.





### *1.2.2. Profondità di campionamento*

È prevista la realizzazione di complessivi n. 32 sondaggi a carotaggio continuo, finalizzati al campionamento dei terreni per analisi chimiche, spinti fino a profondità di 5 m da p.c.

La profondità dei punti di sondaggio a 5 m è stata definita in modo da ottenere delle informazioni preliminari per la caratterizzazione geologica, e ambientale del sito.

### *1.2.3. Formazione dei campioni di terreno*

Nel corso della perforazione dei sondaggi, saranno prelevati campioni rimaneggiati di terreno secondo aliquote medie rappresentative di un intervallo di perforazione non superiore a 1m, da conservare in opportuni contenitori. Verrà comunque assicurata una particolare attenzione nel campionare tutti i livelli litologici e gli strati omogenei riscontrati durante la perforazione.

Le procedure di controllo (dalla selezione dei campioni e le modalità di conservazione fino alle analisi) saranno effettuate in conformità a quanto indicato nell'Allegato 2 alla parte IV del D.Lgs. 152/2006 e ss.mm.ii.

In totale saranno prelevati 128 campioni in diverse aliquote, parte da destinare ad analisi di laboratorio per eventuali approfondimenti successivi:

- 32 sondaggi profondi 5 m: 4 campioni di terreno per ogni sondaggio ( $32 \times 4 = 128$  campioni totali) così suddivisi:
  - uno nel suolo rizosferico;
  - uno sul primo metro di terreno in sito;
  - un campione in corrispondenza della frangia capillare;
  - un campione intermedio a 3 m.

Saranno prelevate tre aliquote per ogni campione:

- una destinata all'esecuzione delle analisi chimiche previste;
- un'aliquota destinata ai Laboratori del Dipartimento di Scienze e Tecnologie dell'Università del Sannio per le analisi chimiche sulla biodisponibilità dei metalli, le analisi microbiologiche e molecolari e per i test di ecotossicità (quantitativo stimato circa 500 gr);
- una da conservare per eventuali contestazioni e controanalisi successive al completamento delle attività di caratterizzazione.

#### *1.2.4. Campionamento di specie vegetali (ipogei ed epigei) e suolo agronomico*

Lo scopo di questo intervento è valutare la possibilità di rimuovere i contaminanti presenti nel suolo tramite la duplice azione di "fitodegradazione" e "fitoestrazione" operate da specie vegetali sull'area da trattare.

Saranno campionate le specie vegetali autoctone ed alloctone presenti nel sito che potenzialmente mostrano una particolare attitudine all'adattamento sito specifico ed eventualmente al bioaccumulo.

Le piante prelevate presso il sito saranno distinte per specie (n=6 campioni per specie) e separate nelle diverse frazioni (radici, fusti, foglie) che saranno lavate con acqua ionizzata.

Quindi è previsto il campionamento di numero 6 campioni per 19 specie per 2 frazioni per un totale di 228 campioni.

Le specie vegetali dovranno essere campionate nel seguente modo:

1. campionare la pianta con la radice;
2. ripulire le radici dal terreno, reciderle dalla parte aerea e sistamarle in un sacchetto di plastica sterile, chiudere il sacchetto ed etichettarlo;
3. riporre la parte aerea della pianta in un sacchetto di plastica sterile, chiudere il sacchetto ed etichettarlo;

Le operazioni saranno eseguite con l'ausilio di "Forbice troncarami lunga su aste di prolunga per prelievi fino a 150 "ed assistite da agronomo specializzato.

In seguito il materiale sarà stato avviato alla preparativa e successiva analisi elementare adottando i metodi accreditati e riconosciuti a livello nazionale ed internazionale.

In corrispondenza di ogni specie vegetale campionata (19 specie - 19 campioni di suolo) sarà prelevato il terreno previa perforazione fino ad un metro di profondità, quindi riposto in un sacchetto di plastica sterile, chiuso ed etichettato.

Per le analisi agronomiche del suolo bisogna prelevare un campione con un peso compreso tra 1 e 2 kg in sacchetti di polietilene con adeguato sistema di chiusura da consegnare fresco con il suo naturale contenuto di umidità o secco, previa essiccazione a temperatura ambiente, lontano da polveri o altre sostanze che possano inquinare e compromettere i risultati analitici.

In seguito il materiale sarà stato avviato alla preparativa e successiva analisi elementare adottando i metodi accreditati e riconosciuti a livello nazionale ed internazionale.

### **1.3.      Analisi chimiche e agronomiche**

Le attività di laboratorio sui campioni di suolo (128 campioni=32x4) raccolti si svolgeranno secondo le seguenti linee principali:

- Caratterizzazione chimica;
- Test di cessione;
- Analisi agronomica su specie vegetali;
- Analisi agronomica del suolo.

#### *1.3.1. Caratterizzazione chimica dei terreni*

L'efficienza di tutte le tecnologie *in situ* dipende strettamente dalle proprietà del suolo che regolano la distribuzione dei contaminanti tra le diverse fasi del terreno (solida, liquida e gassosa). Questo è particolarmente importante per tecniche come la *phytoremediation*, dal momento che le piante assorbono prevalentemente le sostanze

presenti nella fase liquida del suolo (soluzione del suolo). Pertanto, al fine di implementare le informazioni in possesso sui suoli del sito da bonificare, verranno eseguite analisi chimiche volte allo studio della mobilità dei contaminanti nel suolo e al potenziale rischio ad essa associato. In particolare, la valutazione della biodisponibilità dei contaminanti risulta essenziale per una corretta applicazione e una coerente valutazione della tecnologia; nel suolo, la biodisponibilità è il risultato di complessi meccanismi di trasferimento di massa e di assorbimento, che dipendono dalle proprietà dei contaminanti, dalle caratteristiche chimico-fisiche del terreno e dalla biologia delle piante.

Pertanto, in aggiunta alle analisi chimiche per il contenuto totale di contaminanti nei suoli alle quattro diverse profondità, verrà determinata la quantità di metalli presente nella soluzione del terreno e/o quella più facilmente rilasciabile dalla fase solida (frazione biodisponibile).

Elemento e frazione	
Metalli (As; Cu; Pb; Cr; Ni; Zn; Cd; Hg; Sb; Sn; Tl; V; Fe; Mn)	Benzo (g,h,i) perilene
As biodisponibile	Crisene
Cd biodisponibile	Dibenzo (a,e) pirene
Cu biodisponibile	Dibenzo (a,l) pirene
Pb biodisponibile	Dibenzo (a,i) pirene
Tl biodisponibile	Dibenzo (a,h) pirene
Zn biodisponibile	Dibenzo (a,h) antracene
Cr biodisponibile	Indenopirene
Ni biodisponibile	Pirene
Idrocarburi C<12	Sommatoria IPA
Idrocarburi C >12	K <sub>ow</sub> Coefficiente di ripartizione ottanolo /Acqua
Benzene, etilbenzene, Stirene, Toluene, o-Xilene, m-Xilene, p-Xilene	pH
Benzo (a) antracene	Umidità per essiccazione a 105°C a peso costante
Benzo (a) pirene	Tessitura del terreno
Benzo (b) fluorantene	Determinazione della capacità di scambio cationica (CSC)
Benzo (k) fluorantene	Estrazione sequenziale

Inoltre, sugli stessi campioni di suolo verrà eseguito un test di cessione con acqua ionizzata per valutare il rilascio di contaminanti a contatto con un lisciviante; esso consente di individuare il potenziale d'inquinamento della matrice solida in funzione della facilità con cui la frazione più biodisponibile del contaminante viene rilasciata attraverso il percolamento delle acque.

#### *1.3.2. Attività di analisi agronomiche su specie vegetali*

Su ogni campione (per un totale di n. 228 campioni) verranno determinati i seguenti parametri:

As; Cu; Pb; Cr; Ni; Zn; Cd; Hg; Sb; Sn; Tl; V; Fe; Mn.

#### *1.3.3. Attività di analisi agronomiche del suolo*

Su ogni campione (per un totale di n. 19 campioni) verranno determinati i seguenti parametri:

- pH in acqua;
- Granulometria;
- Calcare Totale;
- Calcare Attivo;
- Carbonio Organico;
- Azoto totale;
- Fosforo assimilabile;
- Basi Scambiabili (Sodio, Potassio, Magnesio, Calcio)
- Capacità di Scambio Cationico;
- Micorelementi assimilabili (Ferro; Manganese, Boro)
- Metalli pesanti (Rame, Piombo, Nichel, Cobalto, Cadmio, Zinco, Cromo totale)
- Conducibilità Elettrica.



## **2. ATTIVITÀ DI LABORATORIO**

Come detto in precedenza le attività di campo sono propedeutiche ad attività di laboratorio che saranno svolte presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie dell'Università del Sannio.

L'Ente di Ricerca individuato dalla Stazione appaltante può vantare diverse applicazioni della Tecnica di Bio-phytoremediation, quali ad esempio nel sito di Crotone - area Ex-Pertusola, sito di Ravenna - Ex Sarom, Porto Marghera - Prima zona industriale, etc...

Tutte le applicazioni in campo (test pilota in campo) saranno precedute da attività di laboratorio in mesocosmo, per lo studio e la scelta delle specie vegetali sia autoctone che alloctone che meglio si adattano alla contaminazione presente.

### **2.1. Caratterizzazione microbiologica e molecolare dei suoli**

La caratterizzazione microbiologica è una misura quantitativa della biodiversità microbica. Si considera il numero di microrganismi, appartenenti ad un gruppo fisiotassonomico generale (batteri filamentosi e non, lieviti, microfunghi, protozoi) oppure ad uno specifico gruppo fisiologico o funzionale (es. batteri aerobi ed anaerobi), presenti in una quantità unitaria di suolo (normalmente in un grammo di peso secco).

Su 64 dei 128 campioni di suolo prelevati, verranno effettuate le analisi microbiologiche per la determinazione della conta microbica totale, CFU TOTAL (*total colony Forming units*), al fine di determinare e quantificare l'attività intrinseca dei microrganismi autoctoni presenti nell'area di interesse.

I metodi per la determinazione della carica microbica sono essenzialmente di due tipi:

- diretti (per via microscopica): in un volume esattamente misurato di una sospensione in liquido del suolo possono venir contate direttamente, previo opportuno ingrandimento, le cellule microbiche presenti. Rapportando il numero riscontrato al volume osservato ed alla diluizione effettuata si ottiene la carica (Bloem et al., 1995);
- indiretti (su substrati colturali): la presenza di cellule microbiche vitali viene evidenziata dalla crescita in opportuno terreno colturale (soluzione acquosa dei nutrienti necessari, eventualmente gelificata mediante aggiunta di agar).

Le conte dirette possono permettere di contare realmente tutti i microrganismi, indipendentemente dal tipo e dalla possibilità di poterli coltivare; esistono infatti numerosi microrganismi vitali ma non coltivabili.

Le conte colturali viceversa non possono permettere di raggruppare al di là di un certo limite i microrganismi. Infatti, date le loro diverse esigenze nutritive, non esiste un solo terreno ed una condizione colturale adatta indistintamente a tutti i tipi di microrganismi.

Si dovranno, quindi, conteggiare distintamente, ad esempio, batteri aerobi, batteri anaerobi, eumiceti (funghi filamentosi o muffe, nonché lieviti), ecc.

Terminata la fase di quantizzazione della carica microbica autoctona, si procederà all'allestimento di colture in beute per la selezione e l'isolamento delle specie microbiche individuate con potenziale impiego in un trattamento di *bioremediation*.

Una volta identificata la popolazione batterica autoctona presente nelle matrici inquinate si procederà all'individuazione solo di quei ceppi all'interno del consorzio che mostrano un'effettiva attività nel processo di *bioremediation* mediante tecniche di biologia molecolare.

Tali tecniche prevedono l'individuazione di specifici enzimi con attività cataboliche rivolte alla degradazione di catene di idrocarburi (lineari o ramificati compatibili con le molecole dei contaminanti riscontrate nell'area di interesse) e l'amplificazione delle sequenze geniche codificanti per quel specifico enzima.

Pertanto, sui 64 campioni di suolo verranno avviate attività di laboratorio di biologia molecolare per l'isolamento e l'identificazione di popolazioni microbiche e/o fungine autoctone potenzialmente efficaci nel trattamento di suoli inquinati attraverso diversi meccanismi:

- batteri idrocarburo-degradanti: in grado di convertire in forme meno tossiche e degradare i contaminanti organici presenti nel suolo;
- batteri produttori di siderofori: in grado di mobilizzare i metalli e combattere gli stress legati alla tossicità dei contaminanti attraverso la produzione di altre sostanze favorevoli (auxine);

- funghi: caratterizzati da un sistema enzimatico aspecifico che li rende particolarmente efficaci nella degradazione dei contaminanti.

In particolare, le attività di laboratorio saranno organizzate in due fasi:

1. Analisi molecolari sui campioni prelevati nelle aree contaminate;
2. Screening dei ceppi batterici e delle specie fungine autoctoni da utilizzare.

In sintesi, le fasi di laboratorio si possono così di seguito elencare:

1. Campioni raccolti e trasportati nel laboratorio in condizioni termiche ottimali e specifiche per le successive analisi;
2. I campioni di suolo setacciati per togliere ulteriori tracce di materiale organico presente e manipolati per ottenere il campione standard per le analisi;
3. Conta microbica totale (CFU su piastra, lettura spettrofotometro OD600);
4. Crescite in liquido (colture di arricchimento con e senza contaminante specifico);
5. Selezione su piastra per isolare singole colonie (mediante utilizzo di terreni completi e/o selettivi);
6. Strisce su piastre per ottenere colture pure;
7. Crescita in liquido dei ceppi isolati (curva di crescita specifica per ceppo isolato) ed estrazione DNA genomico (Kit di estrazione);
8. Amplificazione (PCR) 16S rRNA e sequenziamento.

## **2.2. Caratterizzazione ecotossicologica dei suoli**

Le prove di ecotossicità, condotte direttamente sulla matrice solida (suolo), risentono delle interazioni tra il suolo e la componente tossica, interazioni che esercitano effetti non trascurabili sulla biodisponibilità delle sostanze tossiche. D'altronde, le prove sulla matrice solida hanno il vantaggio di utilizzare la matrice in toto e non solo l'estratto acquoso, avvicinandosi in tal modo maggiormente alla situazione reale.

Saranno scelti tra i 128 campioni di suolo quelli maggiormente significativi per quanto riguarda le concentrazioni dei contaminanti presenti nel sito; considerando che il 50% dei campioni siano rappresentativi, avremo al massimo 64 campioni prelevati per i test di ecotossicità.

Per valutare la qualità dei suoli si possono utilizzare come bioindicatori i vegetali, comunemente più sensibili degli animali per rilevare le caratteristiche del suolo in una specifica area.

L'utilizzo di piante come indicatori per valutare la salute e la qualità del suolo in una prospettiva agricola e geobotanica è stato oggetto di molti studi.

La presenza di piante può essere utilizzata per diagnosticare una particolare condizione del suolo, ad esempio può essere utilizzata per quantificare un particolare contaminante del suolo (bioindicazione quantitativa).

I test di ecotossicità su piante sono generalmente metodi veloci che richiedono un impegno economico molto contenuto. Molte piante si prestano in modo egregio al monitoraggio degli inquinanti nel suolo. I vantaggi sono molti, tra l'altro, offrono la possibilità di evidenziare l'effetto contemporaneo di più agenti inquinanti.

Quest'ultimo aspetto riveste una notevole importanza in quanto evidenzia i danni causati da una reale situazione di inquinamento. Le piante utilizzate per questi tipi di saggi sono definite piante indicatrici in quanto rispondono con sintomi evidenti all'azione di uno o più inquinanti. Le piante devono cioè possedere una bassa selettività all'assorbimento di sostanze tossiche e si distinguono dalle piante accumulatrici in quanto queste ultime accumulano nei propri tessuti gli inquinanti e quindi non possono essere utilizzate per un saggio diretto e veloce, ma necessitano dell'analisi chimica dei loro organi.

### *2.2.1. Test di germinazione e allungamento radicale*

Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo).

#### *Saggio di tossicità cronica breve*

In accordo con tale criterio, viene proposta una procedura di saggio per la rilevazione degli effetti cronici su tre specie, di cui due dicotiledoni (Cetriolo e Crescione) e una monocotiledone (Sorgo).

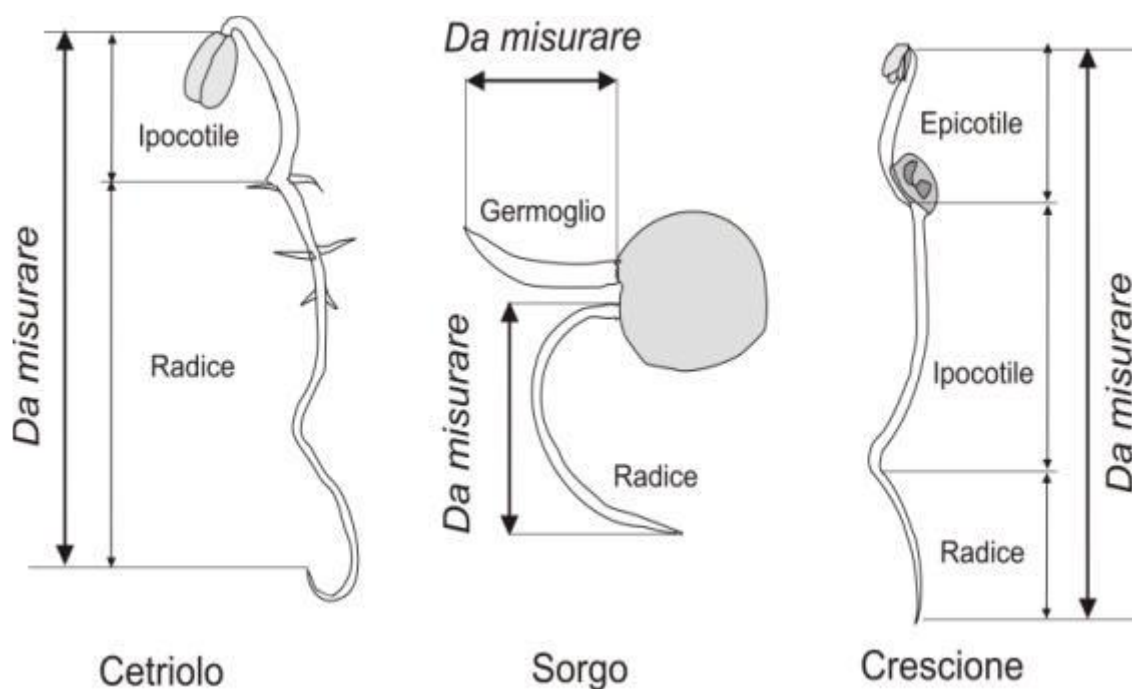
Il saggio, della durata di 72 ore, consente di rilevare contemporaneamente due diversi effetti (germinazione ed allungamento radicale).

Il saggio è applicabile su campioni di suoli contaminati.

Il metodo ha le seguenti caratteristiche:

- è stato sviluppato per verificare la tossicità di campioni liquidi (campioni ambientali; soluzioni di prodotti puri, estratti) e solidi (sedimenti, suoli, fanghi);
- è sensibile ad una vasta gamma di contaminanti organici ed inorganici;
- prevede un contatto minimo da parte del personale con i campioni testati;
- è economico e viene effettuato in breve tempo;
- gli organismi test sono facilmente disponibili;
- non richiede una strumentazione dedicata.

I semi di due dicotiledoni (Cetriolo e Crescione) e di una monocotiledone (Sorgo) vengono esposti al campione ed incubati al buio alla temperatura di  $25 \pm 2$  °C per 72 ore. Al termine dell'esposizione, vengono contati i semi germinati e mediante un righello viene misurata la lunghezza (al più vicino millimetro) dell'apparato radicale emerso dai semi. L'effetto sulla germinazione ed allungamento radicale viene espresso come Indice di Germinazione percentuale (IG %).



Alla fine del test, per ciascuna replica: conteggiare il numero di semi germinati (si considerano germinati i semi per i quali si abbia un allungamento radicale visibile di almeno 1 mm); per cetriolo e crescione, misurare con un righello millimetrato la lunghezza di tutta la plantula, dall'emergenza dal seme all'apice radicale, con l'approssimazione al millimetro più vicino (se necessario, utilizzando due pinzette, estendere il tratto da misurare per linearizzarlo); per il sorgo, misurare separatamente germoglio e radice (il germoglio tipicamente ha un diametro superiore e forma conica, mentre la radice è più filiforme).

Prendere nota di qualsiasi eventuale caratteristica insolita dei semi/radici (presenza di muffe, colorazioni anomale, ecc.).

### *2.2.2. Verifica dell'attività di biodegradazione*

Nelle principali applicazioni il fitorimedio è basato sulla capacità delle piante di assimilare i contaminanti del suolo o di metabolizzarli.

Per progettare un intervento di fitorimedio è necessario acquisire una conoscenza dei processi in gioco e soprattutto poter prevedere il comportamento delle piante nel sito in trattamento.

Data la complessità dei fattori in gioco, è opportuno che la fase operativa sia preceduta da indagini preliminari di laboratorio condotte con l'obiettivo di testare su scala ridotta soluzioni tecniche e l'efficacia di strategie operative alternative.

Più in particolare, si eseguiranno attività sperimentali per valutare le più efficienti pratiche agronomiche del suolo e le prestazioni di specie vegetali potenzialmente adatte ad essere trasferite presso il sito inquinato.

Queste indagini sono condotte con l'ausilio di sistemi sperimentali semplificati e in scala ridotta (mesocosmi) che consentono di eseguire gli approfondimenti necessari.

All'interno del sito sono state individuate e classificate 19 specie di piante, che saranno quindi analizzate in mesocosmi (vasi) progettati e realizzati per la sperimentazione in oggetto.



Scopo ultimo di quest'attività è di trasferire su scala reale soluzioni e strategie preventivamente testate.

Quindi, data la complessità dei fattori in gioco, risulta opportuno che durante la fase operativa verrà testata l'aggiunta di microrganismi rizosferici autoctoni selezionati in precedenza mediante tecniche di microbiologia e biologia molecolare, potenzialmente in grado di degradare i contaminanti organici presenti nel suolo e nel contempo di aumentare le performance delle specie vegetali testate.

A tale scopo si propone un disegno sperimentale strutturato della durata totale di 3 mesi.

### **2.3. Sperimentazione in vaso - mesocosmo**

La sperimentazione in mesocosmo consente di valutare e modulare tutti i fattori coinvolti nel processo di crescita delle piante attraverso un sistema su scala ridotta che semplifica l'individuazione delle strategie operative ottimali.

Test di *bioremediation* verranno quindi eseguiti sulle 19 specie di piante e sui campioni di suoli più significativi attraverso prove in mesocosmo: i campioni di suolo verranno setacciati e rimescolati e quindi sistemati all'interno di vasi in cui verrà studiata l'evoluzione del processo di *bioremediation* attraverso:

- Test di phytoremediation per l'individuazione di specie vegetali idonee all'impiego in funzione della capacità di adattamento alle condizioni della matrice campionata.
- Prove di biodegradazione, utilizzando ceppi batterici selezionati.
- Test di lisciviazione, ricerca dei metalli su massimo 32 campioni, relativi al campione di suolo rizosferico e a quello in corrispondenza della frangia capillare.
- Studio della biodisponibilità dei metalli.

- Effetti indotti dall'aggiunta di concimi, PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) e funghi micorrizici.

Tali operazioni consentiranno di valutare la tecnica di *bioremediation* più adatta alle caratteristiche sito-specifiche dei suoli dell'area in cui eseguire l'intervento e la sua effettiva applicabilità, individuando, inoltre, le migliori *performances* degradative ottenute nei diversi trattamenti, prima di procedere alla progettazione ed esecuzione in pieno campo.

Al momento zero (messa a dimora) saranno analizzate le concentrazioni di metalli nei campioni di piante (radici e parte aerea) e nel corrispondente pane di terra, ritenute rappresentative dall'Ente di ricerca. Pertanto si ipotizza di dover effettuare 64 campionamenti e analisi per la parte vegetale (32 campioni X 2 - radice e parte area) più 64 campioni di pane di terra (32 campioni al tempo  $t=0$  e 32 campioni al tempo  $t=3$  mesi).

Nel caso in cui fosse ritenuto idoneo dall'Ente di ricerca saranno analizzati tutti i campioni (sempre inteso come analisi delle radici, parte area e pane di terra) restando fermo il relativo prezzo totale computato.

Di seguito si riportano la lista degli analiti da analizzare; inoltre nel caso in cui l'Ente di ricerca lo ritenga necessario, a valle dei risultati delle analisi ricevute dalla stazione appaltante, sarà cura e onere dell'Ente integrare con altri analiti:

Elemento e frazione	Preparativa/Estrazione	Metodo Analisi
As totale	EPA 3052 2007	EPA 6010C 2007(*)
Cu totale	EPA 3052 2007	EPA 6010C 2007
Pb totale	EPA 3052 2007	EPA 6010C 2007
Zn totale	EPA 3052 2007	EPA 6010C 2007
Cr totale	EPA 3052 2007	EPA 6010C 2007
Ni totale	EPA 3052 2007	EPA 6010C 2007
As biodisponibile	Hudson-Edwards et al (2004)	EPA 6010C 2007
Cu biodisponibile	Lindsay & Norwell (1969)	EPA 6010C 2007
Pb biodisponibile	Lindsay & Norwell (1969)	EPA 6010C 2007
Zn biodisponibile	Lindsay & Norwell (1969)	EPA 6010C 2007
Cr biodisponibile	Lindsay & Norwell (1969)	EPA 6010C 2007
Ni biodisponibile	Lindsay & Norwell (1969)	EPA 6010C 2007
(*) analisi condotte con il sistema degli <b>idruri</b> .		

Le analisi suddette verranno poi ripetute dopo tre mesi di sperimentazione.

Al termine delle attività di indagine di laboratorio, sarà prodotta, da parte dell'Ente di ricerca, una Relazione Tecnica finale relativa alle attività eseguite. Tale relazione dovrà descrivere le modalità di esecuzione delle stesse e riportare i risultati delle attività di laboratorio svolte.

#### **2.4. Sperimentazione in campo (test pilota)**

La sperimentazione in pieno campo consente di verificare la capacità delle specie vegetali di adattarsi a condizioni ambientali specifiche e trasferire su scala reale le soluzioni e le strategie testate nei mesocosmi. Al fine di ottimizzare l'efficienza del processo tecnologico di *bio-/phytoremediation* verrà quindi avviata, su un'area ristretta selezionata in relazione alle caratteristiche del sito e della contaminazione, una sperimentazione in pieno campo che, attraverso la preparazione delle n. 8 parcelle, la selezione delle specie vegetali idonee (anche in funzione dei risultati dei test in mesocosmo) e la scelta di eventuali trattamenti (agronomici, biologici batteri e funghi), consentirà di individuare le condizioni ottimali di crescita e le tecniche più appropriate da applicare in funzione delle caratteristiche sito-specifiche. Inoltre, durante questa fase pilota verranno monitorati in tempi opportuni i seguenti parametri:

- l'efficacia dei trattamenti di fertilizzazione (incremento di biomassa);
- l'efficacia dell'utilizzo di ammendanti naturali, quali ectomicorrize ed endomicorrize fungine, e specie di batteri benefici (PGPR);
- la mobilizzazione del contaminante (*uptake* da parte delle piante);
- la riduzione della frazione biodisponibile;
- la mobilità del contaminante lungo il profilo del suolo.

I risultati delle prove in campo risulteranno naturalmente di grandissima importanza per mettere a punto tutti gli aspetti operativi per la bonifica *full scale*.

## **2.5.      Analisi statistica**

La procedura statistica che si adotterà consente di analizzare il dataset per individuare la presenza di dati anomali (outliers) mediante il test di Dixon. In seguito saranno testate la distribuzione dei dati e l'omogeneità delle varianze. L'analisi della varianza (ANOVA) sarà condotta mediante il test di Kruskal-Wallis mentre il test post-hoc successivo sarà eseguito adottando il test Mann-Whitney. Le analisi statistiche saranno condotte utilizzando SPSS (SPSS Inc.Chicago, IL, USA, ver. 17) mentre i grafici saranno prodotti utilizzando CoPlot (CoHort ver. 6.204, Monterey, CA, USA).

### 3. CRONOPROGRAMMA

Si riporta il Cronoprogramma previsto per l'esecuzione delle attività.

ATTIVITA'	I ° MESE	II ° MESE	III ° MESE	IV ° MESE	V ° MESE	VI ° MESE
Caratterizzazione chimica						
Caratterizzazione microbiologica						
Caratterizzazione molecolare						
Caratterizzazione ecotossicologica						
Mesocosmo						
Analisi statistica ed elaborazione dati						
Stesura Relazione Finale						