UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
CIRAM - CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCA AMBIENTE
Via Mezzocannone, 16 – 80134 Napoli – ITALY
Tel: (+39) 081.2534646 - fax: (+39) 081.2534645, e-mail: ciram@unina.it,

LIFE Project Number
LIFE11/ENV/IT/275

LIFE+ PROJECT NAME or Acronym
ECOREMED

Action D1
DELIVERABLE

Operative eco-remediation protocol
Ecoremed Handbook

Reporting Date
31/05/2017

MANUALE OPERATIVO

Per il risanamento ecocompatibile dei suoli degradati

OPERATIVE HANDBOOK

For eco-compatible remediation of degraded soils

PROGETTO LIFE 11 ENV/IT/275

ECOREMED

MANUALE OPERATIVO

Per il risanamento ecocompatibile dei suoli degradati

OPERATIVE HANDBOOK

For eco-compatible remediation of degraded soils

INDICE | INDEX

4 INTRODUZIONE: ANALISI DEL CONTESTO TERRITORIALE
INTRODUCTION: ANALYSIS OF LOCAL CONTEXT

1. Premessa	1. Foreword	4
2. Inquadramento normativo	2. Legislative framework	13
3. La risorsa suolo e le forme di contaminazione	3. Soil as a resource and its forms of contamination	19
4. Il contesto territoriale	4. Territorial Analysis	25

38 LA CARATTERIZZAZIONE DELLA QUALITA' AMBIENTALE DEI SITI POTENZIALMENTE CONTAMINATI
ENVIRONMENTAL CHARACTERIZATION OF THE POTENTIALLY CONTAMINATED SITES

5. Misure fisico-chimiche indirette: conoscere la geografia della contaminazione per la caratterizzazione e la bonifica di precisione dei siti potenzialmente contaminati	5. Knowledge of contamination geography for characterization and precision remediation of potentially contaminated sites	38
6. Monitoraggio chimico:	6. Chemical monitoring:	51
6a. Analisi del contenuto totale di contaminanti nei suoli	6a. Analytical determination of soil contamination by potentially toxic metals and hydrocarbons	51
6b. Analisi della biodisponibilità di metalli potenzialmente tossici	6b. Chemical monitoring of the bioavailability of potentially toxic metals	57
7. Test biologici per la caratterizzazione di dettaglio dei suoli contaminati	7. Detailed characterization of contaminated soils: bioassays	70
8. La caratterizzazione della risposta idrologica del suolo per applicazioni dell'analisi del rischio	8. On characterizing the hydraulic response of soil for risk assessment	85

98 TECNICHE DI BIO-FITO-RISANAMENTO DEI SUOLI CONTAMINATI
BIO-PHYTO-REMEDIATION OF CONTAMINATED SOILS

9. I ruoli della vegetazione per il risanamento dei suoli contaminati/degradati	9. Recovering soil fertility in contaminated and degraded land: the use of phytoremediation	98
10. Prospettive e limiti dell'applicazione della bioremediation per la degradazione degli inquinanti organici	10. Perspectives and limits of the bioremediation application for the degradation of organic pollutants	112
11. Soil washing degli hot spot contaminati	11. Soil washing of contaminated hot-spots	127
12. Valorizzazione delle biomasse prodotte dagli impianti di phytoremediation	12. Exploitation of biomass produced from soil phytoremediation	149

175 IL MONITORAGGIO DEGLI EFFETTI DEL RISANAMENTO (messa in sicurezza/bonifica)

MONITORING THE EFFECTS OF RECLAMATION (securing/remediation)

13. Qualità dell'ecosistema — 13. Ecosystem quality **175**

13a. Biomonitoraggio di metalli e IPA aerodiffusi: linee guida per l'utilizzo delle moss bags — 13a. Biomonitoring of airborne PAHs and heavy metals: guidelines for the moss bag approach **175**

13b. Caratterizzazione idrogeologica dei siti sperimentali — 13b. Hydrogeological characterization of a test site **188**

13c. Monitoraggio della microflora del suolo — 13c. Soil microflora **199**

13d. Biomonitoraggio di vertebrati e invertebrati — 13d. Biomonitoring of health status of vertebrate and invertebrate species **206**

14. Monitoraggio della qualità e salubrità della produzione agricola — 14. Biomonitoring agricultural production quality and safety **219**

15. Aspetti territoriali del cambiamento di uso del suolo — 15. Legacies of land use change on landscape **235**

16. Monitoraggio e processi di trasporto nel sistema suolo-pianta-atmosfera: il caso studio di Trentola-Ducenta — 16. Transport process in the soil-plantatmosphere system: The case study at Trentola-Ducenta **252**

17. Analisi dei costi di intervento e degli impatti economici sulle aziende agricole — 17. Analysis of intervention costs and economic impact on farms **267**

278 CONCLUSIONI

CONCLUSIONS

18. Limiti e prospettive dell'applicazione del protocollo Ecoremed — 18. Limits and perspectives of the application of the Ecoremed Protocol **278**

19. I Casi studio del progetto: Teverola,Trentola, Giugliano, San Giuseppiello — 19. The project case studies: Teverola, Trentola, Giugliano, San Giuseppiello **281**

20. Processi partecipativi per la pianificazione e gestione degli interventi — 20. Planning and management of the interventions through participatory processes **292**

Introduzione: Analisi del contesto territoriale

Introduction: Analysis of local context

1. Premessa

M. Fagnano

Il progetto LIFE-Ecoremed fu scritto durante il 2010 e presentato alla Comunità Europea nella primavera del 2011. In seguito, nel 2012 il progetto è stato approvato ed è formalmente iniziato a giugno 2012.
Il progetto ha come soggetto coordinatore il Centro Interdipartimentale di Ricerca Ambiente (CIRAM) dell'Università di Napoli Federico II, che ha riunito intorno a questo progetto 69 ricercatori dell'Ateneo appartenenti a diverse aree: agronomica, chimica, ingegneristica, geologica, economica, biologica, medica, urbanistica. A questo gruppo si sono uniti l'ARPAC, la Regione Campania e Risorsa SrL, con l'obiettivo di affrontare una tematica complessa come l'analisi, la tutela e il risanamento dell'ambiente con una squadra di ricercatori fortemente interdisciplinare (Tab. 1).
Gli obiettivi principali erano: 1) studiare le caratteristiche del territorio di un SIN (Litorale Domizio-Agro Aversano), poi riclassificato nel 2013 come SIR (Sito di interesse Regionale), evidenziandone le criticità ambientali; 2) validare a scala pilota alcune tecniche eco-compatibili di risanamento ambientale (bio- e fito-remediation); 3) verificare se c'era l'opportunità di attivare una filiera di valorizzazione energetica delle biomasse prodotte nei siti contaminati; 4) verificare l'efficacia di tecniche di *soil washing* a basso impatto ambientale per trattare gli *hot spot* maggiormente contaminati; 5) calibrare e validare alcune tecniche di monitoraggio ambientale con approcci chimici, biologici (muschi, microflora, fauna), idrogeologici, paesaggistico-territoriali, socio-economici ed ingegneristici (relativamente alle tecniche di conversione energetica delle biomasse); 6) sensibilizzare il pubblico e diffondere i risultati del progetto tra la popolazione, gli studenti di diversi ordini e grado, i tecnici, i ricercatori e gli amministratori locali.
Nel corso dello svolgimento del progetto si sono poi rese necessarie altre collaborazioni (con l'Istituto per le Ricerche sulla Combustione del CNR, R. Ragucci, P. Giudicianni; con l'INEA, R. Ciaravino; con il CRISP-Centro di Ricerca per il supporto alla Gestione del Paesaggio e

1. Foreword

M. Fagnano

The Ecoremed project (LIFE Programme) was set up in 2010 and submitted to the European Commission (EC) in 2011. The project received EC approval in early 2012 and was started in June 2012.
The project is coordinated by the Interdepartmental Research Centre for the Environment (CIRAM) of the University of Naples Federico II, which brought together 69 researchers from different fields: agronomy, chemistry, engineering, geology, economics, biology, medicine and land use planning. This core group was assisted by the Regional Environmental Agency ARPAC, the Campania Regional Authority and Risorsa Srl in tackling a complex problem: analysis, protection and restoration of the environment in the National Interest Priority Site (NIPS) known as the *Litorale Domizio Agro Aversano* (Volturno River southern coastal plain), using a strong transdisciplinary approach (Tab. 1).
The main aims were: 1) to study the features of a NIPS (*Litorale Domizio-Agro Aversano*), then reclassified in 2013 as a Regional Site of Interest (RSI) and highlight its environmental problems; 2) to validate at pilot scale some eco-friendly techniques for environmental restoration (Bio- and Phyto-remediation); 3) to ascertain whether there is the possibility of harnessing energy from the biomass produced on contaminated sites; 4) to ascertain the efficacy of soil washing for remediation of highly contaminated hot spots; 5) to calibrate and validate environmental monitoring techniques based on chemical, biological (mosses, bacteria, fauna), hydrogeological, territorial, economic, social and engineering approaches; 6) to raise awareness of citizens by disseminating the Ecoremed approach to the resident population, students, technicians, researchers and policy makers.
While the project was under way, new collaboration became necessary with different research centres (Combustion Research Institute of CNR, R.Ragucci, P.Giudicianni; National Agricultural Economics Institute, R. Ciaravino; Research Centre for supporting landscape and agro-

dell'Agroambiente, F. Terribile) che hanno consentito di approfondire alcuni aspetti del progetto.
L'idea di base era piuttosto semplice: trovare una sinergia tra l'esigenza di risanare i terreni contaminati con specie non alimentari e l'esigenza di produrre energia o biomateriali rinnovabili senza entrare in competizione con le tradizionali colture alimentari. Pertanto ci sembrava una buona idea utilizzare i terreni contaminati per la produzione sostenibile di biomasse utilizzabili per la produzione di bioenergia o bioplastiche.
Basandoci sulla percezione che l'Agro Aversano, all'epoca Sito di Interesse Nazionale, oggetto di smaltimento illegale di rifiuti, fosse un territorio estesamente contaminato, a suo tempo ritenevamo che fossero disponibili ampie superfici non più utilizzabili per le tradizionali colture alimentari e quindi utilizzabili per produrre in maniera sostenibile biomasse a servizio di una bioraffineria.
Come vedremo in seguito, i risultati ottenuti hanno fortemente modificato questa inziale percezione sostituendola con una conoscenza più approfondita della realtà oggettiva sulla qualità ambientale del territorio in esame.
Un contributo in tal senso ha avuto la campagna mediatica scatenatasi durante l'estate del 2013 sulla cosiddetta Terra dei Fuochi.
Le rivelazioni di un sedicente pentito, sono state più volte rilanciate dai media nazionali che hanno fatto a gara nel proporre trasmissioni televisive ed articoli a stampa con toni sempre più allarmistici, presentando spesso contenuti pseudo-scientifici assolutamente improbabili. Purtroppo nessuno dei media nazionali presentò l'intervista ai Magistrati (Cafiero de Rhao e Cantone) che avevano inquisito questo pentito e che sostenevano che tutte le sue rivelazioni erano già state verificate senza trovare nessun riscontro (vedi: *http://espresso.repubblica.it/palazzo/2015/02/23/news/il-pentito-della-terra-dei-fuochi-tra-luci-e-ombre-1.200740*).

ecosystem management, F.Terribile) that allowed particular issues of environmental remediation to be covered in depth.
The basic idea of the Ecoremed project was to develop a circular economy model: to link the need to remediate contaminated soils with the need to produce renewable bioenergy or biomaterials whilst avoiding competition for land with traditional food crops. Therefore it seemed a good idea to use contaminated soils for sustainable production of biomass from non-food crops to satisfy the biomass needs of a biorefinery.
As we will see, our findings modified this initial perception thanks to in-depth knowledge of environmental quality of agriculture lands in the study area. A contribution to this was also given by the media campaign about the so-called "Land of Fires" (*Terra dei Fuochi*) that exploded during summer 2013.
The renewed declarations of an informer were amplified by the national media which proposed broadcasts and news items of an increasingly alarmist nature. Unfortunately, no national mass media channel reported the interview with the magistrates (Cafiero de Rhao and Cantone) who investigated the information in question and who stated that none of his declarations had found any confirmation (see: *http://espresso.repubblica.it/palazzo/2015/02/23/news/il-pentito-della-terra-dei-fuochi-tra-luci-e-ombre-1.200740*).
All this media clamour forced the Italian government to enact a Decree regarding "Urgent provisions to tackle the environmental and industrial emergencies and stimulate development of the areas affected in Campania" (Law Decree 136 of 10/12/2013, transposed into law with amendments by Law 6 of 06/02/2014).
To implement Art. 1 of the decree, a Directive of the Italian Ministries of Agriculture, Environment and Health was enacted that established a Task Force to identify a scientific model to evaluate the suitability of soils for the production of food crops. Three partners of the Ecoremed project were nominated among the members of the task force (Massimo Fagnano of Naples University, Amedeo D'Antonio of the Campania Regional Authority and Marinella Vito of ARPAC).

Tabella 1. Struttura del progetto Ecoremed. **Table 1. Structure of the Ecoremed Project**

Azione / Action	**Coordinatore** / Coordinator	**Settore** / Sector
B1. ENVIRONMENTAL CHARACTERIZATION OF THE AREA	**D. Ducci**	**Idrogeologia** / Hydrogeology
B1a. Contribution of air pollutants deposition to soil contamination	A. Senatore	Ing. industriale / Industrial engineering
B1b. Geochemical characterization of agricultural soils	B. De Vivo, S. Albanese	Geochimica ambientale / Environmental geochemistry
B1c. Hydrological and hydrogeological characterization	D. Ducci, N. Romano	Ing. Idraulica; Idrogeologia / Hydraulic engineering, hydrogeology
B1d. Human exposure and health assessment	M. Manno	Medicina del lavoro / Medicine
B1e. GIS inventory of environmental conditions	L. Boccia	Ingegneria del Territorio / Landscape engineering
B2. STRENGTHENING BIO-PHYTO-REMEDIATION OF CONTAMINATED SOILS	**N. Fiorentino**	**Agronomia ambientale** / Environmental agronomy
B2a. Isolation and selection of biodegrading bacteria from microbial community of contaminated soil, preparation and application of formulates in situ	O. Pepe, V. Ventorino	Microbiologia agraria / Microbiology
B2b. Bioremediation improvement by white-rot fungi inoculums in open field conditions	V. Faraco	Biotecnologia / Biotechnology
B2c. Assisted phytoremediation with compost amendment and Trichoderma inoculation of energy crops	M. Mori	Agronomia e colture erbacee / Agronomy
B3. USE OF CONTAMINATED BIOMASSES FOR ENERGY PRODUCTION	**S. Pindozzi**	**Ing. agraria** / Agricultural engineering
B3a. Syngas Production from Gasification of Biomasses	A. Cavaliere, S. Faugno	Impianti chimici / Chemical engineering
B3b. Contaminated biomasses for II - generation biodiesel synthesis	D. Pirozzi	Ing. chimica / Chemical engineering
B4. SOIL WASHING OF CONTAMINATED SOILS	**R. Andreozzi**	**Chimica industriale** / Industrial chemistry
B4a. Chemical, bio-chemical washing of contaminated soils	M. Fabbricino	Ing. sanitaria-ambientale / Environmental engineering
B4b. Oxidative photocatalytic treatment of aqueous stream produced during soil washing	R. Andreozzi	Chimica industriale / Industrial chemistry
C1. ANALYSIS OF MOBILITY AND BIOAVAILABILITY OF POLLUTANTS IN PILOT FIELDS	**S. Di Rosa** **P. Adamo**	**ARPAC** **Chimica agraria** / Agricultural chemistry
C2. BIOMONITORING OF RIQUALIFICATION ACTIONS IN PILOT FIELDS	**S. Giordano**	**Botanica ambientale** / Botany
C2a. Bio-monitoring of air pollution by moss transplants and characterization of airborne particles	S. Giordano	Botanica ambientale / Botany
C2b. Evaluation of the microbial community structure	O. Pepe, V. Ventorino	Microbiologia agraria / Microbiology
C2c. Bio-monitoring of oxidative damage and characterization of reproductive health status of selected species	G. Guerriero	Biologia / Biology
C3. GROUNDWATER MONITORING	**A. Corniello**	**Geologia applicata** / Applied Geology
C4. MONITORING OF ENVIRONMENTAL QUALITY OF THE PROCESSES OF ENERGETIC CONVERSION OF BIOMASSES	**S. Pindozzi**	**Ingegneria agraria** / Agricultural engineering
C5. ENVIRONMENTAL EFFECTS OF LAND USE CHANGE	**L. Boccia** **M. Rigillo**	**Ingegneria Territorio Urbanistica** / Landscape engineering
C6. MONITORING WATER TRANSFER PROCESSES IN THE SOIL-VEGETATION ATMOSPHERE SYSTEM	**N. Romano**	**Ingegneria idraulica** / Hydraulic engineering
C7. MONITORING SOCIAL AND ECONOMICAL IMPACT OF SOIL REMEDIATION	**G. Cicia, T. Del Giudice**	**Economia agraria** / Agricultural economics
D1. WRITING UP OF AN OPERATIVE PROTOCOL IN RELATION TO REGIONAL REGULATORY FRAMEWORK	**A. Di Gennaro**	**RISORSA SrL dissemination**
D2. INFORMATION AND COMMUNICATION DEVOTED TO FARMERS AND LOCAL ADMINISTRATORS	**A. D'Antonio**	**REGIONE CAMPANIA dissemination**
D3. FORMATION, INFORMATION AND COMMUNICATION DEVOTED TO TECHNICAL OPERATORS AND EXPERTS	**M. Giugni**	**Ingegneria ambientale** / Environmental engineering

Tutto questo clamore mediatico ha poi spinto il Governo italiano ad emanare un decreto concernente "Disposizioni urgenti dirette a fronteggiare emergenze ambientali e industriali e a favorire lo sviluppo delle aree interessate" (DL 136 del 10 dicembre 2013 n. 136, convertito con modificazioni con legge 6 febbraio 2014, n. 6). In attuazione a quanto disciplinato dall'articolo 1 del DL 136/2013, il 23 dicembre 2013, è stata emanata la direttiva dei Ministeri delle Politiche Agricole, dell'Ambiente e della Salute, che ha istituito un gruppo di lavoro (GdL) per la identificazione di un modello scientifico che permettesse di valutare l'idoneità dei suoli all'uso agricolo. Tra i componenti di questo gruppo di lavoro sono stati nominati 3 membri del progetto afferenti a differenti partner (il prof. Massimo Fagnano dell'Università di Napoli, il dott. Amedeo D'Antonio della Regione Campania e la dott.ssa Marinella Vito dell'ARPAC).

Il coinvolgimento del gruppo di ricerca di Ecoremed nelle attività di caratterizzazione della Terra dei Fuochi ha poi stimolato una crescente domanda di dati ed informazioni da parte della popolazione e dei media. I ricercatori di Ecoremed non si sono sottratti a queste richieste, accettando di partecipare a oltre 150 incontri diretti con la popolazione, interviste su quotidiani, riviste e televisioni regionali e nazionali.

Dal momento che l'azione B1b del progetto era già stata conclusa e sul sito del progetto erano già state pubblicate le mappe con la distribuzione degli Elementi Potenzialmente Tossici nei suoli agricoli dell'Agro Aversano, il progetto Ecoremed ha messo a disposizione del GdL il suo database geochimico ambientale, composto prevalentemente dai dati raccolti dal prof. De Vivo e dall'ARPAC (vedi: http://www.ecoremed.it/index.php?option=com_content&view=article&id=86&Itemid=65&lang=en).

Questi dati sono stati usati per il primo screening dei suoli agricoli che ha portato ad identificare circa 1000 ha (su un totale di 50.000 ha di aree agricole, pari al 2%) come potenzialmente a rischio (vedi la Sintesi della relazione di cui all'art. 1, comma 3, lettera c) della Direttiva Ministeriale 23 dicembre 2013 e il DL dell'11 marzo 2014, entrambi scaricabili dal sito: http://www.arpacampania.it/web/guest/1086).

Su questi suoli potenzialmente a rischio un gruppo interdisciplinare composto da Guardie Forestali, Tecnici Regionali dell'ARPAC e dell'Istituto Zooprofilattico, è poi tornato per effettuare misure geomagnetometriche per verificare la presenza di rifiuti interrati e prelievi ed analisi di suolo, acque e vegetazione spontanea o coltivata, con l'obiettivo di confermare o rettificare il rischio presunto e proporre una classificazione definitiva dei vari siti in esame (vedi: http://www.arpacampania.it/web/guest/1088).

Ad oggi (gennaio 2017), solo 30 ha circa sono stati classificati come non idonei alla produzione agricola tradizionale.

L'esiguità delle superfici risultate contaminate nel territorio dell'Agro Aversano, ovviamente, ha imposto al progetto Ecoremed la necessità di riconsiderare i propri obiettivi e di evolvere i propri approcci.

Tale evoluzione ha riguardato da un lato le metodologie per la caratterizzazione dei siti contaminati, dall'altro la possibilità di produrre biomasse da energia sui suoli agricoli contaminati.

Involvement of the Ecoremed Research group in the activities of environmental characterization of the Land of Fires stimulated increasing demand for data and information on the part of citizens and the mass media. The Ecoremed researchers attempted to meet such demands, participating in more than 150 public events with citizens, associations and students, and in interviews with newspapers, magazines, and regional and national television channels.

Since action B1b of the project was already concluded and the maps with pollution distribution were already published on the project website, the coordination centre of the Ecoremed project placed at the disposal of the government task force all the geochemical data mainly consisting of datasets from Prof. De Vivo and ARPAC. (see: http://www.ecoremed.it/index.php?option=com_content&view=article&id=86&Itemid=65&lang=en)

All these data were then used for preliminary screening of agricultural soils that allowed identification of about 1000 ha (2% out of a total of 50,000 ha) as potentially at risk (see the report summary required under Art. 1, paragraph 3c of the above-mentioned directive and by the Law Decree of 11/03/2014, both downloadable from the website: http://www.arpacampania.it/web/guest/1086

On these soils potentially at risk, an interdisciplinary group consisting of the National Forest Service, ARPAC, Institute of Experimental Zooprophylaxis and Regione Campania returned to make geomagnetometric measurements to find underground landfilled wastes and samplings and analyses of soils, waters, cultivated or wild vegetation, so as to confirm or disprove the provisional classification, thus proposing a definitive classification of agricultural use suitability of the sites (see: http://www.arpacampania.it/web/guest/1088)

As of today (May 2017), only about 30 ha (0.06% of the total of 50,000 ha) have been classified as contaminated and unsuitable for traditional agricultural uses. The very small size of contaminated croplands, of course, forced the Ecoremed project to reconsider its initial objectives and to fine-tune its approaches. This concerned both the methods for environmental characterization of contaminated soils and the possibility of cultivating energy crops on contaminated soils.

1) Environmental characterization

Analysis of Italian environmental legislation highlighted several weaknesses in relation to setting up the sampling scheme and the depth of the soil layer to be sampled.

In Law Decree No 152/06 there are no mandatory rules regarding rational sampling schemes or sampling layers. Normally reference is made to previous laws (Annex 2 to Ministerial Decree 471/99) which establish that one sample per hectare be taken and a composite sample of the 0-1 m layer be collected. Clearly, a soil sample 10 cm in diameter cannot be representative of an area of 10,000 m^2 and pollution levels, which are often higher in the top centimetres of soils, could be drastically underestimated if they were diluted in a 1 m layer.

For this reason, in the Ecoremed project, several activities were carried out to set up a strategy to attain more representative and more realistic information on the environmental quality of the study areas. In initial research carried out on the Giugliano site (Rocco et al.,

1) Caratterizzazione

L'analisi della legislazione attuale, evidenzia un paio di punti deboli, relativi alla definizione dello schema di campionamento ed allo strato di terreno da campionare.

Nel D.Lgs. 152/06 non ci sono riferimenti cogenti a criteri razionali di disegno del piano di campionamento e dello strato da campionare. Normalmente si fa riferimento a normative precedenti (All. 2 D.M. 471/99) che prevedono l'effettuazione, in genere, di 1 campione ad ettaro; per quanto riguarda lo strato da campionare è riportato il riferimento ad un campione medio composito da 0 a 1 m. Naturalmente salta subito all'occhio il fatto che un foro di 10 cm non può essere rappresentativo di un'area di 10.000 m^2 e che i livelli di inquinamento spesso relativi ai primissimi centimetri potrebbero essere drasticamente ridotti se diluiti in un campione di 1 m.

Per questo motivo nel progetto Ecoremed sono state svolte diverse attività finalizzate a definire una strategia che consentisse di ottenere informazioni rappresentative e realistiche della qualità ambientale delle aree di studio.

In un primo studio effettuato sul sito di Giugliano (Rocco et al., 2016), sono stati confrontati campioni discreti e campioni compositi con 2 griglie di campionamento: 3x3 m e 10x10 m. Dall'esame dei risultati è emerso che la creazione di un campione composito determina un effetto diluizione che porta a sottostimare i livelli di inquinamento di qualche hot spot.

2016), discrete and composite samples were compared with two sampling grids (3 x 3 m and 10 x 10 m). Our findings demonstrated that making a composite sample causes a dilution effect that leads to underestimating pollution levels, at the risk of overlooking several pollution hotspots.

In figure 1 it may be seen (1st, 3rd and 4th plots) that values from composite samples (i.e. 276 ppm in the 1st plot) are always lower than the various discrete samples that make them up (i.e. 1707 ppm). In other research conducted at Trentola-Ducenta (Capolupo et al., 2015), we sought to verify whether high-resolution aerial photographs taken by drones could allow analysis of the micromorphology of a lowland field, thus highlighting microbasins in which the accumulation of sediments, and hence of contaminants, could have a higher probability of occurring. Identification of such points is required to steer the subsequent scheme for direct samplings of soil. From figure 2 it may be seen that this method identified five areas (microbasins) in which copper concentrations were higher.

In a third study made at Giugliano, we asked for collaboration from a research group working on another LIFE project (LIFE08 ENV/IT/000408 – SoilConsWeb) which proposed a preliminary series of geophysical measurements to identify anomalies which would then be analysed with direct excavation of pits or soil profiles (Fig. 3).

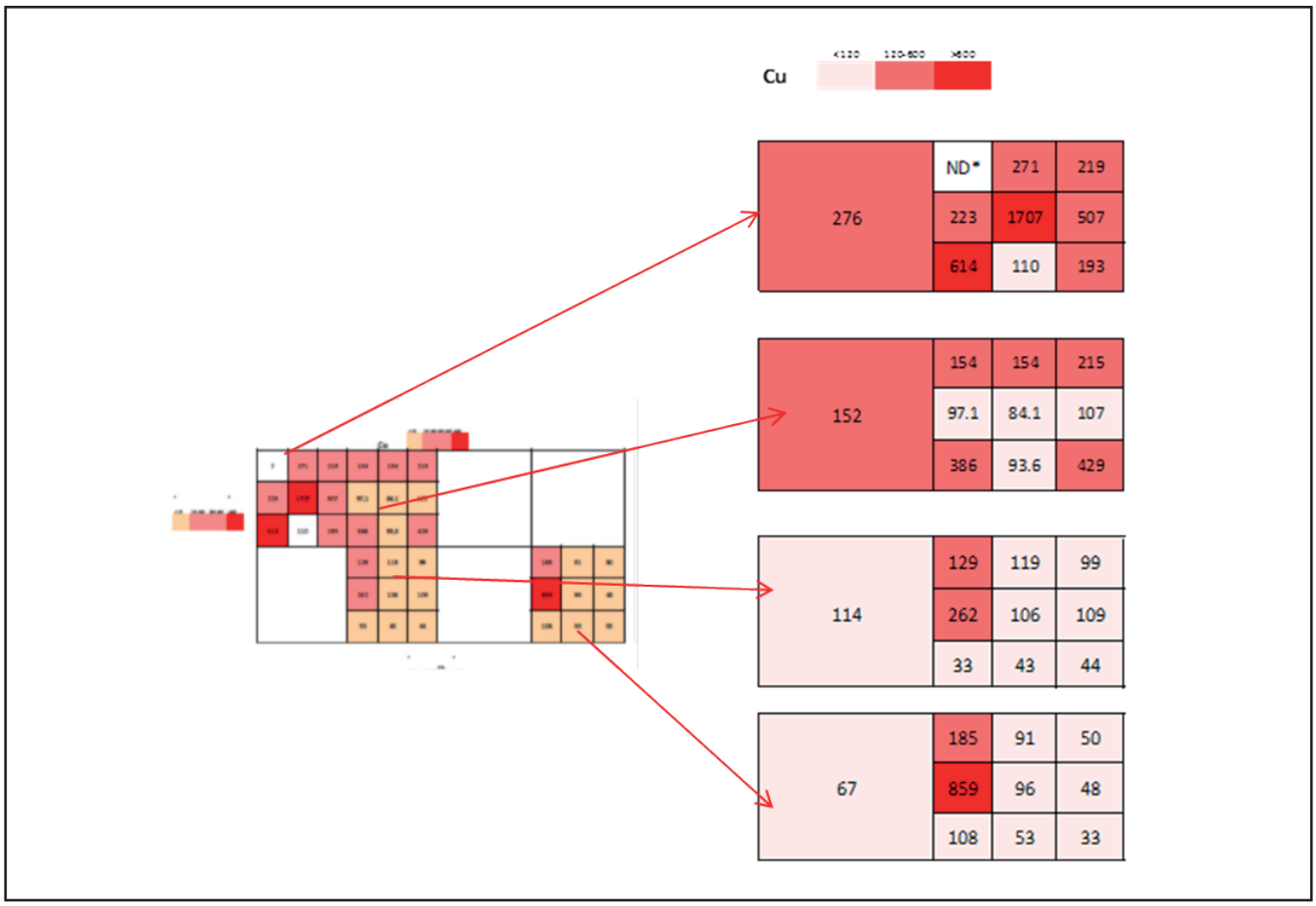


Figura 1. Livelli di rame nel suolo: confronto tra valori determinati con campioni compositi e discreti.

Figure 1. Copper levels in the soil: comparison between values from composite and discrete samples.

In figura 1 è possibile notare (prima, terza e quarta parcella) come i valori dei campioni compositi (es. 276 ppm nella prima parcella) siano sempre più bassi rispetto ad alcuni campioni discreti al loro interno (es. 1707 ppm), con una conseguente grave sottostima dei livelli di contaminanti raggiunti in alcuni punti del campo.
In un secondo studio fatto a Trentola (Capolupo et al., 2015) invece, abbiamo voluto verificare se le foto aeree effettuate ad alta risoluzione con un drone, consentissero di analizzare la micromorfologia di una campo di pianura così da evidenziare la presenza di microbacini in cui l'accumulo dei sedimenti e quindi dei contaminanti potesse essere più probabile. L'identificazione di tali punti risulta necessaria per orientare il successivo schema dei campionamenti diretti nel suolo. Dalla figura 2 è possibile notare che l'applicazione di questa metodologia ha consentito di identificare i 5 punti in cui le concentrazioni di rame erano più alte.
In un terzo studio effettuato a Giugliano, abbiamo coinvolto il gruppo di ricerca di un altro progetto LIFE (LIFE08 ENV/IT/000408 – SoilConsWeb) che ha proposto una serie di misure geofisiche per identificare le anomalie da indagare successivamente con scavi di profili e trincee (Figura 3).

Opening a soil profile also allows the stratigraphy and possible presence of contaminated materials to be analysed, thus making it possible to choose the layers most representing the form of contamination. For example, from the data gained from "Trench 5" it is evident that the most contaminated layers are only those between 50 and 80 cm: in this case the average sample of the 0-1 m layer would have underestimated the level of contamination.
Furthermore, the reliability of rapid low-cost methods was assessed to design a map of contamination levels so as to guide a subsequent rational sampling scheme of the whole site area (6 ha in this case). Figure 4 shows that with a measurement campaign conducted with X-ray fluorescence (XRF), it was possible to identify, in a few days' work, the areas severely contaminated by chromium, on which then to perform direct sampling for analyses with the official methods.
This approach seemed realistically the most feasible, given costs, times (both extremely low), but mainly the quality and representativeness of the data obtained. The methodological details in question will be presented in chapter 5 of the Ecoremed handbook.

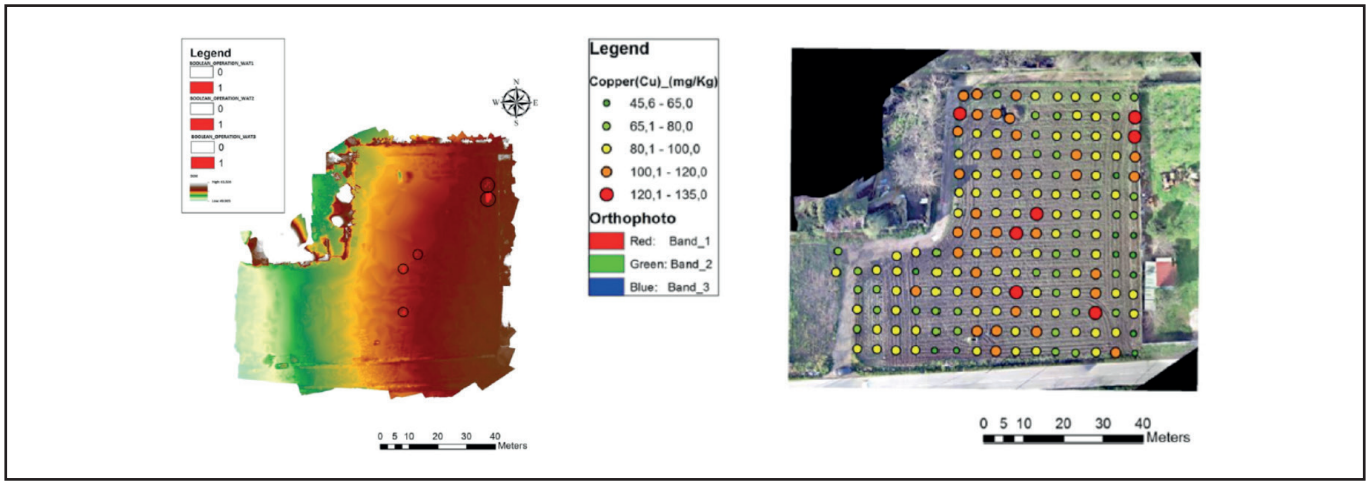


Figura 2. Confronto tra livelli di rame (Cu) stimati con le foto aeree e dati misurati.

Figure 2. Comparison between copper levels estimated by aerial photos and measured data.

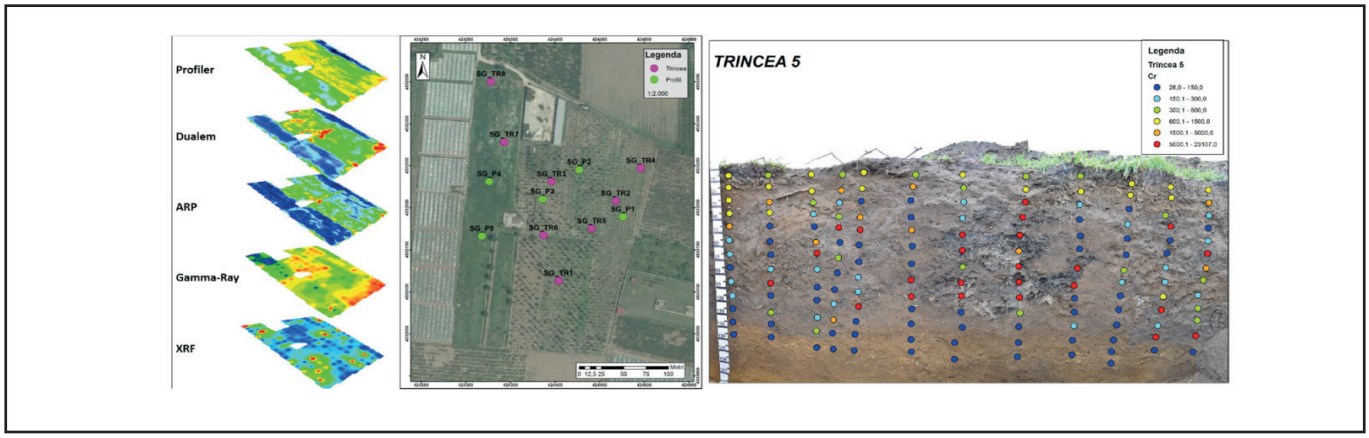


Figura 3. Identificazione delle aree anomale ed esempio di trincea in cui sono stati rinvenuti sversamenti di fanghi industriali.

Figure 3. Identification of anomalous areas and example of a soil profile in which industrial sludge were found.

L'apertura dei profili, consente inoltre di evidenziare la stratigrafia del suolo e l'eventuale presenza di matrici particolarmente contaminate, in modo da scegliere gli strati rappresentativi del tipo di inquinamento del sito. Dall'esame dei dati della trincea 5 risulta evidente come gli strati più contaminati siano solo alcune zone tra i 50 e gli 80 cm: in questi casi il campione medio dello strato 0-1 m determinerebbe una sottostima del livello di contaminazione.
Inoltre, è stata valutata l'affidabilità di metodi speditivi ed economici per ottenere una mappatura dei livelli di inquinamento così da orientare un successivo piano ragionato di campionamento dell'intera superficie del campo (6 ha in questo caso). La figura 4 mostra come, con una campagna di misure effettuate con la fluorescenza a raggi X (XRF), **è stato possibile identificare** in pochi giorni le aree con maggiore contaminazione da cromo, sulle quali orientare il successivo campionamento ufficiale per le analisi con le metodologie previste dalla normativa.
Questo approccio, è sembrato realisticamente il più fattibile, considerando sia i costi, sia i tempi (entrambi molto bassi), sia soprattutto la qualità dei risultati ottenuti.
I dettagli di questa metodologia saranno presentati con maggiore dettaglio nel capitolo 5 del manuale.

2) Biomass production and utilization
Analyses at territorial scale in the *Agro Aversano*, made within both the Ecoremed Project itself (see chap. 3 and 4), for the Italian government task force, have established that the areas which are contaminated and thus not suitable for food crops are so small as not to be enough to fuel biorefineries. Therefore, if "green" firms wanted to obtain biomass whilst avoiding competition for land with traditional food crops, other marginal lands in Campania should be targeted (i.e. salinized soils, abandoned soils or areas subjected to accelerated erosion) or other contaminated areas that could be widespread in other regions of Italy or in other countries.
That said, research conducted in the framework of the Ecoremed project (Giudicianni et al., 2017) allowed us to determine that pyrolysis, concentrating potentially toxic elements (PTEs) in the solid product (so-called Biochar), is the best process with the lowest environmental impact for treating biomass produced in phytoremediation plants (see chap. 12).

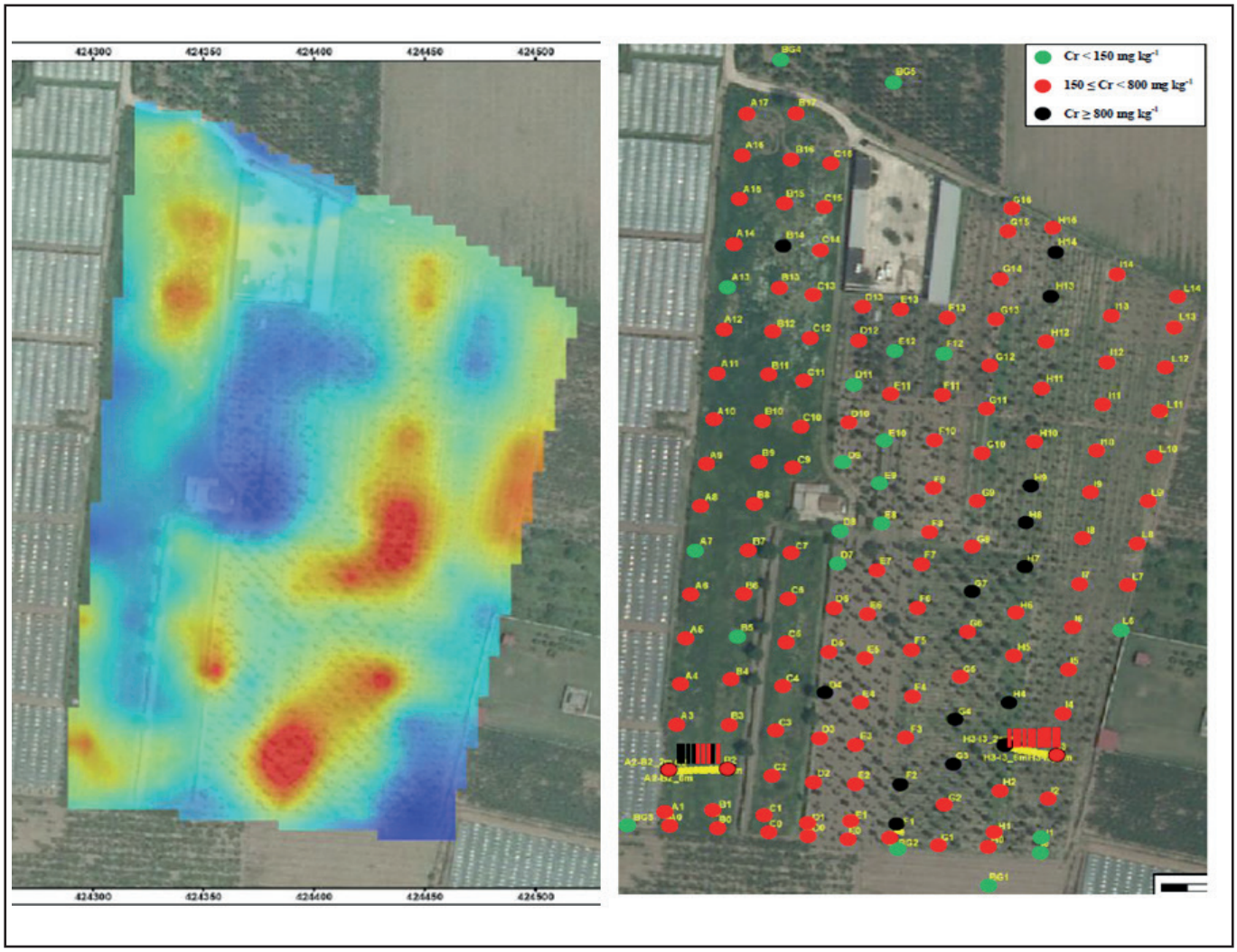


Figura 4. Livelli di cromo determinati con l'XRF (sinistra) e con l'ICP-MS (destra).

Figure 4. Levels of chromium as measured by XRF (left) and the official method of ICP-MS (right).

2) Produzione di biomasse

Le ricerche effettuate nel progetto Ecoremed hanno consentito di verificare che la pirolisi, che determina la concentrazione degli inquinanti nella frazione solida (il c.d. Biochar), è la tecnica migliore ed a minore impatto ambientale per il trattamento delle biomasse ottenute negli impianti di fitorisanamento (vedi cap.12).

Le analisi sul territorio dell'Agro-Aversano, svolte sia nell'ambito del progetto stesso (vedi cap. 3 e 4), sia per il GdL del Governo, hanno evidenziato che le superfici non idonee alle colture alimentari in questo territorio sono talmente esigue da non consentire una produzione di biomasse in quantità sufficiente per le esigenze di una bioraffineria. Pertanto, se le industrie di chimica verde volessero ottenere biomassa evitando la competizione con le colture alimentari nella Regione Campania, dovrebbero rivolgersi ad altri suoli marginali (es. suoli abbandonati, suoli in erosione, suoli salinizzati,…) oppure ad altre aree contaminate che sono diffuse in altre Regioni Italiane o all'estero.

3) Struttura del protocollo

1. Analisi del contesto (cap. 3 e 4)

Definizione delle sorgenti di inquinamento, degli usi del suolo attuali e potenziali, della popolazione esposta.

↓

2. Caratterizzazione di dettaglio (cap. 5 e 6)

2a) Rilievi indiretti geofisici e geochimici, analisi spaziale per:

- definire i volumi realmente contaminati, con tecniche speditive ed economiche
- identificare le aree a maggior rischio per pilotare il piano di campionamento
- identificare le anomalie geofisiche da indagare

↓

2b) Rilievi diretti (campionamento, scavi profili e trincee) per:

- definire contenuto e biodisponibilità dei contaminanti delle aree con i metodi ufficiali di analisi
- verificare presenza di interramenti di materiali estranei

↓

3. Analisi del rischio

- Definizione percorsi di esposizione della popolazione/lavoratori in relazione all'uso del suolo (verde pubblico o residenziale, industriale o commerciale)
- Per i siti agricoli, coltivazione ed analisi specie ortive vulnerabili all'accumulo di EPT **(cap. 7)**

↓

4. Tecniche di Bio-Fito-Risanamento

4a) Siti degradati fisicamente

F-R per Ripristino ambientale/paesaggistico **(cap. 8, 9)**

4b) Siti contaminati da EPT non mobili/biodisponibili **(cap. 9)**

F-R per Messa in sicurezza operativa/permanente (accoppiata ad altre tecniche: barriere idrauliche, iniezioni,…)

4c) siti contaminati da EPT e/o contaminanti organici

F-R per Messa in sicurezza **(cap.9)**, B-R per Bonifica **(cap.10)**

4d) siti contaminati da EPT mobili/biodisponibili

F-R per Bonifica **(cap. 8, 9)**, soil washing per hot spot **(cap. 11)**

3) Structure of the Ecoremed protocol

1. Analysis of the geographical context (chap. 3 and 4)

Identification of pollution sources, present and future land uses, structure of the population exposed to contamination.

↓

2. Detailed characterization of the site (chap. 5 and 6)

2a) Indirect geophysical and chemical surveys, analysis of spatial variability, so as to:

- define the volume of contaminated soil, with rapid, economical techniques,
- identify the sub-areas with the higher probability of contamination for steering the following direct soil sampling plan,
- identify the anomalies to inspect with direct surveys.

↓

2b) Direct surveys (soil sampling, excavation of pits or soil profiles) so as to:

- define concentration and bioavailability of contaminants by using official analytical methods,
- verify the presence of underground disposal of wastes

↓

3. Risk analysis

- Definition of the exposure pathways for citizens/ workers in relation to land use (green, residential, commercial, industrial) (see: http://www.reconnet.net/Risknet%202_download.html)
- For agricultural areas, cultivation and analysis of crops vulnerable to contaminant uptake and accumulation **(chap. 7)**

↓

4. Bio- remediation (BR)/Phyto-remediation (PR)

4a) Physically degraded sites

PR for environmental and landscape restoration **(chap. 8, 9)**

4b) Sites contaminated by non-mobile/non-bioavailable PTEs **(chap. 9)**

PR for operative/permanent securing (combined with other techniques: i.e. hydraulic barrier, syringing,…)

4c) Sites contaminated by PTEs and/or by organic pollutants

PR for securing sites **(chap.9)**, BR for remediation **(chap.10)**

4d) Sites contaminated by mobile/ bioavailable PTEs

PR for remediation **(chap. 8, 9)**, soil washing for the hotspots **(chap. 11)**

In all cases, the limitation in biomass reuse will depend on the analytical results of the biomass produced during PR. In the case of non-contaminated biomass, there will no limitations (timber, biofuels,…), while in the case of contaminated biomass pyrolysis for producing biochar will have the lowest environmental impact **(chap. 12).**

↓

5. Environmental monitoring

The effects of the Ecoremed protocol should be monitored in the years to come by analysing the changes in air quality with mosses (**chap. 13a**), in waters (**chap. 13b**), in soil microbial biodiversity (**chap. 13c**), fauna (**chap. 13d**), crop safety (**chap. 14**), landscape structure (**chap.15**), water fluxes in the soil-plant-atmosphere system (**chap.16**) and finally socio-economic aspects (**chap. 17**).

In tutti i casi, dalle analisi sulle biomasse prodotte potrà dipendere la possibilità di un loro riuso. Nel caso di produzione di biomasse non contaminate, non ci saranno limitazioni alla loro utilizzazione (legna da opera, bio-combustibile,…), mentre nel caso in cui le biomasse prodotte sul sito dovessero risultare contaminate la destinazione a minore impatto ambientale sarà la pirogassificazione con produzione di biochar **(cap. 12)**.

↓

5. Monitoraggio ambientale

L'effetto del protocollo Ecoremed potrà essere monitorato analizzando gli effetti sulla qualità dell'Aria (es. con in muschi (cap. 13a) e delle acque (cap. 13b), sulla biodiversità della microflora del suolo (cap. 13c), sulla fauna (cap. 13d), sulla salubrità delle produzioni vegetali (cap. 14), sulla struttura del paesaggio e del territorio (cap. 15), sui flussi idrici nel sistema suolo-pianta-atmosfera (cap. 16), sugli aspetti socio-economici (cap. 17).

Bibliografia

Rocco C., Duro I., Di Rosa S., Fagnano M., Fiorentino N., Vetromile, A. Adamo, P., 2016. Composite vs. discrete soil sampling in assessing soil pollution of agricultural sites affected by solid waste disposal. Journal of Geochemical Exploration, 170, 30-38.

Capolupo A., Pindozzi S., Okello C., Fiorentino N., Boccia L., 2015. Photogrammetry for environmental monitoring: the use of drones and hydrological models for detection of soil contaminated by copper. Sci. Total Environ., 514, pp. 298–306.

References

Capolupo A., Pindozzi S., Okello C., Fiorentino N., Boccia L., 2015. Photogrammetry for environmental monitoring: the use of drones and hydrological models for detection of soil contaminated by copper. Sci. Total Environ., 514, 298–306.

Giudicianni P., Pindozzi S., Grottola C. M., Stanzione F., Faugno S., Fagnano M., Fiorentino N., Ragucci R., 2017. Pyrolysis for exploitation of biomasses selected for soil phytoremediation: Characterization of gaseous and solid products. Waste Manag., 61, 288-299.

Rocco, C., Duro, I., Di Rosa, S., Fagnano M., Fiorentino N., Vetromile, A., Adamo, P. , 2016. Composite vs. discrete soil sampling in assessing soil pollution of agricultural sites affected by solid waste disposal . J. Geochem. Explor., 170, 30-38.

2. Inquadramento normativo

M. Fagnano, A. D'Antonio

La definizione della contaminazione del suolo è un processo che si articola in due fasi. La prima fase prevede il confronto tra i valori riscontrati in un sito e quelli presenti nella tabella 1 dell'allegato 5 parte IV del Testo Unico Ambientale (Decreto Legislativo aprile 2006, n. 152) che definisce le Concentrazioni Soglia di Contaminazione (CSC) in relazione all'utilizzazione del suolo.
Nel caso di sito ad uso a verde pubblico e residenziale (colonna A), le CSC sono più basse rispetto ai siti ad uso commerciale o industriale (colonna B), perché si considera che il sito può essere frequentato per un numero maggiore di ore. Non sono forniti valori di CSC per i suoli agricoli.
In caso di superamento delle CSC, bisogna considerare anche i valori di fondo (VF), sia naturale che antropico: nel caso in cui valori di un determinato sito siano più alti delle CSC ma più bassi dei VF, il sito viene considerato NON Contaminato.
A tale proposito vale la pena di ricordare alcune definizioni riportate dall'art. 240 del suddetto D.Lgs (Tabella 1).

2. Legislative framework

M.Fagnano, A.D'Antonio

Soil contamination is defined as a process which is divided into two phases. The first phase involves comparison between the values found in a site and those reported in Table 1 of Annex 5 Part IV of the Single Environmental Text (Legislative Decree no. 152 of April 2006) which defines the Contamination Threshold Concentration (CSC) in relation to soil use.
In the case of public green areas and sites for residential use (column A), the CSCs are lower than for commercial or industrial sites (column B), because it is considered that the site can be frequented for longer hours. No CSC values are provided for agricultural soils.
In the event of exceeding the CSC values, the background values (BV), whether natural or anthropic, must also be considered. Should the values of a particular site be higher than the CSC but lower than the BV, the site is considered NOT contaminated.
In this regard it is worth recalling some of the definitions in Art. 240 of the above mentioned Legislative Decree (Table 1).

Tabella 1. Art.240 (definizioni) del D.Lgs 152/06.

Table 1. Art.240 (definition) of the Legislative Decree 152/06.

comma / **subsection**	**testo** / **text**
b	concentrazioni soglia di contaminazione (**CSC**): i livelli di contaminazione delle matrici ambientali che costituiscono valori al di sopra dei quali è necessaria la caratterizzazione del sito e l'analisi di rischio sito specifica, come individuati nell'Allegato 5 alla parte quarta del presente decreto. Nel caso in cui il sito potenzialmente contaminato sia ubicato in un'area interessata da fenomeni antropici o naturali che abbiano determinato il superamento di una o più CSC, queste ultime si assumono pari al valore di fondo esistente per tutti i parametri superati contamination Threshold Concentration (**CSC**): The levels of contamination of environmental matrices that constitute values above which the characterization of the site and the site-specific risk analysis are required, as identified in Annex 5 to the fourth part of this decree. In the case in which the potentially contaminated site is located in an area affected by anthropic or natural phenomena that have led to the exceedance of one or more CSC, the latter are assumed equal to the existing baseline value for all the exceeded parameters
c	concentrazioni soglia di rischio (**CSR**): i livelli di contaminazione delle matrici ambientali, da determinare caso per caso con l'applicazione della procedura di analisi di rischio sito specifica secondo i principi illustrati nell'Allegato 1 alla parte quarta del presente decreto e sulla base dei risultati del piano di caratterizzazione, il cui superamento richiede la messa in sicurezza e la bonifica. I livelli di concentrazione così definiti costituiscono i livelli di accettabilità per il sito risk threshold concentration (**CSR**): the levels of contamination of environmental matrices, to be determined case by case with the application of site-specific risk analysis procedure according to the principles illustrated in Annex 1 to the fourth part of this decree and on the basis of the findings of the characterization plan, which if exceeded requires safety measures and remediation. The concentration levels thereby defined constitute acceptable levels for the site
d	sito potenzialmente contaminato: un sito nel quale uno o più valori di concentrazione delle sostanze inquinanti rilevati nelle matrici ambientali risultino superiori alle **CSC** in attesa di espletare le operazioni di caratterizzazione e di analisi di rischio sanitario e ambientale sito specifica, che ne permettano di determinare lo stato o meno di contaminazione sulla base delle CSR potentially contaminated site: a site in which one or more values of the pollutant concentrations found in environmental matrices are higher than the CSC, prior to carrying out characterization and of site-specific health and environmental risk analysis which allow the contamination status to be determined on the basis of CSR
e	sito contaminato: un sito nel quale i valori delle **CSR**, …., risultano superati contaminated site: a site in which the values of **CSR** are exceeded
f	sito non contaminato: un sito nel quale la contaminazione rilevata nelle matrici ambientali risulti inferiore alle **CSC** oppure, se superiore, risulti comunque inferiore alle **CSR** determinate a seguito dell'analisi di rischio sanitario e ambientale sito specifica non-contaminated site: a site in which the contamination detected in the environmental matrix is lower than the CSC or, if greater, is nonetheless lower than the CSR determined by site-specific health and environmental risk analysis
n	messa in sicurezza operativa: l'insieme degli interventi eseguiti in un sito con attività in esercizio atti a garantire un adeguato livello di sicurezza per le persone e per l'ambiente, in attesa di ulteriori interventi di messa in sicurezza permanente o bonifica da realizzarsi alla cessazione dell'attività. Essi comprendono altresì gli interventi di contenimento della contaminazione da mettere in atto in via transitoria fino all'esecuzione della bonifica o della messa in sicurezza permanente, al fine di evitare la diffusione della contaminazione all'interno della stessa matrice o tra matrici differenti. In tali casi devono essere predisposti idonei piani di monitoraggio e controllo che consentano di verificare l'efficacia delle soluzioni adottate operative safety measures/securing the site: all the actions performed in a site which is still active aimed at ensuring an adequate level of safety for people and environment, prior to further permanent safety measures or remediation to be carried out at the cessation of activity. This also includes contamination containment measures to be carried out until execution of the remediation or until permanent safety measures, in order to prevent the spread of contamination within the same matrix or between different matrixes. In such cases appropriate plans for monitoring and control must be prepared that allow the effectiveness of the adopted solutions to be verified
o	messa in sicurezza permanente: l'insieme degli interventi atti a isolare in modo definitivo le fonti inquinanti rispetto alle matrici ambientali circostanti e a garantire un elevato e definitivo livello di sicurezza per le persone e per l'ambiente. In tali casi devono essere previsti piani di monitoraggio e controllo e limitazioni d'uso rispetto alle previsioni degli strumenti urbanistici permanent safety measures/securing the site: All the actions appropriate to permanently isolating the polluting sources with respect to the surrounding environmental matrixes and to ensuring a high and definitive level of safety for people and for the environment. In such cases plans must be provided for monitoring and control and limitations in the use with respect to technical forecasts
p	bonifica: l'insieme degli interventi atti ad eliminare le fonti di inquinamento e le sostanze inquinanti o a ridurre le concentrazioni delle stesse presenti nel suolo, nel sottosuolo e nelle acque sotterranee ad un livello uguale o inferiore ai valori delle CSR remediation: all the measures appropriate to eliminating the sources of pollution and the pollutants or to reducing their concentrations in the soil, in the subsoil and in the groundwater to a level equal to or lower than the CSR values
q	ripristino e ripristino ambientale: gli interventi di riqualificazione ambientale e paesaggistica, anche costituenti complemento degli interventi di bonifica o messa in sicurezza permanente, che consentono di recuperare il sito alla effettiva e definitiva fruibilità per la destinazione d'uso conforme agli strumenti urbanistici Restoration and environmental restoration: the actions of environmental and landscaping restoration, also complementary to remediation or permanent safety measures, that allow the site to be restored to the effective and final usability for intended use in compliance with technical specifications.

Tabella 2. Screening values (in Italia, CSC) per definire il rischio potenzialmente inaccettabile in siti ad uso residenziale. Estratto Da Carlon, 2007.

Table 2. Screening values (in Italy, CSC) to define the potentially unacceptable risk for residential use sites. From Carlon, 2007.

	AUT	BE(F)	BE(V)	CZE	DNK	FIN	ITA	NLD	POL	SVC	RU
As	50	110	300	70	20	50	20	55	22.5	50	20
Be				20			2	30		30	
Cd	10	6	30	20	5	10	2	12	5.5	20	2
Co				300		100	20	240	45	300	
Cr	250		520	500	1000	200	150	380	170	800	130
Cu	600	400	290	600	1000	150	120	190	100	500	
Hg	10	15	56	10	3	2	1	10	4	10	8
Pb	500	700	700	300	400	200	100	530	150	600	450
Ni	140	470	300	250	30	100	120	210	75	500	
Sb	5			40		10	10	15			
Se							3	100		20	35
Sn				300			1	900	40	300	
Tl	10						1	15			
V				450		150	90	250		500	
Zn		1000	710	2500	1000	250	150	720	325	3000	

Legenda: Austria (AUT), Belgio fiandre(BEF), Belgio Vallonia (BEV), Rep. Ceca (CZE), Danimarca (DNK), Finlandia (FIN), Italia (ITA), Olanda (NLD), Polonia (POL), Slovacchia (SVC), Regno Unito (RU)

Legend: Austria (AUT), Belgium Flanders (BEF), Belgium Walloon (BEV), Czech Republic (CZE), Denmark (DNK), Finland (FIN), Italy (ITA), Netherlands (NLD), Poland (POL), Slovakia (SVC), United Kingdom (UK)

A proposito delle CSC, dall'esame comparato tra i valori presenti nelle normative europee, sia pure con qualche differenza nella classificazioni d'uso, risulta evidente come i valori previsti dalla legislazione italiana sono molto più bassi rispetto agli altri Paesi (Tab. 2).

L'enorme variabilità dei valori fa sorgere qualche dubbio sul loro significato tossicologico.
Sembrerebbe quasi che i vari paesi abbiamo fissato delle soglie su base statistica, cioè considerando il livello medio di contaminazione dei rispettivi territori, alzando le soglie quando in presenza di contaminazione diffusa.
Non avrebbe altro senso, ad esempio, il fatto che un suolo con 300 mg/kg di piombo è considerato potenzialmente contaminato solo il Finlandia ed Italia, ma non lo è negli altri Paesi. Esempi simili si potrebbero fare per tutti gli altri metalli e metalloidi, ma vale la pena di soffermarci sul caso del berillio e dello stagno, perché il superamento delle rispettive CSC ha portato a incauti sequestri.
Il berillio ha una CSC estremamente bassa in Italia (2 mg/kg), che porterebbe a classificare come potenzialmente contaminati tutti i suoli italiani (Fig. 1). Non si è tenuto presente che il berillio (come altri minerali) è naturalmente contenuto in tutte le rocce vulcaniche, ma anche che è praticamente insolubile e quindi non assorbibile dalle piante, né lisciviabile verso le falde. Tant'è vero che quasi nessun Paese Europeo ha fissato delle soglie per il berillio e chi lo ha fatto (Rep. Ceca, Olanda e Slovacchia) ha posto delle soglie molto più alte (20-30 mg/kg).

As regards CSC, from a comparative examination between the values present in the European regulations, albeit with some differences in the classifications of use, it is evident that the Italian legal values are much lower than in other countries (Table 2).

The enormous variability of values gives rise to some doubts regarding their toxicological significance. It would appear that the various countries have set the thresholds on a statistical basis, i.e. considering the average level of contamination in their respective territories, and increasing the thresholds in the presence of widespread contamination. For example, the fact that a soil with 300 mg/kg of lead is considered potentially contaminated only in Finland and Italy, but not in other countries, has otherwise little sense. Similar examples could be made for all other metals and metalloids, but it is worth stressing the cases of beryllium and tin, because the exceedance of their respective CSCs has led to injudicious land confiscation.
The CSC of Beryllium is extremely low in Italy (2 mg/kg), and in accordance with it, all the Italian soils would be classified as potentially contaminated (Figure 1).
It was not taken into account that beryllium (and other minerals) is naturally contained in all volcanic rocks, but also that it is practically insoluble and therefore not absorbed by plants or leached into the groundwater. Indeed, almost no European country has set the threshold for beryllium and those who did so (the Czech Republic, the Netherlands and Slovakia) have set much higher thresholds (20-30 mg/kg).

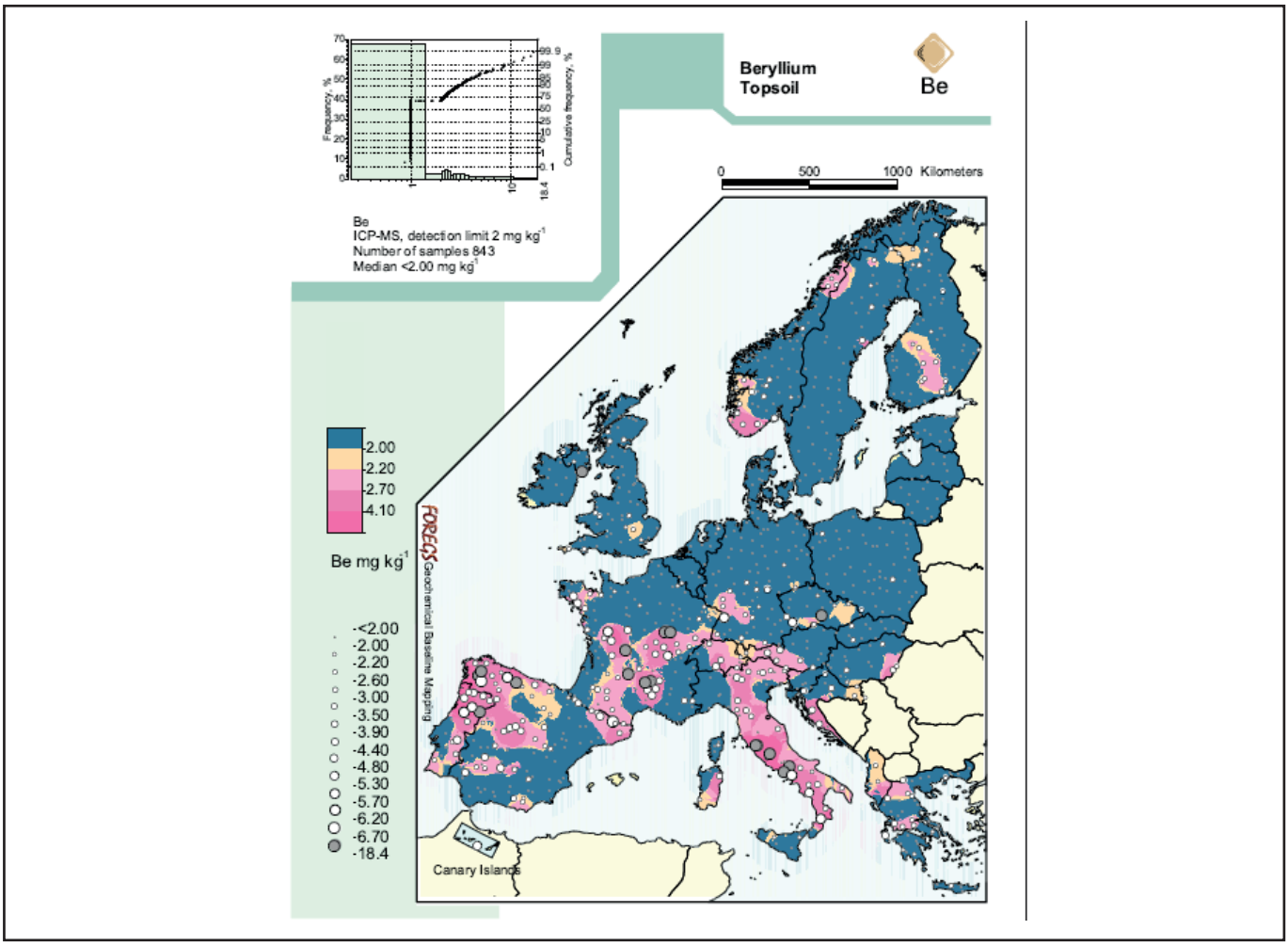


Figura 1. Valori di fondo del berillio in Europa (Da: Foregs, 2005).

Figure 1. Beryllium background values in Europe (From Foregs, 2005).

Per quanto riguarda lo stagno, l'Italia aveva fissato una soglia notevolmente più bassa di altri Paesi (1 mg/kg vs 900 dell'Olanda). In seguito alla segnalazione fatta al Ministero dell'Ambiente, nell'ambito delle attività del Gruppo di Lavoro (GdL) di cui alla Direttiva Ministeriale 23 dicembre 2013 (attuazione dell'art. 1, comma 1 del D.L. 136/2013 convertito in Legge n. 6/2014) per il quale questo valore non poteva che essere un errore materiale, esso è stato corretto (art. 13, comma 3 bis, della Legge 11.08.2014 n. 116) sostituendo la parola "stagno" con "composti organo-stannici".
Tornando ai contaminanti che potrebbero rappresentare un pericolo per la salute umana e per l'ambiente, come ci ricorda l'art. 240 del Testo Unico Ambientale, per poter definire un sito "contaminato" bisogna eseguire un'analisi di rischio sanitario ed ambientale. La procedura prevista ed anche gli strumenti disponibili (es. Software Risknet 2.0, oppure ISPRA 2009) però tengono presente solo i rischi diretti per chi frequenta i siti e quindi sono legati alle ore di esposizione alle particelle di terreno contaminato che posso raggiungere il bersaglio uomo tramite inalazione, ingestione e contatto dermico. Sono anche considerati i rischi per l'ambiente legati alla lisciviazione dei contaminanti in falda.
Nel caso dei suoli agricoli oltre ai rischi diretti per i frequentatori del sito e per l'ambiente, bisogna considerare anche i rischi indiretti per i consumatori che potrebbero

As regards tin, Italy originally set a much lower threshold than other countries (1 mg/kg vs. 900 in the Netherlands). Following a report to the Environment Ministry, within the context of the activities of the Working Group of the Ministerial Directive 23 December 2013 (Art. 1, subsection 1 of Legislative Decree 136/2013 converted into Law no. 6/2014), in which this value could only be a material error, it has been corrected (Art. 13, subsection 3b of Law no. 116 of 11.08.2014), replacing the word "tin" with "organic stannic compounds".
Returning to contaminants that might be hazardous to human health and to environment, as recalled by Art. 240 of the Single Environmental Text, in order for a site to be termed "contaminated" we must perform an analysis of health and environmental risk. The procedure as well as the tools available (e.g. Software Risknet 2.0 or ISPRA 2009), however, take into account only the direct risks for those who frequent the sites and are therefore related to hours of exposure to contaminated soil particles that can reach the human target through inhalation, ingestion and skin contact. The risks for the environment linked to the leaching of contaminants in groundwater are also considered.
In the case of agricultural soils in addition to direct risks, we must also consider indirect risks for end users who could consume the products obtained on contaminated sites.

consumare i prodotti ottenuti su i siti contaminati.
Come detto il T.U. Ambientale non prevede CSC per i suoli agricoli per i quali non è data una procedura specifica. L'art. 241 del T.U. Ambientale prevede un "*regolamento relativo agli interventi di bonifica, ripristino ambientale e di messa in sicurezza, d'emergenza, operativa e permanente, delle aree destinate alla produzione agricola e all'allevamento è adottato con decreto del Ministro dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare di concerto con i Ministri delle attività produttive, della salute e delle politiche agricole e forestali*". Suddetto regolamento, pur se redatto nell'ambito di un tavolo tecnico che ha previsto la presenza del GdL di cui alla Direttiva Ministeriale 23 dicembre 2013 (Ministero Ambiente, 2014), non è stato ancora adottato. In sintesi il regolamento, che si applica alle porzioni di suolo destinate alla produzione delle colture agrarie, al pascolo e all'allevamento, definisce:

1. i valori o range di valori di screening (Concentrazioni Soglia di Contaminazione, CSC) al di sopra dei quali devono essere effettuate valutazioni di rischio sito-specifiche per accertare la mobilità dei contaminanti, il trasferimento ai vegetali, la biodisponibilità e il bioaccumulo;
2. la procedura da applicare per l'esecuzione delle valutazioni di rischio sito-specifiche associate alle concentrazioni di sostanze inquinanti superiori alle CSC nei suoli destinati alla produzione agricola e all'allevamento - Valutazione del Rischio (VdR) sanitario (ISS, 2013);
3. le modalità di intervento (messa in sicurezza, bonifica, ripristino ambientale) per le aree nelle quali è stato rilevato rischio non accettabile al fine di ripristinare le funzioni del suolo idonee alla produzione agricola e all'allevamento.

All'attualità, in assenza di specifici riferimenti normativi, nel progetto LIFE ECOREMED ci siamo basati su quanto previsto nella bozza di regolamento di cui sopra, ed abbiamo validato test chimici sulla biodisponibilità dei contaminanti (vedi cap. 6) e test biologici sull'assorbimento ed accumulo dei contaminati da parte di colture vulnerabili (vedi cap. 7) in modo da ottenere informazioni sul rischio che i contaminanti possano accumularsi nelle parti eduli dei prodotti agricoli e quindi rappresentare una minaccia per la salute dei consumatori.
Una volta definito un sito agricolo come contaminato, poi si deve procedere alla sua bonifica, che deve avere l'obiettivo di ridurre progressivamente la quota biodisponibile degli EPT (Elementi Minerali Potenzialmente Tossici, c.d. metalli pesanti).
A tale proposito, l'uso delle tecniche ecocompatibili previste dal protocollo Ecoremed (bio e fito-risanamento) per il risanamento dei terreni agricoli contaminati dell'agro Aversano, è citato anche dalla Legge n. 6 del 2014 (art. 2 comma 4) in cui, a proposito della Commissione che deve coordinare gli interventi di risanamento della c.d. Terra dei Fuochi, recita: "*La Commissione deve inoltre prevedere, nell'ambito degli interventi di bonifica e riequilibrio dell'ecosistema, l'utilizzo di sistemi naturali rigenerativi e agroecologici, attraverso piante con proprietà fitodepurative previste dalla legislazione vigente*".
Pertanto il protocollo Ecoremed basato sull'uso di risorse naturali (vegetazione e microflora del terreno) può essere applicato, secondo la normativa italiana per le operazioni

As mentioned above, the Single Environmental Text does not provide CSCs for agricultural soils, for which there is no specific procedure. Art. 241 of the Single Environmental Text makes the following provision: a "*regulation on remediation, environmental restoration and emergency operative and permanent safety measures, of the areas for agricultural production and husbandry, was adopted by decree of the Minister for the environment and land and sea protection in concert with the Ministers for Industry, Health and Agriculture and Forestry policy*". The above regulation, albeit drawn up by a technical committee which included the presence of the working group of the Ministerial Directive of December 23, 2013 (Environmental Ministry, 2014), has not yet been adopted. In summary, the regulation, which is applied to soil surfaces to be used for agricultural crops, grazing and husbandry, defines:

1. the values or range of screening values (Contamination Threshold Concentrations, CSC) above which site-specific risk assessments must be carried out to ascertain the mobility of contaminants, their transfer to plants, bioavailability and bioaccumulation;
2. the procedure to apply for the execution of site-specific risk assessments associated to pollutant concentrations above the CSC in soils for agricultural production and husbandry - Health Risk Assessment (ISS, 2013);
3. the intervention modes (safety measures, remediation, environmental restoration) for the areas in which unacceptable risk has been detected in order to restore soil functions for agricultural production and husbandry.

Currently, in the absence of specific regulations, in the project LIFE ECOREMED we relied on the provisions in the draft of the regulation mentioned above, and we validated chemical tests on contaminant bioavailability (see Chap. 6) and biological tests on contaminant absorption and accumulation in vulnerable crops (see Chap. 7) in order to obtain information about the risks of contaminant accumulation in the edible parts of agricultural products that therefore constitute a threat to the health of consumers.
Once an agricultural site has been classified as contaminated, then its remediation must be undertaken. Such remediation must aim to progressively reduce the bioavailable portion of PTEs (potentially toxic elements, so-called heavy metals).
In this regard, the use of environmentally friendly techniques provided by the Ecoremed protocol (bio and phyto-remediation) for the restoration of contaminated farmland in the Agro Aversano, is also mentioned in Law no. 6 of 2014 (Art. 2, subsection 4) which, concerning the Commission which must coordinate the restoration measures of the so-called Land of Fires, reads: "*The Commission must also provide, within the measures for remediation and ecosystem rebalancing, for the use of natural regeneration and agroecological systems, through plants with phyto-cleansing properties in accordance with current legislation*."
Therefore, the Ecoremed protocol based on the use of natural resources (vegetation and soil microflora) can be applied, according to the Italian legislation

di Bonifica, Messa in sicurezza e Ripristino ambientale, a seconda delle caratteristiche dei siti e degli obiettivi dell'intervento. I diversi campi di utilizzo condizionano anche la qualità della biomassa delle specie usate che, ai sensi della normativa vigente, sono considerate un sottoprodotto del fitorisanamento.

Infatti, la caratteristica di protocolli come quello del progetto ECOREMED, è l'applicazione del fito-risanamento con specie vegetali che abbiano intrinseche proprietà qualitative e commerciali che ne rendano vantaggiosa l'applicazione anche dal punto di vista più tipicamente economico oltre che da quello squisitamente scientifico: l'utilizzo dei materiali prodotti nel ciclo di fitorisanamento può infatti contribuire, sia pure in quota parte, ai costi impiantistico/gestionali necessari per attuarlo. Quindi, escludendo la produzione di agroalimentari è evidente che la biomassa ottenuta abbia proprietà economico-commerciali costantemente prodotte che, pur non costituendo il fine tecnico/scientifico del programma in sé, risultino comunque commercialmente sfruttabili in altri cicli produttivi, secondo le pertinenti tecniche industriali. Questa caratteristica consente che tutto il materiale vegetale prodotto abbia tutte le proprietà intrinseche del **sottoprodotto,** così come definito a livello normativo nel D.Lgs. 152/06, art. 184-bis, escludendone pertanto completamente la natura di ***rifiuto***, *ab origine*.

A titolo puramente esplicativo, nella tabella Tab. 3 si riportano le condizioni richieste dalla normativa (cfr. D.Lgs. 152/06 e s.m.i., art. 184-bis c.1) per soddisfare la classificazione di un sottoprodotto.

Resta escluso l'uso delle biomasse derivate dalla *phytoremediation* in impianti di digestione anaerobica, nel qual caso è vietato l'utilizzo agronomico del digestato che deve essere sottoposto a processi di essiccazione finalizzati a ridurre il rischio di dispersione delle sostanze pericolose eventualmente contenute e successivamente avviato ad operazioni di valorizzazione energetica, tra cui preferibilmente l'incenerimento, come previsto dal DIM 5046 del 25/2/2016 del (GU n.90 del 18/4/2016 - S.O. n. 9).

for the operations of Remediation, Safety measures and Environmental restoration, according to the site characteristics and the intervention objectives. The different fields of use also affect the quality of the biomass of the species used, and in accordance with current legislation, they are to be considered a byproduct of phytoremediation.

Indeed, the characteristic of protocols like that of the ECOREMED project is the application of phyto-restoration with plant species that have intrinsic qualitative and commercial properties that make the application advantageous, not only in purely scientific terms but also from the economic standpoint: the use of materials produced in the phytoremediation cycle can indeed contribute, albeit in part, to the plant management costs required to implement it. Therefore, agri-food production aside, it is evident that the biomass obtained has economic and commercial properties which, while not constituting the scientific/technical objective of the programme, are commercially exploitable in other production cycles, according to industrial practices. This feature allows that all the produced plant material has all the intrinsic properties of a **byproduct**, as defined in the Legislative Decree no. 152/06, Art. 184b, hence completely excluding the nature of ***waste***.

For purely explanatory purposes, in Table 3 we report the conditions required by legislation (see Legislative Decree no. 152/06 and subsequent amendments, Art. 184b c.1) for the classification of a byproduct.

What remains excluded is the use of biomass derived from phytoremediation in anaerobic digestion plants. In this case the agricultural use of the digestate is forbidden which must be subjected to drying processes to reduce the risk of dispersion of hazardous substances possibly contained in it, and then used for energy recovery operations, among which incineration is preferred, as provided for by DIM 5046 of 25/02/2016 (GU no. 90 of 18/04/2016 - S.O. no. 9).

Tabella 3. Requisiti richiesti dalla normativa vigente e caratteristiche delle biomasse prodotte in impianti di fitorisanamento.

Table 3. Conditions required by current regulations and characteristics of the biomass produced in phytorestoration plants.

Requisiti richiesti dall'art. 148-bis del D.Lgs. 152/06 **Conditions required by Art. 148b of the Law Decree 152/06**	**Caratteristiche del fitorisanamento** **Characteristics of phytorestoration**
La sostanza o l'oggetto è originato da un processo di produzione, di cui costituisce parte integrante, e il cui scopo primario non è la produzione di tale sostanza od oggetto The substance or the object originates from a production process of which it constitutes an integral part, and whose primary purpose is not production of such substance or object.	Il servizio prodotto è il fito-risanamento dei suoli, e quindi tutti i vegetali ottenuti non è possibile non produrli essendone parte non solo integrante ma addirittura essenziale The service is soil phytorestoration, and hence it is impossible not to produce the vegetables that are obtained, being an integral and essential part of the process
E' certo che la sostanza o l'oggetto sarà utilizzato, nel corso dello stesso o di un successivo processo di produzione o di utilizzazione, da parte del produttore o di terzi It is certain that the substance or the object will be used, in the course of the same or in a subsequent production process, by the producer or by a third party	L'oggetto "***vegetali***" sarà utilizzato nello stesso processo di produzione (es:interramento della flora spontanea, raccolta delle brassicacee ed altre specie intenzionalmente utilizzate, taglio ed eventuale cippatura delle componenti lignee) per ulteriori applicazioni agronomiche in loco secondo le buone tecniche agronomiche, o anche ex situ presso impianti di trattamento di biomasse The "plant" material will be used in the same production process (e.g. burial of the spontaneous flora, collection of the Brassicaceae and other species intentionally used, cutting and eventual chipping of the wood components) for further agronomic applications in situ according to good agronomic techniques, or ex situ in biomass treatment plants
La sostanza o l'oggetto può essere utilizzato direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale The substance or object can be used directly without any further processing other than normal industrial practice	
L'ulteriore utilizzo è legale, ossia la sostanza o l'oggetto soddisfa, per l'utilizzo specifico, tutti i requisiti pertinenti riguardanti i prodotti e la protezione della salute e dell'ambiente e non porterà a impatti complessivi negativi sull'ambiente o la salute umana Further use is lawful, i.e. the substance or object fulfills, for the specific use, all requirements concerning such products and the protection of health and the environment and will not lead to a negative impact on the environment or human health.	L'utilizzo di biomasse per la fertilizzazione dei suoli è normale pratica agricola da millenni e in quanto tale assolutamente legale, così come è altrettanto legale l'impiego di biomassa vegetale, sia per applicazioni industriali come la produzione di energia elettrica o legno da opera, sia per quelle civili (es: legna da ardere per riscaldamento di civili abitazioni) The use of biomass for soil fertilization has been a normal agricultural practice for millennia and as such is absolutely legal, as is also legal the use of plant biomass, both for industrial applications, such as the production of electricity or wood, and for those civil purposes (e.g. firewood for residential heating).

Bibliografia

Carlon C., 2007. Derivation methods of soil screening values in Europe. EC-JRC, Ispra EUR 22805-EN, 306 pp.

Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 Febbraio 2016. https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/9780.

Decreto Legislativo aprile 2006, n. 152. http://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/06152dl6.htm.

Decreto Legge n. 136/2013 "Disposizioni urgenti in materia di reati ambientali e per la tutela dell'ambiente, della salute e delle produzioni agroalimentari in Campania". http://www.bonifiche.minambiente.it/dl_136_13.html.

Legge 6 febbraio 2014 n. 6. http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2014/02/08/14G00013/sg.

Foregs, 2005. http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/maps_table.php.

ISPRA 2009. http://www.isprambiente.gov.it/it/temi/siti-contaminati/analisi-di-rischio.

ISS, 2013. http://www.iss.it/iasa/?lang=1&tipo=41.

Ministero dell'Ambiente, 2014. http://www.bonifiche.minambiente.it/contenuti%5Cgruppi%5Caree_agricole%5CREGOLAMENTO_A_MISE_SALUTE_E_MPAAF.pdf.

Risknet 2.0. http://www.reconnet.net/Risknet%202_download.html.

References

Carlon C., 2007. Derivation methods of soil screening values in Europe. EC-JRC, Ispra EUR 22805-EN, 306 pp.

Interministerial decree no. 5046 of 25 February 2016. https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/9780.

Legislative Decree, April 2006, n. 152. http://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/06152dl6.htm.

Decree Low n.136/2013 "Disposizioni urgenti in materia di reati ambientali e per la tutela dell'ambiente, della salute e delle produzioni agroalimentari in Campania". http://www.bonifiche.minambiente.it/dl_136_13.html.

Law 6 February 2014 no.6. http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2014/02/08/14G00013/sg.

Foregs, 2005. http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/maps_table.php.

ISPRA 2009. http://www.isprambiente.gov.it/it/temi/siti-contaminati/analisi-di-rischio.

ISS, 2013. http://www.iss.it/iasa/?lang=1&tipo=41.

Environment Ministry, 2014. http://www.bonifiche.minambiente.it/contenuti%5Cgruppi%5Caree_agricole%5CREGOLAMENTO_A_MISE_SALUTE_E_MPAAF.pdf.

Risknet 2.0. http://www.reconnet.net/Risknet%202_download.html.

3. La risorsa suolo e le forme di contaminazione

A. Di Gennaro, A. D'Antonio

3.1. Il suolo: funzioni e servizi ecosistemici, processi degradativi

Per suolo si intende "lo strato superiore della crosta terrestre, formato da particelle minerali, materia organica, acqua, aria e organismi viventi. Esso produce insostituibili funzioni e servizi ecosistemici nella produzione di alimenti e di altre biomasse, nell'immagazzinare e trasformare minerali, materia organica, acqua, energia e sostanze chimiche, nel filtrare le acque e gli inquinanti. Il suolo rappresenta la piattaforma dell'attività umana, oltre a costituire l'habitat di gran parte degli organismi della biosfera ed essere fonte di materie prime". (Senato della Repubblica, ddl 1181 "Legge quadro per la protezione e la gestione sostenibile del suolo").

Il suolo è al centro di tutte le funzioni ambientali degli ecosistemi terrestri. Il suolo svolge un ruolo insostituibile nella produzione primaria di alimenti, ma anche di altre biomasse come nelle foreste; nello stoccaggio, filtrazione e trasformazione di nutrienti, sostanze e acqua; nella protezione delle acque sotterranee dalla contaminazione, nello stoccaggio di carbonio e, conseguentemente, nella riduzione delle emissioni di gas serra in atmosfera o nella preservazione della biodiversità microbica, animale e vegetale per le generazioni future. Ma il suolo è anche il supporto sul quale ci spostiamo e costruiamo le nostre case o ci permette di realizzare i nostri giochi e i nostri svaghi; esso conserva le tracce delle civiltà che ci hanno preceduto. Queste sono le funzioni e servizi ambientali, economici, sociali e culturali del suolo denominati: servizi ecosistemici.

In quanto risorsa soggetta a processi di formazione estremamente lenti è da considerarsi una risorsa non rinnovabile, rendendo pertanto estremamente grave la sua perdita in quanto in grado di determinare un'incidenza significativa su alcuni settori strategici per le società come la sicurezza alimentare, la tutela delle acque di superficie e sotterranee, la salute umana, i cambiamenti climatici, la tutela della natura e della biodiversità. Per questo il suolo deve essere utilizzato in maniera sostenibile, in modo da conservarne le capacità di fornire servizi di tipo ecologico, economico e sociale e di mantenerne le funzioni, affinché le generazioni future possano usufruirne.

A differenza dell'aria e delle acque, il suolo è essenzialmente una risorsa di proprietà privata. Inoltre tutte queste funzioni e proprietà dei suoli, e anche la loro fertilità variano (anche enormemente) nel paesaggio. Questa è una ricchezza del paesaggio italiano perché significa che abbiamo una grandissima diversità ecologica e produttiva che se conosciuta e ben gestita può diventare una grande opportunità per la produttività agronomica, ambientale, multifunzionale del paesaggio italiano. Oggi più che mai è importante e urgente confrontarsi con queste problematiche e cercare una giusta mediazione tra il profitto economico derivante dall'uso dei suoli da parte di agricoltori, gruppi di interesse, organizzazioni locali e il rispetto dell'ambiente promosso tramite l'adozione delle direttive e dei regolamenti europei in materia ambientale. Nell'interesse pubblico, pertanto, i proprietari di terreni devono essere tenuti ad adottare misure di precauzione nei casi in cui l'utilizzo che fanno del suolo possa osta-

3. Soil as a resource and its forms of contamination

A. Di Gennaro, A. D'Antonio

3.1 Soil: ecosystem functions and services, degradation processes

Soil is defined as "the top layer of the earth's crust, formed by mineral particles, organic material, water, air and living organisms. It produces irreplaceable ecosystem functions and services relevant to production of food and other biomasses. Soil is also important to store and transform minerals, organic matter, water, energy and chemicals as well as filter water and pollutants. Soil is the platform for human activities, in addition to being the habitat of a large part of the biosphere organisms and the main source of raw materials.*"(Senate of the Italian Republic, Draft law 1181 "Framework Law for the protection and sustainable management of soil").*

Soil lies at the core of all the environmental functions of terrestrial ecosystems. It plays an irreplaceable role in producing food but also other biomass such as forests, in storing, filtering and transforming nutrients, compounds and water, in protecting groundwater from contamination, in carbon storage and hence in reducing greenhouse gas emissions into the atmosphere or in conserving microbial, animal and plant biodiversity for future generations. Soil is also the substrate in which we move and build our houses. It allows us to create our games and our entertainment; it also retains traces of the civilizations that preceded us. These are the functions and environmental, economic, social and cultural services of soil termed ecosystem services.

As a resource with an extremely slow formation process, soil is considered a non-renewable resource, hence making its loss an extremely serious matter due to the potential consequences on some human strategic sectors such as food security, conservation of surface water and groundwater, human health, climate change, nature protection and biodiversity. For the above reasons, soil must be used sustainably so as to preserve its capacity to retain the ecological, economic and social services in order to maintain its functions, making them available to future generations.

Unlike air and water, soil is mainly a privately owned resource. Moreover, the above-mentioned functions and properties, as well as fertility, vary greatly within the landscape. This constitutes the richness of the Italian landscape: it means that the country has great ecological and productive diversity which - if known and well managed - can become a great opportunity for Italy's agricultural, environmental and multifunctional productivity. Today it is critical and urgent to deal with these issues and find the right compromise between economic profit from land use by farmers, and the interests of stakeholders and local associations in relation to environmental protection promoted through the adoption of European directives and regulations on environmental matters. Therefore, in the public interest, land users should be required to take precautionary measures in cases in which soil use can significantly impact on the important functions that the soil itself performs.

The multiple functions of soils are under increasing threat from a wide range of human activities. Increasing environmental pressures are reducing soil availabil-

colare in maniera rilevante le funzioni che questo svolge. Le molteplici funzioni del suolo sono sotto una minaccia crescente da una vasta gamma di attività umane, e le pressioni ambientali sempre più insistenti stanno danneggiando la sua disponibilità e la capacità a lungo termine di risorsa naturale di interesse comune: deve essere dunque protetto dal degrado di per sé.
Il degrado del suolo è la perdita della capacità del suolo di svolgere le sue funzioni ed i suoi servizi ecosistemici (ddl 1181 "Legge quadro per la protezione e la gestione sostenibile del suolo").
La normativa italiana in vari settori – ad esempio sui rifiuti, le sostanze chimiche, la prevenzione e riduzione dell'inquinamento di origine industriale, le acque, l'agricoltura e lo sviluppo rurale – presenta alcune disposizioni riguardanti la protezione del suolo, che tuttavia non sono concepite appositamente né sufficienti a proteggere tutti i suoli contro tutti i principali processi di degrado. Sarebbe opportuno disporre di un quadro normativo coerente ed efficace che proponga principi e obiettivi comuni finalizzati alla protezione e all'utilizzo sostenibile del suolo in Italia ed in coerenza con le norme comunitarie.
Il suolo è soggetto a degrado a causa dei seguenti processi (ddl 1181 "Legge quadro per la protezione e la gestione sostenibile del suolo"):

a) Erosione: fenomeno naturale di rimozione di particelle di suolo ad opera di acqua e vento che, in seguito ad alcune pratiche antropiche, può considerevolmente incrementarsi, fino a produrre effetti molto gravi di degradazione. Per le finalità di questo dispositivo si include in questa definizione la decorticazione del suolo per fini commerciali.
b) Compattazione: fenomeno causato da eccessive pressioni meccaniche, conseguenti all'utilizzo di macchinari pesanti o al sovrapascolamento. In seguito alla compattazione, il suolo perde la naturale densità, struttura e porosità, diminuendo la sua permeabilità e fertilità.
c) Contaminazione: immissione nel suolo di sostanze potenzialmente tossiche che possono pregiudicarne le principali funzioni.
d) Impermeabilizzazione: azione antropica che determina la copertura permanente del suolo, tramite la costruzione di piattaforme, infrastrutture, opere ed edifici; l'impermeabilizzazione impedisce al suolo di svolgere le proprie funzioni ecosistemiche. Ai fini del presente titolo l'impermeabilizzazione include l'attività di rimozione dello strato superficiale dei suoli per fini costruttivi.
e) Salinizzazione: accumulo nel suolo di sali solubili in seguito ad eventi naturali o all'azione dell'uomo.
f) Desertificazione: tutti i rischi enunciati in questo comma, sia presi singolarmente che in combinazione tra loro, possono portare alla degradazione acuta del suolo con la perdita irreversibile di gran parte o di tutte le funzioni ed i servizi ecosistemici dei suoli. La desertificazione fornisce quindi una valutazione globale su tutti i rischi di degrado del suolo in una data area geografica.

Tutte queste minacce sono il frutto di fenomeni complessi e interconnessi tra loro e nella nostra realtà territoriale la severità con la quale si manifestano è sempre più evidente.

ity and its long-term capacity as a natural resource of common interest. Therefore it should be protected from degradation. Soil degradation is defined as the loss of the capacity of soil to perform its functions and its ecosystem services (*Draft Law 1181 "Framework Law for the protection and sustainable management of land")*.
In several areas (e.g. waste, chemicals, prevention and reduction of pollution from industrial sources, water, agriculture and rural development) Italian legislation includes some provisions on soil protection, but these are not conceived specifically nor sufficient to protect all soils against all major degradation processes. It would be desirable to have a coherent and effective legislative framework providing for common principles and objectives and aiming at the protection and sustainable use of soil in Italy also in line with EU standards.
Soil is subject to degradation due to the following processes *(Draft Law 1181 "Framework Law for the protection and sustainable management of land"):*

a) Erosion: natural phenomenon of removal of soil particles by water and wind. It can be considerably incremented as a consequence of some human practices so far as to produce severe degradation effects. Included in erosion processes is also topsoil removal for commercial purposes.
b) Compacting: a phenomenon caused by excessive mechanical pressure, resulting from the use of heavy machinery or overgrazing. Following compaction, the soil loses its natural density, structure and porosity, reducing its permeability and fertility.
c) Contamination in the soil of potentially toxic substances that can impair its main functions.
d) Sealing: human action that results in permanent soil cover, through the construction of platforms, infrastructure and buildings; waterproofing prevents the soil from performing its ecosystem functions. Waterproofing in this context includes the removal of the upper layer of soil for construction purposes.
e) Salinisation: accumulation of soluble salts within the soil as a result of natural events or human action.
f) Desertification: all risks mentioned above - taken individually or in combination - can lead to acute soil degradation with the irreversible loss of most or all of the soil's functions and ecosystem services. Therefore, desertification provides an overall assessment of all the risks related to soil degradation in a given geographical area.

All of these threats are the result of complex inter-related events. In the area concerned, the severity with which they show up is increasingly evident.
In 2002 the European Commission produced a first document related to soil: the Communication COM (2002) 179 entitled " Thematic Strategy for Soil Protection". In September 2006 the European Commission proposed a new Directive of the European Parliament and of the Council, aimed at defining the overall framework for soil protection and at adopting a thematic strategy for the protection and sustainable use of soil. However, in May 2014 the Commission withdrew the proposal of the Framework Directive (2006) on soil, which would have transposed the Thematic Strategy on soil protection into binding rules for Member States. The Commission has also declared its intention to re-

Per quanto riguarda il suolo, nel 2002 la Commissione Europea ha prodotto un primo documento, la Comunicazione COM (2002) 179 dal titolo "Verso una strategia tematica per la protezione del suolo" e nel settembre 2006 (Commissione Europea, 2006), ha proposto una nuova Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, che avrebbe dovuto definire il quadro complessivo per la protezione del suolo e adottare la strategia tematica per la protezione e l'uso sostenibile del suolo. Sebbene nel maggio 2014 la Commissione abbia ritirato la proposta della Direttiva Quadro sul suolo del 2006, che avrebbe trasformato la strategia tematica per la protezione del suolo in norme vincolanti per gli Stati Membri, la stessa Commissione ha poi dichiarato di voler mantenere il proprio impegno sulla questione, valutando le diverse opzioni possibili e, intanto, delegando al Settimo Programma di Azione Ambientale le sfide da affrontare per il perseguimento degli obiettivi sulla protezione del suolo.
Il Settimo Programma Ambientale dell'Unione Europea, siglato il 20 novembre 2013 ed entrato in vigore nel gennaio 2014, prende la forma di una Decisione del Parlamento europeo e del Consiglio e ha quindi una natura normativa. Tra gli obiettivi contenuti nel rapporto finale "Il futuro che vogliamo", sono indicati la protezione, la conservazione e il miglioramento delle risorse naturali, incluso il suolo. Il testo approvato invita i governi nazionali a intervenire per garantire che le decisioni relative all'uso del territorio, a tutti i livelli di pertinenza tengano debitamente conto degli impatti ambientali, sociali ed economici che generano degrado del suolo.
E raccogliendo le indicazioni contenute nel rapporto finale di Rio+20, il tema del monitoraggio del territorio è presente anche nell'Agenda Globale per lo sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite e nei relativi Obiettivi di Sviluppo Sostenibile (Sustainable Development Goals - SDGs), da raggiungere entro il 2030, che dovranno essere integrati nei programmi nazionali a breve e medio termine, così da evitare la coesistenza di agende differenti e incoerenti (UN, 2015). Tra i target individuati, di particolare interesse per il territorio e per il suolo, i governi dovranno:
- migliorare, entro il 2030, la sostenibilità dell'attuale modello di sviluppo urbano e degli strumenti di pianificazione;
- assicurare, entro il 2030, l'accesso universale a spazi verdi e spazi pubblici sicuri, inclusivi e accessibili;
- raggiungere, entro il 2030, un land degradation neutral world, quale elemento essenziale per mantenere le funzioni ed i servizi ecosistemici in un dato intervallo di tempo.

Con la sottoscrizione dell'Agenda, tutti i paesi compresa l'Italia hanno accettato di partecipare ad un processo di monitoraggio di questi obiettivi gestito dalla Commissione Statistica delle Nazioni Unite, attraverso un sistema di indicatori, tra cui alcuni specifici sul consumo di suolo, sull'uso del suolo e sulle aree artificiali. Tra gli indicatori relativi a tali obiettivi sono di interesse specifico:
- il rapporto tra il consumo di suolo e la crescita demografica;
- la percentuale delle aree urbane costruite accessibile al pubblico;
- la percentuale del territorio soggetto a fenomeni di degrado.

main engaged in this issue by evaluating the different options while delegating to the Seventh Environment Action programme the challenges for pursuing soil protection.
The Seventh European Union Environment Programme was signed on November 20, 2013. Entering into force in January 2014, the Programme takes the form of a Decision of the European Parliament and the Council, and is therefore of a regulatory nature. Among the objectives contained in the final report "The Future We Want", the protection, preservation and improvement of natural resources including soil are also listed. This approved document invites governments to take appropriate measures at all relevant levels to ensure that decisions related to land use take due account of environmental, social and economic factors that generate soil degradation.
Following on from the guidelines contained in the Rio+20 Final Report, the issue of land use monitoring is also present in the Global Agenda for Sustainable Development of the United Nations as well as in the related Sustainable Development Goals (SDGs), to be achieved by 2030. These goals will have to be integrated in short and medium-term national programmes in order to avoid the coexistence of different agendas and inconsistencies (UN, 2015). Among the identified targets and of relevant interest to the region and to soil, Governments shall:
- by 2030 improve sustainability of the current model of urban development and planning tools;
- by 2030 ensure universal access to green areas and safe public areas (inclusive and accessible);
- by 2030 achieve a land degradation neutral world, as an essential element to maintain the functions and ecosystem services in a given time interval.

By signing up to the Agenda, all countries including Italy have agreed to participate in a monitoring process of these objectives carried out by the Statistical Commission of the United Nations, through an indicator system which includes some specific indicators on soil consumption, on soil use and on artificial areas. Among the indicators related to these objectives, there are some of specific interest:
- the relationship between land use and population growth;
- the percentage of urban areas made accessible to the public;
- the percentage of land areas subject to degradation.

Valuation of the benefits offered by "natural capital" through quantification of the available ecosystem services is one of the main challenges. Both at the scientific level as well as the institutional level, this valuation is in the forefront: it can help to achieve full awareness of the importance of the protection of environmental resources for the balance of ecosystems and for our own welfare (European Commission, 2014; UN, 2015).
Among the consequences of soil use, it is important to highlight the significant loss of ecosystem services and the increase in "hidden costs" (European Commission, 2013) due to increased soil sealing. Mapping and valuation of ecosystem services and the impact of soil consumption - including the economic impact - described in the last ISPRA report (ISPRA, 2016), albeit prelim-

La valutazione dei benefici offerti dal capitale naturale, attraverso la quantificazione dei servizi ecosistemici forniti, è una delle principali sfide che, sia a livello scientifico, sia a livello istituzionale, è al centro dell'attenzione, con la considerazione che possa contribuire a raggiungere una piena consapevolezza dell'importanza della tutela delle risorse ambientali per l'equilibrio degli ecosistemi e per il nostro stesso benessere (Commissione Europea, 2014; UN, 2015).
Tra le conseguenze del consumo di suolo, infatti, non si può non evidenziare la perdita consistente di servizi ecosistemici e l'aumento di quei "costi nascosti" (Commissione Europea, 2013), dovuti alla crescente impermeabilizzazione del suolo. La mappatura e la valutazione dei servizi ecosistemici e dell'impatto, anche economico, del consumo di suolo su di essi, presentati nell'ultimo rapporto ISPRA (ISPRA, 2016) ancorché preliminari, rappresentano un valore aggiunto importante e significativo per assicurare la comprensione delle conseguenze dei processi di trasformazione dell'uso (a volte, abuso) del suolo.
I costi del consumo di suolo, quindi, pur essendo quella riportata nel rapporto ISPRA una stima preliminare, potrebbero essere ben maggiori rispetto ai valori riportati. Tale valutazione preliminare non ha, quindi, la pretesa di esplicitare la totalità dei servizi ecosistemici forniti dal suolo non consumato e il loro valore complessivo e necessita di opportuni approfondimenti che lasciano lo spazio ad ottimizzazioni, adattamenti e miglioramenti futuri.
Si deve tuttavia evidenziare che la valutazione economica dei beni ambientali non è certo un modo per dare un "prezzo" alla natura, ma solo il metodo per renderne evidente il valore, considerando che il consumo di suolo comporta comunque spesso la perdita irreversibile di un capitale naturale che – a parità di altri fattori – è in grado di fornire i suoi servizi all'infinito. Il capitale economico, di contro, fornisce benefici a breve termine, tende a perdere valore e richiede una costante manutenzione.
Esprimere e quantificare l'impatto delle perdite di suolo e del suo degrado in termini di perdita di servizi ecosistemici è, tuttavia, fondamentale al fine di fornire ai responsabili delle decisioni, anche a livello locale, informazioni specifiche per la definizione e l'implementazione di misure con lo scopo di limitare, mitigare o compensare l'impermeabilizzazione del suolo, considerando che una politica di questo tipo comporterebbe degli indiscussi vantaggi per il patrimonio naturale e, allo stesso tempo, per la spesa pubblica.

3.2. Il suolo nel protocollo ECOREMED

Alla luce di quanto illustrato nel precedente paragrafo circa le funzioni e i servizi ecosistemici forniti dalla risorsa suolo, e i diversi processi degradativi cui il suolo può andare incontro come conseguenza di una gestione inappropriata, risulta evidente come una adeguata caratterizzazione dei suoli dei siti agricoli nei quali il protocollo ECOREMED può essere applicato risulti assolutamente indispensabile. Come verrà illustrato nei capitoli 5 e 6, la caratterizzazione pedologica dei siti prevede in primo luogo l'utilizzo di tecniche tradizionali di rilevamento dei suoli a scala aziendale, con l'effettuazioni di rilievi speditivi con trivella a mano, e lo scavo, descrizione e

inary, constitute important and significant added value to ensure understanding of possible consequences of the transformation processes and the use - sometimes abuse - of soil.
While those shown in the ISPRA report represent preliminary estimates, the costs of soil consumption could be far greater than the reported values. This preliminary assessment does not aim to account for all the ecosystem services provided by soil. Their total value requires appropriate investigations that leave room for future optimisation, adjustments and improvements.
It is worth mentioning that the economic valuation of natural resources is not a way of assigning a "price" to nature but only a way of highlighting its value, given that soil consumption often involves irreversible loss of natural capital which is potentially able to provide its services indefinitely. By contrast, man-made capital provides short-term benefits; it also tends to lose value and require constant maintenance.
Expressing and quantifying the impact of soil loss and its degradation in terms of the loss of ecosystem services is essential in order to provide decision makers, including at the local level, with specific information for drawing up and implementing measures to limit, mitigate or compensate for soil sealing, given that a policy in favour of the above would confer undisputed benefits for the natural heritage and, at the same time, public spending.

3.2. Soil in the ECOREMED Protocol

In the light of the previous section related to the functions and ecosystem services provided by soil as a resource, and given the different degradation processes soil may face as a result of inappropriate management, it is clear that suitable characterization of soils on the agricultural sites where the ECOREMED protocol can be applied is absolutely necessary. As will be explained in Chapters 5 and 6, as a first step the pedological characterization of the sites envisages the use of traditional soil survey techniques, with the execution of surveys with a hand auger, and the excavation, description and sampling of soil profiles at representative sites. The goal is to define the vertical and lateral structure of soil covers, with reference to the stratigraphic sequence of the various horizons with their different physical, chemical and biological properties. The next step consists in detailed spatialization, with non-invasive radiometric techniques, of soil properties indicating particular aspects of contamination. The objective is to produce extremely detailed maps of the contaminated soil volumes, with a density of information well above the standard sampling information required by law (Legislative Decree no. 152/2006). Hence the ECOREMED approach is characterized by the constant consideration of agricultural soils subjected to treatment, with morphological and functional characteristics that must be well known and respected, in order to achieve recovery of a resource which, in the local agricultural context, is a key support of plant, animal and microbial organisms. In this approach the ECOREMED protocol may be distinguished from engineering techniques based on the removal of indiscriminate soil volumes, treated *tout court*

campionamento di profili pedologici in siti rappresentativi. L'obiettivo è quello di definire la struttura verticale e laterale delle coperture pedologiche, con riferimento ai diversi polipedon presenti, e alla sequenza stratigrafica dei diversi orizzonti aventi caratteristiche e proprietà chimico-fisiche e biologiche differenziate. Il passo successivo, consiste nella spazializzazione di dettaglio, con tecniche radiometriche non invasive, di proprietà pedologiche indicatrici di particolari aspetti di degrado. L'obiettivo è quello di giungere alla produzione di cartografie di estremo dettaglio dei volumi di suolo contaminati, con una densità di informazione di gran lunga superiore agli standard di campionamento previsti dalla normativa vigente (D.lgs. 152/2006). L'approccio ECOREMED si caratterizza, pertanto, per la costante considerazione dei suoli agricoli oggetto del trattamento, come corpi naturali, con caratteristiche morfo-funzionali che devono essere il più possibile conosciute e rispettate, proprio in ordine agli obiettivi preminenti di recupero della risorsa, nel contesto dell'agroecosistema nel quale è situata, e del quale rappresenta l'elemento chiave di supporto della vita vegetale, microbica e animale. Tale approccio differenzia il protocollo ECOREMED dalle tecniche ingegneristiche basate sull'asportazione indiscriminata di volumi di suolo, trattati *tout court* alla stregua di un rifiuto speciale da smaltire in discarica o anche sull'impermeabilizzazione del suolo con tecno-barriere impervie (*capping*). Tali approcci si caratterizzano per il fatto di perseguire il recupero dell'ecosistema mediante la distruzione morfologica e funzionale proprio della risorsa base sulla quale il funzionamento dell'ecosistema si fonda: il suolo. Nell'approccio ECOREMED, al contrario, le alterazioni subite dal suolo in quanto "corpo naturale", espressione di processi genetici di lunga durata, vengono affrontate e trattate, quanto più possibile, nel rispetto della struttura originaria delle coperture pedologiche, con il duplice beneficio di rispettare la funzionalità residua della risorsa, favorendone la rigenerazione e gli aspetti di resilienza; di evitare, o comunque limitare gli intensi impatti che caratterizzano le tecniche tradizionali di bonifica; di contenere entro limiti accettabili i costi operativi.

Bibliografia

Senato della Repubblica, ddl 1181 "Legge quadro per la protezione e la gestione sostenibile del suolo". http://www.senato.it/leg/17/BGT/Schede/Ddliter/43159.htm

Commissione Europea (2006), Strategia tematica per la protezione del suolo, COM (2006) 231. Bruxelles, 22.9.2006.

Commissione Europea (2011), Tabella di marcia verso un'Europa efficiente nell'impiego delle risorse, COM (2011) 571. Bruxelles, 20.9.2011.

Commissione Europea (2012), Orientamenti in materia di buone pratiche per limitare, mitigare e compensare l'impermeabilizzazione del suolo. Bruxelles, 15.5.2012, SWD (2012) 101.

Commissione Europea (2013), Superfici impermeabili, costi nascosti. Alla ricerca di alternative all'occupazione e all'impermeabilizzazione dei suoli. Lussemburgo.

Commissione Europea (2014), Mapping and assessment

in the same way as special waste to be disposed of in a landfill - or even soil sealing with techno-impervious barrier (capping). A characteristic of such approaches is the pursuit of ecosystem recovery through the morphological and functional destruction of the resource on which the functioning of the ecosystem is based: soil. Conversely, in the ECOREMED approach, the alterations experienced by the soil as a natural organism, the expression of lengthy genetic processes, are addressed and dealt with, as far as possible, whilst respecting the original structure of the soil cover. This approach confers a twofold benefit: on the one hand, it ensures the residual functionality of the resource, favouring its regeneration and resilience; on the other, it avoids, or at least limits, the intense impacts of traditional remediation techniques, containing operating costs within acceptable limits.

References

European Commission (2006), Thematic strategyfor soil protection, COM(2006) 231. Brussels, 22.9.2006.

European Commission (2011), The Roadmap to a resource-efficient Europe, COM(2011) 571. Brussels, 20.9.2011.

European Commission (2012), Guidelines on best practice to limit, mitigate or compensate soil sealing buone pratiche per limitare, mitigare e compensare l'impermeabilizzazione del suolo. Brussels, 15.5.2012, SWD (2012) 101.

European Commission (2013), Hard surfaces, hidden costs. Searching for alternatives to land take and soil sealing. Luxemburg.

European Commission (2014), Mapping and assessment of ecosystems and their services Indicators for ecosystem assessments under Action 5 of the EU Biodiversity Strategy to 2020 second Report – Final, February 2014.

European Commission (2016), Future Brief: No net land take by 2050? April 2016.

European Parliament and Council (2013), Decision no. 1386/2013/EU of the European Parliament and of the Council of 20 November 2013 on a General Union Environment Action Programme to 2020 «Living well, within the limits of our planet », EUOJ, L 354, 28.12.2013: 171-200.

ISPRA (2014). Il consumo di suolo in Italia - Edizione 2014. ISPRA Rapporti 195/2014.

ISPRA (2015), Il consumo di suolo in Italia - Edizione 2015. ISPRA Rapporti 218/2015.

ISPRA (2015), Annuario dei dati ambientali - Edizione 2014.

ISPRA (2016), Consumo di suolo, dinamiche territoriali e servizi ecosistemici - Edizione 2016. Rapporti 248/2016.

Senato della Repubblica, ddl 1181 "Legge quadro per la protezione e la gestione sostenibile del suolo".

of ecosystems and their services Indicators for ecosystem assessments under Action 5 of the EU Biodiversity Strategy to 2020 second Report – Final, February 2014.

Commissione Europea (2016), Future Brief: No net land take by 2050? April 2016. ISPRA (2014). Il consumo di suolo in Italia - Edizione 2014. ISPRA Rapporti 195/2014. ISPRA (2015), Il consumo di suolo in Italia - Edizione 2015. ISPRA Rapporti 218/2015. ISPRA (2015), Annuario dei dati ambientali - Edizione 2014.

ISPRA (2016), Consumo di suolo, dinamiche territoriali e servizi ecosistemici - Edizione 2016. Rapporti 248/2016.

Parlamento europeo e Consiglio (2013), Decisione n. 1386/2013/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 novembre 2013 su un programma generale di azione dell'Unione in materia di ambiente fino al 2020 «Vivere bene entro i limiti del nostro pianeta», GUUE, L 354, 28.12.2013: 171-200.

UN (2012), The Future We Want, A/RES/66/288, United Nations

UN (2015), Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development, A/RES/70/1, United Nations.

http://www.senato.it/leg/17/BGT/Schede/Ddliter/43159.htm

UN (2012), The Future We Want, A/RES/66/288, United Nations

UN (2015), Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development, A/RES/70/1, United Nations.

4. Il contesto territoriale

L. Boccia, B. De Vivo, A. Di Gennaro, D. Ducci, M. Rigillo, A. Senatore

4.1 Impostazione dell'inventario e dell'analisi in funzione dell'obiettivo del protocollo

La conoscenza del territorio è il punto di partenza per qualsiasi azione o politica si voglia attuare. Le tecniche GIS consentono di razionalizzare il processo di conoscenza territoriale, organizzando layers informativi che offrono immagini complesse e integrate dell'area di studio, immagini che danno contezza della molteplicità dei dati raccolti e della interdisciplinarità dei contributi. Sulla base dell'inventario prodotto, si orientano i processi di analisi, diagnosi e prognosi che possono essere integrabili e aggiornabili nel tempo. L'inventario e l'analisi del contesto, occorrono per pervenire ad una o più diagnosi territoriali e sono necessarie a definire una serie di opzioni progettuali per la soluzione di problemi. Ancora di più, gli strumenti attuali, devono consentire il confronto, in termini di processi evidence-based, tra differenti scenari progettuali, prevedendone le ricadute e dunque consentire la programmazione di interventi/misure di mitigazione degli impatti negativi e di valorizzazione di quelli positivi.

L'inventario del contesto territoriale, non può essere semplicisticamente ricondotto ad una raccolta di strati informativi sovrapposti per facilitare la ricerca delle aree inquinate, idonee all'applicazioni di protocolli predeterminati. Piuttosto, si tratta di organizzare un sistema di conoscenze, funzionale a consentire una molteplicità di analisi interdisciplinari, mirate ad individuare (analizzare) le criticità specifiche dell'area, che possono anche rivelarsi diverse, in tutto o in parte, da quelle inizialmente ipotizzate (ad esempio, proprio nel progetto Ecoremed, si è passati da uno scenario di inquinamento ad uno di degrado). Inoltre, l'inventario GIS è anche base conoscitiva indispensabile per la pianificazione, per consentire scelte progettuali adeguate alla dimensione e alla consistenza dei problemi individuati. L'inventario e l'analisi del contesto territoriale devono creare un sistema informativo pronto versatile ed efficiente, idoneo per produrre analisi multicriteria attraverso cui comparare differenti problematiche territoriali, oppure per definire scenari probabilistici di Land Use Change (LUC) e per la diffusione del protocollo di fitorimedio. La conoscenza GIS del territorio, se ben ideata, può essere orientata alla individuazione di aree marginali (fringe areas) in cui è più probabile il degrado (e quindi più opportuno il protocollo), oppure può consentire successive operazioni di valutazione di scenari di LUC e di determinazione del valore ecosistemico dei territori (Ecosystem services). In particolare, l'inventario deve essere strutturato in modo flessibile, così da permettere approfondimenti successivi - derivanti dall'applicazione dei protocolli e delle tecniche di fitorimedio - che saranno considerati la nuova base conoscitiva per mezzo della quale valutare l'impatto del LUC sulla fauna. Il sistema di inventario dovrà essere concepito quindi pensando a questa ulteriore fase, certo non secondaria, che richiede una mole di strati e di analisi non trascurabili.

Nell'ideazione del GIS bisogna operare con ampiezza e flessibilità, nella consapevolezza di dover successivamente generare scenari da sottoporre ai decisori o addirittura, nei limiti del rigore scientifico, ipotizzare scenari funzionali ai desiderata dei decisori.

4. Territorial Analysis

L. Boccia, B. De Vivo, A. Di Gennaro, D. Ducci, M. Rigillo, A. Senatore

4.1 Design of the GIS inventory and of Territorial Analysis according to the goal of the protocol application

Territorial knowledge is crucial for every policy and/or action. GIS techniques allow us to manage the complexity of territorial knowledge through the structuring of a number of information layers that give a more integrated view of the study area and such representation defines the amount of data that has to be collected and their interdisciplinary nature. Therefore, based on the GIS inventory, it is possible to orientate knowledge processes for territorial analysis, diagnosis and prognosis in such a way that they can be integrated and upgraded over time. The GIS inventory and the context analysis are key steps to providing one or more territorial diagnoses and are considered as prerequisites to defining planning options in problem solving strategy. What is more, current digital tools tend towards evidence-based comparisons between different planning scenarios, forecasting risk potential and programming actions / measures for minimising negative and enhancing positive impacts.

The inventory of a territorial context is not a simple collection of overlapping layers of information, but is structured as a thematic outline aimed at facilitating the search for polluted areas suitable for the application of predetermined protocols. Furthermore, it has to be organised as an information system with the function of providing a number of interdisciplinary analyses through which it is possible to specifically identify/ analyse critical areas of the territory and that could, in whole or in part, be different from those initially assumed as working hypotheses (e.g., in the Ecoremed project, the focus has moved from a scenario of pollution to one of degradation). In addition, a knowledge based GIS inventory is also crucial for planning and for selecting design choices that are adequate to face the scale and consistency of the problems revealed. Together with the analysis of the spatial context, the GIS inventory must create an information system that is ready, versatile , efficient and adequate to support multi-criteria analysis tools through which different territorial issues can be compared, and/or probabilistic scenarios of Land Use Change (LUC) fit for disseminating the phytoremediation protocol can be defined. If well designed, the GIS approach to territorial knowledge will be orientated towards identification of fringe areas (where degradation might be expected) in which the protocol applies, or instead territorial knowledge could be used to compare different options of LUC scenarios with the aim of marking out the value of territories in terms of the ecosystem services provided for. In particular, the inventory must be structured flexibly, so that it allows further investigation, from both the protocol application and the phytoremediation techniques, that will be reloaded as the new knowledge base through which specific LUC impacts (e.g. on the fauna and the wildlife habitat) can be assessed. Indeed, the inventory system must be designed while bearing in mind later stages, so producing the GIS inventory requires a number of layers of analysis.

In designing GIS, it is very important to forecast the later knowledge stages and, so, provide the amplitude and the

Il sistema di inventario dovrà essere aggiornato per tutta la durata del progetto e dovrà restare disponibile per il prosieguo di altri studi e ricerche; esso potrà valersi delle basi informative territoriali normalmente disponibili, alla luce della Direttiva Inspire (D.L. 27 gennaio 2010 n° 32).
L'introduzione di strumenti di mappatura digitale e la capacità di procedere a rappresentazioni del territorio sempre più precise rappresentano un vantaggio strategico per predisporre, in tempi rapidi, un processo di conoscenza organizzato in forma di inventario, che possa essere immediatamente utilizzato per la fase diagnostica e prognostica. In particolare, in termini operativi, è opportuno mantenere in parallelo la fase di costruzione dell'inventario con altre fasi legate alla conoscenza sperimentale, integrando la raccolta dati con informazioni derivanti dalla ricerca sul campo.
Proprio il progetto Ecoremed è stato un esempio di come l'ipotesi iniziale di ampie aree agricole inquinate per azioni antropiche, sia stata progressivamente verificata e ricalibrata. Sulla base di questa ipotesi, sono state fatte partire contemporaneamente le attività GIS e le attività dimostrative sui campi sperimentali, per poi raggiungere la consapevolezza che il progetto fosse da orientare anche ad aree di degrado. L'ipotesi iniziale di dover operare il "protocollo" su ampi territori inquinati è caduta solo successivamente, quando proprio l'analisi dell'inventario e le attività di monitoraggio dei prodotti agricoli, hanno dimostrato che le aree agricole inquinate si riducevano a pochi ettari e che i prodotti erano assolutamente sani. La corretta progettazione dell'inventario, che non è stato ideato per le sole matrici suolo ed acqua alla ricerca della mappatura di aree inquinate, ma bensì all'intero territorio, ha permesso di governare una fase successiva del progetto in cui si è puntato sulla specificità del degrado e di come il protocollo potesse essere utilizzato, sulle sue conseguenze e le opportunità di scenari di LUC che ne derivano.
Se ne ricava che l'obiettivo del processo di conoscenza, non può essere la mera descrizione del paesaggio, degli ecosistemi, del territorio, ma deve invece mirare a supportare le scelte del decision maker e la definizione di strategie ed interventi, valutando le possibili conseguenze, non solo socio-economiche, ma anche ambientali.
La costruzione di un GIS Inventory, quale piattaforma condivisa e condivisibile di dati, analisi, informazioni, è sicuramente il primo risultato del processo di analisi e conoscenza di un contesto territoriale. Tutte le informazioni sono rese in un medesimo sistema di riferimento e sono generalmente aggiornabili ed implementabili.
A tal fine è necessario agire considerando la complessità del contesto, perché un territorio è frutto di stratificazioni non lineari tra esigenze sociali e natura, e non sempre presenta biunivocità nei rapporti di causa-effetto (Leone, 2011). In particolare, ogni singolo ambito territoriale è caratterizzato da uno specifico assetto interno, implicitamente connesso alla struttura geologica e geomorfologica, alle condizioni climatiche, alle risorse naturali, ai fenomeni culturali e sociali, ovvero alla combinazione di fattori oggettivi e soggettivi. Un modello di analisi territoriale che tenga conto del carattere pluridimensionale di un territorio, deve riuscire a misurare grandezze eterogenee ed evidenziare e trasmettere le diversità territoriali e strutturali (Finamore et al., 2002).
Uno dei possibili approcci per costruire il percorso di

flexibility of the inventory through which future scenarios can be generated that will be submitted to decision makers and satisfy their requirements within the limits of the research aims and scientific rigour.
The GIS inventory will be updated throughout the life cycle of the project and will remain available for the continuation of the project itself and/ or for other studies and research. It may also be implemented by territorial information, normally available as consequence of the Inspire Directive (Decreed Law 27 January 2010 n ° 32).
The introduction of digital mapping tools and the ability to carry out even more precise territorial representations become strategic in the rapid organisation of the inventory knowledge process so that it can be immediately used for the diagnostic and the prognostic phases. In operational terms, such phases should run in parallel with the inventory building and with the other phases relating to experimental knowledge, integrating the data collection with specific information derived from on-field research.
The Ecoremed project is a good example of the progressive increase in territorial knowledge. The project has gradually verified the initial hypothesis of the existence of a wide range of areas that have been polluted by human activity, adapting the aims of the project to the research findings and demonstrating the need to apply the protocol to polluted areas as well as to degraded areas. Indeed, the extent of the polluted areas to which the protocol was to be applied had been reduced to just a few hectares thanks to the results of data collection and on-field analysis, including the on-field monitoring of agricultural products. The comprehensive design of the GIS inventory focused not only on identifying the polluted areas, but also covered the mapping of all territorial characteristics (not only the soil and water matrices). Such an approach led us to investigate the specifics of territorial degradation and how opportune the application of the protocol to those areas was, including the impact and benefits of the resulting LUC scenarios.
The Ecoremed experience demonstrated the importance of using a knowledge base approach in rendering the GIS inventory adequate to support decision makers and to help plan strategies and actions, while assessing the comprehensive impacts (including the socio-economic and environmental).
The implementation of a GIS inventory as a shared platform is the first result of such a territorially based approach in which information runs under a given reference system and can be implemented and updated. Consequently, it is very important to evaluate the complexity of a context given that a territory is not simply the stratification of linear correspondences between human needs and the natural environment, and it does not work within the framework of cause and effect relationships or in terms of one-to-one connections (Leone, 2011). In other words, each, single territorial domain features a specific, inner order which is implicitly connected to the geological and geo-morphological structure, to climatic conditions, to natural resources and to social and cultural constraints, i.e. the combination of objective and subjective factors. This model takes into account the multi-scaling nature of the territorial analysis while working to adapt to heterogeneous objects/ issues in order to highlight and transfer spatial and structural diver-

conoscenza di un territorio, è quello che, in primo luogo, distingue i fattori in funzione delle matrici ambientali di riferimento (Aria, Acqua, Suolo), integrando le informazioni con altre più strettamente connesse alle componenti antropiche (rischi per la salute, infrastrutture, urbanizzazione, natura dei contaminanti) e cercando di porre attenzione alle origini dei fenomeni, distinguendo - con le metodiche geostatistiche oggi disponibili - tra fenomeni geogenici e fenomeni antropogenici. Ad esempio per la individuazione delle diverse possibili forme di degrado sono stati utilizzati i seguenti approfondimenti informativi:
- atmosfera
- idrosfera (acque superficiali e sotterranee)
- litosfera (morfologia, geo-pedologia)
- biosfera (flora e fauna)
- noosfera (uso del suolo, insediamenti, infrastrutture, attività)

Per ogni indagine è generalmente costruita una mappa tematica. Le mappe sono calcolate attraverso operazioni GIS di base (overlay, buffering, distance, query spaziali, ecc.) e sono rappresentate mediante mappe di classificazione (coperture del suolo, ecc.) ovvero mediante mappe di valore (pendenza, quote, ecc.). Tutte le mappe devono essere georiferite rispetto ad un medesimo sistema di riferimento che viene concordato ad inizio progetto. Ad oggi è possibile in Campania operare in ETRF2000 Epoca 2008, ma fino ad ottobre 2016 non era ancora disponibile il frame 2008 per la correzione DGPS in regione Campania.
A titolo esemplificativo si riporta l'organizzazione delle attività di inventario ed analisi del contesto territoriale ("Environmental characterization of the area") del SIR Litorale Domizio-Flegreo Agro Aversano, nell'ambito del progetto Life Ecoremed, coordinato dalla prof. Daniela Ducci, in cui il processo è stato articolato in sotto-azioni, ciascuna sviluppata da specifici gruppi disciplinari con uno o più responsabili:
- Matrice Aria (A. Senatore, P. Iodice): Contribution of air pollutants deposition to soil contamination
- Matrice Suolo (A. De Vivo, S. Albanese) Geochemical characterization of agricultural soil contamination
- Matrice acqua (D. Ducci, A. Corniello, M. Sellerino) Hydrogeological characterization
- GIS Inventory of environmental condition (M. Rigillo, L. Boccia)

Altri due gruppi disciplinari hanno contribuito all'analisi territoriale con approcci quantitativi ma non strettamente connessi allo sviluppo del GIS
- Human exposure and health assessment (M. Manno)
- Sistema suolo acqua atmosfera (M. Palladino, B. Sica, G. Speranza, A. Sommella, N. Romano)

Gli elementi raccolti da queste due unità di ricerca sono fondamentali per questo tipo di analisi ma non contribuiscono direttamente alle metodiche che occorrono per le successive fasi prognostiche.

4.2 Matrice aria

L'obiettivo dell'inventario e dell'analisi per la matrice aria è la quantificazione degli inquinanti atmosferici

sity (Finamore et al., 2002).
One of the potential approaches to the GIS inventory begins with analysis of the natural matrices (soil, water and air), integrating such information with that more connected with human aspects (health risk, infrastructure, urbanisation and pollution) and working at highlighting the determinants of the various impacts through use of the geo-statistic methods now available (especially distinguishing between geogenic and anthropogenic phenomena). In the case of the Ecoremed project, the analysis carried out to identify the many, different types of territorial degradation focuses on:
- Atmosphere;
- Hydrosphere (Surface water and groundwater);
- Lithosphere (morphology, geopedology);
- Biosfera (flora and fauna)
- Noosphere (land use, settlements, infrastructure, human activities)

A thematic map is produced for every single analysis. These maps are produced through GIS based operations (overlaying, buffering, distance, spatial query, etc.), and they come in the form of classification maps (land cover, etc.), i.e. value maps (slopes, elevation, etc.). All the maps have to be geo-referred to the same reference system, established at the start of the project. In the Campania Region, it is possible to use ETRF2000 Epoca 2008 (although the 2008 framework for the rectification DGPS has only been available since October 2016)
In order to render clear the analysis processes performed under the GIS inventory construction throughout the Ecoremed project, the B1 action - "Environmental characterisation of the area" (coordinated by Prof. Daniela Ducci) is illustrated here. The B1 action was developed as a system by clustering a number of sub-actions, each of which was coordinated by scientific group leaders responsible for furthering their specific branch of the territorial analysis of the study area (SIR Litorale Domizio-Flegreo Agro Aversano). The sub-actions are the following:
- Air Matrix, (group leaders Prof. A. Senatore, P. Iodice): The contribution of air pollutant deposition to soil contamination;
- Soil Matrix, (group leaders Prof. B. De Vivo, S. Albanese) The geochemical characterisation of agricultural soil contamination;
- Water Matrix, (group leaders D. Ducci, A. Corniello, M. Sellerino) Hydrogeological characterisation;
- The GIS Inventory of environmental conditions (group leaders M. Rigillo, L. Boccia)

Two more groups cooperated in the territorial analysis through quantitative studies that were not strictly connected to the GIS inventory development:
- Human exposure and health assessment (group leader Prof. M. Manno)
- Soil hydrological characterisation (group leaders Prof. M. Palladino, B. Sica, G. Speranza, A. Sommella, N. Romano)

The data collected by these units are very important for furthering the specific territorial knowledge, but they are not part of the established methods for the subsequent prognostic phase.

(CO, SOx, VOC, NOx, e dei metalli potenzialmente tossici PTMs) emessi da fonti puntuali lineari e diffuse, attive in regione Campania. Viene quindi realizzato un inventario delle emissioni, con particolare attenzione alle emissioni del settore trasporto stradale, che in casi come la Campania possono concorrere in modo sostanziale.
L'analisi viene svolta attraverso l'uso di modelli di dispersione ed elaborazioni statistiche mirati a prevedere la concentrazione degli inquinanti.
L'inventario dei dati di inquinamento da fonti puntuali o diffuse, deve essere aggiornato attraverso misure, quando possibile, o attraverso stime. Per le industrie classificate come fonti puntuali industriali sono disponibili dati continui e diretti. Ciò essenzialmente per gli impianti industriali che a causa delle loro dimensioni sono sottoposti ad autorizzazione e sono tenuti a registrare i loro livelli di emissione. Per ottenere questi dati è necessario sottoporre dei questionari, con le richieste di dati che riguardino sia i livelli di emissione sia le dimensioni geometriche delle ciminiere.
Per tutte le altre fonti di emissione, le cosiddette fonti diffuse, i livelli di emissioni devono essere valutati attraverso la raccolta di dati bibliografici (per esempio, AP-42 (US EPA 1999), IPCC Guideline (IPCC / OECD 1997), l'EMEP Inventory Guidebook / CORINAIR Emission (EEA 2013)) per la determinazione dei "fattori di emissione" e l'efficacia dei sistemi di rimozione per ridurre le emissioni (Ohara et al., 2007).
I livelli di emissione dei principali inquinanti atmosferici e PTM (metalli potenzialmente tossici) vengono valutati distinguendo le sorgenti correlate alla combustione da quelle non dovute a combustione, sia per il settore della trasformazione (energia elettrica e generazione di calore, raffinerie di petrolio e simili industrie di trasformazione) sia per gli altri settori industriali (compresa siderurgica, chimica e impianti non siderurgici) sia per il trasporto su strada e in altri settori di attività (compreso il commercio, l'agricoltura e residenziale).
E' opportuno operare un distinguo tra il gruppo delle fonti sostanzialmente "mobili" (il settore dei trasporti su strada) e quelle "puntuali" (per lo più del settore e centrali elettriche).
Le emissioni del settore dei trasporti su strada possono essere valutate con precisione utilizzando il metodo COPERT (Gkatzoflias et al. 2012), che è un database di algoritmi e fattori di emissione proposti a livello europeo per la stima delle emissioni del traffico stradale (CORINAIR 1998; Ntziachristos e Samaras 2012).
L'analisi COPERT consente la valutazione delle emissioni per 230 categorie di veicoli, in cinque gruppi principali (automobili, veicoli leggeri e pesanti, autobus urbani e pullman, e veicoli a due ruote) ulteriormente suddivisi in base al tipo di carburante, le direttive UE per i limiti di emissione e cilindrata del motore.
COPERT calcola gli inquinanti di scarico con l'aggiunta di tre valori, quelli delle emissioni a caldo, le emissioni di avviamento a freddo e le emissioni evaporative. Con questa metodologia le emissioni possono essere calcolate per 36 inquinanti, tra IPA, diossine e metalli pesanti contenuti nel combustibile.
Si suggerisce l'impiego di una procedura di analisi bottom-up (Bellasio et al. 2007), su scala comunale. Si devono esaminare le variabili locali per i modelli di guida,

4.2 Air Matrix (A. Senatore, P. Iodice)
Emission inventories constitute a technological, economic and territorial data collection which permits identification of sources of pollution (industrial, civil, transports, etc.), their localisation with spatial disaggregation (regions, provinces and towns) and an understanding of the amount and typology of the polluting substance.
The emissions of the main air pollutants can be estimated from fuel combustion sources and non-combustion sources as part of anthropogenic activities: transformation (power) sectors (electricity production, oil refineries and other energy and transformation industries); industry (including iron and steel, chemical and petrochemical, and non-ferrous metals); transport sectors (such as aviation, roads, railways, and shipping); and other sectors (including agriculture, commerce and public amenities, residential and domestic).
Details of the amounts of pollutants emitted from various sources can be obtained through direct and continuous measuring, where possible, or otherwise through estimates. Direct measurements of emissions are generally only carried out for the principal industrial systems. The industrial sources, usually categorised as point sources, generally refer to larger industrial facilities that are governed by permits or regulations, or are required to report their emissions due to their size or production capacity. For all other sources, called diffuse sources, emissions of a particular type can be estimated as a product of the activity data, emission factors and removal efficiency of emission controls. Region specific emission factors for several emission types from subdivided source sectors were compiled from a wide range of literature, such as AP-42, the IPCC Guideline and the CORINAIR Emission Inventory Guidebook.
Among the diffuse sources, a considerable fraction of the emissions in industrialised countries, in particular in urban areas, is due to the road transport sector, despite extensive actions world-wide to decrease these emissions over the last two decades . In spite of their importance, the emissions from road transport are very difficult to calculate because they depend on many variables, characterised by a high degree of uncertainty. These uncertainties are both inherent to the emission factor equations (which depend on pollutant, vehicle type, fuel type, inspection and maintenance programmes) and due to the several variables required for their estimation (fuel consumption, annual mileage, driving patterns) and the uncertainties of all these variables. For this reason, emissions from road traffic can be most accurately estimated by implementing the COPERT methodology, the most commonly employed software in Europe for official national inventories of emissions from road traffic.
This methodology permits estimation of the emissions of over 200 vehicle categories belonging to the five main classes: passenger cars, light duty vehicles, heavy duty vehicles, urban buses and coaches, and two wheelers. Vehicles belonging to such main classes are then distinguished between on the basis of their fuel type, the EU Directives to which they conform in terms of emissions, the cylinder capacity and other variables. COPERT calculates the total emissions of exhaust gases by summing emissions from three differing sources,

le flotte di veicoli, il numero medio di viaggi, la velocità media e il consumo di carburante.
Per raccogliere questi dati è necessario integrare informazioni raccolte dall'Istituto Italiano di Statistica, Ministero dei Trasporti e della Navigazione; Automobil Club d'Italia (numero di veicoli immatricolati e la loro composizione a livello comunale), l'Istituto Italiano per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA); l'Associazione Italiana delle compagnie petrolifere (carburante venduto per provincia).
Gli strati informativi che si ottengono sono per lo più tagliati su base comunale, ma è possibile spazializzarle in vari modi accettando un grado di incertezza negli strati derivati.

4.3 Matrice suolo

Anche per la matrice suolo i primi strati sono mirati alla raccolta ed elaborazione di tutti i dati geochimici resi preliminarmente disponibili da attività di esplorazione pregresse già realizzate nell'area (De Vivo et al 2006a, 2006b; Albanese et al 2007; Bove et al. 2011; Grezzi et al 2011; Lima et al 2012; Albanese et al 2015). A valle di questa conoscenza, nelle aree dove si rilevassero condizioni ambientali critiche, è necessario effettuare una prospezione geochimica di dettaglio (follow-up).
Gli elementi su cui è spesso opportuno concentrare l'indagine sono Be, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Tl, V, Zn ma evidentemente lo studio dei dati disponibili deve sempre guidare questa scelta.
Il campionamento è da organizzare su una maglia regolare che in prima approssimazione può anche essere di 5 km per poi essere infittita in base alle emergenze.
Il campionamento è in questa fase di tipo superficiale (primi 20 cm si suolo) e miscelato per ottenere un composito di 5 prelievi superficiali nella maglia.
La analisi sono effettuate mediante metodi analitici basati su ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) o su ICP-ES (inductively coupled plasma emission spectrometer). Il campione viene digerito in una soluzione modificata di acqua regia come riportato in Lima et al. (2012).
Per questo tipo di analisi è opportuno valutare i costi di laboratori locali (ad esempio Università degli Studi di Napoli Federico II- Dipartimento di Scienze Chimiche) o laboratori esteri (ad esempio ACME Analytical Lab, Vancouver, Canada).
In generale, i set di dati ottenuti vengono analizzati in prima istanza con l'utilizzo di tecniche statistiche di base e multivariate per evidenziare eventuali anomalie ed interazioni/associazioni riportanti a processi ambientali specifici.
Per ciascuno degli elementi analizzati, i dati geochimici georeferenziati possono essere utilizzati per la produzione di una cartografia tematica di base sia di tipo puntuale (Dot maps) che di tipo spazialmente continuo mediante interpolazione.
Per le mappe interpolate è opportuno utilizzare una struttura raster abbastanza fitta (ad esempio 100*100 m) ed un raggio di interpolazione mediamente ampio (ad esempio 2,5 km); il metodo di interpolazione IDW multifrattale è molto utile per questo tipo di elaborazioni e la sua validità in geochimica ambientale è riportata a partire da Lima et al. (2003).

namely the thermally stabilised engine operation (hot emissions), the warming-up phase (cold start emissions) and those due to evaporation. Since vehicle emissions depend on the engine operation (i.e. driving situation), exhaust emissions are calculated as a function of average speed and for three driving conditions: urban, rural and highway (Iodice and Senatore, 2016).

4.3 Soil Matrix

For soil media too, the first layers to be produced are the result of the processing of all the geochemical data already made available by previous exploration activities carried out in the area (De Vivo et al 2006a, 2006b ; Albanese et al 2007 ; Bove et al. 2011 ; Grezzi et al, 2011; Lima et al 2012; Albanese et al 2015). Based on these data, a follow-up detailed geochemical prospecting has to be planned for the areas where critical environmental conditions are recorded.
It is often more appropriate to focus the follow-up surveys on such chemical elements as Be, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Tl, V and Zn, but, obviously, if more or different analytical data become available, this new condition should always influence the choice.
Sample collection has to be organised on a regular grid with an average sampling density of 1 sample/5 sq km, which can be increased when critical environmental conditions are expected.
At this stage, sampling is of a superficial type (within the first 20 cm of the ground surface) and composite samples should be formed at each site by mixing 5 sub-samples collected within a fixed radius.
The analyses should be carried out by means of analytical methods based on ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) or ICP-ES (Inductively Coupled Plasma - Emission Spectrometry). Samples have to be digested in a modified solution of *Aqua Regia* as reported in Lima et al. (2012).
For this kind of analytical method, the costs of local (eg University of Napoli Federico II Department of Chemical Sciences) and/or international (eg ACME Analytical Lab, Vancouver, Canada) laboratories should be evaluated.
In general, the obtained datasets are statistically evaluated with univariate and multivariate methods so as to highlight possible elemental anomalies and interactions/associations that can be associated with specific environmental processes.
For each of the analysed elements, the geochemical georeferenced data can be used for the production of a basic thematic map set which includes both dot and interpolated maps for each variable.
For interpolated maps, it is appropriate to use a fairly dense raster structure (for example, 100 * 100 m) and a large average radius interpolation (eg 2,5 km). The multifractal IDW interpolation method is very useful for this type of processing and its validity in environmental geochemistry has been reported by Lima et al. (2003).
The map of the "Contamination Factor" (FC) for each element is obtainable through a process of spatial analysis, dividing the interpolated map of each element (defined as "Predicted Environmental Concentration" or PEC) for a reference concentration value (definable as "Predicted No Effect Concentration" or PNEC),

La mappa del "fattore di contaminazione" (FC) per ciascun elemento è ottenibile attraverso un processo di analisi spaziale, dividendo la mappa interpolata dell'elemento (definibile come "Concentrazione Ambientale Prevista" o PEC) per un valore di concentrazione di riferimento (definibile come "Concentrazione Prevista Priva di Effetti" o PNEC) che rappresenta una potenziale condizione di equilibrio ambientale per il contesto di riferimento. Se la PNEC viene fissata in base a valori di concentrazione che dipendono unicamente dalle caratteristiche geologico/mineralogiche dei suoli analizzati, la mappa FC permette di definire l'entità dell'eventuale impatto antropico (contaminazione antropogenica) dovuto allo specifico elemento rispetto al fondo naturale (Background) o comunque ad un fondo influenzato unicamente dalla presenza storica diffusa degli esseri umani e non da un processo di contaminazione specifico (Lima et al., 2012).

La sommatoria mediante analisi spaziale di tutti i livelli tematici riportanti le FC dei singoli elementi permette di produrre la mappa del "Grado di Contaminazione Totale" (CD) che restituisce un quadro complessivo dello stato ambientale in funzione dell'impatto antropico.

Un'ulteriore elaborazione dei dati relativi ai singoli elementi potenzialmente tossici individuati dalla vigente legislazione ambientale italiana, conduce alla produzione della mappa del "Potential Hazard" basata sul confronto delle concentrazioni riscontrate nei suoli con le concentrazioni soglia di contaminazione (CSC) definite nell'allegato 5 al Titolo V della Parte quarta del D.Lgs 152/2006. Nello specifico, per ogni elemento la griglia interpolata delle concentrazioni viene riclassificata secondo un criterio booleano in accordo al quale tutti i pixel con valori di concentrazioni superanti la CSC di riferimento assumono valore unitario (1) e tutti quelli conformi assumono valore pari a zero. La carta del "Potential Hazard" è frutto della sommatoria spaziale delle griglie riclassificate dei singoli elementi: il valore assunto dal singolo pixel rappresenta in sintesi il numero complessivo di elementi con concentrazioni non conformi alle indicazioni della normativa vigente. Alti valori del "Potential Hazard" si interpretano, dunque, come una forte condizione di pericolo per la salute della popolazione esposta.

In presenza di contaminazione, in alcuni casi, come per esempio per il piombo, può essere importante approfondire la natura del processo di contaminazione che può essere multi-sorgente e dipendere da processi geochimici e/o naturali che ne generano l'iperaccumulo o da attività umane a forte impatto. In questo ultimo caso è possibile ricorrere ad indagini isotopiche (nel caso del piombo ai rapporti isotopici del Pb206, Pb207, Pb208). Per queste determinazioni analitiche occorrono laboratori specializzati come quello dell'US Geological Survey (Reston, Virginia, Stati Uniti), dove si utilizza la spettrometria di massa ad alta risoluzione(HR-ICP-MS). I rapporti isotopici determinati (Es.: Pb206/Pb207 e Pb208/Pb207) devono essere confrontati con i valori di riferimento che caratterizzano i materiali geologici locali e le fonti antropiche comuni come le ceneri leggere prodotte dai rifiuti solidi (Carignan et al., 2005), le benzine al piombo (Cicchella et al., 2008; Monna et al. 1999) e gli aerosol urbani (Cloquet et al., 2006).

which represents a potential environmental equilibrium condition for the study region. If the PNEC is fixed on the basis of concentration values that depend solely on the geological/mineralogical features of the analysed soils, the FC map allows definition of the extent of human impact (anthropogenic contamination) on the natural background due to that specific element. In some case, when a territory is highly anthropised, instead of natural background, the baseline values can be applied. These represent elemental concentrations that are influenced simply by the historical widespread presence of human beings and not by any specific contamination process (Lima et al., 2012).

The sum of all thematic layers presenting the FC of individual elements by means of spatial analysis (map algebra) leads to the production of the "Total Contamination Degree" (CD) map that gives an overall picture of the environmental status in light of the true anthropogenic impact.

A further processing of data relating to "potentially toxic elements" (as determined by applicable Italian environmental legislation) leads to the production of the map of "Potential Hazard" based on the comparison of the concentrations found in soils with the "Environmental Contamination Thresholds" (CSC in the Italian acronym) as defined in Annex 5 - Title V - Part IV of the Legislative Decree 152/2006. To be more specific, the interpolated concentration grid of each element is reclassified according to a Boolean criterion and all the pixels with values of concentrations greater or equal to the reference CSC assume a unitary value (1), whereas all those below assume zero value. The map of "Potential Hazard " is the result of the spatial sum of the reclassified grids: the value assumed by the individual pixels represents the total number of elements with concentrations that do not comply with the requirements of the current legislation. High values of the "Potential Hazard" map should therefore be interpreted as a severe hazard condition for the health of the exposed population.

In the presence of contamination, it may, in some cases, be important to investigate the nature of the contamination process as it might be "multi-sourced" and depend upon geochemical and/or natural processes or on human activity. For this purpose, it is possible to use isotopic analyses (in the case of lead the isotopic ratios of Pb206, Pb207, Pb208 can be used). For these kinds of analytical determination, specialised laboratories, such as the US Geological Survey (Reston, Virginia, USA), where the High Resolution - Mass Spectrometry (HR-ICP-MS) technique is available, are required. The determined isotope ratios (E.g.: Pb206 / Pb207 and Pb208 / Pb207) should be compared with the reference values that feature both the most locally widespread geological materials and common anthropic sources (E.g.: fly ash from solid waste, leaded gasoline and urban aerosol) (Carignan et al., 2005; Cicchella et al., 2008; Cloquet et al., 2006; Monna et al. 1999) to determine the weight of each source within the contamination process.

4.4 Matrice acqua

Anche per questa matrice è fondamentale la disponibilità di un archivio GIS di dati sul territorio di studio. La stratigrafia del sottosuolo in aree di pianura viene ricostruita attraverso i dati dei sondaggi geognostici reperiti presso archivi di Enti ed Istituzioni, opportunamente georiferiti e inseriti in un geo-database. Tali dati spesso presentano diversa risoluzione spaziale e/o sistemi di riferimento dei dati idrogeologici, per cui è necessario uniformarli utilizzando le apposite funzione dei GIS (Resampling e Coordinate transformations/ conversions). Le stratigrafie sono generalmente relative a perforazioni eseguite in zona in tempi e per finalità diversi (pozzi per acqua, sondaggi a supporto di progetti per infrastrutture etc.): la loro qualità è pertanto molto varia e condizionata soprattutto dalla sensibilità dell'estensore e dall'importanza dell'opera per la cui realizzazione le perforazioni sono state eseguite. I dati stratigrafici devono quindi essere criticamente rivisti e omogeneizzati in "complessi idrogeologici". Dopo tale operazione possono essere utilizzati nella costruzione, manuale o attraverso software abbastanza complessi (tipo RockWorks), di sezioni idrogeologiche, fences o modelli 3D, che offrono una possibile ricostruzione dei rapporti tra i vari complessi idrogeologici presenti nel sottosuolo dell'area di studio.

Anche i pozzi e i piezometri (pozzi di piccolo diametro non usati per l'emungimento di acqua) vengono inseriti nell'archivio GIS e tra gli attributi vengono inseriti, oltre alla quota e alle caratteristiche dell'opera (profondità, livelli filtranti, etc.) i livelli piezometrici alle varie date (raccolti oppure ottenuti con misure condotte nei pozzi disponibili) e le caratteristiche idrogeochimiche (risultanti dall'analisi dei campioni di acque sotterranee effettuate prevalentemente in laboratorio), consistenti nel contenuto ionico per gli ioni principali e/o per quelli potenzialmente contaminanti, alle varie date.

Utilizzando questo archivio è possibile definire, la presenza di una o più falde sovrapposte, e per ognuna di esse, l'assetto piezometrico e la direzione del flusso sotterraneo (ad essa ortogonale) grazie all'interpolazione (con apposite metodologie statistiche, come kriging o IDW) dei dati piezometrici. Tramite interpolazione del contenuto ionico è invece possibile produrre carte idrogeochimiche a isolinee (curve che rappresentano lo stesso valore di uno ione).

Il progetto Ecoremed è stato un importante caso studio e la cartografia idrochimica prodotta per il progetto è disponibile sul sito www.ecoremed.it. La cartografia del caso di studio riporta la distribuzione degli ioni Nitrati, Fluoruri, Ferro, Manganese, Arsenico e dei principali inquinanti inorganici e organici. I dati utilizzati sono relativi alla falda principale, essendo come spesso accade, i dati idrochimici relativi alla falda superficiale troppo pochi per permettere elaborazioni cartografiche.

I nitrati sono, come in molte falde di pianura in Europa, il contaminante più presente. Nel caso studio la contaminazione da NO_3 è ovunque diffusa, la presenza di "picchi" indica che probabilmente in taluni casi c'è anche un contributo di origine "civile" oltre che agricolo.

Dall'analisi dei dati si deve valutare se, come nel caso dell'area in esame, in alcuni settori i valori più bassi sono effetto del travaso di acque dai carbonati o in relazione a condizioni riducenti, che conferiscono anche alle acque

4.4 Water Matrix

For groundwater studies, the availability of a GIS database of the study area is crucial. The subsoil stratigraphy in flat areas is based on borehole data, acquired from the archives of relevant organisations and institutions, that are adequately geo-referenced and entered in a geo-database. Acquired hydrogeological data often have different spatial resolutions and / or reference systems, and it is therefore necessary to homogenise them by using the appropriate GIS functions (resampling and coordinate transformations / conversions). The stratigraphies are derived from drilling performed in the area at different times and for different purposes (water wells, surveys infrastructure projects, etc.): their quality is therefore very different and dependent on the accuracy of the description and the importance of the work for which the perforations were made. Therefore, stratigraphic data must be critically revised and homogenised into "hydrogeological units". At the end of these operations, stratigraphies can be used for drawing up hydrogeological sections, manually or through quite complex software (e.g. RockWorks). Indeed, sections, fences and 3D models allow the reconstruction and the visualization of the relationships among the various hydrogeological units present in the subsoil of the study area.

The GIS database should also hold data on groundwater wells and piezometers (groundwater monitoring wells of small diameter), including the attributes: elevation, the technical characteristics of the work (depth, screen location, etc.), groundwater levels at different times (collected or measured) and the chemical characteristics of groundwater, derived prevalently from laboratory analysis of samples (main potentially contaminating ions and substances at different times).

Using the GIS database, we can define the presence of one or more overlayed aquifers and their groundwater potentiometric surfaces, and the groundwater flow direction (orthogonal to the previous), obtained through the interpolation of groundwater levels data by statistical methods (IDW, kriging, etc.). Moreover, we can draw up maps with contour lines of the chemical content through the interpolation of groundwater chemical data.

The Ecoremed project is a significant case study and the groundwater chemical maps of the area are available at the website: www.ecoremed.it. The maps show the distribution of the nitrate ions, fluoride, iron, manganese and arsenic and of the main organic and inorganic contaminants. All data are for the main aquifer, given that there is not sufficient chemical data on the shallow aquifer for it to be spatialised.

Nitrates are the most widespread contaminant in the groundwater in the area, just as in many European countries. Their widespread presence clearly indicates their agricultural origin, but some hotspots are present, highlighting a few cases of a 'civil' origin.

Low levels of nitrate in some sectors are due to the dilution effect of subsurface flows from the carbonate aquifers or to reducing environments, which also determine high contents of iron and manganese (as in at the edge of the Volturno river).

Another common problem in volcanic areas and their vicinity is contamination by fluorides. In the study area, this natural contamination is present on the plain of the

sotterranee elevati contenuti in ferro e manganese (ad esempio nel settore a cavallo del fiume Volturno).
Altra criticità frequente in aree vulcaniche e ad esse prossime è la contaminazione da fluoruri. Nell'area in esame è presente nella Piana del Garigliano e nel settore a sud del fiume Volturno ed è di origine naturale, strettamente connessa alle aree vulcaniche (Roccamonfina, area Flegrea e Vesuviana). Anche la contaminazione da arsenico, presente nell'area flegrea, è sicuramente di origine naturale, come già verificato in letteratura anche sulla base dei valori di fondo (Ducci & Sellerino, 2012). La presenza di contaminanti organici e inorganici in più punti, senza continuità areale, sembra invece provenire dalla superficie e avere un'origine antropica.
Proprio nell'ottica di una chiave di lettura della cartografia prodotta, le carte di vulnerabilità rappresentano un importante strumento per individuare quei settori dove è più probabile che si verifichi un inquinamento.
Esistono molte metodologie per la valutazione della vulnerabilità all'inquinamento delle falde (pagg. 26-32 su http://www.ecoremed.it/images/stories/ReportB1.pdf). Per il progetto sono stati utilizzati documenti precedenti opportunamente uniformati, tutti redatti con il metodo parametrico SINTACS – Release 5 (Civita & De Maio, 2000).
Il metodo SINTACS è basato sulla valutazione preliminare di 7 parametri: Soggiacenza - Infiltrazione - caratteristiche del Non saturo - Tipologia del suolo - litologia dell'Acquifero - Conducibilità idraulica dell'acquifero – acclività della Superficie topografica. Per ognuno di questi fattori (parametri) vengono allestiti i relativi strati informativi (o layers) rappresentabili come altrettante carte tematiche. Tutti i dati puntuali vengono territorializzati con metodi di interpolazione (es. kriging) e gestiti in ambiente GIS. Il metodo prevede che a ogni strato informativo, opportunamente classificato in specifici intervalli con un punteggio variabile da 1 a 10 (direttamente proporzionale al grado di vulnerabilità derivante dal parametro in esame), venga assegnato un "peso" che esprime la differente influenza del parametro nel computo finale della Vulnerabilità. L'indice di vulnerabilità intrinseca (ISINTACS) viene definito da: ISINTACS = ΣPj·Wj dove Pj è il punteggio di ciascuno dei sette parametri e Wj è il corrispondente peso. Gli intervalli di valori dell'Indice (da 26 a 260) vengono poi classificati in 6 gradi di vulnerabilità, da Estremamente basso a Estremamente elevato.
E' necessario realizzare, come è stato fatto nel caso del progetto Ecoremed, la carta della vulnerabilità relativa alla falda principale e quella relativa alle falde superficiali. La prima presenta una vulnerabilità media, con ampie zone ad alta vulnerabilità nei settori costieri per la scarsa soggiacenza e per la presenza di terreni a granulometria grossolana molto permeabili e in prossimità dei rilievi carbonatici per la presenza di terreni a granulometria maggiore. La carta della vulnerabilità relativa alle falde superficiali presenta gradi di vulnerabilità decisamente maggiori dovuti prevalentemente alla scarsa soggiacenza e in molti casi alla scarsa azione di mitigazione per autodepurazione operata dal non saturo nei confronti degli inquinanti.
Per l'analisi multicriteria è stata redatta la "Carta della soggiacenza minima" (la profondità minima a cui si deve

Garigliano river and in the southern sector of the Volturno river, connected to the volcanic areas of Roccamonfina, Phlegrean Fields and Vesuvius.
Arsenic contamination, of a natural origin, is also present in the aquifers of the Phlegraean area, as already demonstrated in the literature on the basis of the Natural Background Levels (Ducci & Sellerino, 2012). The presence of organic and inorganic contaminants in several places, without spatial continuity, seems to come from the surface and has an anthropogenic origin.
To better interpret the chemical maps, the aquifer vulnerability maps of contamination are a significant tool in the identification of areas prone to groundwater contamination.
There are many methodologies for assessing aquifer vulnerability to contamination (see pages 26-32 of http://www.ecoremed.it/images/stories/ReportB1.pdf). For the project, previous, appropriately merged, vulnerability maps were used, all drawn using the SINTACS parametric method - Release 5 (Civita & De Maio, 2000).
The SINTACS method is based on the preliminary assessment of 7 parameters/factors: depth to groundwater, net recharge, impact of the vadose zone, soil media, aquifer media, hydraulic conductivity and topography. Each factor is mapped as a GIS layer and classified into ranges between 1 and 10, indicating an increasing impact on potential pollution. Afterwards, weight multipliers are used for each factor to balance and to enhance their importance. The final vulnerability index ($I_{SINTACS}$) is a weighted sum of the rating value P_j of the seven factors multiplied by W_j, the weight associated with each factor ($I_{SINTACS} = \Sigma P_j \cdot W_j$). The Index ranges (26 to 260) are then classified into 6 degrees of vulnerability, from Extremely low to Extremely high.
For the Ecoremed project, the aquifer vulnerability to contamination maps was drawn up for the main aquifer and, where present, for the shallow aquifers. The aquifer vulnerability to contamination map of the main aquifer shows a prevalently "moderate" degree of vulnerability, with sectors at a higher degree of vulnerability in the coastal area due to the high score assigned to the vadose zone (due to the high permeability of the sand) and to the low depth to water, and in areas close to the carbonate mountains, where the deposits are of coarse size. The aquifer vulnerability to contamination map of the shallow aquifers shows higher degrees of vulnerability due to the low depth to water and to the mitigation effect of the vadose zone.
Finally, for the multi-criteria analysis, we used a map called "minimum depth to water", i.e. the minimum depth to where an aquifer can be intercepted. We preferred this map to the vulnerability map, which, as it uses a layer derived from numerous layers, could lead to redundancy. In the multi-layered aquifer systems, just as in our case study, the depth to water of the shallowest aquifers has to be taken into account as this is lower than the, generally confined, underlying aquifers.

4.5 GIS Inventory of the environmental condition

The development of the GIS inventory, together with the data-base analysis, is crucial for both standardisation of the data from the three territorial matrices (Air, Soil,

arrivare per intercettare la falda) in quanto tale parametro è stato ritenuto il più significativo. Si ritiene tale elaborato più idoneo rispetto all'uso della carta di Vulnerabilità in quanto, essendo quest'ultima una carta parametrica ed includendo quindi già più parametri, potrebbe creare delle ridondanze. Nei sistemi multifalda, come quello esaminato, si deve considerare la soggiacenza della falda più superficiale, essendo sempre minore a quella delle sottostanti falde (generalmente confinate).

4.5 GIS Inventory of environmental condition

La preparazione dell'inventario generale e dell'analisi base dei dati serve sia per omogeneizzare i dati delle tre matrici territoriali, sia per preparare l'analisi multi-criteriale da utilizzare nel prosieguo del progetto. In particolare, la Spatial Multi Criteria Decision Analysis (S-MCDA) è un quadro ideale per l'analisi, la strutturazione, la valutazione e l'attribuzione di priorità delle decisioni alternative (Geneletti 2000; Malczewski 2006), integrando i dati delle matrici con altre fonti aggiuntive come:

- Le cartografie del progetto Corine Land Cover (CLC) 2012, ma anche le precedenti e soprattutto quella del 2006
- Digital Elevation Model (DEM) con risoluzione di 5 m o superiore (facilmente nelle aree di studio sono disponibili gratuitamente come ricaduta della direttiva INSPIRE dei DEM di altissima risoluzione e in alcuni ambiti è possibile reperire dei DEM e DTM -Digital Terrein Model, ottenuti da LIDAR anche con risoluzione di 5 cm)
- Immagini telerilevate da satellite multispettrali dell'area di studio ad alta risoluzione (circa 5 m) o meglio ad altissima risoluzione (0,5 m)
- Cartografie prodotte da Enti Territoriali Istituzionali
- Cartografie contenenti i vincoli di pianificazione del territorio
- Le cartografie dei SIC, delle ZPS e delle aree Ramsar e le relative schede come anche quelle degli istituti faunistici e le cartografie del PTC (piano territoriale di caccia)
- I dati statistici forniti dall'ISTAT
- I dati meteorologici storici e la loro spazializzazione territoriale

In questa fase, col supporto degli specialisti, devono essere generati gli strati di base che rappresentano le conoscenze sulla flora e sugli habitat della fauna selvatica che serviranno per le successive valutazioni diagnostiche. Questi strati sono essenziali per tutte le valutazioni del progetto.

Tutti gli strati devono essere organizzati secondo un albero dei criteri (criteria tree), divisi in vincoli "constrains" e fattori generali "general factor". Tipicamente bisogna considerare come vincoli gli strati binari, che quindi tendono a cancellare alcune aree, e come "general factor" gli strati in cui vi è una graduazione delle quantità (Sharifi e Retsios 2004) che quindi producono nell'analisi valori da sommare. Per questo obiettivo gli strati devono essere convertiti in mappe raster e standardizzati con l'analisi multi-criteria (Malczewsky 2006), convertendoli in una scala comune da 0 a 1, per fornire il grado di risposta a un fattore specifico identificato o vincolo (Cervelli et al. 2016).

E' necessario individuare un gruppo di esperti per

Water) and preparation of the multi-criteria analysis, useful for the later phases of the project. To be more precise, the Spatial Multi Criteria Decision Analysis (S-MCDA) is a well-established method for analysing, prioritising, and evaluating alternative decisions/ scenarios (Geneletti 2000; Malczewski 2006), while also integrating additional information sources. In the case of the Ecoremed project, the additional information sources used for the S-MCDA were the following:

- Corine Land Cover (CLC) 2012, together with previous maps, especially that of 2006;
- Digital Elevation Model (DEM), with a resolution 5 m or more (this kind of data is easily and freely available in the EU area thanks to the INSPIRE Directive). In some cases, it is possible to obtain detailed DEM and DTM, Digital Terrain Models, derived from LIDAR images, which also have a 5 cm resolution
- Remote multispectral images, from sensing satellites with high-resolution (about 5 m) or very high resolution (0.5 m)
- Thematic Maps produced by Institutional Territorial Bodies
- Thematic Maps representing territorial planning constraints
- Thematic Maps representing the existing SIC and ZPS areas, and the Ramsar areas, also including data sheets from wildlife management and maps from the territorial hunting strategy (PTC – Piano Territoriale Caccia)
- Statistics from the Italian National Institute of Statistics (ISTAT)
- Historical series of meteorological data and their territorial spatialization

With the support of experts, further layers concerning data on flora and wildlife habitats will have to be generated in this phase, and these will be used in later diagnostic evaluation. All these layers are crucial for subsequent evaluations.

All layers must be organised following a criteria tree method, and classified into two groups: "constraints" and "general factors". Binary layers are "constraints", typically. This means that constraints represent those layers in which a number of areas are not suitable for transformation and will be left out (e.g. protected areas); while "general factors" correspond to those layers in which it is possible to grade quantities (e.g. population data), thus producing values to be added to other layers (Sharifi e Retsios 2004). Accordingly, all the layers must be converted into raster format so that they can be standardised through multi-criteria analysis (Malczewsky 2006) and can be converted onto a 0 to 1 scale, able to respond to specific description factors or constraints (Cervelli et al. 2016).

A panel of experts will be chosen to assign weights corresponding to the importance of each map. The weighting assignment will be made on the basis of pairwise comparisons, according to the ANP technique (Saaty 1980, 2005).

In the case of the Ecoremed project, the main MCA outcome is the suitability map for application of the Ecoremed protocol, although the evaluation system remains available for further analysis and/ or diagnosis, and for comparison of different planning scenarios.

assegnare i pesi corrispondenti all'importanza di ogni mappa. L'assegnazione di peso è ottenuta dalla adozione della tecnica ANP (Saaty 1980, 2005) sulla base di confronti a coppie.
Risultato principale della MCA è la mappa di idoneità per i protocolli ECOREMED, ma il sistema creato resta interrogabile e utilizzabile anche per altre analisi e soprattutto per le diverse diagnosi possibili e conseguentemente per valutare e confrontare scenari diagnostici differenti.

4.6 Ulteriori elementi per l'analisi del contesto territoriale

Il percorso di conoscenza che si deve realizzare è caratterizzato dall'integrazione dei saperi, che si evidenzia attraverso la costruzione di specifiche richieste (query) e di elaborazioni derivate.
Nell'ambito del progetto LIFE Ecoremed, ad esempio, l'integrazione delle matrici di analisi ha portato alla definizione di ambiti omogenei di territorio, in funzione delle matrici stesse e delle componenti ambientali considerate.
Inoltre, le elaborazioni iniziali sono utilizzate, successivamente, come la base per l'individuazione di altre condizioni territoriali. Per esempio, nel progetto Ecoremed sono state ricavate le "Fringe areas", ambiti di territorio marginali, in disuso o sottoutilizzate, con usi impropri del suolo, con modeste condizioni delle componenti ambientali. Si è assunto che tali ambiti possano essere quelli a maggior grado di suscettibilità di cambiamento di uso del suolo ed hanno costituito la base per le successive elaborazioni e valutazioni degli impatti prevedibili sulle componenti ambientali, attraverso l'approccio degli Ecosystem Services e le valutazioni sulla fauna selvatica.
Gli approfondimenti e le elaborazioni sono sviluppate con software specifici:

- per la costruzione dell'inventario GIS, ARCGIS 10 - ESRI, Esri Headquartersm, Redlands, California, USA;
- per le valutazioni multicriteriali, ILWIS 3.8 -52North, ITC, Enschede, Paesi Bassi).

Bibliografia

Albanese S, Fontaine B, Chen W, Lima A, Cannatelli C, Piccolo A, Qi S, Wang M, De Vivo B 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the soils of a densely populated region and associated human health risks: the Campania Plain (Southern Italy) case study. Environ Geochem Health, 37(1): 1-20

Albanese S., De Vivo B., Lima A., Cicchella D 2007. Geochemical background and baseline values of toxic elements in stream sediments of Campania region (Italy). J Geochem Explor, 93(1): 21-34

Bellasio R, Bianconi R, Corda G, Cucca P 2007. Emission inventory for the road transport sector in Sardinia. Atmos Environ, 41: 677-691

Bove M A, Ayuso R A, De Vivo B, and, Lima A, Albanese S 2011. Geochemical and isotopic study of soils and waters from an Italian contaminated site: Agro Aversano (Campania, Italy). J Geochem Explor, 109: 38–50

Carignan J, Libourel G, Cloquet C, Le Forestiere L

4.6 More knowledge factors for the territorial analysis

The knowledge process for territorial analysis is an integrated and multidisciplinary approach which provides the responses to specific queries and the calculations derived.
In the case of the Ecoremed project, integration of the territorial matrices led to the definition of homogeneous areas. These areas have been used as a basis for further diagnosis, as well as the detection of "fringe areas", i.e. marginal, abandoned or underutilised, areas featuring improper land use and poor conditions for the environmental components. Fringe areas are assumed to be those most suitable for land use change (LUC), so they become the territorial knowledge base for further calculation and for impact assessment. Fringe areas have especially been considered in order to assess the impacts generated by the protocol application on the provision of ecosystem services (evaluated in monetary terms) and on fauna and the wildlife habitat.
All these calculation were made using dedicated software:

- GIS, ARCGIS 10 - ESRI, Esri Headquarter, Redlands, California, USA, for producing the GIS Inventory;
- ILWIS 3.8 -52North, ITC, Enschede, NL) for the multi-criteria analysis.

References

Albanese S, Fontaine B, Chen W, Lima A, Cannatelli C, Piccolo A, Qi S, Wang M, De Vivo B 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the soils of a densely populated region and associated human health risks: the Campania Plain (Southern Italy) case study. Environ Geochem Health, 37(1): 1-20

Albanese S., De Vivo B., Lima A., Cicchella D 2007. Geochemical background and baseline values of toxic elements in stream sediments of Campania region (Italy). J Geochem Explor, 93(1): 21-34

Bellasio R, Bianconi R, Corda G, Cucca P 2007. Emission inventory for the road transport sector in Sardinia. Atmos Environ, 41: 677-691

Bove M A, Ayuso R A, De Vivo B, and, Lima A, Albanese S 2011. Geochemical and isotopic study of soils and waters from an Italian contaminated site: Agro Aversano (Campania, Italy). J Geochem Explor, 109: 38–50

Carignan J, Libourel G, Cloquet C, Le Forestiere L 2005. Lead Isotopic Composition of Fly Ash and Flue Gas Residues from Municipal Solid Waste Combustors in France: Implications for Atmospheric Lead Source Tracing. Environ Sci Technol, 39: 2018-2024

Cervelli E, Pindozzi S, Capolupo A, Okello C, Rigillo M, Boccia L 2016. Ecosystem service and bioremediation of polluted areas. Ecological Engineering, 87: 139 – 149

Cheng Q 1999. Multifractality and spatial statistics. Computer & Geosciences, 25: 946-961

Cicchella D., De Vivo B, Lima A, Albanese S, Mc Gill R. A. R, Parrish R. R (2008). Heavy metal pollution and Pb isotopes in urban soils of Napoli, Italy. Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis, 8: 103-112

2005. Lead Isotopic Composition of Fly Ash and Flue Gas Residues from Municipal Solid Waste Combustors in France: Implications for Atmospheric Lead Source Tracing. Environ Sci Technol, 39: 2018-2024

Cervelli E, Pindozzi S, Capolupo A, Okello C, Rigillo M, Boccia L 2016. Ecosystem service and bioremediation of polluted areas. Ecological Engineering, 87: 139 – 149

Cheng Q 1999. Multifractality and spatial statistics. Computer & Geosciences, 25: 946-961

Cicchella D., De Vivo B, Lima A, Albanese S, Mc Gill R. A. R, Parrish R. R (2008). Heavy metal pollution and Pb isotopes in urban soils of Napoli, Italy. Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis, 8: 103-112

Civita M, De Maio M 2000. Valutazione e cartografia automatica della vulnerabilità degli acquiferi all'inquinamento con il sistema parametrico SINTACS R5/ A new parametric system for the assessment and automatic mapping of groundwater vulnerability to contamination, Pitagora Ed., Bologna, 240 pp

Cloquet C, Carignan J, Libourel G 2006. Atmospheric pollutant dispersion around an urban area using trace metal concentrations and Pb isotopic composition in epiphytic lichens. Atmos Environ, 40: 574-587

CORINAIR 1988. European Inventory of emissions of pollutants into the atmosphere. Commission of the EC– CORINAIR project, DG XI

Corniello A, Ducci D 2014. Hydrogeochemical characterization of the main aquifer of the "Litorale Domizio-Agro Aversano NIPS" (Campania—southern Italy). J Geochem Explor, 137: 1-10

De Vivo B, Cicchella D, Lima A, Albanese S 2006a. Atlante geochimico ambientale dei suoli dell'area urbana e della provincia di Napoli. Aracne Editrice, Roma, 324 pp. ISBN 9788854805637

De Vivo B, Lima A, Albanese S, Cicchella D 2006b. Atlante geochimico-ambientale della regione Campania. Aracne Editrice, Roma, 216 pp. ISBN 9788854808195

di Gennaro A 2002. I Sistemi di Terre della Campania. Map 1:250.000 and Legend. Selca, Firenze

di Gennaro A, Terribile F 1999. I suoli della provincia di Napoli. Ge.Pro. Ter. Napoli, 63 pp

Ducci D, Corniello A, Sellerino M 2010. Hydrostratigraphical setting and groundwater quality status in alluvial aquifers: the low Garigliano River Basin (Southern Italy), case study. Groundwater Quality Sustainability. Krakow, 12–17 September 2010, 1:197–203. ISBN: 9788322619797

Ducci D, Sellerino M 2012. Natural background levels for some ions in groundwater of the Campania region (southern Italy). Environ Earth Sci, 67 (3): 683–693. (ISSN: 1866-6280)

EEA, European Environment Agency 2009. EMEP/ CORINAIR Emission Inventory Guidebook. Technical Report no. 9/2009

EEA, European Environment Agency 2013. EMEP/ CORINAIR air pollutant emission inventory guidebook. Technical guidance to prepare national emission inventories. 23 pp

Geneletti, D. 2000. GIS, dati tele rilevati e Sistemi di Supporto alla Decisione applicati alla valutazione di Impatto ambientale, Geomedia, 6

Gkatzoflias D, Kouridis C, Ntziachristos L, Samaras Z, COPERT 4 2012. Computer programme to calculate emissions from road transport http://www.emisia.com/copert/

Grezzi G, Ayuso RA, De Vivo B, Lima A, Albanese S 2011. Lead isotopes in soils and groundwaters as tracers of the impact of human activities on the surface environment: the Domizio-Flegreo Littoral (Italy) case

Technical guidance to prepare national emission inventories. 23 pp

Geneletti, D. 2000. GIS, dati tele rilevati e Sistemi di Supporto alla Decisione applicati alla valutazione di Impatto ambientale, Geomedia, 6

Gkatzoflias D, Kouridis C, Ntziachristos L, Samaras Z, COPERT 4 2012. Computer programme to calculate emissions from road transport http://www.emisia.com/copert/

Grezzi G, Ayuso RA, De Vivo B, Lima A, Albanese S 2011. Lead isotopes in soils and groundwaters as tracers of the impact of human activities on the surface environment: the Domizio-Flegreo Littoral (Italy) case study. J Geochem Explor, 109: 51–58

Iodice P, Senatore A 2013a. Evaluation of Dispersion Models for Predicting Carbon Monoxide Concentrations from Motor Vehicles in a Metropolitan Area. Int Rev Model Sim, 6(6)

Iodice P, Senatore A 2013b. Cold start emissions of a motorcycle using ethanol-gasoline blended fuels. Energy Procedia, 45: 809–818

Iodice P, Senatore A 2015. Appraisal of pollutant emissions and air quality state in a critical Italian region: Methods and results. Environ. Prog. Sustainable Energy, 34: 1497–1505. doi:10.1002/ep.12149

Iodice P, Senatore A, Meccariello G, Prati MV 2010. Methodology for the analysis of a 4-stroke moped emission behaviour. In: SAE Int J Engines, 2(2): 617-626

IPCC/OECD, 1997. Revised 1996 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories

ISPRA 2010. Trasporto su strada – Inventario nazionale delle emissioni e disaggregazione provinciale. Rapporti 124/2010

Leone, A. 2011. Ambiente e Pianificazione, Analisi processi e sostenibilità. Franco Angeli, Milano, Italy

Lima A, De Vivo B, Cicchella D, Cortini M, Albanese S 2003. Multifractal IDW interpolation and fractal filtering method in environmental studies: an application on regional stream sediments of Campania region (Italy). Appl Geochem, 18: 1853-1865

Lima A, Giaccio L, Cicchella D, Albanese S, Bove MA, Grezzi G, Ayuso AR and De Vivo B 2012. Atlante geochimico-ambientale del S.I.N. (Sito di Interesse Nazionale) Litorale Domizio-Flegreo e Agro Aversano Geochemical Environmental Atlas of S.I.N. Domizio-Flegreo Littoral and Agro Aversano. Aracne Editrice, Roma, 254 pp. ISBN 9788854851481

Malczewski J 2006. GIS-based multicriteria decision analysis: a survey of the literature. Int J Geogr Inf Sci, 20(7): 703–726

Monna F, Aiuppa A, Varrica D, Dongarrà G 1999. Pb Isotope Composition in Lichens and Aerosols fromEastern Sicily: Insights into the regional Impact of Volcanoes on the Environment. Environ Sci Technol, 33: 2517-2523

Ntziachristos L, Samaras Z 2012. Methodology for the calculation of exhaust emissions, SNAPs 070100-070500, NFRs 1A3bi-iv.-EMEP/EEA Emission inventory guidebook

Ohara T, Akimoto H, Kurokawa J, Horii N, Yamaji K, Yan X, Hayasaka T 2007. An Asian emission inventory of anthropogenic emission sources for the period 1980–2020. Atmos Chem Phys, 7: 4419–4444

Rosén L , Back PE, Söderqvist T, Norrman J, Brinkhoff P, Volchko Y, Norin M, Bergknut M, Döberl G 2015. SCORE: A novel multi-criteria decision analysis approach to assessing the sustainability of contaminated land remediation. Sci Tot Env, 511: 621-638

Saaty TL 2005. The Analytic hierarchy and analytic

the calculation of exhaust emissions, SNAPs 070100-070500, NFRs 1A3bi-iv.-EMEP/EEA Emission inventory guidebook

Ohara T, Akimoto H, Kurokawa J, Horii N, Yamaji K, Yan X, Hayasaka T 2007. An Asian emission inventory of anthropogenic emission sources for the period 1980–2020. Atmos Chem Phys, 7: 4419–4444

Rosén L , Back PE, Söderqvist T, Norrman J, Brinkhoff P, Volchko Y, Norin M, Bergknut M, Döberl G 2015. SCORE: A novel multi-criteria decision analysis approach to assessing the sustainability of contaminated land remediation. Sci Tot Env, 511: 621-638

Saaty TL 2005. The Analytic hierarchy and analytic network process for the measurement of intangible criteria and for decision-making. In: Figueira, J. (Ed.), Multiple Criteria Decision Analysis, 345–407

Sharifi MA, Retsios V 2004. Site selection for waste disposal through spatial multiple criteria decision analysis. J Telecommun Inform Technol, 3: 28-38

US EPA (United States Environmental Protection Agency) 1999. Compilation of air pollutant emission factors (AP-42) Volume 1: point and area sources

network process for the measurement of intangible criteria and for decision-making. In: Figueira, J. (Ed.), Multiple Criteria Decision Analysis, 345–407

Sharifi MA, Retsios V 2004. Site selection for waste disposal through spatial multiple criteria decision analysis. J Telecommun Inform Technol, 3: 28-38

US EPA (United States Environmental Protection Agency) 1999. Compilation of air pollutant emission factors (AP-42) Volume 1: point and area sources

La caratterizzazione della qualità ambientale dei siti potenzialmente contaminati

Environmental characterization of the potentially contaminated sites

5. Misure fisico-chimiche indirette: conoscere la geografia della contaminazione per la caratterizzazione e la bonifica di precisione dei siti potenzialmente contaminati

F. Terribile, A. Agrillo, A. Basile, A. Bonfante, R. De Mascellis, M. Iamarino, G. Langella, P. Manna, P. Moretti, A.F. Mileti, L. Minieri, N. Orefice, S. Scognamiglio, S. Vingiani

5.1. Introduzione

La variabilità spaziale dei suoli rappresenta un problema di fondamentale importanza per gestire i territori sia in agricoltura (ad es. per l'agricoltura di precisione) che in campo ambientale (ad es. quando si lavora in siti contaminati).

In particolare, nel caso di siti contaminati ci si trova difronte ad una duplice variabilità spaziale, una legata alla naturale variazione delle proprietà dei suoli nello spazio e un'altra di origine antropica dovuta alle cause della contaminazione. In particolare, quasi sempre risulta sconosciuta la distribuzione nel suolo delle sostanze contaminanti apportate dall'uomo. E' il caso dei siti industriali per i quali è stata persa nel tempo la storia della destinazione delle singole zone del sito, oppure sono stati modificati nel tempo i meccanismi di messa in posto. E' il caso delle discariche illegali di rifiuti, in cui c'è stato l'interramento illecito di sostanze contaminanti e pertanto non vi è traccia della loro localizzazione.

Nell'analisi dei siti contaminati, di fronte a questa mancanza ex-ante di informazioni sulla eterogeneità spaziale (in termini qualitativi e quantitativi) della contaminazione, è evidente che bisogna dotarsi di strumenti d'indagine che consentano di indagare una variabilità difficile da cogliere, perché nascosta nel suolo, ma che è di fondamentale importanza sia ai fini della caratterizzazione del sito, ma anche per le successive fasi di bonifica.

5. Knowledge of contamination geography for characterization and precision remediation of potentially contaminated sites

F. Terribile, A. Agrillo, A. Basile, A. Bonfante, R. De Mascellis, M. Iamarino, G. Langella, P. Manna, P. Moretti, A.F. Mileti, L. Minieri, N. Orefice, S. Scognamiglio, S. Vingiani

5.1. Introduction

Soil spatial variability is a fundamental problem for land management both in agriculture (e.g. precision farming) and in other environmental contexts (e.g. contaminated sites). In the case of contaminated sites a dual spatial variability is experienced; one linked to natural spatial variation of soil properties and another related to the anthropogenic causes of the contamination. In particular, the spatial distribution of anthropic soil contaminants is almost always unknown. This is the case of most industrial sites where the detailed history of contamination is normally lost in time. This is due to two main factors: the loss of historic information of industrial land use for each area of a specific industrial site, and its modification over time (e.g. placing/removal of materials). This also holds for most illegal waste dumping, for which type/quantity and especially localization of contaminants are unknown. In the analysis and subsequent remediation of contaminated sites, faced with this lack of ex-ante information on the detailed spatial heterogeneity of contamination (type/quantity/location), it is clearly essential to adopt proper investigation tools to overcome such major constraints, given as well that soils – by their very nature – tend to hide contamination.

This specific contribution aims to focus on how to acquire detailed knowledge of the spatial geography of contamination which is too often neglected, not

Questa necessità di conoscere in maniera dettagliata la geografia spaziale della contaminazione è spesso trascurata, poco indagata o perfino ignorata ed è oggetto di questo specifico contributo.
La normativa che disciplina i criteri da adottare in caso di potenziale contaminazione dei diversi comparti ambientali, D.Lgs 152/06 - Parte quarta - Titolo V, stabilisce che se in un sito si registra il superamento delle concentrazioni soglia di rischio (CSR) anche solo per uno degli elementi riportati nell'allegato alla stessa legge, è necessario procedere alla caratterizzazione del sito.
Il piano di caratterizzazione, come previsto dal D.Lgs 152/06, deve verificare l'esistenza dell'inquinamento nei diversi comparti ambientali (suolo, sottosuolo, materiali di riporto, acque superficiali e sotterranee, atmosfera) e definirne il grado e l'estensione volumetrica in modo da individuare le possibili vie di dispersione e migrazione degli inquinanti verso i bersagli sensibili (uomo/ambiente).
La normativa tiene conto della componente geospaziale dell'ipotetica fonte di inquinamento ma, per la redazione delle carte di rappresentazione della contaminazione, prevede per "il suolo superficiale" almeno un campione composito prelevato dallo strato 0-1 metro di profondità. Non esistono obblighi per il metodo di campionamento (ragionato o sistematico) e per il numero di campioni da prelevare, ma nella prassi la densità di campionamento fa spesso riferimento all'allegato 2 del D.M. 471/99 che per un sito di estensione inferiore ad 1 ha definisce necessari almeno 5 punti di campionamento, per siti compresi tra 1 e 5 ha da 5 a 15 punti e per siti tra 5 e 25 ha tra 15 e 60 punti.
Tali indicazioni sono nel tempo diventate degli standard a cui gran parte degli studi di caratterizzazione dei siti contaminati italiani fanno riferimento.
Ciononostante, ci si è posti il problema se un numero così esiguo di osservazioni possa consentire di avere sufficienti conoscenze per definire come si distribuiscono spazialmente (in termini sia di superfici che di profondità) i contaminanti nel suolo. Infatti, bisogna sempre considerare che non tutto il sito di interesse è necessariamente contaminato o quanto meno non lo è nello stesso modo. Per queste ragioni, abbiamo elaborato un approccio metodologico integrato, con tecniche diverse, al fine di giungere alla definizione di un modello della distribuzione dei contaminanti quanto più vicino alla realtà.
L'approccio è basato sulla determinazione di diverse proprietà dei suoli dello stesso territorio, dalle caratteristiche di superficie a quelle di profondità.
In dettaglio, l'approccio che noi abbiamo sviluppato prevede le seguenti fasi:
- Indagini preliminari
- Indagini indirette
- Indagini dirette
- Modellazione stocastica e rischio di superamento di valori critici di concentrazione chimica

5.2. Indagini preliminari

Preliminarmente alle indagini geospaziali, è opportuno procedere con la raccolta di tutte le informazioni (carte topografiche, carte uso del suolo, foto aeree, ecc.) esistenti sul sito da indagare al fine di individuare variazioni recenti che possano essere di aiuto nell'identificazione di

investigated or even ignored. The regulatory criteria to be adopted in the case of potential contamination over several environmental media are established by Legislative Decree 152/06 - Part IV- Title V, according to which a site must be registered as potentially contaminated if element concentrations (even only for one element) are higher than the established concentration risk threshold (CSC) reported in the Annex of the same law. In such cases, site characterization is to be conducted.
Under the characterization plan envisaged by the Legislative Decree 152/06, the pollution over several environmental compartments (e.g. soil, subsoil, surface water and groundwater, atmosphere) is ascertained and the degree and extent are determined in order to identify possible modes of pollutant dispersion and migration towards sensitive targets (man/environment). Although the law takes into account the geospatial component of the hypothetical source of pollution, representation of the contamination map requires a very broad sampling aggregation scheme where "soil surface" refers to a composite sample in the 0-1 m depth range.
According to the law, there are no obligations either for the sampling method to be used (free or systematic) or for the number of sampling points. Nevertheless, in practice sampling density often refers to the old Decree 471/99 (Annex 2) establishing (i) for areas of less than 1 hectare, the requirement of having at least five sampling points; (ii) for areas in the range of 1-5 ha, the requirement of 5 to 15 sampling points and (iii) for areas in the range of 5-25 ha, the requirement of 15-60 sampling points. These long-established specifications have actually become a standard to which many of the characterization studies of contaminated sites Italians refer.
Despite the evidence for the above "standard", here we question whether such a small number of observations are really sufficient to define the spatial distribution (in terms of surfaces and depth) of contaminants in soils. Indeed, in reality we must consider whether the entire site of interest is really contaminated or only parts of it and also to what extent it is contaminated at each detailed location. For these reasons, here we elaborate a methodological integrated approach, combining many different techniques, aiming to define a model of contaminant spatial distribution as close as possible to reality. The above approach is based on analysing how soil properties vary in space and depth within the same site.
The approach that we developed is based on the following steps:
- Preliminary investigations
- Indirect investigations
- Direct investigations
- Stochastic modelling and critical risk of chemical concentrations exceeded

5.2. Preliminary investigations

Before the geospatial surveys, it is appropriate to collect all the existing information (topographic and land use maps, aerial photos, etc.) on the site to be investigated in order to identify recent changes that might be helpful in identifying anomalies or simple modifications of interest. Among such preliminary investigations it is sometimes useful to reconstruct the site's history on the basis of

anomalie o semplici modificazioni d'interesse. Tra queste indagini preliminari talvolta risulta utile la ricostruzione della storia del sito sulla base delle foto aeree disponibili, soprattutto se di periodi diversi. Nel caso di siti interessati da sversamento illecito di rifiuti, i periodi di interesse sono certamente quelli antecedenti e successivi agli eventi, al fine di individuare tracce anomale (come disomogeneità della superficie del suolo) che possano essere interpretate come i punti in cui sarebbe stato commesso l'illecito. Per illustrare meglio questo concetto mostriamo un caso studio a Giugliano (San Giuseppiello), per il quale sono state analizzate le immagini aeree relative a 5 anni diversi, a partire dal 1989 fino ad oggi, ottenute dai servizi WMS del Geoportale Nazionale e di Google Earth. In esse sono state individuate variazioni nel tempo dell'uso del suolo di parte dell'area (da frutteto a seminativo) e la presenza, in qualche foto, dei segni di carreggiate, interpretabili con il passaggio di mezzi all'interno del campo. Ciononostante, è importante evidenziare che spesso tali informazioni sono difficili da utilizzare come indicazioni sulla distribuzione dei contaminanti nel territorio. Infatti le immagini sarebbero utili solo nel caso in cui le attività illecite di sversamento fossero concomitanti con l'acquisizione dell'immagine telerilevata (aereo o satellite). E' evidente che nel caso delle attività illecite ciò è altamente improbabile infatti spesso questi sversamenti vengono effettuati in tempi molto rapidi ed a volte con il favore della notte.
Per tutte queste ragioni, il lavoro di indagine geospaziale è stato condotto utilizzando metodologie d'indagine indirette e dirette finalizzate a comprendere la natura spaziale della contaminazione come prerequisito per la migliore caratterizzazione del sito e della sua potenziale bonifica.

5.3. Indagini indirette

Per indagini indirette s'intende un insieme di metodi d'indagine rapidi e non invasivi, basati su principi fisici diversi, che consentono di indagare la realtà (il suolo) utilizzando alcune sue proprietà (resistività/conducibilità elettrica, radiazioni gamma, ecc.), senza effettuare campionamenti. Proprio per le loro peculiarità, tali indagini consentono l'acquisizione dei dati in tempi molto brevi (da 1 a 3 giornate di lavoro per ciascuna tecnica, per circa 6 ha di area d'indagine) ed il passaggio dall'analisi puntuale al monitoraggio in continuo delle proprietà del suolo, e quindi alla elaborazione di mappe di variazione delle proprietà del suolo.
L'approccio metodologico utilizzato prevede l'utilizzo combinato di diverse indagini indirette per caratterizzare dei siti contaminati o potenzialmente contaminati:

- Indagine di resistività elettrica (tecnica ARP)
- Indagine Elettromagnetica (Profiler EMP400 e DUAL-EM 642 S)
- Indagine con spettrometria Gamma-ray
- Indagine con spettrometria di fluorescenza a raggi X (XRF) (Olympus Handheld XRF Analyzers Delta Professional)

La combinazione delle diverse metodologie è importante in quanto ogni metodo indaga un aspetto diverso ed una specifica proprietà chimica o fisica del suolo in un dato volume (da pochi mm^3 a diversi m^3). Inoltre è importante

the available aerial photos, especially if the photos are from different periods. In the case of sites affected by illegal waste, the periods of interest to identify anomalous traces (such as non-homogeneous soil surfaces that can be interpreted as the points where the waste spillage occurred) are undoubtedly those preceding and following the events.
In order to better illustrate this concept, we show the case study of Giugliano (San Giuseppiello), where we analysed the aerial photos obtained from the WMS services of National Geoportal and Google Earth, considering five different years, from 1989 to the present. In the photos, changes in land use (from orchard to arable) were identified in part of the area and the presence, in some pictures, of signs of roadways interpretable as the passage of vehicles within the field.
Nevertheless, it should be pointed out that it is often difficult to use such information to identify the distribution of contaminants in the area. Indeed, the pictures would be useful only if the illegal spillage were associated with almost simultaneous remote sensing images (aerial or satellite photos), which is very rare in the case of illegal activities: waste spills are often effected very quickly and sometimes under the cover of night.
For all these reasons, the geospatial survey was carried out using direct and indirect methods of investigation in order to ascertain the spatial nature of the contamination as a prerequisite for better site characterization and its potential remediation.

5.3. Geophysical prospecting

Almost all geophysical methods are non-destructive, very sensitive and are used for describing subsurface properties without digging to solve engineering, geological, environmental and forensic problems. There are many methods that use different physical proprieties of the subsurface (electrical resistivity/conductivity, density, magnetic susceptibility, quantity of K+U+Th, velocity of P or S waves) and the choice of the best method is related to the purpose of prospecting. Such investigations generally permit the acquisition of data in a very short time (1 to 3 days' work for each technique, for a survey of 6 ha) and can help transform point-based analysis of standard soil observations into information on continuous spatial soil properties.
Geophysical modelling provides generalized and non-unique solutions to questions concerning the geometry of the subsurface. Hence a well-conducted study generally requires complimentary geophysical surveys integrated with geochemical and geologic insight.
The methodological approach involves the combined use of several indirect surveys to characterize contaminated or potentially contaminated sites:

- Automatic resistivity profiling (ARP);
- Frequency domain electromagnetic induction (Profilers EMP400 and DUAL-EM 642 S)
- Gamma-ray spectrometry (compact gamma surveyor – GF instruments);
- X-ray fluorescence (XRF) (Olympus Delta Professional Handheld XRF Analyzers)

evidenziare che per un dato sito contaminato non è possibile conoscere a priori la performance di uno specifico metodo di indagine e che l'utilizzo dei sensori può variare in base allo specifico caso indagato.

5.4. Indagini ARP (Automatic Resistivity Profiling) - Geoelettrica spaziale.

Il metodo della resistività (geoelettrica) utilizza, come parametro per indagare il sottosuolo, la resistività elettrica che è una proprietà strettamente correlata con altre proprietà fisiche e chimiche del suolo (quali tessitura, umidità, struttura, salinità, ecc.). Di conseguenza, variazioni della resistività elettrica apparente del suolo possono essere interpretate come variazioni di altre proprietà fisiche e chimiche del suolo dovute ad esempio ad interramento di rifiuti (ad es. nel caso dei siti contaminati).
Nella figura 1 si può vedere come la resistività elettrica delle argille vari di 1-2 ordini di grandezza rispetto a quella misurata in sabbie e ghiaie.

Il principio. Nei metodi geoelettrici la misura della resistività è ottenuta immettendo una corrente elettrica nel suolo attraverso l'utilizzo di due elettrodi e misurando la differenza di potenziale che si genera tra altri due elettrodi. Tale differenza di potenziale dipende dalla resistività elettrica del volume attraversato dalla corrente immessa e dalla geometria del sistema di acquisizione.
Il sistema ARP (Automatic resistivity profiling) permette di effettuare acquisizioni quasi in continuo grazie all'ausilio di un motociclo del tipo *quad* e ad un sistema di georeferenziazione delle misure (GPS di precisione).
Il sistema ARP è composto da quattro coppie di ruote dentate (elettrodi) che permettono un contatto continuo con la superficie. La coppia di ruote più vicina al *quad* invia corrente nel terreno, mentre le altre tre misurano

5.4 Automatic resistivity profiling

Electrical resistivity of the soil, measured with these methods, is related with the spatial and temporal variability of many other soil physical properties (i.e. structure, water content or fluid composition). Hence, among the geophysical tools used in soil science, electrical methods are considered potentially useful to characterize soil (Fig. 1).
Given that soil is rarely uniform, we can talk about apparent electrical resistivity as the 'combination' of all the resistivity of the volume where the current is able to flow.
Principle: In the resistivity method, electrical resistivity is obtained by injecting a DC current, or a slow alternating current, in the soil by means of a pair of electrodes and measuring the resulting potential field on two other electrodes.
The current flow in the whole soil volume is a function of the spatial distribution of the electrical resistivity and also of the geometry of the quadripole.
The transmitting and receiving electrode pairs are called dipoles. By varying the unit length as well as the distance between them, the horizontal and vertical distribution of electrical properties can be recorded.
The ARP system allows almost continuous acquisitions to be carried out. The system is towed by a quad and records GPS positions for all the measurements made. It comprises four pairs of toothed wheels (electrodes) which allow continuous contact with the surface. The pair of wheels closest to the quad send current into the ground, while the other three measure the resulting potential of the current flow. Each of these three axes has a different distance from the axis of injection, which corresponds approximately to the depth of investigation (Figure 2).
Figure 3 shows the acquisition of resistivity data with ARP conducted in a site in Giugliano. Acquisition was performed in a single day, covering an area of six hectares with a spacing of about two metres between one row and the next.

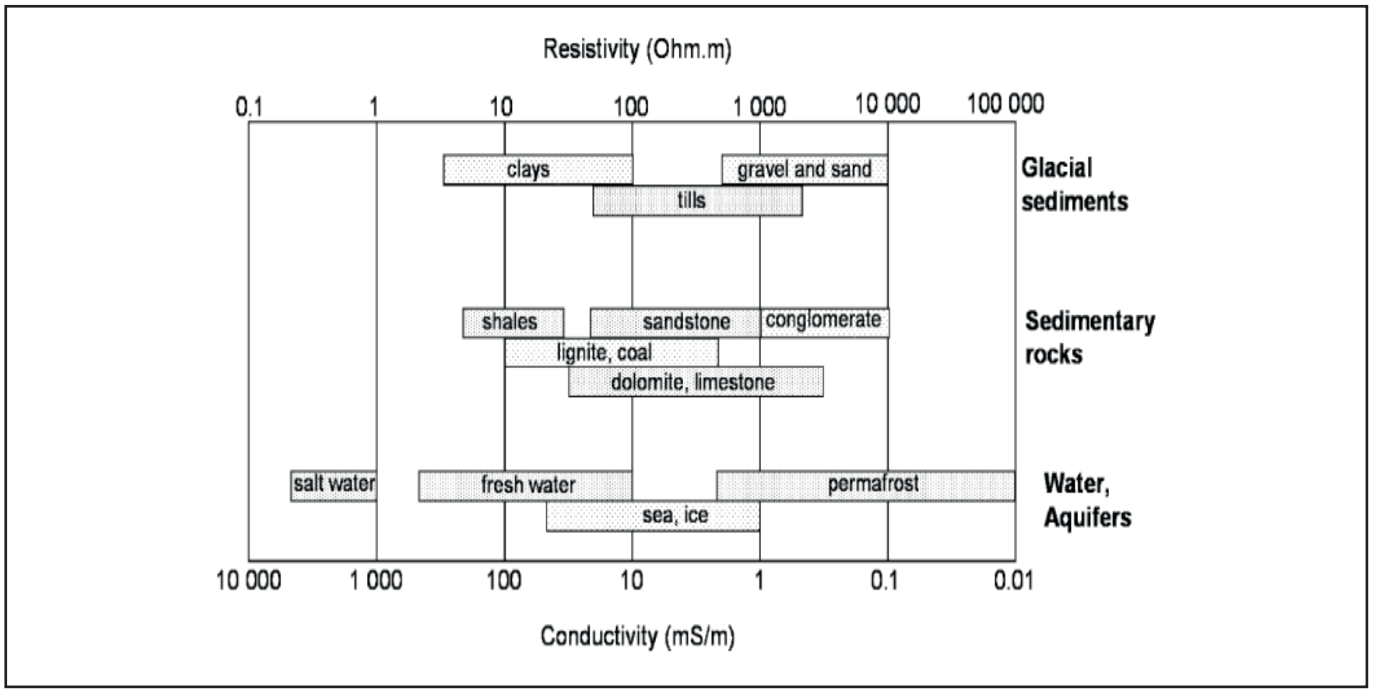


Figura 1. Resistività e conducibilità elettrica di alcuni materiali (rocce, acqua, ecc.)

Figure1. Resistivity and electrical conductivity of certain materials (rocks, water, etc.)

il potenziale risultante del flusso di corrente. Ciascuno di questi tre assi ha una distanza diversa dall'asse d'iniezione che corrisponde all'incirca alla profondità d'indagine (Figura 2). In questo modo è possibile indagare contemporaneamente la resistività elettrica apparente di tre volumi di suolo (0.5 m, 1 m, 1.7 m).
In Fig. 3 si riporta una foto del sito di Giugliano con la posizione delle scansioni effettuate, da cui si può osservare quanto siano fitte e ravvicinate. Il risultato finale è composto da tre mappe di resistività apparente che corrispondono ai tre volumi di suolo indagati.
La restituzione finale è una mappa che descrive la variazione laterale di resistività elettrica apparente.
Per l'acquisizione dei dati in 6 ettari di territorio è stata necessaria una giornata di lavoro.
In Fig. 4 si riporta una mappa della resistività elettrica apparente ottenuta con l'ARP a Giugliano. Come si vede, vengono individuate fasce di territorio a diversa resistività allungate in direzione N-S, ma anche anomalie più piccole (ad es. vicino alla casa al centro dell'a-

Figure 4 shows one of the three maps obtained using kriging interpolation. The field is characterized by the presence of areas with different N-S oriented resistivities and there are also some small anomalies (near the building at the centre or in the bottom margin). Such anomalies could be the most relevant to this type of study because they may be related to holes filled with contaminated materials.

5.5 Frequency domain electromagnetic induction

The electromagnetic induction method (EMI) uses the principle of induction to measure the electrical conductivity (the inverse of electrical resistivity) of the subsurface. Unlike conventional resistivity techniques, no ground contact is required.

Principle. In EMI methods, a current is injected into the soil by means of low frequency variations of a magnetic field (Hp) originating from an oscillating current in a coil (Tx) above the soil. This magnetic field

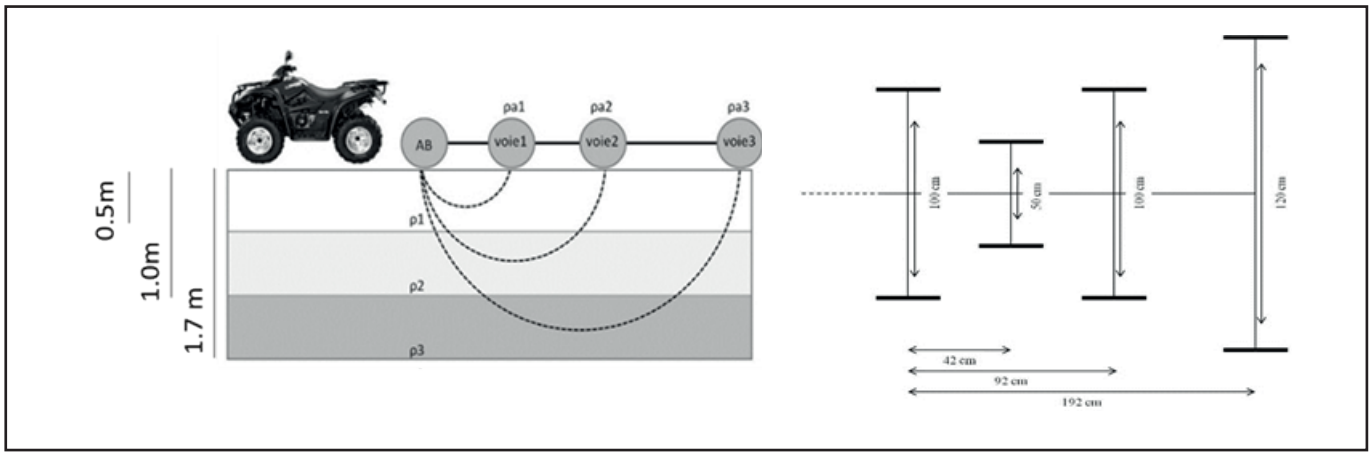


Figura 2. Schema sintetico e geometria del sistema ARP.

Figure2. Geometry of the ARP system

Figura 3. Schema delle scansioni effettuate con la tecnica ARP.

Figure 3. Trajectory of ARP survey.

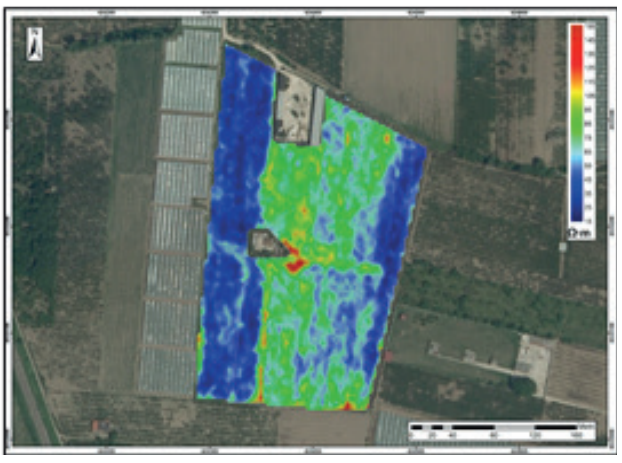


Figura 4. Mappa della resistività elettrica.

Figure 4. Electrical resistivity map

DUALEM - PRP6, 3 m

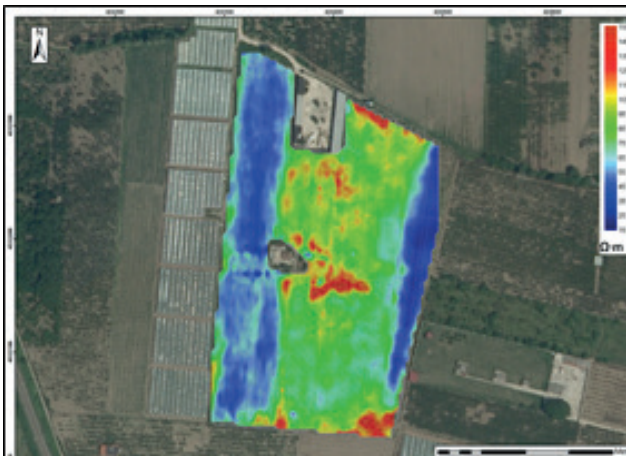


Figura 5. Mappa della resistività elettrica apparente ottenuta con DUALEM

Figure 5. Resistivity map obtained with DUALEM

PROFILER, Eca 15KHz

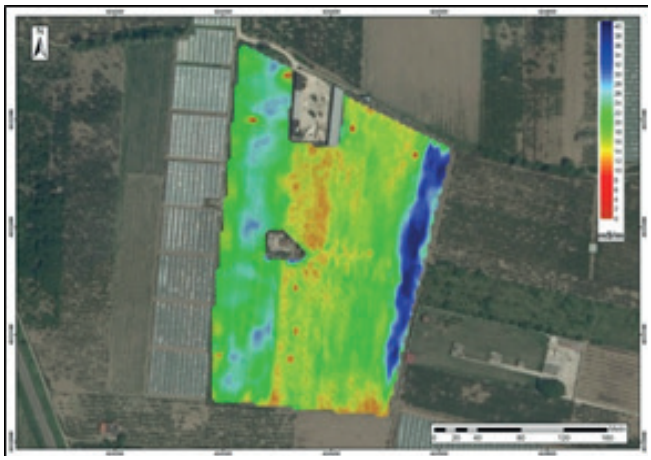


Figura 6. Mappa della resistività elettrica apparente ottenuta con PROFILER.

Figure 6. Resistivity map obtained with PROFILER

rea, nella fascia sud… e quella ovest). Queste zone di anomalia più piccole sono per noi quelle di maggiore interesse perché in corrispondenza di queste potrebbe essere stata scavata una buca e riempita da materiali contaminati.

5.5. Metodo di induzione elettromagnetica

Il metodo dell'induzione elettromagnetica nel dominio della frequenza utilizza, come parametro per indagare il sottosuolo, la conducibilità elettrica (reciproco della resistività elettrica misurata con l'ARP).

Il principio. Gli strumenti per l'induzione elettromagnetica sono dotati di due bobine, una trasmittente Tx ed una ricevente Rx. La bobina trasmittente genera un campo magnetico primario (Hp) che induce nel suolo correnti circolari di piccola intensità che a loro volta generano un campo elettromagnetico secondario (Hs), la cui intensità è proporzionale alla conducibilità elettrica apparente del suolo. La conducibilità elettrica (σ), al pari della resistività (ρ), è una proprietà intrinseca dei materiali. Così come visto con l'ARP, l'impiego di una sola giornata di lavoro è sufficiente per effettuare fitte scansioni in 6 ha di campo. Nel caso studio di Giugliano sono stati utilizzati due strumenti con caratteristiche diverse, il DUAL-EM 642-S ed il Profiler EMP 400; dalle mappe di conducibilità ottenute con DUALEM e Profiler si osservano le stesse ampie fasce allungate N-S e una generale sovrapposizione anche delle zone di anomalia più piccole.

5.6. Metodi radiometrici

Un'altra tecnica utilizzata, e assolutamente non correlata alle precedenti, è la spettrometria gamma.

Il principio. Si tratta di indagini radiometriche che valutano l'ampiezza dello spettro dei raggi gamma emessi dal suolo e misurano il contenuto di radioelementi na-

induces eddy currents in the soil (Faraday's law) that generate a very small oscillating magnetic field (Hs). A second coil (Rx) measures both the primary field (Hp) and the secondary field (Hs).
Under specific constraints, termed low induction number (LIN), what is measured on the Rx coil is a function of the different conductivities in the subsoil but also of other factors like orientation and distance between the two coils, operating frequency and magnetic susceptibility.
In the Giugliano field two instruments with different characteristics (DUAL-EM 642-S and Profiler EMP 400) were used and each electromagnetic induction acquisition took just one day. In the maps reported in figures 5 and 6 the same areas elongated in N-S direction may be observed, as well as the small anomalies identified with ARP.

5.6. Radiometric methods

Another geophysical method used, not correlated with those described above, is gamma-ray spectrometry.

Principle. The gamma-ray spectrometer is designed for measurements of natural and artificial radioisotopes in the ground. The instrument always measures the complete spectrum, from which it evaluates the cps values in ROIs and calculates the concentrations of elements K [%], eU [ppm], eTh [ppm]. The natural dose rate (in nGy/h) is calculated from measured concentrations of K, eU, eTh according to IAEA recommendations. The measurements are performed as points and the position of the measured site can be set using external GPS. In the field at Giugliano (figure 7) we made 180 measurements in three days.
Using (geo)statistic interpolation it is possible to spatialize the point-based information of K [%], U [ppm], Th [ppm] and natural dose rate (in nGy/h) as we did for resistivity data.

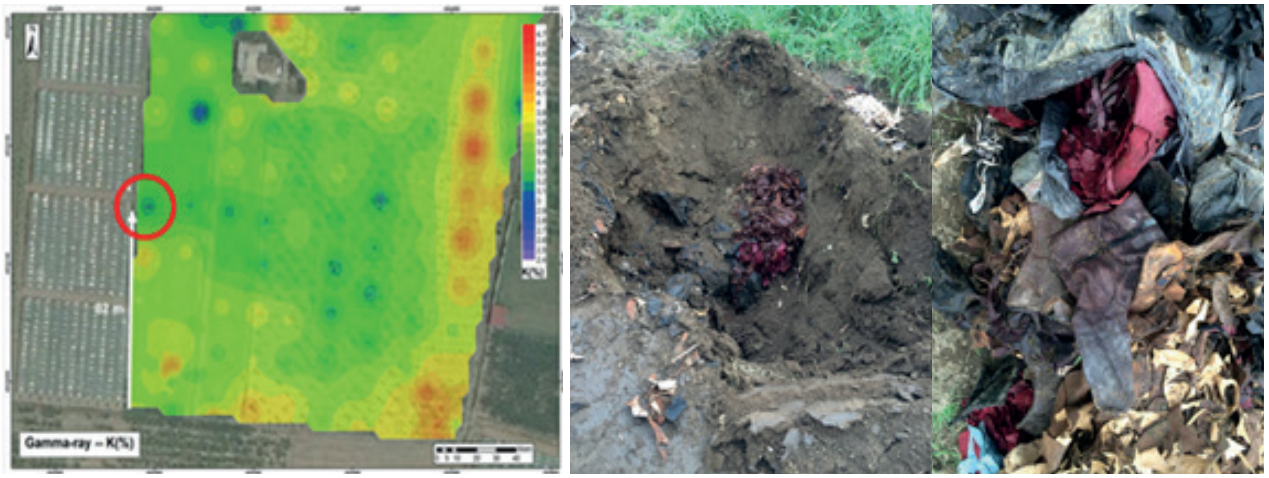


Figura 7. Mappa della radiazione gamma del K con indicata un'anomalia in cui sono stati ritrovati i rifiuti delle figure adiacenti.

Figure 7. Gamma-ray map of K(%) with an identified anomaly in correspondence of which it was discovered a large amount of leather scraps.

turali (quali potassio, uranio, torio), oppure di origine antropica. In questo caso l'acquisizione non è effettuata in continuo ma su punti stabiliti, e, come per le altre indagini, anche in questo caso è possibile ottenere le mappe della distribuzione delle radiazioni gamma rilevate, della emissione totale di radiazioni e delle singole concentrazioni di K, U e Th. Dette mappe possono contribuire ad individuare anomalie di interesse.
Di seguito si riporta come esempio la mappa delle emissioni gamma del K ottenuta nel sito di Giugliano, ove i rilievi sono stati effettuati in circa 180 punti, richiedendo 3 giorni di lavoro di campo.
Premesso che, così come con le metodologie precedenti, da tali indagini non è possibile definire a priori la causa (naturale o antropica) delle anomalie individuate, è interessante osservare che durante i lavori di sistemazione del sito, è stata rinvenuta una grande quantità (22 tonnellate) di ritagli di pellame, anche in diverso stato di conservazione, proprio in corrispondenza di una delle anomalie precedentemente evidenziate sulle mappe dei rilievi geoelettrici e delle radiazioni gamma.

5.7. Indagini dirette

Al fine di associare dati di contaminazione alla distribuzione spaziale delle anomalie, oltre alle indagini indirette sono state eseguite indagini dirette con metodi speditivi adatti ad effettuare misure di campo.

5.7.1. Spettrometria a fluorescenza di raggi-X (Olympus Handheld XRF Analyzers Delta Professional)

Una tecnica di indagine diretta, che segue gli standard internazionali (ISO 13196:2013) per la determinazione del contenuto totale di elementi chimici nel suolo, è la spettrometria a fluorescenza di raggi-X, mediante apparecchiatura portatile da campo. Di seguito si parlerà di quella utilizzata nell'ambito del progetto LIFE Ecoremed, ossia l'OLYMPUS XRF Analyzer, DELTA Professional

In some cases, the anomalies identified with this method can help to discover buried artificial materials. Figure 7 shows the discovery of a large amount (22 tons) of leather scraps, in different states of conservation, at one of the anomalies previously identified on survey maps of resistivity and gamma-ray detection.

5.7. Direct investigation

In order to relate contamination data to the spatial distribution of anomalies, as well as indirect investigations, direct surveys were carried out with rapid field measurement methods.

5.7.1. X-ray fluorescence spectrometry (Olympus Delta Professional Handheld XRF Analyzers)

A direct survey technique, which follows the international standard (ISO 13196: 2013) for the determination of total content of chemical elements in the soil, is X-ray fluorescence spectrometry by means of portable field equipment. Below we discuss the portable field equipment used in the ECOREMED LIFE project, that is the OLYMPUS DELTA Professional Handheld XRF Analyzer. This equipment allows the total content of 32 chemical elements (namely U, Sr, Y, Zr, Th, Nb, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, W, Hg, As, Se, Pb, Bi, Rb, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn) to be measured on each soil sample.

Principle. The field handheld XRF spectrometer is based on the fluorescence principle. The term fluorescence is applied to phenomena in which the absorption of radiation of a specific energy results in the re-emission of radiation of a different energy (generally lower). Through a source placed on the front side of the instrument, a sample is subjected to irradiation by an X-ray beam that determines ionization of their component atoms.
As a consequence there is an electronic transition for compensating the "hole" that causes the emission of X

Handheld. Tale apparecchiatura consente di misurare il contenuto totale di 32 elementi chimici (quali U, Sr, Y, Zr, Th, Nb, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, W, Hg, As, Se, Pb, Bi, Rb, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn) su ciascun campione di suolo.

Il principio. Lo spettrometro XRF portatile da campo si basa sul principio della fluorescenza, ossia sulla proprietà di alcune sostanze di riemettere (nella maggior parte dei casi a lunghezza d'onda maggiore) le radiazioni elettromagnetiche ricevute. Attraverso una sorgente posta sul lato anteriore dell'apparecchio, un campione di suolo è sottoposto ad irraggiamento mediante un fascio di radiazioni X che determina una lacuna elettronica negli orbitali atomici degli elementi costituenti le molecole. Di conseguenza, si verifica una transizione elettronica a compensare la lacuna che provoca l'emissione di raggi-X con una specifica frequenza (ν) ed energia uguale alla differenza tra i valori energetici del livello iniziale e finale:

$$\nu = \frac{E_i - E_f}{h}$$

Ei indica il valore energetico del livello iniziale (da cui l'elettrone si allontana per colmare la lacuna sottostante); Ef indica il valore energetico del livello finale, d'arrivo; h è la costante di Planck.
In virtù della quantizzazione dei livelli energetici nell'atomo, ogni valore di frequenza emessa corrisponde ad un particolare elemento, le radiazioni emesse sono, pertanto, definite come caratteristiche. Tale principio permette di identificare gli elementi attraverso indagini spettroscopiche.
I campioni di suolo analizzati mediante spettrometria XRF vengono prelevati in campo seguendo una griglia di campionamento regolare del suolo (ad es. 20 m x 20 m), con campioni prelevati a 3 profondità (ad es. 0-20, 30-60, 70-90 cm) mediante trivella a mano. Su tali campioni, dopo essiccazione all'aria, per la standardizzazione del grado di umidità, e setacciatura a 2 mm, per eliminare lo scheletro, è possibile determinare la composizione elementare mediante spettrometria a fluorescenza di raggi-X (XRF).
Al fine di spazializzare le indagini XRF, vengono costruite mappe della distribuzione in continuo degli elementi chimici per le tre diverse profondità indagate, mediante kriging ordinario.
In figure 8 e 9 vengono riportate due mappe di distribuzione dello Zn nel sito di Giugliano, ottenute in seguito ad indagini XRF ed elaborate per due diverse profondità indagate (30-60 e 70-90 cm).
Da questo tipo di indagine risulta evidente come sia possibile ricavare immagini che, con rapidità e semplicità, ci consentono sia di individuare i livelli massimi di concentrazione degli elements di interesse, che di localizzare le aree a maggiore concentrazione. Ciascuna misura (con cui si determinano i 32 elementi) ha richiesto circa 120 secondi di acquisizione. In totale, per 510 campioni analizzati, sono stati necessari circa 9 giorni di lavoro.

rays, with a specific frequency (ν) and energy equal to the difference between the initial and final energetic levels:

$$\nu = \frac{E_i - E_f}{h}$$

where Ei is the energetic value of initial level (from which the electron moves for compensating the initial hole); Ef is the energetic value of the final level; h is the Planck constant.
Due to the quantization of energetic levels of the atoms, every value of emitted frequency will correspond to a specific element. Thus, the material emits radiation, which has energy characteristic of the atoms present. This principle allows to identify the different elements by spectroscopic measurements.
Soil samples to be analyzed by XRF spectrometry are collected in the field following a regular soil sampling grid (e.g., 20 m x 20 m), with samples collected at three different depths (e.g., 0-20, 30-60, 70- 90 cm) using a hand auger. On these samples, after air drying for standardizing the degree of humidity and sieving to 2 mm to eliminate the coarse fragments, the elemental composition of the soil can be determined by means of X-ray fluorescence spectrometry (XRF).
In order to perform spatial interpolation of the XRF investigations, distribution maps of the chemical elements for the three different depths are processed by means of ordinary kriging.
Figures 8 and 9 show two Zn distribution maps obtained in the Giugliano site as a result of XRF analyses processed for two different investigated depths (30-60 and 70-90 cm). From this type of survey it is evident how rapid and easy it may be to obtain images that allow us to identify both the maximum concentration levels of the elements of interest and the areas with the highest concentrations. Each measure (with which we determine the 32 elements) required about 120 seconds for acquisition. In total, for 510 samples analyzed, about nine days of work were needed.

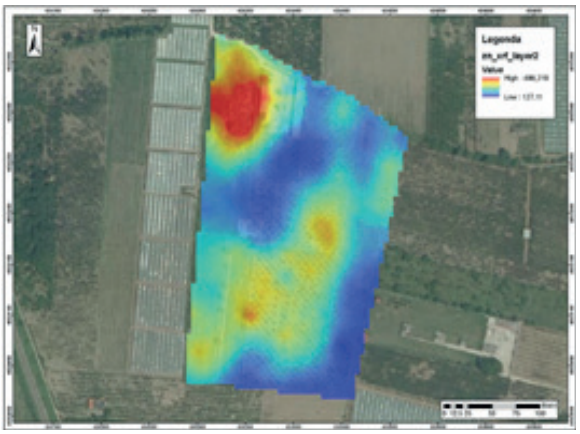


Figura 8. Mappa di distribuzione dello Zn a Giugliano, nello spessore 30-60 cm di profondità.

Figure 8. Zn distribution map at Giugliano (30-60 cm depth).

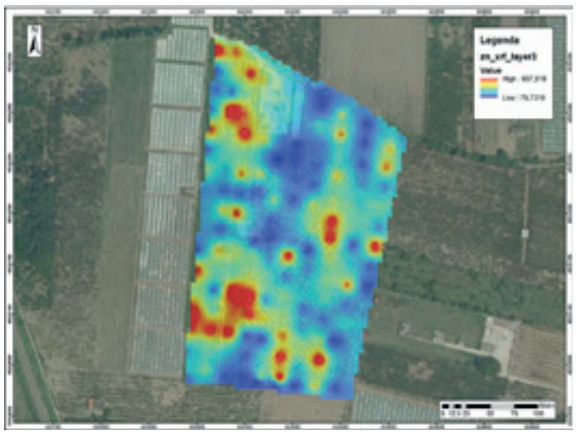


Figura 9. Mappa di distribuzione dello Zn a Giugliano, nello spessore 70-90 cm di profondità.

Figure 9. Zn distribution map at Giugliano (70-90 cm depth)

5.7.2. Modellazione stocastica e rischio di superamento di valori critici di concentrazione chimica

L'indagine geochimica (XRF) si presta ad essere elaborata al fine di ottenere una mappa che rappresenti direttamente i rischi di superamento di una data soglia di concentrazione del contaminante.

In questo contesto l'applicazione della *simulazione geostatistica condizionale* è di grande utilità. Essa è un'avanzata tecnica statistica ed è applicata alle misure di alcuni elementi chimici di particolare interesse per il sito di studio. Qui si farà riferimento allo zinco (Zn) ed al cromo (Cr). La simulazione geostatistica è da preferire ai tradizionali approcci di interpolazione spaziale (come lo stesso kriging) in quanto cattura l'eterogeneità geospaziale dei livelli di un certo composto chimico (il quale superando una certa soglia è da ritenere contaminante) e consente anche una più accurata stima del suo contenuto. Il principio su cui si basa la simulazione geostatistica è quello di preservare la varianza osservata nei dati (misurati mediante XRF, in questo caso applicativo) invece che il valore medio, come avviene nei tradizionali metodi di interpolazione (inverso della distanza, kriging ordinario, ecc.).

Ad esempio, la distribuzione geospaziale 3-D del livello di cromo nel campo di Giugliano non è il risultato di un processo casuale, seppure la combinazione degli agenti fisici, chimici e antropici, che nel tempo hanno modificato le caratteristiche "naturali" del sito, lascerebbero pensare ad una messa in posto del tutto casuale. Infatti, l'azione degli agenti soprattutto antropici impedisce il riconoscimento delle principali cause che hanno determinato lo stato dei luoghi al momento della sua misura. La simulazione geostatistica, con la sua stocasticità, consente all'analista di mettere in evidenza dettagli ad una scala locale che altrimenti andrebbero persi con l'uso di interpolatori tradizionali che invece rimpiazzano il dettaglio locale con valori medi *smussati*. La procedura analitica prevede una modellazione stocastica dei dati, ossia la

5.7.2 Stochastic modelling and the risk of exceeding critical values of chemical concentrations

The X-ray fluorescence spectrometry data are suitable to be processed in order to obtain a continuous map, depicting the risk of exceeding a given threshold of pollutant concentration. In this context it is very useful to apply the *geostatistical conditional simulation* technique, which is an advanced statistical approach here used to estimate the concentration of some key chemical elements including Zinc (Zn) and Chromium (Cr). In our study the geostatistical simulation method is preferable: compared with the traditional approaches to spatial data interpolation (including Kriging), it is better at capturing the geospatial variability of a given compound (whose concentration, if higher than a limit threshold, is considered polluting), and also estimates more accurately its concentration, when this varies widely in space.

The principle on which the geostatistical simulation is based is to preserve the variance observed in the data (measured by XRF in this specific application) rather than the average value, as occurs in conventional interpolation methods (inverse of distance, ordinary kriging, etc.). A good example of its performance is the geospatial 3-D distribution of the chromium levels within the study area of Giugliano. It is not the result of a random process, even if the combination of physical, chemical and especially anthropogenic effects, which over time have modified the "natural" characteristics of the site, would suggest an completely random emplacement. In this scenario, geostatistical simulation, with its stochasticity, allows the analyst to highlight details to a local scale that would otherwise be lost with the use of traditional interpolators, that instead replace local detail with smoothed average values.

The analytical procedure is based on stochastic modelling of the data, that is the definition of the variogram model (which models the spatial structure of a variable), and the realization of 200 geostatistical simulations (i.e.

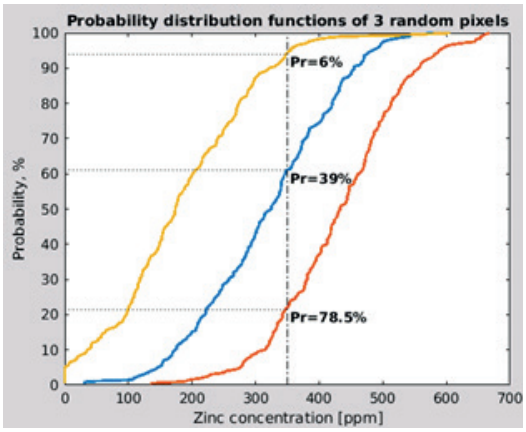


Fig. 10 Probability distribution functions at three randomly selected spatial locations.

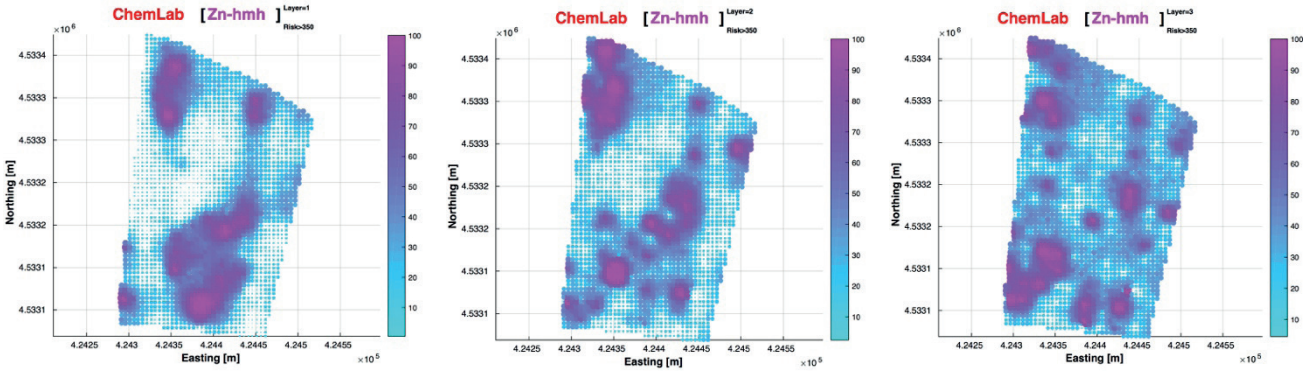


Figura 11. Mappa del rischio di superamento della concentrazione critica di Zn (350 ppm) negli strati 0-20 cm, 30-50 cm e 70-90 cm (da sinistra a destra)

Figure 11. Maps of risk exceeding critical Zn concentration (350 ppm) in layers 0-20 cm, 30-50 cm and 70-90 cm (from left to right).

definizione del modello di variogramma (che modellizza la struttura spaziale di una variabile regionalizzata) e la realizzazione di 200 simulazioni geostatistiche (ossia simulazioni Gaussiane condizionali, in cui la condizionalità è sul dato misurato). Ordinando i valori di simulazione ed applicando una soglia alla concentrazione del composto chimico investigato si ottiene la probabilità di superamento di detta soglia. Nella figura 10 si evidenzia la probabilità (6%, 39% e 78.5%) che tre punti del sito oggetto di studio superino la soglia di 350 ppm per lo zinco alla profondità 0-20 cm. Estendendo la funzione di distribuzione di probabilità a tutti i punti del campo ed a ciascuna delle tre profondità di suolo elaborate (0-20 cm, 30-50 cm e 70-90 cm), si ottengono le mappe del rischio di superamento del valore critico di concentrazione del composto chimico prescelto. Nella figura 11 si riportano, a titolo di esempio, le mappe del rischio di superamento della concentrazione di 350 ppm di Zinco alle tre profondità di suolo.

Risulta evidente che queste mappe sono già esse un importantissimo risultato di caratterizzazione del sito potenzialmente contaminato. Esse possono essere di grande aiuto nella successiva attività di bonifica.

conditional Gaussian simulations, in which conditionality is derived from the measured data). Sorting the simulation values and applying a threshold to the concentration of the chemical compound investigated, we observe the probability of exceeding that threshold. Figure 10 highlights the probability (6%, 39% and 78.5%) that three points within the study site exceed the threshold of 350 ppm for zinc at a depth of 0-20 cm. By extending the probability distribution function to all points of the study site at the three soil depths investigated (0-20 cm, 30-50 cm and 70-90 cm), we obtain the risk maps of exceeding the critical value of concentration for each compound. For example, figure 11 reports the risk maps of exceeding the concentration of 350 ppm of zinc at the three depths (from left to right). These maps are a very important result in characterizing a potentially contaminated site. They can represent a very good support for subsequent remediation activities.

5.7.3. Confronto tra i risultati ottenuti applicando il D.M. 471/99 e quelli ottenuti dal metodo proposto

A questo punto, alla luce delle osservazioni fin qui svolte, è importante tornare al punto iniziale di questo capitolo e domandarsi se l'esiguo numero di osservazioni previste dal D.M. 471/99 (ed utilizzate di prassi) all'interno di un piano di caratterizzazione sia appropriato per definire la variabilità spaziale dei contaminanti nel sito da indagare. Grazie alla mole di analisi svolte abbiamo quindi l'opportunità di effettuare un confronto tra una caratterizzazione che si otterrebbe utilizzando le indicazioni della normativa e quella che si ottiene invece a valle dell'applicazione delle metodologie dirette, al fine di valutare l'effettiva efficacia di previsione dell'approccio elaborato. Nell'ambito del caso studio di Giugliano, per eseguire tale confronto sono state effettuate 5 prove di mappatura (Figura 12), selezionando 25 punti random dal dataset completo di misure XRF ed è stata calcolata la media dei valori dell'elemento di interesse (il cromo nel caso dell'esempio di seguito riportato), per ottenere un unico valore per il «suolo superficiale» (0-100 cm), così come previsto dalla normativa.

Al di sotto di ciascuna immagine, in cui vengono mostrati i punti dove è stato determinato il valore del Cr, è stata riportata la relativa mappa di distribuzione dell'elemento. Come si può chiaramente osservare, al variare dei punti utilizzati per l'elaborazione variano le aree in cui si rilevano le maggiori concentrazioni dell'elemento. Per cui a seconda della mappatura scelta si avrebbe un diverso potenziale intervento di bonifica. Ovviamente ciò è particolarmente grave. Inoltre, per ciascuna mappa si considera che la concentrazione dell'elemento sia la stessa per l'intero strato 0-100 cm. Nella realtà, l'approccio applicato qui proposto ci ha consentito di evidenziare che esiste una variabilità importante in termini di concentrazione e distribuzione dei contaminanti con la profondità entro il primo metro. Di seguito per confronto si riportano le mappe dettagliate di Cr per le tre profondità (0-20, 30-60, 70-90 cm) utilizzando tutto il dataset disponibile.

5.7.3. Comparison between the results obtained by applying both the DM 471/99 and the proposed methodology

At this point, having completed all the observations, it is important to return to the beginning of the current chapter and speculate whether the very limited observation, required under DM 471/99 (usually applied) for a site characterization plan, is appropriate to define the spatial variability of the pollutants.

Thanks to the large number of analyses that we performed, we have the opportunity to carry out a comparison between the characterization -that would be expected by applying the guidelines of DM 471/99- and that obtained by applying our direct methodologies, in order to assess the effectiveness of our approach.

To carry out such a comparison, in the context of the Giugliano site we performed five mapping tests (Figure 12), selecting 25 random points from the full dataset of XRF measurements and calculating the average value for an element of interest (chromium values in the following example). Thus we obtained a single value for the "topsoil" (0-100 cm), as required by legislation.

In figure 12 at the bottom of each image (which show the points where we measured the Cr values), the corresponding distribution map of the element is reported.

Observing the maps, it is evident that the number of points used in the five tests affects the distribution of the areas where we detected the major element concentrations. This means that different remediation strategies could be planned, depending on the chosen map. Obviously this evidence is of serious concern. In addition, in each map the concentration of the element is considered homogeneous for the entire layer of 0-100 cm, but in real conditions soil concentrations are very different. Indeed, the proposed approach allowed us to highlight the fact that there is also a significant vertical variability to be considered in terms of contaminant concentration and distribution within the first 100 cm.

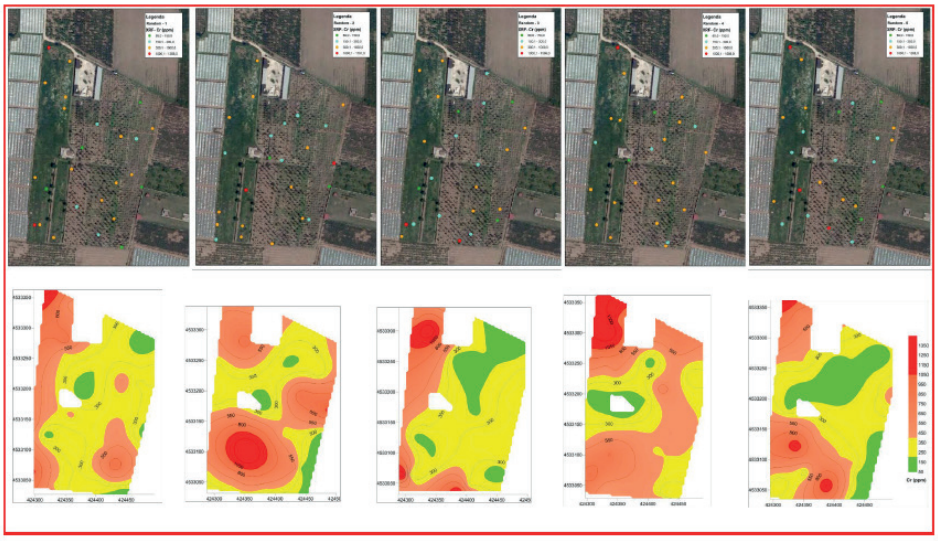


Figura 12. Cinque prove di mappatura, selezionando 25 punti random dal dataset completo di misure XRF

Figure 12. Five mapping tests obtained by selecting 25 random points from the full dataset of XRF measurements.

5.7.4. Integrazione di tutte le analisi dirette ed indirette per orientare un campionamento ragionato

Nonostante l'importanza delle mappature di rischio di superamento di valori soglia ottenute con la simulazione stocastica, è da rilevare che queste mappe nulla ci dicono della variazione di tutte le altre proprietà de suolo (ad es. proprietà fisiche e chimiche del suolo). Tutto questo rappresenta un problema per la buona caratterizzazione del sito e ancor più per orientare le fasi di bonifica che necessariamente richiedono la conoscenza sito specifica di ogni porzione del territorio da bonificare.

E' quindi necessario analizzare tutto l'insieme delle osservazioni fin qui prodotte per orientare un campionamento ragionato al fine di ottenere informazioni sulle principali proprietà chimiche e fisiche dei suoli. Tali elaborazioni possono essere effettuate con tecniche geostatistiche multivariate, elaborazioni GIS o semplicemente con una scelta ragionata (*free survey*).

Nel caso specifico, riportato in figura 13, sono state incrociate tutte le informazioni disponibili e sono state classificate le aree a maggiore omogeneità e quelle a maggiore eterogeneità. Su questa base sono stati individuati i siti altamente rappresentativi (puntini viola e verdi) ove procedere all'apertura di profili pedologici.

5.7.4. Direct and indirect analysis integration to support sound soil sampling

Despite the importance of the stochastic simulation approach in mapping the risk of exceeding threshold values for specific compounds, it should be noted that these maps say nothing about the spatial variation of all other soil properties (e.g. physical and chemical properties). This constitutes a problem, given that a good remediation project requires a complete characterization of the contaminated site. Therefore, the whole set of observations produced should be analysed in order to guide a rational sampling campaign in order to obtain all the soil chemical and physical properties required for a complete site characterization. The above analysis can be performed by using multivariate geostatistical techniques, GIS elaborations, or simply by following a rational choice (*free survey)* based on expert skills. In Figure 13 the approach followed in this specific study is illustrated. All the information available (maps) was crossed in a GIS environment in order to define the areas characterized respectively by greater homogeneity and greater heterogeneity. These areas were used to identify the highly representative sites in which to proceed with the opening of soil profiles (purple and green dots).

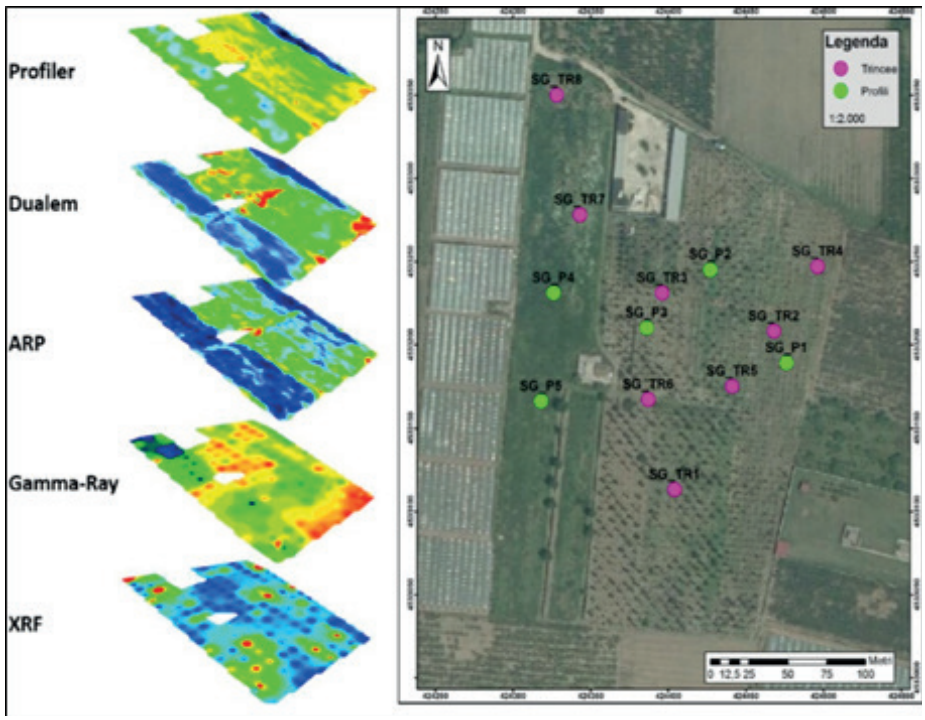


Figura 13. Insieme di mappe utilizzate per individuare i punti di maggiore interesse per il campionamento ragionato

Figure 13. Group of maps used to identify the sampling sites to perform a rational sampling campaign.

5.8. Conclusioni

Dai risultati ottenuti applicando l'insieme di metodologie di cui si è trattato in questo capitolo è emersa chiaramente la complessità geospaziale dei siti contaminati e la complessa distribuzione spaziale dei contaminanti, in gran parte dovute alla storia del sito e ai meccanismi di messa in posto dei contaminanti nel suolo. Noi riteniamo che in siti con problematiche di rischio ambientale non si possa prescindere dall'investigare tale complessità, soprattutto oggi che è possibile applicare numerose moderne tecnologie di misura, spesso basate sull'utilizzo di sensori miniaturizzati e utilizzabili direttamente nella realtà di campo. Abbiamo evidenziato la grande differenza dei risultati ottenuti applicando le metodologie utilizzate di prassi in Italia (D.M. 471/99) con la realtà di campo, e abbiamo anche mostrato come sia possibile e sostenibile utilizzare un approccio più performante che integri diversi sensori (rilievi indiretti e rilievi diretti) per raggiungere una conoscenza geospaziale dettagliata dei siti contaminati. L'approccio proposto si è rivelato molto più preciso degli attuali metodi di caratterizzazione dei siti contaminati e anche economicamente più sostenibile perché la conoscenza dettagliata della geografia della contaminazione di un sito consente di poter effettuare tecniche di bonifica sito specifiche e su areali meglio delimitati evitando di trattare suoli non contaminati.

Tali informazioni potranno poi orientare i campionamenti diretti (carotaggi per la determinazione delle concentrazioni di contaminati con le metodologie analitiche ufficiali, vedi cap. 6), in modo da ridurre il numero di campioni ed i costi analitici, aumentando nel contempo la precisione nella definizione dei problemi specifici di ciascun sito (es. volumi di terreno contaminato).

Infine riteniamo opportuno evidenziare la necessità di migliorare la normativa vigente. Infatti l'attuale formulazione non garantisce una buona caratterizzazione della complessità geospaziale dei siti contaminati e di conseguenza difficilmente può garantire un buon piano di bonifica.

5.8. Conclusion

From the results obtained by applying the set of methodologies which were discussed in this chapter, the geospatial complexity of contaminated sites along with the complex spatial distribution of contaminants appears evident. Both these features are largely due to the site history and the very local mechanisms through which contaminants reached the soil.

We believe that, in sites subject to high environmental risk, such site complexity should not be neglected, especially now that many modern measurement technologies (e.g. miniaturized sensors) are available for use, even directly in the field.

We highlighted the great difference in the results when applying standard methodologies - widely used in Italy (DM 471/99) - with site reality. We also showed that it is indeed possible and sustainable to use a much more powerful approach that integrates various sensors (indirect measurements and direct surveys) to attain detailed geospatial knowledge of contaminated sites. The proposed approach will be much more precise than current methods for the characterization of contaminated sites and also more economically sustainable because detailed knowledge of contamination geography enables site-specific remediation techniques to be performed and thus avoids treatment of non-contaminated soils.

The information obtained can then steer direct sampling (core samples to determine concentrations of contaminants with official analytical methods, see chap. 6), thus reducing the number of samples and costs of analysis, and increasing the accuracy in delineating site-specific problems (e.g. volume of soil contamination).

Finally, we should highlight the absolute need to improve existing legislation: the current formulation fails to guarantee proper characterization of the geospatial nature of contaminated sites and hence it is indeed very hard to ensure proper site restoration.

6. Monitoraggio chimico

6a. Analisi del contenuto totale di contaminanti nei suoli

S. Di Rosa, P. Adamo, C. Rocco

6a.1. Stato dell'arte

Nel secolo scorso si è assistito a un rilevante aumento dell'inquinamento globale, in parte dovuto all'elevata produzione e utilizzo di composti derivati dal petrolio che sono stati incautamente rilasciati nell'ambiente. Come conseguenza, numerosi contaminanti organici (per es. IPA) e metalli potenzialmente tossici (MPT) sono ora presenti nei suoli e nelle acque, rappresentando un serio problema ambientale (Fent, 2004). Nei siti agricoli, questo problema è maggiormente sentito poiché la contaminazione dei suoli rappresenta un serio rischio per la salute umana e animale dovuto al potenziale accumulo dei contaminanti nella catena alimentare (Wuana and Okieimen, 2011).

Le contaminazioni metalliche, a differenza delle contaminazioni organiche, non sono soggette a degradazione chimica o microbica, per cui persistono nei suoli per lungo tempo dopo la loro introduzione (Bolan et al., 2014). Tuttavia, a causa del loro carattere idrofobico, gli idrocarburi e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) vengono assorbiti rapidamente sulle particelle di suolo e sulla sostanza organica (Latimer e Zheng, 2003). Di conseguenza, i suoli sono il ricettacolo ultimo per la maggior parte dei contaminanti organici idrofobici. Il loro impatto negativo deriva principalmente dalla loro elevata tossicità (Máthé et al., 2012).

Ad acuire il problema delle contaminazioni c'è anche la questione dei rifiuti. Infatti, è stato stimato che nel 2008 i paesi dell'UE-27 hanno generato più di 2,6 miliardi di tonnellate di rifiuti, di cui 98 milioni di tonnellate erano definite pericolose (Eurostat 2011). Questa grande produzione di rifiuti ha inevitabilmente alimentato le pratiche di smaltimento dei rifiuti non sempre legali (come ad esempio la combustione). La Commissione europea, attraverso l' European Soil Data Centre, ha condotto un progetto per raccogliere i dati sui siti contaminati provenienti da istituzioni nazionali in Europa utilizzando le informazioni di European Environment Information and Observation Network for soil (EIONET-SOIL). È stato stimato che 2,5 milioni di siti sono potenzialmente contaminati e circa 342,000 sono stati già identificati come contaminati, inclusi migliaia di siti in Italia (Panagos et al., 2013).

Attualmente, in Italia come in diversi paesi europei, per determinare la contaminazione di un sito si fa riferimento al contenuto totale o "pseudototale" di MPT e di idrocarburi presenti nei suoli. Questo è considerato un valido strumento preliminare per stabilire il grado di contaminazione di un sito (Adamo e Zampella, 2008).

Sebbene il campionamento del suolo sia uno dei principali punti critici per l'identificazione del tipo di contaminante e della sua distribuzione spaziale nel suolo, il suo studio è rimasto indietro rispetto a tecniche di analisi del suolo (vedi capitoli 2 e 5). Secondo Markert (1995)

6. Chemical monitoring

6a. Analytical determination of soil contamination by potentially toxic metals and hydrocarbons

S. Di Rosa, P. Adamo, C. Rocco

6a.1. State of the art

The past century has seen a considerable increase in global pollution due to high levels of production and use of petroleum-derived compounds, with the resulting waste and emissions discharged into the environment. As a consequence, numerous organic contaminants (PAHs) and potentially toxic metals (PTMs) are now present in the soils and water of terrestrial sites, which represent a major environmental concern due to their potential accumulation in the food chain (Fent, 2004). In agricultural land, contamination of soil with PTMs represents a serious risk to human and animal health due to the potential accumulation of pollutants in the food chain (Wuana and Okieimen, 2011).

Unlike organic contaminants, metal(loid)s do not undergo microbial or chemical degradation, and the total concentration of these metal(loid)s persists for a long time after their introduction into soils (Bolan et al., 2014). However, due to their hydrophobic nature, hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental matrices are rapidly sorbed on particles and organic matter of soils (Latimer and Zheng, 2003). Consequently, soils are the ultimate repository for most hydrophobic organic contaminants. Their negative impact mainly results from their high toxicity (Máthé et al., 2012).

In addition to soil contamination, there is also the problem of waste disposal. Indeed, in 2008 the EU-27 countries generated more than 2.6 billion tonnes of waste, of which 98 million tonnes were hazardous (Eurostat 2011). This high production of solid waste inevitably feeds into illegal dumping and inappropriate practices (e.g. burning of agricultural residues). Recently, the European Commission, through the European Soil Data Centre, conducted a project to collect data on contaminated sites from national institutions in Europe using the European Environment Information and Observation Network for soil (EIONET-SOIL). There was estimated to be local soil contamination at 2.5 million potentially contaminated sites, of which about 342,000 have already been identified as contaminated, including several thousand in Italy (Panagos et al., 2013).

Currently, in Italy as well as in other European countries, a site is declared to be contaminated only on the basis of its total or "pseudototal" content of PTMs and hydrocarbons in soil. This is considered a valid preliminary instrument to establish the contamination degree in a site (Adamo and Zampella, 2008).

Although field soil sampling is a crucial step in the description of the type, patterns and spatial distribution of soil pollution, its study has lagged behind in relation to soil analysis techniques (see chapters 2 and 5). According to Markert (1995) the uncertainty arising

l'incertezza derivata dal campionamento rappresentativo del terreno è di gran lunga maggiore di quella dovuta al trattamento di pre-analisi e alla misurazione strumentale. Inoltre, non tutti i paesi dell'Unione Europea hanno linee guida standard imposte dalla legge o dei protocolli per il campionamento del suolo. Per questo molti paesi fanno riferimento alle linee guida ISO/DIS o ad altre linee guida suggerite da società scientifiche o di ricerca (Theocharopoulos et al., 2001).
La maggior parte delle linee guida richiedono la raccolta di campioni compositi piuttosto che di campioni puntuali, mentre alcuni preferiscono il campionamento di profili del suolo. L'attuale legislazione italiana (D.Lgs 152/06 integrato con D.M. 471/99) fornisce dei criteri indicativi, come la profondità di campionamento (0-1 m come terreno 'superficiale') e la densità di campionamento sulla base della dimensione totale dell'area di studio (<1 ha, almeno 5 campioni 1-5 ha, da 5 a 15 campioni, 5-25 ha, da 15 a 60 campioni). Queste indicazioni stanno diventando standard di riferimento nella caratterizzazione dei siti inquinati italiani senza alcuna distinzione circa l'uso del territorio.
Nel sistema agricolo, dove il suolo viene omogeneizzato tramite aratura, il mescolamento dei campioni discreti, presi da diversi punti del campo, per formare campioni compositi è una tecnica ampiamente applicata di campionamento del suolo. Il contenuto totale di MPT misurati sui campioni di terreno compositi è considerato rappresentativo dell'intera area. Tuttavia, se nel terreno ci sono forti gradienti orizzontali o verticali di concentrazione degli inquinanti, come nel caso di interramento di rifiuti, questo metodo di campionamento può far perdere informazioni importanti con una sottostima significativa del rischio posto dal contaminante (Correll, 2001).

6a.2. Procedura di campionamento

Nell'ambito del progetto è stato sviluppato un protocollo di campionamento basato su griglie a due livelli di risoluzione. Al primo livello, è stata definita una griglia regolare a bassa risoluzione 10x10 m. Al secondo livello, ogni gri-

from representative soil sampling is far greater than that linked to pre-analysis treatment and instrumental measurement. Moreover, not all European countries have standard soil sampling guidelines imposed by law nor similar soil sampling protocols. Some countries follow ISO/DIS guidelines, others soil sampling guidelines suggested by scientific societies or research institutions (Theocharopoulos et al., 2001). Most guidelines require the collection of composite instead of simple samples, while some prefer sampling soil profiles. The current Italian legislation (Law Decree 152/06 integrating the Ministerial Decree 471/99) provides only indicative criteria, such as sampling depth (0-1 m as 'superficial' soil) and sampling density based on the total size of the study area (<1 ha, at least 5 samples; 1-5 ha, 5 to 15 samples; 5-25 ha, 15 to 60 samples). These indications, far from taking full account of the complexity of soil pollution, are becoming the standard reference in characterizing polluted sites in Italy without any distinction about land use. In agricultural systems, where the soil is homogenised by ploughing, the bulking of discrete samples, taken from several points in field plots, to form composite samples is a widely applied soil sampling technique. The PTM total content measured on composite soil samples can be considered representative of the field plots sampled. Nevertheless, if there are strong horizontal or vertical gradients of pollutant concentrations in the soil, the compositing scheme may miss important information with a significant underestimation of the risk posed by the contaminant (Correll, 2001).

6a.2. Soil sampling procedures

In the framework of the project a soil sampling protocol based on a two-level grid resolution was defined. On the first level, each study area was divided into regular low-resolution 10×10 m grids (plots). On the second level, each grid plot was subdivided into nine high-resolution 3.33×3.33 m subplots. Discrete soil samples (DS) were taken from each 3.33×3.33 m subplot. Composite soil samples (CS) were made by bulking aliquots from the previously homogenised nine DS taken from each 10×10

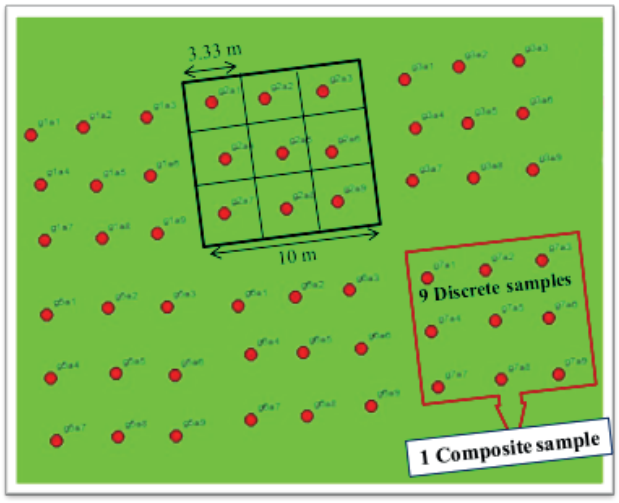


Figura 1. Strategia di campionamento

Figure 1. Soil sampling strategy

glia è stata suddivisa in nove sub-plots ad alta risoluzione 3.33x3.33 m. I campioni di suolo discreti erano presi da ciascun plot 3.33x3.33 m. I campioni di suolo compositi sono stati ottenuti mescolando un'aliquota dei campioni di suolo discreti come mostrato in figura 1. I campioni di suolo sono stati prelevati a 2 profondità 0–30 e 30–60 cm. Tutti i punti di prelievo sono stati georeferenziati.

6a.3. Procedure analitiche

Contenuto totale di metalli potenzialmente tossici (MPT)

L'analisi multielemento viene effettuata mediante spettrometria di emissione con plasma ottico induttivamente accoppiato ICP-OES (EPA 6010C) su campioni sottoposti a digestione acida in acqua regia (EPA 3051) ad elevata temperatura. La digestione acida è stata effettuata per campioni di 0.5 g di suolo in una soluzione di HCl e HNO_3 con rapporto 3:1.

Il contenuto di mercurio è stato determinato mediante decomposizione termica con Direct Mercury Analyzer DMA-80 Milestone Inc. (EPA 7473).

I valori di MPT misurati sono stati confrontati con il limite riferito ai suoli di siti a uso verde pubblico, privato e residenziale (Allegato 5, titolo V parte quarta colonna A) del D.Lgs. 152/06.

Contenuto totale di idrocarburi pesanti C >12

La determinazione del contenuto totale di C >12 è avvenuta tramite gascromatografia con rilevatore di fiamma GC/FID (UNI EN ISO 16703). I campioni di suolo sono stati estratti con una miscela di n-esano-acetone come previsto dal protocollo EPA.

I parametri analizzati e le relative soglie di contaminazione, fanno sempre riferimento al D.Lgs. 152/06.

Contenuto totale di idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Gli IPA sono stati estratti dai campioni di suolo utilizzando una miscela di cicloesano-acetone, come previsto dai metodi EPA 3550+3630C. La determinazione è avvenuta tramite gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa GC/MS (EPA 8270).

I parametri analizzati e le relative soglie di contaminazione, fanno sempre riferimento al D.Lgs. 152/06.

Controllo di qualità

Accuratezza e precisione del metodo analitico vengono valutate analizzando, parallelamente ai campioni, bianchi, repliche e materiale standard certificato. Generalmente l'accuratezza e la precisione si valutano attraverso il calcolo del recupero %, che confronta il valore certificato con quello analitico o della deviazione standard relativa (RSD, %), che viene calcolata considerando media e deviazione standard del valore analitico. In particolare, il metodo analitico è tanto più accurato e preciso se il valore di recupero % è prossimo a 100 % e la RSD inferiore o uguale a 10 %.

Nell'ambito del progetto Ecoremed, i calcoli per il controllo qualità sono stati effettuati sui risultati dell'analisi

m plot as shown in figure 1. Soil samples were collected at two depths 0–30 cm and 30– 60 cm. All sampling points were georeferenced.

6a.3. Analytical procedures

Total content of potentially toxic metals (PTMs)

Multi-elemental analysis of soil samples was carried out using inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy ICP-OES (EPA 6010C) after acid digestion in aqua regia (EPA 3051) at high temperature. Acid digestion was carried out on 0.5 g of soil samples in a HCl and HNO_3 solution (3:1 ratio). Mercury content was determined by thermal decomposition with a direct mercury analyzer (DMA-80, Milestone Inc.) (EPA 7473). All measured values of PTM content in soil were compared with the threshold limits referring to sites for public (parks etc.), private and residential use (Annex 5, Title V of the fourth column A) of Legislative Decree no. 152/06.

Total content of heavy hydrocarbons C >12

The total content of heavy hydrocarbons (C >12) was determined by gas-chromatography with a flame detector (GC/FID). Soil samples were extracted with a mixture of n-hexane-acetone as required by the UNI EN ISO 16703 protocol. All analysed parameters with their relative contamination thresholds always refer to Legislative Decree no. 152/06.

Total contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

Total contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were extracted from soil samples using a mixture of cyclohexane-acetone, as required by EPA methods 3550+3630C. The determination was made by gas-chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) (EPA 8270).

All analysed parameters with their relative contamination thresholds always refer to Legislative Decree no. 152/06.

Quality control

Accuracy and precision of the analytical method are evaluated by analyzing, in parallel with samples, controls, replicates and certified standard material. Generally, accuracy and precision are evaluated by calculating the recovery %, which compares the certified value with the analytical value or with the relative standard deviation (RSD, %), which is calculated as the ratio between standard deviation and average of the analytical values. The analytical method is much more accurate and precise if the recovery value is close to 100 % and the RSD does not exceed 10 %. Within the Ecoremed project, the calculations for quality control were carried out using CRM141R, ERMCC141, BCR700 and BCR701 certified standards, internal standards, replicates and controls.

Data analysis

For the various analytical procedures carried out on the soil samples (e.g., ICP-MS or GC-MS analysis), the concentrations of pollutants, generally expressed as mg

del contenuto elementare degli standard certificati, standard interni, repliche e bianchi.

Analisi dei dati

Attraverso le diverse procedure analitiche effettuate sui campioni di suolo (per esempio, ICP-MS o GC-MS), si ottengono valori di concentrazioni degli inquinanti, generalmente espresse come mg di inquinante su kg di campione, e calcolate sottraendo i valori dei bianchi analitici.

I dati ottenuti, prima di qualsiasi elaborazione statistica, vengono valutati sulla base dei limiti di rilevabilità strumentale (LOD), limiti di quantificazione (LOQ) e le informazioni ottenute attraverso il controllo di qualità (QC).

In linea generale, si tende ad escludere dall'analisi statistica del dato tutti i valori relativi ad un inquinante di cui non si hanno dati attendibili di QC e si tende a sostituire i valori di concentrazione inferiore al LOD con il valore del LOD/2.

Il tipo di elaborazione dei dati dipende essenzialmente dalla numerosità campionaria (da cui dipende la scelta di test parametrici e non parametrici) e dal tipo di informazione che si vuole ricavare. L'analisi statistica è finalizzata non solo a testare la significatività dei dati ma anche ad avere, appunto, informazioni di tipo qualitativo-descrittivo (ad esempio, come con l'analisi multivariata). Il calcolo delle medie delle repliche campionarie, deviazioni standard e altre elaborazione di statistica di base sono generalmente preliminari a qualsiasi ulteriore elaborazione più complessa, nonché a facilitare la rappresentazione grafica dei risultati.

6a.4. Il progetto ECOREMED

Nell'ambito del progetto ECOREMED, il monitoraggio di metalli potenzialmente tossici (MPT), idrocarburi pesanti (C>12) e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) è stato condotto prima, durante e dopo i processi di bio-fito-remediation in quattro siti pilota.

I siti pilota risiedono nei comuni di Giugliano-Fondo Zacaria (NA) di 1000 m^2, Trentola Ducenta-Fondo Bove (CE) di 3300 m^2, Teverola-Fondo comunale (CE) di 3300 m^2 e Villa Literno-Località Soglitelle (CE) 1600 m^2. In tutti i siti è stata condotta la valutazione del contenuto totale di MPT, C>12 e IPA.

Applicando le griglie di campionamento descritte nel paragrafo 6a2, nel sito pilota di Giugliano sono stati individuati 8 plot e 72 mini-plot; nel sito di Trentola Ducenta 28 plot e 252 mini-plot e nel sito di Teverola 12 plot e 108 mini-plot. In totale sono stati raccolti 960 campioni di suolo di cui 96 medio-compositi e 864 mini-plot.

Nel sito di Villa Literno, invece, sono stati prelevati 21 campioni discreti di suolo secondo una griglia 15x5 m, sempre alle due profondità 0-30 e 30-60 cm, per un totale di 42 campioni.

6a.5. Risultati e Conclusioni

Dall'analisi dei campioni dei quattro casi studio si è visto in primo luogo che i livelli di contaminazione erano più

of pollutant per kg of sample, were obtained.

All data, prior to any statistical elaboration, are valued on the basis of instrumental detection limits (LOD), limit of quantification (LOQ) and information obtained through quality control (QC, section 3.4). For each analyte the LOD and LOQ are characteristic of each instrument, and dependent on the analytical method and the calibration performed. As a general rule, all analyte values without reliable QC data, are excluded from the statistical analysis, and the concentration values below the LOQ are replaced with the value of LOQ/2.

The type of data processing essentially depends on the number of samples and on the type of information to be obtained. Statistical analysis aims to test the significance of the data as well as obtain information of a qualitative-descriptive type (for example, as with multivariate analysis). Calculation of the average of the sample replicates, standard deviations and other basic statistical elaborations are usually preliminary to any further more complex processing, and facilitate the graphical representation of the results.

It is good practice to compare the extracted bioavailable amounts using different methods with the quantities extracted in sequence and with the total content of PTMs in the soil. Indications on the different bioavailability of the soil metal contaminants may be obtained by calculating the ratio between the amount of PTMs extracted in EDTA and those extracted in ammonium nitrate. This ratio may be considered an index of bioavailability of PTMs.

6a.4. The ECOREMED project

In the ECOREMED project, the monitoring of potentially toxic metals (PTMs), heavy hydrocarbons (C>12) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was conducted before, during and after the bio-phyto-remediation treatments in four pilot sites.

The examined sites were in Giugliano-Fondo Zagaria (NA) – 1000 m^2, Trentola Ducenta-Fondo Bove (CE) – 3300 m^2, Teverola-Fondo comunale (CE) – 3300 m^2 and Villa Literno-Località Soglitelle (CE) - 1600 m^2. These sites were affected by legal (Teverola-authorized landfill) and illegal (Giugliano and Trentola Ducenta) waste dumping, as well as illegal hunting on the Villa Literno site. At all sites the total contents of PTMs, C>12 and PAHs were assessed.

Applying the sampling grids as described in section 2, in the Giugliano site 8 plots and 72 mini-plots were identified; in Trentola Ducenta 28 plots and 252 mini-plots and in Teverola 12 plots and 108 mini-plots. In all, 960 soil samples were collected, comprising 96 composite and 864 discrete soil samples. By contrast, in the Villa Literno site, 21 discrete soil samples were collected following a 15x5 m grid at two depths (0-30 and 30-60 cm), amounting to a total of 42 samples.

The results were reported in the following scientific paper: Monaco D., Riccio A., Chianese E., Adamo P., Di Rosa S., Fagnano M., 2015. *Chemicals characterization and spatial distribution of PAHs and heavy hydrocarbons in rural sites of Campania Region, South Italy*. Environ. Sci.

contenuti rispetto al grande clamore suscitato dai *media*.
Nel sito di Teverola è risultato che le comuni pratiche di smaltimento dei rifiuti sono state sufficienti a riportare il sito a valori al di sotto delle soglie di contaminazione previste dal D.Lgs 152/06.
Nei siti di Giugliano e Trentola Ducenta i principali contaminanti metallici risultavano essere Cu e Zn, mentre per gli IPA il Benzo(a)pirene risultava essere quello più presente.
Nel sito di Villa Literno erano principalmente presenti superamenti delle soglie di contaminazione per il Pb.
Pertanto i siti di Giugliano, Trentola e Villa Literno sono considerati potenzialmente contaminati. Per poterli definire contaminati, è necessario effettuare l'analisi di rischio ed in particolare verificare se questi contaminanti possono essere assorbiti dalla vegetazione coltivata e rappresentare un rischio indiretto per la salute dei consumatori (vedi capitoli 2, 6b, 7 e 14).
In tutti i siti analizzati (ad eccezione di Teverola) è stata riscontrata una elevata variabilità spaziale delle contaminazioni, sia metalliche sia organiche, visibili solamente quando si prendevano in considerazione i campioni discreti (griglia 3.33x3.33 m).

I risultati ottenuti sono stati riportati nei seguenti articoli scientifici:
Monaco D., Riccio A., Chianese E., Adamo P., Di Rosa S., Fagnano M., 2015. *Chemicals characterization and spatial distribution of PAHs and heavy hydrocarbons in rural sites of Campania Region, South Italy*. Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (19), 14993–15003.
Rocco C., Duro I., Di Rosa S., Fagnano M., Fiorentino N., Vetromile A., Adamo P., 2016. *Composite vs. discrete soil sampling in assessing soil pollution of agricultural sites affected by solid waste disposal*. Journal of Geochemical Exploration 170: 30-38.

Bibliografia
Adamo, P., Zampella, M., 2008. Chemical speciation to assess potentially toxic metals' (PTMs') bioavailability and geochemical forms in polluted soil. Environ. Geochem. 9, 175–215.

Correll, R.L., 2001. The use of composite sampling in contaminated site – a case study. Environ. Ecol. Stat. 8, 185–200.

Eurostat, 2011. Generation and treatment of waste in Europe 2008. Tech. Rep. 44, Environmental Data Centre on Waste, Germany

Fent K., 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. Toxicology 205:223–240

ISO (International Standardization Organization), 2002. Soil Quality-Sampling-Part 1: Guidance on the Design of Sampling Programmes. ISO 10381-1:2002. ISO, Geneva.

Latimer J.S., Zheng J., 2003. Sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In: Douben PET (ed) PAHs: an ecotoxicological perspective. Wiley,

Pollut. Res. 22 (19), 14993–15003.
Rocco C., Duro I., Di Rosa S., Fagnano M., Fiorentino N., Vetromile A., Adamo P., 2016. *Composite vs. discrete soil sampling in assessing soil pollution of agricultural sites affected by solid waste disposal*. Journal of Geochemical Exploration 170: 30-38.

6a.5. Results and Conclusions
In analysing the four study sites, we found no severe or diffuse soil contamination, contrary to information broadcast on the mass media. At the Teverola site, common waste disposal practices were sufficient to restore the site to values below the threshold limits of contamination as established by Law Decree 152/06.
At Giugliano and Trentola Ducenta, the main metal contaminants were Cu and Zn, whilst Benzo(a)pyrene was the most present PAH. At the Villa Literno site Pb exceeded the legal thresholds.
Therefore, the Giugliano, Trentola and Villa Literno sites are considered potentially contaminated. But, for these sites to be defined as contaminated, risk analysis has to be applied. In particular, the risk that such contaminants may be taken up by vegetation and represent an indirect risk for human health has to be assessed (see chapters 2, 6b, 7 and 14).
At all the sites analysed (except Teverola), a large dishomogeneity in the spatial distribution of soil contamination emerged on comparing data obtained at high- and low-resolution level (10x10 vs. 3.33x3.33 m) for both inorganic and organic contaminants.

References
Adamo, P., Zampella, M., 2008. Chemical speciation to assess potentially toxic metals' (PTMs') bioavailability and geochemical forms in polluted soil. Environ. Geochem. 9, 175–215.

Correll, R.L., 2001. The use of composite sampling in contaminated site – a case study. Environ. Ecol. Stat. 8, 185–200.

Eurostat, 2011. Generation and treatment of waste in Europe 2008. Tech. Rep. 44, Environmental Data Centre on Waste, Germany

Fent K., 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. Toxicology 205:223–240

ISO (International Standardization Organization), 2002. Soil Quality-Sampling-Part 1: Guidance on the Design of Sampling Programmes. ISO 10381-1:2002. ISO, Geneva.

Latimer J.S., Zheng J., 2003. Sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In: Douben PET (ed) PAHs: an ecotoxicological perspective. Wiley, Chichester, pp 9–23

Markert, B., 1995. Quality assurance of plant sampling and storage. In: Quevauviller, P. (Ed.), Quality Assurance in Environmental Monitoring Sampling and Sample Pretreatment. VCH Weinheim, New York, pp. 215–254.

Chichester, pp 9–23

Markert, B., 1995. Quality assurance of plant sampling and storage. In: Quevauviller, P. (Ed.), Quality Assurance in Environmental Monitoring Sampling and Sample Pretreatment. VCH Weinheim, New York, pp. 215–254.

Máthé I., Benedek T., Táncsics A., Palatinszky M., Lányi S., Márialigeti K., 2012. Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). Int Biodeterior Biodegrad 73:41–49

Panagos P., Van Liedekerke M., Yigini Y., Montanarella L., 2013. Contaminated sites in Europe: review of the current situation based on data collected through a European network. J Environ Public Health 2013, 158764. doi:10.1155/2013/158764

Theocharopoulos, S.P., Wagner, G., Sprengert, J., Mohr, M.-E., Desaules, A., Muntau, H., Christou, M., Quevauviller, P., 2001. European soil sampling guidelines for soil pollution studies. Sci. Total Environ. 264, 51–62.

UNI EN ISO 16703 (2011) Soil quality-determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography. European Standard. UNI Printing Office, Milan, Italy

US-EPA Method 8270 (2007) Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). United States Environmental Protection Agency, SW-846 manual. US Government Printing Office, Washington, DC

US-EPA Method 8440 (1996) Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrophotometry. United States Environmental Protection Agency, SW-846 manual. US Government Printing Office, Washington, DC

Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. Int. Sch. Res. Netw. Ecol. 2011, 1–20.

Máthé I., Benedek T., Táncsics A., Palatinszky M., Lányi S., Márialigeti K., 2012. Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). Int Biodeterior Biodegrad 73:41–49

Panagos P., Van Liedekerke M., Yigini Y., Montanarella L., 2013. Contaminated sites in Europe: review of the current situation based on data collected through a European network. J Environ Public Health 2013, 158764. doi:10.1155/2013/158764

Theocharopoulos, S.P., Wagner, G., Sprengert, J., Mohr, M.-E., Desaules, A., Muntau, H., Christou, M., Quevauviller, P., 2001. European soil sampling guidelines for soil pollution studies. Sci. Total Environ. 264, 51–62.

UNI EN ISO 16703 (2011) Soil quality-determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography. European Standard. UNI Printing Office, Milan, Italy

US-EPA Method 8270 (2007) Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). United States Environmental Protection Agency, SW-846 manual. US Government Printing Office, Washington, DC

US-EPA Method 8440 (1996) Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrophotometry. United States Environmental Protection Agency, SW-846 manual. US Government Printing Office, Washington, DC

Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. Int. Sch. Res. Netw. Ecol. 2011, 1–20.

6b. Analisi della biodisponibilità di metalli potenzialmente tossici

P. Adamo, D. Agrelli, A. Giandonato Caporale, C. Rocco

6b.1. Stato dell'arte

La contaminazione del suolo da parte di metalli potenzialmente tossici (MPT) pone seri rischi per il biota e la salute dell'uomo. A basse concentrazioni alcuni MPT (per es. rame, cromo, molibdeno, nickel, selenio e zinco) sono essenziali per il normale funzionamento e riproduzione di microrganismi, piante e animali (incluso l'uomo). Tuttavia, a elevate concentrazioni questi stessi elementi possono risultare tossici per piante e animali. Tossicità che per i MPT non essenziali (per es. arsenico, piombo e mercurio) si manifesta anche a basse concentrazioni. La tossicità non è necessariamente associata all'origine antropogenica dei MPT. Anche concentrazioni naturalmente elevate possono causare effetti tossici, come si può osservare su suoli che originano da rocce serpentinitiche, dove si osservano fenomeni di adattamento del biota alle elevate concentrazioni.

I MPT, comunemente definiti metalli pesanti o metalli in traccia, di origine naturale e antropica, sono presenti nel suolo in forme diverse che ne condizionano la mobilità, la tossicità potenziale e la biodisponibilità (Adamo et al., 2017). Nel suolo i MPT sono presenti: (a) liberi in soluzione, (b) adsorbiti sulle superfici degli scambiatori, (c) combinati nei costituenti solidi minerali ed organici. In generale, il contenuto totale di ciascun elemento presente è distribuito tra le differenti forme in proporzioni che variano con la natura e le quantità totali degli elementi chimici coinvolti, le proprietà e le modalità di gestione del suolo, il tipo di vegetazione, le condizioni climatiche ed il tempo. La conoscenza delle proprietà chimico-fisiche degli elementi e delle caratteristiche della pedosfera costituisce un valido supporto nell'analisi del destino dei MPT nel suolo. I MPT liberi in soluzione rivestono nel suolo un notevole significato ecologico in quanto mobili e prontamente biodisponibili. La maggior parte di essi, presenti come ioni semplici o complessi solubili, rappresentano nei suoli non contaminati una piccola percentuale della quantità totale. Al contrario nei suoli contaminati tale percentuale può assumere valori elevati.

In considerazione del fatto che rappresentano la frazione più pericolosa per la salute e per l'ambiente, notevole è l'interesse rivolto dalla comunità scientifica verso la definizione e la misura della quantità biodisponibile di MPT nel suolo. Tuttavia, mentre è semplice definire la biodisponibilità, notevoli risultano le difficoltà con cui ci si confronta quando si tenta di indicarne le modalità di misura. La quantità biodisponibile viene, infatti, considerata la frazione della quantità totale di metallo presente nel suolo disponibile ad essere utilizzata dagli organismi viventi. Le modalità di interazione e di trasferimento dei metalli dal suolo agli organismi viventi variano, tuttavia, in modo significativo a seconda che siano coinvolti organismi vegetali, organismi animali o l'uomo. Per la misura della biodisponibilità è, pertanto, cruciale definire l'organismo target.

I metodi analitici comunemente impiegati per l'estra-

6b. Chemical monitoring of the bioavailability of potentially toxic metals

P. Adamo, D. Agrelli, A. Giandonato Caporale, C. Rocco

6b.1 State of the art

Contamination of soil with potentially toxic metals (PTMs) poses serious risks for biota and human health. At low concentrations some PTMs (e.g., Cu, Cr, Mo, Ni, Se and Zn) are essential to healthy functioning and reproduction of microorganisms, plants and animals (including humans). However, at high concentrations these same essential elements may become toxic to plants and animals. For non-essential PTMs (e.g. As, Pb and Hg), toxicity is also manifested at low concentrations. Toxicity is not necessarily associated with the anthropogenic origin of PTMs; also naturally high concentrations can cause toxic effects, as can be observed in soils originating from serpentinite rocks, and lead to natural adaptation of the biota to these high concentrations. The PTMs, commonly known as heavy metals or trace metals, of natural and anthropic origin, are present in the soil in different forms that affect their mobility, potential toxicity and bioavailability (Adamo *et al*., 2017). In soil the PTMs are: (a) free in solution, (b) adsorbed on the exchange surfaces, and (c) combined in mineral and organic solid constituents. In general, the total content of each element is distributed between the different forms in proportions depending on the nature and total quantities of the chemical elements involved, the soil properties and management, the type of vegetation, the weather conditions and time. Knowledge of the chemical and physical properties of the elements and characteristics of the pedosphere constitutes a valid support in analysing the fate of the PTMs in the soil. PTMs free in solution play a significant ecological significance in the soil since they are mobile and readily bioavailable. Present as simple ions or soluble complexes, most in non-contaminated soils represent a small percentage of the total amount. Conversely in contaminated soils this percentage can reach high values.

Given that they represent the most dangerous fraction for health and the environment, considerable interest is devoted by the scientific community to defining and measuring the bioavailable amount of PTMs in soil. However, while it is easy to define bioavailability, the difficulties when trying to indicate measurement modes are considerable. The bioavailable amount is considered to be the fraction of the total metals occurring in the soil, available for use by living organisms. The modalities of interaction and metal transfer from soil to living organisms vary significantly depending on whether plants, animals or humans are involved. For the measurement of bioavailability it is therefore crucial to define the target organism.

The analytical methods commonly used for extracting from the soil the amount of a nutrient or PTM available for plant nutrition are based on: (i) the use of chemical reagents able to extract from the soil the fraction of the total content of an element which, on the basis of field experiments, is significantly correlated with the amount

zione dal suolo della quantità di un nutriente o di un MPT disponibile per la nutrizione vegetale si basano o (i) sull'impiego di reattivi chimici capaci di estrarre dal suolo quella frazione del contenuto totale di un elemento che sulla base di esperimenti di pieno campo risulta significativamente correlata con la quantità disponibile per la pianta (*functionally defined speciation*) o (ii) sull'impiego di reattivi chimici classificati sulla base della forma di metallo che sono capaci di separare dal suolo (*operationally defined speciation*). In entrambi i casi, nell'analisi e nell'interpretazione dei risultati, è sempre indispensabile considerare che gran parte degli estraenti disponibili può risultare molto meno selettiva di quanto si ipotizzi e, conseguentemente, che le diverse forme di metalli pesanti estratte possono risultare molto meno specifiche di quanto previsto e costituite, piuttosto, da un insieme di forme differenti.

I reattivi utilizzati per estrarre dal suolo quella frazione del contenuto totale di un elemento che sulla base di esperimenti di pieno campo risulta significativamente correlata con la quantità disponibile per la pianta sono principalmente soluzioni diluite di acidi minerali o organici (per es. acido acetico, HCl, $HCl+HNO_3$), agenti chelanti (per es. Na_2EDTA, EDTA, DTPA [+TEA], acido citrico, NH_4-citrato), sali tamponanti (per es. CH_3COONH_4), sali neutri (per es. $CaCl_2$, $MgCl_2$, NH_4Cl, $NaNO_3$, NH_4NO_3). Le estrazioni chimiche sequenziali sono comunemente usate in studi ambientali per il frazionamento dei MPT tra le varie forme geochimiche in cui essi potrebbero esistere nel suolo. Quest'approccio operativo è basato sull'utilizzo di una serie di reagenti selezionati per la loro capacità di reagire con le diverse principali componenti del suolo e di rilasciare i metalli associati. Per armonizzare le procedure di estrazione sequenziale tra gli stati membri dell'UE, il "Measurement and Testing Programme" – MAT (precedentemente BRC) – della Commissione Europea, ha proposto due protocolli di estrazione sequenziale, per i quali sono stati preparati e resi disponibili anche i materiali di riferimento certificati per i metalli estraibili (sedimento CRM 601 e sedimento CRM 701).

L'integrazione dei risultati ottenuti mediante estrazioni singole e sequenziali consente di migliorare la conoscenza della distribuzione dei MPT nel suolo e la loro disponibilità ad essere assorbiti dalle piante. Il confronto dei dati chimici con le quantità effettivamente assorbite dai vegetali coltivati sui suoli studiati potrebbe validare i metodi chimici nei differenti contesti pedoclimatici (vedi capitoli 7, 14).

6b.2. Protocollo analitico impiegato nel progetto ECOREMED

La conoscenza della biodisponibilità dei MPT si rende necessaria per una valutazione scientificamente fondata della qualità dei suoli agricoli, attualmente basata su dati relativi ai contenuti totali, che non sono direttamente correlati con l'effettivo assorbimento da parte delle piante.

Nelle aree definite potenzialmente contaminate sulla base dei contenuti totali di MPT, le quantità biodisponibili e che potrebbero accumularsi negli organismi vegetali (e quindi atte ad entrare nella catena alimentare ed incidere

available to the plant (*functionally defined speciation*); (ii) the use of chemical reagents classified on the basis of the form of metal that can be separated from the soil (*operationally defined speciation*). In both cases, the analysis and interpretation of the results must consider that a large part of the available extractants can be much less selective than assumed and, consequently, that the different forms of extracted heavy metals may be much less specific than expected and constituted by a set of different forms.

The reagents used to extract from the soil the fraction of the total content of an element which, on the basis of field experiments, is significantly correlated with the amount available to plants, are mainly diluted solutions of mineral and organic acids (e.g., acetic acid, HCl, $HCl+HNO_3$), chelating agents (e.g., Na_2EDTA, EDTA, DTPA [+TEA], citric acid, NH_4-citrate), buffered salts (e.g., CH_3COONH_4), and neutral salts (e.g., $CaCl_2$, $MgCl_2$, NH_4Cl, $NaNO_3$, NH_4NO_3). Sequential chemical extractions have been commonly used in environmental studies for fractionation of PTMs among the various geochemical forms in which they might exist in soil. This operational approach is based on the use of a series of reagents selected for their ability to react with the different major soil components and release associated metals. In order to harmonise sequential extraction procedures between EU Member States, the *Measurements and Testing Programme* – MAT (formerly BCR) - of the European Commission has proposed two sequential extraction protocols, for which certified reference materials for the extractable metals were prepared and made available (sediment CRM 601 and sediment CRM 701).

The integration of the results obtained by means of single and sequential extractions improves the knowledge of the distribution of the PTMs in the soil, and of their availability to be absorbed by plants. Comparison of chemical data with the amounts of PTMs effectively absorbed by plants grown on the studied soils could validate the chemical methods in different pedoclimatic contexts (see chapters 7, 14).

6b.2. Analytical protocol applied in the ECOREMED project

Currently, in Italy, agricultural soil pollution standards are based on total or pseudototal PTM content. It represents an excellent criterion to define the extent of metal contamination in soil, but it is of little value for the prediction of ecological impact. In agricultural soils, knowledge of PTM bioavailability is also required for a scientifically based evaluation since total metal content is not directly correlated to the effective absorption by plants.

In the ECOREMED project study areas, defined as potentially contaminated on the basis of total PTM contents in soil, PTM bioavailable amounts and PTM plant uptake (hence the risk of PTMs entering the food chain and affecting human health) were assessed applying an analytical protocol based on (i) single reagents, commonly used for the determination of PTMs

sulla salute umana), sono state accertate applicando un protocollo analitico basato sull'impiego (i) sia di reattivi singoli comunemente utilizzati per l'estrazione dal suolo del contenuto di MPT disponibile per la pianta [nitrato di ammonio 1 mol L^{-1} (metodo ISO 19730:2008 E) e EDTA 0,05 mol L^{-1}, pH 7 (Rauret *et al.*, 2001)]; (ii) sia trattando in successione un campione di suolo con differenti reattivi capaci di estrarre diverse specie chimiche e mineralogiche dei metalli presenti [Procedura di estrazioni chimiche sequenziali BRC - Rauret *et al*., 1999]. Al fine di una corretta interpretazione dei dati analitici i campioni di suolo oggetto di studio sono stati inoltre caratterizzati chimicamente. Infatti, oltre che dalla 'natura chimica' degli elementi, lo stato dei MPT nel suolo dipende anche dalle caratteristiche della pedosfera. Tra queste, particolarmente determinanti sono il pH, il contenuto di sostanza organica, il contenuto di minerali argillosi, la presenza di ossidi di Fe e Mn ed il potenziale redox. Importanti risultano anche la tessitura, la capacità di scambio cationico, la presenza di carbonati, il contenuto idrico e la temperatura.
Laddove i contenuti di Cromo totale erano particolarmente elevati si è proceduto alla determinazione del contenuto di Cromo esavalente nel suolo. Per una più completa caratterizzazione dello stato dei metalli nel sistema suolo, i metodi chimici potranno essere combinati con metodi diretti di speciazione, che richiedono l'impiego di metodologie analitiche e strumentali di elevata selettività e sensibilità. Tra questi, la diffrattometria a raggi-X (XRD), la microscopia elettronica a scansione accoppiata all'uso della microsonda (SEM/EDS/WDS) e la spettroscopia FT-IR sono i più comunemente impiegati.

6b.3. Procedure analitiche

Estrazione in nitrato di ammonio 1 mol L^{-1} (metodo ISO 19730:2008 E)

L'estrazione con nitrato di ammonio 1 mol L^{-1} viene comunemente impiegata per determinare il contenuto prontamente solubile, e pertanto prontamente biodisponibile, dei MPT nel suolo (Gryschko *et al.*, 2005). In Germania, il metodo è riconosciuto come *official standard* (DIN 19730, 1997) e viene impiegato per valutare il rischio di trasferimento di MPT dal suolo alla pianta nella German Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance (BBodSchV, 1999).

Procedimento

Dieci grammi di suolo setacciato a 2 mm, posti in tubi da centrifuga da 50 mL vengono estratti con 25 mL di soluzione 1 mol L^{-1} di nitrato di ammonio (m/v = 1:2,5) per 120 minuti a 20±2°C su un agitatore orbitale orizzontale a 150 rpm (rotazioni per minuto). L'estratto viene separato dal residuo solido per centrifugazione a 1000 giri min^{-1} per 10 min e il surnatante viene filtrato (mediante siringa dotata di un filtro monouso da 0,45 μm) in un contenitore di polietilene e poi conservato a 4°C in frigorifero prima di essere analizzato. Il contenuto di metalli negli estratti viene misurato mediante tecniche spettroscopiche monoelementari (FAAS o GFAAS) o multielementari (ICP-OES, ICP-MS).

content in soil available to plants [ammonium nitrate 1 mol L^{-1} (ISO 19730:2008 E) and EDTA 0.05 mol L^{-1}, pH 7 (Rauret *et al.*, 2001)]; (ii) sequential chemical extractions (BRC procedure - Rauret *et al*., 1999). The studied soils were also physically and chemically characterised in order to improve interpretation of the analytical data. Indeed, in addition to the chemical nature of the elements, the status of the PTMs in soil strongly depends on the pedosphere characteristics. Among these, the pH, organic matter, clay minerals and Fe/Mn oxide contents, and the redox potential are crucial. Texture, cation exchange capacity, the presence of carbonates, water content and temperature are also important.
When the content of total chromium was particularly high, the hexavalent chromium content in the soil was also determined. For a more complete characterization of the state of the metals in the soil, the chemical methods can be combined with direct methods of speciation, which require the use of analytical and instrumental methodologies of high selectivity and sensitivity. Among these, X-ray diffractometry (XRD), scanning electron microscopy combined with the use of microprobes (SEM/EDS/WDS), and FT-IR spectroscopy are the most commonly used.

6b.3. Analytical procedures

Extraction by 1 mol L^{-1} ammonium nitrate (procedure ISO 19730:2008 E)

Extraction with 1 mol L^{-1} ammonium nitrate is commonly used to determine the readily soluble and bioavailable content of PTMs in soil (Gryschko *et al.*, 2005). In Germany, this procedure is recognized as official standard (DIN 19730, 1997) and is used to assess the risk of transfer of PTMs from the soil to plants in the German Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance (BBodSchV, 1999).

Procedure

Ten grams of 2 mm sieved soil, weighed in a 50 mL centrifuge tube, are extracted by 25 mL of 1 mol L^{-1} ammonium nitrate (m/v = 1:2.5) for 120 minutes at 20±2°C on an end-over-end shaker at 150 rpm (rotations per minute). The extract is separated from the solid residue by centrifugation at 1000 rpm for 10 min and the supernatant is filtered (using a syringe equipped with a 0.45 μm disposable filter) in a polyethylene container and then stored at 4°C in the fridge prior to being analysed. The metal contents in the extracts are measured by mono-element (FAAS or GFAAS) or multi-element (ICP-OES, ICP-MS) spectroscopic techniques.

Extraction by 0.05 mol L^{-1}EDTA at pH 7 (Rauret et al., 2001)

Soluble compounds with good complexing properties, such as EDTA, remove from the soil the PTMs specifically adsorbed on the surfaces of solid mineral constituents and bound in organic or organo-metal complexes (i.e. the potentially bioavailable fractions), in addition to the soluble and easily exchangeable fractions. The large number of procedures using EDTA for the extraction of bioavailable fractions of PTMs from soil prompted the

Estrazione in EDTA 0,05 mol L^{-1}, pH 7 (Rauret et al., 2001)

Composti solubili con marcate proprietà complessanti, come l'EDTA, rimuovono dal suolo, oltre ai MPT presenti nella soluzione circolante e le forme facilmente scambiabili (forme prontamente disponibili), anche i MPT adsorbiti specificamente sulle superfici dei costituenti solidi minerali e fissati in complessi organici o organo-metallici, ovvero le forme potenzialmente biodisponibili. Il numero elevato di metodi che utilizzano l'EDTA per l'estrazione della frazione biodisponibile di MPT dal suolo ha spinto il *Measurement and Testing Programme* della Commissione Europea, a proporre una procedura armonizzata, basata sull'impiego di soluzione di EDTA 0,05 mol l^{-1} (pH 7,0) (Rauret *et al.*, 2001) e a produrre materiali di riferimento certificati (BCR-700, BCR-483 e BCR-484) per accertare la qualità dei dati prodotti con l'impiego di questa procedure di estrazione.

Procedimento

Quattro grammi di suolo setacciato a 2 mm, posti in tubi da centrifuga da 50 mL, vengono estratti con 40 mL di soluzione 0,05 mol L^{-1} di acido etilendiamminotetracetico (EDTA; m/v = 1:10) per 60 minuti a 20±2°C su un agitatore orbitale orizzontale a 150 giri min^{-1} (Rauret *et al.*, 2001). L'estratto viene separato dal residuo solido per centrifugazione a 3000 giri min^{-1} per 10 min e il surnatante viene filtrato (mediante siringa dotata di un filtro monouso da 0,45 μm) in un contenitore di polietilene e poi conservato a 4°C in frigorifero prima di essere analizzato. Il contenuto di metalli negli estratti viene misurato mediante tecniche spettroscopiche monoelementari (FAAS o GFAAS) o multielementari (ICP-OES, ICP-MS).

Estrazioni chimiche sequenziali

Lo schema di estrazioni chimiche sequenziali selezionata è quella a 4 *steps* proposta e standardizzata dall'European Community Bureau of Reference (Rauret *et al.*, 1999). Essa prevede l'impiego in sequenza dei reattivi: acido acetico 0,11 mol L^{-1}, idrossilammina cloridrato 0,5 mol L^{-1}, perossido d'idrogeno/ammonio acetato 1 mol L^{-1}, acido cloridrico/acido nitrico. Le presunte frazioni geochimiche di MPT estratte in sequenza sono: solubili, scambiabili ed associate a carbonati, associate a ossidi amorfi di Fe e Mn, legate alla sostanza organica e solfuri, costituenti di minerali non-silicei.

Procedimento

Quaranta mL di soluzione 0,11 mol L^{-1} di acido acetico vengono aggiunti ad 1 g di suolo setacciato a 2 mm (m/v = 1:40), in un tubo da centrifuga da 50 mL, posto successivamente ad agitare per 16 ore a 20±5°C su un agitatore orbitale orizzontale a 150 rpm, in modo da estrarre la frazione labile (*step* 1), costituita da metalli scambiabili e legati ai carbonati. È la frazione più debolmente trattenuta dal suolo e, quindi, quella più pericolosa per l'ambiente. L'estratto viene separato dal residuo solido per centrifugazione a 3000 rpm per 20 min e il surnatante viene filtrato (mediante siringa dotata di un filtro monouso da 0,45 μm) in un contenitore di polietilene e poi conservato a 4°C in frigorifero prima di essere analizzato. Il contenuto di metalli negli estratti viene misurato mediante tecniche spettroscopiche monoelementari (FAAS o GFAAS) o multielementari (ICP-OES, ICP-MS).

Measurement and Testing Programme of the European Commission to propose a harmonised procedure, based on the use of 0.05 mol L^{-1} EDTA at pH 7.0 (Rauret *et al.*, 2001), as well as to produce certified reference materials (BCR-700, BCR-483 and BCR-484) aiming to ensure the quality of data obtained by this extraction procedure.

Procedure

Four grams of 2 mm sieved soil, weighed in a 50 mL centrifuge tube, are extracted with 40 mL of 0.05 mol L^{-1} ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; m/v = 1:10) for 60 minutes at 20±2°C on an end-over-end shaker at 150 rpm (Rauret *et al.*, 2001). The extract is separated from the solid residue by centrifugation at 1000 rpm for 10 min and the supernatant is filtered (using a syringe equipped with a 0.45 μm disposable filter) in a polyethylene container and then stored at 4°C in the fridge prior to being analysed. The metal contents in the extracts are measured by mono-element (FAAS or GFAAS) or multi-element (ICP-OES, ICP-MS) spectroscopic techniques.

Sequential chemical extraction procedure

The applied sequential chemical extraction procedure is the 4-step proposed and standardised by the European Community Bureau of Reference (Rauret *et al.*, 1999). It involves the use of reagents in sequence: 0.11 mol L^{-1} acetic acid, 0.5 mol L^{-1} hydroxylamine hydrochloride, hydrogen peroxide/1 mol L^{-1} ammonium acetate and hydrochloric acid/nitric acid. The presumed geochemical fractions of PTMs extracted in sequence are: soluble, exchangeable and associated to carbonates, associated to amorphous Fe and Mn oxides, bound to organic matter and sulphides, and occluded in non-siliceous minerals.

Procedure

Forty mL of 0.11 mol L^{-1} acetic acid are added to 1 g of 2 mm sieved soil (m/v = 1:40) in a 50 mL centrifuge tube, then kept to shake for 16 h at 20±5 °C (overnight) on an end-over-end shaker, in order to extract the acid-soluble fraction (step 1) consisting of exchangeable metals and fraction bound to carbonates. It is the most labile metal fraction in the soil and hence the most dangerous for the environment. The extract is separated from the solid residue by centrifugation at 3000 rpm for 20 min and the supernatant is filtered (by syringe, equipped with a 0.45 µm disposable filter) into a polyethylene container and then stored at 4°C in a fridge prior to being analysed. The soil residue is washed by adding 20 mL of distilled water, shaken for 15 min on an end-over-end shaker and centrifuged for 20 min at 3000 rpm, discarding the supernatant. Forty mL of 0.5 mol L^{-1} hydroxylammonium chloride are then added to the soil residue to extract by shaking for 16 h at 20±5 °C (overnight) on an end-over-end shaker, the reducible phase (step 2) consisting of metals bound to Fe and Mn oxides. The separation, filtration and storage of 2^{nd}-step extract, as well as soil residue washing, are performed as described above (Step 1). Thereafter, the soil residue is treated with suitable addition of 8.8 M H_2O_2 at 85 °C until no foaming occurs. This treatment aims to oxidize the organic matter and release bonded metals. To recover these metals and

servato a 4°C in frigorifero prima di essere analizzato. Il suolo residuo viene lavato mediante l'aggiunta di 20 mL di acqua deionizzata, agitato per 15 min su un agitatore orbitale orizzontale a 150 rpm e centrifugato per 20 min a 3000 rpm, con scarto finale del surnatante. Successivamente, 40 mL di soluzione 0,5 mol L^{-1} di idrossilammina cloridrato vengono aggiunti al suolo residuo per estrarre, dopo agitazione per 16 ore a 20±5°C su agitatore orbitale orizzontale a 150 rpm, la frazione riducibile (*step* 2), costituita da metalli associati ad ossidi di Fe e Mn. La separazione, la filtrazione e la conservazione dell'estratto dello *step* 2, così come il lavaggio del suolo residuo, vengono effettuati con la stessa modalità descritta in precedenza (*step* 1). Successivamente, il suolo residuo viene trattato a caldo con aggiunte successive di H_2O_2 8,8 mol L^{-1} fino ad assenza di schiumeggiamento. Questo trattamento ha lo scopo di ossidare la sostanza organica e rilasciare i metalli ad essa associati. Dopodiché, per recuperare tali metalli ed evitare che precipitino o vengano riadsorbiti dal campione, 40 mL di soluzione 1 mol L^{-1} di acetato di ammonio vengono aggiunti al suolo residuo. Dopo agitazione per 16 ore a 20±5°C su agitatore orbitale orizzontale a 150 giri min^{-1}, si ottiene la frazione ossidabile (*step* 3), rappresentata dai metalli associati a sostanza organica e, nel caso fossero presenti, a solfuri. La separazione, la filtrazione e la conservazione dell'estratto dello *step* 3, così come il lavaggio del suolo residuo, vengono effettuati con la stessa modalità descritta in precedenza (*step* 1). Il contenuto di metalli nel residuo (*step* 4) viene poi determinato trattando il suolo residuo con acqua regia (3:1, v/v, HCl to HNO_3). I metalli contenuti nel residuo sono prevalentemente incorporati nelle strutture cristalline di minerali non silicei. Ai fini di un controllo della qualità dei dati, è consigliabile che la somma dei contenuti di MPT estratti mediante i 4 *steps* della procedura sequenziale (totale cumulato) non differisca per più del 20% dal totale di MPT dello stesso campione di suolo determinato in una sola volta (totale unico).
Il contenuto di metalli in tutti gli estratti viene successivamente misurato mediante tecniche spettroscopiche monoelementari (FAAS o GFAAS) o multielementari (ICP-OES, ICP-MS).

Determinazione del cromo esavalente nel suolo

La mobilità e la biodisponibilità del cromo nel suolo sono particolarmente influenzate dalle sue forme chimiche: esavalente, Cr(VI), e trivalente, Cr(III). Nel suolo, le due forme Cr(VI) e Cr(III) sono in equilibrio tra loro ma hanno differenti proprietà e tossicità: i composti del Cr(VI) sono molto più solubili, mobili, biodisponibili e tossici rispetto ai composti che contengono Cr(III). Nel suolo, il Cr(VI) è molto reattivo e viene facilmente ridotto a Cr(III) da agenti riducenti come la sostanza organica, il ferro ferroso, i solfuri; il Cr(III) può essere ossidato a Cr(VI) solo da ossidi di manganese dopo mobilizzazione a seguito di formazione di complessi organici solubili (Barlett, 1991; Avudainayagam *et al.*, 2003); pertanto, l'equilibrio tra le due forme di cromo è fortemente spostato verso la forma trivalente. Comunque, in suoli con elevati contenuti di cromo totale, una conoscenza dettagliata dei livelli di Cr(III) e Cr(VI) permette di valutare

prevent their precipitation or re-adsorption by the soil sample, 40 mL of 1 mol L^{-1} ammonium acetate are then added to the soil residue. After shaking for 16 h at 20±5 °C (overnight) on an end-over-end shaker, the oxidizable phase (step 3) is extracted, representing the amount of metal bound to organic matter and, if present, in the form of sulphides. The separation, filtration and storage of 3rd-step extract, as well as soil residue washing, are performed as described above (Step 1). The metal contents in the soil residue (step 4) are then determined by treating the residual soil with *aqua regia* (3:1, v/v, HCl to HNO_3). The metals present in the residual phase are mainly occluded in the crystalline structures of non-siliceous minerals. For checking the quality of data, it is recommended that the sum of the PTM contents extracted by the four steps of the sequential procedure (cumulative total) does not differ by more than 20% from the total PTM contents extracted by single procedure (single total) from the same sample. The metal contents in the extracts are measured by mono-element (FAAS or GFAAS) or multi-element (ICP-OES, ICP-MS) spectroscopic techniques.

Determination of hexavalent chromium in the soil

The mobility and bioavailability of chromium in the soil are particularly influenced by its chemical forms: hexavalent, Cr(VI), and trivalent, Cr (III). In the soil, the two forms, Cr(VI) and Cr(III), are in dynamic equilibrium, but have different properties and toxicity: the Cr(VI) compounds are much more soluble, mobile, bioavailable and toxic compared to compounds containing Cr(III). In the soil, Cr(VI) is highly reactive and is easily reduced to Cr(III) by agents such as organic matter, ferrous iron and sulphides; Cr(III) can be oxidized to Cr(VI) only by manganese oxides after mobilization following the formation of soluble organic complexes (Barlett, 1991; Avudainayagam *et al.*, 2003). Therefore, the equilibrium between the two forms of chromium is strongly shifted to the trivalent form. However, in soils with a high content of total chromium, detailed knowledge of the levels of Cr(III) and Cr(VI) allows the toxicological effects, chemical transformations, mobility and bioavailability of this metal to be correctly evaluated.

Procedure

The determination of hexavalent chromium content in soil is generally conducted using extraction method EPA 3060 A, which consists in soil extraction in a strongly alkaline medium at 90 °C for one hour, combined with method EPA 7196 A or EPA 7199; the former consists in determining Cr(VI) in the extract by means of a specific colorimetric reaction between Cr(VI) and diphenylcarbazide in acidic environment, and spectrophotometric measurement of the coloured Cr(III)-diphenylcarbazone complex at 540 nm; the latter consists in a step of extract purification on an appropriate chromatographic column and pre-column, post-column colorimetric reaction between Cr(VI) and diphenylcarbazide, and measurement of the coloured complex with a spectrophotometric detector at 540 nm.
It is appropriate to assess the recovery of the amount of

correttamente gli effetti tossicologici di questo metallo, le sue trasformazioni chimiche, la sua mobilità e biodisponibilità.

Procedimento
La determinazione del contenuto di cromo esavalente nel suolo è generalmente condotta secondo il metodo di estrazione EPA 3060 A, che prevede l'estrazione in ambiente fortemente basico a 90 °C per 1 ora, accoppiato al metodo EPA 7196 A o al metodo EPA 7199; il primo prevede la determinazione del Cr(VI) nell'estratto secondo una reazione colorimetrica specifica tra Cr(VI) e difenilcarbazide in ambiente acido e lettura spettrofotometrica a 540 nm del complesso colorato Cr(III)-difenilcarbazone; il secondo prevede una fase di purificazione dell'estratto su apposite colonna e precolonna cromatografiche, reazione colorimetrica post-colonna tra Cr(VI) e difenilcarbazide e determinazione del complesso colorato con rilevatore spettrofotometrico a 540 nm.
E' opportuno per ogni suolo analizzato valutare il recupero di quantità di Cr(VI) aggiunte volontariamente (spike) su un campione dello stesso suolo analizzato in parallelo, poiché il suolo può contenere agenti riducenti (per es. la sostanza organica) che portano alla riduzione del cromo esavalente alla forma trivalente durante le fasi di analisi, e quindi a una sottostima del dato di Cr(VI).
Per stimare le interconversioni tra le due forme di cromo, che possono avvenire durante le fasi analitiche, esistono protocolli che prevedono l'aggiunta di specie isotopiche di Cr(III) e Cr(VI) ai campioni da analizzare e la loro successiva misura in spettrometria di massa per tracciare le eventuali trasformazioni (Guidotti *et al.*, 2015).

Controllo di qualità
Accuratezza e precisione del metodo analitico vengono valutate analizzando, parallelamente ai campioni, bianchi, repliche e materiale standard certificato. Generalmente l'accuratezza e la precisione si valutano attraverso il calcolo del recupero %, che confronta il valore certificato con quello analitico o della deviazione standard relativa (RSD, %), che viene calcolata come rapporto tra deviazione standard e media dei valori analitici. In particolare, il metodo analitico è tanto più accurato e preciso se il valore di recupero è prossimo a 100 % e la RSD inferiore o uguale a 10 %.
Nell'ambito del progetto Ecoremed, i calcoli per il controllo qualità sono stati effettuati utilizzando gli standard certificati CRM141R, ERMCC141, BCR700 e BCR701.

Analisi dei dati
Attraverso le diverse procedure analitiche effettuate sui campioni di suolo (per esempio analisi ICP-MS degli estratti), si ottengono valori di concentrazioni degli inquinanti, generalmente espresse come mg di inquinante su kg di campione.
I dati ottenuti, prima di qualsiasi elaborazione statistica, vengono valutati sulla base dei limiti di rilevabilità strumentale (LOD), limiti di quantificazione (LOQ) e le informazioni ottenute attraverso il controllo di qualità (QC). Per ogni analita il LOD e il LOQ sono caratteristici di ogni strumento utilizzato e dipendenti dal metodo

Cr(VI) voluntarily added (spike) to a sample of the same soil analysed in parallel, since the soil can contain reducing agents (e.g. organic matter) which lead to the reduction of the hexavalent chromium to the trivalent form during the analytical phases, hence to underestimation of the Cr(VI) amounts.
In order to estimate the interconversion between the two forms of chromium that can occur during the analytical steps, there are protocols which consist in adding Cr(III) and Cr(VI) isotopic species to the samples to be analysed and their subsequent measurement in mass spectrometry to track any transformations (Guidotti *et al.*, 2015).

Quality control
Accuracy and precision of the analytical method are evaluated by analysing, in parallel with samples, blanks, replicas and certified standard material. Accuracy and precision are generally evaluated by calculating the recovery %, comparing the certified value with the analytical value or with the relative standard deviation (RSD, %), which is calculated as the ratio between standard deviation and average of the analytical values. In particular, the analytical method is much more accurate and precise if the recovery value is close to 100 % and the RSD does not exceed 10 %.
Within the ECOREMED project, the calculations for quality control were carried out using CRM141R, ERMCC141, BCR700 and BCR701 certified standards.

Data analysis
For the various analytical procedures carried out on soil samples (for example, ICP-MS analysis of the extracts), the concentrations of pollutants, generally expressed as mg of pollutant per kg sample, were obtained. Prior to any statistical elaboration, all data are valued on the basis of instrumental detection limits (LOD), limit of quantification (LOQ) and information obtained through quality control (QC, paragraph 3.5). For each analyte the LOD and LOQ are characteristic of each instrument, and dependent on the analytical method and the calibration performed. As a general rule, all analyte values without reliable QC data are excluded from statistical analysis, and the concentration values below the LOQ are replaced with the value of LOQ/2.
The type of data processing essentially depends on the number of samples and the type of information that we want to obtain. Statistical analysis aims to test the significance of the data as well as obtain information of a qualitative-descriptive type (for example, as with multivariate analysis). Calculation of the average of the sample replicates, standard deviations and other basic statistical elaborations are usually preliminary to any more complex processing, and facilitate the graphical representation of the results.
It is good practice to compare the PTM bioavailable amounts extracted by single reagents with the quantities extracted in sequence and with the total contents in soil. Indications on the different bioavailability of the soil metal contaminants may be obtained by calculating the ratio between the amount of PTMs extracted in EDTA and those extracted in ammonium nitrate. This ratio may

analitico e dalle tarature effettuate.
In linea generale, si tende ad escludere dall'analisi statistica dei dati tutti i valori relativi ad un analita di cui non si hanno dati attendibili di QC e si tende a sostituire i valori di concentrazione inferiore al LOQ con il valore del LOQ/2.
Il tipo di elaborazione dei dati dipende essenzialmente dalla numerosità campionaria e dal tipo di informazione che si vuole ricavare. L'analisi statistica è finalizzata non solo a testare la significatività dei dati ma anche ad avere informazioni di tipo qualitativo-descrittivo (ad esempio, come con l'analisi multivariata). Il calcolo delle medie delle repliche campionarie, deviazioni standard e altre elaborazioni di statistica di base sono generalmente preliminari a qualsiasi ulteriore elaborazione più complessa, e facilitano la rappresentazione grafica dei risultati.
E' buona norma confrontare le quantità biodisponibili estratte tra loro, con le quantità estratte in sequenza e con i contenuti totali di MPT del suolo. Indicazioni sulla diversa biodisponibilità dei contaminanti metallici del suolo si possono ottenere dal calcolo del rapporto tra le quantità di MPT estratte in EDTA e quelle estratte in nitrato di ammonio. Tale rapporto può essere considerato un indice di biodisponibilità dei MPT.

6b.4. Casi studio del progetto ECOREMED
Nell'ambito del progetto ECOREMED, il monitoraggio chimico della biodisponibilità di metalli potenzialmente tossici è stato condotto in diversi casi studio.

Caso studio 1 – Siti pilota del progetto ECOREMED
Il caso studio 1 ha previsto la determinazione della mobilità/biodisponibilità e la speciazione dei metalli potenzialmente tossici presenti nei suoli dei siti pilota del progetto ECOREMED prima, durante e dopo i processi di bio-fito-remediation.
I siti pilota in esame risiedono nei comuni di Giugliano-Fondo Zacaria (NA) – 1000 m^2, Trentola Ducenta-Fondo Bove (CE) – 3300 m^2, Teverola-Fondo comunale (CE) – 3300 m^2 e Villa Literno-Località Soglitelle (CE) – 1600 m^2. I siti erano interessati da sversamento legale (Teverola-discarica autorizzata) e illegale di rifiuti (Giugliano e Trentola Ducenta) nonché da caccia non autorizzata nel sito di Villa Literno.
Le indagini analitiche preliminari, svolte presso i laboratori dell'U.O.C siti contaminati e bonifiche ARPAC, come descritto nel capitolo 6a hanno evidenziato un'elevata variabilità spaziale della contaminazione, principalmente dovuta a superamenti dei limiti previsti dal D.Lgs. 152/06 di Colonna A (limiti per suoli destinati ad uso verde pubblico, privato e residenziale) per Cu, Zn (nel sito di Giugliano e Trentola Ducenta) e Pb (nel sito di Villa Literno), rispettivamente di 120, 150 e 100 mg kg^{-1}. Il sito di Teverola, invece, è risultato essere non contaminato.
In tutti i siti pilota, ad eccezione del sito di Teverola, sono state applicate metodiche di estrazione chimica basate sull'impiego di singoli reattivi. In particolare, sono state impiegate l'estrazione con soluzione di NH_4NO_3 1 mol L^{-1} (DIN 19730, 1997) per determinare le frazioni

be considered an index of PTM bioavailability.

6b.4. Case studies of the ECOREMED project
Within the ECOREMED project, the bioavailability of potentially toxic metals was chemically monitored in several case studies.

Case study 1 – Pilot sites in the ECOREMED project
The first case study provided the determination of the mobility/bioavailability and speciation of PTMs in soils of the pilot sites of the ECOREMED project before, during and after bio-phyto-remediation treatments. The pilot sites are in Giugliano-Fondo Zagaria (NA) – 1000 m^2, Trentola Ducenta-Fondo Bove (CE) – 3300 m^2, Teverola-Fondo comunale (CE) – 3300 m^2 and Villa Literno-Località Soglitelle (CE) - 1600 m^2. The sites were affected by legal (Teverola-authorised landfill) and illegal (Giugliano and Trentola Ducenta) waste dumping, as well as by illegal hunting (Villa Literno).
Preliminary analytical investigations, carried out in the ARPAC laboratories (see chapter 6a), highlighted high spatial variability of the contamination, mainly due to Cu, Zn (in Giugliano and Trentola Ducenta) and Pb (in Villa Literno), exceeding the legal limits provided by Law Decree 152/06 for public, private and residential green areas. The Teverola site proved to be uncontaminated.
In all pilot sites, except Teverola, chemical extraction procedures, using single reagents, were applied, namely 1 mol L^{-1} NH_4NO_3 (DIN 19730, 1997) to determine easily and readily soluble fractions and 0.05 mol L^{-1} EDTA pH 7 (Rauret *et al.*, 2001) to determine potentially bioavailable fractions.
The results of 1 mol L^{-1} NH_4NO_3 extraction almost always showed higher Cu and Pb values than the respective *trigger values* of 1 and 0.1 mg kg^{-1}, adopted by several European countries for agricultural areas (ASP, 2004; BBodSchV, 1999; Carlon, 2007). Zn proved higher than the *trigger value* of 2 mg kg^{-1} only in concomitance with the highest total concentrations.
The amounts of metals extracted in EDTA were, as expected, much higher than those extracted in NH_4NO_3. Nevertheless, the potentially bioavailable amount of Zn was in some cases higher than Cu.
EU-BCR sequential extractions (Rauret *et al.*, 1999), carried out on selected samples, showed that Cu and Pb were mainly associated to easily reducible mineral phases (Step 2 – extractable in hydroxylamine hydrochloride, pH 2), probably Fe and Mn oxides and hydroxides (Fig. 1). Instead, Zn was equally distributed between the different geochemical phases with a slight predominance of the carbonates (Step 1 - extractable in acetic acid 0.43 M).
The operatively defined bioavailable metal amounts were also compared with metal concentrations in plant tissues (leaves and shoots); as expected, a higher adsorption of Zn with respect to Cu was observed.

Case study 2 – Agricultural soil of San Giuseppiello
In the second case study, the spatial variability, bioavailability and speciation of PTMs and heavy hydrocarbons (C>12) was investigated in a 6 ha

prontamente biodisponibili e l'estrazione con soluzione di EDTA 0,05 mol L^{-1} a pH 7 (Rauret *et al.*, 2001) per determinare le frazioni potenzialmente biodisponibili.
I risultati ottenuti dalle estrazioni in NH_4NO_3 1 mol L^{-1} hanno mostrato valori di Cu e Pb quasi sempre superiori ai *trigger value* rispettivamente di 1 e 0,1 mg kg^{-1}, adottati da alcuni Paesi europei in aree agricole (ASP, 2004; BBodSchV, 1999; Carlon, 2007); lo Zn risultava superare il *trigger value* di 2 mg kg^{-1} solo nei punti con una concentrazione totale più elevata.
Le quantità di contaminanti estratte in EDTA sono risultate, come atteso, molto più elevate di quelle estratte in NH_4NO_3. Tuttavia, la frazione di Zn potenzialmente biodisponibile è risultata in alcuni casi più elevata rispetto al Cu.
L'estrazione sequenziale EU-BCR (Rauret *et al.*, 1999) svolta su campioni selezionati, ha rivelato che Cu e Pb risultavano prevalentemente associati a fasi minerali facilmente riducibili (Step 2 - estraibili in soluzione di idrossilammina cloridrato, pH 2), presumibilmente ossidi e idrossidi di Fe e Mn (Figura 1). Lo Zn è risultato, invece, più uniformemente distribuito tra le diverse fasi geochimiche con una leggera prevalenza delle quantità associate a carbonati (Step 1 - estraibili in soluzione di 0,43 M di acido acetico).
Le quantità di metalli definite operativamente biodisponibili sono state confrontate con le quantità degli stessi asportate dalle piante e che mostravano, come atteso, un maggiore assorbimento dello Zn rispetto al Cu.

agricultural site, in the area of Giugliano (NA), contaminated by illegal disposal of industrial sludges probably from tanneries. In the site, 510 soil samples were collected, applying a 20x20 m sampling grid at three different depths (0-20, 30-60 and 70-90 cm).
A diffuse high and inhomogeneous contamination by Cr, Zn (extraction procedure ISO 11466 or USEPA 3050) and heavy hydrocarbons [C>12, ISO 16703:2004 procedure; almost exclusively consisting of aliphatic long chain (C19-C36)] was measured in the site. In certain sub-areas point-source contamination by Cu, Pb, Cd and As was also found. The surface soil layer (0-20 cm) was extensively contaminated by heavy metals and hydrocarbons, but with more moderate levels of contamination. By contrast, in the subsoil layers (30-60 and 70-90 cm), a higher-level but point source contamination was detected.
Single chemical extractions revealed that Zn, although present on average at a lower total concentration, was more mobile and bioavailable than Cr (Figure 2). The readily bioavailable (extracted by 1 mol L^{-1} NH_4NO_3; DIN 19730, 1997) amounts of Cr were always much lower than those of Zn, which in some cases were higher than the trigger value of 2 mg kg^{-1}, adopted by some European countries in agricultural areas (ASP, 2004; BBodSchV, 1999; Carlon, 2007). In the most contaminated soil samples, even the NH4NO3-extracted amounts of Pb, Cu and Cd were higher than the trigger values adopted by some European countries for agricultural areas (1 mg kg^{-1}

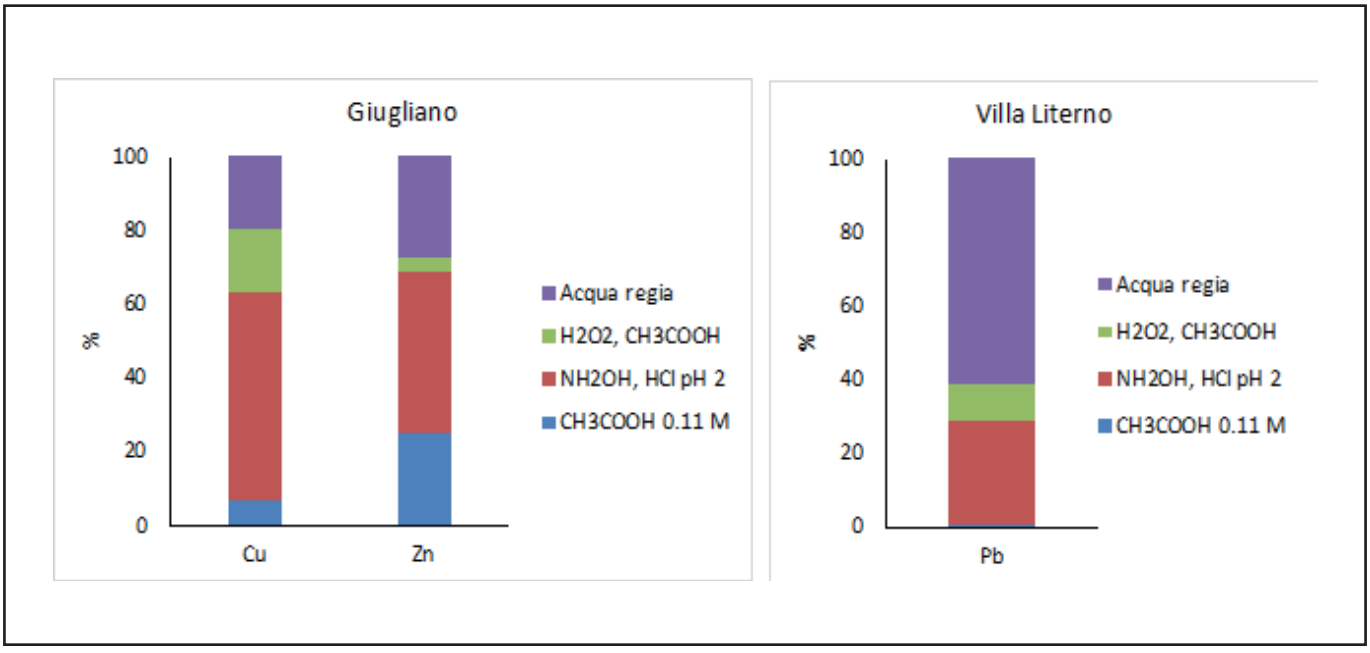


Figura 1. Quantità di MPT mediamente estratte in sequenza dai suoli di Giugliano (Cu e Zn) e di Villa Literno (Pb) ed espresse come percentuale del totale (Cu 1472±169; Zn 915±76; Pb 412±55).

Figure1. Average amounts of sequentially extracted PTMs in Giugliano (Cu and Zn) and Villa Literno (Pb) soils, expressed as percentages of total contents (Cu 1472±169; Zn 915±76; Pb 412±55).

Caso studio 2 – Fondo agricolo di San Giuseppiello

Nel secondo caso studio è stata studiata la variabilità spaziale, la biodisponibilità e la speciazione di contaminanti metallici ed idrocarburi pesanti (C>12) in un suolo agricolo di 6 ha, sito in agro di Giugliano (NA), interessato in passato da smaltimento illegale di fanghi industriali di probabile natura conciaria, in cui sono stati prelevati 510 campioni di suolo mediante griglia di campionamento 20x20 m a 3 diverse profondità (0-20, 30-60 e 70-90 cm).

Le indagini analitiche hanno evidenziato un'elevata e disomogenea contaminazione da Cr, Zn (procedura di estrazione ISO 11466 o USEPA 3050) ed Idrocarburi Pesanti [C>12, procedura ISO 16703:2004; quasi esclusivamente rappresentati da idrocarburi alifatici a lunga catena (C19-C36)]. In talune sub-aree è stata inoltre riscontrata una contaminazione puntuale da Cu, Pb, Cd ed As. Lo strato di suolo superficiale (0-20 cm) è risultato diffusamente contaminato da metalli ed idrocarburi pesanti, ma con livelli di contaminazione più moderati. Viceversa, negli strati più profondi di suolo (30-60 e 70-90 cm), la contaminazione è apparsa più elevata e puntuale.

Le estrazioni singole hanno evidenziato che lo Zn, sebbene presente ad una concentrazione mediamente più bassa, è risultato più mobile e biodisponibile del Cr (Figura 2). Le quantità di Cr prontamente biodisponibili (estratte in NH_4NO_3 1M; DIN 19730, 1997) sono sempre modeste, mentre quelle di Zn sono più cospicue, superiori in alcuni casi al *trigger value* di 2 mg kg^{-1}, adottato da alcuni Paesi europei in aree agricole (ASP, 2004; BBodSchV, 1999; Carlon, 2007). Nei campioni di suolo più contaminati, anche le quantità di Pb, Cu e Cd estratte in NH_4NO_3 sono superate superiori ai *trigger values* adottati da alcuni Paesi europei nelle aree agricole (1 mg kg^{-1} per il Cu; 0,1 mg kg^{-1} per il Pb; 0,04 o 0,1 mg kg^{-1} per il Cd). Le quantità di contaminanti potenzialmente biodisponibili (estratte in EDTA 0,05M a pH 7; Rauret *et al.*, 2001) sono risultate molto superiori a quelle estratte in NH_4NO_3. Tuttavia la frazione di Cr potenzialmente biodisponibile è molto inferiore a quella dello Zn, ad indicare un maggiore pool di Zn potenzialmente disponibile e mobilizzabile.

L'estrazione sequenziale EU-BCR (Rauret *et al.*, 1999) ha rivelato che il Cr risulta principalmente distribuito nella frazione ossidabile e in quella residuale (Step 3 e 4), mentre scarsamente presente nella frazione più facilmente estraibile (Step 1). Lo Zn invece è principalmente distribuito nella frazione più facilmente estraibile ed in quella riducibile (Step 2), a conferma di una maggiore mobilità e biodisponibilità. Il Pb risulta distribuito principalmente nella frazione riducibile e in quella residuale. Il Cu dei campioni più contaminati risulta distribuito principalmente nella frazione riducibile e in quella ossidabile. Indagini preliminari sulla speciazione del Cr hanno inoltre rivelato che, nei punti più contaminati, nonostante lo scarso potere ossidante del suolo (determinato mediante metodo ufficiale XII.6 del Supplemento Ordinario G.U. 248 del 21-10-1999) ed il forte potere riducente della sostanza organica, sembra essere presente anche Cr in forma esavalente (da estrazione con metodo EPA 3060 A e determinazione con metodo EPA 7199).

for Cu, 0.1 mg kg^{-1} for Pb; 0.04 or 0.1 mg kg^{-1} for Cd). The amounts of potentially bioavailable metals (extracted by 0.05 mol L^{-1} EDTA at pH 7; Rauret *et al.*, 2001) were much higher than those extracted by NH_4NO_3. However, the amounts of potentially bioavailable Cr were much lower than those of Zn, indicating a greater potentially mobile and bioavailable pool of Zn.

The EU-BCR sequential extractions (Rauret *et al.*, 1999) revealed that the total Cr content was mainly distributed between oxidizable and residual phases (Steps 3 and 4), with a very scant presence of the more easily extractable forms (Step 1). Vice versa, Zn was mainly found distributed between more easily extractable (Step 1) and reducible forms (Step 2), confirming its greater mobility and bioavailability. Lead was mainly associated to reducible and residual phases. In the most contaminated samples, Cu was prevalently found in the reducible and oxidizable fractions.

Preliminary investigations on the Cr speciation also revealed that, in the most contaminated areas, despite the poor oxidizing capacity of the soil (determined by official procedure XII.6 of the Ordinary Supplement G.U. 248, 21.10.1999) and the strong reducing capacity of the soil organic matter, a certain amount of Cr seemed to occur as a hexavalent species (extraction with EPA 3060 A and determination with EPA 7199). Considering the importance of this result for the risk assessment of the site, collaboration with the University of Oviedo (Spain) was established to carry out the Cr(III)-Cr(VI) speciation by addition of spikes with enriched isotopically species of Cr and analysis by LC-ICP-MS (liquid chromatographic separation and detection by inductively coupled plasma mass spectrometry; Fabregat *et al.*, 2012; Guidotti *et al.*, 2015).

Case study 3 – The Campania Plain project

The main aim of the Campania Plain project (Operative tools for assessment and control of the quality of agricultural systems in the Campania Plain) was to assess the level of contamination of soils and agricultural products from the Campania Plain. To this end, 300 pairs of agricultural soils and related vegetables were collected in 52 municipalities of the Campania Plain and two in municipalities of Salerno. Soil and vegetables were analysed for total and bioavailable contents of PTMs. The relationship between soil properties and PTM bioavailability was also investigated.

The main physical and chemical properties of the soils were determined according to the official methods of soil analysis (DM 13/09/1999). The pseudo-total content of 12 PTMs (As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Tl, V, Zn) was determined according to the EPA 3051A/2007 and EPA 6010C/2007 methods. The content of the same elements in edible plant parts was determined according to the EPA 6010C/2007 method. On some soil samples, selected on the basis of their total PTM content or on the PTM content found in the related plants, the readily and potentially bioavailable PTM amounts were determined by NH_4NO_3 (DIN 19730, 2008) and EDTA (Rauret *et al.*, 2001; EUR 19774 EN/2001) extractions.

The most severe soil contaminations were due to copper

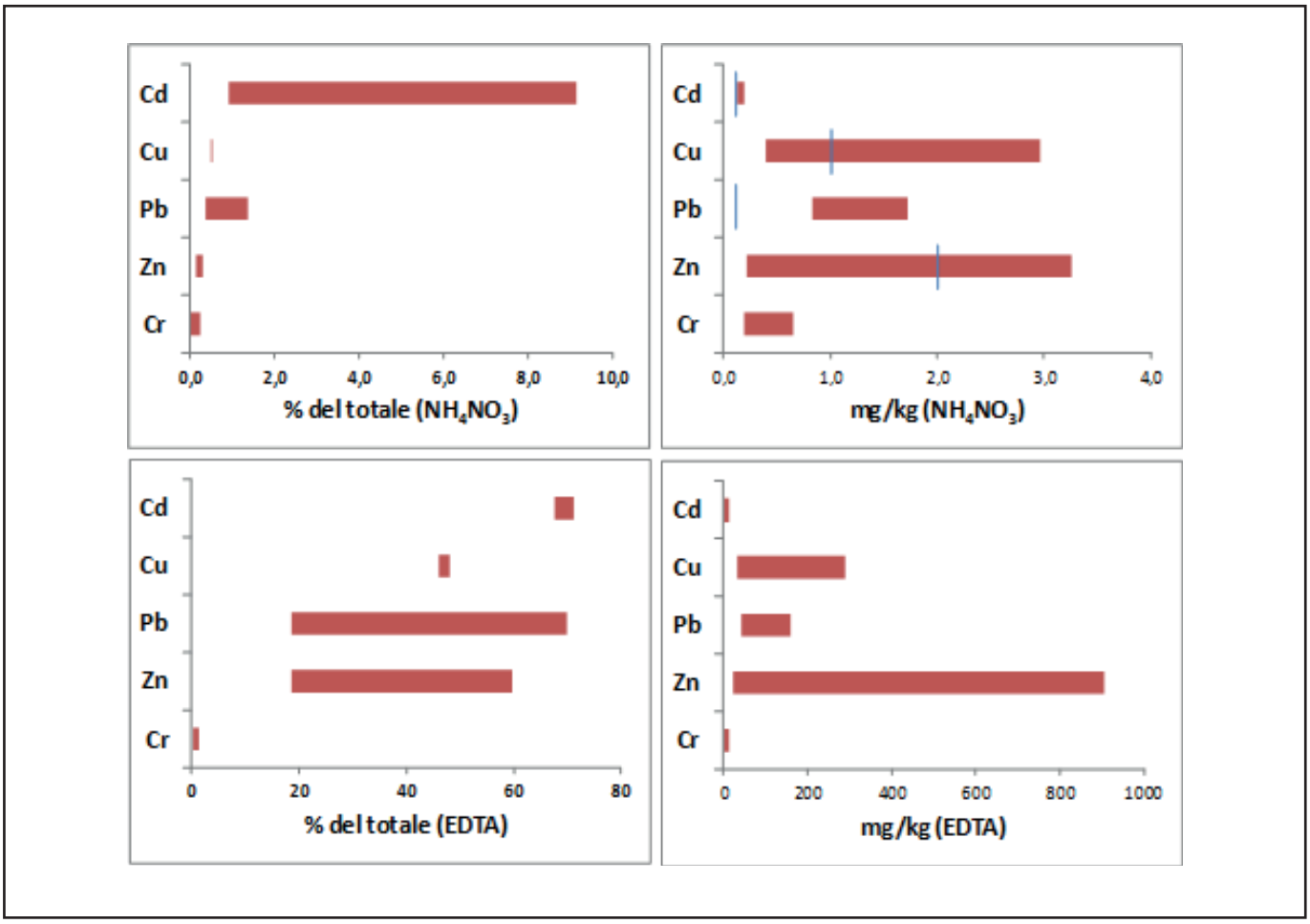


Figura 2. Range di quantità relative e assolute di MPT estratti in NH4NO3 ed EDTA dai suoli di San Giuseppiello. Le linee blu indicano i trigger value di alcuni paesi europei per l'estrazione in NH4NO3.

Figure2. Ranges of relative and absolute amounts of PTMs extracted by NH4NO3 and EDTA from soil samples collected at the San Giuseppiello site. Blue lines indicate the trigger values for NH4NO3 extraction adopted for agricultural soils by several European countries.

Tuttavia, considerata l'importanza di tale risultato ai fini dell'analisi del rischio sito-specifica, si sta effettuando, in collaborazione con l'Università di Oviedo (Spagna), la speciazione Cr(III)-Cr(VI) mediante aggiunta di spike di specie di Cr arricchite isotopicamente ed analisi LC-ICP-MS (separazione cromatografica in fase liquida e rivelazione con spettrometria di massa a plasma accoppiata induttivamente; Fabregat *et al.*, 2012; Guidotti *et al.*, 2015).

Caso studio 3 – Il progetto Piana Campana

Il progetto Piana Campana (Strumenti operativi di valutazione e controllo della qualità dei sistemi agricoli nella Piana Campana) al fine valutare la contaminazione dei suoli e dei prodotti agricoli Campani, ha previsto il campionamento e l'analisi di 300 coppie di suoli agricoli e vegetali su essi coltivati in 52 municipalità nell'areale della Pianura Campana e 2 municipalità della provincia di Salerno. Inoltre sono state cercate le relazioni che intercorrono tra le proprietà di questi suoli e la biodisponibilità degli elementi.

Le principali proprietà chimiche e fisiche dei suoli sono state determinate secondo i metodi ufficiali di analisi del suolo (DM 13/09/1999). Il contenuto pseudototale dei

and zinc, which, according to the NH_4NO_3 extraction were also the more readily soluble and bioavailable elements (Fig. 3), exceeding in some cases the trigger values of 1 and 2 mg kg^{-1} respectively, defined by some European countries for this type of extraction (BBodSchV, 1999; ASP, 2004) to prevent the transfer of PTMs from soil to plants. The amounts of PTMs extracted by EDTA from the studied soils were almost always several times greater than those extracted by NH_4NO_3, indicating a consistent pool of potentially bioavailable elements.

All soil properties are known to influence the equilibrium between total and bioavailable amounts of PTMs. In the studied soils, pH and organic carbon appeared to influence the equilibrium of a larger number of elements than the other properties.

No correlation was found between the level of PTMs in plants and the total or bioavailable PTM amounts in soils. The possible accumulation of the PTMs in a tissue of the plant other than that considered in this study (edible part) could have affected this result (Adamo *et al.*, 2017). In addition, the plants do not absorb the elements from the soil indiscriminately, but maintain a nutrient homeostasis, unless they are hyperaccumulators (Clemens, 2001). Indeed, plant uptake is species-dependent (Adamo *et al.*,

12 metalli potenzialmente tossici (MPT) (As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Tl, V, Zn) è stato determinato secondo le metodiche EPA 3051A/2007 e EPA 6010C/2007. Il contenuto degli stessi elementi nella parte edibile dei vegetali è stato determinato secondo il metodo EPA 6010C/2007. Su campioni di suolo selezionati sulla base dei contenuti totali di MPT nel suolo o nella pianta accoppiata è stata determinata la frazione prontamente e potenzialmente biodisponibile di MPT con estrazioni in NH_4NO_3 (DIN 19730, 2008) e in EDTA (Rauret *et al.*, 2001; EUR 19774 EN/2001) poiché indicative dell'ammontare di un elemento del suolo potenzialmente assorbibile dalla pianta e quindi atto a entrare nella catena alimentare.
Le contaminazioni più severe rilevate sono state quelle dovute a rame e zinco, e secondo l'estrazione con NH_4NO_3, Cu e Zn sono anche gli elementi più prontamente solubili e biodisponibili (Figura 3) e in alcuni casi le quantità estratte eccedono i valori di attenzione (1 e 2 mg kg^{-1} per Cu e Zn rispettivamente) definiti da alcuni paesi europei per questo tipo di estrazione (BBodSchV, 1999; ASP, 2004) per prevenire il trasferimento dei metalli pesanti dal suolo alle piante. Le quantità di elementi estratte in EDTA dai suoli studiati sono quasi sempre diverse volte più grandi di quelle estratte in NH_4NO_3 indicando un pool più consistente di elementi potenzialmente biodisponibili.
Tutte le proprietà del suolo influenzano l'equilibrio tra pool totale e biodisponibile di MPT, ma nei suoli studiati pH e carbonio organico sembrano influenzare l'equilibrio di un numero maggiore di elementi rispetto alle altre proprietà.
Nessuna correlazione è stata trovata tra i livelli degli elementi potenzialmente tossici in pianta e le quantità totali o biodisponibili del suolo. Ciò potrebbe essere dovuto all'accumulo dei MPT in un tessuto della pianta diverso da quello considerato in questo studio (parte edibile) (Adamo *et al.*, 2017). Inoltre le piante non assorbono indiscriminatamente gli elementi dal suolo, ma mantengono un omeostasi di nutrienti, a meno che non siano piante iperaccumulatrici (Clemens, 2001). Infatti l'assorbimento della pianta è comunque specie-dipendente (Adamo *et al.*, 2017).

6b.5. Conclusions

The criteria to assess the quality of agricultural soils, safeguarding the healthiness and quality of agro-food products for the protection of human health, cannot take into consideration only the total content of the metal contaminants in soil, but must also take into account their mobility and bioavailability. Indeed, in assessing the level of contamination of areas devoted to agricultural use, attention should be mainly paid to the possible transfer of pollutants from the soil to the plant, with the consequent entry of contaminants into the food chain.
The chemical monitoring of PTM bioavailability in the different case studies described above produced results in this direction, differentiating the metals on the basis of their prompt and potential bioavailability and providing useful information to the next stage of phytoremediation of the sites (in case studies 1 and 2).
In the metal-contaminated sites, study of the bioavailability of the contaminants in soil would translate into economic benefits from the executive phases of the restoration projects, which in the absence of such information should reduce the PTM total content in soil below the risk thresholds.
Knowledge of bioavailable PTM concentrations (hence those likely to enter the food chain and affect human health) of the agricultural soils in Campania could contribute to creating a database from which to derive specific threshold values for the Campania Regional Authority, as well as in legislative proposals leading to an improvement in Law Decree 152/2006 (see Chapter 2).

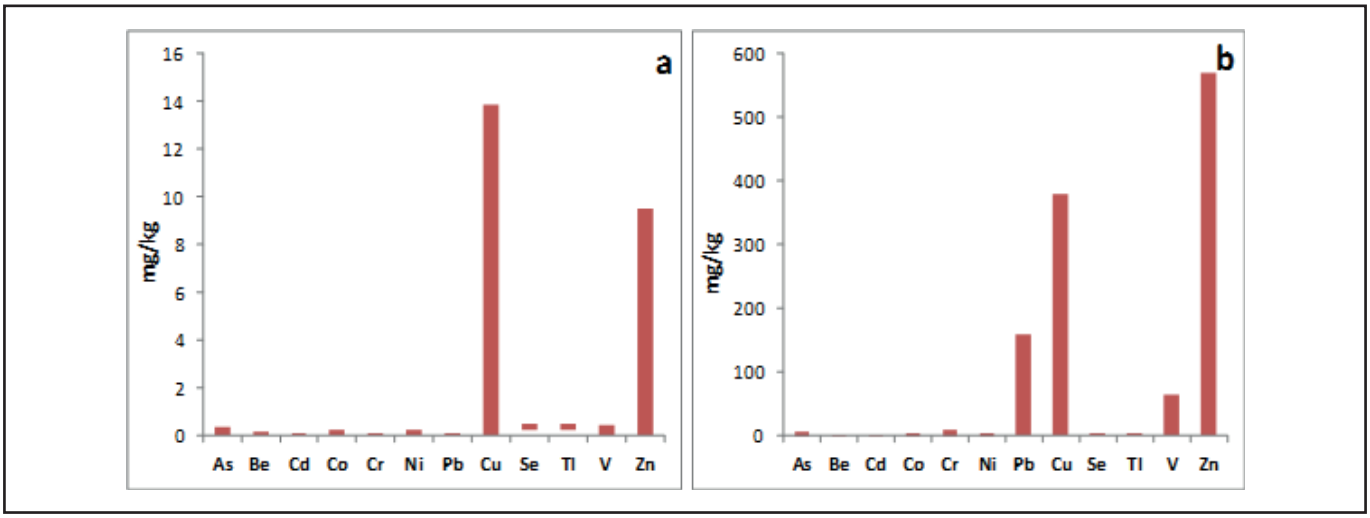


Figura 3. Range di quantità di MPT estratte in NH4NO3 (a) e EDTA (b) dai suoli della Piana Campana

Figure 3. Ranges of PTM amounts extracted by NH4NO3 (a) and EDTA (b) from the studied soils of the Campania Plain.

6b.5. Conclusioni

I criteri per la valutazione dei suoli agricoli, finalizzati ad assicurare la salubrità e la qualità delle produzioni agro-alimentari a tutela della salute umana, devono tenere in conto non solo il contenuto totale dei contaminanti metallici, ma anche la loro mobilità e biodisponibilità. Infatti, nella valutazione dello stato di contaminazione di aree ad uso agricolo, l'attenzione dovrebbe essere incentrata principalmente sulla possibilità del passaggio degli inquinanti dal suolo alla pianta, con il conseguente ingresso di sostanze contaminanti nella catena alimentare.

Il monitoraggio chimico della biodisponibilità di metalli potenzialmente tossici nei diversi casi studio sopra descritti ha prodotto risultati in tal senso, differenziando i metalli in base alla pronta e potenziale biodisponibilità e fornendo informazioni utili alla fase successiva di fitoremediation dei siti (nei casi studio 1 e 2).

Nei siti contaminati, lo studio della biodisponibilità, oltre che dei contenuti totali dei contaminanti metallici, si potrebbe tradurre in un risparmio economico nelle fasi esecutive dei progetti di bonifica, giacché la mancata distinzione fra concentrazioni di contaminanti biodisponibili e non biodisponibili, fa sì che si debba procedere ad operazioni di bonifica il cui obiettivo è ridurre il contenuto totale di MPT nel suolo al di sotto delle concentrazioni soglia di rischio o delle soglie di contaminazione fissate nel D.Lgs. 152/2006 o fino alle concentrazioni di background.

La conoscenza delle concentrazioni di MPT biodisponibili (e quindi atte ad entrare nella catena alimentare, ed incidere sulla salute umana) dei suoli agricoli della Regione Campania, si potrebbe tradurre nella realizzazione di un database da cui ricavare valori soglia specifici per la Regione Campania, nonché in proposte legislative che portino ad un miglioramento del D.Lgs. 152/2006 (vedi capitolo 2).

Bibliografia

Adamo P., Agrelli D., Zampella M., 2017. *Chemical speciation to assess bioavailability, bioaccessibility and geochemical forms of potentially toxic metals (PTMs) in polluted soils.* In: De Vivo, B., Belkin, H.E., Lima, A. (Eds.), Environmental Geochemistry, second edition, Elsevier.

ASP, 2004. Act No. 220/2004 Coll. on the Protection and Use of the Agricultural Soil. Ministry of Agriculture of the Slovak Republic.

Avudainayagam S., Megharaj M., Owens G., Kookana R.S., Chittleborough D., Naidu R., 2003. *Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites*. Rev Environ Contam Toxicol 178, 53-91.

Barlett J.R., 1991. *Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods*. Environmental Health Prespectives 92, 17-24.

BBodSchV, 1999. Bodenschutz- und Altlastenverordnung [Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance]. 12 July 1999, Germany.

Carlon, C., 2007. *Derivation methods of soil screening*

Bibliography

Adamo P., Agrelli D., Zampella M., 2017. *Chemical speciation to assess bioavailability, bioaccessibility and geochemical forms of potentially toxic metals (PTMs) in polluted soils.* In: De Vivo, B., Belkin, H.E., Lima, A. (Eds.), Environmental Geochemistry, second edition, Elsevier.

ASP, 2004. Act No. 220/2004 Coll. on the Protection and Use of the Agricultural Soil. Ministry of Agriculture of the Slovak Republic.

Avudainayagam S., Megharaj M., Owens G., Kookana R.S., Chittleborough D., Naidu R., 2003. *Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites*. Rev Environ Contam Toxicol 178, 53-91.

Bartlett J.R., 1991. *Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods*. Environmental Health Perspectives 92, 17-24.

BBodSchV, 1999. Bodenschutz- und Altlastenverordnung [Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance]. 12 July 1999, Germany.

Carlon, C., 2007. *Derivation methods of soil screening values in Europe. A review and evaluation of national procedures towards harmonization*. European Commission, Joint Research Centre, ISPRA, EUR 22805-EN, 306 pp.

Clemens S., 2000. *Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis.* Planta 212, 475-486.

DIN 19730, 1997. Bodenbeschaffenheit–Extraktion von Spurenelementen mit Ammoniumnitratlösung. Beuth Verlag Berlin.

DM 13/09/1999. Decreto Ministeriale del 13/09/1999. Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo". Gazz. Uff. Suppl. Ordin. No. 248 of 21/10/1999.

Fabregat N., Rodriguez-Gonzalez P., Castillo A., Malherbe J., Roig Navarro A., Long S., Garcìa Alonso J.I., 2012. *Fast and accurate procedure for the determination of Cr(VI) in solid samples by isotope dilution mass spectrometry.* Environ Sci Technol 46, 12542–12549.

Gryschko R., Kuhnle R., Terytze K., Breuer J., Stahr K., 2005. *Soil Extraction of Readily Soluble Heavy Metals and As with 1 M NH4NO3-Solution. Evaluation of DIN 19730.* J Soils Sediments 5, 101-106.

Guidotti L., Abad S.Q., Rodríguez-González, P., Alonso, J.I.G., Beone, G.M., 2015. *Quantification of Cr(VI) in soil samples from a contaminated area in northern Italy by isotope dilution mass spectrometry.* Environ Sci Pollut Res 22, 17569-17576.

Rauret G., López-Sánchez J.F., Bacon J., Gomez A., Muntau H., Queaviller P., 2001. *Certification of the contents (mass fraction) of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in an organic-rich soil following harmonised EDTA and acetic acid extraction procedures. BCR-700.* BCR information, reference materials. Report EUR 19774 EN.

Rauret G., López-Sánchez J.F., Sahuquillo A., Davidson

values in Europe. A review and evaluation of national procedures towards harmonization. European Commission, Joint Research Centre, Ispra, EUR 22805-EN, 306 pp.

Clemens S., 2000. *Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis.* Planta 212, 475-486.

DIN 19730, 1997. Bodenbeschaffenheit–Extraktion von Spurenelementen mit Ammoniumnitratlösung. Beuth Verlag Berlin.

DM 13/09/1999. Decreto Ministeriale del 13/09/1999. Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo". Gazz. Uff. Suppl. Ordin. n° 248 del 21/10/1999.

Fabregat N., Rodriguez-Gonzalez P., Castillo A., Malherbe J., Roig Navarro A., Long S., Garcìa Alonso J.I., 2012. *Fast and accurate procedure for the determination of Cr(VI) in solid samples by isotope dilution mass spectrometry.* Environ Sci Technol 46, 12542–12549.

Gryschko R., Kuhnle R., Terytze K., Breuer J., Stahr K., 2005. *Soil Extraction of Readily Soluble Heavy Metals and As with 1 M NH4NO3-Solution. Evaluation of DIN 19730.* J Soils Sediments 5, 101-106.

Guidotti L., Abad S.Q., Rodríguez-González, P., Alonso, J.I.G., Beone, G.M., 2015. *Quantification of Cr(VI) in soil samples from a contaminated area in northern Italy by isotope dilution mass spectrometry.* Environ Sci Pollut Res 22, 17569-17576.

Rauret G., López-Sánchez J.F., Bacon J., Gomez A., Muntau H., Queaviller P., 2001. *Certification of the contents (mass fraction) of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in an organic-rich soil following harmonised EDTA and acetic acid extraction procedures. BCR-700.* BCR information, reference materials. Report EUR 19774 EN.

Rauret G., López-Sánchez J.F., Sahuquillo A., Davidson C., Ure A., Quevauviller P., 1999. *Improvement of the BCR 3-step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials.* J Environ Monit 1, 57-61.

C., Ure A., Quevauviller P., 1999. *Improvement of the BCR 3-step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials.* J Environ Monit 1, 57-61.

7. Test biologici per la caratterizzazione di dettaglio dei suoli contaminati

D. Visconti, N. Fiorentino, M. Fagnano

7.1. Introduzione

Negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi per la misura diretta della concentrazione dei più diversi tipi di inquinanti in differenti matrici quali suolo, acqua e aria, utilizzando metodologie analitiche molto laboriose e costose che spesso non risultano particolarmente adatte a restituire informazioni interessanti sulla qualità dell'ambiente anche futura. Solo negli ultimi decenni l'attenzione è stata rivolta alla valutazione di sistemi biologici per il monitoraggio ambientale (biomonitoraggio). Rispetto ai metodi tradizionali, l'utilizzo di un sistema biologico ha l'enorme vantaggio di essere in grado di valutare l'effettiva tossicità dell'inquinante su un organismo vivente anche in matrici molto complesse, e quindi di essere un buon indice della reale possibilità che una sostanza inquinante diventi pericolosa per la salute dell'uomo. Tra i diversi sistemi biologici, le specie vegetali sono state molto studiate negli ultimi anni per trovare quali di esse possano essere utilizzate come bioindicatori o per estrarre i contaminanti dal suolo per una bonifica economica ed ecocompatibile. Per raggiungere tali obiettivi, particolare attenzione è stata posta sulle specie vegetali spontanee presenti in siti contaminati, in quanto è stato osservato che in diverse aree la contaminazione ha provocato l'emergenza di un mosaico di comunità vegetali secondarie in diversi stadi successionali a seconda della durata e dell'intensità della contaminazione. Inoltre, la presenza di particolari comunità vegetali spontanee in siti contaminati dipende dal potenziale delle specie stesse di germinare, sopravvivere e riprodursi e quindi che la presenza di tali specie indica che esse sono ben adattate ai contaminanti e li possono rimuovere o accumulare (Chaney et al., 2000). L'analisi della quantità e della qualità delle specie vegetali spontanee presenti in un sito contaminato può quindi indicare l'entità della sua contaminazione (biomonitoraggio) e permette di effettuare scelte decisionali per un eventuale intervento di fitorimedio.

7.2. Biomonitoraggio

Il biomonitoraggio può essere effettuato valutando piante indicatrici (o piante spia) cioè quelle piante che rispondono, con sintomi evidenti e possibilmente caratteristici, all'azione di uno o più agenti inquinanti (bioindicazione) oppure piante accumulatrici-indicatrici, cioè piante capaci di accumulare nei propri tessuti specifici inquinanti riflettendo le concentrazioni di inquinanti nel suolo (bioaccumulazione) e specie tolleranti che non soffrono la presenza di metalli pesanti nel suolo ("esclusori").

Per quanto riguarda le piante spia, il biomonitoraggio si basa sul maggior o minor grado di sopravvivenza o di crescita di specie vegetali. Le informazioni che si possono dedurre attraverso l'impiego di piante indicatrici sono molteplici; tuttavia le principali, che normalmente più interessano, riguardano:

a) la segnalazione della presenza di inquinanti: primo segnale di una situazione anomala da esaminare poi

7. Detailed characterization of contaminated soils: bioassays

D.Visconti, N.Fiorentino, M. Fagnano

7.1. Introduction

In recent years methods have been developed for measuring concentrations of many types of pollutants directly in different matrices such as soil, water and air, using very burdensome and costly analytical methods that are often not particularly suitable to retrieve interesting information on the current (and also future) quality of the environment. Only in recent decades has attention been paid to assessing the possible use of biological systems for environmental monitoring (biomonitoring). Compared to traditional methods, the use of a biological system has the enormous advantage of being able to evaluate the actual toxicity of pollutants vis-à-vis living organisms even in very complex matrices, and hence of being a good indicator of the real possibility of a pollutant becoming hazardous for human health. Among the various biological systems, plant species have been widely studied in recent years to find which could be used as bio-indicators and as accumulators of contaminants in radical and aerial tissues for economically strategic and environmentally friendly soil remediation. To achieve these objectives, particular attention has been paid to spontaneous species present in contaminated sites, as it was observed that in several areas contamination had caused the emergence of a patchwork of secondary plant communities in different successional stages depending on the length and intensity of human activity (Díaz and Elcoro, 2009). Furthermore, it has been shown (Ash et al., 1994) that the presence of particular spontaneous plant communities in contaminated sites depends on the potential of the same species to germinate, survive and reproduce, hence that the presence of these species means that they are well adapted to contaminants and can remove or accumulate them, thereby reducing their toxicity (Chaney et al., 2000). Analysis of the quantity and quality of wild plant species present in a contaminated site may therefore indicate the level of its contamination (biomonitoring) and allow choices to be made regarding possible phytoremediation.

7.2. Biomonitoring

Biomonitoring can be conducted by assessing plant indicators, i.e. those plants that respond, with evident and preferably characteristic symptoms, to the action of one or more pollutants (bioindication), or bio-accumulating plant species, i.e. plants capable of accumulating specific pollutants in their tissues which reflect the concentrations of pollutants in soil (bioaccumulation - which will be discussed in greater detail below), and tolerant species, which are not adversely affected by the presence of heavy metals in soil ("excluders"). With regard to plant indicators, biomonitoring is based on the greater or lesser degree of survival or growth of each plant species. Although much can be learnt from the use of plant indicators, the main information concerns:

a) the detection of pollutants: the first sign of an abnormal situation to be examined in greater detail; signals of

in modo più approfondito; segnalazione di situazioni di stress dovute all'azione sinergica di più inquinanti che, singolarmente, potrebbero anche essere presenti in dosi non pericolose;

b) l'indicazione di uno specifico inquinante: reazione caratteristica all'azione di determinati inquinanti (es. macchie clorotiche su foglie di tabacco a causa dell'ozono troposferico);

c) la possibilità di valutare il livello o l'intensità dell'inquinamento.

Un'analisi diversa deve essere effettuata per il biomonitoraggio utilizzando specie indicatrici-accumulatrici di Elementi Potenzialmente Tossici (EPT) e in generale specie che tollerano la presenza di EPT senza presentare sintomi specifici. In questo caso è utile effettuare l'analisi della vegetazione (rilievo floristico) delle specie presenti naturalmente su un sito contaminato valutando quindi la risposta dei vegetali ai fattori ambientali e ai loro cambiamenti in termini di biodiversità (a vari livelli) e valutando l'accumulo di inquinanti (sia nelle diverse parti della pianta che nei rispettivi suoli rizosferici). Questa valutazione si basa sul fatto che ogni specie vegetale ha il suo specifico *range* di tollerabilità alle diverse situazioni ambientali, entro il quale esiste il suo optimum ecologico e fisiologico. Ne consegue che per ogni ambiente si possono definire le specie caratteristiche, consentendo una definizione della qualità di un data area semplicemente osservandone la vegetazione. La rilevazione floristica, si basa sul riconoscimento delle singole specie che costituiscono un'associazione vegetale, considerata come "un raggruppamento vegetale più o meno stabile ed in equilibrio con l'ambiente, caratterizzato da una composizione floristica, in cui alcune specie vegetali rilevano con la loro presenza una ecologia particolare ed autonoma". La rilevazione floristica considera le singole specie vegetali come bioindicatori. Il censimento delle stesse avviene all'interno di zone omogenee e prevede la valutazione quantitativa dell'abbondanza di ogni specie (stima a vista) o conta precisa del numero di specie. La stima a vista, cioè la percentuale di superficie occupata dalle singole specie, evidenzia l'importanza relativa dei singoli componenti della vegetazione. Questo è un metodo legato alla soggettività del rilevatore e risulta molto più grossolano rispetto al metodo puntuale di identificazione delle singole specie in specifici punti. Qualunque sia il metodo operativo, i censimenti vanno eseguiti su almeno tre zone e per un periodo di tempo minimo di tre ripetizioni (anni, stagioni ecc.), dato che di anno in anno i risultati potrebbero subire modificazioni o sovversioni. Naturalmente, per un quadro complessivo della vegetazione, bisogna disporre di un numero congruo di rilievi, più o meno elevato a seconda della variabilità di microambienti esistenti nel territorio oggetto di studio.

Parametri interessanti che si possono ottenere dalla rilevazione floristica sono:

- la ricchezza o densità di specie (numero di specie);
- la diversità di specie (abbondanza relativa di ogni specie, espressa come rapporto tra numero di individui e numero di specie totali);
- la dominanza (grado di prevalenza della specie più rappresentativa).

distress due to the synergistic action of more than one pollutant which, individually, may also be present in non-hazardous doses.

b) indication of a specific pollutant: characteristic reaction to the action of certain pollutants (e.g. chlorotic spots on tobacco leaves or due to tropospheric ozone air pollution);

c) the ability to assess the level or intensity of pollution.

A different analysis must be carried out for biomonitoring, when using indicators or accumulators of potentially toxic elements (PTEs) and generally species that tolerate the presence of PTEs in the soil without presenting specific symptoms. In this case it is useful to carry out an analysis of the vegetation (floristic survey) naturally occurring on a contaminated site, evaluate the response of plants to environmental factors and their changes in terms of biodiversity (at various levels), and evaluate the accumulation of pollutants (both in different plant parts and in their respective rhizospheric soils). This assessment is based on the fact that each plant species has its own specific range of tolerance to different environmental situations, within which there is its ecological and physiological optimum. Hence for each environment the characteristic species can be defined, allowing the quality of a given area to be defined simply by observing the vegetation.

A floristic survey is based on the recognition of individual plant species that make up an association, considered "a more or less stable plant grouping and in equilibrium with the environment, characterized by a floristic composition, where certain plant species detect with their presence a particular and independent ecology". The floristic survey considers the individual plant species as a bioindicator. The census of plant species is performed within homogeneous areas and provides the quantitative assessment of the abundance of each species (visual estimation) or precise count of the number of species. Visual estimation, that is, the percentage of the plot occupied by individual species, highlights the relative importance of the individual components of the vegetation. This is a method linked to the subjectivity of the detector and is much coarser compared with the precise method of individual species identification at specific points. Whatever method of operation, the census should be carried out in at least three zones and for a minimum of three repetitions (years, seasons etc.), given that each year the results may undergo changes. Of course, for an overall picture of the vegetation, there must be a sufficient number of surveys, according to the variability of existing micro-environments in the area under study.

The following interesting parameters may be obtained from the floristic survey:

- species richness or density, understood as the number of species found with the floristic survey;
- species diversity, i.e. the relative abundance of each species, generally expressed as the number of individuals / number of total species;
- dominance, or the degree of prevalence of the most representative species.

These parameters are used to calculate indices such as the **Shannon-Weaver Diversity Index (H)**, used to quantify species diversity in a community. This index is calculated by the following formula (Shannon and Weaver, 1963):

I suddetti parametri permettono di calcolare indici quali: **Indice di Diversità di Shannon-Weaver (H)**, usato per quantificare la diversità di specie in una comunità. Tale indice viene calcolato con la formula seguente (Shannon e Weaver, 1963):

$$H = -\sum_{i=1}^{\%} (P_i * log\, P_i)$$

con P_i: presenza di ogni specie sul totale (%); abbondanza relativa data dal rapporto tra il numero di individui di ogni "iesima" specie (n_i) e il numero totale di individui nella comunità (N), ovvero: $P_i = n_i/N$ Maggiore sarà l'indice H, maggiore sarà la biodiversità nella comunità. Da tale indice si può poi calcolare l'indice di *evenness* o *equitability* di Shannon (E_H):

$$E_H = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\log N}$$

Tale indice varia da 0 a 1 e quantifica la equiripartizione (stesso o simile numero di individui per le diverse specie appartenenti ad una determinata area o ecosistema). Più tale indice si avvicina a 1 e maggiore sarà l'equiripartizione delle specie in una comunità o ecosistema con completa equiripartizione in corrispondenza di 1.
Un esempio pratico dell'applicazione di tale indice è rappresentato dal confronto tra la biodiversità di un vigneto biologico e uno convenzionale (Fig.1) che potrà essere applicato a qualsiasi altro studio della vegetazione di un'area di interesse riportando la percentuale di copertura (come in questo caso) o l'abbondanza relativa di ogni specie vegetale rilevata.

$$H = -\sum_{i=1}^{\%} (P_i * log\, P_i)$$

where Pi is the presence of each species in relation to the total (%); relative abundance is given by the ratio of the number of individuals of each "*i*th" species (n_i) to the total number of individuals in the community (N), that is: $P_i = n_i / N$. The higher the H index, the greater the biodiversity in the community. From this index the evenness or equitability index of Shannon can then be calculated (E_H):

$$E_H = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\log N}$$

This index varies from 0 to 1 and quantifies the equipartition (same or similar number of individuals for the various species belonging to a specific area or ecosystem). The closer the index is to 1, the greater the evenness of species in a community or ecosystem, with complete evenness corresponding to 1. A practical example of the application of the above index is given by the comparison between the biodiversity of an organic vineyard and its conventional counterpart (Fig.1), which can be applied to any other study of the vegetation of an area of interest by returning the percentage of cover (as in this case) or the relative abundance of each plant species detected.

Table 1 shows the species and percentage cover of all species, respectively, in the organic and conventional vineyards.

Figura 1. Vigneto convenzionale (sx); Vigneto biologico (dx)

Figure. 1. Conventional vineyard (l); organic vineyard (r)

Tabella 1. Indici di copertura delle differenti specie vegetali in due vigneti

Table 1. Biodiversity of plant species in two vineyards

Specie / Species	**Vigneto biologico** / **Organic vineyard**	**Vigneto convenzionale** / **Conventional vineyard**
Lactuca saligna	0.117	
Plantago media	0.004	
Convolvulus arvensis	0.211	0.011
Geranium molle	0.021	
Taraxacum officinalis	0.325	0.011
Numero di specie totale per sito (N) / Number of total species per site (N)	5	2

In Tabella 1 sono mostrate le specie e le coperture percentuali di ogni specie, rispettivamente nel vigneto biologico e in quello convenzionale.

Per calcolare l'indice di Shannon H per il vigneto biologico, possiamo utilizzare l'equazione seguente: H = (-1) * (0.117 * ln 0.117) + (0.004 * ln 0.004) + (0.211 * ln 0.211)+… = **1.0478**. L'indice di equiripartizione di Shannon per il vigneto biologico sarà: E_H = 1.0478 / ln 5 = **0.6510**. Usando la stessa equazione, l'indice di Shannon per il vigneto convenzionale sarà **0.099**, e E_H = **0.1431**.

Come si può osservare dai risultati, la biodiversità e l'equiripartizione del vigneto biologico (basso disturbo), sono molto più alti dei rispettivi valori del vigneto convenzionale (elevato disturbo antropico). Il vigneto biologico non solo presenta un maggiore numero di specie, ma gli individui della comunità sono anche distribuiti più equamente tra le diverse specie.

Come detto precedentemente in questo paragrafo la presenza di elevate concentrazioni di contaminanti influirà sulle popolazioni vegetali presenti favorendo specie tolleranti gli EPT a discapito di specie sensibili. Le specie vegetali tolleranti l'elevata concentrazione di metalli pesanti possono essere assimilate a tre gruppi diversi a seconda del loro comportamento in presenza di tali contaminanti (Baker, 1981; MacGrant et al., 1999): (a) "esclusori", in cui la concentrazione di EPT nella parte aerea è mantenuta a bassi livelli a diverse concentrazioni di EPT biodisponibile nel suolo fino ad un livello critico in cui si ha la morte della pianta; (b) "accumulatrici" in cui gli EPT si concentrano nella parte aerea sia in presenza di basse che di alte concentrazioni di EPT nel suolo; c) "indicatrici" in cui le concentrazioni di EPT nei tessuti della pianta riflettono le concentrazioni di EPT nel suolo, usate nell'antichità per le prospezioni minerarie (Tab.2). Ad esempio la ricerca dell'Allume fu effettuata con piante indicatrici, infatti sin dall'antichità il solfato di Al e K (allume) era prodotto in Asia minore da un minerale (alunite) ed era molto ricercato (concia pelli, tintura tessuti, emostatico, ecc.). Veneziani e genovesi facevano affari con produzione e commercio, ma nel 1400 le miniere passarono ai Turchi. Giovanni Da Castro notò nei Monti della Tolfa (Lazio) l'agrifoglio e altre piante presenti anche in Turchia e trovò l'alunite. Georg Bauer (detto Agricola, 1494-1555) nella sua opera "*De Re Metallica*" sosteneva che per individuare nuovi giacimenti di metalli era necessario rifiutare le pratiche "magiche" e leggere "i segni della natura", perché dove sono presenti filoni di

To calculate the Shannon index (H) for the organic vineyard, the following equation may be used: H = (-1) * (0.117 * ln 0.117) + (0.004 * ln 0.004) + (0.211 * ln 0211) + ... = **1.0478**. Shannon's evenness index for the organic vineyard can be expressed as: EH = 1.0478 / ln 5 = **0.6510**. Using the same equation, the Shannon index for the conventional vineyard will be **0.099**, and EH = **0.1431**.

As can be seen from the results, the biodiversity and evenness of the organic vineyard is greater than in its conventional counterpart. This can be explained by the fact that organic vineyards are in principle less intensively managed (hence lower human disturbance), resulting in a more developed plant cover. Thus different noise levels have different effects on biodiversity.

As can be seen from the results, biodiversity and the evenness of the organic vineyard (low noise) are much higher than the respective values from the conventional vineyard (high human disturbance). The organic vineyard not only has a greater number of species, but individuals in the community are also distributed more evenly among the different species.

As stated above, the presence of high concentrations of contaminants will affect the populations of plant species, favouring PTE-tolerant plant species at the expense of susceptible species. The plant species tolerant to high PTE concentrations can be assimilated to three different groups according to their behaviour in the presence of such contaminants (Baker, 1981; MacGrant et al., 1999): (a) "excluders", in which the concentration of PTEs in the aerial part is maintained at low levels at different concentrations of bioavailable PTEs in soil up to a critical level where there is the death of the plant; (b) "accumulators" in which the PTEs are concentrated in the aerial part both in the presence of low and high concentrations of PTEs in the soil; c) "indicators" in which the concentrations of PTEs in plant tissues reflect the concentrations of PTEs in the soil, used in ancient times in mineral prospecting (Table 2). For example, the search for alum was performed with plant indicators: indeed, in ancient times Al and K sulphate (alum) was produced in Asia Minor from a mineral (alunite) and was highly prized (for tanning leather, fabric dyeing, etc.). Venetian and Genoese did business with production and trade, but in the 15th century the mines were taken over by the Turks. Giovanni Da Castro noted in the Tolfa hills north of Rome holly and other plants also present in Turkey and found alunite. Georg Bauer (known as Agricola, 1494-1555) in his work "De Re Metallica" argued that to identify new deposits of metals it was necessary to reject "magic" practices and read "the signs of nature", because where there

Tabella 2. Specie bioaccumulatrici e/o indicatrici di EPT

Table 2. Bioaccumulator and/or indicator species of PTEs

Specie / Species	**EPT / PTEs**
Ailantus glandulosa, *Cynodon dactylon, Achyrocline alata*, *Senecio leptolobus, Taraxacum officinale*, *Trifolium repens* (Bech et al., 2016)	Pb, Zn
Agrostis gigiantea, Minuartia verna, Myriophyllum alterniflorum, *Potamogeton crispus*, *Potamogeton perfloiatus*, *Rumex acetosa, Viola dubyana*	Pb, Zn, Cu
Agrostis tenuis, Arundo donax (Barbosa et al. 2016), *Hordeum vulgare*, *Lolium multiflorum* (Lambrechts et al. 2011) *Miscanthus spp.* (Barbosa et al. 2016), *Thlaspi rotundifolium* ssp. *Cepaefolium, Viola calaminaria*	Zn
Alyssum argenteum	Ni
Artemisia artemisiifolia, Helianthus annuus (Tassi et al. 2008), *Phaseolus vulgari*, *Verbascum thapsus*	Pb, Cd, Zn
Artemisia vulgaris	Cd, Zn
Baccharis trimera (Boechat et al., 2016)	Cd
Brassica juncea, *Brassica carinata*, *Brassica napus*, *Tagetes patula* (Marchiol et al. 2004; Mahbuboor et al. 2016)	Cr, Cu, Zn, Pb
Cerastium latifolium	Cr
Festuca spp. (Alvarez et al. 2003)	Cu, Zn
Glycine max (L.) Merr. (Fellet et al. 2007)	As, Cu, Pb, Zn
L.perenne (Alvarenga et al.2009), *Senecio brasiliensis* (Boechat et al., 2016)	Pb
Populus alba, *Populus nigra* (Houda et al., 2016)	Pb, Cd
Phragmites australis (Bonanno et al., 2010)	Mn, Zn, Pb, Cu
Pteris vittata	As, Zn, Sb
Robinia pseudoacacia	Zn, Cu
Viscaria alpina	Cu
*Zea Mays (*Murakami et al. 2009)	Cd, Ni, Cu, Pb, Zn

metalli vi crescono piante e funghi che sono assenti nelle aree circostanti. Thalius nel 1588, descrisse *Minuartia verna,* specie indicatrice dei depositi di Pb e Zn nel Monte Harz (Germania); *Viscaria (Lychnis) alpina* (fiore del Cu) fu usata nei paesi scandinavi per individuare i giacimenti minerali e Viscaria è il nome di una miniera di Cu in Lapponia (Svezia). *Alyssum bertolonii* è una delle specie tipiche dei serpentini (es. Mt. Ferrato). Altre specie indicatrici nei suoli seleniferi e con solfuri misti. *Viola calaminaria* ed alcune specie di *Thlaspi* sono tipici indicatori di substrati ricchi di Zn.

Un particolare sottogruppo è costituito dalle specie iperaccumulatrici (Adriano, 2001), che sono capaci di completare il loro ciclo vitale su suoli contaminati da EPT senza evidenziare sintomi di fitotossicità (Baker et al., 1981) e accumulano elevate concentrazioni di EPT nella parte aerea (soprattutto nelle foglie). Le concentrazioni soglia di EPT nella parte aerea per definire una specie iperaccumulatrice spontanea sono riportate in tabella 3 con i relativi EPT.
Le specie iperaccumulatrici possono essere distinte in obbligate, endemiche per alcuni suoli metalliferi che mostrano sempre assorbimento di EPT e facoltative, in cui solo alcuni individui della popolazione si comportano da iperaccumulatrori, (Pollard et al., 2002). Le differenze tra individui di specie iperaccumulatrici facoltative possono derivare da: differenze genetiche e differenze riguardanti i suoli (es. differente biodisponibilità).

are metal seams certain plants and fungi grow which are absent in the surrounding areas. Thalius in 1588, described *Minuartia verna*, indicator species of Pb and Zn deposits in the Harz mountains (Germany); *Viscaria (Lychnis) Alpina* (copper flower) was used in Scandinavian countries to identify mineral deposits and Viscaria is the name of a copper mine in Lapland (Sweden). *Alyssum bertolonii* is a typical species found on "serpentines" (e.g. Mt Ferrato). Other indicator species may be found in seleniferous soils and mixed sulphides. *Viola calaminaria* and some species of *Thlaspi* are typical indicators of Zn-rich substrates.

A special sub-group consists of hyperaccumulator species (Adriano, 2001). Hyperaccumulator plant species are able to complete their life cycle on soils contaminated by PTEs without showing any clinical signs of phytotoxicity (Baker et al., 1981), and accumulate high concentrations of PTEs in their aerial part (especially in leaves). The thresholds of PTE concentrations in the aerial part to define a spontaneous hyperaccumulator species are shown in table 3, with related PTEs.
Two classes of hyperaccumulator species can be distinguished: obliged hyperaccumulators, endemic in some metalliferous soils, that always show absorption of PTEs at typical levels of hyperaccumulators; optional hyperaccumulator species in which only some individuals of the population behave like hyperaccumulators (Pollard et al. 2002). Optional hyperaccumulator species can arise from: genetic differences between different populations of the species; differences in soils (e.g. differences in

La biodisponibilità degli EPT, infatti può derivare da variazioni nella concentrazione totale degli EPT e nelle loro forme chimiche, da differenze di pH, sostanza organica, argilla, calcare del suolo (vedi capitolo 6b).
Le specie iperaccumulatrici facoltative hanno l'innata propensione all'accumulazione di EPT ed i fattori locali ne garantiscono la biodisponibilità. In pratica, come mostrato in Figura 2, le specie "normali" non tollerano la presenza di EPT e quindi muoiono a basse concentrazioni nel suolo di EPT biodisponibili; le specie tolleranti ("indicatrici" e "esclusori") continueranno a sopravvivere fino a determinate concentrazioni di EPT biodisponibili nel suolo mentre le "iperaccumulatrici" sopravvivranno a concentrazioni ancora maggiori di EPT biodisponibili nel suolo. Quindi, in linea teorica, dal rilievo vegetazionale di un sito contaminato, all'aumentare della concentrazione dei contaminanti nel suolo in una determinata area, si osserverà una riduzione del numero di specie (in favore di specie maggiormente tolleranti e quindi competitive) nel seguente ordine: piante "normali" > piante "indicatrici" > piante "esclusori" > piante "iperaccumulatrici".

bioavailability and uptake of ions). The last point shown above can result from variations in the following: the total concentration in the soil of the element of interest; the presence of metals in different phases or chemical forms; differences in soil pH; concentrations of the main elements in the soil; physical factors like local rainfall, soil porosity and evapotranspiration. Optional hyperaccumulator species occur when species or populations of a species possess the innate propensity to accumulate PTEs and local soil factors provide sufficient bioavailability of PTEs. In practice, as shown in Fig. 2, the "normal" species does not tolerate the presence of PTEs, but dies at low concentrations in the soil of bioavailable PTEs; tolerant species ("indicators" and "excluders") will continue to survive up to certain concentrations of bioavailable PTEs in the soil, while "hyperaccumulators" survive at even higher concentrations of bioavailable PTEs in the soil. Thus, in theory, from the vegetation survey of a contaminated site, as the concentration of contaminants in the soil in a specific area increases, there will be a reduction in the number of species (in favour of more tolerant and hence competitive species) in the following order: "normal" plants > "indicators">

Tabella 3. Valore soglia di EPT nella parte aerea per definire specie iperaccumulatrici (Van der Ent et al., 2013)

Table 3. PTE threshold values in the aerial part to define hyperaccumulator species (Van der Ent et al., 2013)

EPT / PTEs	**Valore soglia / PTE concentration threshold**
Cd	100 (mg/kg)
Tl	100 (mg/kg)
Se	100 (mg/kg)
Co	300 (mg/kg)
Cu	300 (mg/kg)
Cr	300 (mg/kg)
Ni	1,000 (mg/kg)
Pb	1,000 (mg/kg)
As	1,000 (mg/kg)
Zn	3,000 (mg/kg)
Mn	10,000 (mg/kg)

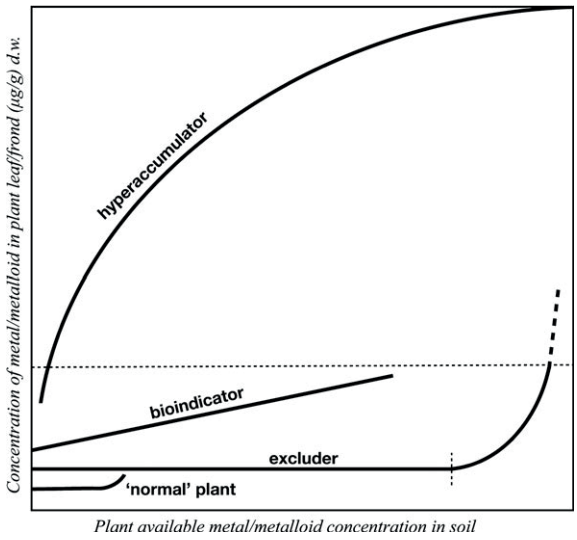


Figura 2. Grafico di risposta dell'assorbimento di EPT nelle diverse specie vegetali alla concentrazione di EPT biodisponibili nel suolo (Baker, 1981; McGrath et al.,1999)

Figure 2. Graph of the absorption response of PTEs in the different plant species to the concentration of bioavailable PTEs in soil (Baker, 1981; McGrath et al., 1999)

Tabella 4. Specie iperaccumulatrici di EPT (Van der Ent. et al. 2013)

Table 4. Hyperaccumulator species of PTEs (Van der Ent et al. 2013)

Specie / Species	**EPT** / PTEs
Gomphrena canescens, Thlaspi ochroleucum	Zn
Arabis paniculata	Cd, Pb e Zn
Ageratina sp. (Bech et al., 2016)	Pb, Zn
Carpobrotus rossii (Liu et al., 2016), *Arabidopsis halleri, Rorippa globulosa, Solanum nigrum, Sedum alfredii, Viola baoshanensis, Viola principis*	Cd
Thlaspi (Noccaea) caerulescens, Cortaderia hapalotricha (Bech et al. 2016)	Pb
Rinorea bengalensis, Pimelea leptospermoides	Ni
Biscutella laevigata, Iberis intermedia, Silene latifolia	Tl
Elsholtzia splendens, Commelina communis, Geniosporum tenuiflorum, Laportea ruderalis	Cu
Nyssa sylvatica	Co
Leersia hexandra, Spartina argentinensis,	Cr

Attualmente più di 500 specie vegetali sono state citate in letteratura quali iperaccumulatrici di uno o più elementi (As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Se, Tl, Zn) includendo 101 famiglie tra cui: *Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cumouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae* e *Euphobiaceae* (Sarma, 2011), quindi la presenza di tali specie può indicare la presenza di suoli altamente contaminati (Tab.4).

7.3. Parametri di riferimento e metodologia per l'analisi delle specie

La buona riuscita di un intervento di bonifica/messa in sicurezza di un sito contaminato ricorrendo a tecniche di fitorimedio, parte dalla scelta di specie adatte all'obbiettivo prefissato. Diversi autori ritengono che le migliori specie vegetali da utilizzare in un progetto di fitorimedio sono quelle spontanee presenti sul sito per le loro capacità di sopravvivenza, crescita, riproduzione in condizioni di forti stress ambientali, rispetto a piante introdotte da altri ambienti (Adriano, 2001).

Come detto in precedenza in questo capitolo, l'analisi della vegetazione spontanea può essere effettuata con la rilevazione floristica tramite il riconoscimento delle singole specie che costituiscono un'associazione vegetale. Una volta identificate le aree omogenee per contaminazione (se è stata effettuata una caratterizzazione precedente) o per tipologia di vegetazione ed una volta identificate le specie vegetali più efficienti nell'accumulare o meno EPT, è indispensabile campionare le diverse parti della pianta: parte aerea (foglie e fusti separati o l'intera parte aerea se non è possibile suddividerle) e radici. Il campionamento può essere effettuato prelevando tre o quattro piante della stessa specie nell'area omogenea o tre-quattro superfici note adiacenti (nel caso di specie pratensi) mantenendole separate per le successive analisi. Deve essere anche prelevato il suolo rizosferico delle singole piante campionate, scuotendo e raccogliendo il suolo che aderisce agli apparati radicali. Si procede quindi all'analisi chimica sia delle piante che dei rispettivi suoli rizosferici.

Dai risultati delle analisi ottenute è possibile calcolare degli indici per valutare l'efficienza di estrazione o stabilizzazione

"excluders"> "hyperaccumulators".

Currently over 500 plant species have been cited in the literature as hyperaccumulators of one or more elements (As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Se, Tl, Zn), comprising 101 families including: *Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cumouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae* and *Euphorbiaceae* (Sarma, 2011). Hence the presence of these species can indicate the co-presence of highly contaminated soils (Table 4).

The search for tolerant species by performing vegetation surveys in the study, however, has limitations related to the concentration of contaminants (only effective in highly contaminated sites) and type of contaminants (there is a reduction in the effectiveness of the survey when there are other contaminants that could have a synergistic effect) and is closely linked to the site in which it is conducted. Further studies are needed with different contaminated sites for more certainty on data taken from phytosociological surveys.

7.3. Parameters and methodology for species analysis

The success of remediation of a contaminated site, or at least making it safe, using phytoremediation techniques starts with the choice of species suited to the established goals. It is widely agreed that the best plant species to be used in a phytoremediation project are spontaneous species occurring *in situ* due to their great capacity for survival, growth, reproduction under conditions of severe environmental stress, and genetic tolerance of contamination by PTEs in soil compared with plants introduced from other environments (Adriano, 2001). As previously mentioned in this chapter, analysis of spontaneous vegetation may be carried out with floristic surveys, identifying individual plant species that constitute an association. Having identified areas which are homogeneous by contamination (if there has been previous characterization) or by vegetation type and once the plant species best at accumulating PTEs or otherwise have been identified, it is essential to sample the different plant parts: aerial part (leaves and stems separated or the whole aerial part if they cannot be separated) and roots. Sampling can be carried out by taking three or four plants (the aerial part and the roots) of the same species in the area identified or

di EPT. Tali indici sono il *bioaccumulation coefficient* (BAC), *bioconcentration factor* (BCF) e *translocation factor* (TF).
Il BAC e il BCF rappresentano la capacità della parte aerea e delle radici di accumulare EPT rispetto alla concentrazione di EPT nel suolo. Il BAC e il BCF vengono calcolati, rispettivamente, come il rapporto tra la concentrazione degli EPT nella parte aerea e radici delle piante e la concentrazione degli EPT nel rispettivo suolo rizosferico (Putwattana et al., 2015). Il TF invece, viene calcolato come rapporto tra la concentrazione di EPT nella parte aerea e la concentrazione di EPT nelle radici e indica l'abilità della pianta di traslocare EPT dalle radici alla parte aerea (Roongtanakiat, 2009).

$$BAC = \frac{concentrazione\ EPT\ parte\ aerea}{concentrazione\ EPT\ suolo}$$

$$BCF = \frac{concentrazione\ EPT\ radici}{concentrazione\ EPT\ suolo}$$

$$TF = \frac{concentrazione\ EPT\ parte\ aerea}{concentrazione\ EPT\ radici}$$

Le piante possono essere divise in quattro categorie in base al valore assunto dal BAC:
- non accumulatrici di EPT se BAC < 0.01;
- accumulatrici limitate di EPT se 0.01 < BAC < 0.1;
- accumulatrici moderate di EPT se 0.1 < BAC < 1.0;
- accumulatrici notevoli di EPT se 1.0 < BAC < 10.0 (Sekabira et al., 2011).

Le piante possono poi essere divise in altre tre categorie in base ai valori assunti dal BCF come:
- escludenti se BCF<1;
- accumulatrici se 1.0 < BCF < 10.0;
- accumulatrici notevoli se BCF > 10. (Ma et al., 2001).

Il terzo indice, il TF, rappresenta il grado di traslocazione di EPT dalle radici alla parte aerea. Se TF > 1 la traslocazione degli EPT determina un accumulo nella parte aerea (Fayiga and Ma, 2006) e le piante sono più efficienti nella fitoestrazione; se TF<1, gli EPT si accumulano negli apparati radicali e le specie sono più efficienti nella fitostabilizzazione.

7.4. Casi studio

Quanto detto finora nel presente capitolo può essere visto in due casi studio rappresentati da due siti contaminati: A) Sito agricolo contaminato da cromo e zinco per lo sversamento di fanghi conciari; B) Sito industriale contaminato da elevate concentrazioni totali e biodisponibili di piombo derivante dallo stoccaggio di batterie di autoveicoli esauste.
In diverse aree dei due siti (Fig. 3) è stato effettuato il rilievo delle specie presenti per effettuare:
1. valutazione della percentuale di copertura di ogni specie in ogni area;
2. prelievo delle specie rappresentative di ogni *area* (parte aerea, radici e suolo rizosferico);
3. calcolo dell'indice di biodiversità e dell'indice di Equità di Shannon.

three to four adjacent areas known (in the case of grass species), keeping them separated for subsequent analysis (representing repetitions) or combining the sampled parts (keeping the aerial part and roots separate) in a single representative sample. The rhizospheric soil of the species in question must also be sampled and kept separate for three to four repetitions (should sampled species be kept separate) or combined within a single representative sample (if the sampled plant species are combined). The plants and their rhizospheric soils are then analysed. The results of the analysis allow calculation of widely used indices in the context of phytoremediation to evaluate the extraction efficiency or stabilization of PTEs. These indices are the bioaccumulation coefficient (BAC), bioconcentration factor (BCF) and translocation factor (TF). BAC and BCF represent the capacity of the aerial part and roots to accumulate PTEs with respect to the concentration of PTEs in the soil. BAC and BCF are calculated, respectively, as the relationship between the concentration of PTEs in the aerial part and the roots of plants, and the concentration of PTEs in the respective rhizospheric soil (Putwattana et al., 2015). TF however, is calculated as the ratio of the PTE concentration in the aerial parts to that in the roots, and indicates the ability of PTEs to translocate from the roots to the aerial part (Roongtanakiat, 2009).

$$BAC = \frac{EPT\ concentration\ in\ shoots}{EPT\ concentration\ in\ soil}$$

$$BCF = \frac{EPT\ concentration\ in\ roots}{EPT\ concentration\ in\ soil}$$

$$TF = \frac{EPT\ concentration\ in\ shoots}{EPT\ concentration\ in\ roots}$$

The plants can be divided into four categories of PTE accumulation based on the value assumed by BAC:
- no accumulators of PTEs if BAC <0.01;
- limited accumulators of PTEs if 0.01 <BAC <0.1;
- moderate accumulators of PTEs if 0.1 <BAC <1.0;
- considerable accumulators of PTEs if 1.0 <BAC <10.0 (Sekabira et al., 2011).

The plants can then be divided into three categories according to the values assumed by BCF as:
- "excluders" if BCF <1;
- "accumulators" if 1.0 <BCF <10.0;
- considerable "accumulators" if BCF> 10. (Ma et al., 2001).

The third index, TF, represents the degree of translocation of PTEs from the roots to the aerial part. If TF> 1, then translocation of PTEs from the roots to the aerial part actually takes place (Fayiga and Ma, 2006).

7.4. Case studies

What is stated above can be illustrated by case studies of two contaminated sites: A) an agricultural site contaminated with chromium and zinc due to the spillage of tannery sludge; B) an industrial site contaminated with high total and bioavailable concentrations of lead resulting from the storage of exhausted vehicle batteries. In different plots

Figura 3. Inquadramento del Sito A (sx) e del Sito B (dx) con indicazione dei plots.

Figure 3. Image of Site A (left) and Site B (right) indicating the plots

Le specie più frequenti e con maggiore copertura rilevate nel rilievo floristico del sito A sono riportate in tabella 5.

Come si può vedere in tabella 5, il numero di specie, l'indice di biodiversità e equità di Shannon si riducono drasticamente nelle aree 6 e 10 corrispondenti prevalentemente ad un'unica specie, il *Rubus ulmifolius*. Analizzando le concentrazioni di EPT per le differenti aree (Tab. 6) si può osservare che le numero 6 e 10 presentano le massime concentrazioni di Pb, Cd e As nei suoli che hanno provocato una forte riduzione del numero di specie e dell'indice di Shannon.

at the two sites (Fig. 3) a floristic survey of species was carried out as follows:

1. The percentage of coverage of each species in each area was estimated;
2. The most representative species of each plot (aerial part, roots and rhizosphere soil) were sampled;
3. Shannon's diversity index and equitability index were then calculated.

The most frequent species with greater coverage recognized in the floristic survey of site A are shown in Table 5.

As can be seen in Table 5, the number of species, Shannon's diversity index and equitability index are drastically reduced in plots 6 and 10 corresponding mainly to a single species, *Rubus ulmifolius*. Analysing the concentrations of PTEs in the different plots (Tab. 6), it can be seen that plots 6 and 10 correspond to the highest concentrations of Pb, Cd and As in rhizosphere soils which resulted in a sharp reduction in the number of species and in the Shannon index for these two plots.

Tabella 5. Copertura delle specie rilevate con rilievo floristico nelle 11 aree (plot) del sito A

Table 5. Cover percentage of species detected with floristic survey in site A

Aree di saggio	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
Copertura totale vegetazione (%) / Total vegetation cover (%)	**100**	**100**	**100**	**90**	**95**	**100**	**100**	**90**	**100**	**100**	**90**
Artemisia annua				2	20						
Artemisia vulgaris	30										
Ballota nigra								45			
Cirsium arvense				50	7						
Dactylis glomerata				15			10		10		
Dittrichia viscosa	40	10			1						
Elymus repens				7			70	35	80		
Epilobium tetragonum	10	60		1	1						
Erigeron sumatrensis					7						
Holcus lanatus	20	5			25			5	1		
Rubus ulmifolius						100				100	
Sambucus ebulus			80								80
Silene latifolia				2			20	1	1		2
Sorghum halepense		25									
***Numero di specie** / Total number of species*	**4**	**4**	**5**	**7**	**7**	**1**	**3**	**3**	**3**	**1**	**4**
***Biodiversità di Shannon** / Shannon biodiversity index*	**1.33**	**1.03**	**0.00**	**1.36**	**1.76**	**0.00**	**0.71**	**0.87**	**0.50**	**0.00**	**0.29**
***Equità di Shannon** / Shannon equitability index*	**0.33**	**0.26**	**0.00**	**0.19**	**0.25**	**0.00**	**0.24**	**0.29**	**0.17**	**0.00**	**0.07**

Tabella 6. Concentrazioni di Pb, As e Cd nelle 11 aree (plot) del sito A

Table 6. Concentrations of Pb and Cd in soil of plots of Site A

Plot	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
Pb (mg kg^{-1})	409	10505	6231	2998	1567	**100000**	26538	26601	17509	**39263**	100
As (mg kg^{-1})	14	34	25	19	16	**861**	87	92	94	**97**	18
Cd (mg kg^{-1})	1.6	41.9	19.3	13.9	5.3	**298.6**	91.7	97.6	63.1	**153.2**	0.6

Analizzando le concentrazioni nella parte aerea e radici delle specie prelevate nei plot in cui è presente la maggiore concentrazione di Pb, As e Cd nei suoli rizosferici (Tab. 7), si può osservare che tutte le specie appartengono alla categoria degli esclusori citata prima, cioè quelle specie che tollerano gli EPT senza accumularli nei tessuti aerei e molto adatte alla fitostabilizzazione, infatti le concentrazioni di Pb, Cd, As nella parte aerea (evidenziate in blu) vengono mantenute molto basse rispetto alle concentrazioni degli stessi elementi nel suolo. In particolare, il rovo presente come unica specie nei plot 6 e 10 è la più tollerante e riesce a competere meglio con altre specie che non tollerano la contaminazione presente. Dall'analisi delle concentrazioni, è stato anche rilevato che la *Silene Latifolia* presente nel plot 7 è una iperaccumulatrice di Tl (come riportato anche da Escarrè et al. 2011), infatti la concentrazione di tale elemento nella parte aerea supera la concentrazione minima per tale elemento che è 10 volte superiore alla concentrazione dello stesso nel suolo (Van der Ent et al. 2013).

Analysing the concentrations in the aerial part and roots of species sampled in plots in which there is the highest concentration of Pb, As and Cd in rhizosphere soils (Tab. 7), the following may be observed: all species belong to the category of excluders mentioned above, i.e. those species that tolerate PTEs without accumulating them in their aerial part and are very suitable for phytostabilization. Indeed, concentrations of Pb, Cd and As in the aerial part are kept very low compared to the concentrations of these elements in the soil. In particular, the blackberry present as single species in plots 6 and 10 is the most tolerant and able to outcompete other species that cannot tolerate the contamination present. From the analysis of concentrations, it was also noted that the *Silene latifolia* present in plot 7 is a hyperaccumulator of Tl (as also reported by Escarré et al. 2011). Indeed, the concentration of this element in the aerial part exceeds the minimum concentration for the element in question which is 10 times higher than the concentration of the same in the soil (Van der Ent et al. 2013).

Tabella 7. Contenuto di Pb, Cd, Tl e As in parte aerea, radici e suoli rizosferici delle piante nel sito A

Table 7. Contents of Pb, Cd, Tl and As in different parts of the plants sampled from Site A

	Pb (mg/Kg)			Cd (mg/Kg)			Tl (mg/Kg)			As (mg/Kg)		
Plot/specie Plot/Plant species	**Parte aerea /** Aerial part	**Radici /** Roots	**Suoli /** Soils	**Parte aerea /** Aerial part	**Radici /** Roots	**Suoli /** Soils	**Parte aerea /** Aerial part	**Radici /** Roots	**Suoli /** Soils	**Parte aerea /** Aerial part	**Radici /** Roots	**Suoli /** Soils
6. Rubus ulmifolius	67	232	100000	0.2	4.2	298.6	0.0	0.3	1.7	0.2	0.4	861.0
7. Silene latifolia	217	3404	49647	7.7	41.2	175.6	**102.5**	**44.0**	**9.4**	0.9	20.7	159.0
7. Elymus repens	433	n.a.	3429	5.3	n.a.	7.8	1.1	n.a	7.9	0.3	n.a	15.0
8. Elymus repens	290	2492	32067	9.5	40.1	140.3	1.8	3.3	5.5	0.2	2.5	99.0
8. Ballota nigra	176	671	21135	5.9	20	55.0	1.7	4.1	5.9	0.6	<0.1	86.0
9. Elymus repens	125	322	12760	0.8	12.3	30.6	0.1	0.35	2.3	0.1	1.1	96.0
9. Dactylis glomerata	228	634	22258	4.1	15.4	95.6	0.1	0.5	2.1	0.4	4.7	93.0
10. Rubus ulmifolius	107	136	39263	1.8	3.0	153.2	0.4	0.8	3.8	<0.1	<0.1	97.0
Soglie vegetali / Threshold values (EC REG 1275/2013)	34			1.1					10	2		
CSC per suoli industriali / Screening values for industrial soils			1000			15						50
Soglie delle imperccumulatrici / Thresholds for hyperaccumulator (Van der Ent et al. 2013)	1000			100			**100**			1000		

Tabella 8. Copertura delle specie rilevate con rilievo floristico nel sito B

Table 8. Cover percentage of species detected with floristic survey in site B

Aree di saggio	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
Copertura vegetale / Total vegetation cover	70	74	81	100	81	90	63	100	74	100	35
Altezza vegetazione / Average vegetation height	100	40	40	30	40	30	50	40	60	40	40
Amaranthus retroflexus						20					
Artemisia annua							1			2	5
Aster tripolium						10			20		
Chenopodium album									1		5
Cirsium arvense	60			20							
Cynodon dactylon		1		70		10	40	20	40	72	5
Cyperus rotundus				10			1				5
Echium vulgare							5			7	
Epilobium angustifolium							1	1			
Erigeron sumatrensis	10		30			50	15	40		17	
Hedera helix									5		
Holcus lanatus									5		
Hordeum leporinum			40					4			
Lactuca sp.		1									
Lolium perenne		50			60						10
Lophochloa cristata			10								
Malva sylvestris										2	
Melilotus albus									1		
Mercurialis annua								30			
Parietaria diffusa			1								
Piptatherum thomasii		10			10			5			
Raphanus landra		1									
Rumex sp.		10			10						
Solanum nigrum					1						
Sonchus oleraceus		1							1		5
Trifolium repens									1		
Numero di specie / *Total number of species*	**2**	**7**	**4**	**3**	**4**	**4**	**6**	**6**	**8**	**5**	**6**
Biodiversità di Shannon / *Shannon biodiversity index*	**0.54**	**0.85**	**0.73**	**0.80**	**0.77**	**1.13**	**0.85**	**1.35**	**0.69**	**0.77**	**0.53**
Equità di Shannon / *Shannon equitability index*	**0.27**	**0.12**	**0.18**	**0.27**	**0.19**	**0.28**	**0.14**	**0.22**	**0.09**	**0.15**	**0.09**

Le specie più frequenti e con maggiore copertura rilevate nel rilievo floristico del sito B sono riportate in tabella 8
Mentre le concentrazioni degli EPT nei suoli dei singoli plot sono mostrati in tabella 9.
Nel sito B la contaminazione non influenza il numero di specie o l'indice di biodiversità dei plot come è meglio evidenziato analizzando il contenuto di EPT delle singole specie dei plot (Tab. 10).

The most frequent species with greater coverage, as recognized in the floristic survey of Site B, are shown in Table 8..
By contrast, the concentrations of the PTEs in soils of the individual plots are shown in Table 9.
In Site B contamination does not affect the number of species or biodiversity of plots, as best evidenced by analysing the content of the PTEs of individual species in the plots (Tab. 10).

Tabella 9. Concentrazioni di Pb, Cr e Cd nei plot considerati per il sito B

Table 9. Concentrations of Pb, Cr and Cd in soil of plots of Site B

Plot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nr. di specie / N. of species	2	7	4	3	4	4	6	6	8	5	6
Pb (mg /kg^{-1})	101	101	161	92	122	88	84	117	89	83	180
Cd (mg/kg^{-1})	0,6	0,6	0,8	<0,1	12,0	9,6	0,6	1,0	0,7	0,6	1,5
Cr (mg/kg^{-1}) Soil	348	221	325	415	759	954	851	764	332	317	266

Tabella 10. Contenuto di Pb, Cd e Cr in parte aerea, radici e suoli rizosferici delle piante nel sito B.

Table 10. Contents of Pb, Cd and Cr in different parts of the plants sampled from Site B

Plot/ specie / Plot/Plant species	Pb (mg/Kg)			Cd (mg/Kg)			Cr (mg/Kg)		
	Parte aerea / Aerial part	Radici / Roots	Suoli / Soils	Parte aerea / Aerial part	Radici / Roots	Suoli / Soils	Parte aerea / Aerial part	Radici / Roots	Suoli / Soils
Amaranthus retroflexus	**2,2**	0,7	84	**2,6**	1,8	**9,6**	2,2	6,5	1414
Aster tripolium	0,3	0,5	81	0,1	0,1	0,5	3,2	4,7	137
Cirsium arvense	0,4	1,0	**106**	0,1	0,1	0,6	2,5	8,8	357
Cynodon dactylon	**1,1**	2,5	89	0,1	0,2	0,7	6,5	19,8	525
Cyperus rotundus	**1,1**	4,1	83	0,3	0,2	0,8	25,2	6,9	504
Echium vulgare	0,4	1,0	83	0,0	0,0	0,6	1,8	3,4	492
Erigeron sumatrensis	0,5	1,3	**136**	**1,3**	0,8	0,8	2,2	4,5	674
Hordeum leporinum	0,5	3,8	100	0,0	0,1	0,6	3,1	9,8	142
Lolium perenne	0,8	5,3	152	0,1	0,2	7,1	4,7	45,4	472
Mercurialis annua	0,7	2,4	141	0,0	0,1	1,5	3,8	9,6	509
Piptatherum thomasii	0,7	20,4	156	0,1	0,1	0,0	2,6	173,2	415
Rumex sp.	0,7	2,6	109	0,0	0,1	0,6	2,5	11,4	158
Limiti / Threshold concentrations in the aerial part (REG UE N. 1275/2013)	**0,7**			**0,3**					
CSC per i suoli residenziali / CCT residential soils (col. A D.Lgs. 152/06)			100			2			150

Tabella 11. Confronto tra numero di specie, Indice di Biodiversità e Indice di Equità di Shannon tra i siti A e B.

Table 11. Comparison between the number of species, the Biodiversity and Equitability Index of Shannon for sites A and B.

Sito / Site	Numero di specie / No. of species	Biodiversità di Shannon / Shannon Biodiversity Index	Equità di Shannon / Shannon Equitability Index
A	3	0.71	0.16
B	5	0.82	0.18

La Tabella 10 mette in evidenza un altro aspetto che esula dal presente capitolo, ma è molto importante per la identificazione di siti realmente contaminati. Infatti una volta definito un sito agricolo come potenzialmente contaminato (concentrazioni EPT>CSC, vedi cap.2), per definire il rischio indiretto per la salute dei consumatori, bisogna analizzare il contenuto di contaminanti nei prodotti vegetali. Come evidenziato in grassetto in Tabella 10, nei casi in cui si superano le CSC nei suoli, i contaminanti nelle piante non superano i limiti del REG UE N. 1275/2013 per i foraggi e, viceversa, nei casi in cui si ha il superamento dei limiti nei vegetali, non si ha il superamento delle CSC nei suoli. Questo aspetto conferma l'importanza di considerare la quota biodisponibile degli EPT e non tanto il loro contenuto totale (vedi cap. 6b) e di effettuare test biologici con le piante per definire i rischi indiretti per i consumatori (vedi cap. 14).

Infine, confrontando numero di specie, indici di biodiversità e di equità dei due siti (Tab. 11) si può osservare come i valori minori si hanno nel sito A dove il fattore di disturbo maggiore (contaminazione) ha provocato la selezione di specie maggiormente tolleranti gli EPT a discapito di altre più sensibili.

7.5 Bibliografia

Adriano D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York.

Alvarenga P., Gonc¸alves A.P., Fernandes R.M., de Varennes A., Vallini G., Duarte E., Cunha Queda A.C., 2009. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) effects on soil chemical characteristics. Chemosphere 74:1292–1300.

Alvarez E., Fernandez Marcos M. L., Vaamonde C., Fernandez-Sanjurjo M. J., 2003. Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. Sci Total Environ 313:185–197.

Baker A.J.M., 1981. Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3, 643–654.

Barbosa B., Boléo S., Sidella S., Costa J., Duarte M. P., Mendes B., Cosentino S. L., Fernando A.L., 2016. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils Using the Perennial Energy Crops Miscanthus spp. and Arundo donax L. Bioenerg. Res 8:1500–1511.

Bech J., Roca N., Tume P., Ramos-Miras J., Gil C., Boluda R., 2016. Screening for new accumulator plants in potential hazards elements polluted soil surrounding Peruvian mine tailings. Catena 136:66–73.

Bonanno G., Lo Giudice R., 2010. Heavy metal bioaccumulation by the organs of Phragmites australis (common reed) and their potential use as contamination indicators. Ecological Indicators 10 639–645.

Chaney R., Li Y., Brown S., Homer F., Malik M., Scott

Table 10 highlights another aspect that goes beyond the present chapter, but which is very important for the identification of contaminated sites. In fact, according to the current legislation (Law Decree no. 152/06) a soil is considered potentially contaminated if the contamination thresholds (CCTs) of soils reported for each PTE in column A (residential sites) or in column B (industrial sites) are exceeded. However, as shown in bold in Tab. 10, when the CCTs in soils were exceeded, plant contaminants did not exceed the legal values for plants (EU REG No. 1275/2013) and, vice versa, when the threshold values were exceeded in the plants, the CCTs in soils were not exceeded. This aspect highlights the importance of considering the bioavailable portion of PTEs and not the total share present in soils to ascertain the real contamination of soils and the hazardousness for public health.

On comparing the average number of species, indexes of biodiversity and equitability of the two sites (Tab. 11), it can be observed that smaller values are present in site A where the factor of greatest disturbance (contamination) led to the selection of species more tolerant to PTEs to the detriment of others which were more PTE-sensitive.

7.5. Bibliography

Adriano D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York.

Alvarenga P., Gonc¸alves A.P., Fernandes R.M., de Varennes A., Vallini G., Duarte E., Cunha Queda A.C., 2009. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) effects on soil chemical characteristics. Chemosphere 74:1292–1300.

Alvarez E., Fernandez Marcos M. L., Vaamonde C., Fernandez-Sanjurjo M. J., 2003. Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. Sci Total Environ 313:185–197.

Ash H., Gemmell R., Bradshaw, A., 1994. The introduction of native plant species on industrial waste heaps: a test of immigration and other factors affecting primary succession. J. Appl. Ecol. 31, 74–84.

Baker A.J.M., 1981. Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3, 643–654.

Barbosa B., Boléo S., Sidella S., Costa J., Duarte M. P., Mendes B., Cosentino S. L., Fernando A.L., 2016. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils Using the Perennial Energy Crops Miscanthus spp. and Arundo donax L. Bioenerg. Res 8:1500–1511.

Bech J., Roca N., Tume P., Ramos-Miras J., Gil C., Boluda R., 2016. Screening for new accumulator plants in potential hazards elements polluted soil surrounding Peruvian mine tailings. Catena 136:66–73.

Bonanno G., Lo Giudice R., 2010. Heavy metal bioaccumulation by the organs of Phragmites australis (common reed) and their potential use as contamination

J., 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction. Plant Soil 101, 129–158.

Escarré J., Lefèbvre C., Raboyeau S., Dossantos A., Gruber W., Cleyet Marel J. C., Frérot H., Noret N., Mahieu S., Collin C., Van Oort F., 2011. Heavy Metal Concentration Survey in Soils and Plants of the Les Malines Mining District (Southern France):Implications for Soil. Rest. Water Air Soil Pollut. 216:485–504

Fayiga A.Q., Ma L.Q., 2006. Using phosphate rock to immobilize metals in soils and increase arsenic uptake in Pteris vittata. Sci. Total Environ. 359, 17-25.

Fellet G., Marchiol L., Perosa D., Zerbi G., 2007. The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders. Ecol Eng 31:207–214.

Houda Z., Bejaoui Z., Albouchi A., Gupta K. D., Corpas F. J., 2016. Comparative study of plant growth of two poplar tree species irrigated with treated wastewater, with particular reference to accumulation of heavy metals (Cd, Pb, As, and Ni). Environ. Monit. Assess. 188: 99

Kim I.S., Kang H.K., Johnson-Green P., Lee E.J., 2003. Investigation of heavy metal accumulation in Polygonum thunbergii for phytoextraction. Environ Pollut 126(2), 235–243.

Lambrechts T., Couder E., Bernal P., Faz A., Iserentant A., Lutts S., 2011. Assessment of Heavy Metal Bioavailability in Contaminated Soils from a Former Mining Area (La Union, Spain) Using a Rhizospheric Test. Water Air Soil Pollut 217:333–346.

Liu W., Zhang C., Hul P, Luo1 Y., Wu L., Sale P., Tang C., 2016. Influence of nitrogen form on the phytoextraction of cadmium by a newly discovered hyperaccumulator Carpobrotus rossii. Environ. Sci. Pollut. Res., 23:1246–1253.

Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W., Cai Y., Kennelley, E.D., 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. Nature 409 (6820), 579-579.

Ma L., Rao X., Lu P., Huang S., Chen X., Xu Z., Xie J., 2015. Acid-tolerant plant species screened for rehabilitating acid mine drainage sites. J Soils Sediments 15:1104–1112.

Macnair, M. R., 1987. Heavy metal tolerance in plants: A model evolutionary system. Trends in Ecology & Evolution, 2(12), 354–359.

Mahbuboor R. C., Mohammad S. I., Zaki U. A., Farnia N., 2016. Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Buriganga Riverbed Sediment by Indian Mustard and Marigold Plants. Environmental Progress & Sustainable Energy 35:117-124.

Marchiol L., Sacco P., Assolari S., Zerbi G., 2004. Reclamation of polluted soil: phytoremediation potential of crop-related Brassica species. Water Air Soil Pollut 158:345–356

McGrath S. P., Dunham S.J., Correll R.L., 1999. Potentindicators. Ecological Indicators 10 639–645.

Chaney R., Li Y., Brown S., Homer F., Malik M., Scott J., 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction. Plant Soil 101, 129–158.

Díaz W., and Elcoro, 2009. S. Pioneer plant species in disturbed mining areas in Bolívar State, Venezuela. Acta Bot. Venez; 32 (2), 453–466.

Escarré J., Lefèbvre C., Raboyeau S., Dossantos A., Gruber W., Cleyet Marel J. C., Frérot H., Noret N., Mahieu S., Collin C., Van Oort F., 2011. Heavy Metal Concentration Survey in Soils and Plants of the Les Malines Mining District (Southern France):Implications for Soil. Rest. Water Air Soil Pollut. 216:485–504

Fayiga A.Q., Ma L.Q., 2006. Using phosphate rock to immobilize metals in soils and increase arsenic uptake in Pteris vittata. Sci. Total Environ. 359, 17e25.

Fellet G., Marchiol L., Perosa D., Zerbi G., 2007. The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders. Ecol Eng 31:207–214.

Houda Z., Bejaoui Z., Albouchi A., Gupta K. D., Corpas F. J., 2016. Comparative study of plant growth of two poplar tree species irrigated with treated wastewater, with particular reference to accumulation of heavy metals (Cd, Pb, As, and Ni). Environ. Monit. Assess. 188: 99

Kim I.S., Kang H.K., Johnson-Green P., Lee E.J., 2003. Investigation of heavy metal accumulation in Polygonum thunbergii for phytoextraction. Environ Pollut 126(2), 235–243.

Lambrechts T., Couder E., Bernal P., Faz A., Iserentant A., Lutts S., 2011. Assessment of Heavy Metal Bioavailability in Contaminated Soils from a Former Mining Area (La Union, Spain) Using a Rhizospheric Test. Water Air Soil Pollut 217:333–346.

Liu W., Zhang C., Hul P, Luo1 Y., Wu L., Sale P., Tang C., 2016. Influence of nitrogen form on the phytoextraction of cadmium by a newly discovered hyperaccumulator Carpobrotus rossii. Environ. Sci. Pollut. Res., 23:1246–1253.

Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W., Cai Y., Kennelley, E.D., 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. Nature 409 (6820), 579-579.

Ma L., Rao X., Lu P., Huang S., Chen X., Xu Z., Xie J., 2015. Acid-tolerant plant species screened for rehabilitating acid mine drainage sites. J Soils Sediments 15:1104–1112.

Macnair, M. R., 1987. Heavy metal tolerance in plants: A model evolutionary system. Trends in Ecology & Evolution, 2(12), 354–359.

Mahbuboor R. C., Mohammad S. I., Zaki U. A., Farnia N., 2016. Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Buriganga Riverbed Sediment by Indian Mustard and Marigold Plants. Environmental Progress & Sustainable Energy 35:117-124.

Marchiol L., Sacco P., Assolari S., Zerbi G., 2004.

tial for phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plants. In: Terry N, Bañuelos GS (eds) Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press, pp 109–128

Murakami M., Ae N., 2009. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (Oryza sativa L.), soybean (Glycine max [L.] Merr.), and maize (Zea maysL.). J Hazard Mater 162:1185–1192

Pollard A. J., Powell K. D., Harper F. A., Smith J. A. C., 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. Crit Rev Plant Sci 21:539–566.

Putwattana N., Kruatrachue M., Kumsopa A., Pokethitiyook P., 2015. Evaluation of organic and inorganic amendments on maize growth and uptake of cd and zn from contaminated paddy soils. Int. J. Phytoremediation 17 (2), 165-174.

Roongtanakiat N., 2009. Vetiver phytoremediation for heavy metal decontamination. Tech. Bull. 2, 1-20.

Sartori F. et al., 1997. Bioindicatori Ambientali. Fondazione Lombardia per l'Ambiente.

Sarma, H., 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. Environmental Science and Technology 24, 118–138.

Sekabira K., Oryeme Origa H., Mutumba G., Kakudidi E., Basamba T.A., 2011. Heavy metal phytoremediation by Commelina benghalensis (L) and Cynodon dactylon (L) growing in urban stream sediments. Int. J. Plant Physiol. Biochem. 3 (8), 133-142.

Shannon C.E., Weaver W., 1963. The Mathematical Theory of Comunication. University of Illinois Press, Urbana, 117.

Tassi E., Pouget J., Petruzzelli G., Barbafieri M., 2008. The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals. Chemosphere 71:66–73.

Van der Ent A., Baker A. J. M., Reeves R. D. A., Pollard A. J., Schatet H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. Plant Soil 362: 319-334.

Reclamation of polluted soil: phytoremediation potential of crop-related Brassica species. Water Air Soil Pollut 158:345–356

McGrath S. P., Dunham S.J., Correll R.L., 1999. Potential for phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plants. In: Terry N, Bañuelos GS (eds) Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press, pp 109–128

Murakami M., Ae N., 2009. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (Oryza sativa L.), soybean (Glycine max [L.] Merr.), and maize (Zea mays L.). J Hazard Mater 162:1185–1192

Pollard A. J., Powell K. D., Harper F. A., Smith J. A. C., 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. Crit Rev Plant Sci 21:539–566.

Putwattana N., Kruatrachue M., Kumsopa A., Pokethitiyook P., 2015. Evaluation of organic and inorganic amendments on maize growth and uptake of cd and zn from contaminated paddy soils. Int. J. Phytoremediation 17 (2), 165-174.

Roongtanakiat N., 2009. Vetiver phytoremediation for heavy metal decontamination. Tech. Bull. 2, 1-20.

Sartori F. et al., 1997. Bioindicatori Ambientali. Fondazione Lombardia per l'Ambiente.

Sarma, H., 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. Environmental Science and Technology 24, 118–138.

Sekabira K., Oryeme Origa H., Mutumba G., Kakudidi E., Basamba T.A., 2011. Heavy metal phytoremediation by Commelina benghalensis (L) and Cynodon dactylon (L) growing in urban stream sediments. Int. J. Plant Physiol. Biochem. 3 (8), 133-142.

Shannon C.E., Weaver W., 1963. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana, 117.

Tassi E., Pouget J., Petruzzelli G., Barbafieri M., 2008. The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals. Chemosphere 71:66–73.

Van der Ent A., Baker A. J. M., Reeves R. D. A., Pollard A. J., Schatet H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. Plant Soil 362: 319-334.

8. La caratterizzazione della risposta idrologica del suolo per applicazioni dell'analisi del rischio

N. Romano, P. Nasta, M. Palladino

8.1. Premesse

Per lo studio dei processi di inquinamento, puntuali o diffusi, del suolo e delle acque sotterranee è necessario analizzare in via preliminare componenti naturali caratterizzate da un elevato grado di complessità. L'origine di tale complessità è connaturata alle due principali componenti, suolo e acque sotterranee, poiché esse da un lato manifestano notevole eterogeneità naturale, dovuta essenzialmente alla diversa origine delle formazioni geologiche e alla pedogenesi, mentre dall'altro lato sono intimamente interconnesse fra loro dai processi del ciclo idrologico che hanno luogo nel sistema suolo-vegetazione-atmosfera e che, a loro volta, possono essere modificati da insediamenti umani e intense attività agricole oppure da pratiche di stoccaggio e sversamento non corrette o addirittura illecite. Queste complessità rendono difficilmente prevedibili a priori l'effettivo impatto che una contaminazione avrà sull'ambiente, sia in termini di estensione territoriale sia di persistenza temporale. Pertanto, la valutazione del rischio deve descrivere e interpretare le complessità illustrate per potere quindi valutare con adeguata rispondenza la probabilità di occorrenza di specifici danni alla salute umana e all'ecosistema.

Un contaminante rilasciato alla superficie del suolo può essere interessato a diversi processi di natura sia fisico-chimica sia biologica. Uno dei principali processi che l'analisi del rischio deve tenere conto è senza dubbio il trasporto del soluto inquinante fino alla falda acquifera. Il principale motivo dell'importanza di tale processo risiede nell'elevato valore intrinseco di una falda come risorsa idrica e anche perché una falda, a seconda delle specifiche condizioni idrogeologiche, può propagare le sostanze inquinanti anche a notevole distanza dal punto di immissione.

Il movimento e la diffusione di un contaminante nel suolo e verso il sottosuolo dipendono anche dalle complesse interazioni, soprattutto di natura fisico-chimico che l'inquinante medesimo intrattiene con il suolo e dai fenomeni di adsorbimento più o meno accentuati che hanno luogo sia sulle superfici di scambio di natura inorganica sia con la frazione organica del suolo. Queste interazioni tendono a rallentare i fenomeni di diluizione e di smaltimento: le acque di precipitazione o di irrigazione, pur trasportando il contaminante, non riescono a "lavare" il suolo. È proprio a causa della persistenza della presenza degli inquinanti del suolo che certe sostanze possono agevolmente espandersi e perdurare anche per decine di anni dopo la cessazione della immissione e che rappresenta una specificità delle problematiche connesse ai fenomeni di contaminazione dei suoli.

Come accennato, tutti gli inquinanti rilasciati nel suolo sono soggetti a fenomeni di accumulo e/o trasformazione e/o migrazione. La corretta definizione e previsione delle

8. On characterizing the hydraulic response of soil for risk assessment

N. Romano, P. Nasta, M. Palladino

8.1. Introduction

To study point or diffuse pollution phenomena in soil and groundwater it is necessary to first characterize natural components that show a high degree of complexity. This complexity is inherent to the two main components of the system at hand, namely soil and groundwater, because, on the one hand, they have significant natural heterogeneity, mainly due to the different origin of the geological formations and the pedogenesis factors. On the other, they are intimately interconnected by the hydrological processes occurring in the soil-vegetation-atmosphere system and which, in turn, can be altered by human settlements, intensive agricultural practices, waste storage and disposal, as well as incorrect or even illegal spills. These complexities make it difficult to predict *a-priori* the actual impact that a contamination will have on the environment, in terms of both spatial extent and temporal persistence. Therefore, risk assessment of contamination should describe and interpret these complexities adequately in order to evaluate correctly the probability of occurrence of specific damage to human health and the ecosystem.

A contaminant released on the soil surface can be involved in different physico-chemical and biological processes. One of the most important processes that a risk assessment tool should account for is undoubtedly solute transport towards the groundwater. The main reason why this is a key issue lies in the great intrinsic value of the aquifer as a water resource and in the fact that an aquifer, depending on its hydrogeological features, can propagate the potentially dangerous substances over long distances from the source. The movement and diffusion of a contaminant through soil and towards the saturation zone also depend on complex interactions, especially of a physico-chemical nature, that the contaminant itself has with the porous medium and on the more or less strong adsorption phenomena occurring on the inorganic exchange surfaces and in the soil organic fraction. Such interactions tend to slow down the contribution of dilution to the natural attenuation of contaminants: precipitation or irrigation waters, though helping to transfer contaminants, are unable to "wash" the soil. As a result of the persistent presence of contaminants in the soil, some substances can easily diffuse and last even for decades after emission has ceased. This is a specific feature of the problems linked to soil contamination.

As mentioned above, all of the substances released in the soil are exposed to accumulation, and/or transformation, and/or migration phenomena. Accurate prediction of these fractions is essential to evaluate the spatial and temporal extent of the contamination and its potential impact on the environment as well as enable effective remediation measures to be implemented.

The fundamental mechanism that governs the movement

aliquote appena definite è essenziale per potere valutare l'estensione spaziale e temporale della contaminazione e il suo possibile impatto sull'ambiente e per progettare ed istituire efficaci opere di bonifica o di contenimento.
Il meccanismo più generale di infiltrazione nel suolo dei contaminanti rilasciati sulla sua superficie agisce attraverso le acque meteoriche, che dilavano i contaminanti e ne permettono l'infiltrazione nel terreno, portando nel sottosuolo e verso la falda i contaminanti disciolti. Nel caso peggiore, i contaminanti possono muoversi direttamente percolando verso il basso attraverso la matrice porosa del suolo. La zona del non saturo si trova al di sopra della falda acquifera. Durante i processi di moto dell'acqua lungo la direzione verticale verso la falda, gli inquinanti vengono in parte trattenuti dal suolo, cui possono aderire per fenomeni di adsorbimento. Se la quantità è sufficiente, le sostanze possono in forma fluida raggiungere la zona satura. Sia gli inquinanti trattenuti dalle particelle del suolo che quelli a contatto con la falda saranno poi dilavati dall'acqua piovana e di falda, che determineranno una lenta e continua dissoluzione di alcuni dei componenti portando alla contaminazione dell'acquifero. Il movimento e la migrazione di un contaminante nel suolo sono dovuti a due tipi di fenomeni: quelli microscopici di diffusione molecolare e quelli macroscopici che seguono le leggi dell'idrodinamica. Tralasciando la diffusione molecolare, che presenta in genere un modesto impatto sul movimento globale di contaminanti nel sistema suolo-pianta-atmosfera, i movimenti macroscopici di acqua e sostanze inquinanti sono alquanto complessi perché regolati dalle leggi dell'idrodinamica, in cui il fluido si muove sotto l'azione di forze esterne come la gravità o il gradiente del potenziale matriciale. Tali processi sono molto influenzati dalle interazioni con le particelle solide del suolo e dai fenomeni di percolazione, di adesione superficiale, capillarità, convezione termica e advezione. L'advezione è lo scorrimento dell'acqua di falda, con il contaminante in essa disciolto, che avviene in risposta ai gradienti idraulici, ossia le differenze di livello freatico nelle falde a superficie libera oppure le differenze di quota piezometrica nelle falde confinate. Insieme con l'entità dei gradienti idraulici, la velocità di scorrimento dipende dalla natura del suolo stesso e, soprattutto, dal diametro dei suoi pori. Il movimento dell'acqua e dei soluti in essa disciolti dipendono dalle proprietà del fluido, in particolare da viscosità, densità, tensione superficiale, e da quelle del mezzo poroso, definite proprietà idrauliche del suolo.
Il principale obiettivo di questo capitolo è fornire una rassegna critica su questioni connesse alla caratterizzazione delle proprietà idrauliche di un suolo e alla descrizione della loro variabilità spaziale rispetto alla scala di interesse del problema da trattare.

8.2. Moto dell'acqua e trasporto di soluti nel sistema suolo-vegetazione-atmosfera

Studi di idrologia del suolo considerano solitamente come elemento di base il "pedon", inteso come un volume di suolo con area compresa fra 1 e 10 m^2 e tale da consentire valutazioni rappresentative delle sue proprietà sia in orizzontale sia in verticale. E' questa

of contaminants released on the soil surface or in the uppermost soil layer takes place through stormwater or irrigation water that infiltrates the ground surface and enables the substances to be transported towards the aquifer. In the worst case, the contaminants percolate directly downwards through the porous medium. The vadose zone is located above the groundwater and contains the plant roots. While soil water moves along the vertical direction of a soil profile towards the phreatic aquifer, the contaminants are in part tightly bound with the soil particles and organic matter due to adsorption phenomena. With a high enough contaminant concentration, the substance can reach the saturation zone. Contaminants that are both binding to soil and reaching the groundwater will then leach due to stormwater and groundwater that cause a slow and continuous dissolution of some components leading to groundwater pollution. The transport of a contaminant in the soil is mainly caused by two different phenomena: the microscopic process of molecular diffusion and the macroscopic process governed by hydrodynamic equations. Disregarding the molecular diffusion that usually has a scant impact on the global movement in the soil-vegetation-atmosphere system, macroscopic water flow and solute transport processes are quite complex and governed by forces such as gravity and those relating to differences in the total hydraulic potential. These processes are highly affected by the interactions with the soil particles and other phenomena such as advection, surface tension, percolation, and thermal convection.
The aim of this chapter is to provide the reader with a critical account of the major issues relevant to proper characterization of soil hydraulic properties and the more effective description of their spatial variations depending on the scale of interest for the environmental problem being tackled.

8.2. Water flow and solute transport in the soil-vegetation-atmosphere system

Soil hydrology studies commonly assume as a basic element the "pedon", which is viewed as a soil volume with an area ranging from 1 m^2 to 10 m^2 and such as to enable representative evaluations about its properties to be retrieved in both vertical and horizontal directions. This is the soil unit that is described by a pedologist and then characterized from the hydraulic point of view for analyzing hydrological processes.
Soil water flow at the field scale is a dynamic process with alternate sequences of wetting and drying. During rainfall or irrigation, water infiltrates into the soil and continues to move to greater depths, increasing the water content of the soil profile. When water enters an initially dry soil for prolonged periods of time, a transmission zone with relatively high, uniform water content is established. This zone overlies a wetting zone where the water content decreases rapidly with increasing depth and reaches its initial value near the wetting front. At the cessation of infiltration the process of redistribution commences. The wetting front continues to move downward at a decreasing rate, wetting the deeper part of the profile with

l'unità di suolo che è classificata dal pedologo ed è poi caratterizzata dal punto di vista idraulico per analizzare i processi idrologici.
Il movimento dell'acqua nel suolo è un processo complesso che evolve con continuità nel tempo e può ricondursi, in modo schematico, a un alternarsi di fenomeni di infiltrazione e ridistribuzione. In conseguenza di apporti meteorici o irrigui, l'acqua s'infiltra attraverso la superficie superiore del suolo e muove impegnando nel tempo spazi sempre maggiori del profilo. Se il processo di infiltrazione evolve in un profilo essenzialmente uniforme con contenuti d'acqua iniziali modesti, è evidente lo stabilirsi di una zona di trasmissione, ove i contenuti d'acqua sono relativamente elevati e variano poco con la profondità, sovrapposta ad una zona di inumidimento caratterizzata invece da contenuti d'acqua che rapidamente si riducono per raggiungere il valore iniziale in prossimità del cosiddetto fronte di inumidimento. Quando termina l'alimentazione sulla superficie, si avvia un fenomeno di ridistribuzione dell'acqua nel suolo con un fronte di inumidimento che continua a spostarsi verso gli strati inferiori del suolo, con velocità che si riduce rapidamente nel tempo. L'acqua si ridistribuisce nel profilo di suolo, interessando spazi sempre più profondi a spese di quella che abbandona la zona superficiale con maggiore grado di saturazione. Nella parte più superficiale del profilo, i contenuti d'acqua possono ridursi più rapidamente per effetto di processi di evaporazione diretta attraverso la superficie del suolo e per l'attingimento da parte delle radici delle piante. Inoltre, in presenza di una falda poco profonda e intensi fenomeni di evapotraspirazione può instaurarsi un flusso ascendente dell'acqua diretto dalla falda verso gli strati più superficiali del suolo. Analisi teoriche e riscontri sperimentali hanno evidenziato che, per un medesimo suolo, le distribuzioni del contenuto d'acqua nel profilo durante le fasi di ridistribuzione e di evaporazione dalla superficie assumono andamenti strettamente legati al processo di infiltrazione che li ha preceduti, quindi al volume e alle modalità di somministrazione, nonché ai contenuti d'acqua presenti inizialmente nel suolo.
Alla scala di pedon, alcune indagini teoriche (Dagan, 1986; Sposito, 1986) e numerosi riscontri sperimentali (Santini, 1975; Vauclin et al., 1979) hanno mostrato che i processi ora discussi di moto dell'acqua nel suolo in prossimità dell'apparato radicale della vegetazione sono essenzialmente mono-dimensionali in verticale e possono essere convenientemente descritti utilizzando l'equazione di Richards:

$$C(h)\frac{\partial h(z,t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z}\left\{K(h)\left[\frac{\partial(z,t)}{\partial z}-1\right]\right\}-\zeta(h) \qquad (1)$$

che si ottiene combinando l'equazione di continuità con la legge di Darcy per un liquido incomprimibile, un mezzo poroso rigido e in condizioni isoterme. Nella (1), z è la profondità, t è il tempo, h è il potenziale matriciale dell'acqua nel suolo (energia per unità di peso di acqua e quindi avente le dimensioni di una lunghezza) e K è la conducibilità idraulica. Il parametro $C(h)=\mathrm{d}\theta/\mathrm{d}h$ è

water draining from the shallower part. Deep drainage or percolation will often recharge phreatic aquifers. Simultaneously, water may be removed from a soil as a result of evaporation at the surface and uptake by plant roots. Evaporation at the soil is characterized by stages with different rates, while the magnitude of transpiration phenomena is much affected by the possible existence of plant water stress. In the presence of a shallow water table, movement of soil water towards the surface layers may occur during evapotranspiration. All of these phenomena evolve over time and exhibit different and varying rates, allowing the soil to fulfil the valuable function of storing water with its dissolved nutrients. The soil is thus capable of meeting the water demand of growing plants.
From a merely conceptual point of view, the flow of water within the soil and through the soil-plant-atmosphere continuum should be analysed on the microscopic scale by viewing the soil as a disperse system and applying the Navier-Stokes equations. Such a detailed description of flow patterns at every point in the domain is practically impossible as actual flow velocities vary greatly in both magnitude and direction due to the complexity of the paths followed by individual fluid particles when they move through the interconnected pores. On the other hand, in many applications greater interest is attached to the knowledge of flux density. Therefore, flow and transport processes in environmental systems are typically described on a macroscopic scale by defining a representative elementary volume (REV) and an averaged set of quantities and balance equations.
At the pedon scale, theoretical studies (Dagan, 1986; Sposito, 1986) and many experimental investigations (Santini, 1975; Vauclin et al., 1979) have demonstrated that water flow and solute transport processes in soil and in the rhizosphere are basically one-dimensional along the vertical direction and governed by the well-known Richards' equation:

$$C(h)\frac{\partial h(z,t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z}\left\{K(h)\left[\frac{\partial(z,t)}{\partial z}-1\right]\right\}-\zeta(h) \qquad (1)$$

which is obtained by combining the mass balance equation and Darcy's law for the case of an incompressible liquid, a rigid porous medium, and isotherm conditions. In Eq.(1), t is time, z is soil depth (values are positive and increase downwards), h is matric pressure head, θ is the soil volumetric water content, $C(h)=\partial\theta/\partial h$ signifies the differential soil-water capacity function, $K(h)$ is the soil hydraulic conductivity function, and $\zeta(h)$ is the volumetric sink term function that describes macroscopic root water uptake. In the remainder of the paper we refer to centimetres (cm) for the length dimension and to units of hours, days or years for the dimension of time. After selecting the appropriate initial and boundary conditions for the flow field under study, while knowing the relevant soil hydraulic functions $\theta(h)$ and $K(h)$, solving even simple problems of practical interest requires Eq.(1) to be solved numerically and by using specific, well-validated algorithms (Romano et al., 1998; Brunone et al., 2003).
The problem of solute movement in the subsurface is

definito capacità idrica capillare, essendo θ il contenuto di acque del suolo, mentre ç(*h*) è la portata (di acqua e/o soluto) estratta per unità di suolo dagli apparati radicali della vegetazione. Stabilite le appropriate condizioni iniziali e al contorno del campo di moto e note le funzioni *C*(*h*), oppure θ(*h*), e *K*(*h*) per il suolo in esame, anche i più semplici problemi di pratico interesse richiedono però che l'Eq. (1) sia risolta per via numerica ricorrendo ad opportuni e ben verificati algoritmi (Romano et al., 1998; Brunone et al., 2003).

Per quanto invece riguarda il trasporto di un soluto nel suolo, il problema è reso alquanto complesso dalla natura del soluto medesimo. Tuttavia, i due processi che maggiormente caratterizzano il trasporto di soluti nei suoli agrari sono la convezione e la dispersione. In termini generali, le variazioni spazio-temporali delle concentrazioni di un soluto sono descritte dall'equazione convettiva-diffusiva (CDE) che assume la seguente espressione:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\theta c + \rho s) = \frac{\partial}{\partial z}\left(\theta D_e \frac{\partial c}{\partial z} - q c\right) - \zeta(h) \qquad (2)$$

in cui, insieme con la profondità *z* nel suolo e il tempo *t*, *c* è la concentrazione del componente nella fase liquida, ρ è la densità apparente del suolo, D_e è il coefficiente di dispersione apparente (che descrive il mixing complessivo determinato dai processi di diffusione e dispersione), *s* è la concentrazione del componente nella fase solida, *q* è il flusso idrico di Darcy calcolato tramite l'equazione (1).

Le relazioni che intercorrono fra le grandezze θ, *h* e *K* sono alquanto complesse, dipendono da numerosi fattori e nella maggioranza dei casi di pratico interesse sono espresse tramite le funzioni di ritenzione idrica θ(*h*) e di conducibilità idraulica *K*(*h*). Tali funzioni sono di solito indicate con il termine di proprietà idrauliche del suolo e la Figura 1 ne rappresenta schematicamente gli andamenti per due suoli di differente tessitura. E' opportuno osservare che per processi caratterizzati dall'alternarsi di fasi di inumidimento ed esaurimento, la funzione di ritenzione idrica è affetta da una isteresi, più evidente nel caso di suoli sabbiosi.

considerably more complex. This complexity is also often exacerbated by the nature of the solute. However, the movement and fate of a chemical species (the solute) in an agricultural soil are mainly governed by two basic processes: convection and dispersion. In general, the space-time variations of solute concentrations are described by the following convection-dispersion equation (CDE):

$$\frac{\partial}{\partial t}(\theta c + \rho s) = \frac{\partial}{\partial z}\left(\theta D_e \frac{\partial c}{\partial z} - q c\right) - \zeta(h) \qquad (2)$$

where, together with soil depth *z* and time *t*, *c* is the concentration of the substance in the liquid phase, ρ is oven-dry soil bulk density, D_e is effective dispersion (that describes the global mixing caused by both convection and dispersion processes), *s* is the concentration of the substance in the solid phase, and *q* is Darcy's flux of water as computed by Eq.(1).

The relationships between the variables θ, *h*, and *K* are rather complex and depend on many factors, but in most practical cases they are expressed by the soil water retention, θ(*h*), and hydraulic conductivity functions *K*(*h*). These functions are commonly referred to as the soil hydraulic properties and in Figure 1 they are schematically depicted for two differently-textured soils. It is worth noting, however, that in the case of coarser soils subjected to consecutive drainage-imbibition cycles, the soil water retention function can show a typical hysteretic behaviour.

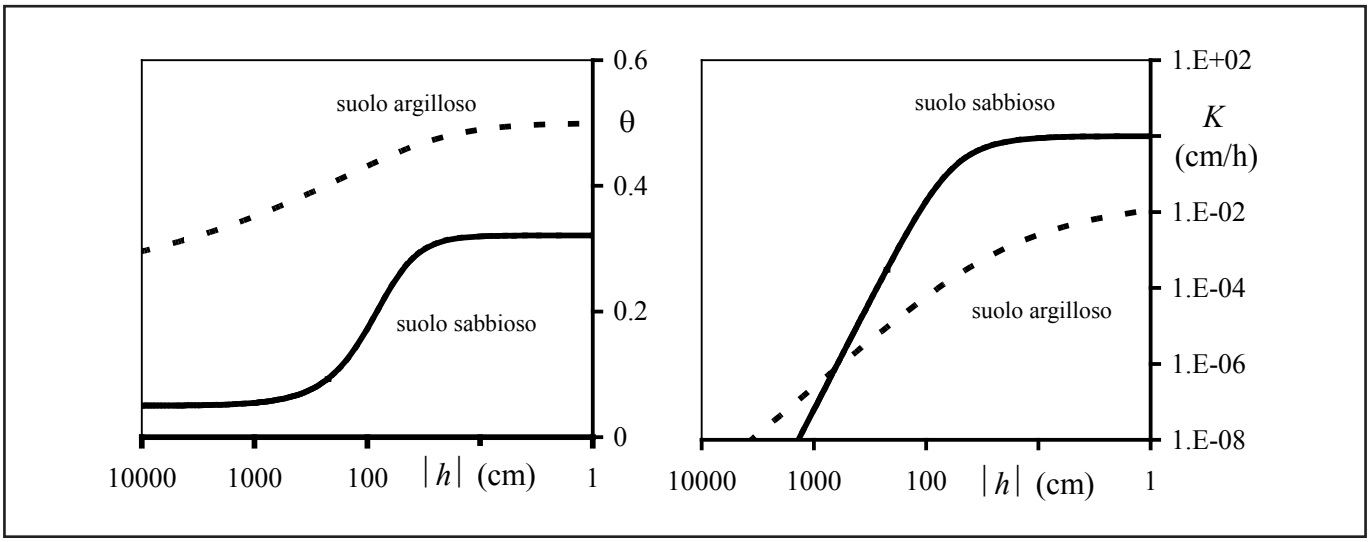


Figura 1. Schema della ritenzione idrica del suolo θ(h) e della conducibilità idraulica K(h), di due suoli con differente tessitura.

Figure 1. Schematic of the soil water retention, θ(h), and hydraulic conductivity, K(h), functions for two differently-textured soils.

8.2.1. Determinazione delle proprietà idrauliche del suolo a diversa scala spaziale

La letteratura sui metodi di misura delle proprietà idrauliche del suolo è molto vasta e in questa nota non è possibile fornire una rassegna dei molti metodi proposti, ma vale la pena osservare che non esistono metodologie che possano essere applicate con soddisfazione in tutte le circostanze e per tutti i tipi di suoli. Una prima distinzione è fra metodi di laboratorio e metodi di campo. Le misure di laboratorio, rispetto a quelle in campo, si svolgono in condizioni più controllate, eventualmente anche impiegando apparecchiature sofisticate, e dunque forniscono risultati più precisi e accurati sul campione sottoposto a prova; le prove in campo, invece, sono senz'altro maggiormente rappresentative delle effettive condizioni strutturali del suolo. La funzione $\theta(h)$ è più agevole da determinare e in genere è misurata in laboratorio su campioni non rimaneggiati di suolo sottoposti a successivi stadi di equilibrio (*Romano et al.*, 2002), oppure in parcelle di campo, con misure simultanee di h e θ a varie profondità durante una prova di drenaggio (*Romano*, 1993). Per la determinazione della funzione $K(h)$ o $K(\theta)$ sono necessarie prove più complesse ed elaborazioni dei dati con procedure che sono spesso laboriose ed i cui risultati in alcuni casi sono affetti da incertezze, specie in prossimità della saturazione completa per l'influenza della macroporosità ed in condizioni di suolo molto secco per problemi di propagazione degli errori insiti nelle procedure di calcolo (*Santini*, 1997).

Di solito i punti θ-h e K-θ ottenuti dalle misure sono poi interpolati utilizzando espressioni analitiche semplici che consentono rapidi confronti fra le proprietà idrauliche di suoli differenti, rappresentano uno strumento efficiente per estrapolare i rilievi sperimentali e agevolano l'uso di tecniche di integrazione dell'Eq. (1). Le relazioni parametriche più diffuse in letteratura sono certamente quelle uni-modali di van Genuchten-Mualem (relazioni vGM):

$$\theta(h) = \theta_r + (\theta_s - \theta_r)\left[1 + |\alpha h|^n\right]^{-m} \qquad (3a)$$

$$K(\theta) = K_0 S_e^{0.5}\left[1 + \left(1 - S_e^{1/m}\right)^m\right]^2 \qquad (3b)$$

ove θ_s e θ_r sono i contenuti d'acqua rispettivamente alla saturazione e residuo, $S_e = (\theta-\theta_r)/(\theta_s-\theta_r)$ è la saturazione effettiva, mentre K_0 è la conducibilità idraulica per $h=0$ (spesso assunta pari alla conducibilità idraulica satura K_s). I parametri α e m sono spesso considerati essenzialmente empirici, ma possono essere suscettibili anche di una interpretazione fisica poiché è stato mostrato che α rappresenta il valore modale della distribuzione statistica dei pori, mentre $1/n$, essendo $n=1/(1-m)$, è proporzionale alla deviazione standard di tale distribuzione. Di recente, *Romano e Nasta* (2016) hanno mostrato che l'impiego di relazioni parametriche bi-modali sono in grado di descrivere meglio i processi idrologici che evolvono nel suolo.

La determinazione delle proprietà idrauliche del suolo con metodi diretti, di laboratorio o di campo, è molto onerosa, richiede lunghi tempi di prova e personale

8.2.1 Determination of the soil hydraulic properties at different spatial scales

Much has been published on the measurement of the soil hydraulic properties, but no suitable single method has been developed which performs well in a wide range of circumstances and for all soil types. In spite of requiring collection of undisturbed soil samples, laboratory methods entail measurements being performed more easily under controlled conditions by employing complex measuring devices, and can lead to more precise results with reference to the tested soil sample. In addition, running laboratory experiments can be profitable insofar as one can collect a large number of samples, even originating from different locations, and then conduct the tests simultaneously on several of them. The validity of laboratory methods, though, is linked to the representativeness of the soil sample, and hence to both the size of the soil core and the technique employed to collect it. In some cases, it is necessary to resort to field methods, which avoid deformation of the soil inside the cylinder used to collect the sample and do not lead to changes in soil structure due to sampling and test preparation procedures. Hence, they appear to be more representative of the actual field conditions.

The soil water retention function, $\theta(h)$, is usually determined with more ease in the laboratory on undisturbed soil cores subjected to successive equilibrium stages (*Romano et al.*, 2002), or in a field plot by making simultaneous measurement at various soil depths of soil water content and matric head values during a drainage experiment (*Romano*, 1993). The determination of the hydraulic conductivity function, $K(h)$ or $K(\theta)$, requires more complex tests and burdensome data processing procedures (*Santini*, 1997).

The θ-h and K-θ data points measured during the experiments are then commonly interpolated using parametric expressions that allow easier comparisons between the hydraulic properties of different soils, are an effective tool for extrapolation purposes, and make the solving of Eqs.(1)-(2) more efficient. Among the most widely used parametric expressions are the unimodal van Genuchten-Mualem relations (vGM relations):

$$\theta(h) = \theta_r + (\theta_s - \theta_r)\left[1 + |\alpha h|^n\right]^{-m} \qquad (3a)$$

$$K(\theta) = K_0 S_e^{0.5}\left[1 + \left(1 - S_e^{1/m}\right)^m\right]^2 \qquad (3b)$$

where θ_s and θ_r are the saturated and residual soil water contents, respectively, $S_e = (\theta-\theta_r)/(\theta_s-\theta_r)$ is effective saturation, and K_0 is hydraulic conductivity when $h=0$ (often replaced by the saturated hydraulic conductivity value, K_s). Parameters α and m are often assumed to be empirical terms, but they can also both be open to physical interpretation: α is the mode value of the uni-modal pore-size distribution, whereas the term $1/n$, it being $n=1/(1-m)$, can be linked to the standard deviation of this distribution. More recently, *Romano and Nasta* (2016) have shown that the use of bi-modal parametric relationships are in many cases better than their unimodal counterparts at describing the hydrologic processes in the vadose zone of the Earth.

esperto, e quindi è costosa anche se fornisce risultati accurati. Per ovviare in parte a queste limitazioni, pur mantenendo un'accettabile precisione dei risultati, sono stati proposti metodi che utilizzano relazioni analitiche delle proprietà idrauliche (ad esempio, le relazioni vGM) e stimano i coefficienti di tali relazioni mediante tecniche numeriche di inversione dell'Eq.(1) (*Hopmans et al.*, 2002).

Per soddisfare l'esigenza di disporre di metodiche più semplici e che soprattutto non richiedano lo svolgimento di specifiche prove idrauliche, di recente si stanno affermando metodi che determinano le proprietà idrauliche di un suolo da misure soltanto di alcune sue proprietà fisiche e chimiche, quali la tessitura, la densità apparente e il contenuto di sostanza organica, pervenendo a una relazione di regressione multipla, essenzialmente empirica e denominata *pedotransfer function* (PTF; *Pachepsky & Rawls*, 2004).

Il problema della parametrizzazione della risposta idrologica alla scala locale è dunque ricondotto alla determinazione delle funzioni di ritenzione idrica $\theta(h)$ e di conducibilità idraulica $K(\theta)$ e diversi risultati sperimentali hanno confermato la validità di tale approccio, anche per simulare processi complessi quali il trasferimento dell'acqua nel sistema suolo-vegetazione-atmosfera (*Santini*, 1992). *Basile et al.,* (2003) hanno fra l'altro mostrato come l'impiego di idonee procedure sperimentali consenta di pervenire ad una rispondente caratterizzazione idraulica sia con prove di laboratorio sia mediante prove eseguite direttamente in campo. *Severino et al.* (2003) hanno riscontrato la validità dell'impiego di misure di contenuto d'acqua nel suolo in un approccio stocastico che consente di determinare la risposta idrologica di un suolo eterogeneo.

8.2.2.Variabilità spaziale e scala di osservazione

La teoria del moto dell'acqua nel suolo è stata sviluppata essenzialmente con riferimento alle eterogeneità che si manifestano alla scala di laboratorio (con dimensione caratteristica lineare $\approx 10^{-1} - 10^{0}$ m) e numerosi studi ne hanno verificato la validità (*Sposito*, 1986). Tuttavia, molti problemi idrologici di pratico interesse possono essere affrontati efficacemente solo ricorrendo a modelli matematici di simulazione che operano alla scala di versante ($\approx 10^{1} - 10^{3}$ m) o di bacino idrografico ($\approx 10^{4} - 10^{6}$ m). La risposta idrologica di un suolo deve dunque essere messa in relazione con la scala a cui si osserva un certo fenomeno: alla scala di laboratorio, ad esempio, la configurazione dei menischi nei diversi pori di un campione di suolo, e i conseguenti gradienti del potenziale h che si instaurano per differenti curvature dei menischi medesimi, rappresenta senz'altro il fenomeno dominante; ad una scala maggiore, invece, si può avanzare qualche dubbio che questo fenomeno sia la causa che determina i principali trasferimenti di massa nel sistema.

Pertanto, tre importanti questioni, peraltro connesse fra loro, influenzano l'identificazione della risposta idrologica del suolo per l'applicazione dei modelli: la variabilità spaziale del fenomeno in esame, la scala di

Determining soil hydraulic properties by direct methods is generally not easy to carry out. Experiments based on such methods often need several stages of steady-state or equilibrium conditions to be achieved or require rather restrictive initial and boundary conditions to be imposed in performing a transient flow test. This makes such methods labour-intensive, time-consuming and expensive. In recent decades, some authors have proposed to simultaneously estimate the soil water retention and hydraulic conductivity functions from a transient flow experiment by employing the inverse problem method in the form of the parameter optimization technique (Hopmans et al., 2002). By using this approach, only a few selected variables need to be measured during a relatively simple transient flow event obtained for prescribed, but arbitrary initial and boundary conditions. However, especially when one has to solve problems dealing with larger spatial scales, there is the need to employ simpler methods that do not require data measured by performing hydraulic tests. In these cases, pedotransfer functions (PTFs; *Pachepsky & Rawls*, 2004) have been developed to estimate in an empirical manner the parameters of the hydraulic relations from knowledge of the main physical and chemical properties of the soil, such as particle-size distribution or soil texture, oven-dry bulk density and soil organic matter content.

Overall, the problem of parameterizing the hydraulic response of a soil at local scale is therefore being associated to the determination of the soil water retention, $\theta(h)$, and hydraulic conductivity, $K(\theta)$, functions. Various experimental results have confirmed the validity of this approach even to simulate comprehensive phenomena occurring in the transfer of water and chemical substances in the soil-vegetation-atmosphere system (*Santini*, 1992). *Basile et al.* (2003) have shown, among other things, that employing suitable experimental techniques enables a reliable soil hydraulic characterization to be obtained using both laboratory or in-situ tests. *Severino et al.* (2003) have demonstrated the validity of employing soil moisture measurements within a stochastic approach to obtain the hydrological response of a heterogeneous porous medium.

8.2.2 Spatial variability issues and the scale of observations

The theory of water flow and solute transport in soil has been primarily developed with reference to the heterogeneity that occurs at the laboratory scale (the pedon scale characterized by a representative linear size ranging from 10^{-1} m to 10^{0} m), and various studies have verified the validity of this approach (Sposito, 1986). However, many hydrological problems of practical interest can be addressed effectively only by using simulation models that run at the hillslope scale (with a characteristic length ranging from 10^{1} m to 10^{3} m) or at landscape/catchment scales (with a characteristic length ranging from 10^{4} m to 10^{6} m). The soil hydrological response should therefore be placed in relation to the scale at which a certain phenomenon is observed. At the laboratory scale, for example, the configuration

osservazione del fenomeno medesimo e la scala di lavoro del modello impiegato. Numerosi studi hanno evidenziato che le proprietà del suolo sono irregolarmente distribuite sul territorio e soltanto accurati rilevamenti, peraltro alquanto onerosi specie con riferimento alle sue proprietà idrauliche, consentono di descrivere questa variabilità. Tuttavia, quasi mai queste proprietà sono distribuite nello spazio in modo completamente casuale, bensì mostrano una dipendenza non solo dalla distanza che separa fra loro i siti di misura, ma talvolta anche dalla direzione prescelta per i rilievi. Si riscontra, dunque, la presenza di una struttura spaziale della variabilità che è possibile descrivere in modo efficace ricorrendo a tecniche stocastiche o geostatistiche.

Gli studi pedologici consentono di pervenire a classificazioni e cartografie utili per molte applicazioni ma, anche se condotti con tecniche innovative come quelle fuzzy, sono basati su fattori spesso poco correlati alle proprietà idrauliche del suolo. Nell'ambito di una medesima unità cartografica quasi sempre si riscontrano variazioni delle funzioni $\theta(h)$ e $K(h)$ che difficilmente possono essere trascurate senza introdurre errori non accettabili nelle successive elaborazioni con modelli. Ad esempio, con riferimento a zone omogenee della Piana Campana, *Romano* (1993) e *Ciollaro e Romano* (1995) hanno mostrato che in una unità cartografica identificata in base a studi prettamente geologico-pedologici, le proprietà idrauliche dei suoli mostrano invece una struttura della variabilità spaziale che si deve considerare quando, anziché un comportamento medio globale, sia necessario analizzare in dettaglio la risposta del suolo, ad esempio per studi di agricoltura di precisione o fenomeni di inquinamento sotterraneo. Un altro aspetto importante dell'analisi spaziale della risposta idrologica del suolo, ma che spesso viene sottovalutato o addirittura ignorato, è l'influenza che la particolare tecnica di misura delle proprietà idrauliche esercita eventualmente sulla descrizione della variabilità spaziale. Ogni misura è sempre affetta da errori, sistematici e/o random, e differenti tecniche di misura in pratica mai forniscono un medesimo valore per la grandezza di interesse. Specie quando si adoperano tecniche semplificate per raccogliere con costi sostenibili un gran numero di informazioni sulle proprietà idrauliche dei suoli in aree relativamente estese, è opportuno verificare che tali tecniche non siano utili soltanto per stimare il comportamento medio del sistema, ma consentano anche una corretta individuazione della struttura di variabilità spaziale (*Romano*, 1993).

Il problema della descrizione della variabilità spaziale appare dunque alquanto complesso e spesso lo si affronta distinguendo, nell'ambito della totale variabilità osservata, una componente deterministica (organizzata) e una componente stocastica della variabilità. Ad esempio, descrivendo diversi pedon e utilizzando opportune tecniche di interpolazione è possibile innanzi tutto suddividere un'intera area di interesse in distinte unità iso-pedogenetiche, ciascuna comprendente suoli relativamente omogenei, e applicare poi metodi geostatistici per individuare la struttura stocastica della variabilità all'interno di ciascuna unità (v. Figura 2). Inoltre, l'individuazione in alcune zone di cosiddette

of the menisci in the connected pores of a soil sample, and the resulting gradients of the total potential energy established as a result of the different curvatures of these menisci, is undoubtedly the dominant phenomenon. At the larger scale, instead, one can raise doubts that this phenomenon might be the main driver governing mass transfer within the physical system.

Therefore, the soil hydrological response is affected by three key questions, also closely interrelated to each other: *i*) the space-time variations of the process to be studied, *ii*) the scale at which this process is observed, and *iii*) scale of the model being employed to describe the process and make predictions. It has been extensively demonstrated that soil properties vary significantly in space, and sometimes also in time, and only detailed surveys, even rather burdensome in the case of soil hydraulic properties, enable this variability to be accurately assessed. However, the measurements of soil properties do not vary in a completely erratic manner over a field, but often show a spatial correlation structure that can be detected using geostatistic or stochastic techniques.

The outcomes of pedological surveys produce classifications and maps useful in many applications, but their products are usually based on factors that have weak correlations with the hydraulic characteristics of soils. Within a soil mapping unit, the soil water retention and hydraulic conductivity functions show spatial variations that cannot be overlooked if one does not want to limit the prediction power of the model. With reference to a pedological unit of the Campania Plain, *Romano* (1993) and *Ciollaro and Romano* (1995) showed that soil hydraulic properties manifest an evident structure of the spatial variability that one has to account for in studies of precision agriculture or soil contamination.

Another important aspect of the spatial analysis of the soil hydrological response, which is often overlooked or even ignored, is the influence that a specific measurement method can exert on the description of the spatial variability of the soil hydraulic properties. Experimental measurements are always affected by systematic and/or random errors, and different measurement techniques never give the same value for a variable of interest. Especially when one adopts simplified methods to gather in a cost-effective way a large body of information on the soil hydraulic properties over relatively large land areas, such methods should be tested for their ability not only to estimate the average behaviour of soil, but also to identify the spatial variability structure as accurately as possible (*Romano*, 1993).

Identifying the spatial variability of soil hydraulic properties is therefore quite complex and one often tackles this problem by differentiating a deterministic (i.e. organized) component and a stochastic component of the entire observed variability. For example, by describing several pedons and using appropriate interpolation techniques, first the area of interest can be split into various iso-pedogenic units, each comprising a relatively uniform soil, and then applying geostatistical methods to identify the stochastic structure of the spatial variability within each unit (see Figure 2). Moreover, especially in the case of hillslope studies, the identification of soil catena,

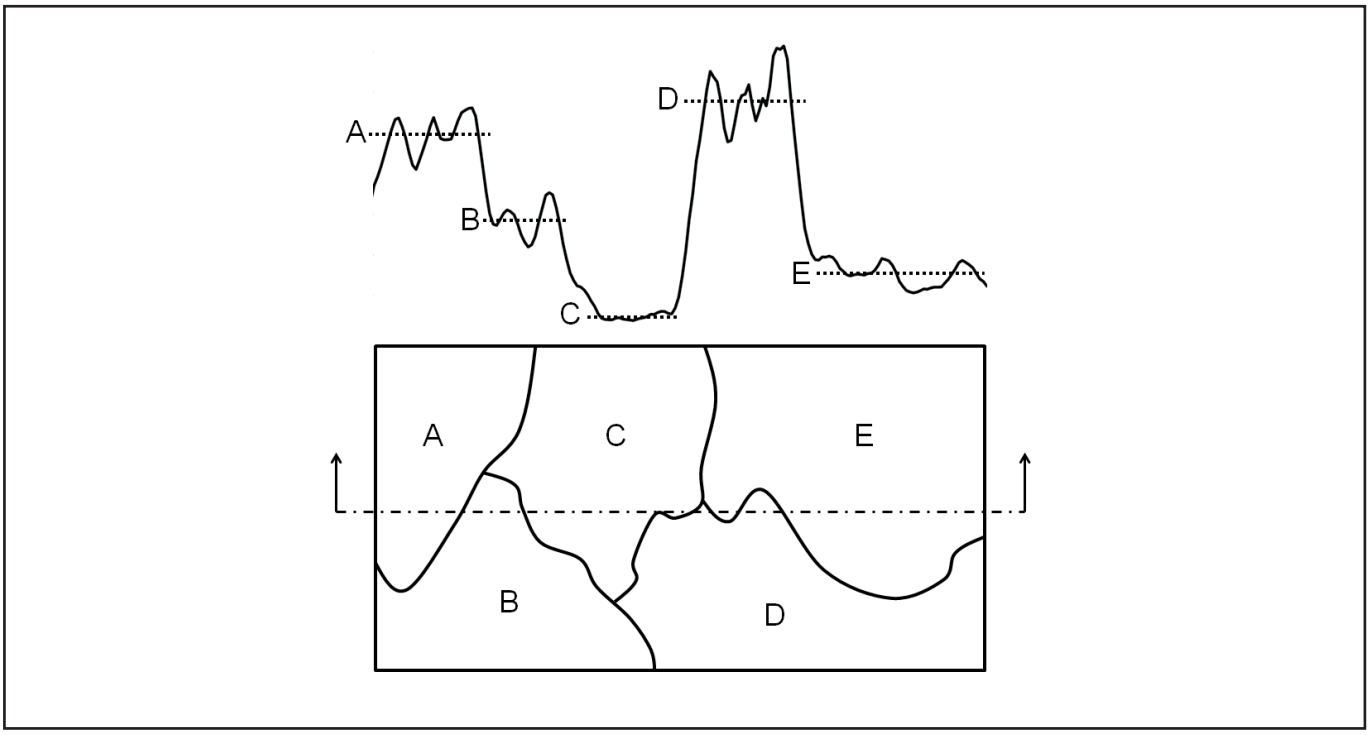


Figura 2. Schema di partizione di un'area di studio in unità di mappa differenti, con indicazione della variabilità spaziale di una certa grandezza all'interno di ciascuna unità (da Kavvas, 1999).

Figure 2. Schematic drawing of how a study area can be spited with different mapping units, each of which associated with different spatial variability characteristics of a variable of interest (re-drawn from Kavvas, 1999).

"catene" di suoli (da intendere come una graduale transizione di suoli connessi fra loro proprio dai processi di pedogenesi e di idrologia del suolo o per effetto delle condizioni topografiche locali) agevola senz'altro la descrizione di particolari fenomeni, come ad esempio quelli connessi all'erosione idrica superficiale. Pertanto, rispetto al tradizionale rilevamento pedologico, una visione più moderna della classificazione dei suoli e maggiormente orientata all'uso dei modelli di bilancio idrologico, affianca al concetto di pedon quello di pedo-paesaggio, per tentare di definire diverse unità di mappa in base a criteri funzionali e che, in particolare, tengano conto degli effetti indotti dal movimento dell'acqua nell'intero sistema costituito dal suolo, dalla vegetazione e dall'atmosfera.
Resta inteso, in ogni caso, che per potere descrivere la componente stocastica della variabilità spaziale in un certo ambiente è essenziale verificare che al suo interno la serie dei dati disponibili sia stazionaria perché è su tale ipotesi che si fonda la maggior parte delle tecniche di analisi oggi disponibili, come ad esempio la geostatistica.

8.2.3. L'influenza della scala spaziale di interesse

Per caratterizzare la variabilità della risposta idrologica dei suoli nella pratica si raccolgono informazioni in diverse posizioni dell'area di interesse. E' frequente il caso di studi alla scala di campo o di versante che utilizzano proprietà idrauliche ottenute da misure di laboratorio su un numero di campioni non rimaneggiati

being considered a gradual transition of soils connected by pedogenetic and hydrological processes or affected by local topographical features, certainly makes it easier to describe specific phenomena, such as soil erosion by overland flow. Therefore, compared to the conventional soil survey, a modern view of soil classification, being then oriented to the use of water budget models, should identify the different mapping units based on functional criteria that specifically account for the effects exerted by water movement in the entire soil-vegetation-atmosphere system. However, for the stochastic component of variability to be described over a certain unit, it is important to verify that the available dataset is stationary because most of the available techniques, such as the geostatistical methods, are grounded on such basic hypotheses.

8.2.3 The influence of the spatial scale of interest

When faced with practical problems, the spatial variability of the soil hydrological response is commonly characterized by gathering information in various locations of the spatial domain of interest for the problem being solved. This is often the case of studies carried out at the field or hillslope scales that make use of soil hydraulic properties obtained from laboratory tests on a certain number of undisturbed soil cores collected in preselected points and at a certain distance between each other. A mismatch often occurs between the spatial scale at which the process evolves and that at which

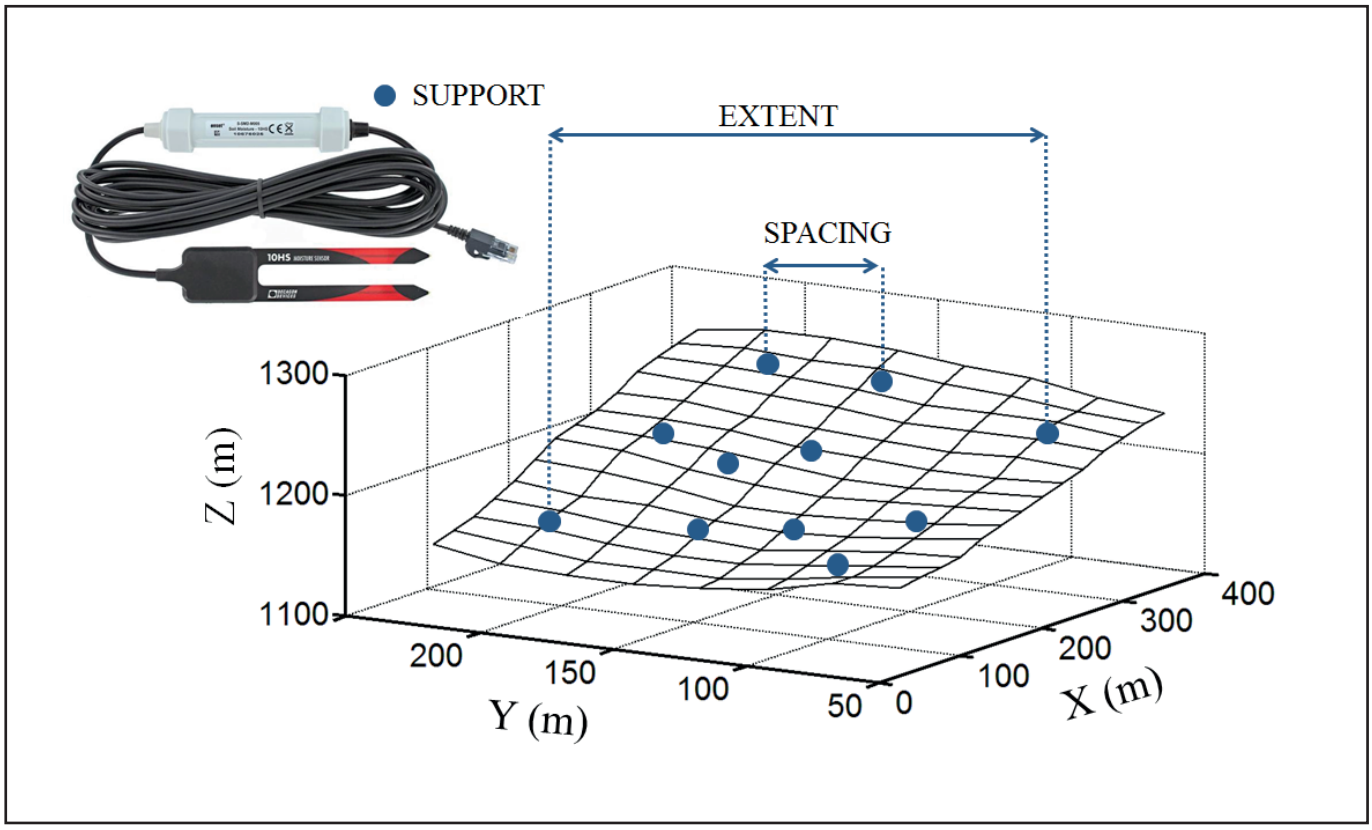


Figura 3. Schema per la definizione di distanza fra i siti di misura (spacing), ampiezza della zona di interesse (extent) e volume di misura (support) (da Romano, 2014).

Figure 3. Schematic of the triplet of spacing, extent, and support (re-drawn from Romano, 2014).

di suolo, prelevati in assegnate posizioni del dominio e ad una certa distanza fra loro. Sorge spesso una discrepanza fra la scala di evoluzione del fenomeno che si desidera rappresentare e la scala a cui si eseguono i rilievi. La scala di osservazione del fenomeno può essere schematicamente descritta tramite le seguenti tre grandezze: la scala di aggregazione spazio-temporale delle osservazioni, la distanza fra due osservazioni successive e l'estensione spazio-temporale delle osservazioni. Un esempio, sintetizzato dalla terminologia proposta da *Blöschl e Sivapalan* (1995), è quello in cui il campione di suolo da sottoporre a prova ha dimensione verticale dell'ordine delle decine di centimetri (*support*), mentre la distanza di campionamento è di 50 m (*spacing*) per un allineamento lungo 5 km (*extent*) (v. Figura 3).

E' dunque evidente che la variabilità spaziale delle proprietà dei suoli può influire in modo notevole sull'evoluzione dei processi idrologici, specie alla scala di versante o di piccolo bacino, ed è stato anche mostrato che informazioni sull'eventuale organizzazione spaziale dei parametri idraulici contribuisce ad una maggiore rispondenza dei modelli idrologici. Le proprietà idrauliche dei suoli mostrano un diverso grado di variabilità quando si considerano differenti scale spaziali di osservazione. Alla scala di laboratorio, quella dei campioni non rimaneggiati o delle colonne di suolo, la principale causa di eterogeneità è essenzialmente dovuta alla notevole diversità delle dimensioni dei pori e alla

measurements are taken. The observation scale can be schematically described in terms of the following triplet: the space-time aggregation scale of the observations, the distance between two subsequent observations and the space-time extent of the observations. One example of this triplet is proposed by *Blöschl and Sivapalan* (1995) where the undisturbed soil core to be tested has a vertical length of ten or so centimetres (*support*), whereas the sampling distance is 50 m (*spacing*) along a transect 5 km long (*extent*) (see the schematic in Figure 3).

It is therefore evident that the spatial variability of soil properties can affect even significantly the assessment of the variation in space and time of the process accounted for in the model, especially when the interest is at hillslope or at small catchment scales. It has also been shown that providing information of spatial patterns of model parameters yields more accurate predictions.
The soil hydraulic properties show a different degree of variability when considering different measurement scales. At the laboratory scale, namely that of undisturbed soil cores or columns, the heterogeneity of the porous medium is mainly due to the large variety of pore dimensions and the complex tortuosity of the flow paths through the soil pores. In short, soil structure and texture play a key role in the description of the hydrological processes occurring at that scale. When the spatial scale increases, for example the scale of a field or a hillslope, soil layering and pedogenetic phenomena start to

complessa tortuosità dei percorsi seguiti dall'acqua nel suo fluire attraverso i meati del mezzo poroso. In sintesi, struttura e tessitura di un suolo assumono un ruolo di primaria importanza nella definizione dei processi idrologici osservati nel suolo a questa scala. All'aumentare della scala, ad esempio quella di campo o di un singolo versante, le stratificazioni e i fenomeni di pedogenesi iniziano a dominare i caratteri di variabilità spaziale. Alla scala di bacino, le differenze esistenti tra le formazioni geologiche e le facies metamorfiche possono senz'altro considerarsi fra le cause principali della eterogeneità dei suoli osservata a questa scala.

Anche se la serie di dati sulle proprietà del suolo per una certa area assume i tipici caratteri di un processo non stazionario, *Kavvas* (1999) ritiene che spesso la non stazionarietà osservata alle scale minori in pratica non si manifesta quasi più alle scale maggiori (v. Figura 4). In modo schematico, l'implicita operazione di media spaziale che interviene all'aumentare della scala di osservazione agisce come un filtro delle componenti di variabilità a cui competono le maggiori frequenze. Pertanto, analizzando una serie di valori a una scala spaziale più ampia di quella in cui si evidenziano i trend non stazionari, la presenza di non stazionarietà può essere agevolmente identificata con tecniche quali l'analisi di covarianza, gli spettri di potenza o la teoria delle onde (*Blöschl e Sivapalan*, 1995; *Ciollaro e Romano*, 1995; *Pringle et al.,* 2007). Questa ipotesi ha consentito di formulare una teoria secondo cui un'equazione che governa un particolare fenomeno alla scala locale può ritenersi valida con opportune modifiche anche a scale spaziali maggiori, consentendo quindi il passaggio dalla scala locale di formulazione del modello alla scala maggiore di evoluzione del fenomeno. Tuttavia, si segnala anche il diverso approccio seguito da *Haverkamp et al.* (1998) che adottano un criterio di similitudine per definire l'Eq. (1) in modo che resti immutata al variare della scala spaziale di interesse.

Poiché le misure di variabili e parametri idraulici del suolo sono notoriamente molto onerose e quindi la loro numerosità è quasi sempre ben minore di quella necessaria

govern the observed spatial variations. At the catchment scale, instead, the macroscopic differences between the geologic settings and metamorphic facies can definitely be considered the main cause of the heterogeneities observed at that larger scale.

Even though the available spatial series of a soil property can show typical features of a non-stationary process, *Kavvas* (1999) suggested that often the non-stationarity observed at smaller scale disappears somehow at the larger scales (see Figure 4). In brief, the implicit spatial averaging operation that comes into play when increasing the observation scale acts as a sort of filter of the components of the variability with the higher frequencies. Therefore, by analysing a series at a spatial scale larger than that at which the non-stationary trends occur, non-stationarity can easily be detected by using tools such as variance analysis, spectral analysis, or wavelet analysis (*Blöschl and Sivapalan*, 1995; *Ciollaro and Romano*, 1995; *Pringle et al.,* 2007). Such an assumption enables a theory to be formulated that an equation governing a process at a local (space-time) scale can still be considered valid, under appropriate changes, even when used to interpret this process at larger scales. This allows one to move from the scale at which the model is developed to the larger scale at which the phenomenon evolves. However, it is worth noting that *Haverkamp et al.* (1998) proposed to tackle this problem differently, by using a similitude criterion to define Equation (1) in such a way that it remains nearly invariant with changing scales.

Measuring the variables and parameters of soil hydrology is notoriously a burdensome task. Hence the number of the observed values is almost always less than that required to identify the complex system heterogeneity at the scale of interest for the problem at hand. Therefore, especially from the practical viewpoint, a question of paramount importance is to examine whether, and to what extent, the soil hydraulic properties determined in the laboratory on soil cores or in small plots under field conditions can be fruitfully employed to describe the soil water flow and transport processes at a scale greater

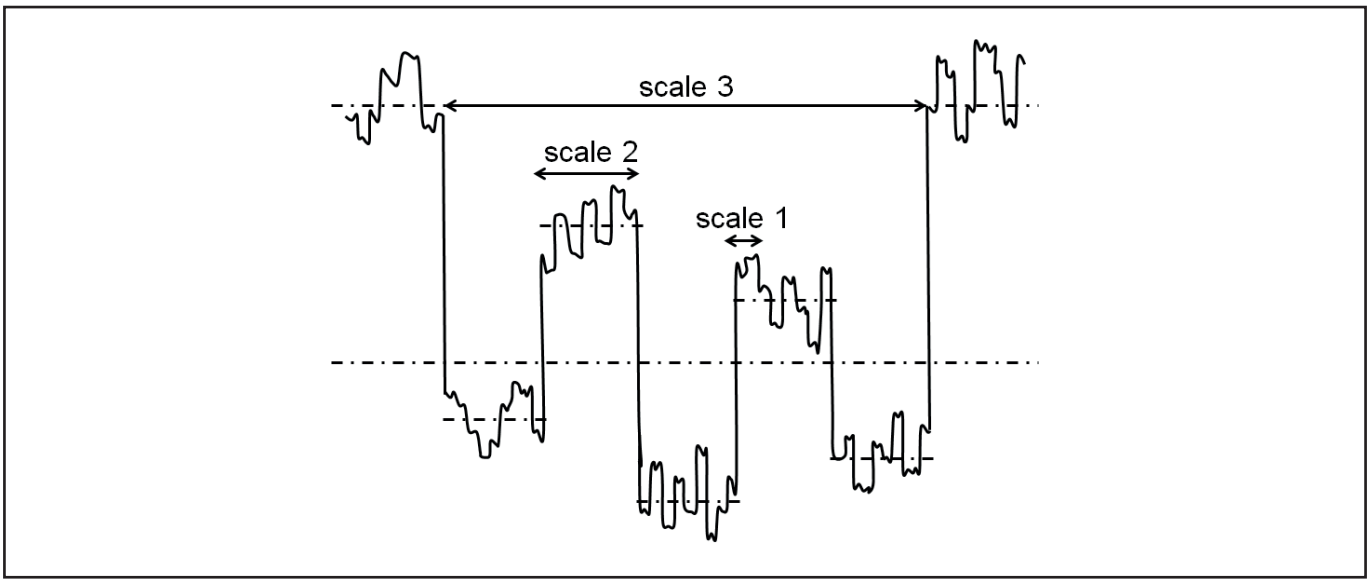


Figura 4. Stazionarietà di un processo stocastico per diverse scale spaziali (da Kavvas, 1999)

Figure 4. Stationarity of a stochastic process at different spatial scales of the domain of interest (re-drawn from Kavvas, 1999).

a identificare la complessa eterogeneità del sistema alla scala di interesse, è evidente che una questione di primaria importanza consiste nell'esaminare se, ed entro quali limiti, le proprietà idrauliche del suolo ottenute con misure eseguite in laboratorio o in piccole parcelle di campo possano essere utilizzate per descrivere i processi di moto e trasporto ad una scala maggiore (*Hopmans et al.*, 2002). Infatti, una delle principali limitazioni delle indagine discusse in precedenza è che le aree, o meglio i volumi, di suolo interessati dalle misure sono sempre ben minori di quelle a cui si riferiscono le simulazioni dei modelli. Nel successivo paragrafo saranno brevemente illustrate le principali tecniche proposte per affrontare questo problema.

8.3. Identificazione di parametri equivalenti della risposta idrologica dei suoli

Definiti i caratteri di variabilità spaziale a una particolare scala di interesse, sorge la questione del trasferimento ottimale di informazioni tra scale differenti: dalla scala piccola a quella più grande (l'aggregazione o *upscaling*); dalla scala maggiore a quella più piccola (la disaggregazione o *downscaling*). Questo argomento è diventato negli ultimi anni uno dei temi di ricerca più investigato e dibattuto nelle scienze idrologiche anche perché la sua risoluzione è alquanto complessa per due principali motivi:

a) i processi idrologici, specie quelli che hanno luogo nel sistema suolo-vegetazione, sono fortemente non lineari;
b) la variabilità spazio-temporale dei parametri del modello e delle condizioni al contorno introduce incertezze non trascurabili allorquando si effettuano i passaggi di scala.

Scelto il tipo di modello, definiti i processi da simulare e valutati i caratteri di variabilità spaziale dei dati in ingresso, sono state sviluppate diverse tecniche di aggregazione delle eterogeneità manifeste alla piccola scala per individuare un comportamento medio del sistema alla scala di interesse, ad esempio quella di una intera unità suolo-paesaggio o della maglia di discretizzazione spaziale del modello numerico adoperato. Tale problema è spesso affrontato assumendo che il sistema in osservazione sia composto da elementi singoli omogenei e disconnessi fra loro (il cosiddetto *stream-tube model*) e identificando per ciascuno di essi un "parametro equivalente" che sintetizzi la risposta non lineare del sistema all'interno dell'elemento medesimo. Tuttavia, sarebbe bene assegnare a tale parametro equivalente un significato un po' più ampio nell'ambito di un modello di trasferimento dell'acqua nel sistema suolo-vegetazione-atmosfera, considerando non solo le eterogeneità locali del suolo, ma anche il tipo di vegetazione (se presente) ed eventuali stress idrici nelle colture, la posizione topografica, la scabrezza superficiale del terreno e le caratteristiche climatiche locali (precipitazione, evapotraspirazione, radiazione netta incidente, ecc.).

Per stimare un valore "equivalente" di una grandezza all'interno di un'area sulla base di un numero discreto di misure locali sono disponibili diverse tecniche: dalle

than that one at which the measured values have been gathered (*Hopmans et al.*, 2002). As a matter of fact, one of the main drawbacks concerning the above-mentioned investigations is that the surficial areas, or rather the volumes, of soil involved in the measurements are always appreciably less than those referred to by the modelling results. In the next section we will briefly discuss the main methods proposed to deal with this problem.

8.3. Identification of equivalent parameters of soil hydrologic response

Once one has characterized the spatial variations of the variables and parameters at the specific scale of interest for the problem being solved, the question arises about the optimal transfer of information between scales: from the smaller to the larger scale (aggregation or upscaling), or from the larger scale to the smaller scale (disaggregation or downscaling). In recent decades, the upscaling/downscaling technique has been one of the most widely investigated but also debated topics of hydrological science, partly because it is a fairly complex issue due to the following main problems:

Hydrological processes, especially those occurring in the soil-vegetation-atmosphere system, are notoriously highly non-linear;

Space-time variability in both model parameters and boundary conditions brings in non-negligible uncertainties when the scale transfer is performed.

Once the processes to be simulated have been identified, the simulation model is selected, and the space-time variability is assessed. Different aggregation techniques are available in the literature to retrieve an average behaviour of the physical system at the scale of interest, e.g. that of an entire soil-landscape unit or the mesh size of the numerical computer code. This problem is often tackled by assuming that the system is made up by single and disconnected uniform elements (the so-called stream-tube model) and by attaching to each element an "equivalent parameter" that is able to synthesize the non-linear system response within this element. However, in view of its application in a soil-vegetation-atmosphere transfer model, such an equivalent parameter should have a wider significance, allowing for not only soil heterogeneity, but also the type of vegetation (if present) and relating water stress conditions, the topographic location, the soil roughness and the local weather conditions (precipitation, evapotranspiration, net radiation, etc.). Various methods are available to estimate an "equivalent" value of a certain attribute within an area from the knowledge of a limited number of measurements. They range from the classic averaging techniques (e.g. arithmetic, geometric, harmonic means) to the more sophisticated stochastic sampling methods. Because of the high non-linearity that characterizes soil hydrological processes, classic averaging techniques or regression methods are underperforming when the equivalent response of a soil has to be determined. As discussed in more detail by *Nasta and Romano* (2016), specific methods have been set-up and are now available to aggregate at a larger scale the measurements of the soil

più tipiche operazioni di media (aritmetica, geometrica, armonica, ecc.) ai più sofisticati metodi di campionamento stocastico.Per le notevoli non linearità che intervengono nei processi dell'idrologia del suolo, le classiche tecniche di media o di interpolazione risultano spesso poco efficienti se utilizzate per identificare la risposta idraulica equivalente di un suolo. Come anche discusso da *Nasta e Romano* (2016), sono oggi state messe a punto e rese disponibili tecniche specifiche per aggregare a una scala maggiore le misure di proprietà idrauliche del suolo svolte alla scala di laboratorio o di campo.

8.4. Riferimenti bibliografici

Basile A., Ciollaro G., Coppola A., 2003. Hysteresis in soil water characteristics as a key to interpreting comparisons of laboratory and field measured hydraulic properties. Water Resour. Res., 39, 1355.

Blöschl G., Sivapalan, M., 1995. Scale issues in hydrological modeling: A review. Hydrological Processes, 9, 251-290.

Brunone B., Ferrante M., Romano N., Santini A., 2003. Numerical simulations of one-dimensional infiltration into layered soils with the Richards equation using different estimates of the interlayer conductivity. Vadose Zone Journal, 2, 193-200.

Ciollaro G., Romano N., 1995. Spatial variability of the hydraulic properties of a volcanic soil. Geoderma, 65, 263-282.

Dagan G., 1986. Statistical theory of groundwater flow and transport: pore to laboratory, laboratory to formation, and formation to regional scale. Water Resour Res., 22, 120S-134S.

Haverkamp R., Parlange J.-Y., Cuenca R., Ross P.J., Steenhuis T.S., 1998. Scaling of the Richards equation and its application to watershed modelling. In "Scale dependence and scale invariance" (G. Sposito, ed.), Cambridge Univ. Press, NY, USA, pp. 190-223.

Hopmans J.W., Nielsen D.R., Bristow K.L., 2002. How useful are small-scale soil hydraulic property measurements for large-scale vadose zone modeling. In "Heat and Mass Transfer in the Natural Environment, The Philip Volume (D. Smiles, P.A.C. Raats, and A. Warrick, eds.) AGU, Geophysical Monograph Series No. 129, 247-258.

Hopmans J.W., Šimůnek J., Romano N., Durner W., 2002. Inverse Methods. In "Methods of Soil Analysis, Part 4, Physical Methods" (Dane J.H., G.C. Topp G.C., eds.) SSSA Book Series N.5, Madison, WI, pp. 963-1008.

Kavvas M.L., 1999. On the coarse-graining of hydrologic processes with increasing scales. J. Hydrol., 217, 191-202.

Nasta P., Romano N., 2016. Use of a flux-based field capacity criterion to identify effective hydraulic parameters of layered soil profiles subjected to synthetic hydraulic properties carried out at the core scale in the laboratory or under field conditions in an experimental plot.

8.4. References cited

Basile A., Ciollaro G., Coppola A., 2003. Hysteresis in soil water characteristics as a key to interpreting comparisons of laboratory and field measured hydraulic properties. Water Resour. Res., 39, 1355.

Blöschl G., Sivapalan, M., 1995. Scale issues in hydrological modeling: A review. Hydrological Processes, 9, 251-290.

Brunone B., Ferrante M., Romano N., Santini A., 2003. Numerical simulations of one-dimensional infiltration into layered soils with the Richards equation using different estimates of the interlayer conductivity. Vadose Zone Journal, 2, 193-200.

Ciollaro G., Romano N., 1995. Spatial variability of the hydraulic properties of a volcanic soil. Geoderma, 65, 263-282.

Dagan G., 1986. Statistical theory of groundwater flow and transport: pore to laboratory, laboratory to formation, and formation to regional scale. Water Resour Res., 22, 120S-134S.

Haverkamp R., Parlange J.-Y., Cuenca R., Ross P.J., Steenhuis T.S., 1998. Scaling of the Richards equation and its application to watershed modelling. In "Scale dependence and scale invariance" (G. Sposito, ed.), Cambridge Univ. Press, NY, USA, pp. 190-223.

Hopmans J.W., Nielsen D.R., Bristow K.L., 2002. How useful are small-scale soil hydraulic property measurements for large-scale vadose zone modeling. In "Heat and Mass Transfer in the Natural Environment, The Philip Volume (D. Smiles, P.A.C. Raats, and A. Warrick, eds.) AGU, Geophysical Monograph Series No. 129, 247-258.

Hopmans J.W., Šimůnek J., Romano N., Durner W., 2002. Inverse Methods. In "Methods of Soil Analysis, Part 4, Physical Methods" (Dane J.H., G.C. Topp G.C., eds.) SSSA Book Series N.5, Madison, WI, pp. 963-1008.

Kavvas M.L., 1999. On the coarse-graining of hydrologic processes with increasing scales. J. Hydrol., 217, 191-202.

Nasta P., Romano N., 2016. Use of a flux-based field capacity criterion to identify effective hydraulic parameters of layered soil profiles subjected to synthetic drainage experiments. Water Resour. Res., 52, 566-584.

PachepskyY.A., Rawls W.J. (eds.), 2004. Development of Pedotransfer Functions in Soil Hydrology. Elsevier Science B.V., ISBN:0-444-51705-7.

Pringle M.J., Romano N., Minasny B., Chirico G.B., Lark R.M., 2007. Spatial evaluation of pedotransfer functions using wavelet analysis. J. Hydrol., 333, 182-198.

drainage experiments. Water Resour. Res., 52, 566-584.

PachepskyY.A., Rawls W.J. (eds.), 2004. Development of Pedotransfer Functions in Soil Hydrology. Elsevier Science B.V., ISBN:0-444-51705-7.

Pringle M.J., Romano N., Minasny B., Chirico G.B., Lark R.M., 2007. Spatial evaluation of pedotransfer functions using wavelet analysis. J. Hydrol., 333, 182-198.

Romano N. 1993. Use of an inverse method and geostatistics to estimate soil hydraulic conductivity for spatial variability analysis. Geoderma, 60, 169-186.

Romano N., Nasta P., 2016. How effective is bimodal soil hydraulic characterization? Functional evaluations for predictions of soil water balance. Eur. J. Soil Sci., 67, 523-535

Romano N., Brunone B., Santini A., 1998. Numerical analysis of one-dimensional unsaturated flow in layered soils, Adv. Water Resour., 21, 315-324.

Romano N., Hopmans J.W., Dane J.H., 2002. Water retention and storage: Suction table. In “Methods of Soil Analysis, Part 4, Physical Methods” (Dane J.H., G.C. Topp G.C., eds.) SSSA Book Series N.5, Madison, WI, pp. 692-698.

Santini A., 1975. Presupposti teorici delle misure idrologiche ed idrauliche nel terreno agrario e forestale. Atti dell’incontro della 1a Sez. AIGR su “Misure Idrologiche ed Idrauliche nel Terreno Agrario e Forestale”, Milano, pp. 11-42.

Santini A., 1997. Conducibilità idraulica del suolo non saturo. In “Metodi di analisi fisica del suolo” (M. Pagliai, ed.) Parte VIII, FrancoAngeli, Milano, pp. 89-107.

Santini A., 1992. Modelling water dynamics in the soil-plant-atmosphere system for irrigation purposes. Excerpta, 6, 133-166.

Severino G., Santini A., Sommella A., 2003. Determining the soil hydraulic conductivity by means of a field scale internal drainage. J. Hydrol., 273, 234-248.

Sposito G., 1986. The “physics” of soil water physics. Water Resour. Res., 22, 83S-88S.

Vauclin M., Haverkamp R., Vachaud G., 1979. Résolution numérique d’une équation de diffusion non linéaire, Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, France, ISBN: 2-7061-0159-8.

Romano N. 1993. Use of an inverse method and geostatistics to estimate soil hydraulic conductivity for spatial variability analysis. Geoderma, 60, 169-186.

Romano N., Nasta P., 2016. How effective is bimodal soil hydraulic characterization? Functional evaluations for predictions of soil water balance. Eur. J. Soil Sci., 67, 523-535

Romano N., Brunone B., Santini A., 1998. Numerical analysis of one-dimensional unsaturated flow in layered soils, Adv. Water Resour., 21, 315-324.

Romano N., Hopmans J.W., Dane J.H., 2002. Water retention and storage: Suction table. In “Methods of Soil Analysis, Part 4, Physical Methods” (Dane J.H., G.C. Topp G.C., eds.) SSSA Book Series No.5, Madison, WI, pp. 692-698.

Santini A., 1975. Presupposti teorici delle misure idrologiche ed idrauliche nel terreno agrario e forestale. Atti dell’incontro della 1a Sez. AIGR su “Misure Idrologiche ed Idrauliche nel Terreno Agrario e Forestale”, Milan, pp. 11-42.

Santini A., 1997. Conducibilità idraulica del suolo non saturo. In “Metodi di analisi fisica del suolo” (M. Pagliai, ed.) Parte VIII, FrancoAngeli, Milan, pp. 89-107.

Santini A., 1992. Modelling water dynamics in the soil-plant-atmosphere system for irrigation purposes. Excerpta, 6, 133-166.

Severino G., Santini A., Sommella A., 2003. Determining the soil hydraulic conductivity by means of a field scale internal drainage. J. Hydrol., 273, 234-248.

Sposito G., 1986. The “physics” of soil water physics. Water Resour. Res., 22, 83S-88S.

Vauclin M., Haverkamp R., Vachaud G., 1979. Résolution numérique d’une équation de diffusion non linéaire, Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, France, ISBN: 2-7061-0159-8.

Tecniche di bio-fito-risanamento dei suoli contaminati

Bio-Phyto-remediation of contaminated soils

9. I ruoli della vegetazione per il risanamento dei suoli contaminati/degradati

N. Fiorentino, M. Mori, V. Cenvinzo, A. De Rosa, D. Visconti, M. Fagnano

9.1 La fertilità del suolo e le sue funzioni ecosistemiche

La fertilità del suolo rappresenta la sua capacità di sostenere la crescita vegetale garantendo la disponibilità di nutrienti sia a partire dalle riserve stesse del suolo che a seguito di input esterni mirati alla produzione agricola. In un ottica ecosistemica, il concetto di fertilità del suolo può essere ridefinito come la capacità di sostenere la crescita e l'equilibrio dei bionti che vi risiedono siano essi appartenenti al regno animale che a quello vegetale.

Il concetto di fertilità è comunemente schematizzato nel modo seguente:

- Fertilità chimica: disponibilità di micro e macro-nutrienti (N, P, K, Mg, Mn, Fe); pH, salinità; contenuto di sostanza organica; capacità di cambio cationico;
- Fertilità fisica: stato di aggregazione del suolo legato alla capacità delle particelle minerali ed organiche di formare strutture di dimensioni variabili. E' strettamente legata alla tessitura (contenuto di sabbia, limo ed argilla), al contenuto di sostanza organica e di cationi bivalenti (es. Ca e Mg). Ad essa è correlata la porosità, l'areazione e la ritenzione idrica del suolo;
- Fertilità biologica: assetto equilibrato e ottimale delle proporzioni tra micro-macro flora-fauna presenti nel suolo.

Questi tre aspetti sono fortemente correlati tra di loro; pertanto è il loro equilibrio ad essere responsabile della

9. Recovering soil fertility in contaminated and degraded land: the use of phytoremediation

N. Fiorentino, M. Mori, V. Cenvinzo, A. De Rosa, D. Visconti, M. Fagnano

9.1 Soil fertility and ecosystem functions

Soil fertility is commonly defined as the potential for sustaining crop growth through the availability of nutrients from soil reservoirs or from external inputs (e.g. fertilization). From an ecosystem standing point, this concept can be redefined as the potential of ensuring nutrient availability for both animals and plants in the soil. Moreover soil fertility must be related not only to its suitability for food and raw material production but also other ecosystem functions such as: aesthetic and functional landscape characterization; biodiversity and water quality protection; storage of atmospheric C as soil organic matter.

The conceptual model of soil fertility includes the following aspects:

- Chemical fertility, i.e. the availability of micro- and macro-nutrients (e.g. N, P, K, Mg, Mn, Fe) and organic matter (SOM) content; pH; salinity; cation-exchange capacity (CEC);
- Physical fertility, i.e. the stability and dimension of soil aggregates originating from the interaction between mineral and organic soil components. This property is strongly affected by soil texture (relative content of clay, sand and silt in the soil fraction lower than 2 mm), organic carbon content and divalent cations (e.g. Ca^{2+}, Mg^{2+}). Moreover, soil aggregation is related to its porosity, air content and water retention;

fertilità nella sua interezza. A titolo di esempio, si consideri che un suolo fortemente destrutturato (scarsa fertilità fisica) è caratterizzato da una bassa disponibilità di ossigeno dovuta all'elevata microporosità. In tali condizioni l'attività dei batteri aerobi del ciclo dell'azoto è fortemente limitata così come la disponibilità di questo macronutriente per le colture. Al contempo, la carenza di ossigeno rallenta anche la crescita delle radici, rendendo un suolo difficile da colonizzare da parte della vegetazione.
La sostanza organica è il vero anello di congiunzione tra i vari aspetti della fertilità visto che è strettamente legata alla possibilità da parte del suolo di ritenere nutrienti, di stoccare carbonio, di aggregare le particelle di suolo e di sostenere la crescita della microflora. Pertanto una gestione del suolo orientata al mantenimento o alla reintegrazione del contenuto di sostanza organica nel suolo ha un effetto globale su tutti gli aspetti summenzionati.
La fertilità del suolo è solo uno degli aspetti della sua qualità derivante dal riferimento alla vocazione agricola dello stesso. A questo vanno aggiunti elementi di elevato valore quali la capacità di: connotare dal punto di vista estetico e funzionale il paesaggio; assolvere a delle funzioni ecosistemiche come il mantenimento della biodiversità, della qualità delle acque superficiali e sotterranee; essere un sito di stoccaggio del carbonio atmosferico come sostanza organica.

9.2 Degradazione del suolo

Un suolo degradato è sostanzialmente un suolo in cui è stata compromessa a diverso grado la sua fertilità e la sua capacità di assolvere alle funzioni ecosistemiche. La forma di degrado più facilmente percepibile è quella chimica che consiste nell'introduzione nel sistema suolo di sostanze inorganiche e/o organiche non presenti naturalmente nel suolo. Tali inquinanti possono raggiungere e compromettere la vita degli organismi viventi attraverso diverse vie di esposizione: dall'asportazione da parte della vegetazione e trasferimento alla catena alimentare, al trasporto in falda per percolazione fino al trasporto di particolato aereo che può essere inalato o entrare in contatto dermico.
Non meno importante è il degrado fisico, legato al passaggio di mezzi pesanti (si pensi a zone in cui è stato effettuato uno stoccaggio temporaneo dei rifiuti) oppure al movimento terra fatto in corrispondenza delle zone in cui si è operato per la costruzione di infrastrutture o edifici. In questi casi il problema reale è l' alterazione dei cicli biogeochimici dovuta all'anerobiosi del suolo, alla ridotta capacità di infiltrazione e ritenzione dell'acqua e alla formazione di strati di suolo massivi e difficilmente esplorabili dalle radici.
Infine va menzionato il processo di degradazione del paesaggio agrario che rappresenta un danno di immagine per le produzioni agricole e riduce in maniera significativa il valore dei servizi ecosistemici che è in grado di erogare (vedi cap. 3).

- Biological fertility: balanced interaction between micro-macro biota living in the soil.

These three aspects are strongly correlated with each other. Therefore their balance is responsible for soil fertility in its entirety. By way of example, consider that a highly unstructured soil (poor physical fertility) has a low availability of oxygen due to its high micro-porosity. In such conditions, the activity of aerobic N cycling bacteria is severely limited as well as the availability of this macronutrient for crops. Moreover, low oxygen availability can limit root growth and reduce soil colonization by vegetation.
Soil organic matter is the main pillar of soil fertility, its content being linked with nutrient retention, organic C storage, soil aggregation and microbial diversity and growth. Therefore soil management with a view to increasing its organic C content is pivotal to enhancing all the above aspects of soil fertility.

9.2 Soil degradation

This process refers to the partial or total impairment of its ecosystemfunctions with a consequence also on its agronomic fertility. Chemical degradation is a fairly common example consisting in the external input of xenobiotics as inorganic/organic chemicals not present in natural soils of a specific area. These pollutants are prone to be transferred to living organisms through different exposure patterns: i) plant uptake and consequent transfer to the food chain; ii) leaching in the water table or surface water, and iii) soil erosion and particulate inhalation/ingestion.
Physical degradation is also linked to the flow of heavy vehicles, as in temporary disposal sites or in construction sites where soil excavation is carried out for new infrastructures or buildings. In these conditions soil compaction severely increases soil anaerobic conditions with an alteration of biogeochemical patterns, a reduction in soil water infiltration and retention together with the formation of hardened soil layers. Finally we have landscape degradation of agricultural areas which represents a significant image damage for agricultural production and causes a reduction in value of its ecosystem services (see chapter 3).

9.3 Tecniche di bonifica dei suoli contaminati: il fitorimedio

Il termine "Fitorimedio" deriva dall'associazione della parola greca *phytos* (pianta) e di quella latina *remedium* (curare, risanare) e consiste in un insieme di tecniche di coltivazione di piante finalizzate a ridurre la concentrazione o il rischio legato alla presenza di contaminanti organici ed inorganici (Greipsson, 2011, Ali et al., 2013). In un'ottica più ampia gli obiettivi del fitorimedio possono essere (Vangronsveld et al., 2009):

1) accumulo di metalli nella vegetazione a scopi economici (es. Ni e Tl): phytomining;
2) riduzione del rischio: bonifica con fitoestrazione assistita o fitostabilizzazione, oppure messa in sicurezza grazie all'interruzione del percorso di esposizione;
3) miglioramento della fertilità globale del suolo e dei suoi servizi ecosistemici: ripristino ambientale.

In questo capitolo ci si propone di illustrare la strategia ottimale per la gestione di siti agricoli che presentano problemi di degrado chimico-fisico, mettendo a frutto l'esperienza maturata durante il progetto LIFE ECOREMED puntualizzando alcune delle possibili tecniche di fitorimedio (o fitorisanamento). In particolare ci si concentrerà su fitoestrazione, fitostabilizzazione e rizodegradazione.

Fitoestrazione

La fitoestrazione consiste nel favorire il trasferimento di contaminanti inorganici dal suolo ad organi facilmente raccoglibili con le ordinarie tecniche agronomiche quali fusti, culmi e foglie (Halim et al., 2003) ed in alcuni casi anche la parte ipogea (Fiorentino et al., 2017). In questo modo si concentrano gli inquinanti in una biomassa facilmente gestibile e smaltibile ad intervalli regolari corrispondenti alla frequenza delle raccolte. L'utilizzo di specie particolarmente affini a specifici metalli e di tecniche agronomiche orientate all'incremento del trasporto nei tessuti vegetali degli stessi, consente di portarne le concentrazioni biodisponibili nel suolo al di sotto delle soglie di rischio.

Le specie più idonee per la fitoestrazione devono preferibilmente presentare le seguenti caratteristiche(Alkorta *et al.,*2004).:

1 tolleranza ad alte concentrazioni di metalli,
2 accumulo nei tessuti che saranno prelevati con le raccolte,
3 rapido tasso di crescita,
4 elevata produzione di biomassa,
5 apparato radicale ben sviluppato,
6 facilità di gestione culturale,
7 proprietà geneticamente stabili,
8 eventuale interesse economico della biomassa,
9 non pabularità (non gradite agli animali al pascolo).

Nel risanamento di suoli agrari, va considerata la possibilità di utilizzare colture da biomassa da *Short Rotation Forestry* per il duplice obiettivo di risanare un suolo e produrre energia rinnovabile (es. Pioppo, Jatropha e Salice, Abhilash et al., 2012). In questo modo si ottiene come risultato principale il mantenimento della vocazione agricola di aree inquinate o potenzialmente tali,

9.3 Phytoremediation of contaminated soils

The term phytoremediation derives from the association of the Greek word *phyton* (plant) and the Latin word *remedium* (cure). It consists of a pool of agricultural techniques aimed at reducing the concentration or the risk related to the presence of organic and inorganic contaminants using plants and soil fertilization (or amendment) (Greipsson, 2011, Ali et al., 2013). In a broader perspective phytoremediation may have the following aims (Vangronsveld et al., 2009):

1) Metal accumulation in plant tissues for economic purposes (e.g. Ni e Tl) such as phytomining;
2) Risk management: gentle soil remediation and/or phytostabilization and/or making the site safe;
3) Increase in soil fertility and improvement in its ecosystem services.

This chapter focuses on the description of optimal strategies for managing chemically and physically degraded agricultural soils. We will describe the main phytoremediation strategies validated during the LIFE project ECOREMED including phytoextraction, phytostabilization and rhizodegradation

Phytoextraction

This technique aims to increase accumulation of potentially toxic elements (PTEs) in easily harvestable crops in order to concentrate metals in biomass to be disposed of or used in other chemical conversion processes. The main PTE sinks are trunks, culms and leaves (Halim et al., 2003) and in some cases also belowground organs such as rhizomes (Fiorentino et al., 2017). Metal uptake can be significantly increased by selecting appropriate species and enhancing PTE transfer to plant tissues with specific cropping techniques. This process can significantly reduce the bioavailable PTE fraction, with values below the risk threshold. The most suitable species for phytoextraction present the following characteristics (Alkorta *et al.,* 2004):

1 tolerance to high PTE content ;
2 PTE accumulation in easily harvestable organs,
3 fast-growing biomass,
4 high biomass accumulation,
5 high root growth,
6 easy cropping management,
7 genetically stable attributes,
8 biomass useful for energy production or green chemistry
9 not appreciated by grazing animals

Short rotation forestry (SRF) crops (e.g. poplar, jatropha, willow) perfectly fit with the above-mentioned attributes, proving to be appropriate tools for both reclaiming soils and producing biomass (Abhilash et al., 2012). SFR-based phytoremediation allows the high productivity of (potentially) polluted areas to be maintained, lowering soil PTE content below the thresholds of risk without any detrimental effect on soil fertility. Indeed, perennial crop cultivation minimises soil disturbance (no tillage), favouring C storage in the soil with the conversion of crop residues (e.g. litter) and root exudates into soil

nella prospettiva di ritornare all'ordinario utilizzo per produzioni di interesse alimentare una volta che le concentrazioni dei contaminati siano scese al di sotto delle soglie di rischio.
La scelta di specie poliennali consente di minimizzare il disturbo del suolo favorendo un naturale processo di recupero della fertilità, grazie all'accumulo del carbonio derivante dai residui e dagli essudati radicali nello strato superficiale.
E' ormai comprovata anche l'elevata capacità fitoestrattiva di specie erbacee a ciclo annuale appartenenti alla famiglia delle Brassicacee (es. *Brassica juncea* L o senape indiana) che sono in grado di stoccare nella parte epigea quantità di metallo nettamente superiori a quelle normalmente presenti nelle colture. Infine, va menzionata la Canna comune (*Arundo donax* L), che è in grado di produrre elevate quantità di biomassa concentrando in modo preferenziale l'accumulo di metalli nei rizomi che a fine ciclo possono essere rimossi e smaltiti in discarica.
Di seguito riportiamo le specie di interesse agrario di comprovata efficienza fitoestrattiva (Tabella 1)

Fitostabilizzazione
Questa tecnica consente sia la riduzione della presenza di contaminati nella sorgente secondaria (suolo contaminato), sia nell'interruzione delle vie di esposizione per la popolazione o i lavoratori che frequentano un sito. Uno dei meccanismi principali è l'immobilizzazione della frazione biodisponibile dei MPT attraverso l'assorbimento radicale da parte delle piante; a questa vanno aggiunti i meccanismi di riduzione/precipitazione che inattivano la tossicità dei metalli limitandone la presenza all'interfaccia suolo- pianta (Mahar et al., 2016).
La fitostabilizzazione può avere come obiettivo la limitazione del sollevamento polveri che può essere una via di esposizione predominante in ambiente mediterraneo durante i periodi siccitosi (giugno-agosto): in questi casi vengono selezionate specie capaci di colonizzare rapidamente il suolo in modo da evitare che particelle contaminate vengano trasportate per erosione eolica. La soluzione tecnicamente più efficace è quella di un inerbimento con un miscuglio microterme-macroterme. Questa consociazione è in grado di colonizzare rapidamente il suolo durante il periodo più umido e fresco con l'utilizzo di specie da prato microterme (es. Loietto e Festuca), e di garantire una copertura adeguata durante il periodo estivo che a causa della siccità è più esposto al sollevamento delle particelle di terreno grazie a graminacee resistenti allo stress idrico e in grado di formare un tappeto erboso compatto come la Gramigna (*Cynodon dactylon L.*) o il Paspalo (vedi tabella 2).
Non è secondaria la necessità di rendere inaccessibili i siti qualora se ne voglia limitare l'utilizzo improprio o illegale (pascolamento, coltivazione di specie alimentari) garantendone nel contempo il recupero nei tempi necessari: in questi casi si selezionano specie a rapida crescita come l'*Arundo donax* (L) o il *Mischantus sinensis* (L) capaci di colonizzare con rapidità il suolo, adattandosi ad ambienti particolarmente asfittici e destrutturati, e capaci di formare dal 2°-3° ciclo colturale delle barriere che limitano in modo decisivo l'accesso al sito.

organic matter (SOM).
Another tool consists in species belonging to Brassicaceae (e.g. *Brassica juncea* L known as Indian mustard). These herbaceous crops are known to be hyperaccumulators of several PTEs, meaning that PTE content in their tissues are usually of orders of magnitude higher than in other plants. Finally, there are some lignocellulosic herbaceous crops for biomass production such as *Arundo donax* L (giant reed) with a preferential allocation of PTEs in rhizomes suitable for harvest at the end of the phytoremediation programme with a significant removal of PTEs from the soil rooted layer. A short-list of some crops which may be used for phytoextraction is provided in Table 1.

Phytostabilization
This technique aims to both reduce PTE content in the secondary source of pollution (contaminated soil) and limit exposure for the population or workers who frequent a site. A well-recognized mechanism of phytostabilization is the immobilization of the PTE bioavailable fraction through root compartmentalization. In addition there are the reduction/precipitation mechanisms that inactivate the toxicity of metals in the rooted layer, limiting their availability (Mahar et al., 2016). Phytostabilization may be used to limit dust lifting which may be a predominant source of exposure in Mediterranean areas during dry periods (June-August): in such cases we must choose fast-growing species able to rapidly colonize the soil, forming a compact turf to hinder wind erosion. To achieve this goal, the most effective tool consists in perennial grasses including both microtherm and macrotherm species. Intercropping such species aims to cover the soil rapidly during the wet-cold season with microtherms (e.g. ryegrass or fescue), and ensure high soil cover during the dry season with drought-resistant grass such as Bermuda grass (*Cynodon dactylon L.*) or dallisgrass (*Paspalum spp*.) (see table 2).
In some cases limiting the access to polluted/degraded sites is mandatory to avoid grazing and food production. The most effective way to do so is to transplant fast-growing species suchas giant *(Arundo donax L) or* common reed (*Miscanthus sinensis L.*), these plants being tolerant to high pollution levels and to anoxic conditions of unstructured soils. The above species create a green barrier within three growth cycles, limiting use of polluted/contaminated sites during the phytoremediation period.

Molte specie arboree impiegabili per la fitoestrazione possono dare un contributo anche in termini di fitostabilizzazione (vedi tabella 1), soprattutto riducendo la velocità del vento al suolo e la conseguente erosione eolica.

Many tree species suited to phytoextraction can also lend a contribution in terms of phytostabilization (see table 1), especially by reducing ground wind speeds and the consequent wind erosion.

Tabella 1. Specie arboree ed erbacee utilizzabili per la fitoestrazione

Table 1. Tree and herbaceous crops for phytoextraction.

Specie / Species	Metallo di riferimento / PTE extracted	Organo di stoccaggio / Sink tissue	Riferimenti / Reference
Populus nigra L (Pioppo nero)	Cd (160 g ha^{-1});	Fusto -Foglie	Vangronsveld et al., 2009
Eucalyptus camaldulensis (Eucalipto rosso)	Cd (8 g ha^{-1})	Fusto -Foglie	Luo et al., 2016
Salix viminalis L (Salice viminale)	Cd (340 g ha^{-1}); Zn (2000 g ha^{-1})	Fusto -Foglie	Vangronsveld et al., 2009
Arundo donax L (Canna comune)	Cd, Cr	Culmi-Foglie-Rizomi	Barbosa et al, 2015 Fiorentino et al., 2013, 2017
Brassica carinata A.(Cavolo di abissina)	As, Cd, Cr, Cui, Ni, Pb,Zn	Fusto -Foglie	Marchiol et al. 2004; Soriano and Fereres 2003
Brassica juncea L. (Senape indiana)	As, Cd, Cr, Cui, Pb,Zn	Fusto -Foglie	Clemente et al. 2005; Marchiol et al. 2004
Brassica nigra L.(Colza)	As, Cd, Cr, Cui, Ni, Pb,Zn	Fusto -Foglie	Marchiol et al. 2004;

Tabella 2. Specie erbacee lignocellulosiche e pratensi utilizzabili per la fitostabilizzazione

Table 2. Grasses and herbaceous lignocellulosic crops for phytostabilization.

Specie / Species	Principale effetto / Main effect	Riferimenti / Reference
Lignocellulosiche / Lignocellulosic crops		
Miscanthus sinensis (Miscanto) / (Silvergrass)	Riduzione MPT nella soluzione circolante Limitazione praticabilità del sito PTE reduction in soil solution; Limitation of site access	Barbosa et al., 2015 Fagnano, 2014
	Riduzione MPT della frazione biodisponibile Limitazione praticabilità del sito	Fiorentino et al., 2013 Fagnano 2014
Arundo donax (Canna comune) / (Giant reed)	Riduzione sollevamento particelle terreno Reduction of bioavailable PTE fraction Limitation of site access Limitation of wind erosion	
Phragmites australis (Canna di palude) / (Common reed)	Stoccaggio nei rizomi Limitazione praticabilità del sito PTE allocation to rhizomes Limitation of site access	Bacchetta et al., 2015 Fagnano, 2014
Pratensi microterme / Microtherm grasses		
Lolium perenne	Riduzione sollevamento particelle terreno Riduzione frazione biodisponibile Cu, Pb, Mn Reduction in dust lift Reduction in bioavailable PTE fraction of Cu, Pb, Mn	Prabha et al., 2010; Karami et al., 2011 (visconti)
Poa pratensis	Riduzione sollevamento particelle terreno Stabilizzazione Mn, Pb Reduction in dust lift Reduction in bioavailable PTE fraction of Mn, Pb	Prabha et al., 2010
Festuca spp. *Agrostis spp* *Phleum pratense* *Bromus inermis* *Elymus spp*	Riduzione sollevamento particelle terreno Stabilizzazione Cu, Zn and Pb Reduction in dust lift Reduction in bioavailable PTE fraction of Cu, Zn and Pb	Mahar et al., 2016
Pratensi macroterme / Macrotherm grasses		
Paspalum spp	Copertura suolo limitazione processi erosivi Reduction in dust lift	Mekonnen et al., 2015
Cynodon dactylon (gramigna)	Copertura suolo limitazione processi erosivi Reduction in dust lift	Kort et al., 1998

Rizodegradazione

La rizodegradazione si basa sulla capacità dell'attività radicale delle piante di modificare e potenziare la microflora del suolo attraverso il rilascio di essudati radicali ed altri composti utilizzabili come substrato di crescita da parte dei microrganismi. A questo va aggiunto l'incremento di ossigeno attraverso la fessurazione degli strati di suolo esplorati delle radici con conseguente potenziamento dei microbi aerobici. Questo effetto è particolarmente marcato nel volume di suolo distante al massimo 2-5 mm dalle radici che viene denominato "rizosfera" e rappresenta la chiave di volta altrettanto importante nel recupero di suoli degradati attraverso la tecnologia del fitorisanamento. La rizodegradazione è la tecnica di fitorimedio principale laddove l'inquinamento predominante è rappresentato da composti organici; l'attività radicale è in questi caso in grado di potenziare l'azione di microrganismi naturalmente presenti nel suolo ed in grado di degradare i composti organici a forme a differente livello di tossicità.

Tutte le pratiche agronomiche orientate ad un miglioramento dell'estensione e dell'efficienza radicale possono incidere in modo positivo sulla rizodegradazione: tra queste vanno ricordate la fertilizzazione organica e l'inoculo con funghi micorrizici dei quali si parlerà nella sezione successiva. Inoltre una tecnologia di fitorimedio dei composti organici può avvalersi anche dell'inoculo massivo di batteri autoctoni, e per questo adattati agli inquinanti specifici di ciascun sito, in modo da incrementare la degradazione degli inquinanti con l'applicazione in fertirrigazione di formulati microbici prodotti ad hoc (cfr. capitolo 10).

9.4. Utilizzo del compost e dei funghi micorrizici per potenziare il fitorimedio

La efficienza del fitorimedio può essere potenziata con due tecniche agronomiche comunemente utilizzate nella gestione di colture di interesse alimentare: la fertilizzazione con matrici compostate e l'inoculo delle radici con funghi micorrizici.

Il compost è un ammendante ottenuto attraverso un processo aerobico di stabilizzazione della sostanza organica di origine vegetale ma anche da scarti organici derivanti dalla raccolta differenziata nei rifiuti solidi urbani.

Il suo utilizzo nei piani di fitorimedio, a dosi generalmente comprese tra le 40 e le 80 t ha^{-1} in peso fresco, ha come principale effetto il miglioramento della fertilità fisica e biologica del suolo attraverso i seguenti meccanismi:

a) miglioramento della struttura grazie agli apporti di sostanza organica che favoriscono la formazione di aggregati stabili;
b) potenziamento dell'attività microbica che può servire nel breve periodo ad attivare il metabolismo di degradazione degli inquinanti organici (vedi sezione sulla rizodegradazione);
c) attivazione del ciclo dell'N.

La fertilizzazione con compost consente in questo modo di creare una condizione idonea all'accrescimento delle colture anche in ambienti particolarmente ostili. Di particolare interesse per i protocolli di fitorimedio sono gli effetti del compost sulla mobilità e sulla biodisponibilità dei metalli (Huang et al. 2016). In particolare sono stati evidenziati processi di immobilizzazione legati all'assorbimento diretto

Rhizodegradation

Rhizodegradation is based on the ability of plants to modify and enhance the soil microflora through the release of root exudates and other compounds usable as a growth substrate by microorganisms. Another effect of this technique is to increase aerobic conditions in the soil due to the effect of root growth on soil porosity. This enhances the activity of soil microflora able to oxidize organic pollutants. The effects described above are important in the "rhizosphere" which is a specific volume of soil surrounding roots (within a maximum distance of 2-5 mm) known as the rhizosphere and represents the keystone in restoring polluted soils through phytoremediation.

Rhizodegradation is the main phytoremediation technique when the pollution in question predominantly consists in organic compounds. Root activity enhances the activity of microorganisms naturally present in the soil and capable of degrading organic compounds.

All agronomic practices aimed at increasing root growth and efficiency can positively affect rhizodegradation. In this context, organic fertilization and the inoculation with mycorrhizal fungi also play a major role, as discussed in the next section. In addition, rhizodegradation can also use massive inoculum of native bacteria in order to increase the degradation of organic pollutants with the application of microbial formulations designed using bacteria adapted to the site-specific conditions (see chapter 10).

9.4. Assisted phytoremediation with compost fertilization and mycorrhizal **fungi**

The efficiency of phytoremediation can be enhanced with two agronomic techniques commonly employed in food crop management: fertilization with composted organic matter and inoculation of roots with mycorrhizal fungi. Compost is a fertilizer obtained through a process of aerobic stabilization of crop residues and also from organic municipal solid wastes. Compost use in phytoremediation, with a reference dose ranging from 40 to 80 Mg ha^{-1} (wet weight), positively affects soil fertility according to the mechanisms described below:

a) Improvement of soil structure due to the formation of stable mineral-organic aggregates;
b) Enhancement of microbially driven degradation of organic pollutants (see section on "rhizodegradation");
c) Activation of N-cycling bacteria.

These effects allow a suitable condition for crop growth to be created even in hostile environments. For phytoremediation purposes we must highlight the compost effect on PTE mobility and bioavailability (Huang et al. 2016) due to direct immobilization from compost (Vanegas *et al.*, 2015) and the formation of insoluble complexes (Achiba *et al.*, 2009). With these mechanisms humic substances reduce the passive PTE mobility (diffusion, mass transport), limiting vertical or lateral flows towards adjacent water bodies. In addition, organic fertilization is associated with an increase in active PTE mobility (root uptake), thanks to the formation of humus-metal complexes, prone to be

da parte delle matrici compostate (Vanegas et al. 2015) e formazione di complessi insolubili (Achiba et al., 2009).
In altri termini le sostanze umiche riducono la mobilità passiva (diffusione, trasporto di massa) la quale determina flussi verticali o laterali con il rischio di contaminare i corpi idrici adiacenti. A questo va aggiunto un aumento della mobilità attiva (assorbimento radicale), visto che i complessi humus-metallo in presenza degli acidi organici degli essudati radicali, rilasciano i metalli e li rendono disponibili all'assorbimento da parte delle piante fitoestrattrici (Fiorentino *et al,* 2013)

I funghi micorrizici sono molto comuni nella rizosfera e sono in grado di instaurare una simbiosi di tipo mutualistico con la porzione ipogea delle piante. L'utilizzo dei funghi micorrizici può favorire in modo determinante la colonizzazione di suoli degradati attraverso il potenziamento dell'attività radicale che ne aumenta l'efficienza di asportazione dei nutrienti e metalli potenzialmente tossici. I meccanismi più riportati in letteratura sono:
a) diluizione dei MPT nei tessuti delle piante grazie all'incremento della biomassa (Kaldorf et al., 1999);
b) esclusione dei metalli attraverso la precipitazione o la chelazione nella rizosfera (Christie et al., 2004);
c) riduzione delle asportazioni da parte della coltura grazie alla diretta compartimentalizzazione nei tessuti del fungo (Christie et al., 2004)

Tra le specie particolarmente utili per potenziare il fitorimedio vanno ricordate quelle appartenenti al genere *Trichoderma* spp. (Fiorentino et al., 2013) dei quali è nota la capacità di limitare fortemente la crescita di funghi patogeni come *F. oxysporum, R. solani, Phytophthora spp, Verticillium* spp e altri. Inoltre i funghi del genere Trichoderma esplicano una attività di antibiosi attraverso la produzione di un vasto numero di metaboliti secondari ad attività antibiotica (Harman et al., 2004). Alcuni ceppi stabiliscono forti e durature colonizzazioni delle superfici delle radici penetrando addirittura fino al di sotto dell'epidermide (Woo and Lorito, 2007). Grazie alla produzione di una grossa varietà di enzimi depolimerizzanti, *Trichoderma* spp. sono capaci di utilizzare come fonte di carbonio e azoto un ampio gruppo di composti e ciò, insieme all'abbondante produzione di conidi e all'adattabilità a diverse condizioni ambientali, conferiscono a queste specie un'elevata competitività rispetto alla restante microflora del terreno. Altri ceppi di Trichoderma interagiscono attivamente con la pianta promuovendone la crescita delle radici e del fusto (Harman et al., 2004).
Negli ultimi anni è stata dimostrata anche la capacità di alcuni ceppi di *Trichoderma* di biodegradare o comunque tollerare una vasta gamma di inquinanti ambientali tanto è vero che in letteratura è riportato l'impiego di *Trichoderma spp*. nel fitorisanamento di suoli inquinati da idrocarburi (Harman et al., 2004). Tali ceppi, in virtù delle loro peculiarità, sono stati inseriti anche in programmi di recupero di suoli; essendo microrganismi rizosfera-competenti, contribuiscono alla stabilità delle comunità microbiche nella rizosfera, controllano la microflora patogena e competitiva: insomma migliorano la salute delle piante e aumentano lo sviluppo e la densità delle radici. Nella fattispecie si è visto che il ceppo T22 di *T. harzianum* aumenta notevolmente l'efficacia delle

broken up by organic acids of plant exudates, increasing the PTE bioavailable fraction (Fiorentino *et al.,* 2013).

Mycorrhizal fungi are fairly common in the rhizosphere and are able to establish a mutualistic symbiosis with plant roots. Mycorrhizal symbiosis can foster plant colonization of contaminated/degraded soils, enhancing root uptake of nutrients and PTEs according to the following mechanisms:
a) dilution of PTE contents in plant tissues due to increased biomass (Kaldorf et al., 1999);
b) exclusion of metals through precipitation or chelation in the rhizosphere (Christie et al., 2004);
c) direct uptake in fungi tissues that limit transport in plant tissues (Christie et al., 2004)

Among mycorrhizal fungi species viable for phytoremediation, *Trichoderma spp.* (Fiorentino et al., 2013) are well recognized for their antagonistic effect on pathogenic fungi such as *F. oxysporum, R. solani, Phytophthora spp* and *Verticillium spp*. In addition the Trichoderma genus is recognized for its production of a large number of secondary metabolites with antibiotic activity (Harman et al., 2004). Thanks to the production of a large variety of depolymerising enzymes, *Trichoderma spp.* are able to use a large group of compounds as a source of carbon and nitrogen. Together with the abundant production of conidia and adaptability to different environmental conditions, this makes *Trichoderma* highly competitive with respect to the common soil microflora. Some strains establish strong and lasting colonization of the roots, penetrating surfaces even below the epidermis (Woo and Lorito, 2007). This fungi-root interaction promotes above-ground and below-ground plant growth(Harman et al., 2004).
In recent years the ability of some *Trichoderma* strains to biodegrade or tolerate a wide range of environmental pollutants has also been demonstrated, allowing their use in the phytoremediation of soils contaminated by hydrocarbons (Harman et al., 2004).
A widely used strain for this purpose is *T. harzianum* T22 which greatly increases the effectiveness of plants used for phytoremediation, as proved by experiments showing a significant decrease in soil metal content due to inoculated fern and giant reed and a significant increase in root biomass, compared to control plants (Harman et al., 2004, Fiorentino et al., 2013).

9.5. Application of assisted phytoextraction in the Ecoremed Protocol

The Ecoremed protocol is based on the cultivation of vegetative structures for the management of the most widespread cases of degradation of agricultural soils as stated under Italian Law 6 of 2014 (Art. 2, paragraph 4) which recommends "in the context of remediation and ecosystem balance, the use of natural regeneration and agroecological systems, including plants with phytoremediation properties"
In particular, this protocol can be modulated according to the specific operating contexts as described below.

piante utilizzate per il fitorisanamento e recenti studi hanno dimostrato che il trattamento delle radici di felci con questo fungo determina una drastica riduzione dei livelli di arsenico nei suoli contaminati ed un significativo incremento della biomassa radicale, rispetto alle piante controllo (Harman et al., 2004, Fiorentino et al., 2013).

9.5. Applicazione della fitoestrazione assistita nel protocollo Ecoremed

Il protocollo Ecoremed consiste nella coltivazione di strutture vegetali con lo scopo di gestire i casi di degrado più comunemente riscontrati nei suoli agricoli come previsto dalla Legge 6 del 2014 (art. 2 comma 4) che prevede *"nell'ambito degli interventi di bonifica e riequilibrio dell'ecosistema, l'utilizzo di sistemi naturali rigenerativi e agroecologici, attraverso piante con proprietà fitodepurative previste dalla legislazione vigente*".

L'utilizzo del protocollo Ecoremed è modulabile a seconda dei differenti contesti in cui si va ad operare. Di seguito sono riportati i casi studio in cui è stato applicato e validato.

A) Sito contaminato da EPT (Elementi Potenzialmente Tossici, c.d. metalli pesanti) biodisponibili (cfr. Sito di S. Giuseppiello, cap. 19)

In questo caso l'obiettivo potrebbe essere triplice: 1) bonificare il suolo riducendo gradualmente la frazione biodisponibile dei MPT; 2) interrompere i percorsi di esposizione degli inquinanti mettendo in sicurezza il sito; 3) analizzare i rischi diretti ed indiretti.

La tecnica più pertinente per la bonifica include l'utilizzo di piante arboree (pioppo, eucalyptus, salice) la cui attività fitoestrattiva viene rafforzata dalla presenza di un prato di micro-macroterme che svolge anche la funzione di messa in sicurezza impedendo il sollevamento e la dispersione delle particelle di terreno. Negli hot spot con concentrazioni di metalli biodisponibili particolarmente alte, la bonifica può essere potenziata consociando le specie arboree a brassicacee come la Senape indiana che è tra le specie erbacee più efficaci nell'asportare i metalli (cfr. sezione fitoestrazione, par. 9.3).

Nel caso in cui le concentrazioni di contaminanti siano talmente alte da non rendere perseguibile l'ipotesi della bonifica, va valutata la possibilità di effettuare la messa in sicurezza operativa con l'utilizzo di colture come la Canna comune o la Canna di palude che sono in grado di interrompere il percorso di esposizione ai contaminanti, di limitare il flusso degli inquinanti verso le falde e l'accesso al sito, immobilizzando gli MPT nei rizomi e negli strati superficiali del suolo. In questi casi va valutata la qualità delle biomasse lignocellulosiche prodotte analizzandone il contenuto di MPT e confrontandolo con i limiti normativi previsti per il loro utilizzo come sottoprodotti (vedi cap. 2). In funzione dell'uso previsto di questo sito (es. residenziale, a verde), la messa in sicurezza può essere garantita anche da un inerbimento fitto con un prato permanente in modo da consentire la fruibilità dell'area in sicurezza in quanto viene interrotto il percorso di esposizione ai contaminanti attraverso l'inalazione ed il contatto dermico.

B) Inquinamento da EPT non biodisponibili e/o da composti organici

In questo caso i principali obiettivi sono: 1) limitare il sol-

A) Soil contamination by PTEs (potentially toxic elements) with a large bioavailable fraction (see the S. Giuseppiello site, ch. 19)

In this case the objective may be twofold: 1) remediate the soil by gradually reducing the bioavailable fraction of potentially toxic metals; 2) terminate the exposure pathways of pollutants by making the site safe.

The most appropriate technique is cultivating SRF trees (poplar, eucalyptus, willow) intercropped with a microtherm-macrotherm grass in order to combine the phytoextractive ability of trees with the effect of turf in preventing lifting and dispersion of soil particles. In the hot-spot areas with a very high bioavailable metal concentration, remediation can be enhanced by intercropping also species belonging to Brassicaceae such as Indian mustard (see the section on "Phytoextraction", section 9.3).

When phyto-reclamation is not achievable due to excessive PTE concentration, we can opt to secure the site operationally by using common reed or giant reed that can interrupt contaminant exposure pathways, limit the flow of pollutants towards the groundwater and site access , and immobilise the PTEs in the rhizomes and in the upper soil layers. In this case, the quality of biomass produced must be verified, analyzing the content of PTEs and comparing it with the anticipated regulatory limits for their use as by-products (see chapter 2). According to the intended use of the site (e.g. residential, to green), site safety can also be guaranteed through dense permanent grassing, ensuring a safe fruition by interrupting contaminant exposure routes through inhalation and skin contact.

B) Soil contaminated by non-bioavailable PTEs and/or organic pollutants

In this case the focus of phytoremediation should be to: 1) limit the lift and the dispersion of contaminated soil particles 2) enhance biodegradation of organic compounds by soil microflora. The control of dust lift can be achieved with permanent grassing, including microtherm-macrotherm species, (see section 9.3 on phytostabilization") with a lignocellulosic rhizomatous species such as the common reed or giant reed. The above-mentioned crops are able to explore large amounts of soil with their root system and hence able to reduce the content of organic compounds through rhizodegradation. This activity can be enhanced with the use of specific microbial consortia (bioremediation), as stated in chapter 10. It must be pointed out that in this specific case there are no risks of pollutant transfer to crops, whether non-food or food (e.g. orchards)

C) Degraded soil and disfigurement of the landscape (cfr. Teverola site, ch. 19)

This is the most frequently recognized problem in different areas of Campania (see chs. 3 and 4). Soil physical degradation and the disfigurement of the landscape represent a strong limitation to the provision of ecosystem services, being linked to soil compaction, destruction of the soil structure and waste disposal (see section 9.2).

levamento e la dispersione delle particelle di terreno contaminato 2) bonificare il suolo dai composti organici potenziando la biodegradazione da parte microflora del suolo.
Il controllo del movimento del particolato può essere ottenuto attraverso prati permanenti con specie micro e macroterme (cfr. sezione di fitostabilizzazione, par. 9.3) oppure con specie tappezzanti rizomatose come la Canna comune o la Canna di palude. Le colture summenzionate sono dotate di un apparato radicale in grado di esplorare una notevole quantità di suolo e pertanto in grado rizodegradare i composti organici. Questa attività può essere potenziata con l'utilizzo di specifici consorzi microbici (Bioremediation), come riportato nel cap. 10. Va precisato che nel caso descritto in questa sezione non ci sono rischi di contaminazione delle biomasse lignocellulosiche coltivate o delle colture agrarie (es. frutteti).

C) Siti caratterizzati da degrado fisico ed estetico-percettivo (cfr. Sito di Teverola, cap 19)
Si tratta del caso più frequentemente riscontrato in diverse zone della regione Campania (cfr. cap. 3 e 4). Il degrado fisico e paesaggistico è legato, ad esempio, al compattamento dei suoli, alla sua destrutturazione ed alla presenza di rifiuti e rappresenta una fortissima limitazione all'erogazione dei servizi ecosistemici da parte del suolo (cfr. par. 9.2). In questi casi, oltre alla rimozione ed allo smaltimento dei rifiuti, se separabili dalla matrice suolo, il fitorisanamento può essere usato per il ripristino ambientale ottenibile applicando tutte le tecniche che migliorino la fertilità fisica del suolo come la fertilizzazione con le matrici compostate e la minimizzazione della lavorazione. Pertanto ci si orienta verso le specie che richiedono la più ridotta manutenzione come l'*Arundo donax L.* in grado anche di limitare l'accesso al sito da parte dei mezzi pesanti.

9.6 Fasi della realizzazione dell'impianto
Successivamente alla caratterizzazione chimico-fisica ed a eventuali rilievi fitosociologici (vedi cap. 5, 6 e 7) il protocollo ECOREMED prevede le seguenti operazioni:

1) rimozione di materiali di rifiuto, pietrosità e flora preesistente
Questa operazione è richiesta soprattutto quando il sito da recuperare è stato utilizzato per lo stoccaggio dei rifiuti o quando è oggetto di sversamenti illegali. Per procedere con la rimozione è necessario redigere un inventario delle differenti categorie di rifiuto presenti facendo riferimento alla codifica europea (codici CER) e stimare i quantitativi da gestire per preventivare i costi di smaltimento. E' necessario procedere con un iter simile per i siti che hanno mantenuto un utilizzo agricolo e sui quali insistano ancora colture poliennali piantumante precedentemente al programma di recupero del suolo, e non utilizzabili in piani di fitorimedio (es. frutteti). Tali specie devono essere necessariamente smaltite seguendo la procedura precedentemente descritta. Qualora siano presenti specie utilizzabili per il fitorimedio (es. Pioppo), nei limiti della gestibilità del sito si consiglia di integrarle con il programma di risanamento.

2) Selezione della flora spontanea utile al fitorisanamento e valutazione dell'idoneità di altre specie
A seguito delle indagini fitosociologiche descritte nel

In these cases, in addition to the removal of the waste fraction separable from the soil, phytoremediation can be used for environmental recovery by applying all the techniques that improve the physical fertility of the soil, such as fertilization with composted matrices and minimum tillage. In this way the most suitable species are those with reduced maintenance, such as giant reed, which can also limit access to the site on the part of heavy machinery.

9.6 Operative stages of phytoremediation
The following agronomic practices are consecutive to soil physical and chemical characterization and phyto-screening (see chapters 5, 6 and 7)

1) removal of waste, stones and pre-existing flora
This activity is obviously required especially in waste disposal areas or on sites subjected to illegal spills. To proceed with removal it is necessary to draw up an inventory of the different categories of waste present by referring to the European Waste Catalogue (EWC) code, estimating the quantities to be managed and the costs of disposal. The same approach should be adopted in agricultural sites on which perennial crops not suitable for phytoremediation purposes are already present. The biomass of these crops must be necessarily disposed of following the previously described procedure. If there are any species that can be used for phytoremediation (e.g. poplar), it is recommended to integrate them within phytoremediation programmes.

2) Selection of wild plants suitable for phytoremediation and evaluation of the suitability of other candidate species
Native herbaceous crops suitable for phytoremediation will be identified according to the phyto-screening described in chapter 7. It is recommended to carry out tests in a controlled environment in order to assess the effectiveness of the chosen species, using the soils that have the highest levels of contamination. As regards lignocellulosic trees (e.g. poplar) and herbaceous species (e.g. giant reed) suitable for phytoremediation, it is recommended to set up experimental plots *in situ* in order to evaluate the engraftment of the available propagation material (e.g. poplar cuttings; rhizomes). The species with the lowest mortality will be considered for transplanting in the following cropping season.

3) compost fertilization
Compost fertilization is recommended in physically and chemically degraded soils according to the reference dose of 30-60 Mg ha^{-1} (FW), in order to recover fertility. The same fertilization rate is recommended to enhance microbial biodegradation of organic pollutants (see chapter 10). On soils whose fertility has not been threatened, the compost fertilization rate may be 10 Mg ha^{-1} (wet weight) in order to promote plant growth and increase PTE bioavailability. It is recommended to use high quality composted material that complies with the limits established by the legislation on fertilizers

capitolo 7, saranno identificate le specie erbacee natie utilizzabili in un programma di fitorimedio. Qualora l'obiettivo principale sia la bonifica del suolo da EPT, si suggerisce di effettuare prove in ambiente controllato per valutare l'efficacia delle specie prescelte utilizzando i suoli che presentano i livelli di contaminazione più elevati.
Per quanto riguarda le specie lignocellulosiche arboree (es. Pioppo) ed erbacee (es. Canna comune) candidate all'utilizzo per il programma di fitorimedio, si suggerisce di valutare in via preventiva la capacità di attecchimento del materiale di propagazione prescelto (es. talee, astoni non radicati, astoni radicati per il pioppo; rizomi per la Canna comune) allestendo delle parcelle di saggio direttamente sul sito. L'anno successivo si procederà alla piantumazione sull'intero sito delle specie che hanno mostrato la percentuale di mortalità inferiore.

3) spandimento del compost
Su suoli poveri chimicamente e con problemi di struttura si suggerisce di apportare quantità di compost comprese tra le 30 e le 60 t ha^{-1} (peso fresco), con l'obiettivo principale di ripristinare nel lungo periodo la fertilità del suolo. Lo stesso dosaggio è adeguato al caso in cui si debba stimolare la biodegradazione dei composti organici (cfr. cap.10) da parte della flora microbica. Sui suoli che hanno mantenuto una vocazione agricola e per i quali non sono registrati problemi particolari di fertilità chimica e fisica si suggeriscono dosi pari a 10 t ha^{-1} (peso fresco) con lo scopo di creare un ambiente favorevole alle colture che saranno trapiantate e o seminate successivamente e di stimolare la biodisponibilità degli EPT. Si raccomanda di utilizzare materiale compostato di qualità e conforme ai limiti stabiliti dalla normativa sui fertilizzanti (D.lgs 75/2010). Si consiglia di effettuare l'operazione di spandimento del compost un mese prima della piantumazione/semina delle colture (pieno inverno) in modo da favorirne la stabilizzazione in campo (ove necessario) ed evitare fenomeni di fitotossicità.

4) lavorazioni
Si consiglia di effettuare una lavorazione profonda (40-60 cm) con un ripuntatore. La ripuntatura va effettuata durante il periodo estivo (settembre) in condizioni di umidità, evitando il peggioramento delle condizioni strutturali dei suoli.
Tali interventi sono anche necessari quando l'utilizzo del sito ne abbia determinato il compattamento sottosuperficiale (es. passaggio di mezzi pesanti per lo smaltimento ed il trattamento dei rifiuti).
In prossimità della piantumazione delle colture o della semina di pratensi e/o Brassicacee è necessario preparare il suolo con una fresatura che omogenizza i primi 20 cm di suolo garantendo l'interramento del compost ed eventuali residui colturali.

5) piantumazione delle essenze arboree e delle erbacee ligno-cellulosiche
Tutte le specie arboree e le specie rizomatose (es. Canna comune) vanno trapiantate ad inverno inoltrato durante la fase di riposo vegetativo delle colture. Per le arboree si consigliano sesti di impianto particolarmente fitti (2 x 1 m; 3 x 1 m) in modo da comporre delle spalliere con elevato potere fitoestrattivo. Qualora il sito sia stato messo in sicurezza con tecniche ingegneristiche e la piantumazione

(Legislative Decree 75/2010). Spreading of the compost should be performed one month before planting/sowing of the crop (winter) so as to facilitate its stabilization (when necessary) and avoid phytotoxicity.

4) soil tillage
Deep tillage (40-60 cm) should be performed with a ripper during the late summer so as to operate in optimal working conditions in terms of soil moisture. Indeed, soil structure can be seriously compromised by performing tillage on wet soils (e.g. winter or early spring). Soil ripping is recommended on compacted soils, previously subjected to the transit of heavy vehicles and or waste disposal. Soil preparation prior to crop transplant (e.g. trees) and/or seeding (e.g. brassicaceae, grass) must carried out with a rotary-hoe in order to mix compost and crop residues in the 0-20 cm soil layer.

5) transplant of trees and herbaceous lignocellulosic species
Tree as well as rhizomatous species (giant reed) should be transplanted in late winter and the dormancy stage. Dense planting layouts (2 x 1 m; 3 x 1 m) should be employed for tree species in order to create planting espaliers with high phytoextraction efficiency.
For phytoremediation plans aimed at increasing the landscape value of a site (when phytoextraction is not required) a larger planting layout can be employed (5 x 5 m; 7 x 7 m; 10 x 10 m) in order to allow the growth of tall forest species (e.g. poplar and willow). The planting layout of rhizomatous species will be 1 x 1 m in loose soils, where rhizome growth is not limited, while a higher density (0.60 x 0.60 m) is recommended in heavy soils
Tree species transplanted at a high density will be managed as short rotation forestry, harvesting biomass every three years; tree species with a higher planting density will have a harvesting pattern with a growth period of 5-20 years (depending on the planting density).
An annual pattern will be adopted for giant reed harvest. Temporary storage of materials will be required after each harvest in order to plan their disposal to conform with the code of the European Waste Catalogue (EWC) (cfr. Point 1 in this section), or the reuse of biomass (energy, timber, ...) which is considered the byproduct of phytoremediation.

6) grassing
The seeding of microtherm grasses (e.g. ryegrass, fescue) should be carried out when the soil temperature is above 10 ° C and during the rainy season (i.e. the period from September to December). When irrigation water is available onsite the suitable time for sowing can be extended until April. For macrotherm species (e.g. Bermuda grass) seeding must be carried out in late spring (April-May) in order to reach a soil temperature close to 18-20 °C, ensuring adequate soil moisture in order to promote seed germination. Grass mowing and baling must be planned every month from June to November; temporary storage and subsequent disposal must be carried out according to the approach described in point 1 of this section.

avesse unicamente un valore paesaggistico si potrebbero anche coltivare specie ad alto fusto (es. Pioppi) con un sesto di impianto più ampio (5 x 5 m; 7 x 7 m; 10 x 10 m). Per le rizomatose si consiglia un sesto di 1 x 1 m su suoli più sciolti, in cui il rizoma può propagarsi facilmente, e sesti di impianto più stretti (0.60 x 0.60 m) su suoli argillosi. Le arboree trapiantate con un'alta densità andranno trattate come piante da Short Rotation Forestry operando un taglio ogni 3 anni; quelle trapiantate con un sesto più ampio avranno cicli di taglio che vanno dai 5 ai 20 anni a seconda della distanza di impianto. Le specie erbacee come la Canna comune saranno raccolte annualmente. Ad ogni operazione di taglio seguirà uno stoccaggio temporaneo dei materiali e lo smaltimento a seguito dell'identificazione dell'appropriato codice CER (cfr. punto 1 di questo paragrafo) oppure la riutilizzazione delle biomasse (energia, legna da opera,…) che sono considerate il sottoprodotto dell'attività di fitorisanamento.

6) semina delle colture pratensi
La semina delle pratensi microterme (es. Loietto, Festuca) va effettuata quando la temperatura del suolo è superiore ai 10°C e durante il periodo piovoso, ovvero nel periodo da settembre a dicembre. In caso di disponibilità di acqua per l'irrigazione il periodo adatto per le semine potrà protrarsi fino ad aprile. Per le macroterme (es. Gramigna) è necessario attendere la primavera inoltrata (aprile-maggio) in modo da raggiungere una temperatura al suolo prossima ai 18-20°C. E' importante garantire una bagnatura del suolo successivamente alla semina per favorirne la germinazione. Si suggerisce di prevedere delle falciature mensili del prato da giugno a novembre (5-6 interventi) ed il successivo imballamento, stoccaggio temporaneo e smaltimento del materiale sfalciato secondo la modalità definita al punto 1 di questo paragrafo.

7) rifornimento idrico delle colture
Qualora di disponga di acque idonee all'uso agricolo si consiglia di allestire un impianto di irrigazione in modo da garantire l'approvvigionamento idrico alle colture arboree ed alle pratensi macroterme nelle primissime fasi di crescita (irrigazione di soccorso). L'irrigazione deve essere gestita in maniera ottimale durante tutto il periodo primaverile-estivo, qualora l'impianto di fitorimedio debba garantire la stabilizzazione delle particelle di suolo durante il periodo siccitoso. La bagnatura del suolo infatti limita il sollevamento polveri e garantisce la copertura del suolo da parte delle pratensi macroterme.
Qualora le acque sotterranee non fossero idonee all'uso agricolo, si consiglia di provvedere con il trasporto in situ di acque di qualità con le quali effettuare irrigazioni di soccorso oppure di utilizzare specie particolarmente resistenti allo stress da siccità.

8) monitoraggio degli effetti dell'impianto di fitorimedio
Come per tutte le tecniche di bonifica, è necessario provvedere al monitoraggio degli effetti dell'impianto di fitorimedio durante il periodo in cui questo è presente sul sito.
In particolare per la fitoestrazione degli EPT è previsto il campionamento delle biomasse lignocellulosiche in corrispondenza della loro raccolta e la determinazione del contenuto dei contaminanti nei differenti organi della pianta (fusti, rami, foglie) e della loro umidità (variazione di peso

7) irrigation
When irrigation water is available it is recommended to set up an irrigation system in order to ensure water requirements of tree crops and macrotherm grasses in the very early stages of growth (emergency irrigation). Irrigation must be performed during the whole summer season in order to limit dust lift from the soil, ensuring a higher soil moisture content and grass covering. When water available on site is not suitable for crops, irrigation can be performed using safe water from other sites; alternatively drought-resistant species can be transplanted.

8) monitoring phytoremediation efficiency
As with all reclamation techniques, it is required to monitor the effects of phytoremediation when the plants are *in situ*. PTE phytoextraction can be monitored by sampling plant biomass before each harvest in order to determine the PTE content and moisture (after drying at 60°C until sample weight is constant) different plant organs (trunk, branches, leaves). The proportion between stems, branches and leaves on a minimum number of 20 plants also needs to be estimated, so as to be able to quantify their biomass on one hectare according to the amount of total biomass (whole aerial part) harvested on the site. The PTE content of the dry biomass of different organs multiplied by the biomass produced per hectare represents the PTE quantity (e.g. Mg/ha or g/ha) removed at each harvest. A similar approach should be followed for grass after each mowing. Soil samples must be collected in the rooted layer (0-30 cm and 30-60 cm depth) for monitoring soil bioavailable PTE (see chapter 6). Annual bioavailable PTE patterns are strictly correlated with crop uptake (e.g. SRF trees, grasses and intercropped Brassicaceae) and allow estimation of the PTE fraction liable to be transferred into the food chain through leaching into the groundwater, or being absorbed by the food crops concerned.
The indirect risk of transfer to the food chain can also be explored by monitoring PTE transfer to food crops in plots established in areas with higher PTE content (see chapter 14). Finally, monitoring the effects of grasses on dust lift as a consequence of turf formation can be carried out by setting specific samplers of particulate in the interrow area. Amongst the most commonly used samplers suitable for this purpose is the Big Spring Number Eight or Modified Wilson and Cook (Gao et al., 2016; Mendez et al., 2016). PTE content of the air particulate is linked to wind erosion from the polluted soil and thus to the turf effect on particulate lift.

dopo essiccazione a 60°C fino a peso costante del campione). E' necessario inoltre stimare la proporzione tra fusti, rami e foglie su un numero minimo di 20 piante, in modo da poter quantificare la loro biomassa su un ettaro una volta nota la quantità di biomassa totale (intera parte aerea) raccolta sulla superficie del sito.
I valori di EPT misurati nella biomassa secca dei differenti organi moltiplicati per le biomasse prodotte su un ettaro consentono di stimare le quantità di metalli (es. mg/ha oppure g/ha) asportate con ogni raccolta. Un approccio simile va seguito anche con le pratensi in corrispondenza di ogni taglio.
Contestualmente al rilievo sulla vegetazione è necessario prelevare dei campioni di suolo nello strato radicato (0-0.30 m; e 0.30-0.60 m) per la quantificazione delle frazioni biodisponibili di EPT (cfr. capitolo 6). La dinamica degli EPT biodisponibili nel suolo, associata a quella delle asportazioni da parte della vegetazione (arboreto inerbito) consente di apprezzare l'effetto del fitorisanamento sulla riduzione del rischio di trasferimento degli inquinanti inorganici alla catena alimentare attraverso la lisciviazione in falda o l'assorbimento da parte di colture di interesse alimentare.
Quest'ultimo aspetto può essere approfondito allestendo delle parcelle coltivate con colture alimentari particolarmente affini agli EPT target di ciascun sito, in modo da poter stimare rischi indiretti legati agli EPT attraverso il monitoraggio delle asportazioni delle colture scelte nelle zone del sito che presentano i maggiori livelli di contaminazione (cfr. capitolo 14). Infine il monitoraggio degli effetti degli inerbimenti sulla protezione del suolo e la limitazione della dispersione aerea del particolato può essere effettuato posizionando negli interfilari inerbiti delle opportuni campionatori per la raccolta del particolato aero disperso. I campionatori più comunemente utilizzati per questo tipo di monitoraggio sono i Big Spring Number Eight oppure i Modified Wilson and Cook (Gao et al., 2016; Mendez et al., 2016). Le analisi degli EPT nel particolato campionato confrontate con quelli presenti nel suolo possono essere utilizzate per stimare l'apporto dell'erosione eolica sulla dispersione del suolo e quindi, indirettamente, l'effetto del tappeto erboso sul contenimento di questo processo.

Bibliografia

Abhilash P.C.,Powell J.R., Singh H.B., Singh B.K., 2012. Plant-microbe interactions: Novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies. Trends in Biotechnology, 30, 416–420.

Achiba W.B., Gabteni N., Lakhdar A., Laing G.D., Verloo M., Jedidi N., Gallali T., 2009. Effects of 5-year application of municipal solid waste compost on the distribution and mobility of heavy metals in a Tunisian calcareous soil. Agriculture, Ecosystems & Environment, 130 (3–4), 156–163.

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

Alkorta I., Hernandez-Allica J., Becerril J.M., Amezaga I., Albizu I., Garbisu C., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environ-

References

Abhilash P.C., Powell J.R., Singh H.B., Singh B.K., 2012. Plant-microbe interactions: Novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies. Trends in Biotechnology, 30, 416–420.

Achiba W.B., Gabteni N., Lakhdar A., Laing G.D., Verloo M., Jedidi N., Gallali T., 2009. Effects of 5-year application of municipal solid waste compost on the distribution and mobility of heavy metals in a Tunisian calcareous soil. Agriculture, Ecosystems & Environment, 130 (3–4), 156–163.

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

Alkorta I., Hernandez-Allica J., Becerril J.M., Amezaga I., Albizu I., Garbisu C., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. Reviews on Environmental Health, 3, 71-90.

Bacchetta G., Cappai G., Carucci A., Tamburini E., 2015. Use of native plants for the remediation of abandoned mine sites in Mediterranean semiarid environments. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 94, 326–333.

Barbosa B., Boléo S., Sidella S., Costa J., Duarte M.P., Mendes B., Cosentino S.L., Fernando A.L., 2015. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils using the perennial energy crops Miscanthus spp. and Arundo donax L. Bioenergy Research, 8, 1500–1511.

Christie P., Li X., Chen B., 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. Plant and Soil, 261 (1), 209–217.

Clemente R., Walker D.J., Berna M.P., 2005. Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcollar (Spain): the effect of soil amendments. Environmental Pollution, 138, 46–58.

Fagnano 2014. http://www.ecoremed.it/galleria/2014-Action-E1/Fagnano%2011apr14%20LIFE%20Ecoremed%20per%20l'agro%20Aversano.pdf

Fiorentino N., Ventorino V., Rocco C., Cenvinzo V., Agrelli D., Gioia L., Di Mola I., Adamo P., Pepe O., Fagnano M., 2017. Giant reed growth and effects on soil biological fertility in assisted phytoremediation of an industrial polluted soil. Science of the Total Environment, 575, 1375-1383.

Fiorentino N., Fagnano M., Ventorino V., Pepe O., Zoina A., Impagliazzo A., Spigno P., 2013. Assisted phytoextraction of heavy metals: compost and Trichoderma effects on giant reed uptake and soil quality. Italian Journal of Agronomy, 8, 244–254.

Gao Y., Dang X., Yu Y., Li Y., Liu Y., Wang J., 2016. Effects of tillage methods on soil carbon and wind erosion. Land degradation & development. 27, 583–591.

mentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. Reviews on Environmental Health, 3, 71-90.

Bacchetta G., Cappai G., Carucci A., Tamburini E., 2015. Use of native plants for the remediation of abandoned mine sites in Mediterranean semiarid environments. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 94, 326–333.

Barbosa B., Boléo S., Sidella S., Costa J., Duarte M.P., Mendes B., Cosentino S.L., Fernando A.L., 2015. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils using the perennial energy crops Miscanthus spp. and Arundo donax L. Bioenergy Research, 8, 1500–1511.

Christie P., Li X., Chen B., 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. Plant and Soil, 261 (1), 209–217.

Clemente R., Walker D.J., Berna M.P., 2005. Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcollar (Spain): the effect of soil amendments. Environmental Pollution, 138, 46–58.

Decreto Legislativo 29 aprile 2010 n.75 " Riordino e revisione della disciplina in materia di fertilizzanti,

a norma dell'articolo 13 della legge 7 luglio 2009, n.88"

Fagnano 2014. http://www.ecoremed.it/galleria/2014-Action-E1/Fagnano%2011apr14%20LIFE%20Ecoremed%20per%20l'agro%20Aversano.pdf

Fiorentino N., Ventorino V., Rocco C., Cenvinzo V., Agrelli D., Gioia L., Di Mola I., Adamo P., Pepe O., Fagnano M., 2017. Giant reed growth and effects on soil biological fertility in assisted phytoremediation of an industrial polluted soil. Science of the Total Environment, 575, 1375-1383.

Fiorentino N., Fagnano M., Ventorino V., Pepe O., Zoina A., Impagliazzo A., Spigno P., 2013. Assisted phytoextraction of heavy metals: compost and Trichoderma effects on giant reed uptake and soil quality. Italian Journal of Agronomy, 8, 244–254.

Gao Y., Dang X., Yu Y., Li Y., Liu Y., Wang J., 2016. Effects of tillage methods on soil carbon and wind erosion. Land degradation & development. 27, 583–591.

Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., 1991. Antifungal antibiotics produced by Trichoderma spp. Soil Biology & Biochemestry, 23, 1011-1020.

Greipsson S., 2011. Phytoremediation. Nature Educational Knowledge, 2, 7.

Halim M., Conte P., Piccolo A., 2003. Potential availability of heavy metals to Phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. Chemosphere, 52,265–275.

Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., 2004. Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2, 43-56.

Huang M., Zhu Y., Li Z., Huang B., Luo N., Liu C., Zeng G., 2016 Compost as a Soil Amendment to Remediate Heavy Metal-Contaminated Agricultural Soil: Mechanisms, Efficacy, Problems, and Strategies. Water Air and Soil Pollution, 227 (10), 1-18.

Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., 1991. Antifungal antibiotics produced by Trichoderma spp. Soil Biology & Biochemestry, 23, 1011-1020.

Greipsson S., 2011. Phytoremediation. Nature Educational Knowledge, 2, 7.

Halim M., Conte P., Piccolo A., 2003. Potential availability of heavy metals to Phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. Chemosphere, 52,265–275.

Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., 2004. Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2, 43-56.

Huang M., Zhu Y., Li Z., Huang B., Luo N., Liu C., Zeng G., 2016 Compost as a Soil Amendment to Remediate Heavy Metal-Contaminated Agricultural Soil: Mechanisms, Efficacy, Problems, and Strategies. Water Air and Soil Pollution, 227 (10), 1-18.

Kaldorf M., Kuhn A.J., Schröder W.R., Hildebrandt U., Bothe H., 1999. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. Journal of Plant Physiology. 154 (5–6), 718–728.

Kort J., Collins M., Ditsch D., 1998. A review of soil erosion potential associated with biomass crops. Biomass and Bioenergy, 14, 351–359

Law Decree No. 75 of 29/04/2010 "Amendment of the Regulations governing Fertilizers, as under Art. 13 of Law No. 88 of 07/07/2009"

Luo J., Qi S., Peng L., Wang J., 2016. Phytoremediation efficiency OF CD by Eucalyptus globulus transplanted from polluted and unpolluted sites International Journal of Phytoremediation, 18, (4), 308–314

Mahar A., Wang P., Ali A., Awasthi M.K., Lahori A.H., Wang Q., Li R.H., Zhang Z.Q., 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 126, 111–121.

Marchiol L., Sacco P., Assolari S., Zerbi G., 2004. Reclamation of polluted soil: phytoremediation potential of crop-related Brassica species. Water, Air and Soil Pollution, 158, 345–356

Mekonnen M., Keesstra S.D., Stroosnijder L., Baartman J.E.M., Maroulis J., 2015. Soil conservation through sediment trapping: a review. Land Degradation & Development, 26, 544–556.

Mendez M.J., Funk R., Buschiazzo D.E., 2016. Efficiency of Big Spring Number Eight (BSNE) and Modified Wilson and Cook (MWAC) samplers to collect PM10, PM2.5 and PM1. Aeolian Research 21, 37–44.

Soriano A.M., Fereres E., 2003. Use of crops for in situ phytoremediation of polluted soils following a toxic flood from a mine spill. Plant and Soil, 256, 253–264

Venegas A., Rigol A., Vidal M., 2015. Viability of organic wastes and biochars as amendments for the remediation

Kaldorf M., Kuhn A.J., Schröder W.R., Hildebrandt U., Bothe H., 1999. Selective element deposits in maize colonized by a heavymetal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. Journal of Plant Physiology. 154 (5–6), 718–728.

Kort J., Collins M., Ditsch D., 1998. A review of soil erosion potential associated with biomass crops. Biomass and Bioenergy, 14, 351–359

Luo J., Qi S., Peng L., Wang J., 2016. Phytoremediation efficiency OF CD by Eucalyptus globulus transplanted from polluted and unpolluted sites International Journal of Phytoremediation, 18, (4), 308–314

Mahar A., Wang P., Ali A., Awasthi M.K., Lahori A.H., Wang Q., Li R.H., Zhang Z.Q., 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 126, 111–121.

Marchiol L., Sacco P., Assolari S., Zerbi G., 2004. Reclamation of polluted soil: phytoremediation potential of crop-related Brassica species. Water, Air and Soil Pollution, 158, 345–356

Mekonnen M., Keesstra S.D., Stroosnijder L., Baartman J.E.M., Maroulis J., 2015. Soil conservation through sediment trapping: a review. Land Degradation & Development, 26, 544–556.

Mendez M.J., Funk R., Buschiazzo D.E., 2016. Efficiency of Big Spring Number Eight (BSNE) and Modified Wilson and Cook (MWAC) samplers to collect PM10, PM2.5 and PM1. Aeolian Research 21, 37–44.

Soriano A.M., Fereres E., 2003. Use of crops for in situ phytoremediation of polluted soils following a toxic flood from a mine spill. Plant and Soil, 256, 253–264

Venegas A., Rigol A., Vidal M., 2015. Viability of organic wastes and biochars as amendments for the remediation of heavy metal-contaminated soils. Chemosphere, 119, 190–198.

Vangronsveld J., Herzig R.,Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E.,Vander Lelie D., Mench M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. Environmental Science & Pollution Research, 16,765–794.

Woo S.L., Lorito M., 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro M., Gressel J. (Eds.), Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, 107-130.

of heavy metal-contaminated soils. Chemosphere, 119, 190–198.

Vangronsveld J., Herzig R.,Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E.,Vander Lelie D., Mench M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. Environmental Science & Pollution Research, 16,765–794.

Woo S.L., Lorito M., 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro M., Gressel J. (Eds.), Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, 107-130.

10. Prospettive e limiti dell'applicazione della bioremediation per la degradazione degli inquinanti organici

O. Pepe, V. Faraco, V. Ventorino, A. Di Donato, V. Cafaro

10.1. Il biorisanamento microbico

Il biorisanamento microbico di suoli contaminati da sostanze xenobiotiche di natura organica rappresenta un valido metodo di bonifica alternativo alle tecnologie convenzionali (incenerimento e trattamenti chimici). Tale tecnologia si basa sulla capacità della popolazione microbica autoctona presente naturalmente nei suoli contaminati di poter mineralizzare completamente i composti xenobiotici ad anidride carbonica e acqua e biotrasformarli in forme meno pericolose e/o sotto livelli di concentrazione inferiori a quelli stabiliti dalla normativa vigente (Rocco e Pin, 2000; Atlas e Bartha, 1997). Inoltre, i prodotti secondari ottenuti durante il processo di mineralizzazione delle sostanze xenobiotiche possono talvolta rappresentare una fonte di carbonio ed energia per altri microrganismi presenti in un dato ecosistema (Atlas e Bartha, 1997). Infatti, i microrganismi, principalmente batteri e funghi, adattandosi all'ambiente, hanno acquisito nel tempo la capacità di mineralizzare i composti chimici comunemente reperibili nel loro habitat sviluppando particolari vie metaboliche ed evolvendo i propri complessi enzimatici che gli permettono di utilizzare i contaminanti organici come fonte di carbonio, necessario per la loro crescita, ottenendo energia dalla rottura dei legami chimici (tra questi, i più resistenti sono i legami cloro-carbonio e azoto-carbonio). Infatti, la presenza di contaminanti tossici xenobiotici determina l'instaurarsi di condizioni di disequilibrio biologico nel suolo, nella rizosfera e tra le popolazioni microbiche. Tale disequilibrio, col passare del tempo, si tramuta in una condizione di nuovo equilibrio poiché sopravvivono solo quei gruppi microbici resistenti ai composti tossici e che possono utilizzarli come fonte di nutrienti.

Tuttavia in condizioni naturali il tempo necessario per la bonifica di un suolo inquinato può richiedere anni o essere talmente lungo da non poter essere valutabile. Per ridurre il tempo necessario per la biotrasformazione degli inquinanti organici da parte dei microrganismi in un dato ambiente esistono diversi approcci che possono essere utilizzati in modo complementare:

- stimolare la microflora presente attraverso la biostimolazione: aggiungere nutrienti per favorire la crescita dei batteri autoctoni;
- isolare e selezionare microrganismi autoctoni con un elevato potere degradativo e reintrodurli nel suolo attraverso la bioaugmentation: aggiungere batteri competenti, autoctoni o alloctoni, per aumentare le capacità cataboliche rilevanti per il processo di biorisanamento.

In base alle caratteristiche proprie del sottosuolo e della falda, alla tipologia, alla distribuzione e alle concentrazioni di potenziali contaminanti nel suolo, può essere applicato un determinato metodo di risanamento. Infatti, il biorisanamento è una tecnologia sito-specifica e come tale richiede studi dettagliati di caratterizzazione del sito e di fattibilità, prima di decidere il metodo di biorisanamento adeguato. Per un'ottima bonifica è fondamentale

10. Perspectives and limits of the bioremediation application for the degradation of organic pollutants

O. Pepe, V. Faraco, V. Ventorino, A. Di Donato, V. Cafaro

10.1. Microbial bioremediation

Microbial bioremediation of soils contaminated by xenobiotic substances of an organic nature is a valid alternative remediation method to harmful conventional technologies (incineration and chemical treatments). This technique is based on the ability of indigenous microbial populations, naturally present in contaminated soils, to remove the contaminants by mineralising them and/or forming metabolites that are less toxic than the original pollutants (Rocco and Pin, 2000; Atlas and Bartha, 1997). In addition, the secondary products obtained during the mineralization process of the xenobiotic substances could be a carbon and energy source for other microorganisms present in the contaminated ecosystem (Atlas and Bartha, 1997). In fact, microorganisms, mainly bacteria and fungi, adapted to the environment, have acquired the ability to mineralise the chemical compounds commonly found in their habitat by developing particular metabolic pathways and evolving their enzymatic complexes in order to use organic contaminants as a carbon source, necessary for their growth, obtaining energy from the breakdown of chemical bonds (amongst which, the most resistant are the chlorine-carbon and nitrogen-carbon bonds). Indeed, the presence of xenobiotic toxic compounds causes a biological disequilibrium in the soil, in the rhizosphere and among microbial populations. However, over time, a condition of new equilibrium is established because only the microorganisms resistant to toxic compounds and which are able to use them as a source of nutrients actually survive.

However, in natural conditions, the time required to remediate a polluted soil could take years or to be so long that it cannot be evaluated. Different approaches can be used in a complementary manner to reduce the time required for biotransformation of organic pollutants by microorganisms in the environment:

- *biostimulation*: addition of nutrients to stimulate the growth of autochthonous bacteria;
- *bioaugmentation*: isolation, selection and inoculation of autochthonous or allochthonous bacteria able to efficiently transform the target contaminant into less harmful end products in order to improve catabolic activity for restoring contaminated soil.

The suitable remediation method that could be applied depends on the physico-chemical characteristics of soil as well as on the nature, distribution and mixture of contaminants detected in the environment. Bioremediation is a site-specific technology and detailed characterization of the site is necessary to choose the best approach for its implementation. It is also necessary to consider the pollutant concentration, the population density of the contaminant-degrading microorganisms and the biodegradation potential, for an optimum bioremediation of polluted sites (Bento et al., 2005). In fact, the result of the bioremediation process depends on microorganisms (concentration, diversity, enzymatic activities), substrate (chemical characteristics, molecular

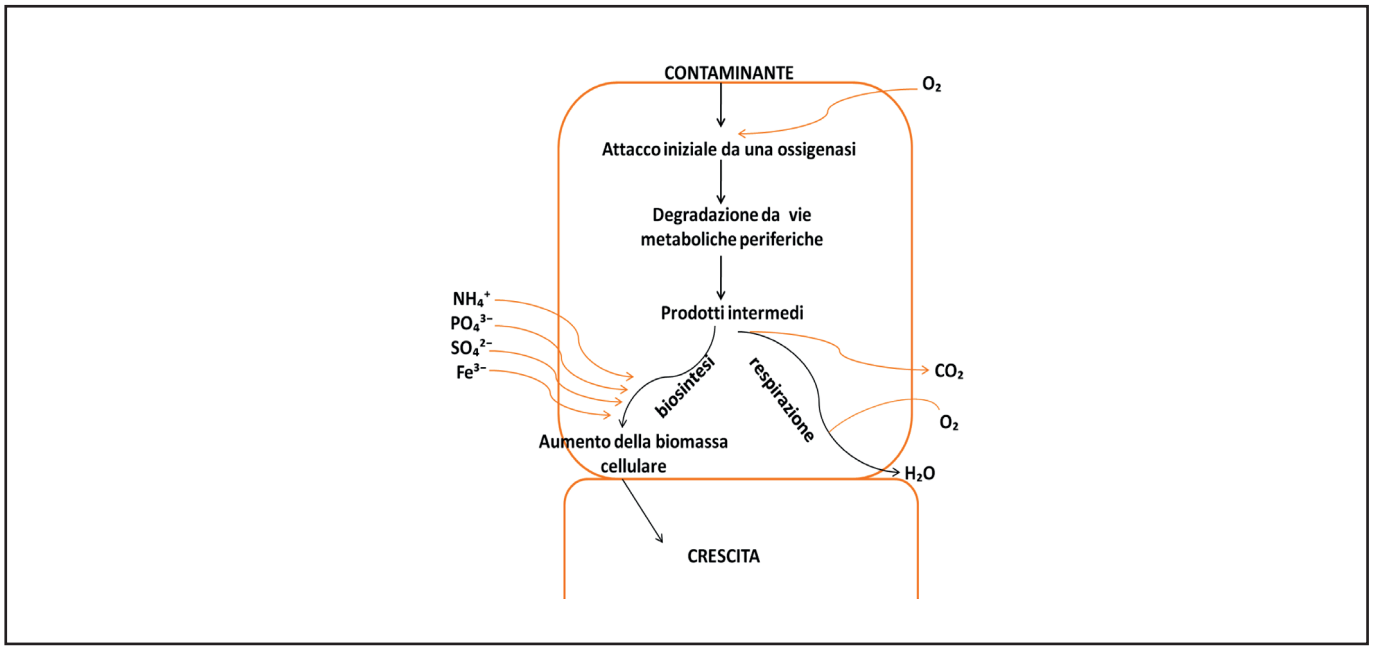


Figura 1. Principio di un processo di degradazione aerobica di contaminanti organici (Fritshe e Hofrichter, 2005).

Figure1. Main characteristics of aerobic degradation of organic pollutants (Fritshe and Hofrichter, 2005).

considerare la concentrazione dell'inquinante, la densità di popolazione dei microrganismi degradatori e la potenzialità della bonifica (Bento et al., 2005). Infatti, il risultato di ogni processo di degradazione dipende dai microrganismi (concentrazione di biomassa, diversità di popolazione, attività enzimatiche), dal substrato (caratteristiche fisico-chimiche, struttura molecolare e concentrazione) e da una gamma di fattori ambientali (pH, temperatura, umidità, disponibilità di accettori di elettroni, di fonti di carbonio e di energia). Infatti, il contaminante fornisce gli elementi essenziali (carbonio, *in primis*) per la crescita e la riproduzione della cellula batterica, mentre l'energia è ottenuta mediante la rottura dei legami chimici e il trasferimento di elettroni (mediato generalmente dal NADH, che funge da molecola trasportatrice) lontano dal contaminante. Si ottiene una tipica reazione di ossido-riduzione in cui il contaminante perde gli elettroni e si ossida, mentre il nutriente (che funge da accettore di elettroni) si riduce. L'energia ottenuta è spesa, quindi, per utilizzare il carbonio e altri elementi (nutrienti) per la crescita della popolazione batterica. Avviene in questo modo un processo, che possiamo definire catabolico, ossia di produzione energetica, energia che sarà, poi, utilizzata nella costruzione di componenti cellulari durante la crescita (processo anabolico).
Nel caso della respirazione aerobica, l'accettore di elettroni è l'ossigeno e il processo ossidativo è catalizzato da ossigenasi e perossidasi. I principali prodotti secondari della degradazione associati all'accrescimento sono anidride carbonica e acqua, oltre all'aumento della biomassa cellulare (Figura 1).

Diverse sostanze xenobiotiche di origine organica possono essere degradate dai microrganismi del suolo sia attraverso processi aerobici sia anaerobici. In Tabella 1 sono riportati alcuni esempi di contaminanti potenzialmente suscettibili alla biodegradazione ad opera di microrganismi.

structure, concentration) and environmental factors (pH, temperature, moisture, electron acceptor, carbon and energy sources). The contaminant provides the essential elements (in particular carbon) for the growth of the bacterial cell, whereas the energy is obtained by breaking down chemical bonds and transporting electrons (generally mediated by NADH that acts as a carrier molecule) far away from the contaminant. Oxygenases and peroxidases are the key enzymes of aerobic biodegradation. The main secondary products obtained by aerobic degradation of organic pollutants and associated with microbial growth are CO_2 and H_2O (Figure 1).

Several xenobiotic organic substances could be degraded by soil microorganisms through both aerobic and anaerobic processes. In Table 1 some examples of pollutants potentially suitable for microbial biodegradation are reported.

Attualmente la ricerca in questo settore è in espansione in tutto il mondo e, in particolare, negli Stati Uniti, dove molte aziende già commercializzano preparati di colture *starter* per il biorisanamento di una vasta gamma di inquinanti (Tabella 2).

Currently, the research in this sector is growing, especially in the United States, where many companies are already marketing starter cultures effective for bioremediation of a wide range of pollutants (Table 2).

Tabella 1. Esempi di contaminanti potenzialmente suscettibili alla biodegradazione ad opera di microrganismi.

Table 1. Some pollutants potentially suitable for microbial biodegradation.

Classe di contaminanti / Class of contaminants	Esempio specifico / Specific examples	Aerobico / Aerobic	Anaerobico / Anaerobic	Fonti potenziali / Potential source
Solventi clorurati / Chlorinated solvents	Tricloroetilene / Trichloroethylene		+	Lavanderie a secco / Dry cleaners
	Tetracloroetilene / Perchloroethylene			Industrie chimiche / Chemical manufacture
Policlorobifenili / Polychlorinated biphenyls	4-clorobifenile / 4-chlorobiphenyl		+	Industrie elettriche / Electrical manufacturing
	4,4-diclorobifenile / 4,4-dichlorobiphenyl			Centrali elettriche / Power stations
				Ferrovie / Railway yards
Clorofenoli / Chlorinated phenol	Pentaclorofenolo / Pentachlorophenol		+	Impianti del trattamento del legno / Timber treatment
				Discariche / Landfills
BTEX	Benzene	+	+	Raffinerie / Oil production and storage
	Toluene			Aeroporti / Airports
	Etilbenzene / Ethylbenzene			Industrie di vernici / Paint manufacture
	Xilene / Xylene			Ferrovie / Railway yards
				Industrie chimiche / Chemical manufacture
				Porti / Port facilities
Idrocarburi policiclici aromatici (IPA) / Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs	Naftalene / Naphthalene	+		Discariche / Landfills
	Antracene / Atrazine			Raffinerie / Oil production and storage
	Fluorene			Centrali elettriche / Power stations
	Pirene / Pyrene			Fabbriche di carbone / Coke plants
	Benzo(a)pirene / Benzo(a) pyrene			
Pesticidi / Pesticides	Atrazina / Atrazine	+	+	Agricoltura / Agriculture
	Carbaryl / Carbaryl			Indistria di pesticidi / Pesticide manufacture
	Carbofurano / Carbofuran			Discariche / Landfills
	Glifosate / Glyphosphate			
	Diazinone / Diazinon			
	Parathion / Parathion			

Tabella 2. Esempio di miscele microbiche confezionate e vendute per il biorisanamento di siti inquinati (Alabaster Corporation, http://www.alabastercorp.com/Microbial.htm).

Table 2. Examples of microbial blends produced for the bioremediation of polluted sites (Alabaster Corporation, http://www.alabastercorp.com/Microbial.htm).

Miscela microbica a secco (*nome commerciale*) Microbial blend	**Descrizione / Description**
Blend A	Utilizzabile per il biorisanamento di sottoprodotti del petrolio (benzina, gasolio, oli motore, oli idraulici, oli greggi, greggi leggeri e pesanti) e di altri idrocarburi complessi e prodotti chimici organici Effective for bioremediation of sites contaminated by oil spills of natural petroleum products (gasoline, diesel, motor oils, hydraulic oils, crude oils) and other complex hydrocarbons and organic chemicals.
Blend B	Utilizzabile per l'inquinamento da fenoli, idrocarburi clorurati, BTEX. Effective for bioremediation of sites contaminated by refinery petrochemical waste (H2S, phenol, chlorinated hydrocarbons, BTX, solvents, amines, etc.).
Blend C	Utilizzabile per il biorisanamento di siti inquinati da sversamenti di oli Effective for bioremediation of sites contaminated by oil spills.
Blend D	Utilizzabile per il biorisanamento di siti inquinati da PCP, idrocarburi policiclici aromatici, creosoto, idrocarburi pesanti Effective for bioremediation of sites contaminated by oil spills of wastes (PCP, polynuclear aromatics, creosote, heavy hydrocarbons, etc.).
Blend F	Utilizzabile per il biorisanamento di siti inquinati da sversamenti di rifiuti quali ad esempio oli e grassi, pulizia di serbatoi, fanghi attivi etc. Effective for bioremediation of sites contaminated by oil spills of waste (extreme oil and grease, tank cleaning, lift stations, activated sludge, etc.).
Blend S	Utilizzabile per il biorisanamento di siti inquinati da sversamenti industriali di oli Effective for bioremediation of sites contaminated by oil spills.
Blend Z	Prodotto per il biorisanamento microbico utilizzato come additivo per migliorare l'attività microbica nelle applicazioni a temperatura fredda. La normale gamma di temperature efficaci per questa miscela microbica è tra i 35 ° F a 85 ° F. Utilized as a microbial additive for enhancing microbic bioremediation activity in cold temperature applications. Normal effective temperature range for these bioremediation microbes is between 35 ° F to 85 ° F.

10.2. Vantaggi e svantaggi del biorisanamento rispetto ai metodi tradizionali di bonifica

Il biorisanamento presenta alcuni vantaggi rispetto alle strategie chimiche o fisiche. Le tecniche convenzionali hanno comportato per anni l'escavazione del suolo inquinato e il suo trasferimento in discarica, oppure la copertura e l'isolamento dell'area inquinata. Entrambi questi metodi presentano evidenti svantaggi: il primo sposta semplicemente il problema, con rischi elevati durante le fasi di scavo, movimento e trasporto di materiali pericolosi e inquinanti. Inoltre, è molto difficile e sempre più costoso trovare nuovi siti per realizzare discariche per il confinamento di tali materiali. Il metodo di contenimento, invece, rappresenta soltanto una soluzione temporanea poiché le sostanze tossiche restano nel suolo, che quindi non può avere alcuna utilizzazione agricola. Inoltre i costi di monitoraggio e manutenzione delle barriere isolanti aumentano.

Le nuove tecniche convenzionali, divise in fisiche, chimiche o termiche, comportano la completa distruzione del contaminante o la formazione di prodotti meno pericolosi, mediante, rispettivamente, separazione fisica, trattamenti chimici o distruzione termica (incenerimento). Nonostante tali tecniche portino alla risoluzione del problema fondamentale di eliminazione dell'inquinante, esse comportano collateralmente sconvolgimenti nella matrice naturale, non essendo esse, come il biorisanamento, basate su processi naturali.

L'utilizzo di tecniche di biorisanamento, invece, determina un riciclo degli elementi presenti nei contaminanti, permettendo di mantenere gli equilibri biologici necessari al mantenimento della fertilità all'interno dei suoli trattati. Pertanto tale tecnologia ha un minore impatto ambientale e, allo stesso tempo, non genera rifiuti. Altro vantaggio dell'applicazione di tale metodo, è la minima pericolosità rispetto alle altre tecniche di bonifica e i suoi bassi costi, poiché i contaminanti possono essere trattati in situ. Inoltre, i residui di questo trattamento sono solitamente prodotti innocui, che includono anidride carbonica, acqua e residui cellulari.

L'opinione pubblica, inoltre, sembra essere sempre più favorevole a questa strategia, grazie anche all'informazione e ai molti enti che promuovono il suo utilizzo in tutto il mondo.

Ci sono, comunque, degli svantaggi legati ai criteri necessari perché si verifichi il biorisanamento: ad esempio, il contaminante deve essere, innanzitutto, biodegradabile, ossia suscettibile ad essere mineralizzato; deve essere, inoltre, biodisponibile, oppure le condizioni del suolo nel sito da risanare devono essere tali, da promuovere la crescita dei microrganismi. La situazione peggiore si verifica quando un sito è contaminato con una miscela di composti organici e inorganici. Si può verificare, infatti, che un composto sia biodegradabile per alcuni microrganismi, ma che un altro sia per loro tossico, che un composto possa richiedere condizioni anaerobiche, mentre un altro l'aerobiosi. Infine, alcune condizioni di pH, necessarie per la degradazione di un composto, possono variare sensibilmente. Inoltre, se il processo metabolico non è ben conosciuto, c'è la preoccupazione che alcuni prodotti della biodegradazione siano più tossici di quelli iniziali.

10.2. Advantages and disadvantages of bioremediation vs. traditional remediation methods

Bioremediation has some advantages compared to chemical or physical strategies. Conventional techniques have led to the excavation of polluted soil and its transfer to the landfill, or the coverage and segregation of contaminated areas. Both of the latter methods have obvious disadvantages: the first only shifts the problem, with high risks involved in the excavation, movement and transport phases of hazardous and polluted materials. In addition, it is very difficult and expensive to find new sites to build landfills for the containment of such materials. By contrast, the containment method represents only a temporary solution because the toxic substances remain in the soil, which therefore cannot have any further use. Moreover, the cost of monitoring and maintenance of containment barriers is increasing.

New conventional physical, chemical or thermal techniques lead to the complete destruction of the contaminant or the formation of less dangerous products, by physical separation, chemical treatment or thermal destruction (incineration), respectively. Although such techniques lead to pollutant elimination, they cause disturbance of the environmental matrix because they are not based on natural processes.

By contrast, the use of bioremediation techniques leads to a recycling of the elements present in the contaminants, retaining the biological equilibrium required for the maintenance of fertility in the treated soils. Therefore this technology has a low environmental impact and, at the same time, no waste is generated. Another advantage of the application of this method is the minimum risk compared to other remediation techniques and its low cost, since the contaminants can be treated in situ. In addition, the treatment residues are usually harmless products, which include carbon dioxide, water and cellular debris. Public opinion also seems to be increasingly in favour of this strategy, thanks to information and to the many organizations that promote its use worldwide.

However, there are drawbacks related to the criteria needed for bioremediation to occur. For example, the contaminant must be, first of all, biodegradable (susceptible to be mineralised); it must also be bioavailable, or soil conditions must be such as to promote the growth of microorganisms. The worst situation occurs when a site is contaminated with a mixture of organic and inorganic compounds. Indeed, in this case, one compound may be biodegradable by microorganisms, but another could be toxic for them, or a compound could require anaerobic conditions while another aerobic conditions. Finally, pH conditions, which are required for the degradation of a compound, could significantly vary. Moreover, if the metabolic process is not well known, there is concern that some products of biodegradation are more toxic than the initial ones.

10.3. Ruolo dei microrganismi nel biorisanamento

Nel corso degli anni, un numero sempre maggiore di autori (Atlas e Bartha, 1997; Juck et al., 2000; Bundy et al., 2002) hanno studiato l'effetto della contaminazione da idrocarburi sulla comunità microbica, la quale ha dimostrato di svolgere un ruolo chiave nel metabolismo delle sostanze organiche sia nel suolo sia nelle acque sotterranee. La concentrazione dei microrganismi capaci di degradare le sostanze inquinanti nel terreno sembra diminuire con la profondità a causa della forte pressione selettiva e delle condizioni estremamente sfavorevoli del suolo (Maila et al., 2005). Al contrario, nei terreni superficiali c'è una maggiore varietà di nutrienti che consentono il rapido sviluppo di una carica microbica in grado di biotrasformare più velocemente e meglio le sostanze inquinanti. Ciascun microrganismo, tuttavia, è generalmente in grado di biodegradare soltanto un range ristretto di idrocarburici, per questo risulta fondamentale la costituzione di idonei consorzi microbici in grado di condurre ed estendere il tasso di degradazione con un ampio spettro enzimatico. Un importante fattore che condiziona la biodegradazione di inquinanti organici è rappresentato dal potenziale di ossido-riduzione che si stabilisce nella matrice contaminata. Nella maggior parte dei casi, soprattutto in presenza di idrocarburi, il metabolismo microbico ossidativo (quello cioè che impiega l'ossigeno come accettore finale di elettroni) si è rivelato il più efficace per la degradazione. In carenza di ossigeno, è fondamentale l'azione svolta dai microrganismi anaerobi che si sono dimostrati in grado di trasformare le sostanze inquinanti in modo tale da renderle più suscettibili al successivo attacco per via ossidativa. Talvolta le reazioni metaboliche a carico delle sostanze organiche di partenza possono portare alla formazione di composti intermedi che altre specie microbiche possono riconoscere come substrato di crescita.

Tra gli enzimi maggiormente implicati nei processi biodegradativi aerobici dei composti xenobiotici troviamo le monoossigenasi e le diossigenasi. Le monoossigenasi sono prodotte sia da funghi sia da batteri, mentre le diossigenasi sono prodotte esclusivamente da batteri. Diversi studi hanno evidenziato che molti microrganismi riescono a biodegradare gli idrocarburi anche grazie alla produzione di biosurfattanti (lipopeptidi, glicolipidi, polisaccaridi, proteine, lipopolisaccaridi, lipoproteine o miscele complesse di questi biopolimeri) di diversa natura chimica e peso molecolare (Rosenberg e Sar, 1983). E' stato dimostrato che la produzione di emulsionanti ad alto e basso peso molecolare è indotta da segnali molecolari e avviene in concomitanza con l'aumento di densità cellulare e all'inizio della fase stazionaria di crescita (Van Delden et al., 1998). A tal proposito, in un recente studio è stato testato l'uso di microrganismi per accelerare i processi di detossificazione naturali di sostanze tossiche nel terreno. Il ceppo *Methylobacterium populi* VP2, isolato dal terreno dell'ex- sito industriale ACNA (Aziende Chimiche Nazionali Associate) di Cengio (Savona, Italia) era capace di crescere su un terreno selettivo minimo con una miscela complessa di diverse classi di composti xenobiotici come unica fonte di carbonio; inoltre promuoveva la crescita delle piante essendo in grado di produrre acido indol-3-acetico (IAA), siderofori e fosfatasi. Interessante era anche la sua capacità di formare biofilm in

10.3. Role of microorganisms in bioremediation

Several studies have been performed to evaluate the effect of hydrocarbon contamination on the microbial community in the soil (Atlas and Bartha, 1997; Juck et al., 2000; Bundy et al., 2002). The concentration of microorganisms able to degrade organic pollutants in the soil appears to decrease with depth due to the strong selective pressure and extremely unfavourable soil conditions (Maila et al., 2005). By contrast, on the soil surface there is a greater variety of nutrients that allow the rapid development of microorganisms able to transform pollutants. However, since each microorganism is generally able to degrade only a narrow range of hydrocarbons, it is essential to establish suitable microbial consortia able to conduct and extend the rate of degradation with a broad spectrum enzyme. An important factor that affects the biodegradation of organic pollutants is the oxido-reduction potential established in the contaminated matrix. In most cases, especially in the presence of hydrocarbons, the oxidative microbial metabolism (that uses oxygen as a final electron acceptor) proves to be the most effective for degradation. In the absence of oxygen, the action carried out by anaerobic microorganisms is crucial: they have proved able to transform pollutants, making them more susceptible to subsequent attack by the oxidative pathway. In addition, sometimes microorganisms can produce intermediate compounds that other microbial species could use as growth substrate.

Monooxygenase and dioxygenase are important enzymes involved in the aerobic bioremediation process. Monooxygenases are produced by both fungi and bacteria, while dioxygenases are produced exclusively by bacteria. Several studies have shown that many microorganisms are able to biodegrade hydrocarbons also thanks to the production of biosurfactants (lipopeptides, glycolipids, polysaccharides, proteins, lipopolysaccharides, lipoproteins or complex mixtures of these biopolymers) of different chemical composition and molecular weight (Rosenberg and Sar, 1983). The production of high and low molecular weight emulsifiers is known to be induced by molecular signals and occurs concurrently with the increase in cell density and at the beginning of the stationary growth phase (Van Delden et al., 1998). In a recent study, the use of microorganisms was evaluated for accelerating the detoxification process of toxic compounds in the soil. The strain *Methylobacterium populi* VP2, isolated from the soil of the ex-industrial site ACNA (Aziende Chimiche Nazionali Associate) in Cengio (Savona, Italy), was able to produce indole-3-acetic acid (IAA) and siderophores, solubilise phosphate, and produce a biofilm in the presence of phenanthrene and alleviate phenanthrene stress in tomato seeds. For these characteristics, this strain was a good candidate for plant growth promotion and was capable of biodegrading xenobiotic organic compounds to remediate contaminated soil alone and/or soil associated with plants (Ventorino et al., 2014).

presenza di fenantrene, mostrando pertanto la sua capacità di aumentare la solubilità dei composti idrofobi in acqua. Essendo un promotore della crescita delle piante e capace di biodegradare i composti organici xenobiotici, era un possibile candidato per piani di bonifica dei suoli contaminati associando bio- e fito- risanamento (Ventorino et al., 2014).

10.4. Tecniche di isolamento microbico da suoli contaminati da composti organici xenobiotici

10.4.1 Campionamento

Il campionamento di suolo contaminato al quale si vuole apportare una strategia di risanamento microbico è il primo step per sviluppare un processo di biorisanamento attraverso l'isolamento, la selezione e l'uso di microrganismi autoctoni potenziali biodegradatori di sostanze xenobiotiche di origine organica. I campioni di suolo possono essere prelevati a una profondità di 0-20 cm e conservati in buste sterili a 4 °C fino ad un massimo di 48 h prima di essere utilizzati per le successive analisi microbiologiche.

10.4.2 Preparazione del campione

Diluire 10 g di suolo in 90 ml di soluzione di Ringer sterile (Oxoid) e 0,162 g di pirofosfato di sodio. I campioni devono essere agitati vigorosamente per 30 minuti per permettere il distacco dei microrganismi dalle particelle di suolo e, successivamente, devono essere lasciati a riposo per 15 minuti. In seguito, si allestiscono diluizioni decimali seriali (Figura 2). Da ciascuna diluizione è prelevato e inoculato, per spatolamento superficiale, 0,1 mL su un substrato nutritivo solido selettivo messo a punto per l'isolamento mirato di microrganismi potenziali biodegradatori di idrocarburi. Nell'ambito del progetto Ecoremed, tale substrato era costituito dal terreno colturale minimo (M9) contenente, come unica fonte di carbonio, il contaminante o i contaminanti organici ritrovati nei suoli dei siti oggetto dello studio (Tabella 3). Le piastre inoculate sono poi incubate per 24-48 h a 28 °C.

10.4. Microbial isolation from soils contaminated by xenobiotic organic compounds

10.4.1 Sampling

Soil sampling is the first step to develop a bioremediation process through the isolation, selection and use of autochthonous microorganisms potentially able to degrade organic xenobiotic substances. The soil samples were able to be collected at a depth of 0-20 cm and stored in polyethylene bags at 4 °C for no more than 24–48 h before soil microbiological analyses were conducted.

10.4.2 Sample analysis

Soil samples (10 g) were shaken for 30 min in 90 ml of sterile Ringer solution (Oxoid) containing 0.162 g of tetrasodium pyrophosphate to detach the bacteria from soil particles. After soil particles were allowed to settle for 15 min, the solution was diluted tenfold in a series (Figure 2). To isolate microorganisms potentially able to degrade hydrocarbons, 0.1 mL of each dilution was used to inoculate, by using the surface spread plate method, solid medium composed by minimal medium (M9) containing hydrocarbons as the sole carbon source (Table 3). Plates were incubated at 28 °C for 24-48 h.

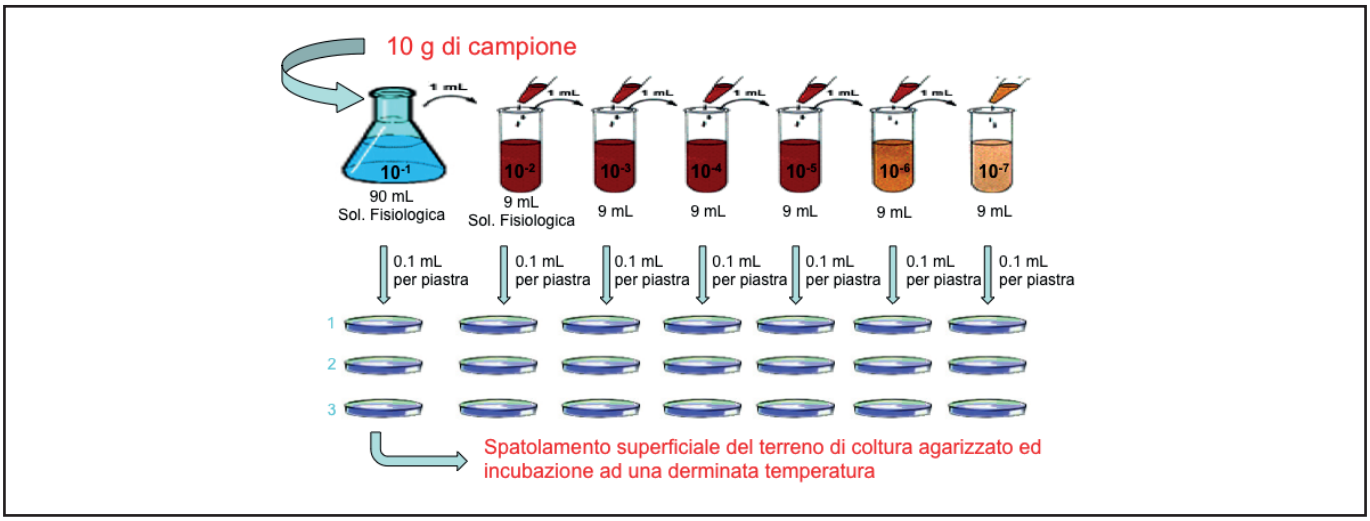


Figura 2. Schema di una tecnica colturale di numerazione microbica: messa a punto di diluizioni decimali seriali e inoculo del campione per spatolamento superficiale in substrato colturale agarizzato.

Figure 2. Schematic depiction of surface spread plate method on solid medium.

Tabella 3. Composizione del substrato colturale minimo (M9) utilizzato per l'isolamento di microrganismi autoctoni potenziali biodegradatori di sostanze xenobiotiche di origine organica.

Table 3. Composition of the minimal medium (M9) used for the isolation of autochthonous microorganisms potentially effective for the bioremediation of soils contaminated by xenobiotic organic compounds.

M9 Modificato / M9 Modified	**Quantità per 1 L**
M9 Salts[1]	200 mL
$MgSO_4$ 1M	2 mL
$CaCl_2$ 1M	0,1 mL
Fonte di carbonio (contaminante organico)	100-500 ppm
Bacteriological agar	15 g
Acqua	A 1000 mL

[1]M9 Salts (64 g/L Na_2HPO_4-$7H_2O$; 15 g/L KH_2PO_4; 2,5 g/L NaCl; 5 g/L NH_4Cl)

[1]M9 Salts (64 g/L Na2HPO4-7H2O; 15 g/L KH2PO4; 2.5 g/L NaCl; 5 g/L NH4Cl)

10.4.3 Isolamento delle colonie pure

Dopo la fase di incubazione, le colonie che presentano differente morfologia sono prelevate con un'ansa sterile e strisciate più volte per effettuare la fase di purificazione sullo stesso substrato di isolamento selettivo (M9 modificato contenente i contaminanti) fino ad ottenere colonie pure. Per la conservazione dei ceppi isolati, si preleva una colonia pura che viene inoculata in tubi a becco di clarino contenente lo stesso substrato di isolamento selettivo. I tubi sono incubati per 24-48 h a 28 °C e successivamente conservati a 4 °C.

10.4.4 Analisi fenotipiche

Le colonie pure sono sottoposte a una caratterizzazione fenotipica. Dopo aver annotato la morfologia delle colonie, si procede con la determinazione della morfologia microscopica mediante l'osservazione di preparati a fresco utilizzando un microscopio ottico.
Di seguito è riportato il protocollo di allestimento dei preparati a fresco:

- pulire e sgrassare un vetrino portaoggetti;
- porre una goccia di acqua deionizzata sul vetrino;
- stemperare il materiale microbico nell'acqua;
- coprire con il preparato con un vetrino coprioggetto;
- esaminare il preparato al microscopio ottico.

Inoltre, le colonie pure sono saggiate per distinguere i Gram positivi dai Gram negativi, attraverso la reazione di Gram descritta da Halebian et al. (1981), stemperando una colonia in una goccia di una soluzione di KOH al 3 %. I batteri Gram-negativi formano un ammasso filante viscoso che non si osservava se il ceppo batterico è un microrganismo Gram-positivo.
Infine, il saggio della catalasi permette di verificare la presenza di tale enzima in seguito alla produzione di effervescenza in presenza di perossido di idrogeno al 3 % (Hanker e Rabin, 1975).

10.4.3 Isolation of pure cultures

After incubation, single colonies were picked and checked for purity by repetitive streaking on the same isolation medium (modified M9 containing hydrocarbons as the sole carbon source). Cultures were incubated at 28 °C for 24-48 h and stored at 4 °C.

10.4.4 Phenotypic analysis

Phenotypic and biochemical characterization of pure colonies were performed. Morphological analysis of the colony of each bacterial strain was carried out observing shape (regular/irregular/rhizoid/ punctiform/ filamentous), edge (entire/undulate), surface (dry/ viscid/powdery), elevation (flat/raised) and colour of colony. Moreover, the micromorphology of the cells was observed using an optic microscope (Eclipse E200; Nikon). In addition, a Gram reaction was performed using the KOH test as described by Halebian et al. (1981). Finally, catalase activity was detected by evaluating the effervescence production after dissolving the colony in 3% hydrogen peroxide (Hanker and Rabin, 1975).

10.4.5 Analisi molecolari

Gli isolati microbici selezionati in base alla loro capacità di crescita in substrato nutritivo selettivo e alle loro caratteristiche fenotipiche, sono poi identificati tramite tecniche molecolari mediante il sequenziamento parziale dei geni che codificano l'RNA ribosomiale. L'identificazione molecolare dei ceppi batterici selezionati prevede l'identificazione tramite amplificazione (Polymerase Chain Reaction) e sequenziamento del gene codificante la subunità 16S del ribosoma. L'amplificazione delle regioni 16S rDNA permette di analizzare il polimorfismo del DNA che codifica per l'RNA ribosomiale in modo da ottenere una tipizzazione molecolare dei microrganismi. Tale metodo risulta molto affidabile, grazie al fatto che, a livello dell'operone ribosomiale, tra i geni che codificano per la subunità 16S, esiste una regione spaziatrice estremamente variabile sia in sequenza che in lunghezza, anche all'interno di gruppi tassonomici strettamente correlati. L'amplificazione mediante PCR può essere, perciò, sfruttata validamente per un'identificazione e una differenziazione microbica rapida e attendibile.

Estrazione del DNA dalle cellule microbiche

L'estrazione del DNA dai ceppi può essere condotta utilizzando diversi kit disponibili in commercio specifici per l'isolamento del DNA microbico.

Amplificazione PCR del 16S rDNA

La PCR è una metodologia che sfrutta l'attività enzimatica di una DNA polimerasi termostabile, come la *Taq*-DNa polimerasi, per amplificare uno specifico frammento di DNA delimitato alle sue estremità da due "primer" oligonucleotidici sequenza-specifici che si legano con le eliche complementari in orientamento opposto. In presenza di desossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs), i primer fungono da innesco per la DNA polimerasi, la quale sintetizza la regione di DNA tra essi compresa. Il risultato di tale reazione è l'amplificazione selettiva di una regione genomica delimitata da due sequenze specifiche.

Per l'identificazione dei ceppi batterici selezionati sono generalmente utilizzati i primer fD1 (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3') e rD1 (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CC -3') che presentano sequenze complementari a due regioni altamente conservate del 16S rRNA degli eubatteri. In Tabella 4 è riportata la composizione della miscela di reazione, del volume totale di 50 µl.

Tabella 4. Composizione della miscela di reazione per l'amplificazione del gene16S rRNA.

Componenti / Reagent	**Soluzione Stock** / Stock solution	**Concentrazione in reazione** / Concentration in reaction	**Quantità in reazione** / Volume in reaction
DNA batterico / DNA template	-	50 ng	5 µl
H_2O bidistillata / Sterile dH2O	-	-	36,3 µl
Buffer	10X	1X	5 µl
$MgCl_2$	50 mM	2,5 mM	2,5 µl
Miscela di dNTP / dNTPs	25 mM	250 µM	0,5 µl
Taq Polimerasi / *Taq* polymerase	5 U/µl	2,5 U/50µl	0,5 µl
Primer 1 / Primer fD1	0,1 mM	0,2 µM	0,1 µl
Primer 2 / Primer rD1	0,1 mM	0,2 µM	0,1 µl

10.4.5 Molecular analysis

Morphologically different bacterial isolates selected on the basis of their ability to grow on selective nutrient medium were finally identified by molecular method. Molecular identification involved the amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing of the 16S rRNA gene. Amplification of 16S rDNA regions allows analysis of the DNA polymorphism encoding for ribosomal RNA in order to obtain molecular biotyping of microorganisms. This method is very reliable due to the fact that, at the level of the ribosomal operon, between the genes encoding for the 16S subunit, there is a spacer region which is extremely variable both in sequence and in length, even within closely related taxonomic groups. Therefore, PCR and sequencing of the 16S rRNA gene is a valid approach for bacterial identification and differentiation.

DNA extraction

DNA extraction from microbial strains can be carried out using different commercially available kits specific to isolating microbial DNA.

PCR amplification of 16S rDNA

PCR is a methodology that exploits the enzymatic activity of a thermostable DNA polymerase, such as *Taq*-DNA polymerase, to amplify a specific DNA fragment delimited at its ends by two oligonucleotide sequence-specific "primers". In the presence of deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), DNA polymerase synthesizes the DNA region comprised between primers. The result of this reaction is the selective amplification of a specific genomic region delimited by two sequences.

The synthetic oligonucleotide primers fD1 (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3') and rD1 (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CC -3') were used to amplify the 16S rRNA gene. In Table 4 we report the composition of the reaction mixture, in a total volume of 50 µl.

PCR conditions consisted of an initial denaturing step at 95 °C for 3 minutes, followed by 30 cycles (1 minute at 94 °C, 45 seconds at 54 °C, 2 minutes at 72 °C), and an additional final chain elongation step at 72 °C for 7 minutes. Amplified products were resolved on a 1.5% (w/v) agarose TBE-gel electrophoresis. The composition of the TRIS-borate-EDTA 10X buffer (TBE) consisted of 0.89 M Tris, 0.89 M boric acid and 0.02 M EDTA.

Table4. Amplification of 16S rRNA gene: reaction mixture composition.

L'amplificazione deve poi essere condotta in un termociclatore a rapido controllo della temperatura Il programma di amplificazione prevede uno step di denaturazione iniziale di 95 °C per 3 minuti, seguito da 30 cicli di amplificazione (94 °C per 1 minuto, 54 °C per 45 secondi, 72 °C per 2 minuti) e uno step di estensione finale di 7 minuti a 72 °C. I prodotti di amplificazione (ampliconi) possono poi essere analizzati mediante corsa elettroforetica convenzionale in cui i frammenti di DNA sono separati in un campo elettrico in base al loro peso molecolare. In dettaglio gli ampliconi sono caricati su gel di agarosio all'1,5 % contenente una sostanza capace di intercalarsi con le molecole di DNA visibile ai raggi UV. La corsa viene effettuata ad un voltaggio di 100 V per circa 30 minuti in TBE 1X (Trizma base, Acido borico, EDTA 0.5M, pH 8). Successivamente le bande possono essere visualizzate con un transilluminatore a raggi UV.

Identificazione molecolare
Grazie all'utilizzo di un marker specifico caricato sul gel di agarosio, è possibile identificare e selezionare le bande aventi un peso molecolare di circa 1500 bp. Tali bande vengono poi tagliate dal gel, pesate ed infine purificate utilizzando diversi kit disponibili in commercio specifici per la purificazione degli acidi nucleici da gel di agarosio. Successivamente, il DNA purificato, viene quantificato e sequenziato. La sequenza nucleotidica ottenuta è infine comparata con quelle presenti nella GenBank Data Libraries del National Center of Biotecnology Information, tramite il software BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
L'identificazione dei ceppi microbici isolati permette inoltre di selezionare i batteri wild-type che non siano patogeni né per l'uomo né per l'ambiente in generale.

10.4.6 Selezione di batteri potenziali biodegradatori di idrocarburi

La selezione dei batteri isolati è lo step fondamentale per identificare i microrganismi con le più alte performance degradative nei confronti di composti organici xenobiotici, quali ad esempio idrocarburi policiclici aromatici (IPA) o idrocarburi alifatici (C>12).
La selezione dei batteri isolati avviene attraverso la valutazione della crescita in substrati colturali minimi contenenti uno o più contaminanti organici come unica fonte di carbonio e la loro capacità degradativa. In dettaglio, i ceppi batterici identificati sono inoculati a una concentrazione di cellule di circa $1x10^6$/mL (conteggio diretto con camera di conta Thoma 0,02 Depth) in diversi terreni di coltura minimi (M9) liquidi contenenti diverse concentrazioni di IPA e/o idrocarburi alifatici. Le colture batteriche sono poi incubate alla temperatura ottimale di crescita. Durante il periodo di incubazione, a diversi tempi, sono prelevate delle aliquote per determinare la concentrazione di cellule vitali tramite il conteggio indiretto (allestimento di diluizioni decimali seriali, inoculo su substrati di coltura, incubazione e conteggio). Contemporaneamente, le aliquote sono analizzate tramite diverse tecnologie, quali ad esempio cromatografia con rilevatore a ionizzazione di fiamma, per determinare la concentrazione degli inquinanti organici nel mezzo colturale e valutare la loro eventuale diminuzione.

Electrophoresis was performed at 100 V for 1 hour and the gel was visualized by UV-transillumination after SYBR Safe (Invitrogen) staining.

Molecular identification
Amplicons of approximately 1500 bp were excised from the gel, purified by using specific commercially available kit and sequenced. The DNA sequences were then compared to the GenBank nucleotide data library using the BLAST program at the National Center of Biotechnology Information web site (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) to determine their closest phylogenetic relatives. Identification of isolated microbial strains also allows the selection of wild-type bacteria which are not pathogenic either to humans or to the environment.

10.4.6 Selection of hydrocarbon-degrading bacteria

The selection of bacterial isolates is the crucial step to identify the microorganisms with the highest degradative performance against xenobiotic organic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) or aliphatic hydrocarbons (C> 12). Such selection is carried out through the evaluation of microbial growth and their degradative ability in minimal medium containing one or more organic contaminants as the sole carbon source. In detail, the identified bacterial strains were inoculated at a concentration of approximately $1x10^6$ cells / mL (Thoma counting chamber, 0.02 depth) in minimum liquid medium (M9) containing different concentrations of PAHs and/or aliphatic hydrocarbons. Bacterial cultures are then incubated at the optimum temperature for growth. During incubation, culture aliquots are sampled to determine the concentration of viable cells by the surface spread plate method. Simultaneously, the aliquots are analysed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) to determine the concentration of organic pollutants in the culture medium.

10.4.7 Valutazione delle proprietà emulsionanti e produzione di biofilm

La limitata biodisponibilità di un composto chimico è una delle cause della recalcitranza di particolari contaminanti a essere biorisanati, specialmente se questi sono suscettibili a entrare nel metabolismo microbico. I batteri dispongono naturalmente di fattori che possono aumentare la biodisponibilità di possibili fonti di carbonio. Uno di questi fattori è la sintesi di biosurfattanti. I biosurfattanti sono polimeri naturali che sono prodotti dai batteri mediante un processo di fermentazione. Essi si formano in presenza di fonti di carbonio, come idrocarburi e altre sostanze (es. glucosio). Microrganismi diversi producono biosurfattanti diversi, tra cui glicolipidi, lipopeptidi, lipopolisaccaridi, fosfolipidi, acidi grassi/lipidi neutri e proteine. Questi, grazie alle loro proprietà anfipatiche, aumentano la superficie di interfaccia tra fase organica/acquosa, facilitando la formazione di emulsioni e in generale di molecole facilmente solubili in fase organica. Pertanto, una caratteristica importante per la selezione di ceppi microbici da utilizzare nel biorisamaneto di suoli contaminati da organici è rappresentata dalla capacità di tali ceppi di produrre bioemulsioni.

La capacità dei ceppi batterici di sintetizzare bioemulsionanti può essere valutata in colture liquide in assenza e in presenza di fase organica, quale potenziale induttore della produzione e secrezione di emulsionanti. In particolare può essere utilizzata paraffina a bassa viscosità (low viscosity paraffin, LVP) come fase organica cui si aggiunge un contaminante organico, quale ad esempio il fenantrene come composto modello di IPA. Le colture batteriche sono poi incubate alla temperatura ottimale di crescita in agitazione (220 rpm). La fase acquosa di ciascuna coltura è raccolta e centrifugata per 20 minuti a 4 °C per separare le cellule e il surnatante. Le cellule devono essere lavate due volte in tampone fosfato 10 mM, pH 7,0, e risospese in M9 fino a ottenere una densità ottica di circa 0,01 $O.D._{600nm}$. La sospensione cellulare viene poi misu-

10.4.7 Evaluation of emulsification properties and biofilm production

The effectiveness of microbial strains to biodegrade the contaminants present in the environment depends on several factors, including bioavailability of organic pollutants. The bacteria could naturally exhibit characteristics to increase the bioavailability of the pollutants present in the soil, such as synthesis of biosurfactants. Biosurfactants are surfactants of biological origin naturally produced by bacteria, formed in the presence of carbon sources such as hydrocarbons and other substances (e.g. glucose). Microorganisms produce several different biosurfactants such as glycolipids, lipopeptides, lipopolysaccharides, phospholipids, fatty acids / neutral lipids and proteins. These compounds, due to their amphipathic properties, increase the surface area between the organic / aqueous phase, facilitating the formation of emulsions, and of molecules readily soluble in the organic phase. Therefore, an important feature for the selection of microbial strains to be used in bioremediation of contaminated soils is represented by the ability of these strains to produce biosurfactants.

Such ability could be evaluated using liquid media with and without an organic phase. In particular, low-viscosity paraffin (LVP) could be used as an organic hydrophobic phase, and organic contaminants, such as phenanthrene (PHE) dissolved in LVP used as the model PAH compound. Bacterial cultures are then incubated at their optimum temperature under orbital shaking (220 rpm). The water phase of each culture is collected and centrifuged at 5,000×g for 20 minutes at 4 °C to separate the cells and the supernatant. The cells are washed twice in 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, and suspended in fresh M9 medium at a final optical density at 600 nm of approximately 1 $O.D._{600\ nm}$. The cell suspension absorbance at 600 nm is measured. 0.1 mL of LVP is added to 1 mL of the cell suspension, and the sample is vortexed vigorously for 2 minutes. The phases are

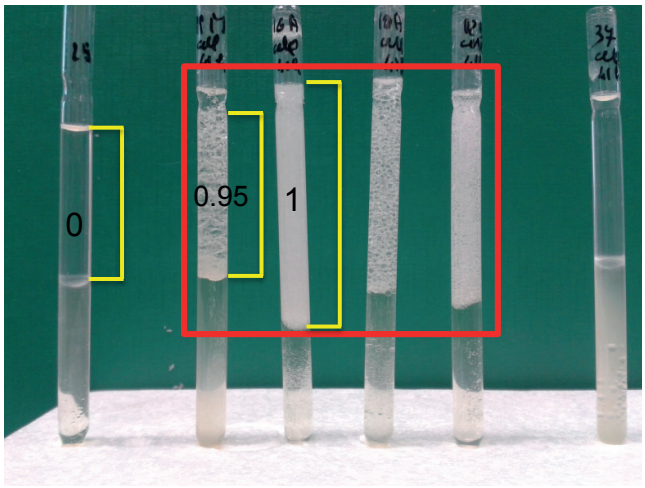


Figura 3. Visualizzazione di emulsioni prodotte dai ceppi microbici (tubi nel quadrato rosso).

Figure 3. Emulsions produced by bacterial strains (tubes in the red box).

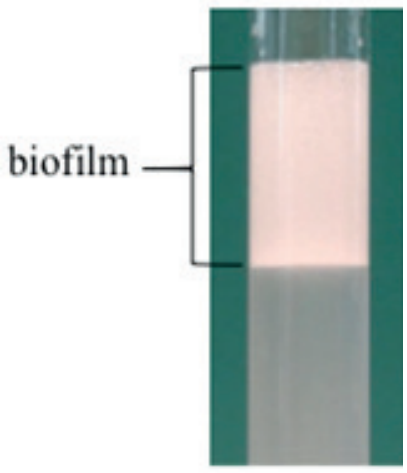


Figura 4. Biofilm prodotto da Methylobacterium populi VP2 su LVP/PHE (Ventorino et al., 2014).

Figure 4. Biofilm formed by Methylobacterium populi VP2 on LVP/PHE (Ventorino et al., 2014).

rata ad un'assorbanza di 600 nm. Ad 1 mL di sospensione cellulare viene aggiunto 0,1 mL di PLV e il campione deve essere agitato vigorosamente per 2 min. Per favorire la separazione delle fasi si lascia riposare per 15 minuti a temperatura ambiente. In seguito si è misurata la densità ottica delle cellule residue in sospensione nella fase acquosa a 600 nm. Per testare le proprietà emulsionanti, i surnatanti vengono poi ulteriormente centrifugati per 30 minuti a 4 °C. 1 mL di surnatante e 1 mL di PLV sono agitati energicamente per 2 minuti e lasciati riposare per 24 ore a temperatura ambiente. La capacità di produrre emulsioni è espressa come Indice di emulsione (EI; 1= emulsione totale; 0= nessuna emulsione) (Figura 3).
Inoltre, si può analizzare la produzione di biofilm in risposta alla presenza di una fonte di carbonio apolare utilizzando come fase organica l'LVP a cui viene aggiunto il fenantrene come composto modello di IPA. In figura 4 è mostrata la capacità di un ceppo batterico, *Methylobacterium populi* VP2, di crescere formando biofilm su fase organica correlata alla presenza di IPA.

10.4.8 Valutazione delle attività di promozione di crescita delle piante

La co-contaminazione dei suoli con metalli pesanti ed idrocarburi rappresenta uno dei colli di bottiglia metabolici del biorisanamento. Infatti, se la contaminazione del suolo è dovuta alla sola presenza di idrocarburi, l'attività metabolica dei microrganismi capaci di mineralizzare i contaminanti organici può essere sufficiente per il recupero del suolo (bioremediation). Nel caso in cui, invece, la contaminazione è mista (idrocarburi e metalli pesanti) il solo biorisanamento ad opera dei microrganismi del suolo non è sufficiente poiché i metalli sono sostanze elementari non degradabili. In questo caso la bonifica per via biologica dei suoli contaminati dai metalli può avvenire con il fitorisanamento. Purtroppo, anche questa tecnologia può avere un'efficacia limitata a causa della scarsa biodisponibilità dei metalli nel suolo, del limitato sviluppo radicale delle piante e del livello di tolleranza delle piante a ciascun particolare metallo. Infatti, affinché una pianta sia effettivamente in grado di bonificare un suolo inquinato essa deve essere tollerante alla presenza di uno o più metalli, crescere rapidamente e produrre una sufficiente biomassa epigea. Una strategia che consente il superamento dei limiti sia del biorisanamento sia del fitorisanamento è la selezione di batteri che oltre ad avere capacità biodegradative nei confronti di contaminanti organici, sono anche in grado di promuovere la crescita vegetale (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) (Glick, 2010).
I PGPB, infatti, riescono a promuovere la crescita delle piante attraverso diversi meccanismi sia diretti che indiretti. Tra le azioni dirette rientrano quelle dei batteri interessati alla biofertilizzazione, capaci di aumentare la disponibilità dei nutrienti nel suolo, come ad esempio azoto o fosforo, e stimolare la crescita vegetale attraverso la sintesi di fitormoni, come ad esempio auxine o gibberelline. Inoltre, i PGPB possono anche agire in maniera indiretta attraverso meccanismi di biocontrollo quali ad esempio produzione di sostanze caratterizzate da attività antagonista nei confronti di fitopatogeni, competizione per l'utilizzo di determinate sostanze nutritive, competi-

allowed to separate for 15 minutes at room temperature. Then the optical density at 600 nm of the cells remaining in suspension in the water phase is measured. To test the emulsification properties of the free cell medium, the supernatants are further centrifuged at 18,000 ×g for 30 minutes at 4 °C. Typically, 1 mL of the supernatants and 1 mL of LVP are mixed vigorously for 2 minutes and the emulsions are allowed to stand for 24 hours at room temperature. The emulsification index (EI) is calculated by the following equation: (height of emulsified layer/ height of the total oil phase) × 100. An EI value of 0% indicated no emulsification whereas an EI value of 100% indicated 100% emulsification (Figure 3).

Moreover, also the biofilm formation could be evaluated in M9 medium supplemented with LVP (organic hydrophobic phase) and PHE (dissolved in LVP as the model PAH compound). In figure 4 we show the ability of the bacterial strain *Methylobacterium populi* VP2 to form biofilms on the hydrophobic phase.

10.4.8 Evaluation of plant growth-promoting activities

The co-contamination of soils with heavy metals and hydrocarbons remains the main bottleneck for bioremediation. Indeed, if the soil were contaminated only by hydrocarbons, the metabolic activity of microorganisms able to mineralise the organic contaminants could be sufficient for soil recovery (bioremediation). However, if the soil is contaminated by different substances (hydrocarbons and heavy metals), mere bioremediation by soil microorganisms may not be sufficient to remediate the environment since such metals are not usually degradable. In this case, the biological remediation of soils could be performed by phytoremediation. Unfortunately, also this technology could have limited effectiveness due to low bioavailability of metals in the soil, limited root development of the plants and the tolerance of plants to each heavy metal. Indeed, to be effective the plant species used to remediate a polluted soil must be tolerant to the presence of one or more heavy metals, grow rapidly and produce a large quantity of aboveground biomass. A strategy that allows us to overcome the limits of both bioremediation and phytoremediation is the selection and use of bacteria that are also able to promote plant growth (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) (Glick, 2010).
PGPB are able to benefit plant development by using a wide range of mechanisms, including synthesising compounds to promote plant growth (phytohormone synthesis such as auxins and gibberellins) and/or increasing the uptake of nutrients (such as nitrogen and phosphorus) and acting as biocontrol agents by suppressing plant pathogens in the rhizosphere.
Plant growth-promoting activities of bacterial strains could be evaluated by using several qualitative and quantitative methods as previously described by Ventorino et al. (2014). Figure 5 reports several examples to determine the production of indole-3-acetic acid and siderophores as well as the ability to solubilise phosphate.

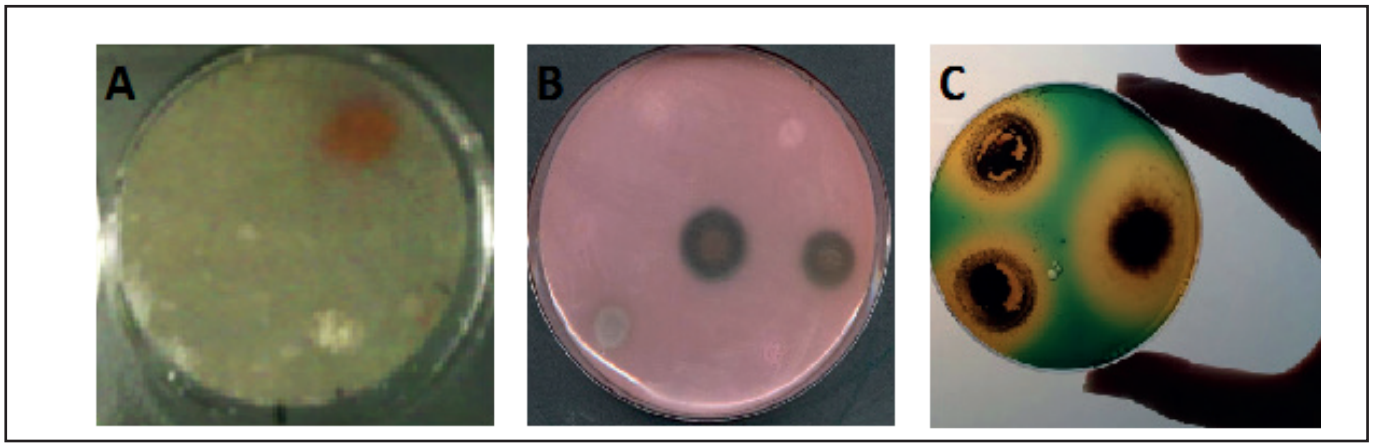


Figura 5. Saggi per la determinazione della produzione di acido indolacetico (A), attività fitasica (B), produzione di siderofori (C).

Figure 5. Plant growth-promoting activities: production of indole-3-acetic acid (A), ability to solubilise phosphate (B), production of siderophores (C).

zione per lo spazio, o anche induzione di resistenza sistemica nelle piante.
La capacità dei ceppi batterici di avere attività di promozione di crescita vegetale può essere valutata attraverso diversi test qualitativi, semiquantitativi e quantitativi, specifici per ogni attività come descritto da Ventorino et al., 2014. In figura 5 sono riportati alcuni esempi per la determinazione della produzione di acido indolacetico, siderofori e attività fitasica.

10.4.9 Selezione di funghi per il biorisanamento mediante bioagumentation

In aggiunta all'applicazione di microrganismi isolati dai suoli contamintati, il biorisanamento può prevedere la bioaugmentation tramite l'aggiunta di microrganismi esogeni all'ambiente del sito contaminato, ottenuti da varietà isolate in laboratorio noti per la capacità di degradare specifici composti. Tra questi, i funghi rappresentano microrganismi dalle forti capacità degradative nei confronti di composti xenobiotici tossici.
Primo step nell'applicazione di funghi al biorisanamento mediante bioaugmentation è la selezione condotta mediante analisi delle capacità degradative allestendo colture in terreni solidi contenenti composti xenobiotici mediante trasferimento di pezzi di agar colonizzato da micelio, al centro della piastra. Tra i composti xenobiotici analizzati ci sono gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) come ad esempio pirene, antracene, fenantrene, benzo[a]antracene, benzo[b] fluorantene, benzo[k]fluorantene e benzo[a]pirene.
Un mezzo solido comunemente utilizzato per la crescita dei funghi è il PDY-agar la cui composizione è riportata in Tabella 5.

Tale terreno senza aggiunta degli IPA viene utilizzato per gli esperimenti di controllo. A esso sono aggiunti i composti IPA, singolarmente, a differenti concentrazioni (2.5 ppm e 25 ppm), per testare le capacità di crescita dei funghi selezionati.
Una volta selezionati i funghi dotati della capacità di crescere in presenza dei composti xenobiotici, si può procedere all'analisi delle attività enzimatiche, ossidasi e perossidasi, frequentemente coinvolte nella degradazione da parte dei funghi, e all'allestimento di crescite dei funghi direttamente su suoli contaminati, con la messa a punto

10.4.9 Selection of fungi for bioremediation by bioaugmentation

As described above, bioremediation could be performed also by bioaugmentation, selecting and inoculating allochthonous microorganisms able to efficiently transform the target contaminant into less harmful end products in order to improve the catabolic activity to restoring contaminated soil. Among these, fungal strains usually exhibit degradation properties against hydrocarbons.
The first step in the application of fungi for bioremediation by bioaugmentation is the selection of fungal strains on the basis of their hydrocarbon degradative ability growing on solid media containing xenobiotic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (pyrene, anthracene, phenanthrene, benzo[a] anthracene, benzo[b] fluoranthene, benzo[k]fluoranthene and benzo[a] pyrene).
A solid medium commonly used for the growth of the fungi is PDY-agar. The composition of PDY-agar medium is reported in Table 5.

This medium, without the addition of PAHs, is used for the control experiments. To test the ability of the fungal strain to grow in the presence of hydrocarbons, different PAHs at different concentrations (2.5 ppm and 25 ppm) are added to the PDY-agar medium. The selected fungal strains are then analysed, evaluating several enzymatic activities, such as oxidase and peroxidase, usually involved in the degradation of hydrocarbons. This test is performed in microcosm conditions, inoculating the fungal strain in contaminated soils. During the experiment, soil samples are collected to evaluate the concentration of PAHs.
In particular, within the Ecoremed project, to evaluate the degradation effectiveness of fungal strains, solid state fermentation (SSF) was carried out including: **A)** inoculation of fungal strains from six-day-old agar culture on PDY agar medium on 200 g of sterilized wheat (sterilization of wheat in an autoclave for 60 min at 110° C) and incubation at 28° C for 14 days in static conditions; **B)** homogenization and shredding of the grain/fungal mycelium and inoculation in contaminated soils using the experimental conditions described in Table 6; **C)** collection of soil samples after 5 and 10 days.

Tabella 5. Composizione del substrato colturale PDY-agar.

Table 5. Composition of PDY-agar medium.

PDA	Quantità per 1 L
Patata destrosio	24 g
Estratto di lievito	5 g
Bacteriological agar	15 g
Acqua	a 1000 mL

Tabella 6. Modalità di inoculo di funghi per SSF

Table 6. Description of the experimental conditions *for the inoculation of fungal strain by SSF*

MODALITA' DI INOCULO / INOCULUM METHOD	
Substrato	Suoli
Rapporto miscela grano-fungo (preinoculo)/substrato	20%
Reattore	Beuta da 100 mL
Quantità di substrato utilizzata	10 grammi
Durata crescita	20 giorni
Temperatura di incubazione	28 °C

delle migliori condizioni di inoculo dei funghi sui suoli in oggetto. Dunque, si procede al prelievo delle colture a vari intervalli di tempo d'incubazione per valutare le capacità di biorisanamento dei funghi.
In particolare, per valutare la capacità degradativa dei funghi, si allestiscono Fermentazioni su Stato Solido (SSF) che prevedono: **A)** preinoculo del fungo da terreno di coltura solido PDY-agar su 100 g di grano (sterilizzato in autoclave a 110°C per 60 min) ed incubazione per 6 giorni a 28°C. **B)** inoculo del fungo, dopo aver reso omogeneo il micelio in frullatore, sui suoli in esame nelle condizioni schematizzate nella Tabella 6. **C)** prelievo di campioni di suolo dopo 5 e 10 giorni di trattamento.

La capacità di funghi di rimuovere idrocarburi e metalli (rame e zinco) può essere valutata mediante analisi *Gas Cromatography Flame Ionization Detector* (GC-FID) e *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS), rispettivamente.
Per verificare che i funghi siano in grado di ridurre il contenuto di idrocarburi anche nelle condizioni più vicine a quelle naturali, viene poi effettuato uno *scale-up* della fermentazione "in vaso", contenente 100 g di suolo.
La capacità di funghi di rimuovere idrocarburi e metalli (rame e zinco) è stata valutata mediante analisi *Gas Cromatography Flame Ionization Detector* (GC-FID) e *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS), rispettivamente.
La produzione dell'inoculo fungino da utilizzare in suoli contaminati da composti xenobiotici di natura organica prevede le seguenti fasi:
1. preinoculo del fungo da terreno di coltura solido PDY-agar (24 g/L patata destrosio, 5g/L estratto di lievito, 15 g/L agar) su 200 g di grano (autoclavato a 110°C per 60 min, pH 6.0) incubato in un totale di 25 beute da 2 L per 14 giorni a 28°C, in statica;
2. omogeneizzazione del micelio e triturazione del grano/micelio fungino in frullatore in modo da rendere l'inoculo distribuibile più facilmente in campo;
3. conservazione dell'inoculo fungino a 4°C fino ad un massimo 24-48 h prima della dispersione in campo.

The ability of the fungal strains to remove hydrocarbons and heavy metals (zinc and copper) could be evaluated by *Gas Chromatography - Flame Ionization Detector* (GC-FID) and *Inductively Coupled Plasma -Mass Spectrometry* (ICP-MS), respectively.
The scaling-up of the experiment described above was performed in microcosm containing 100 g of contaminated soil. The ability of the fungal strains to remove hydrocarbons and heavy metals (zinc and copper) was evaluated by GC-FID and ICP-MS, respectively.
The production of fungal inoculum to apply to the contaminated soils was performed as follows:
1. inoculation of fungal strains from six-day-old agar culture on PDY agar medium (24 g l/L potato dextrose, 5g l/L yeast extract, 15 g l/L agar) on 200 g of sterilized wheat in 2 L flask (sterilization of wheat in an autoclave for 60 min at 110° C) and incubation at 28° C for 14 days in static conditions;
2. homogenization and shredding of the grain/fungal mycelium by using a mixer to obtain the fungal component of biodegrading microbial formulation;
3. storage at 4° C for 24-48.

10.4.10 Preparazione della miscela microbica e inoculo nei suoli contaminati

I ceppi selezionati con le desiderate caratteristiche metaboliche devono essere prodotti in modo massivo. La produzione delle cellule batteriche deve avvenire attraverso l'uso di fermentatori dopo aver determinato le condizioni di crescita ottimali per ciascun ceppo selezionato.
Dopo la fase di crescita le cellule batteriche sono recuperate e risospese in una soluzione acquosa contenente un crioprotettore quale ad esempio una soluzione di saccarosio al 5%. In questo caso, è stato dimostrato che la quantità ottimale di soluzione da aggiungere alle cellule batteriche è di 5:1 (volume:peso). La soluzione con le cellule è poi congelata ed infine liofilizzata. Il processo di liofilizzazione può avere una tempistica variabile dalle 24 alle 48 ore. Le cellule liofilizzate ottenute sono infine contate tramite il conteggio indiretto (allestimento di diluizioni decimali seriali, inoculo su substrati di coltura, incubazione e conteggio) per determinare la concentrazione delle cellule vitali.
Le cellule liofilizzate sono altamente solubili in acqua, pertanto la distribuzione al suolo nei siti contaminati può avvenire risospendendo le cellule liofilizzate direttamente nell'acqua di irrigazione in modo da ottenere in campo una concentrazione di ciascun ceppo batterico pari a circa $2x10^6$ cellule/g di suolo, fino ad una profondità di circa 20-30 cm legata all'assorbimento dell'acqua di irrigazione nel suolo.

Riferimenti bibliografici

Atlas R.M., Bartha R. (1997). Microbial Ecology: fundamentals and applications 4th edition, *Benjamin/ Cummings Publishing Company*, cap. 14.

Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96:1049-55.

Bundy J.G., Paton G.I., Campbell C.D. (2002). Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *Journal of Applied Microbiology*, 92:276-88.

Fritsche W., Hofrichter M. (2005). Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms. In *Environmental Biotechnology: Concepts and Applications* (ed. Jördening H.J., Winter J.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, pp. 203-227.

Glick BR. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28:367–374.

Halebian S., Harris B., Finegold S., Rolfei R. (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 13: 444–448.

Hanker J.S., Rabin A.N. (1975) Color reaction streak test for catalase-positive microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 2: 463–464.

Juck D., Charles T., Whyte L.G., Greer C.W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum

10.4.10 Bacterial inoculum preparation and application in polluted soil

The selected bacterial strains are finally produced in large quantities by using fermentors after determining the optimum growth conditions of each strain. After the growth phase, the bacterial cells are recovered and suspended in an aqueous solution containing a cryoprotectant such as a 5 % sucrose solution. In this case, it was shown that the optimum ratio of sucrose solution to bacterial cells was 5 : 1 (volume : weight). The cells suspended in the sucrose solution are then freeze-dried. The freeze-drying process could last between 24 and 48 hours. The freeze-dried cells obtained are finally counted by using the surface spread plate method to determine the concentration of viable cells. The freeze-dried cells are highly soluble in water: therefore the distribution to the contaminated soil could be carried out by suspending them directly in the irrigation water in order to obtain a concentration in the field of each bacterial strain equal to approximately $2x10^6$ cells / g of soil, up to a depth of about 20-30 cm.

References

Atlas R.M., Bartha R. (1997). Microbial Ecology: fundamentals and applications 4th edition, *Benjamin/ Cummings Publishing Company*.

Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96:1049-55.

Bundy J.G., Paton G.I., Campbell C.D. (2002). Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *Journal of Applied Microbiology*, 92:276-88.

Fritsche W., Hofrichter M. (2005). Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms. In *Environmental Biotechnology: Concepts and Applications* (ed. Jördening H.J., Winter J.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, pp. 203-227.

Glick BR. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28:367–374.

Halebian S., Harris B., Finegold S., Rolfei R. (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 13: 444–448.

Hanker J.S., Rabin A.N. (1975) Color reaction streak test for catalase-positive microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 2: 463–464.

Juck D., Charles T., Whyte L.G., Greer C.W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 33:241-249.

Maila M.P., Randima P., Surridge K., Drønen K., Cloete T.E. (2005). Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55:39-44.

hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 33:241-249.

Maila M.P., Randima P., Surridge K., Drønen K., Cloete T.E. (2005). Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55:39-44.

Rocco F., Pin M. (2000). Nuove tecnologie di bioremediation e di phytoremediation per la decontaminazione dei suoli: esperienze e prospettive, Workshop "*Gestione integrata dell'ambiente urbano: rifiuti, acque e suolo*", Trieste, Area Science Park.

Rosenberg E., Sar N. (1983). Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Current Microbiology*, 9:309-313.

Van Delden C., Pesci E.C., Pearson J.P., Iglewski B.H. (1998). Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. *Infection and Immunity* 66:4499-4502.

Ventorino V., Sannino F., Piccolo A., Cafaro V., Carotenuto R., Pepe O. (2014). *Methylobacterium populi* VP2: Plant growth-promoting bacterium isolated from a highly polluted environment for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation. *The Scientific World Journal*, Article ID 931793.

Rocco F., Pin M. (2000). Nuove tecnologie di bioremediation e di phytoremediation per la decontaminazione dei suoli: esperienze e prospettive, Workshop "*Gestione integrata dell'ambiente urbano: rifiuti, acque e suolo*", Trieste, Area Science Park.

Rosenberg E., Sar N. (1983). Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Current Microbiology*, 9:309-313.

Van Delden C., Pesci E.C., Pearson J.P., Iglewski B.H. (1998). Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. *Infection and Immunity* 66:4499-4502.

Ventorino V., Sannino F., Piccolo A., Cafaro V., Carotenuto R., Pepe O. (2014). *Methylobacterium populi* VP2: Plant growth-promoting bacterium isolated from a highly polluted environment for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation. *The Scientific World Journal*, Article ID 931793.

11. Soil washing degli hot spot contaminate

R. Andreozzi, M. Fabbricino, L. Onotri, R. Marotta, F. Pirozzi, M. Race

Introduzione

L'impiego delle tecniche di biorisanamento potrebbe essere ostacolato da fattori limitanti, come la composizione chimica degli inquinanti nel suolo e più in dettaglio la loro concentrazione o l'elevata biodisponbilità, in quanto questi potrebbero, da un lato, inibire lo sviluppo di microrganismi adatti e/o, dall'altro, richiedere tempi molto lunghi per completare la bonifica. Per queste ragioni potrebbe essere preferibile applicare un trattamento di *soil washing* mite ed eco-sostenibile, accoppiato ad un processo solare di ossidazione fotocatalitica per il trattamento delle acque esauste del lavaggio del suolo.

Entrambi questi processi (lavaggio del suolo e trattamento fotocatalico delle acque reflue) rappresentano delle tecnologie mature, che possono essere proposte per applicazioni su scala industriale.

Il problema dell'inquinamento dei terreni, in particolar modo da metalli pesanti, sta assumendo una connotazione sempre più preoccupante, a causa soprattutto delle attività antropiche sul territorio.

La necessità di far fronte a tale problema ha fatto in modo che negli anni si sviluppassero numerose tecniche di disinquinamento.

Gli interventi di bonifica dei siti contaminati possono essere eseguiti *in-situ* o *ex-situ*. I primi prevedono il trattamento delle matrici solide direttamente in loco, senza escavazione e asportazione del terreno contaminato. I secondi, invece, prevedono la rimozione del materiale contaminato, che può essere trattato in un luogo adibito all'interno dell'area del sito stesso (*on-site*) oppure inviati in impianti di trattamento o in discariche esterne al sito (*off-site*).

Trattare le matrici contaminate *in-situ* presenta evidenti vantaggi in termini di impatto ambientale in quanto consente di disturbare al minimo il sito; inoltre risulta, in genere, più vantaggioso dal punto di vista economico in quanto non bisogna procedere alla movimentazione del materiale inquinato. D'altra parte si possono riscontrare maggiori difficoltà in termini di contatto tra il contaminante e l'agente estraente, soprattutto in terreni eterogenei, in quanto i processi in-situ non godono dello stesso livello di controllo dei processi *ex-situ*. Inoltre infiltrazioni esterne possono modificare la concentrazione iniziale dell'agente decontaminante, con conseguente diminuzione dell'efficacia. A questo si aggiunge un rallentamento del processo, e quindi un aumento dei costi, nel caso di terreni dotati di bassa permeabilità.

Gli interventi *ex-situ*, invece, permettono di gestire in maniera migliore e di ottimizzare le condizioni del processo di trattamento. Il suolo contaminato, infatti, può essere analizzato e caratterizzato in un laboratorio attrezzato. Lo scavo, e l'eventuale trasporto del materiale contaminato nel caso di intervento *off-site*, incidono, però, in maniera rilevante sul costo globale di un trattamento di bonifica.

Inoltre è possibile classificare le tecniche di bonifica, in funzione delle metodologie utilizzate, nel seguente modo:

- Biologiche
- Fisiche
- Chimiche

11. Soil washing of contaminated hot-spots

R. Andreozzi, M. Fabbricino, L. Onotri, R. Marotta, F. Pirozzi, M. Race

Introduction

The applicability of bioremediation techniques is limited by parameters related either to soil composition or to pollutant characteristics. Among others, the concentration and the bioavailability of the pollutant play a prominent role. Whenever the concentration is very high and the pollutant is extremely bioavailable, indeed, the process can be partially or completely inhibited, because of the toxic effect on living species responsible of the remediation. In these situations, it may be preferable the recourse to other techniques able to solve the problem, without affecting the quality of the soil. An interesting alternative is certainly represented by mild soil washing, coupled with the photocatalytic treatment of the spent solution. Both processes (soil washing and photocatalytic treatment) are mature enough to be proposed at full scale without any technological constraints.-

Heavy metal pollution of natural soils caused by anthropogenic activities is nowadays a worldwide concern because of its large diffusion in all industrialized areas in order to cope with this problem numerous remediation strategies have been developed over the years. Some of them can be applied in-site, without excavation and removal of the contaminated soils, and are more advantageous whenever the contamination is extremely spread or very deep. In-situ technologies have the further advantage of causing a reduced impact on the surrounding area, because of the absence of polluted materials handling and transportation. Alternatively the soil can be removed and treated within the area of excavation or outside it, in a centralized plant. Off-site treatments, of course, offer the possibility of controlling all the parameters involved in the applied process, and are therefore, generally, more efficient, although less convenient in terms of cost and environmental impact.

Together with the distinction among in-site and off-site solutions, the remediation techniques can be classified considering the intrinsic nature of the applied processes. This classification includes:

- Biological processes;
- Physical processes;
- Chemical processes.

Biological processes are based on the development of living species, able to degrade or up-take the pollutants. Physical processes include the recourse to heat or electrical current to detach the pollutants from the soil. Finally chemical processes require a chemical agent to facilitate the detachment and the extraction of the pollutant, or its modification in less hazardous specie.

The choice of the remediation system depends on the following parameters: i) pollutant characteristics; ii) extent of the pollution; iii) nature of the contaminated medium; and iv) required performances.

In the case of relevant and extensive contamination more than one solution can be adopted. The most

Nelle prime vengono generalmente impiegati microrganismi come funghi e batteri, per i quali gli inquinanti fungono da substrati da degradare. Fanno parte dei trattamenti fisici le tecniche elettrocinetiche e i trattamenti termici. Infine, nell'ambito dei trattamenti chimici, vengono impiegate soluzioni che hanno lo scopo di aumentare la solubilità dei contaminanti e, dunque, favorirne la mobilitazione e l'estrazione. La scelta del metodo di bonifica varia in funzione del tipo di inquinante, dell'estensione dell'inquinamento e della natura del mezzo contaminato, dalle prestazioni di risanamento da conseguire e, nel caso di contaminazioni rilevanti ed estese vengono generalmente utilizzate più tecnologie. In relazione all'utilizzo delle varie tecniche risulta, tuttavia, importante considerare anche quanto le stesse siano consolidate o, di contro, vengano applicate ancora a livello sperimentale (Bertelle and Beretta, 2009). Nella Tabella 1 sono riepilogate le principali tecniche di bonifica.

11.1 La bonifica mediante soil washing

Il *soil washing* è una tecnologia di risanamento *ex-situ* di terreni contaminati basata su meccanismi fisici e/o chimici, in cui gli agenti inquinanti sono rimossi dal suolo mediante il loro trasferimento ad una fase liquida acquosa (Mann, 1999). L'individuazione di questa tecnologia può essere necessaria se la composizione chimica degli inquinanti del suolo e la loro concentrazione potrebbero essere significativi fattori limitanti per i processi biologici. Poiché, elevato inquinamento può sia essere causa di eccessivi aumenti dei tempi di biorisanamento sia, ancor più, inibire i processi di biodegradazione. Relativamente alla rimozione di metalli pesanti, il lavaggio avviene essenzialmente per effetto della dissoluzione di questi nel liquido di estrazione.
I principali stadi del trattamento sono:

- pretrattamento del suolo contaminato, mediante processo fisico di separazione dei componenti grossolani;
- lavaggio ed estrazione dei contaminanti con il suolo pretrattato che viene miscelato intensamente con acqua e, se necessario, con agenti estraenti al fine di trasferire i contaminanti dalla fase solida a quella liquida;
- separazione delle fasi (soluzione estraente/suolo);
- eventuale ritrattamento della matrice solida con l'agente estraente per incrementare l'efficienza di estrazione.

Il pretrattamento consiste nella separazione meccanica o manuale delle parti più ingombranti presenti, che sono quindi sottoposte a operazioni di riduzione delle dimensioni. Grazie a questa fase si ottiene la frazione più fine, che contiene la maggior parte degli inquinanti. Tale separazione consente di ridurre il volume di materiale inquinato da sottoporre ad ulteriori trattamenti o da smaltire in discarica e consente altresì di recuperare la ghiaia e la sabbia.
Il lavaggio è un trattamento fisico-chimico che viene condotto in ambiente controllato (e.g. pH, velocità di miscelazione, etc.), miscelando la matrice solida con un agente estraente. Il suo ciclo di trattamento può essere schematizzato in quattro fasi (carico, reazione, sedimentazione, scarico), come riportato in Figura 1.

L'estrazione avviene per effetto di meccanismi fisici, fisi-

used ones are summarized in Table 1. The Table also includes the classification, and the typical application of each of listed techniques

11.1 Soil washing

Soil washing is a technology for the remediation of contaminated sites, based on physical and/or chemical processes which remove the pollutants from the solid matrix, transferring them to a liquid aqueous phase (Mann, 1999). The recourse to this technology is often appropriate when the chemical structure and/or the concentration of the pollutants in the soil limit somehow the development of biological processes.
Soil washing is frequently adopted for the remediation of sites contaminated by heavy metals. In this situation the effect of the process is mainly due to the dissolution of the metal in the washing solution.
The most important phases of the treatment can be summarized as follow (Figure 1):

- pre-treatment of the contaminated soil, by a physical process separating the coarse components;
- washing and extraction of the contaminants: the pre-treated soil is vigorously mixed with the water and, if necessary, with an extracting agent, to transfer the pollutants from the solid phase to the liquid one;
- separation of the two phases (washing solution/soil);
- potential reprocessing of the soil with the extraction agent in order to improve the extraction efficiency.

The pre-treatment consists in a manual or mechanical separation of bulk elements followed by a dimensional classification aimed at isolating the finest fractions of the soil, which contain most of the pollutants. In such a way it is possible to reduce the volume of the polluted soil to be further treated, while the gravel and the sand are generally retrieved and collocated in the excavation site.
The washing phase is a physical-chemical treatment that is conducted in a controlled environment (e.g. pH, mixing speed, etc.), mixing the soil with a washing solution, generally containing and extracting agent. The treatment cycle can be outlined in four steps (load, reaction, sedimentation, discharge), as shown in Figure 2.

Mechanisms of extraction are physical, physical-chemical and chemical. Physical ones (shear, impact, friction) have the function of breaking up the agglomerates present in the soil, so to transfer the contaminant in the washing solution. The physical-chemical and the chemical mechanisms (desorption and dissolution) determine, instead, the separation of the contaminants from the soil particles as consequence of the alteration of the local forces of adsorption.
The technique of soil washing is applicable with success to remove, from the solid matrix, semi-volatile and volatile organic compounds, and heavy metals, especially the fraction weakly bound to the soil.
The applicability of the washing process depends on several factors, including:

Tabella 1. Categorie delle tecnologie di bonifica (Fonte: Bertelle e Beretta, 2009)

Table 1. Remediation Technologies (Fonte: Bertelle e Beretta, 2009)

Tecnica / Technique	Localizzazione / Location	Metodologia utilizzata / Method used	Intervento / Process	Matrice ambientale / Matrix
Separazione (l'inquinante è separato dal mezzo inquinato e trattato) / Separation (the pollutant is separated from the medium polluted and treated)	in situ / in site	chimico fisica / Physical-chemical	• soil flushing	suolo / soil
			• soil washing	suolo / soil
			• soil vapor extraction	suolo-acque / soil-water
			• air sparging	suolo / soil
			• vagliatura / screening	suolo / soil
			• pump and treat	suolo - acque sotterranee / soil- groundwater
		termica / thermal	• desorbimento / desorption	suolo / soil
			• thermal enhanced (TEVES) / thermal enhanced (TEVES)	suolo / soil
		biologica / biological	soil washing	suolo / soil
	ex situ / off site	chimico fisica / physical-chemical	• soil washing	suolo / soil
			• estrazione con solventi / solvent extraction	suolo / soil
		termica / thermal	desorbimento / desorption	suolo / soil
Trasformazione (l'inquinante è trasformato in sostanze meno pericolose o innocue) / Transformation (the pollutant is converted into substances that are less hazardous or harmless)	in situ / in site	chimico fisica / physical-chemical	barriere permeabili reattive / permeable reactive barriers	acque sotterranee / groundwater
		biologica / biological	• bioventing,	suolo / soil
			• biosparging,	suolo-acque / soil- water
			• natural attenuation,	suolo / soil
			• barriere biologiche / biological barriers	suolo- acque sotterranee / soil- groundwater
	ex situ / off site	chimico fisica / physical-chemical	• trattamenti chimici / Chemical treatments	suolo / soil
			• inertizzazione / inertization	suolo / soil
		termica / thermal	• incenerimento / Incineration	suolo / soil
			• pirolisi / pyrolysis	
		biologica / biological	• landfarming	suolo / soil
			• biosparging	suolo / soil
			• natural attenuation	suolo / soil
			• barriere biologiche / biological barriers	suolo / soil
Immobilizzazione (l'inquinante viene immobilizzato o in una matrice o tramite trasformazione in sostanze meno mobili) / Immobilization (the pollutant is immobilized in a matrix, or through transformation into substances that are less mobile)	in situ / in site	chimico fisica / physical-chemical	• solidificazione / solidification	suolo / soil
			• contenimento / containment	suolo / soil
		termica / thermal	vetrificazione / vitrification	suolo / soil
	ex situ / off site	chimico fisica / physical-chemical	solidificazione / solidification	suolo / soil
		termica / thermal	vetrificazione / vitrification	suolo / soil

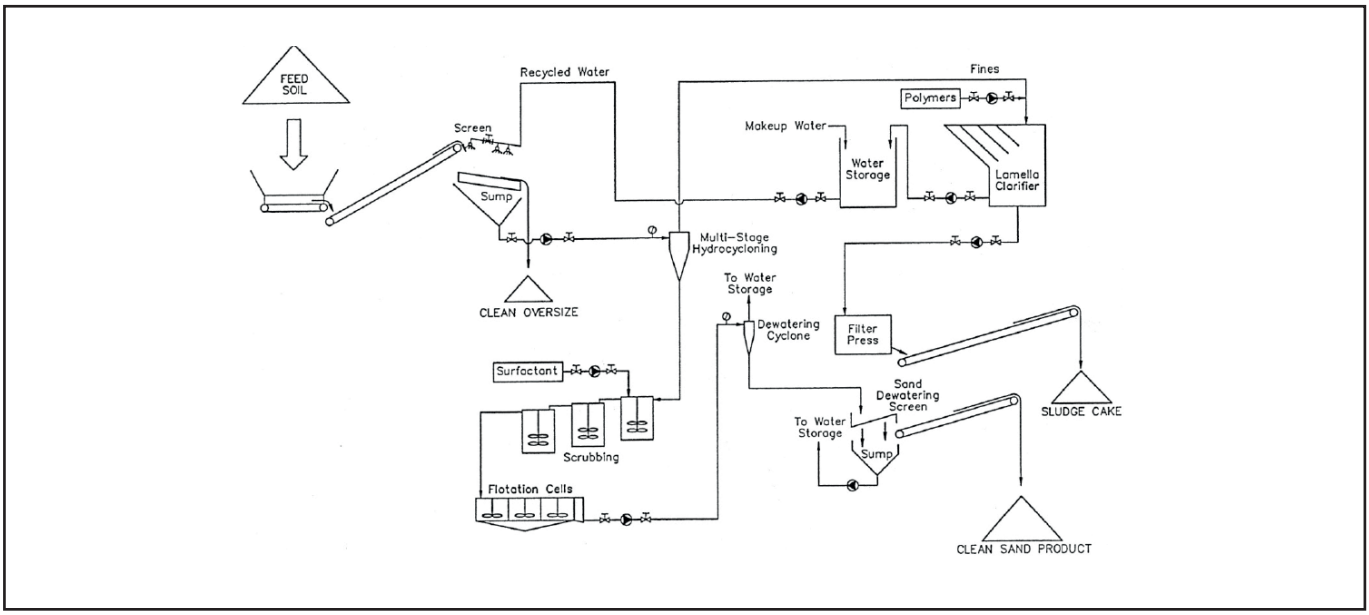


Figura 1. Schema di un impianto di soil washing (Fonte: Mann, 1999).

Figure 1. Outline of a soil washing plant (Fonte: Mann, 1999)

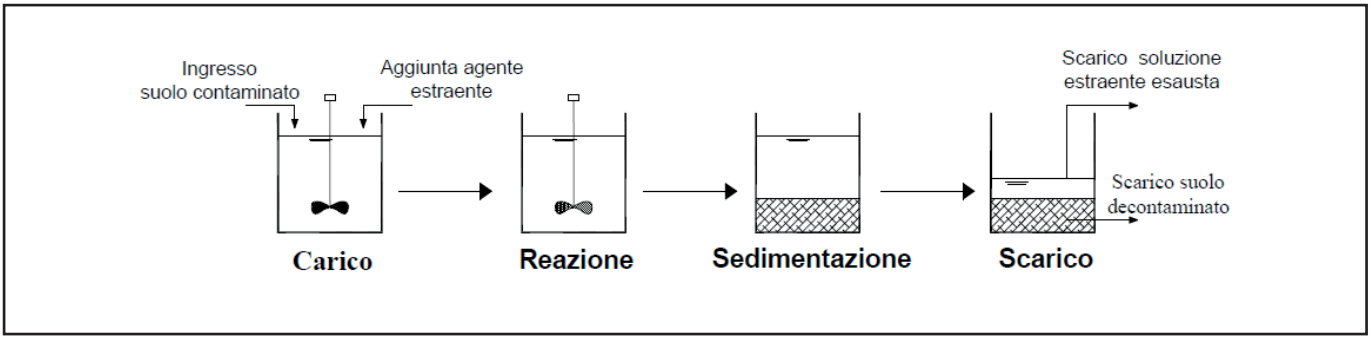


Figura 2. Schema del processo di soil washing

Figure 2. Outline of soil washing process

co-chimici e chimici che possono aver luogo simultaneamente nello stesso stadio del trattamento o distintamente in stadi successivi. I meccanismi di tipo fisico (taglio, impatto, sfregamento) svolgono la funzione di disgregare gli agglomerati eventualmente presenti nel terreno e di liberare in sospensione nel liquido estraente le particelle di contaminante. I meccanismi di tipo fisico-chimico e chimico (desorbimento e dissoluzione) determinano, invece, il distacco dei contaminanti dalle particelle di terreno mediante l'alterazione delle forze locali di adsorbimento (per esempio variando il pH della soluzione acqua-terreno o mediante la risolubilizzazione di precipitati).
La tecnica del *soil washing* è applicabile con successo per la rimozione dalle matrici solide di composti organici semivolatili e volatili, e di metalli pesanti. Relativamente a questi ultimi, esso è il più appropriato per quelli debolmente legati nella forma di idrossidi, ossidi e carbonati.
L'applicabilità del processo di lavaggio dipende da diversi fattori:
- caratteristiche del suolo;
- natura dei contaminanti;
- natura dei legami tra terreno e contaminanti.

I fattori che possono influenzare la buona riuscita del processo sono:
- alta percentuale di argilla e limo;
- presenza di contaminanti idrofobici, che richiedono

- soil characteristics;
- nature of the contaminants;
- nature of the bonds between the soil and the contaminants.

The elements that have the greatest influence on process performances are:
- high percentage of clay and silt;
- presence of hydrophobic contaminants, which require emulsifiers or organic solvents to be properly detached from the soil;
- presence of a complex mixtures of contaminants, which require several sequential steps of washing.

The process of extraction depends on the type of used agent. Water is the most commonly one, but, of course, various chemical reagents may be added to the solution for increasing the efficiency.
A reagent needs to have the following general characteristics:
- high selectivity towards the contaminants to be removed;
- low level of interaction with the soil, because the extracting solution must be separated after the process, to be properly treated;
- low toxicity;
- contained cost.

The quickness and efficiency of the treatment are, in

emulsionanti o solventi organici per la rimozione;
- miscele complesse di contaminanti, che richiedono stati sequenziali di *soil washing*;
- necessità di operare frequenti cambi del rapporto suolo/soluzione di lavaggio.

I processi di estrazione dei contaminanti dipendono strettamente dal tipo di liquido utilizzato: quello più comunemente utilizzato è l'acqua; per aumentare l'efficienza del processo ad essa possono essere addizionati diversi reagenti chimici.
Un reagente deve avere le seguenti caratteristiche generali:
- elevata selettività nei confronti dei contaminanti da rimuovere;
- basso livello di interazione con la matrice solida, poiché la soluzione estraente ne deve essere poi separata, sia in vista di un recupero e riutilizzo, sia per evitare ulteriori problemi ambientali;
- ridotta tossicità;
- essere economico.

La velocità e l'efficienza del trattamento sono, in linea generale, influenzate da molteplici fattori:
- caratteristiche specifiche della matrice solida;
- proprietà fisico-chimiche e concentrazione dei metalli pesanti investigati;
- età della contaminazione;
- parametri di processo, quali agenti estraenti utilizzati (tipo e concentrazione), tempo di contatto con la soluzione di lavaggio, concentrazione di secco trattata, intensità della miscelazione, temperatura e altri ancora, in dipendenza della tipologia di contaminanti.

In generale, oltre ai parametri di processo richiamati, sull'efficienza di lisciviazione dei metalli pesanti intervengono anche:
- pH della sospensione;
- potenziale redox;
- forza ionica del sistema;
- presenza di eventuali agenti complessati.

In particolare, pH e potenziale redox influiscono sulla forma chimica che assumono gli elementi da estrarre, pH e forza ionica sull'intensità delle interazioni tra inquinanti e matrice solida, pH e agenti complessati determinano la concentrazione degli inquinanti nelle fasi solida e liquida all'equilibrio.
Tuttavia l'applicazione di questi trattamenti richiede uno studio preliminare, in scala di laboratorio, per valutare le condizioni operative atte a massimizzare la rimozione di contaminanti dal suolo.

11.1.1 Lavaggio ed estrazione dei contaminanti

I processi di estrazione dei contaminanti dipendono strettamente dal tipo di liquido estrattivo utilizzato: il più comunemente usato è l'acqua che, nel caso specifico di estrazione di **metalli pesanti**, è di solito coadiuvata, come detto, da soluzioni acide o da agenti chelanti in grado di aumentare l'efficienza del processo.
Le soluzioni acide, in genere con HCl, H_2SO_4 ed HNO_3, sono utilizzate per l'estrazione di metalli pesanti per l'intensa solubilizzazione attuata dal fluido estraente su sali ed ossidi metallici. L'effetto principale ottenuto con l'aggiunta di acidi è la creazione di un ambiente con elevato contenuto di ioni H^+. Questi ultimi sono consumati in una moltitudine di reazioni pH–dipendenti che

general, affected by the following factors:
- soil characteristics;
- physical-chemical properties and concentration of the heavy metals to be removed;
- age of the contamination;
- process parameters, such as extracting agents to be used (type and concentration), contact time, soil amount, intensity of mixing and temperature.

In addition, the efficiency of heavy metal removal is also influenced by:
- pH of the suspension;
- redox potential;
- ionic strength of the system;
- presence of complexing agents.

In particular, pH and redox potential influence the chemical form of the contaminants; pH and ionic strength the intensity of the interactions between pollutants and soil; pH and complexing agents determine the concentration of pollutants in the solid and the liquid phases at equilibrium.
For all these reasons, the application of the treatment requires a preliminary study, at laboratory scale, to evaluate the operating conditions in order to maximize the final efficiency.

11.1.1 Washing and extraction of contaminants

The processes of extraction of the pollutants depend on the type of the extracting liquid. Water is the most commonly used one and, in case of extraction of heavy metals, it is usually supported by acid or chelating agents, able to increase the overall efficiency.
The main effect obtained by the addition of an acid is the creation of an environment rich in H^+ ions. These ions participate in a multitude of reactions, pH–dependent, which favour the desorption of the pollutants from the soil and, therefore, their solubilisation. Moreover, low pH values favour the solubilisation of some forms of precipitated metal, such as carbonates and hydroxides, and the dissolution of certain components of the soil which are commonly bound to the contaminants, such as Fe/Mn oxides, and the organic matter.
In case of hydrochloric acid, the complexation of metal ions by Cl^- further contributes to the removal mechanisms. The formation of soluble complexes, sufficiently stable, increase, at fixed pH, the maximum concentration of metal ions in the solution.
The acid solutions most frequently used are hydrochloric acid (HCl), sulfuric acid (H_2SO_4) or nitric acid (HNO_3). Although poorly selective and very aggressive, they are selected mainly because of economic reasons, being extremely inexpensive, and very common to be found. Unfortunately, because of their poor selectivity, they are responsible for the extraction of important elements from the soil, such as the organic matter and the nutrients.
The use of complexing agents, such as citric acid, ammonium acetate, nitrilotriacetic acid (NTA), ethylenediamine tetra- acetic acid (EDTA) and ethylene diamine disuccinate acid (EDDS), is a valid alternative to the use of inorganic acid. The chelation process is the formation of soluble complexes with the contaminants to be removed. The chelating agents

favoriscono il desorbimento degli inquinanti dal terreno e la loro solubilizzazione. In particolare, gli idrogenioni agiscono sugli scambiatori del suolo cui è legata la contaminazione entrando in competizione con essa per l'occupazione dei siti di scambio. A questo si aggiunge, al diminuire del pH, l'incremento della solubilità di alcune forme di precipitati metallici quali carbonati ed idrossidi, e la dissoluzione di taluni componenti del suolo cui si legano comunemente i contaminanti metallici (ossidi di ferro e manganese, sostanza organica). Nei lavaggi con l'acido cloridrico, ai meccanismi di rimozione basati sulla riduzione del pH, si aggiunge quello della complessazione degli ioni metallici ad opera degli anioni Cl^- prodotti dalla dissociazione dell'acido: la formazione di complessi solubili sufficientemente stabili incrementa, a parità di pH, la concentrazione massima di ioni metallici nel liquido estraente. Gli acidi più utilizzati, sebbene scarsamente selettivi e molto aggressivi, sono l'acido cloridrico e l'acido nitrico per via della loro efficacia abbinata al basso costo. Un aspetto negativo che accomuna gli acidi inorganici agli agenti complessanti e agli acidi organici, è quello di non essere selettivi nei confronti dei metalli e ciò comporta che, nel trattamento del *soil washing*, oltre ad essere estratti i metalli pesanti, sono interessati dalla complessazione anche altri metalli presenti nella soluzione.
Gli agenti complessanti, come l'acido citrico, l'acetato d'ammonio, l'acido nitrilotriacetico (NTA) e l'EDTA (Etilen Diammino Tetra Acetico), EDDS (Etilen Diammino Disuccinico) costituiscono una valida alternativa all'uso di soluzioni acide. Il processo di chelazione è la formazione di complessi solubili contenti i contaminanti da rimuovere. Gli agenti chelanti sono per l'appunto in grado di dar luogo a legami di coordinazione noti come "chelati", in genere caratterizzati da elevata solubilità e stabilità, nei quali il catione metallico occupa la posizione centrale. In tal modo, il catione metallico risulta intrappolato all'interno del chelato, il quale possiede una struttura ad anello. La differenza principale che intercorre tra i vari agenti chelanti consiste nell'efficienza di lavaggio che, naturalmente, è direttamente correlata all'abilità della soluzione estraente, essendo molto più selettivi, nell'estrarre gli inquinanti dal suolo ed alla tipologia di inquinanti presenti. Il più utilizzato finora è stato l'acido citrico soprattutto per l'elevata capacità di estrazione dei metalli pesanti, ma anche per il modesto impatto ambientale e i contenuti costi delle operazioni di bonifica. Esso però non è selettivo nei confronti dei metalli pesanti, e per questo motivo sta diventando sempre più preponderante l'uso dell'EDTA e dell'EDDS.
Tra i criteri di scelta dei chelanti riveste molta importanza anche la sua capacità di essere non dannoso per l'ambiente e riciclabile per il riuso. Durante il processo di estrazione il metallo si complessa molto stabilmente con il chelante, ma questo accade sotto ben determinate condizioni al contorno. Le condizioni operative che influenzano il processo di recupero sono il pH, che deve essere moderatamente alto, e la presenza di composti che, mettendosi in competizione o con il metallo o con il chelante, vadano ad interferire nella formazione del complesso. È quindi possibile modificare la stabilità del complesso dosando nella soluzione appropriate sostanze che alterino l'equilibrio termodinamico raggiunto durante l'estrazione.

are indeed able to give rise to the bond known as "chelates", typically characterized by high solubility and stability. The metal occupies the central position of the ring structure of the complex, and is therefore trapped within the chelate.
For many years citric acid has been the most used chelating agent adopted in soil washing processes, especially in case of metal contamination, because of its relatively modest environmental impact and cost. However, citric acid has a low selective capacity towards different metals. For this reason the use of EDTA and EDDS is becoming more and more predominant.
Among the criteria for the selection of chelating agents, the ability to be non-harmful to the environment and the possibility to be recovered and reused, are of great importance. It has to be considered, in fact, that during the extraction process, the metal complex is very stable, but this stability could be reduced if the boundary conditions are varied. In such a way it is possible to break the bond and recover the chelating agent. The two operating conditions that mostly influence the recovery process are the pH value, which should be moderately high, and the presence of compounds interfering in the formation of the complex. Therefore it is possible to modify the stability of the complex simply adding appropriate substances in the solution, so to alter the thermodynamic equilibrium reached during the extraction.

11.1.2. EDDS - acido etilendiamminodisuccinico

Numerosi studi sperimentali rivolti alla ricerca di un agente chelante alternativo all'EDTA, in grado di raggiungere le stesse efficienze di rimozione dei metalli pesanti e, al contempo, ottenere un minore impatto ambientale, hanno trovato nell'EDDS (acido etilendiamminodisuccinico) una valida alternativa "verde". L'acido Etilen Diammino Disuccinico (EDDS) è prodotto in natura da un certo numero di microrganismi, ma può essere anche sintetizzato artificialmente a partire dall'etilendiammina e dall'anidride maleica (Schowanek et al., 1997). E' un isomero strutturale dell'EDTA, ha due carboni chirali e presenta tre stereoisomeri: (S,S), (S,R/R,S) e (R,R), di queste tre forme solo una è rapidamente biodegradabile, ovvero la configurazione (S,S), che restituisce come prodotti N-(2-aminoethyl) aspertic-acid ed eventualmente CO_2 (Jaworska et al., 1999). I processi di complessazione di uno ione metallico con un agente chelante avvengono generalmente per mezzo di un solvente acquoso, per cui ogni ione viene prima idrato, poi tutte le molecole di acqua coordinate vengono sostituite successivamente dall'agente chelante, ovvero si formano complessi solubili contenenti i contaminanti da rimuovere; quindi la formazione del complesso metallico può essere trattata per l'appunto come una reazione di sostituzione. Sotto questa ipotesi si può valutare la variazione di energia libera impiegata per la sostituzione del complesso metallico idrato con l'agente chelante come una stima della stabilità del complesso creato. Anche se la stabilità dei complessi metallo-EDDS, in alcuni casi, è leggermente inferiore rispetto a quella dei corrispondenti complessi metallo-EDTA, risulta sicuramente sufficiente nella maggior parte delle applicazioni (Chen et al., 2010). L'acido, quando entra in contatto con il solvente, si dissocia, rilasciando la molecola di EDDS anionica; la soluzione così ottenuta presenta un valore di pH per cui il composto non risulta avere un forte potere acidificante. I complessi che possiedono un legante coordinato ad uno ione metallico centrale attraverso due o più atomi donatori, sono detti *chelati*; ciò deriva dalla parola greca "chlh" ("chele") poiché il legante afferra il metallo centrale come una tenaglia. In effetti lo ione metallico centrale si ritrova completamente avvolto dall'anione di EDDS. L'estrazione dei metalli pesanti dalla matrice solida avviene mediante reazioni di complessazione tra ciascun acido/base coniugati dell'agente chelante ed i cationi metallici. All'interno della soluzione di lavaggio, dunque, in ogni istante di tempo, è presente una condizione di equilibrio tra cationi metallici e complessi EDDS-MP. Se gli ioni di metallo superano il valore di concentrazione corrispondente al loro limite di solubilità, si assiste a fenomeni di riprecipitazione in fase solida. La massima quantità dei metalli che è possibile trasferire dalla matrice solida alla soluzione estraente dipende dalla massima concentrazione di metalli in forma cationica e dal valore del pH della soluzione, il quale influenza fortemente la solubilità dei precipitati metallici: generalmente minore è il valore del pH e maggiore è il limite di saturazione. A differenza dell'EDTA l'intervallo utile di pH in cui si esplica la funzione chelante è un po' più ristretto: 3 <pH (S, S) -EDDS <9 e 2 <pH EDTA <11, ma comunque efficace nella maggior parte delle applicazioni. Durante la sequenza con cui, in linea generale, avvengono le reazioni di complessazione è quella che prevede il rilascio dap-

11.1.2. EDDS ethylene diamine disuccinate acid

Several experimental studies have been aimed at searching a chelating agent, alternative to EDTA, capable of achieving the same removal efficiencies and, at the same time, obtaining a lower impact on the environment. As a result of this search, EDDS acid has been indicated as a viable "green"alternative.

EDDS is produced in nature by a large number of microorganisms. Moreover it can be synthesized artificially, starting from ethylenediamine and maleic anhydride (Schowanek et al., 1997).

It is a structural isomer of EDTA, has two carbons chiral and three stereoisomers: (S,S), (S,R/R,S) and (R,R). Of these three forms, only one is readily biodegradable, i.e. the (S,S) one (Jaworska et al., 1999).

Even if the stability of the metal-EDDS complexes is, in some cases, slightly lower than the stability of the corresponding metal-EDTA complexes, it is certainly sufficient for most applications (Chen et al., 2010). EDDS, unlike EDTA, performs as a chelator in a more restricted pH range, which goes from 3 to 9, instead of being included in the range 2-11, as it happens for the EDTA. Nonetheless, it is still effective in most applications.

As already mentioned, a non-negligible advantage of EDDS compared to other chelators, is its biodegradability. The experiments carried out by Hauser et al. (2005), indicated that the complete degradation of the compound takes place in 7-11 days and the half-life is about 4.2-5.6 days. In details EDDS concentration is washed soil went from 100 μM to about 1 μM in a maximum of 50 days.

prima delle specie chimiche più facilmente mobilizzabili, perché debolmente legate, quindi prontamente disponibili al trasferimento in soluzione; poi, progressivamente, di quelle più fortemente legate. In ordine temporale, dunque, si può ammettere che avvenga prima il rilascio di tutta la frazione adsorbita e legata ai carbonati, poi di quella riducibile (legata agli ossidi e idrossidi di Fe, Al e Mn) e infine di quella ossidabile (legata alla sostanza organica e ai solfuri). Così come elencate, infatti, tali specie metalliche sono caratterizzate da una forza di legame crescente, richiedendo pertanto una energia di attivazione via via maggiore per rompere il legame (Peters, 1999). Come già accennato, un vantaggio non trascurabile dell'EDDS rispetto ad altri chelanti, è la biodegradabilità. In seguito ad alcuni esperimenti riportati nello studio di Hauser et al., (2005), è stata misurata la degradazione completa del composto, dopo "soil washing", in un lasso di tempo pari a 7-11 giorni con un tempo di dimezzamento di 4.18-5.60 giorni; inoltre si è misurata la degradazione anche in terreni inquinati, ossia non trattati dal processo di bonifica, verificando che si è passati da alcune centinaia di micro moli a circa 1 μM di EDDS in massimo 50 giorni. Sostanzialmente la differenza tra i due composti risiede nella rottura dei legami C-N (carbonioazoto). Si può notare che l'EDDS si degrada formando acido aspartico, poiché avviene la rottura di un legame C-N, per poi degradarsi in etilendiammina. L'acido aspartico è un amminoacido che presenta una facilità di biodegradazione notevolmente più alta rispetto ai composti che si producono durante il processo di consumo dell'EDTA (Chen et al., 2010).

11.1.3. Stadi dell'attività di soil washing

Ogni progetto richiede informazioni specifiche sviluppate attraverso uno studio di fattibilità (Mann, 1999). Lo scopo dello studio è quello di comprendere quale frazione granulometrica risulta essere contaminata e quindi definire i costi dell'intero processo. Si può suddividere lo studio da eseguire per individuare le modalità di esecuzione in tre differenti step:

I Step

Devono essere selezionati campioni rappresentativi dal sito ed effettuare analisi granulometriche e per ogni frazione individuata determinare il tenore di contaminante presente in essa. In questa fase è indispensabile inoltre effettuare analisi della biodisponibilità dei contaminanti e l'analisi del rischio.

II Step

Se i risultati provenienti dal I Step risultano essere positivi è necessario effettuare dei test di *soil washing* in scala di laboratorio individuando le tecniche di separazione, determinare i reagenti necessari e tutte le condizioni operative necessarie. Questa fase può richiedere alcuni mesi al fine di poter giungere all'individuazione dei parametri di processo e al termine deve essere redatto un documento contente tutte le informazioni tecniche necessarie per l'esecuzione del trattamento.

III Step

Prima del reale trattamento, potrebbe essere richiesto anche un test con reattore pilota, al fine di verificare il corretto funzionamento del processo. In seguito a questo si può procedere o alla correzione di qualche parametro di processo o al trattamento di tutto il sito.

11.1.3 Plant design

A soil-washing project requires specific information before its application at full scale, to verify its feasibility (Mann, 1999). The purpose of the study is to understand what are the granulometric fractions more contaminated, and then to define the costs of the entire process.

It is possible to divide the feasibility study in three different steps:

I Step

It is selected a representative sample from the site of operation. The sample is subject to grain size analysis. For each grain fraction it is determined the contaminant concentration. At this stage it is also essential to perform an analysis of the bioavailability of the contaminant and a risk analysis.

II Step

If the results of the first step are positive, it is necessary to conduct a soil washing test at laboratory scale in order to: i) identifying the technique of separation; and ii) determining the reagents needed and the operating conditions required. This phase may take several months to correctly identify all process parameters. After that, it has to be drawn up a document containing all the technical information required for the treatment execution.

III Step

Before the treatment, a pilot scale test may be also required in order to verify the correct performances of the process.

11.1.4 Vantaggi del soil washing

In conclusione, è' possibile attribuire all'uso della tecnologia di lavaggio chimico i seguenti vantaggi (Mann, 1999):

- è particolarmente conveniente perché permette di concentrare il trattamento solo sulla frazioni appropriate, piuttosto che trattare l'intero flusso dei rifiuti;
- può trattare sia organici e inorganici nello stesso flusso di trattamento, previa opportuna scelta dei reagenti;
- è una vera e propria opzione di riduzione del volume, e supporta direttamente il riciclo e il riutilizzo dei materiali del sito;
- è in linea con le direttive e le politiche US EPA che richiedono trattamenti innovativi on-site;
- non vi è nessuno scarico di emissioni d'aria o acqua di scarico.

11.1.5 Analisi dei costi

Le informazioni relative alle analisi dei costi è possibile effettuarla utilizzando il software *Remedial Action Cost Engineering and Requirements* (RACER). I fattori che possono variare principalmente i costi sono:

- Economia di scala
- Velocità del processo (dipende anche dalla quantità di rifiuti/suolo contaminato da trattare)

In tabella 2 sono rappresentati i costi stimati (per unità di misura) applicando la tecnologia *soil washing* in siti di varia dimensione e complessità.

11.1.4 Advantages of soil washing

In conclusion, the following benefits can be attributed to the application of the soil washing technology (Mann, 1999):

- it allows a reduction of the amount of soil to be treated, been only focused on the treatment of the grain fraction more contaminated;
- it can treat both organic and inorganic contaminants in the same stream of processing, after an appropriate choice of the reagents to be used;
- it directly supports the recycle and reuse of site materials;
- it is in line with the directives and policies of US EPA that require innovative treatments.

11.1.5 Costs analysis

The costs analysis of a soil-washing project can be done automatically, using an open software called *Remedial Action Cost Engineering and Requirements* (RACER). The main factors affecting the cost are:

- Economy of scale;
- Process velocity, that depends on the amount of waste/contaminated soil to be treated

Table 2 summarizes the estimated costs in case of application of the technology in sites of varying size and complexity.

Tabella 2. Analisi dei costi per l'applicazione del soil washing in due differenti scenari

Table 2. Cost analysis of soil washing in two different scenarios

SOIL TECHNOLOGY:	Soil Washing	
RACER PARAMETERS	Scenario A Small Site	Scenario B Large Site
Remedial Action:		
Media/Waste Type	Soil	Soil
Contaminant	SVOC	SVOC
Approach	Ex situ	Ex situ
System Definition:		
Volume (CY)	10,000	200,000
Density (Lbs/CY)	2,600	2,600
Quantity (Tons)	13,000	260,000
Size of Soil Washing Plant (Tons/Hr)	50	100
Mobilization Distance (Mi)	100	100
Safety Level	D	D
Additives:		
Surfactant Additive Rate (Lbs/ton)	4	4
Soil Type	sand-silt/sand clay mixture	sand-silt/sand clay mixture
Supply Water Temperature (°F)	55	55
Process Water Temperature (°F)	55	55
Make up Water (GPM)	50	100
Boiler Capacity (MBH)	0	0
Operation:		
Hours of Operation per Day	16	16
Hours of Downtime per Day	2	2
Days of Operation per Week	5	5
Weeks of Operation per Year	42	42
O&M:		
Years of O&M		
Additional Costs:		
O&M	$0	$0
Remedial Design (10% or 10K)	$129,147	$960,991
Soil Washing Marked-Up Costs	$1,291,468	$9,609,909
TOTAL MARKED-UP COSTS	$1,420,615	$10,570,900
COST PER CUBIC FOOT	$5	$2
COST PER CUBIC METER	$187	$70
COST PER CUBIC YARD	$142	$53

11.2 Processi di rimozione di inquinanti che impiegano le radiazioni ultraviolette e visibili

I processi che sfruttano la radiazione luminosa come fonte energetica si possono dividere in tre gruppi:
- Fotolisi del Perossido di idrogeno o dell'ozono
- Fotocatalisi omogenea
- Fotocatalisi eterogenea

11.2.1 Fotolisi del Perossido di idrogeno e dell'ozono

Tali processi di ossidazione avanzata possono essere condotti sia in fase liquida che in fase gassosa in presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2) o di ozono (O_3), che irradiati da radiazione ultravioletta con lunghezza d'onda tra 200 e 400 nm (0.2-0.4*10^{-6} m) generano radicali , che sono i reali agenti ossidanti.

L'uso del perossido di idrogeno è molto comune nel trattamento di reflui per i seguenti vantaggi:
- è di facile utilizzo, non comporta grandi rischi per la sicurezza degli operatori, e può essere facilmente diluito in acqua in un ampio *range* di valori di concentrazione, non comportando ulteriori costi di impianto per la produzione o lo stoccaggio;
- non produce nessuna emissione in aria;
- ha un alto valore di *quantum yield* rispetto ai radicali generati, non comporta una eccessiva spesa in termini energetici.

Il principale svantaggio è rappresentato dal basso valore del coefficiente di estinzione molare; ciò comporta che per ottenere una determinata produzione di radicali potrebbe essere necessaria una maggiore concentrazione di perossido di idrogeno. Un ulteriore svantaggio risiede nel fatto che la radiazione solare che giunge al suolo terrestre presenta lunghezze d'onda superiore ai 300 nm, e che la componente di quest'ultima che presenta lunghezze d'onda tra i 300 e 400 nm è molto piccola (tra il 3 e il 5%), per cui l'aliquota effettiva di energia solare che si può sfruttare con questo sistema è molto bassa. Altro ossidante che può essere impiegato è l'ozono, prodotto mediante scariche elettriche in aria o in ossigeno in concentrazioni molto basse (in un campo di concentrazioni che va dall' 1 all'8 per cento in volume). Quando l'ozono assorbe una radiazione con lunghezza d'onda tra 200 e 300 nm, si forma perossido di ossigeno attraverso queste reazioni:

$$O_3 \xrightarrow{h\nu} O(^1D) + O_2$$
$$O(^1D) + H_2O \rightarrow H_2O_2$$

L'ozono reagendo con la base coniugata del perossido porta alla formazione dei radicali :

$$H_2O_2 + H_2O \rightarrow HO_2^- + H_3O^+$$
$$HO_2^- + O_3 \rightarrow O_3^- + H\dot{O}_2$$
$$O_3^- + H_2O \rightarrow H\dot{O}_3 + OH^-$$
$$H\dot{O}_3 \rightarrow \dot{O}H + O_2$$

In questo processo, oltre alla formazione di perossido di idrogeno, bisogna considerare anche il contributo all'abbattimento degli inquinanti per ossidazione diretta dell'ozono, che ha la capacità di ossidare numerose sostanze inquinanti, poiché è un potente ossidante.

11.2 Removal processes of pollutants by ultraviolet radiation and visible

The processes that use the light radiation as a source of energy can be divided into three groups:
- photolysis of hydrogen peroxide or of ozone;
- homogeneous photocatalysis;
- heterogeneous photocatalysis.

11.2.1 Photolysis of hydrogen peroxide or of ozone

These advanced oxidation processes (AOP) can be carried out both in liquid phase and in gaseous phase, in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) or ozone (O_3). These compound, irradiated by an ultraviolet radiation with a wavelength ranging between 200 nm and 400 nm (0.2-0.4*10^{-6} m), generate radicals, which that are the true oxidizing agents.

Use of H_2O_2 is very common in wastewater treatment because of the following reasons:
- it is easy to use, does not involve great risks to the safety of the operators, and can be easily diluted in water and in a wide range of concentration values, not implying additional costs for the production or storage;
- t produces no emissions into the air;
- t has a high value of *quantum yield* with respect to the radicals generation, not implying excessive expenditure of energy.

The main disadvantage is represented by the low value of the molar extinction coefficient. Therefore, to obtain a given production of radicals, it may be necessary to increase the concentration of the H_2O_2. A further disadvantage resides in the fact that the solar radiation reaching the earth presents wavelengths greater than 300 nm, while the component between 300 nm and 400 nm is very limited (between 3% and 5%).
Another oxidizing agent that can be used is O_3, produced by an electric discharge in air or oxygen at low concentrations (concentrations range is 1-8% in volume). When O_3 absorbs a radiation with a wavelength between 200 and 300 nm, it forms H_2O_2through the following reactions:

$$O_3 \xrightarrow{h\nu} O(^1D) + O_2$$
$$O(^1D) + H_2O \rightarrow H_2O_2$$

The O_3 reacts with the conjugated base of H_2O_2 leading to the formation of the radicals :

$$H_2O_2 + H_2O \rightarrow HO_2^- + H_3O^+$$
$$HO_2^- + O_3 \rightarrow O_3^- + H\dot{O}_2$$
$$O_3^- + H_2O \rightarrow H\dot{O}_3 + OH^-$$
$$H\dot{O}_3 \rightarrow \dot{O}H + O_2$$

In this process, in addition to the formation of H_2O_2, it is necessary to consider the contribution of the pollutants reduction by direct oxidation by O_3, which is a powerful oxidant.

11.2.2 Fotocatalisi Omogenea

La fotocatalisi omogenea è un processo di rimozione in cui il fotocatalizzatore è disciolto nella fase liquida, viene investito dalla radiazione luminosa e produce radicali che ossidano gli inquinanti.

Un esempio di fotocatalisi omogenea è rappresentato dal sistema Foto-Fenton. Esso è basato sulla reazione di Fenton e sulla capacità di alcuni aquocomplessi del ferro di ridursi se irradiati in un campo di lunghezze d'onda comprese tra 300 e 400 nm.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \dot{O}H$$
$$Fe^{3+} + H_2O + h\upsilon \rightarrow Fe^{2+} + H^+ + \dot{O}H$$
$$[Fe(OOC - R)]^{2+} + h\upsilon \rightarrow Fe^{2+} + CO_2 + \dot{R}$$

Il vantaggio del sistema Foto-Fenton rispetto ai precedenti processi AOP, è rappresentato dalla capacità di sfruttare la radiazione solare mentre esso presenta lo svantaggio di richiedere bassi valori di pH (intorno a 4) (Hoffmann et al., 1995; Oller et al., 2007).

11.2.3 Fotocatalisi Eterogenea

La fotocatalisi eterogenea è così chiamata perché fa uso di un catalizzatore solido, che si trova sospeso nella corrente di acqua da trattare, sulla cui superficie avviene l'ossidazione degli inquinanti grazie alla presenza di opportuni siti liberi o la formazione di particolari specie reattive. Quindi, il processo di ossidazione è in genere preceduto da una fase di adsorbimento, che può in alcuni casi limitare il processo stesso.

Il catalizzatore è un semiconduttore, che per effetto dell'irraggiamento presenta due bande, una banda di valenza (in cui gli elettroni sono normalmente presenti) e una banda di conduzione (in cui essi migrano dalla banda di valenza per assorbimento di energia).

La differenza di energia tra le due bande rappresenta il cosiddetto *band gap* (E_G). Nel caso della fotocatalisi eterogenea, l'energia necessaria per il salto da una banda all'altra è fornita dalla radiazione luminosa, quindi, considerando l'equazione di Planck, è possibile calcolare la lunghezza d'onda massima necessaria per avviare il processo di fotocatalisi:

$$\lambda_{max} = \frac{hc}{E_G}$$

Dove h è la costante di Planck e E_G è l'energia di band gap, che dipende dal semiconduttore.

Una volta che il semiconduttore viene colpito da fotoni con un'energia sufficiente, l'elettrone eccitato passa dalla banda di valenza a quella di conduzione, liberando una buca positiva, ovvero una specie in grado di ossidare le sostanze organiche che interagiscono con essa, mentre l'elettrone promosso nella banda di conduzione favorisce la riduzione di specie presenti (ad esempio, si riescono a ridurre le forme ossidate dei metalli presenti in acqua); il tutto è riassumibile nel seguente schema:

11.2.2 Homogeneous photocatalysis;

The homogeneous photocatalysis presents a photocatalyst dissolved in the liquid phase, which is activated by light radiation, and produces radicals which oxidize the pollutants.

An example of homogeneous photocatalysis, is represented by the Photo-Fenton system. It is based on the Fenton reaction and on the ability of some complexes of the iron(III) to be reduced, if irradiated in a field of wavelengths between 300 nm and 400 nm.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \dot{O}H$$
$$Fe^{3+} + H_2O + h\upsilon \rightarrow Fe^{2+} + H^+ + \dot{O}H$$
$$[Fe(OOC - R)]^{2+} + h\upsilon \rightarrow Fe^{2+} + CO_2 + \dot{R}$$

The advantage of the Photo-Fenton system compared to the previous AOP processes, is represented by the ability to exploit solar radiation, while it has the disadvantage of requiring low pH values (around 4) (Hoffmann et al., 1995; Oller et al., 2007).

11.2.3 Heterogeneous photocatalysis

The heterogeneous photocatalysis uses a solid catalyst, which is suspended in the current of the water to be treated. The oxidation of the pollutants takes place on the catalyst surface due to the presence of suitable vacant sites or the formation of specific reactive species. Thus, the oxidation process is typically preceded by an adsorption phase, which, in some cases, may limit the process. The catalyst is a semiconductor with two bands: a valence band (where electrons are normally present) and a conduction band (where electrons migrate from the valence band due to the absorption of energy). The energy difference between the two bands is called the band gap. In the case of heterogeneous photocatalysis, the energy required by the electrons to jump from one band to another is provided by light radiation, and then, considering the Planck equation is possible to evaluate the maximum wavelength required to start the photocatalysis process:

$$\lambda_{max} = \frac{hc}{E_G}$$

where h is the Planck constant, c the speed of light and E_G is the energy band gap, which depends on the semiconductor.

Once the semiconductor is struck by photons with a sufficient energy, the electron is excited, moves from the valence to the conduction band, freeing up a positive hole, that is, a species that can oxidize the organic substances; at the same time the electron promoted to the conduction band makes possible the reduction of species present (for example, reduce oxidized forms of metals present in the water). All of these facts are summarised in Figure 3.

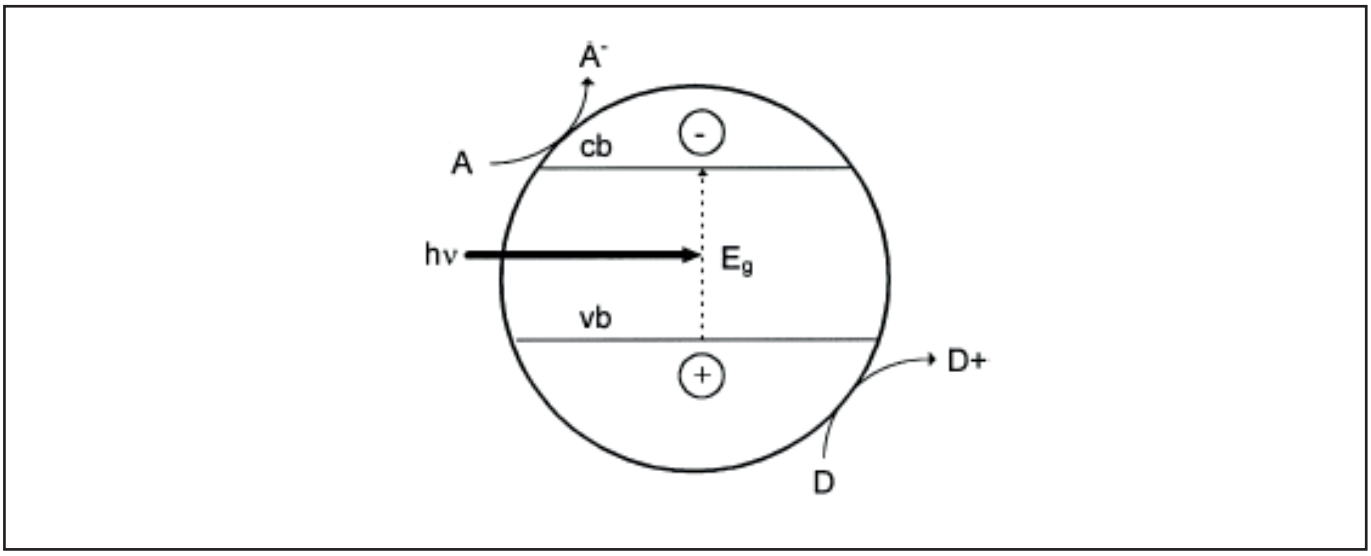


Figura 3. Schema di funzionamento di un Semiconduttore in fotocatalisi (Litter, 1999)

Figure 3. Outline of semiconductor functioning in photocatalysis (Litter, 1999)

Material	Band gap energy required to activate catalyst (eV)	Corresponding wavelength required (nm)
$BaTiO_3$	3.3	375
CdO	2.1	590
CdS	2.5	497
CdSe	1.7	730
Fe_2O_3	2.2	565
GaAs	1.4	887
GaP	2.3	540
SnO_2	3.9	318
$SrTiO_3$	3.4	365
TiO_2	3.0	390
WO_3	2.8	443
ZnO	3.2	390
ZnS	3.7	336

Figura 4. Band Gap Catalizzatori (Galvez and Malato, 2003)

Figure 4. Band Gap catalyst (Galvez and Malato, 2003)

Oltre a ossidare e ridurre, la coppia buca (h^+_{VB})-elettrone (e^-_{CB}) può ricombinarsi generando calore. Quest'ultima rappresenta una reazione parassita che riduce l'efficienza di tutto il sistema.
Va detto che una sostanza può essere ossidata se la buca h^+ presenta un potenziale di ossidazione maggiore di quello della sostanza da ossidare.
In natura esistono molti materiali che si comportano da semiconduttori, sebbene non tutti siano adatti per l'utilizzo in fotocatalisi. Un aspetto molto importante è rappresentato proprio dal "band gap", poiché, più esso è ampio, maggiore è l'energia da fornire per poter attivare il fotocatalizzatore.
Di seguito si riporta una tabella con i valori dei *band gap* presentati dai fotocatalizzatori più comuni (fig. 4).
Inoltre, i fotocatalizzatori, per poter essere impiegati nel trattamento di reflui che devono essere reimmessi

In addition to oxidize and reduce, the couple hole (h^+_{VB})-electron (e^-_{CB}) may recombine generating heat. This represents a parasite reaction, which reduces the efficiency of the entire system. A substance can be oxidized only if the hole, (h^+), has an oxidation potential greater than that of the substance to be oxidized. Many materials behave as semiconductors, although not all are suitable as catalysts. Another important aspect is represented by the "band gap", because when it is bigger, greater is the energy to be provide to activate the photocatalyst. Figure 4 presents the band gap values of the most common photocatalysts.

The photocatalysts to be used in the wastewater treatment shall have the following characteristics:
- be non-toxic;
- be easy-to-find;

nell'ambiente, devono presentare le seguenti caratteristiche:
- essere atossici
- di facile reperibilità
- economici
- riutilizzabili per più cicli senza perdere le caratteristiche originarie.

Per le caratteristiche appena indicate, a tutt'oggi, il catalizzatore usato in maniera quasi esclusiva è il biossido di titanio TiO_2.

11.2.4 Fotocatalisi sacrificale

In alcuni casi, gli inquinanti da rimuovere dai reflui non sono le sostanze organiche, che vengono rimosse per ossidazione, ma sostanze che vengono ridotte dai fotoelettroni. Un esempio è rappresentato dalla rimozione di metalli pesanti come il rame, piombo e il mercurio da acque contaminate.
Questa tecnica prende il nome di fotocatalisi sacrificale perché è necessaria la presenza di determinate sostanze che fungono da agenti sacrificali, ovvero, reagendo con le buche, evitano la ricombinazione tra queste ultime e gli elettroni e vengono di conseguenza ossidate.
Gli agenti sacrificali molto spesso sono già presenti nei reflui da cui si vuole rimuovere i metalli pesanti, poiché le acque di scarto sono spesso ricche di sostanze organiche che devono essere ossidate fino ad arrivare alla completa mineralizzazione.
In altri casi, invece, il substrato organico deve essere aggiunto al refluo per poter permettere la rimozione dei metalli, che vengono ridotti. In questo caso il substrato deve essere atossico, facilmente ossidabile e a basso costo.
Va sottolineato che una sostanza può essere ridotta dall'elettrone della banda di conduzione solo se il suo potenziale di riduzione è più positivo del potenziale della banda di conduzione stessa del catalizzatore. (Litter, 1999; Spasiano et al., 2013).

11.2.5 Biossido Di Titanio

Il biossido di titanio in forma monocristallina (TiO_2) è utilizzato come fotocatalizzatore in numerose applicazioni e le sue proprietà sono state studiate negli ultimi anni nella rimozione di una vasta gamma di inquinanti sia atmosferici che delle acque: alcoli, alogenuri, idrocarburi aromatici, acidi organici, coloranti, NO_x e altri. Il biossido di titanio soddisfa una serie di requisiti che ne permettono un utilizzo pratico e conveniente; esso può cristallizzare in diverse forme: rutilo, anatasio e brookite. Nonostante il rutilio abbia una E_G inferiore di 3,0 eV (energia corrispondente alle radiazioni nel campo dell'ultravioletto, λ=407 nm) e sia in grado di assorbire in un intervallo di lunghezze più vicino al visibile, è l'anatasio, con una E_G di 3,2 eV (λ=374 nm) a mostrare una più elevata attività fotocatalitica. L'anatasio possiede un potenziale della banda di conduzione più negativo di 0,2 eV rispetto al rutilio; ciò fornisce una maggiore efficienza nelle reazioni di riduzione, una più alta mobilità elettronica ed una scarsa tendenza ad adsorbire permanentemente l'ossigeno. In aggiunta tale forma polimorfa possiede una superficie specifica maggiore di quella del rutilio (fig. pag 143). Uno degli svantaggi nell'utilizzo di

- be economic;
- be reusable for several cycles without losing the original characteristics.

For these characteristics the catalyst used in a way that is almost unique is the titanium dioxide (TiO_2).

11.2.4 Sacrificial photocatalysis

In some cases, the pollutants to be removed from the wastewater are not organic substances, which are removed by oxidation, but the substances that are reduced by photoelectrons. An example is represented by the removal of heavy metals such as copper, lead and mercury. This technique takes the name of sacrificial photocatalysis because requires the presence of certain organic substances that act as sacrificial agents preventing the recombination between the hole and the electrons and are therefore oxidized. The sacrificial agents often are already present in the wastewater, since the wastewaters are often rich in organics that must be oxidized up to the complete mineralization. In other cases the organic substrate must be added to the wastewater in order to allow removal of metals. In this case, the substrate must be non-toxic, easily oxidizable and of low-cost. It should be stressed that a substance may be reduced by the electron of the conduction band only if its reduction potential is more positive than that of the conduction band of the catalyst. (Litter, 1999; Spasiano et al., 2013).

11.2.5 Titanium Dioxide

TiO_2 in different crystalline forms (anatase, rutile and their mixture) is used as a photocatalyst in many applications. Its properties have been studied in the last years for the removal of a wide range of pollutants: alcohols, halides, aromatic hydrocarbons, organic acids, dyes, NOx and others.
One of the disadvantages in the use of this catalyst is the fact that it absorbs only ultraviolet radiation, which is a very little part of the solar radiation available on the Earth. For this reason, many studies are currently oriented to the possibility of broadening the absorption spectrum of TiO_2, in order to exploit a larger portion of the solar radiation, through doping operations. Another effect that reduces the efficiency of TiO_2 consists in the hole-electron recombination, with the consequent release of energy in the form of heat.

questo catalizzatore è che in sostanza esso assorbe solo radiazioni ultraviolette, una piccolissima parte della radiazione solare disponibile sulla Terra. Per questo motivo molti studi sono attualmente orientati alla possibilità di allargare lo spettro di assorbimento del TiO_2, per sfruttare una parte più cospicua della radiazione solare, mediante il dopaggio del biossido di titanio. Un altro effetto che riduce l'efficienza di questo catalizzatore consiste nella ricombinazione buca-elettrone, molto rilevante, con il consecutivo rilascio di energia sotto forma di calore.

11.2.6 Variabili operative capaci di influenzare il comportamento del sistema reattivo

Influenza del flusso di fotoni

Possiamo riassumere le reazioni coinvolte nel seguente schema:

$TiO_2 + h\nu \rightarrow e^- + h^+$	$r_a = k_a I$	(a)
$e^- + h^+ \rightarrow TiO_2 + calore$	$r_b = k_b[e^-][h^+]$	(b)
$A + e^- \rightarrow A^-$	$r_c = k_c[A][e^-]$	(c)
$D + h^+ \rightarrow D^+$	$r_d = k_d[D][h^+]$	(d)
$A^- + D^+ \rightarrow intermedi \rightarrow Prodotti$	$r_e = k_e[A^-][D^+]$	(e)

Scrivendo il bilancio sulle buche fotogenerate e ipotizzando che la loro concentrazione rimanga sostanzialmente costante nel tempo si giunge a questa espressione per la loro concentrazione:

$$[h^+] = \frac{k_a I}{k_b[e^-] + k_d[D]}$$

Ipotizzando inoltre che la specie limitante nel processo sia propria la buca fotogenerata h^+ (reazione d), si giunge ad un'espressione della velocità di reazione di questo tipo:

$$r = \frac{k_a k_d [D] I}{k_b[e^-] + k_d[D]}$$

In questa espressione si può notare che esiste una relazione lineare tra la velocità di reazione e la potenza della radiazione (I). Inoltre, si può osservare che, se il flusso di fotoni è molto alto, le concentrazioni delle buche e degli elettroni sono molto maggiori del termine $k_d[D]$ e la relazione per calcolare la concentrazione delle buche si riduce a:

$$[h^+] = \frac{k_a I}{k_b[e^-]}$$

Esistono condizioni in cui la relazione lineare tra la velocità di reazione e la potenza viene meno e la velocità di degradazione della sostanza organica risulta proporzionale alla potenza (I) elevata a 0,5:

$$r = r_e = r_d = k_d[D]\left(\frac{k_a I}{k_b}\right)^{1/2}$$

Questo accade nel momento in cui la velocità di formazione della coppia buca-elettrone è maggiore della velocità di degradazione delle specie da rimuovere, ovvero quando è favorita la reazione di ricombinazione della coppia buca-elettrone. Le condizioni ottimali di utilizzo della radiazione sono ovviamente quelle in cui si osserva

11.2.6 Operating variables capable of influencing the behaviour of the reactive system

The influence of the photons flow

The reactions involved can be summarised as follows:

$TiO_2 + h\nu \rightarrow e^- + h^+$	$r_a = k_a I$	(a)
$e^- + h^+ \rightarrow TiO_2 + calore$	$r_b = k_b[e^-][h^+]$	(b)
$A + e^- \rightarrow A^-$	$r_c = k_c[A][e^-]$	(c)
$D + h^+ \rightarrow D^+$	$r_d = k_d[D][h^+]$	(d)
$A^- + D^+ \rightarrow intermedi \rightarrow Prodotti$	$r_e = k_e[A^-][D^+]$	(e)

Considering the balance on the photo-generated holes and imposing the pseudo-stationary hypothesis for them, it is possible to write:

$$[h^+] = \frac{k_a I}{k_b[e^-] + k_d[D]}$$

Assuming that the rate determining step is (d), an expression of the reaction speed of this type is achieved:

$$r = \frac{k_a k_d [D] I}{k_b[e^-] + k_d[D]}$$

From this expression, it is possible noting a linear relationship between the reaction rate and the power of the radiation (I). In addition, if the photons flux is very high, the holes and electrons concentrations are much larger than the term $k_d[D]$ and the relationship to calculate the concentration of holes reduces to:

$$[h^+] = \frac{k_a I}{k_b[e^-]}$$

In some cases the linear relationship between the reaction rate and the power is not valid and the degradation rate of the organic substance is proportional to the power (I) raised to 0.5:

$$r = r_e = r_d = k_d[D]\left(\frac{k_a I}{k_b}\right)^{1/2}$$

This happens whenever the formation rate of the pair hole-electron is greater than the degradation rate of the species to be removed. The optimal conditions of the radiation are obviously those in which a linear dependence is observed. If the light intensity further increases, the reaction rate becomes independent of the radiation itself, and the process is regulated by the surface adsorption of the species and by the redox reactions. This may be due to two different reasons:

1. the lack of substances that accept electrons such as O_2;
2. the presence of excess of organic substance or of the reaction products that occupy all sites of the catalyst, and do not allow further reactions.

The power value of the radiation, which allows obtaining a linear dependence between r and I, varies according to the substances and the reactor system, hence, is to be determined case-by-case.

la dipendenza lineare. Se l'intensità luminosa aumenta ancora, la velocità di reazione diventa indipendente dalla radiazione stessa e il processo dipende dai soli processi di adsorbimento superficiale delle specie e dalle reazioni di ossidoriduzione.
Ci possono essere due cause per cui ciò accade, in primo luogo, la mancanza di sostanze che accettano gli elettroni della coppia buca-elettrone come O_2 o, in secondo luogo, la presenza in eccesso di sostanza organica o dei prodotti di reazione che occupano tutti i siti del catalizzatore, e non permettono ulteriori reazioni. Il valore di potenza della radiazione per cui si passa dalla dipendenza lineare tra r e I ad una diversa varia al variare delle sostanze e del sistema reattoristico e, quindi, va determinato caso per caso.

Influenza del pH
Il pH influenza significativamente il comportamento fotocatalitico del TiO_2 presente nelle soluzioni acquose, sia modificando la carica superficiale delle particelle, sia modificando la dimensione degli aggregati delle particelle stesse.
Il pH di *zero point of charge* (pH_{zpc}) è definito come quello al quale la concentrazione sulla superficie delle cariche positive è uguale a quella delle negative; in tabella 3 è riportato il pH_{zpc} per alcuni tipi di biossido di titanio:

Poiché la degradazione della sostanza organica procede in genere prima attraverso un suo adsorbimento, nel caso in cui il pH della soluzione è maggiore del pH_{zpc} si ha una maggiore concentrazione di cariche negative e viene, quindi, favorito l'adsorbimento di sostanze acide. Al contrario, se il pH è minore del pH_{zpc} viene favorito l'adsorbimento di sostanze basiche in quanto il catalizzatore è carico positivamente. Tutto ciò influenza, quindi, la velocità di degradazione delle sostanze che si vogliono rimuovere dall'acqua. Inoltre, in caso di decontaminazione di sostanze organiche, va considerato che alcuni intermedi di reazione possono influenzare il pH della soluzione, influenzando il comportamento del sistema in esame.
Un ulteriore effetto del pH sul funzionamento del fotocatalizzatore è rappresentato dalla sua capacità di influenzare le dimensioni medie degli aggregati di particelle che si formano in soluzione; al variare del pH della soluzione in cui è sospeso il TiO_2 la dimensione degli aggregati cambia. Questo aumento della dimensione media degli aggregati di particelle di biossido di titanio può essere sfruttato per rendere più semplice la separazione del catalizzatore dalle acque trattate attraverso filtrazione o sedimentazione.

The influence of pH
The pH significantly influences the behaviour of TiO_2 present in the aqueous solutions, both changing the surface charge of the particle, and changing the size of the aggregates of the particles.
The pH of zero-point-of- charge is defined as the one corresponding to a concentration on the surface of the positive charges equal to the concentration of the negative charges. Table 3 reports the pH_{zpc} for some types of TiO_2.

Since the degradation of the organic substances proceeds usually through their adsorption, if the solution pH is greater than the pH_{zpc}, a higher concentration of negative charges is present on the surface and the adsorption of acidic substances is favoured. On the contrary, if the pH is lower than pH_{zpc} the adsorption of basic substances is favoured because the catalyst surface is positively charged. Therefore, the pH can influence the degradation rate of substances to be removed from the water. In addition to that, in the case of decontamination of organic substances, it has to be considered that some reaction intermediates may influence the pH of the solution, influencing the behaviour of the system. A further effect of the pH is represented by its ability to affect the average size of the particle aggregates in the solution. Changing the pH of the solution, in which TiO_2 is suspended, changes the size of the aggregates. The increase of aggregates can be exploited to make easier the catalyst separation from the treated water through filtration or sedimentation.

The influence of the catalyst amount
Whatever the type of the used photo-reactor, the initial rate of degradation of the substances to be oxidized is directly proportional to the load of the catalyst. This behaviour is generally observed up to a certain value of the load, beyond which the degradation rate of the contaminant becomes independent from this variable. The value at which this phenomenon is observed depends on the geometry of the reactor and on the adopted operating conditions. In addition, it is achieved when all the particles of the catalyst are illuminated. Increasing the load of the catalyst, does not results in a further increase of the degradation rate of the organic substance, since the particles in excess of the catalyst are not illuminated, because of the increased turbidity of the solution. The optimal value of the load of the catalyst has been investigated in several studies and is included between few grams per litre of solution

Tabella 3. Valori di pH_{zpc} per alcuni tipi di TiO_2 ; (a) (Ryu and Choi, 2007); (b) (Zhang et al., 2008).

Table 3. pH_{zpc} of some TiO2 ; (a) (Ryu and Choi, 2007); (b) (Zhang et al., 2008).

TiO_2 Type	pH_{zpc}
ALDRICH (pure anatase phase)	4.2 (a)
ALDRICH (pure rutile phase)	4.8 (a)
AEROXIDE P25 (80% anatase, 20% rutile)	6.3 (a)
ALDRICH nanopowder (pure anatase phase)	5.2 (b)

Influenza del carico del catalizzatore
Qualunque sia il tipo di fotoreattore utilizzato, sia che si tratti di fotoreattori con catalizzatore sospeso sia di sistemi a catalizzatore adeso, la velocità iniziale di degradazione delle sostanze da ossidare è direttamente proporzionale al carico del catalizzatore.
Questo comportamento viene osservato in genere fino ad un certo valore del carico stesso, oltre il quale la velocità di degradazione del contaminante diventa indipendente da tale variabile. Il valore al quale si osserva tale fenomeno dipende dalla geometria del reattore e dalle condizioni operative adottate. Inoltre, esso si raggiunge quando tutte le particelle di catalizzatore vengono illuminate. Aumentando ulteriormente il carico di catalizzatore, non si osserva un ulteriore aumento della velocità di degradazione di sostanza organica, in quanto le particelle in eccesso del catalizzatore non vengono illuminate, come conseguenza dell'accresciuta torbidità della soluzione che impedisce così alla luce di raggiungere tutto il volume.
Il valore ottimale del carico del catalizzatore è stato stimato in diversi studi e si è visto che esso varia da alcuni grammi per litro di soluzione, in caso di reattore anulare illuminato internamente, a alcune centinaia di milligrammi per litro di soluzione, in reattori con diametro di pochi centimetri e sorgente luminosa esterna, tipologia di reattore più vicina a quella che sfrutta la radiazione solare.
Può accadere che non si sia arrivati al valore limite della concentrazione di catalizzatore, ma essendo il processo di ossidazione composto da reazioni in serie, possono esserci degli intermedi la cui reattività non risente di un ulteriore aumento della concentrazione di catalizzatore. Quando si deve decontaminare un acqua reflua, può accadere che si debbano eliminare anche gli intermedi del processo ossidativo, quindi, per quanto detto in precedenza, si lavora a concentrazioni minori rispetto al valore ottimale (Galvez and Malato, 2003; Hoffmann et al., 1995).

Influenza della temperatura
I sistemi fotocatalitici si attivano con l'energia fornita dai fotoni, essi, quindi, risultano attivi già a temperatura ambiente, purché irradiati con una radiazione al di sotto di una certa lunghezza d'onda.
Nel campo di temperatura in cui lavorano di solito i fotoreattori solari (tra i 20 e i 70 °C), le velocità di degradazione delle sostanze risentono limitatamente delle variazioni di temperatura. Ad esempio Liu e Song, (2010) hanno studiato l'effetto della temperatura sulla degradazione fotocatalica del Metil Arancio ed hanno osservato che la costante cinetica aumentava di sei volte passando da 34 a 100 °C.
Va in ogni caso sottolineato che aumentare la temperatura di lavoro del sistema potrebbe comportare un aumento dei costi che non sarebbe sempre giustificato da un reale aumento di efficienza del sistema.

Influenza delle condizioni di moto del liquido da trattare
Per quanto riguarda le caratteristiche del flusso bisogna fare una distinzione netta tra i sistemi in cui il catalizzatore è adeso, ovvero, fissato ad una delle superficie del reattore, e il caso in cui il catalizzatore è sospeso nella soluzione da trattare (Dijkstra et al., 2001).

(reactor annular illuminated internally), and few hundreds of milligrams per litre of solution (reactors with a diameter of a few centimetres, and external light source) (Galvez and Malato, 2003; Hoffmann et al., 1995).

The influence of temperature
The photocatalytic systems are activated through the energy provided by the photons; they are already active at ambient temperature, if irradiated with a radiation below a certain wavelength. In the operating temperature range of the solar photo reactor (between 20 and 70 °C), the temperature does affect only moderately the degradation rate of the substances. Liu and Song (2010), studying the effect of temperature on the degradation of Orange Methyl, observed, for example, that the rate constant increased six-fold from 34 to 100 °C. It should be pointed out that temperature increase might result in a cost increment, which could not always be justified by the real increase of the system's efficiency.

The influence of the flow conditions of the liquid to be treated
Concerning the effect of the characteristics of the liquid flow on the process, it is necessary to make a distinction between systems where the catalyst is attached to a surface of the reactor, and systems where the catalyst is suspended (Dijkstra et al., 2001).

In the first case the flow must be laminar, so that the contact between the solution and the catalyst is maximized. Reynolds number takes on the maximum values of a few hundred.
In the second case, instead, the flow must be fully turbulent, since the catalyst tends to easily settle in places where the current slows down; in all the points of the photo-reactor needs to be guaranteed, the homogeneity of the solution (Prieto-Rodriguez et al., 2012).

Figura 5. Parabolic Trough Collector (PTC) by Gossamer and 3M (Photo: Gossamer Space Frames).

Figure 5. Parabolic Trough Collector (PTC) by Gossamer and 3M (Photo: Gossamer Space Frames).

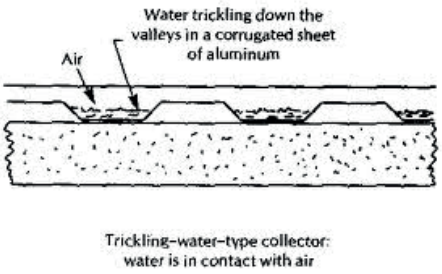


Figura 6. Fotoreattore tipo di trickle-down flat plate

Figure 6. Photoreactor trickle-down flat plate

Figura 7. Fotoreattore tipo Compound Parabolic Reactor (CPC) (photo: P. Fernández Ibáñez, Plataforma Solar de Almería)

Figure 7. Photoreactor Compound Parabolic Reactor (CPC) (photo: P. Fernández Ibáñez, Plataforma Solar de Almería)

Nel primo caso il flusso deve essere laminare, affinchè il contatto tra soluzione e catalizzatore sia massimizzato, quindi in questo caso il numero di Reynolds assume valori al massimo di poche centinaia.
Nel secondo caso, invece, il flusso deve essere completamente turbolento, poiché il catalizzatore tende facilmente a depositarsi nei punti in cui la corrente rallenta; inoltre, deve essere garantita l'omogeneità della soluzione in tutti i punti del fotoreattore (Prieto-Rodriguez et al., 2012).

11.2.7 Fotoreattori Solari

I processi di fotocatalisi che sfruttano la radiazione solare vengono condotti in fotoreattori solari, le cui tipologie risultano abbastanza simili a quelli inizialmente sviluppati per la cattura di energia termica dalla radiazione stessa.
Essi si possono suddividere in due categorie:

- Sistemi a concentrazione: concentrano la radiazione solare riuscendo a catturare una potenza maggiore rispetto a sistemi diversi con stessa area geometrica irradiabile. Solitamente sono dotati di sistemi di "inseguimento" del sole su uno o due assi, e riescono a raggiungere temperature alte. Sfruttano solo la radiazione diretta, in quanto la radiazione diffusa non si può direzionare.
- Sistemi non concentrati: non concentrano la radiazione solare, sono molto spesso fissi, vengono inclinati in base alla posizione geografica e sfruttano sia la radiazione diretta che diffusa.
- Sistemi ibridi: I *Compound parabolic reactor* rappresentano un incrocio tra i tradizionali sistemi non concentrati e i PTC. Riescono a sfruttare le caratteristiche di entrambe i sistemi.

11.2.8 Materiali per la costruzione del fotoreattore

a) Reattore

Poiché il reattore deve essere trasparente alle radiazioni, incluse quelle ultraviolette, il materiale migliore è rappresentato dal quarzo, che, tuttavia, è troppo costoso e fragile; in alternativa, si possono usare tubi in vetro borosilicato o in materiali plastici, in particolare i fluoropolimeri (Blake et al., 1997).

11.2.7 Solar photo-reactor

The photocatalyc processes that take advantage of the solar radiation are carried out in solar reactors, which are similar to those initially developed for the capture of thermal energy from the solar radiation. Solar reactors can be divided into the following categories:

- concentrating solar reactors: these reactors concentrate the solar radiation capturing a greater power compared to different systems with the same geometric irradiable area. They are usually equipped with systems of "tracking" of the sun on one or two axes, and can reach high temperatures. They exploit only the direct radiation, because the diffuse radiation cannot be direct.
- non concentrating solar reactors: these reactors do not concentrate the solar radiation. They are very often fixed and inclined on the basis of the geographical location and take advantage of both the direct radiation and the diffuse radiation.
- Hybrid systems: The *Compound parabolic collector* represents a medley between the traditional systems, not concentrated, and the PTC. They have the features of both systems.

11.2.8 Materials for the construction of the photoreactor

a) Reactor

Since the reactor must be transparent to the radiation, including the ultraviolet ones, the best material to be used for their realization is represented by quartz, which is very expensive and fragile. Alternatively it is possible to use tubes made of borosilicate glass or plastic materials, particularly fluoropolymers (Blake et al., 1997). It must not be underestimated that borosilicate glass loses part of its characteristics with aging and that, additionally, in some systems may be necessary a high resistance due to the pressure of the fluid flowing inside the circuit. Plastic materials have, in general, optical characteristics inferior to those of glass, but have a longer durability and are more resistant to external loads, being non-brittle materials (Blake et al., 1997).

Non va comunque sottovalutato che il vetro borosilicato perde parte delle sue caratteristiche col passare del tempo e che, inoltre, in alcuni sistemi può essere richiesta un'elevata resistenza ai carichi dovuta alla pressione del fluido che scorre all'interno del circuito.
I materiali plastici hanno, in genere, caratteristiche ottiche inferiori a quelle del vetro, ma presentano una durabilità maggiore e resistono meglio ai carichi esterni, non essendo materiali fragili (Blake et al., 1997).

b) Collettore

Le superficie riflettenti che compongono il collettore, oltre ad avere delle ottime caratteristiche di riflettanza (rapporto tra il flusso radiante riflesso e quello incidente su una superficie) della luce, devono anche essere durevoli e capaci di conservare le loro caratteristiche nel tempo, inoltre devono avere un prezzo non elevato. Per questi motivi, dall'analisi di diversi lavori presenti in letteratura, si evince che la soluzione migliore ed economicamente sostenibile è rappresentata da uno strato di ossido anodizzato, o uno strato a *sandwich* di film plastico con *coating* di alluminio.

Dalla figura 8 in cui è riportato il confronto di diverse superficie riflettenti presenti in commercio, si evince che tutti i materiali hanno una buona riflettanza nello spettro di interesse per la fotocatalisi con TiO_2(Galvez and Malato, 2003).
Il rivestimento anodizzato assicura una protezione contro abrasione e agenti chimici (basta uno strato di 2–3 μm). Un'altra alternativa è costituita dall'impiego di un rivestimento di alluminio su di un film di materiale plastico (Jorgensen and Govindarajan, 1991).

c) Raccorderia

Non vi sono considerazioni particolari da fare sul materiale in cui devono essere realizzate le parti di raccorderia, che sono comunemente in materiali plastici, a meno che non si debbano trattare reflui particolari, nel qual caso esse devono essere costruite con materiali specifici variabili da caso a caso.

b) Collector

The reflective surfaces of the collector must have excellent characteristics of reflectance (ratio between the radiant flux reflected and that one incident on surface) of the light and must be durable and able to retain their characteristics over time. For these reasons the best and the most economically sustainable solution is represented by a layer of oxide anodized, or by a layer of plastic film with the aluminium coating.

Figure 8 reports a comparison among different reflective surfaces available on the market. All materials have a good reflectance in the spectrum of interest for photocatalysis with TiO_2(Galvez and Malato, 2003). The anodized coating ensures protection against abrasion and chemical agents (just a layer of 2-3 μm). An interesting alternative is represented by the use of a coating of aluminium on a film of plastic material (Jorgensen and Govindarajan, 1991).

c) Fittings

There are not special considerations to be done on the materials used for the parts of the fittings. They are commonly made of plastics, unless a special wastewater has to be treated. In this case fittings should be realized using specific materials, to be choses case by case.

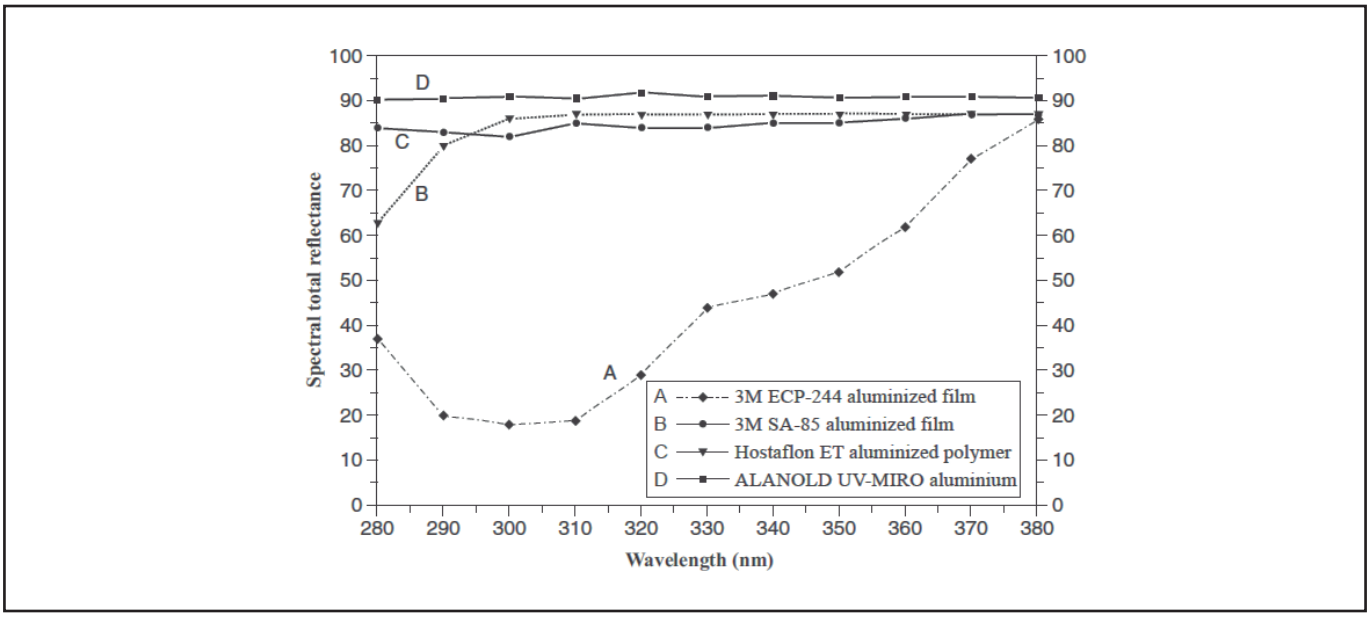


Figura 8. Confronto tra varie superfici riflettenti (Galvez and Malato, 2003).

Figure 8. Comparison between reflecting surfaces (Galvez and Malato, 2003).

11.2.9 Scale-Up del fotoreattore

Fissato il tipo di reattore (ad esempio, un CPC), il volume totale (V_{TOT}), il volume illuminato (V_{ir}), nonché le condizioni operative (carico di catalizzatore, pH, ecc…), effettuando una prova sperimentale solare con un volume V_{TOT} in un tempo, partendo da $c_{IN}=c_{0,}$ si possono riportare i risultati nel seguente modo:

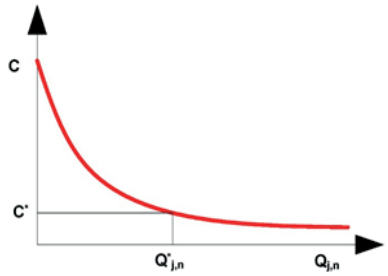


Figura 9. Concentrazione inquinante (C) vs energia specifica (Qj,n)

Dove:

$$Q_{j,n} = Q_{j,n-1} + t_n \quad \overline{UV} \ \frac{S_{CPC}}{V_{TOT}}$$

In questo modo, fissato un valore di rimozione accettabile (C*), ricaviamo l'energia specifica da fornire al sistema () in un tempo t*.

Consideriamo ora di dover trattare una soluzione con la stessa concentrazione iniziale dello stesso inquinante, $c_{IN}=c_0$, ma con un volume V'tot>>Vtot in un tempo t, tale che:

$$\frac{V'_T}{t} \gg \frac{V_T}{t^*}$$

se H_S sono le ore di illuminazione durante il tempo t (le ore di illuminazione sono una frazione del tempo effettivo t), allora la superficie del collettore da utilizzare è data da:

$$S_{CPC} = \frac{Q^*_{j,n} \quad V'_{TOT}}{H_s \quad \overline{UV}}$$

dove () è l'irradianza media del luogo dove sarà situato l'impianto. È evidente l'importanza di disporre del valore ottenibile da una sperimentazione ad hoc effettuata sul sistema per il quale si deve effettuare lo scale-up.

11.3 Stima Dei Costi

Per poter giungere ad una stima più precisa del costo di un impianto fotocatalitico, se non si hanno a disposizione i costi di installazione dei diversi fotoreattori per metro quadro di superficie, bisogna considerare tutte le voci di costo.

Per una stima dei costi bisogna distinguere in primo luogo tra i costi di investimento (C_{IN}) e costi di esercizio (C_E); i primi sono relativi all'investimento iniziale, alla costruzione del reattore e a tutti gli accessori e che vengono sostenuti una tantum all'inizio dell'attività; i secondi invece sono relativi al consumo di energia per il pompaggio del refluo, eventuali reagenti, catalizzatore, manutenzione, e si affrontano annualmente.

11.2.9 Scale-Up of the Photoreactor

After having identified the type of reactor (e.g. CPC), the total volume (V_{TOT}), the illuminated volume (V_{ir}), as well as the operating conditions (loading of catalyst, pH, etc...) and having performed an experimental solar test with a volume V_{TOT} at a determined time, starting with $c_{IN}=c_0$, it is possible to report the results as indicated in Figure 9, where:

$$Q_{j,n} = Q_{j,n-1} + t_n \quad \overline{UV} \ \frac{S_{CPC}}{V_{TOT}}$$

and S_{CPC} is the surface of the collector.

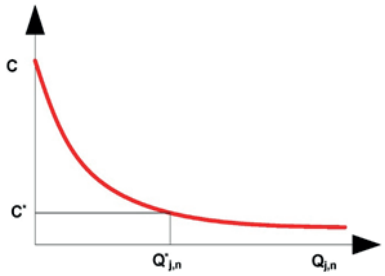


Figure 9. Contaminant concentration (C) vs Specific Energy (Qj,n)

In this way, fixing a value of removal to an acceptable level (C*), it is possible to obtain the specific energy to be supplied to the system () in a time t*. Considering the possibility of treating a solution with the same initial concentration of the same pollutant ($c_{IN}=c_0$), but with a volume $V'_{TOT}>>V_{TOT}$, in a time t, such that:

$$\frac{V'_T}{t} \gg \frac{V_T}{t^*}$$

if H_S are the hours of illumination during the time t (the lighting hours are a fraction of the actual time t), then the surface of the collector to be used is given by:

$$S_{CPC} = \frac{Q^*_{j,n} \quad V'_{TOT}}{H_s \quad \overline{UV}}$$

where () is the average irradiance of the place where the plant will be located.

11.3 Cost analysis

In order to reach a more accurate estimate of the cost of a photocatalytic plant, if the installation costs of the different photoreactors per square meter of surface are not available, it is necessary to consider the cost of all the items. To estimate the costs it is necessary, at first, to distinguish between the costs of investment (C_{IN}) and the operational costs (C_E).

The costs of the investment may be further divided as follows:

- **Facility costs**: the costs related to the construction of the reactor. They includes: foundations, connections to mains electricity and water, solar collectors, tanks, pipes, pumps and valves, structures and supports, control systems, instrumentation, units of separation of the catalyst;
- **Project contingency**: these are costs related to preliminary design, and generally ranges between

I costi principali che si devono affrontare sono:
- **Facility cost**: i costi relativi alla costruzione del reattore. I principali sono: fondazioni, collegamenti alla rete elettrica e alla acqua, collettori solari, serbatoi, tubazioni, pompe e valvole, strutture e supporti, sistemi di controllo, strumentazione, unità di separazione del catalizzatore.
- **Project contigency**: sono i costi legati alla progettazione di massima. Possono essere tra il 10 e il 20% dei facility cost; sommati ai facility cost consentono di calcolare il total facility cost (C_{TF}).
- **System enigneering and assembly**: questo include la progettazione definitiva, le procedure, il project managment, l'assemblamento, e il supporto agli operatori per la gestione dell'impianto. Questi costi (C_{EA}) sono stimati pari circa al 50% del total facility cost.
- **Spare parts**: sono circa lo 0.5% del total facility cost e sono relativi alla fornitura dei pezzi di ricambio (C_{SP}).

La somma di tutti questi costi consente di calcolare il costo di investimento:

$$C_{IN} = C_{TF} + C_{EA} + C_{SP} = 1.55\ C_{TF}$$

I costi di esercizio derivino dalla somma delle seguenti voci:
- **Personale**: i costi del personale dipendono linearmente dalla grandezza dell'impianto. Un impianto di 500 m² che lavora 24 ore al giorno per 7 giorni settimanali, completamente automatizzato, richiede 0.1 persone, per anno principalmente per la pulizia, mentre per un impianto non automatizzato questo valore sale a 0.25.
- **Costo di manutenzione**: sono relativi alle parti meccaniche, elettriche e si può stimare in circa il 2% del total facility cost.
- **Elettricità**: costi dovuti al consumo elettrico delle pompe e dei sistemi di controllo e delle varie strumentazioni. È difficile da stimare, dipende molto dalla superficie occupata dai reattori solari e dalla differenza di pressione assicurata dalle pompe. Per una stima, si può considerare accettabile un valore tra 40 e 80 kWh per m² di superficie solare istallata.
- **Reagenti chimici**: Dipende da caso a caso, dalla concentrazione di inquinante, dal tipo di catalizzatore utilizzato, dal carico di catalizzatore scelto. Va quindi valutato di volta in volta.

Il costo di esercizio va valutato caso per caso e dipende dal luogo in cui si trova l'impianto, in quanto è legato al costo del lavoro, dell'energia e degli eventuali reagenti chimici.
Per avere la somma dei costi (C_{IM}), il costo di installazione va annualizzato e viene, quindi, moltiplicato per il fattore di attualizzazione r, che dipende dalla vita utile dell'opera (per una vita utile di 20 anni può essere accettato 5%).

$$C_{IM} = C_{IN} * r + C_E$$

Una parte considerevole dei costi di investimento sono per l'area di sviluppo del reattore.
Per una stima generale dei costi bisogna in primo luogo stimare la grandezza dell'impianto, ovvero la superficie dei collettori (Galvez and Malato, 2003). Un metodo per determinare l'area di un impianto di fotocatalisi è stato presentato nel paragrafo precedente.

10 to 20% of facility cost. Added to the facility cost allow to calculate the total facility cost (C_{TF});
- **System engineering and assembly**: this includes the final design, the procedures, the project management, the assembly, and the support to operators for the management of the system. These costs (C_{EA}) are estimated to be approximately 50% of the total facility cost;
- **Spare parts**: are about 0.5% of the total facility cost and are related to the supply of spare parts (C_{SP}).

The cost of the investment, therefore, results:

$$C_{IN} = C_{TF} + C_{EA} + C_{SP} = 1.55\ C_{TF}$$

Operational costs derive from the sum of the following items:
- **Personnel**: the personnel costs depend linearly on the size of the plant. A plant of 500 m² which works 24 hours a day, 7 days weekly, fully automated, requires 0.1 people per year mainly for cleaning, while for an installation not automated, this value rises to 0.25;
- **Maintenance cost**: are related to the mechanical, electrical and can be estimated as about 2% of the total facility cost;
- **Electricity**: costs due to the electrical consumption of the pumps and control systems and of the various instruments. These costs are difficult to predict, depends mainly on the surface area occupied by the solar reactors and by the pressure supplied by the pumps. For an estimate, it can be considered acceptable a value between 40 and 80 kWh per m² of solar surface installed;
- **Chemical reagent**: these depend from case to case. These costs are affected by: the concentration of the pollutant, the type of catalyst used, the load of catalyst chosen.

The cost of exercise must be evaluated on a case-by-case basis and depends on the location in which the facility is placed, because it is related to the cost of labour, the cost of the energy and the cost of any chemical reagent. To get the sum of the costs (C_{IM}), the installation cost should be annualized and then multiplied by the discount factor r, which depends on the useful life of the plant (for a useful life of 20 years can be accepted 5%):

$$C_{IM} = C_{IN} * r + C_E$$

A general estimate of the costs can be obtained by estimating the only cost the surface area of the collectors (Galvez and Malato, 2003). A method for determining the area of a system of photocatalysis has been presented in the previous paragraph.

Conclusioni

L'applicazione del processo di *soil washing* può essere una valida alternativa alle tecniche di biorisamento nel caso che queste non sono applicabili per l'eccessiva presenza di contaminanti che inibiscono i processi biologici o per la necessità di tempi troppo lunghi. Tuttavia il lavaggio chimico ha come punto chiave la separazione della frazione fine del terreno (ritenuta maggiormente contaminata) da quella più grossolana, consentendo in tal modo di diminuire la volumetria di suolo da trattare; è d'uopo, quindi, evidenziare che nel caso di suoli con elevata frazione fine tale tecnica potrebbe non essere conveniente applicarla. Pertanto, oltre ad una corretta valutazione delle caratteristiche chimico fisiche, è opportuno possedere una definizione precisa dei volumi contaminati da trattare come già descritto nel cap. 5 del presente manuale. Inoltre, preliminarmente all'impiego della tecnica di *soil washing*, altra opportuna attenzione va data agli additivi chimici da impiegare, poichè una loro elevata quantità potrebbe determinare un eccessivo aumento dei costi. Una corretta analisi dei costi deve tenere in conto anche la quota ascrivibile al ciclo di trattamento delle acque, che, sebbene possono essere depurate con tecniche che prevedono lo sfruttamento dell'energia solare, non è trascurabile.

Bibliografia

Bertelle, A., Beretta, G.P., 2009. Prezzario delle bonifiche.

Blake, D.M., Magrini-Bair, K., Wolfrum, E., May, E.K., 1997. Materials issues in solar detoxification of air and water, in: Optical Science, Engineering and Instrumentation'97. International Society for Optics and Photonics, pp. 154–162.

Chen, L., Liu, T., Ma, C., 2010. Metal Complexation and Biodegradation of EDTA and S,S-EDDS: A Density Functional Theory Study. J. Phys. Chem. A 114, 443–454. doi:10.1021/jp904296m

Dijkstra, M.F.J., Buwalda, H., De Jong, A.W.F., Michorius, A., Winkelman, J.G.M., Beenackers, A., 2001. Experimental comparison of three reactor designs for photocatalytic water purification. Chem. Eng. Sci. 56, 547–555.

Galvez, J.B., Malato, S.R., 2003. Solar detoxification.

Hauser, L., Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B., 2005. Column extraction of heavy metals from soils using the biodegradable chelating agent EDDS. Environ. Sci. Technol. 39, 6819–6824.

Hoffmann, M.R., Martin, S.T., Choi, W., Bahnemann, D.W., 1995. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. Chem. Rev. 95, 69–96.

Jaworska, J.S., Schowanek, D., Feijtel, T.C.J., 1999. Environmental risk assessment for trisodium [S, S]-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applications. Chemosphere 38, 3597–3625.

Jorgensen, G.J., Govindarajan, R., 1991. Ultraviolet reflector materials for solar detoxification of hazardous waste, in: San Diego,'91, San Diego, CA. International

Conclusions

Soil washing application may be a valid alternative to the techniques of bioremediation in the event that these are not applicable due to the excessive presence of contaminants, which inhibit the biological processes. The technique is based on the separation of the fine fractions of the soil (thought to be most contaminated) from the more coarse, thereby enabling to decrease the volume of soil to be treated; therefore it is important to highlight that this technique may not be convenient in the case of soils with a high proportion of fine fraction. For a correct evaluation of the process applicability it is appropriate to have a precise estimate of the volumes of the contaminated soil, as already described in chap. 5 of this manual. Moreover before applying the process, a proper cost analysis must be done, taking into account also the expenses related to the treatment of the produced wastewater. To contain this latter it can be used a system able to exploit the solar energy.

References

Bertelle, A., Beretta, G.P., 2009. Prezzario delle bonifiche.

Blake, D.M., Magrini-Bair, K., Wolfrum, E., May, E.K., 1997. Materials issues in solar detoxification of air and water, in: Optical Science, Engineering and Instrumentation'97. International Society for Optics and Photonics, pp. 154–162.

Chen, L., Liu, T., Ma, C., 2010. Metal Complexation and Biodegradation of EDTA and S,S-EDDS: A Density Functional Theory Study. J. Phys. Chem. A 114, 443–454. doi:10.1021/jp904296m

Dijkstra, M.F.J., Buwalda, H., De Jong, A.W.F., Michorius, A., Winkelman, J.G.M., Beenackers, A., 2001. Experimental comparison of three reactor designs for photocatalytic water purification. Chem. Eng. Sci. 56, 547–555.

Galvez, J.B., Malato, S.R., 2003. Solar detoxification.

Hauser, L., Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B., 2005. Column extraction of heavy metals from soils using the biodegradable chelating agent EDDS. Environ. Sci. Technol. 39, 6819–6824.

Hoffmann, M.R., Martin, S.T., Choi, W., Bahnemann, D.W., 1995. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. Chem. Rev. 95, 69–96.

Jaworska, J.S., Schowanek, D., Feijtel, T.C.J., 1999. Environmental risk assessment for trisodium [S, S]-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applications. Chemosphere 38, 3597–3625.

Jorgensen, G.J., Govindarajan, R., 1991. Ultraviolet reflector materials for solar detoxification of hazardous waste, in: San Diego,'91, San Diego, CA. International Society for Optics and Photonics, pp. 194–205.

Litter, M.I., 1999. Heterogeneous photocatalysis: transition metal ions in photocatalytic systems. Appl.

Society for Optics and Photonics, pp. 194–205.

Litter, M.I., 1999. Heterogeneous photocatalysis: transition metal ions in photocatalytic systems. Appl. Catal. B Environ. 23, 89–114.

Liu, B., Song, M., 2010. Temperature effect on the photocatalytic degradation of methyl orange under UV-vis light irradiation. J. Wuhan Univ. Technol. Sci. Ed. 25, 210–213.

Mann, M.J., 1999. Full-scale and pilot-scale soil washing. J. Hazard. Mater. 66, 119–136.

Oller, I., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M.I., Pérez-Estrada, L., Gernjak, W., Pulgarín, C., Passarinho, P.C., Malato, S., 2007. Solar heterogeneous and homogeneous photocatalysis as a pre-treatment option for biotreatment. Res. Chem. Intermed. 33, 407–420.

Peters, R.W., 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. J. Hazard. Mater. 66, 151–210. doi:10.1016/S0304-3894(99)00010-2

Prieto-Rodriguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Puma, G.L., Malato, S., 2012. Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO 2 concentrations. J. Hazard. Mater. 211, 131–137.

Ryu, J., Choi, W., 2007. Substrate-specific photocatalytic activities of TiO2 and multiactivity test for water treatment application. Environ. Sci. Technol. 42, 294–300.

Schowanek, D., Feijtel, T.C.J., Perkins, C.M., Hartman, F.A., Federle, T.W., Larson, R.J., 1997. Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of Ethylene Diamine Disuccinic Acid (EDDS), a transition metal chelator. Chemosphere 34, 2375–2391. doi:10.1016/S0045-6535(97)00082-9

Spasiano, D., Rodriguez, L. del P.P., Olleros, J.C., Malato, S., Marotta, R., Andreozzi, R., 2013. TiO 2/Cu (II) photocatalytic production of benzaldehyde from benzyl alcohol in solar pilot plant reactor. Appl. Catal. B Environ. 136, 56–63.

Zhang, W., Tsang, D.C.W., Lo, I.M.C., 2008. Removal of Pb by EDTA-washing in the presence of hydrophobic organic contaminants or anionic surfactant. J. Hazard. Mater. 155, 433–9. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.11.084

Catal. B Environ. 23, 89–114.

Liu, B., Song, M., 2010. Temperature effect on the photocatalytic degradation of methyl orange under UV-vis light irradiation. J. Wuhan Univ. Technol. Sci. Ed. 25, 210–213.

Mann, M.J., 1999. Full-scale and pilot-scale soil washing. J. Hazard. Mater. 66, 119–136.

Oller, I., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M.I., Pérez-Estrada, L., Gernjak, W., Pulgarín, C., Passarinho, P.C., Malato, S., 2007. Solar heterogeneous and homogeneous photocatalysis as a pre-treatment option for biotreatment. Res. Chem. Intermed. 33, 407–420.

Peters, R.W., 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. J. Hazard. Mater. 66, 151–210. doi:10.1016/S0304-3894(99)00010-2

Prieto-Rodriguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Puma, G.L., Malato, S., 2012. Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO 2 concentrations. J. Hazard. Mater. 211, 131–137.

Ryu, J., Choi, W., 2007. Substrate-specific photocatalytic activities of TiO2 and multiactivity test for water treatment application. Environ. Sci. Technol. 42, 294–300.

Schowanek, D., Feijtel, T.C.J., Perkins, C.M., Hartman, F.A., Federle, T.W., Larson, R.J., 1997. Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of Ethylene Diamine Disuccinic Acid (EDDS), a transition metal chelator. Chemosphere 34, 2375–2391. doi:10.1016/S0045-6535(97)00082-9

Spasiano, D., Rodriguez, L. del P.P., Olleros, J.C., Malato, S., Marotta, R., Andreozzi, R., 2013. TiO 2/Cu (II) photocatalytic production of benzaldehyde from benzyl alcohol in solar pilot plant reactor. Appl. Catal. B Environ. 136, 56–63.

Zhang, W., Tsang, D.C.W., Lo, I.M.C., 2008. Removal of Pb by EDTA-washing in the presence of hydrophobic organic contaminants or anionic surfactant. J. Hazard. Mater. 155, 433–9. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.11.084

12. Valorizzazione delle biomasse prodotte dagli impianti di phytoremediation

S.Pindozzi, P. Giudicianni, R. Ragucci, G. Ruoppolo, S. Faugno, D. Pirozzi

12.1 Introduzione

Il crescente interesse verso le filiere bioenergetiche e la ricerca di strategie che non entrino in competizione con la produzione di colture alimentari, ha aperto la strada all'individuazione di suoli marginali definiti dall'OCSE come suoli con ''basso potenziale agricolo e non idonei per propositi residenziali" per la produzione di colture cosiddette no-food. Tali suoli possono essere parzialmente contaminati da metalli pesanti derivanti da un uso scorretto del territorio ed essere depurati dall'azione estrattiva di biomasse specificamente selezionate. Per implementare correttamente la fitodepurazione è, tuttavia, necessario dotarsi di un piano di smaltimento sicuro del materiale prodotto dopo la raccolta, specie se contaminato. Alcuni studi riportano il compostaggio e la compattazione come possibili post-trattamenti, in quanto entrambi sono in grado di ridurre notevolmente il volume della biomassa raccolta. Tuttavia, l'elevata solubilità dei metalli pesanti nel percolato derivante da questi processi induce a valutare trattamenti alternativi per garantire una raccolta e uno smaltimento appropriato (Fig. 1). Inoltre, la fattibilità economica del processo di fitodepurazione potrebbe ancor più trarre vantaggio dalla valorizzazione dei residui vegetali prodotti qualora essi posseggano caratteristiche tali da consentirne l'inserimento in filiere bioenergetiche o di produzione di biomateriali (Kueppens et al. 2015; Vigil et al. 2016). In tal senso, la scelta delle biomasse utilizzate per la fitodepurazione, generalmente selezionate solo sulla base di criteri puramente agronomici e della loro attitudine ad estrarre metalli pesanti, va effettuata prendendo in considerazione anche la possibilità di un impiego dei residui finali in luogo di un loro smaltimento in discariche speciali. In questo capitolo sono state individuate due possibili linee di post-trattamento di biomasse utilizzate per la fitodepurazione sulla base dei risultati ottenuti dalla campagna sperimentale condotta su biomasse di riferimento cresciute su terreni marginali poco inquinati, su terreni e su biomasse appositamente coltivate su terreni oggetto di contaminazione da metalli pesanti (prevalentemente piombo, cadmio, rame e zinco). La descrizione dei processi proposti è accompagnata da una discussione che ne mette in luce i punti di forza e le eventuali criticità.

Inquadramento normativo

Da un punto di vista normativo le biomasse prodotte dagli impianti di bonifica o di messa in sicurezza di siti contaminati sono da considerarsi come un sottoprodotto (parte IV del D.Lgs. n. 152/06 art. 184 ter D.Lgs. 152/06), che può quindi essere reimpiegato in un ulteriore processo produttivo. Non c'è pertanto una limitazione del loro impiego ad eccezione della digestione anaerobica (Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 Febbraio 2016 -Decreto effluenti), rientrando pienamente nella definizione di biomassa del D. Lgs 387/2003 modificato dal

12. Exploitation of biomass produced from soil phytoremediation

S.Pindozzi, P. Giudicianni, R. Ragucci, G. Ruoppolo, S. Faugno, D. Pirozzi

12.1 Introduction

The growing interest in the bio-based energy chain together with urgency of avoiding land competition for food production, make so-called "marginal lands", defined by the OECD as "land of poor quality with regard to agricultural use, and unsuitable for housing and other uses" (https://stats.oecd.org/glossary) suitable for cultivating energy crops. If these areas are also contaminated by potentially toxic elements (PTEs), caused by illegal spills or dumping, specifically selected biomass could be used for phytoremediation purposes. Nevertheless, the safe disposal of contaminated biomass to avoid subsequent risks for both health and environment appears fundamental.

Biomass composting and compaction have been reported as possible pre- or post-treatment steps, thanks to their capability in reducing volumes of the harvested biomass (Sas-Nowosielska et al., 2004). However, high solubility of high metals in the leachate, deriving from such processes, suggest the need to search for possible alternatives in order to ensure appropriate harvest and disposal. In addition, the economic feasibility of the phytoremediation process could benefit even more from the enhancement of plant by-products if they can be inserted in the bioenergy or biomaterial production chain (Kueppens et al., 2015; Vigil et al., 2016). Further, when choosing species to be considered for phytoremediation, generally selected to match agronomic criteria and their ability to extract heavy metals, account should also be taken of the actual possibility of reusing their residues instead of sending them to of special landfill sites.

In this chapter three possible post-treatments were identified based on the results obtained from the experimental trials. Biomass grown on scarcely polluted marginal land or on heavy metal contaminated soils (mainly lead, cadmium, copper and zinc) were used as reference. The description of the proposed processes is accompanied by a discussion that highlights the strengths and possible weaknesses.

Regulatory framework

From a regulatory point of view biomass produced for land restoration or rendering contaminated sites safe should be considered a by-product (Part IV of Legislative Decree. No. 152/06 Art. 184b), which means that it can then be reused in a further production process. Therefore, with the exception of biomass used for the anaerobic digestion process (Inter-ministerial Decree no. 5046 of 25 February 2016), there is no limitation for the use of this type of biomass, as it falls entirely within the definition of biomass of Legislative Decree 387/2003, modified by Legislative Decree 28/2011 "Implementation of Directive No. 2009/28/EC promoting the use of renewable energy sources, amending and subsequently repealing Directives No. 2001/77/EC and No. 2003/30/

D. Lgs 28/2011 "Attuazione della direttiva 2009/28/CE sulla promozione dell'uso dell'energia da fonti rinnovabili, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive 2001/77/CE e 2003/30/CE". All'articolo 2 lett. e) si definisce biomassa "la frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali), dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, comprese la pesca e l'acquacoltura, gli sfalci e le potature provenienti dal verde pubblico e privato, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani".
La valorizzazione energetica è quindi una strada perseguibile specialmente nel caso in cui le biomasse siano state prodotte da un sito in cui la fitodepurazione sia stata utilizzata per la messa in sicurezza o quello in cui le biomasse tendano ad accumulare i metalli potenzialmente tossici soltanto nei rizomi lasciando pulite le restanti parti. Da questo non ne consegue l'accesso agli incentivi nazionali che sono regolati dall'allegato 2 punto 2 del D. Lgs 28/2011. In tale allegato è specificato che, perché sia possibile avere accesso agli incentivi, è necessario il rispetto dei requisiti e specifiche tecniche degli impianti alimentati da fonti rinnovabili secondo quanto riportato: "Per le biomasse utilizzate in forma di pellet o cippato ai fini dell'accesso agli incentivi statali, [...], è richiesta la conformità alle classi di qualità A1 e A2: per il pellet, indicate nelle norme UNI EN 14961-2 (oggi sostituita dalla UNI EN ISO 17225-2:2014 Definizione delle classi di pellet di legno); per il cippato, indicate nelle norme UNI EN 14961- 4 (oggi sostituita dalla UNI EN ISO 17225-4:2014 Definizione delle classi di cippato di legno) ". In quest'ultimo caso è comunque esclusa dalla classe A la classe 1.1.1.3 "ceduo a turnazione breve qualora (…) la piantagione sia stata espressamente usata per sequestrare sostanze chimiche (…)".

12.2 Tipologie di processi di conversione

Nell'ambito dei processi di trattamento termochimico delle biomasse sono state individuate due possibili linee di post-trattamento delle biomasse residuali provenienti dai siti contaminati, una relativa alla produzione di biomateriali (Biochar), l'altra alla produzione di biocombustibile (Gas o Biodiesel) (Fig.1).

EC". For the purpose of this Directive 'biomass' shall mean the "biodegradable fraction of products, waste and residues from biological origin from agriculture (including plant and animal substances), forestry and related industries including fisheries and aquaculture, as well as the biodegradable fraction of industrial and municipal waste". Consequently, energy recovery is possible especially in the case in which biomass has been produced from abandoned sites (to prevent further degradation) or that in which potentially toxic metals are accumulated only in the rhizomes of plants. It is worth stressing that energy recovery does not mean access to national incentives that are set out in Annex 2 point 2 of Legislative Decree 28/2011. As reported, to have access to national incentives, the requirements introduced by UNI EN ISO 17225-2:2014 (Solid biofuels -- Fuel specifications and classes -- Part 2: Graded wood pellets) and by ISO 17225-4:2014 (Solid biofuels -- Fuel specifications and classes -- Part 4: Graded wood chips) have to be respected. Woodchips from biomass cultivated for phytoremediation purposes remain excluded from access to incentives in any case.

12.2 Thermochemical conversion of contaminated biomass

Two type of post-treatment for contaminated biomass were selected, one for the biomaterial (biochar) production and the other for biofuel (gas or biodiesel) production (Fig.1).
In the first case, pyrolysis is configured as a potential process aimed at reducing mass and volume of contaminated biomass. The process increases biomass biochemical stability, transforming it into solid residue where the heavy metals, reduced in mobility, are concentrated, and the vapour phase with very small content of heavy metals usable as bio-fuel. Pyrolysis can be an effective eco-friendly process for the treatment of contaminated biomass: on the one hand, it concentrates heavy metals in a solid fraction (char) with reduced volume and low weight and, on the other, it produces a clean gas phase that can be exploited for energy applications (Stals et al., 2010; Lievens et al., 2008). The stability of potentially toxic metals (PTMs) and physico-chemical properties of the char product are of significant importance to assess

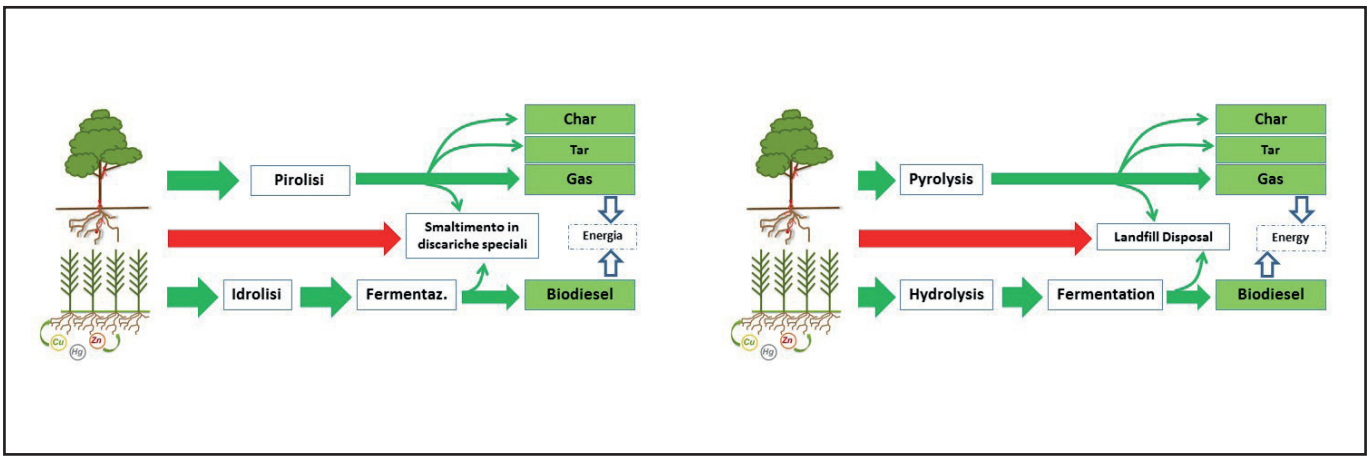


Fig. 1: Possibili processi di trattamento delle biomasse utilizzate nella fitodepurazione.

Figure 1. Possible biomass post-treatment processes to be used after phytoremediation.

Nel primo caso **la pirolisi** si configura come un potenziale processo utilizzabile con lo scopo di ridurre la massa e il volume della biomassa contaminata, aumentarne la stabilità biochimica attraverso la trasformazione in un residuo solido in cui i metalli pesanti, a ridotta mobilità, vengono concentrati e in una fase vapore con limitato contenuto (o totalmente priva) di metalli pesanti utilizzabile come bio-combustibile.
La stabilità dei Metalli Potenzialmente Tossici (MPT) e le proprietà fisico-chimiche del char prodotto sono di rilevante importanza per valutare se possa essere successivamente convertito in una risorsa preziosa. Evidenze di letteratura indicano che utilizzando l'azoto come agente pirolizzante venga influenzato sia il comportamento del MPT durante il trattamento termico sia la successiva biodisponibilità di PTE nel char a seconda della composizione delle biomasse in ingresso. Tuttavia è dimostrato che al fine di sviluppare alti livelli di porosità del char, fondamentale per il suo reimpiego in molte applicazioni, sia preferibile utilizzare il vapore al posto dell'azoto.
Allo stesso tempo, è stato dimostrato che il vapore induce modifiche nel meccanismo di devolatilizzazione della matrice organica (Minkova et al., 2001).
Qualora la biomassa risulti contaminata solo nelle sue parti ipogee, accanto alla pirolisi è possibile individuare nella **gassificazione**, un processo interessante per la produzione di un biocombustibile gassoso utilizzando come feedstock le parti aeree prive di contaminazione. Va sottolineato che la gassificazione può essere adoperata anche in presenza di contaminazione. Tuttavia, in questo caso va posta particolare attenzione alla pulizia del gas in uscita dal processo che potrebbe contenere concentrazioni non trascurabili di metalli pesanti date le temperature in gioco maggiori rispetto a quelle tipiche di un processo pirolitico.
La produzione di biodiesel di seconda generazione, basata sull'**idrolisi** e la **successiva fermentazione** delle biomasse lignocellulosiche, rappresenta un'utile alternativa alla pirolisi per lo smaltimento delle biomasse residue da phytoremediation, in quanto offre i seguenti vantaggi (Pirozzi et al., 2010 e 2015):

- consente, come la pirolisi, di concentrare i metalli pesanti in una frazione solida di volume ridotto, rappresentata dalla frazione non oleaginosa della biomassa fermentata;
- consente il recupero energetico del residuo attraverso la produzione di biocombustibile (biodiesel di seconda generazione)
- consente, in alternativa alla produzione di biodiesel, di utilizzare gli oli microbici (prodotto intermedio nella sintesi del biodiesel) per la produzione di altri prodotti green, come le bioplastiche.

Pirolisi e fermentazione possono essere anche eseguite in sequenza. E' infatti possibile realizzare la fermentazione dei bio-oli ottenuti dalla pirolisi (Jarboe et al., 2011), aumentando l'efficienza del recupero energetico delle biomasse.
Appare evidente come la caratterizzazione chimica delle biomasse provenienti dai siti contaminati costituisca

whether it can be subsequently converted into a valuable resource. Evidence in the literature indicates that using nitrogen as a pyrolyzing agent, the behaviour of both PTMs during the heat treatment and the subsequent bioavailability of PTEs in the char is influenced depending on feedstock characteristics. However, it is shown that in order to develop high levels of porosity of the char, fundamental for its re-use in many applications, it is preferable to use steam instead of nitrogen. At the same time, it has been shown that the vapour induces changes in the devolatilizing mechanism of the organic matrix.
In the case of biomass contamination in only its underground parts, together with pyrolysis it is possible to adopt the gasification process. The latter represents an interesting process for the production of a gaseous biofuel, using only the non-contaminated aerial parts as feedstock. It should be stressed that gasification can also be implemented in the presence of contamination. However, in this case particular attention should go to ensure clean process emissions which might contain non-negligible concentrations of heavy metals, caused by higher temperatures than those typical of a pyrolytic process.
The production of II generation biodiesel, based on hydrolysis and the subsequent fermentation of lignocellulosic biomass, offers a useful alternative to pyrolysis for the exploitation of biomass obtained from soil phytoremediatrion. Indeed, the production of II generation biodiesel offers some significant advantages (Pirozzi et al., 2010 and 2015):

- it allows, like pyrolysis, heavy metals to be concentrated in a reduced volume fraction, i.e. the non-oleaginous fraction of the fermented biomass;
- it promotes energy recovery from biomass and the simultaneous production of a biofuel (II generation biodiesel)
- in addition, the microbial oils (intermediate product of biodiesel synthesis) can be used as feedstock for the production of alternative green materials, e.g. bioplastics.

Fermentation can also be carried out in series, using the bio-oils obtained by pyrolysis as feedstock for fermentation (Jarboe et al., 2011), thus improving the efficiency of energy recovery from waste biomass.
In conclusion, it can be said that the chemical analysis and characterization of biomass obtained from polluted soils is of critical importance to define the sequence of treatments to be adopted.

un'attività preliminare di grande importanza al fine di individuare la linea di trattamento più idonea verso cui indirizzare tali biomasse. Inoltre, la conoscenza di alcune caratteristiche della biomassa è fondamentale al fine di stabilire le condizioni operative del processo di post-trattamento scelto.

12.2.1 Caratterizzazione chimica delle biomasse

La caratterizzazione chimica delle biomasse è importante per valutarne sia le caratteristiche energetiche sia le possibili fonti di inquinamento legate al processo di trasformazione a cui si intende sottoporle. Nel caso di biomasse coltivate su suoli contaminati è importante eseguire, oltre all'analisi elementare e all'analisi immediata, anche una caratterizzazione della frazione inorganica al fine di determinare il contenuto di metalli pesanti. Ogni analisi di caratterizzazione della biomassa va eseguita in conformità con la normativa italiana ed internazionale, secondo quanto riportato in Tabella 1.

L'analisi elementare permette di misurare il contenuto di carbonio (C), idrogeno (H) e azoto (N) della sostanza analizzata. L'ossigeno (O) viene valutato come complemento a 100 partendo dalla percentuale in peso su base secca degli altri elementi e delle ceneri ricavate attraverso l'analisi immediata. Va sottolineato che nel computo del contenuto di H e O non vanno inclusi O e H derivanti dall'umidità della biomassa. L'analisi elementale consente di ottenere importanti informazioni riguardanti sia gli aspetti energetici (potere calorifico) che di impatto ambientale (formazione di inquinanti) di un possibile impiego diretto o indiretto di tali residui in processi termochimici di trasformazione. Per quanto riguarda la valutazione del potere calorifico, sebbene esista una misura diretta dello stesso (UNI 9017), sono disponibili, nella letteratura scientifica, numerose correlazioni (Channiwala e Parikh, 2002) che consentono di calcolare con un elevato grado di accuratezza il potere calorifico sulla base del contenuto di C, H, O, N e S. In particolare un elevato contenuto di C e H e un basso contenuto di O corrispondono ad un elevato potere calorifico, mentre il contenuto di S, N e Cl e fornisce informazioni utili sulla possibile formazione di precursori di inquinanti come ossidi di zolfo e azoto e composti clorurati. Tipicamente, il contenuto di carbonio in una biomassa varia tra il 42 e il 54%, l'ossigeno tra il 35 e il 45% (Demirbas, 2005). La quantità di azoto può raggiungere il 2% ed è maggiore nelle biomasse non legnose, mentre minore è il contenu-

12.2.1 Feedstock characterization

Chemical characterization of biomass is important to assess both energy characteristics and potential pollution risk once it is introduced into the transformation process. In addition to the classical ultimate and proximate analysis, in the case of biomass suspected of contamination it is important to determine the content of heavy metals by analyzing the inorganic fraction too. Each analysis for biomass characterization is performed in accordance with Italian and international regulations, as reported in Table 1.

Ultimate analysis allows measurement of carbon (C), hydrogen (H) and nitrogen (N) content for the analyzed substance. Oxygen (O) is evaluated as complement to 100 starting from the percentage by weight on a dry basis of the other elements summed with ash found by proximate analysis. It should be noted that in the calculation of H and O contents O H arising from moisture biomass should not be included. The ultimate analysis allows important information to be obtained about both aspects of energy (heat value) and environmental impact (pollutant formation) of a possible direct or indirect use of such residues in thermochemical conversion processes. Although a direct measure of heat value is reported (UNI 9017), it was calculated on the basis of C, H, O, N and S content, with a high degree of accuracy, according to the correlations proposed in the literature (Channiwala and Parikh, 2002). In particular, a high C and H content together with low O content correspond to a high heat value, while the content of S, N and Cl provides useful information on the possible formation of pollutant precursors such as sulphur oxides and nitrogen and chlorine compounds. Typically, the carbon content in biomass ranges from 42% to 54%, while oxygen ranges from 35% to 45%. The amount of nitrogen can reach 2% and is greater in non-woody biomass, while the sulphur content is lower than 0.5% (Demirbas, 2005).

Proximate analysis allows assessment of moisture content, ashes, volatile matter and fixed carbon. Moisture is a parameter needing attention when feedstock is subjected to thermochemical treatments. Indeed, thermochemical processes impose an upper limit for biomass moisture content that may require drying pretreatment. High moisture content has a negative effect on the energy efficiency of the whole process because of heat required for its evaporation, but also on the heat value of the biofuel liquid product in the case of pyrolysis. Moreover, in a gasification plant high water

Tab. 1: Normativa italiana ed internazionale per la caratterizzazione di biomasse.

Table 1. Italian and international rules for biomass characterization

Tipo di caratterizzazione / Characterization type	*Procedura standard / Standard procedure*
Analisi elementale (contenuto di C, H e N) / Ultimate analysis (C, H and N content)	ASTM D-5373
Analisi immediata (contenuto di umidità, volatili e ceneri) / Proximate analysis (moisture content, volatiles and ashes)	CENT/TS 14774-1,2,3; CENT/TS 14775; NI 9903-8
Contenuto di S / S content	CEN/TS 15289
Contenuto di Cl / Cl content	CEN/TS 15289
Analisi dei metalli / Heavy metals	US-EPA 3051 e 3052

to di zolfo che si mantiene inferiore a 0.5% (Demirbas, 2005).
L'analisi immediata permette di caratterizzare la biomassa in termini di contenuto di umidità, di ceneri, di sostanze volatili e di carbonio fisso. L'umidità è un parametro a cui si deve prestare particolare attenzione nel caso in cui la biomassa debba essere sottoposta a trattamenti termochimici in quanto essi impongono un limite superiore al suo contenuto in ingresso che potrebbe richiedere preventivi pretrattamenti di essiccazione. Un elevato contenuto di umidità incide negativamente sull'efficienza energetica dell'intero processo a causa del calore necessario alla sua evaporazione, ma anche, nel caso della pirolisi sul potere calorifico del biocombustibile liquido prodotto. Inoltre, in un impianto di gassificazione un elevato contenuto di acqua nella biomassa iniziale incide negativamente sulla temperatura di esercizio dell'impianto riducendo la produzione di gas e aumentando il suo contenuto di sostanze organiche ad alto peso molecolare (tar). La maggior parte degli impianti di gassificazione è progettata per operare in maniera efficiente con biomasse aventi un contenuto di umidità compreso fra il 15 e il 30%, sebbene esistano tecnologie (gassificatori a letto fisso in controcorrente) adatte ad operare con biomasse caratterizzate da un contenuto di umidità decisamente superiore (fino al 60% su base umida) (Schuster et al., 2001; Basu, 2010). Il contenuto di volatili dà indicazioni importanti per il processo di pirolisi veloce o flash finalizzato al recupero di combustibili liquidi fornisce indicazioni sulla resa di tali prodotti. Il contenuto di volatili è abbastanza variabile e si attesta attorno a valori compresi fra il 65 e l'88 % (Demirbas, 2005). Il contenuto di carbonio fisso da informazioni sulla velocità del processo di gassificazione in quanto ne costituisce lo stadio limitante ed è pertanto utilizzato per il dimensionamento del gassificatore (Basu, 2010). Nel processo di pirolisi finalizzato al recupero materico il contenuto di carbonio fisso dà indicazioni sulla resa del prodotto solido (char) in quanto esso è costituito appunto da carbonio fisso, ceneri e una frazione meno rilevante di volatili. Il suo contenuto è molto variabile ed è tipicamente compreso fra il 10 e il 29% (Demirbas, 2005).
La presenza di sostanze inorganiche, generalmente definite come ceneri, gioca un ruolo determinante nei processi termochimici. Il loro contenuto nelle biomasse è molto variabile e si attesta a valori inferiori al 2% per biomasse legnose, mentre per biomasse non legnose raggiunge valori sensibilmente più alti fino al 22 % (Demirbas, 2005). Le alte temperature raggiunte durante il processo di gassificazione determinano una parziale devolatilizzazione degli inorganici che si ritrovano successivamente come particolato negli effluenti gassosi in uscita dagli impianti di trattamento. Inoltre, in presenza di composti alcalini e alogeni, la formazione di sali bassofondenti causa problemi di agglomerazione, sporcamento e corrosione dell'impianto con conseguente riduzione dell'efficienza dello scambio termico (Mettanant et al., 2009). Nel caso di utilizzo della biomassa in un processo pirolitico per produzione di bio combustibili liquidi o il recupero di materiali solidi la presenza di composti alcalini e alcalino-terrosi nelle ceneri influisce sulla resa e

content in the initial feedstock negatively affects the plant operating temperature, reducing the production of gas and increasing the content of high molecular weight organic substances in the liquid fraction (tar). Most of the gasification plant is designed to operate efficiently using biomass with a moisture content ranging from 15 to 30%, although there are technologies (for example fixed-bed countercurrent gasifiers) adapted to work with feedstock with higher moisture content (up to 60% on a wet basis) (Schuster et al., 2001; Basu, 2010).
The volatile content gives important information about liquid fuel recovery from fast or flash pyrolysis process, as it provides indications on the yield of such products. The volatile content is quite variable and is around 65 and 88% (Demirbas, 2005). The fixed carbon content provides information on the gasification rate because it constitutes the limiting stage and is therefore used for gasifier sizing (Basu, 2010). For the pyrolysis process aimed at material recovery, the fixed carbon content provides indications on the solid product yield (char), as it consists of fixed carbon, ash, and a less sizeable fraction of volatile. Fixed carbon content is very variable, ranging typically from 10 to 29% (Demirbas, 2005).
High temperatures reached during the gasification process cause a partial devolatilization of inorganics that can be found as particulate matter in the gaseous effluents. In addition, in case of the presence of alkaline compounds and halogens, the formation of low-melting salts can occur, which is responsible for agglomeration problems, fouling and corrosion of the plant, reducing heat exchange efficiency (Mettanant et al., 2009). When biomass is fed into a pyrolytic process for bio liquid fuel production or matter recovery, the presence of alkali compounds and alkaline-earth metals in the ashes affects the yield and quality of process products. The inorganic species typically present in a biomass are mainly alkali metal salts (K, Na) and alkaline earth metals (Ca, Mg), silicon salts, iron and manganese and phosphates. Chemical characterization therefore provides useful information also about any operational issues that may arise during the thermochemical treatments. This is even more important if the biomass to be processed is grown on heavy-metal contaminated soil insofar as the presence of possible pollutants in the gaseous effluent of the gasification process may be inferred, and optimum operating conditions may be adopted during pyrolysis.
Specifically for the LIFE project, five biomasses were initially selected, matching agronomic criteria and documented phytoextraction capacity. Such biomass, namely *Populus nigra, Salix alba*, *Fraxinus* oxyphylla, *Eucalyptus occidentalis* and *Arundo donax*, was characterized (Giudicianni et al., 2017). Pre-drying of the harvested biomass on forced air ventilated racks in the field allowed moisture contents lower than 9.5 wt% to be reached, that is low enough to direct biomass towards pyrolysis or gasification. The biomass samples did not exhibit large variations in the ultimate and proximate analysis. The same applies to the heat value, ranging between 17.7 and 18.8 MJ/kg db. Of the characterized biomass, poplar is the one with highest heat value. Giant reed, a herbaceous species, has the lowest heat value due

sulla qualità dei prodotti di processo. Le specie inorganiche tipicamente presenti in una biomassa sono prevalentemente sali di metalli alcalini (K, Na) e alcalino terrosi (Ca, Mg), sali di silicio, ferro e manganese e fosfati. La caratterizzazione chimica fornisce pertanto informazioni utili anche sulle eventuali criticità operative che si possono presentare durante i trattamenti termochimici. Essa è importante qualora le biomasse da processare siano coltivate su terreni contaminati da metalli pesanti in quanto la conoscenza dei metalli presenti fornisce indicazioni sui possibili inquinanti presenti negli effluenti gassosi del processo di gassificazione e sulle condizioni operative ottimali nel processo di pirolisi.

Nel caso specifico del progetto LIFE, sono state selezionate inizialmente 5 biomasse sulla base di criteri agronomici e sulla documentata abilità di captazione di metalli pesanti dai terreni contaminati. Tali biomasse, nella fattispecie pioppo, salice, frassino, eucalipto e canna comune, sono state caratterizzate al fine di valutarne le proprietà sopra descritte (Giudicianni et al., 2017). L'essiccazione condotta in campo dopo la raccolta, ha consentito di raggiungere valori del contenuto di umidità inferiori al 9.5 % in peso sufficientemente bassi da poter indirizzare tali biomasse sia verso un processo di pirolisi che di gassificazione. Dal punto di vista energetico le biomasse considerate risultano abbastanza simili e presentano un potere calorifico compreso fra 17.7 e 18.8 MJ/kg su base secca. Fra le biomasse studiate, il pioppo rappresenta la specie energeticamente più interessante. La canna comune, biomassa di natura erbacea, presenta un potere calorifico minore a causa del maggior contenuto di ceneri che si attesta intorno al 6.5 % in peso su base secca. Il contenuto di zolfo è inferiore a 0.2 %, mentre per quanto riguarda l'azoto, solo per il salice è stato osservato un quantitativo (0.5-0.6%) rilevabile dallo strumento utilizzato per l'analisi. Trattandosi di biomasse provenienti da siti non contaminati, l'analisi della componente inorganica è stata limitata alla misura della concentrazione dei macroelementi tipicamente presenti nelle biomasse vegetali. Il potassio rappresenta il costituente principale delle ceneri di tutte le biomasse analizzate e in particolare in quelle erbacee dove raggiunge valori pari a ca. 1.2% in peso. Elevati quantitativi di fosforo e calcio suggeriscono la presenza di fosfati di calcio che dovrebbero corrispondere a limitati quantitativi di fosfati di metalli alcalini più inclini a dare problemi di agglomerazione in impianti di gassificazione a letto fluidizzato (Zevenhoven-Onderwater et al., 2001).

Tali biomasse sono state sottoposte ad un processo di pirolisi finalizzato alla valutazione delle proprietà del residuo solido in vista di una sua possibile applicazione. I risultati di tale studio riportati in Giudicianni et al. (2017) unitamente a considerazioni di natura agronomica hanno portato alla selezione di tre biomasse che sono state successivamente impiantate su terreni contaminati, raccolte e sottoposte a processi termochimici di post-trattamento finalizzati a recupero materico ed energetico:

1. Il pioppo (*Populus nigra* L.) è, tra i cedui a turnazione breve, la biomassa con più alta velocità di crescita con una produttività annua pari a ca. 18 Mg di sostanza secca per ettaro. Tale specie, pur non essendo una specie iper-ac-

to the higher ash content (around 6.5 wt%). For all the biomass selected, the sulphur content is less than 0.2%. Nitrogen was detected in small traces (0.5-0.6%) only for willow. For non-contaminated biomass, analysis of the inorganic component was limited to macro-elements typically reported in the literature. Potassium is the principal constituent of the ashes for all biomass analysed and especially in herbaceous biomass, where it reaches values of ca. 1.2 wt%. High levels of phosphorus and calcium suggest the presence of calcium phosphate which should correspond to limited quantities of alkali metal phosphates, which can give agglomeration problems in the fluidized bed gasifier (Zevenhoven-Onderwater et al., 2001).

After characterization, the biomass selected was subjected to a pyrolysis process aimed at studying the char properties in order to provide information concerning its possible application. The results of the study reported in Giudicianni et al. (2017) together with agronomic considerations led to the selection of three biomass species which were subsequently tested also on contaminated soils, collected and subjected to thermochemical processes of post-treatment for material and energy recovery:

1. Poplar (*Populus nigra*) is one of the fastest-growing trees for SRC with an annual dry matter (DM) production of 18 Mg ha^{-1} y^{-1}. Poplar trees, though not hyperaccumulators, are effective in taking up PTEs from a very deep layer due to the efficiency of their root systems (Bhargava et al., 2012). Moreover, among the species analysed, poplar has the highest energy potential (18.8 MJ/kg db) together with a low content of alkali metals.
2. Eucalyptus (*E. occidentalis*) was chosen because of its high DM yield (31.98 Mg/ha/year) and its uptake efficiency of nutrients and heavy metals.
3. Giant Reed (*Arundo donax*) was considered for phytoremediation, because it is a representative of the typical Mediterranean flora, and highly resistant to biotic and abiotic stresses. Its high productivity (DM yield 15-30 Mg/ha/year) has been found on marginal lands and in polluted soils.

Results of proximate and ultimate analysis of the above biomass grown on contaminated are the same as those of similar biomass types grown on non-contaminated soil. The presence of alkali metals could create problems of low-melting salt formation responsible for agglomeration. This issue may be particularly critical in the case of gasification *of Arundo donax,* which has an extremely high potassium content. However, it is worth stressing that the content of alkali metals should always be assessed in relation to the calcium phosphate content which leads to an increase in the ash melting temperature. A further indication could come if leaves and trunk are considered separately for poplar, whereas in the case of giant reed if roots, stalks and leaves are examined. In the case of poplar all inorganic species are present in higher concentrations in the leaves rather than in the trunk. In the case of *Arundo donax* inorganic compounds are concentrated in the rhizomes, followed by leaves and stalks, with the exception of potassium present in greater

cumulatrice ha mostrato un'elevata efficienza nell'assorbimento di Metalli Potenzialmente Tossici (MPT) dagli strati più profondi del terreno grazie all'efficienza del suo apparato radicale. Inoltre, tra le specie analizzate, essa risulta essere, insieme alla robinia, quella a più alto potenziale energetico (18.9 MJ/kg su base secca) con un ridotto contenuto di metalli alcalini.
2. L'eucalipto (*Eucalyptus occidentalis*) è stato scelto per la sua elevata resa (31.98 Mg di sistanza secca per anno per ettaro) ed efficienza di assorbimento di metalli pesanti.
3. La canna comune (*Arundo donax*) è stata selezionata in quanto rappresentativa della tipica flora Mediterranea. Inoltre, la sua elevata resistenza agli stress biotici e abiotici non richiede l'utilizzo di input agronomici in fase di crescita e consente di ottenere elevate rese (15-30 Mg di sostanza secca per anno per ettaro) anche su suoli marginali o contaminati.
I risultati della caratterizzazione chimica delle suddette biomasse coltivate su suoli contaminati hanno confermato i risultati precedentemente ottenuti sulla stessa tipologia di biomasse coltivate su terreni non contaminati. La presenza di metalli alcalini potrebbe creare problemi di formazione di sali bassofondenti responsabili di agglomerazione. Questo problema potrebbe risultare particolarmente critico nel caso di gassificazione della canna che presenta un contenuto di potassio estremamente elevato. Tuttavia, si ricorda che il contenuto di metalli alcalini va sempre valutato in relazione al contenuto di fosfati di calcio che determinano un aumento della temperatura di fusione delle ceneri. Un'ulteriore indicazione proviene dalla suddivisione del pioppo in foglie e tronco e della canna in radici, culmi e foglie. Tutte le specie inorganiche sono presenti in concentrazione maggiore nelle foglie piuttosto che nel tronco nel caso del pioppo. Nel caso della canna gli inorganici presentano una concentrazione maggiore nei rizomi, seguiti dalle foglie e dai culmi, ad eccezione del potassio presente in quantità maggiore nelle foglie e comparabile nei culmi e nei rizomi.
Come già osservato nel caso delle corrispondenti biomasse non contaminate lo sfruttamento di tali biomasse per fini energetici richiede il monitoraggio di H_2S, HCN, COS e NH_3 negli effluenti gassosi in uscita dall'impianto di trasformazione per poter predisporre le adeguate misure di abbattimento.
L'impatto ambientale dei trattamenti termochimici di conversione delle biomasse coltivate su suoli contaminati è strettamente legato alla presenza di elementi contaminanti trasmigrati dal suolo alla pianta. Nel caso specifico del progetto LIFE, nelle biomasse è stata attestata la presenza di piombo (Pb) e cadmio (Cd) nel tronco di pioppo e, in aggiunta, di zinco (Zn) e rame (Cu), nelle foglie in concentrazione superiore a quella indicata dai limiti indicati nelle norme UNI EN ISO 17225 riguardanti i requisiti di varie tipologie di biocombustibili. Nella canna comune è stata invece rilevata una contaminazione da Pb, Zn e Cu la cui concentrazione, analogamente a quanto osservato per la maggior parte delle specie inorganiche, è maggiore nei rizomi.

quantities in the leaves with comparable value in culms and rhizomes.
As already observed in the case of uncontaminated biomass, exploitation of such biomass for energy purposes requires the monitoring of H_2S, HCN, COS and NH_3 in gaseous effluents in order to arrange effective abatement systems.
The environmental impact of thermochemical processes for contaminated biomass is closely related to the presence of contaminant elements eventually migrating from soil to plant. In the specific case of the LIFE project, the presence of lead (Pb) and cadmium (Cd) was detected in the poplar trunk whereas zinc (Zn) and copper (Cu) were found in poplar leaves with a higher concentration than the limits reported by the above-mentioned UNI EN ISO 17225 concerning biofuel characteristics. Contamination by Pb, Zn and Cu, especially in the rhizomes, was also detected in the case of *Arundo donax*.

Feedstock preparation
Prior to analysis, samples must be pretreated. After the harvesting phase, the first operation entailed field pre-drying. This phase avoids fermentation processes which would alter biomass properties. The harvested biomass was pre-dried on forced air ventilated racks operated directly in the field. The moisture content at harvest ranged between 57.3 and 53.7 wt%, whereas the moisture content after forced air ventilation was greatly lower ranging between 4.6 and 9.4 wt% (Civitarese et al., 2015; Giudicianni et al. 2017). In both cases, the moisture content was determined by drying the samples in a thermos-ventilated oven at a temperature of 105 °C until a constant weight was reached. All the pre-dried biomass samples were completely dried in an electric oven at 105 °C for 2 h to remove the residual moisture before the pyrolysis tests.
Pre-drying in the field is only implemented for samples intended for analytical characterization. The whole amount of harvested biomass is indeed stored along heaps placed directly on the floor. The heaps had the shape of a truncated pyramid, each with an average base of about 2 x 2m and 2 m high. Samples were collected only from the top of the heaps and then placed on forced air ventilated racks to avoid fermentation.

Preparazione dei campioni
Prima di analizzare i campioni la biomassa va necessariamente pretrattata. La prima operazione è il pre-essiccamento che segue la fase di raccolta in campo. Questa fase evita che si instaurino processi di fermentazione che altererebbero le caratteristiche delle biomasse. Il pre-essiccamento viene operato in campo in genere lasciando la biomassa a essiccarsi su delle griglie ventilate. A seguito di questa prima essiccazione la biomassa raggiunge un valore di umidità variabile tra il 4.6 e il 9.4 % del peso (Giudicianni et al. 2017), ovvero molto più bassa di quanto si rileva sul campione di biomassa appena raccolta ovvero circa 50% del peso (Civitarese et al., 2015). In entrambi i casi il contenuto di umidità si determina essiccando ulteriormente i campioni in un forno termoventilato ad una temperatura di 105 °C per 2 h in modo da rimuovere l'umidità residua.
La pre-essiccazione in campo su griglie ventilate viene attuata soltanto per i campioni destinati alla caratterizzazione analitica. Nel caso in cui la biomassa raccolta sia destinata ad una utilizzazione energetica si procede con una essiccazione in campo in culmi, con altezza massima di 2 metri, effettuando almeno un rivoltamento per evitare fenomeni fermentativi. Successivamente vengono raccolti dei campioni random dai cumuli per procedere alla caratterizzazione chimico-fisica.

12.2.2 La densificazione delle biomasse
Il processo di pellettizzazione è largamente utilizzato per molti tipi di biomassa e presenta l'indubbio vantaggio di disporre di un feedstock solido più maneggevole e pregiato rispetto alla biomassa di origine. Risulta, infatti, facilitato sia lo stoccaggio, sia l'alimentazione di molti impianti di conversione. Inoltre, questo pretrattamento consente di ottenere un notevole aumento del contenuto energetico su base volumetrica. Tuttavia bisogna tenere conto che la pellettizzazione induce un aumento della densità del letto presente in alcune tipologie di impianti di conversione incidendo notevolmente sul profilo termico all'interno del letto e quindi sulla temperatura reale di processo.
Nel caso specifico del processo di gassificazione a cui sono state sottoposte le biomasse utilizzate nell'ambito del progetto LIFE, è stato osservato che la biomassa fornita sotto forma di cippato non è idonea all'alimentazione diretta nel tipo di impianto utilizzato (gassificatore a letto fluidizzato). Infatti, la bassa densità energetica del materiale imporrebbe di alimentare elevati volumi di biomassa spesso non compatibili con le potenzialità delle tramogge di carico. In tali casi il materiale va preventivamente pellettizzato prima di essere alimentato all'impianto. I risultati dell'analisi elementare del materiale cippato e pellettizzato mostrano che non sussistono differenze rilevanti fra la biomassa tal quale e la biomassa pellettizzata su base massica, ad eccezione del contenuto di umidità. In linea teorica, la biomassa pellettizzata dovrebbe avere un ridotto contenuto di umidità dovuto all'evaporazione di acqua a causa dell'aumento di temperatura registrato durante il processo di pellettizzazione. Tuttavia, al fine di garantire una pellettizzazione efficiente, è necessaria

12.2.2 Biomass densification
The pelletization process is widely used for many types of biomass. Advantages consist in having a solid feedstock which is easier to handle and more valuable than non-pelletized biomass. Pellet storage is easier, as well as the feeding of many conversion plants. In addition, this pre-treatment allows a considerable increase in the energy content to be obtained on a volumetric basis. On the other hand, pelletization induces an increase in the density of bed used in some types of conversion plants, impacting greatly on the thermal profile inside the bed itself and then on the actual process temperature.
In the specific case of the gasification process adopted for the LIFE Ecoremed project, biomass supplied in the form of wood chips are not suitable, as the low-energy density of the material would require the feeding of high biomass volumes which are not always compatible with the maximum load capacity of the hoppers. The results of proximate analysis of chipped and pelletized material show that there are no significant differences between all parameters, with the exception of moisture content. In theory, pelletized biomass should have lower moisture content due to evaporation of water following the increase in temperature recorded during the pelletization process. However, in order to ensure efficient pelletization, the addition of water is required during the process, an operation which sometimes affects pellet moisture content.

12.3 Pyrolysis
Pyrolysis of biomass consists in a thermo-chemical decomposition process occurring in the absence of molecular oxygen that produces condensable compounds (known as bio-oil or pyrolysis liquid), gaseous species (mainly CO_2, CO, CH_4, H_2 and C_2) and a solid residue (known as char) that can be exploited for energy applications. Moreover, pyrolysis, as a mild thermal pretreatment, could improve the performance of bioenergy chains, when combustion and gasification technologies are applied, in order to convert biomasses with high moisture content into denser energy carriers.
When PTE-contaminated biomass is considered, combustion and gasification raise some environmental concerns due to the high temperatures typical of these processes, potentially leading to the devolatilization of the volatile fraction of PTEs. In such cases, pyrolysis can represent an environmentally sustainable strategy combining both the concentration of heavy metals in the char, thus reducing the volume and weight of contaminated matter with respect to the original biomass, and producing a gaseous phase with no or limited content of heavy metals (Stals et al., 2010; Lievens et al., 2008).
A review of the literature suggests many possibilities for exploiting char potential for diverse applications such as fuel in traditional and advanced power generation facilities, fertilizer and carbon sink, contaminant adsorbent in wastewater and soil, adsorbent or catalyst for gas cleaning, catalyst for syngas conversion to liquid hydrocarbons and biodiesel production, raw material for supercapacitors and filler in wood and polymer

l'aggiunta di acqua durante il processo e tale operazione incide talvolta sul contenuto di umidità del pellet.

12.3 La pirolisi

Il processo di pirolisi consiste nella degradazione termica della biomassa in assenza di agenti ossidanti. L'azione del calore determina la devolatilizzazione di composti condensabili ossigenati (liquidi di pirolisi o bio-oli) e gas permanenti (principalmente CO_2, CO, CH_4, H_2 e C_2). In assenza di un agente ossidante il processo lascia un residuo solido carbonioso detto char. I tre prodotti della pirolisi, gas, liquido e char, trovano applicazione come combustibili o, nel caso del liquido e del char, come materia prima per la produzione di chemicals o materiali. In particolare studi di letteratura mostrano come il char possa essere efficientemente utilizzato per diverse applicazioni come combustibile in impianti di potenza, come fertilizzante e mezzo di stoccaggio di carbonio nel terreno, come adsorbente di specie contaminanti in acque di scarico e suoli contaminati, come adsorbente o catalizzatore nei trattamenti di pulizia di gas esausti da impianti di trattamento termochimico, catalizzatore per la conversione di gas di sintesi a idrocarburi liquidi e per la produzione di biodiesel, come materia prima per la sintesi di supercapacitori and filler nella sintesi di materiali compositi.

La pirolisi oltre ad essere considerata come un processo a se stante, costituisce, dopo l'essiccazione, il secondo stadio dei processi di gassificazione e combustione. Sebbene in questi processi la pirolisi avvenga in intervalli di tempo molto brevi e a temperature molto elevate è noto quanto questa fase possa globalmente influenzare il processo successivo. In particolare le caratteristiche chimico fisiche del char danno indicazioni sulla reattività dello stesso in condizioni di gassificazione, mentre la resa di volatili e la loro natura chimica fornisce indicazioni sulla formazione dei tar durante la gassificazione.

La pirolisi può rappresentare un efficace processo eco-sostenibile per il trattamento delle biomasse contaminate, in quanto permetterebbe, operando nelle opportune condizioni termiche, di concentrare i MPT nel char, riducendo sia il volume che il peso della biomassa inizialmente contaminata. Allo stesso tempo consentirebbe di produrre una fase vapore con limitate concentrazioni di MPT (liquidi di pirolisi e gas permenenti) a sua volta riutilizzabile come biocombustibile.

La distribuzione dei prodotti della pirolisi dipende, oltre che dal tipo di biomassa, dalle condizione operative con cui il processo viene condotto. Inoltre, nel caso di biomasse utilizzate per processi di fitoestrazione, la stabilità dei Metalli Potenzialmente Tossici (MPT) e le proprietà fisico-chimiche del char prodotto sono di rilevante importanza per valutare una possibile valorizzazione dello stesso. Anche in questo caso, evidenze di letteratura indicano che le condizioni operative del processo pirolitico influenzano sia il comportamento degli MPT durante il trattamento termico sia la loro stabilità nel char.

I parametri operativi principali che influenzano un processo di pirolisi sono temperatura finale, velocità di ri-

composites. High values of internal specific surface area (SSA) are required as a basic feature for many applications of the char.

Pyrolysis product distribution as well as physico-chemical properties of the solid residue exhibit a large variation in structure and chemistry due, in part, to the large degree of chemical heterogeneity of the feedstock (Paraskeva et al., 2008; Zanzi et al., 2001; Savova et al., 2001; Lee et al., 2013) as well as the operating conditions of the process itself. Moreover, when biomass is contaminated by PTEs the distribution of the toxic metals in the pyrolysis products and the availability of the metals in the char are greatly affected by the operating conditions (Stals et al., 2010; Lievens et al., 2008, Buss et al., 2016).

The final temperature, heating rate, pressure, gas residence time, pyrolysing agent and feedstock are the main operating variables affecting product yield and characteristics (Di Blasi, 2009; Demirbas and Arin, 2002).

On the basis of the values assumed by these variables, three different kinds of pyrolysis may be performed, namely slow, conventional and fast (Bridgwater et al., 1999). The characteristic ranges of temperature, heating rate and solid residence time in the three different regimes are reported in Tab. 2.

Low temperatures and heating rate favour charring reactions, thus providing high char yield. In particular, it is widely shown in the literature (Di Blasi et al., 2009) that at low temperature (about 400 °C) char yield varies between 15% and 45% wt (on a dry biomass basis), depending on the heating rate, the gas residence time and the chemistry of the feedstock. Char yield decreases with increasing temperature which, in turn, favours an increase in gas and liquid yields. The yield of liquid peaks at temperatures between 450-500 °C when the liquid species undergo secondary decomposition reactions, producing lighter condensable species and permanent gases (mainly CO and CO_2). Proximate analysis of char obtained at low temperature shows that its volatile matter content is still high, determining low values of specific surface area, while an increase in carbonizing temperature has a positive effect on this property (Paraskeva et al., 2008).

Low heating rates favour char formation, reducing biomass devolatilization and the activity of secondary degradation reactions due to lower average temperatures experienced by the sample during the process. Moreover, low heating rates (below 10 K/min) allow for a slow release of volatile compounds determining a final porosity that resembles the original porous structure of biomass enhancing micropore fraction, fundamental for the attainment of a high values of SSA.

Nevertheless, at an excessively low heating rate char is characterized by a relatively high volatile content compared with that obtained under more severe heating conditions. Moreover, the closer internal structure of chars produced at low heating rates does not allow an easy escape of volatiles from the char particles. Consequently, the increased residence time of volatiles inside the char particle favours their polymerization to

Tab. 2: Condizioni operative dei differenti tipi di pirolisi.

Table2. Ranges of temperature, heating rate and solid residence time in the three different pyrolysis regimes.

	Velocità di riscaldamento, °C/s / Heating rate, °C/s	*Temperatura finale di reazione, °C / Final temperature, °C*	*Tempo di residenza del solido (ordine di grandezza) / Solid residence time (order of magnitude)*
Pirolisi lenta / Slow pyrolysis	0.01-2	200-350	minuti-ore
Pirolisi convenzionale / Conventional pyrolysis	2-20	<600	minuti
Pirolisi veloce / Fast pyrolysis	100-1000	450-500	secondi

scaldamento, pressione, le proprietà chimico-fisiche della biomassa e portata dell'agente pirolizzante (Di Blasi, 2009; Demirbas and Arin, 2002). La portata dell'agente pirolizzante è strettamente legata al tempo di permanenza della fase gassosa nell'ambiente di reazione.

E' possibile realizzare tre diversi tipi di pirolisi (Bridgwater et al., 1999), pirolisi lenta, convenzionale e veloce a seconda delle condizioni operative del processo (Tab.2).

In condizioni di pirolisi lenta, il char risulta essere il prodotto principale del processo di pirolisi. La sua resa varia in funzione del feedstock fra 38 e 48 % in peso a 350°C e diminuisce all'aumentare della temperatura di processo fino a raggiungere valori compresi fra il 18 e il 28 % in corrispondenza di una temperatura finale pari a 700°C (Di Blasi, 2009). Il char prodotto a bassa temperatura e velocità di riscaldamento, pur essendo caratterizzato da un'elevata resa, presenta un elevato contenuto di volatili e, di conseguenza, una porosità interna non ben sviluppata. In tali condizioni il char non è idoneo ad essere utilizzato in applicazioni che coinvolgono fenomeni di interfaccia-solido fluido.

La pirolisi veloce è invece generalmente impiegata qualora si voglia massimizzare la resa di prodotto liquido a scapito di quella di char e gas. La resa di liquido aumenta con la temperatura di pirolisi e raggiunge un massimo compreso fra il 65 e l'80 % in peso intorno ai 450-550 °C. A temperature maggiori i prodotti della devolatilizzatione della biomassa, se permangono un tempo sufficientemente lungo (dell'ordine di qualche secondo) nell'ambiente di reazione, decompongono producendo specie condensabili più leggere e gas permanenti. Ciò determina una riduzione della resa di liquido e un aumento della resa di gas. In particolare, mentre il gas in condizioni di pirolisi veloce è costituito essenzialmente da CO e CO_2, in presenza di reazioni di decomposizione secondaria dei condensabili primari esso si arricchisce di CO, CH_4, C_2 e H_2. Il residuo solido in condizioni di pirolisi veloce sviluppa una porosità determinata da una devolatilizzazione molto rapida. In queste condizioni, da un lato si favorisce la formazione di pori a causa dell'allontanamento massiccio di volatili, dall'altro, però, la rapida devolatilizzazione comporta la rottura dei micropori con conseguente formazione di pori più grandi e riduzione della superficie specifica.

Da quanto detto, emerge che al fine di ottenere un'apprezzabile resa di char con buone caratteristiche di porosità è preferibile condurre una pirolisi ad alta temperatura e bassa velocità di riscaldamento. Inoltre, studi di letteratura mostrano che al fine di sviluppare alti livelli di porosità del char, fondamentale per il suo reimpiego in molte applicazioni, è preferibile utilizzare il vapore al

form secondary char and consequent pore occlusion. This effect is limited in more severe heating conditions. At high heating rates the devolatilization of condensable species is disruptive, thus allowing an easy escape of the volatiles from the char matrix. In this case the volume of the residual pores is higher, but the SSA could decrease due to the greater average size of the pores.

The effect of pressure on product distribution is not easily predictable due to the formation of heavy liquid compounds (tar) that prevents the attainment of the thermodynamic equilibrium of pyrolysis reactions. Few and contradictory data are presented in the literature about the effect of pressure on pyrolysis product yields. Moreover, the data are often not comparable as they are related to different thermal and fluid dynamical conditions.

However, from previous studies focusing on cellulose pyrolysis, it can be deduced that an increase in pressure, generally linked to higher gas residence times in reaction environments, results in higher char yields as well as the production of lighter volatiles.

On the other hand, char morphology is negatively affected by an increase in pressure. Pressure values higher than 5 bar lead to the formation of fused intermediates on the char surface that favour agglomeration of close char particles reducing the SSA of the solid residue, although this effect becomes more significant when heating conditions typical of fast pyrolysis are established.

Pyrolysis experiments are typically carried out in an inert environment (nitrogen or helium) while an oxygenated gas (steam or carbon dioxide) is used as a pyrolyzing or gasifying agent, depending on the thermal conditions established. Previous studies involving the production of char-based activated carbon show the positive effect of steam as compared with nitrogen and carbon dioxide on the liquid quality and physical properties of char. Using steam as a pyrolyzing agent, the yields of water-soluble liquid products increase at the expense of gaseous and solid products, given the ability of steam to perform a more efficient penetration of solid matter, enhancing desorption, distillation and removal of volatiles. On the contrary, during nitrogen-assisted pyrolysis, higher char yields are obtained with lower porosity because of the deposition of carbonaceous material inside char pores.

It is worth noting that although steam enhances the development of the porosity of the solid residue, at temperatures higher than about 600 °C it promotes char gasification reactions and gas yields increase at the expense of char.

In the framework of the ECOREMED project, variation ranges in temperature, heating rate and pressure, were

posto dell'azoto in quanto favorisce la devolatilizzazione della biomassa agendo non solo come vettore termico, ma anche come agente estraente. Va sottolineato però che, in presenza di vapore, una temperatura finale troppo elevata induce l'insorgere di reazioni di gassificazione del char determinando una notevole riduzione della sua resa. Ciò avviene tipicamente ad una temperatura compresa fra 600 e 700°C.

Nell'ambito del progetto ECOREMED è stato condotto uno studio sulla pirolisi assistita da vapore in condizioni di riscaldamento lento (4 °C/min) e pressione pari a 5 bar. Sono state inizialmente selezionate 5 biomasse non contaminate al fine di valutare le rese dei prodotti di processo e alcune proprietà di interesse della fase gassosa e del residuo solido (Giudicianni et al., 2017) e successivamente sono stati condotti test di pirolisi su 3 fra le biomasse studiate nella precedente campagna sperimentale coltivate su suoli contaminati, eucalipto, pioppo e canna comune. I test di pirolisi hanno permesso di mettere in luce gli effetti di due parametri molto importanti sulle caratteristiche del residuo solido del processo pirolitico e sulla distribuzione di alcuni metalli pesanti (Pb, Cu, Zn e Cd) nei prodotti di processo:

- natura chimica della biomassa;
- temperatura di pirolisi.

Nel primo caso l'indagine è stata condotta ad una temperatura finale pari a 600°C in quanto per le biomasse,tale temperatura rappresenta tipicamente il passaggio da condizioni di pirolisi a condizioni di gassificazione. L'influenza della temperatura è stata invece valutata nell'intervallo 380-700 °C.

Il confronto fra le biomasse testate ha permesso di estrapolare le seguenti indicazioni a carattere generale relative ai prodotti di pirolisi in condizioni di pirolisi lenta condotta in vapore fino ad una temperatura finale di a 600°C:

- a parità di contenuto complessivo di carbonio fisso e ceneri nella biomassa iniziale, più alto è il contenuto di ioni alcalini (K+Na) nel feedstock, più è alta la corrispondente resa di char. Nello specifico delle biomasse studiate, in accordo con quanto detto, salice ed eucalipto producono elevate rese di char (circa il 27%), seguiti da frassino, canna e pioppo. Al contrario pioppo e canna forniscono una maggiore resa di liquido pari a circa il 58%, nettamente maggiore di quella ottenuta dalla pirolisi di salice, frassino ed eucalipto che si attesta attorno a valori compresi fra il 47 e il 48%.
- La produzione e la composizione del gas è molto variabile e non può essere banalmente correlata alla composizione iniziale della biomassa. In ogni caso, indipendentemente dalla biomassa considerata, CO, CH_4 e H_2 sono i costituenti combustibili principali del prodotto gassoso caratterizzato da un'elevata diluizione in CO_2 (77,3-83,2% in peso nel caso specifico). Per le biomasse studiate la produzione di gas varia tra 0.13 e 0.22 Nm^3/kg di biomassa ed è massima per il frassino, mentre il potere calorifico superiore varia fra 6.1 e 7.2 ed è maggiore laddove è più alto il contenuto di idrogeno e metano (pioppo).
- Il char è caratterizzato da un elevato grado di aroma-

selected on the basis of their effect on both product yields and morphology of the residual char. On the grounds of the considerations presented above a steam-assisted slow pyrolysis process was proposed for the post-processing of the contaminated biomass. In order to avoid excessive consumption of char due to the onset of the heterogeneous gasification reactions the upper limit of temperature was set at 700°C.

At first five non-contaminated biomasses were studied in order to evaluate the effect of pyrolysis temperature and feedstock chemistry on the yields of the products and on some specific properties of the gaseous phase and of the char (Giudicianni et al., 2017). The results of this analysis allowed exploration of possible applications of the char, thus providing an important tool to drive decision making on the optimal biomasses for phytoremediation processes. On the basis of the obtained results, three biomass species were selected for phytoremediation of heavy metal contaminated soils, namely *Eucalyptus occidentalis*, *Populus nigra* and *Arundo donax*. These biomasses were then pyrolyzed in order to evaluate the effect of pyrolysis temperature and feedstock chemistry on the partitioning of some heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) among the process products.

Because of the presence of steam, a final temperature of 600 °C was selected for the experimental tests because this value lies on the borderline between the pyrolysis and the gasification stage. The dependence of char properties on the process final temperature was assessed in the temperature range of 380-700°C, where no or limited release of the volatile fractions of PTEs in the gas phase is expected, with the aim of identifying the optimal process temperature that is a good compromise between weight reduction in the processed material and good chemical and structural quality of the solid residue.

Comparative analysis between the chars produced at 600 °C from *P. nigra*, *S. alba*, *F. oxyphylla*, *E. occidentalis* and *A. donax* shows that the chemical nature of the biomass plays a major role in the determination of char yield and properties:

- Char yield depends on the content of lignin as well as alkali and earth alkali metals. Under the pyrolysis conditions used in this work, a linear correlation was observed between the yield of the organic fraction of char obtained at 600°C and the product between lignin content, cellulose content and the content of both alkali and earth alkali metal ions.
- The content of ash in the chars follows the same trend as in the corresponding biomasses. The most abundant species in all the char ashes are P, K and Ca, whereas Na and Al are almost devolatilized in the chars produced at 600 °C.
- All the produced chars have an O/C value lower than 0.2, revealing a high degree of aromaticity and maturation.
- All the chars were alkaline in nature, due to the presence of alkali and alkaline earth metal ions.
- Type II isotherms characterized all the chars and are associated with narrow slit pores including pores in the micropore region. Under the pyrolysis conditions

tizzazione, infatti, presenta un rapporto H/C simile a quello dell'antracite e un rapporto O/C simile a quello tipico del carbone.
- Il contenuto di ceneri nel char segue lo stesso andamento qualitativo del contenuto di ceneri nel feedstock di partenza. Le ceneri sono costituite principalmente da P, K e Ca in tutti i char esaminati, mentre Na e Al risultano essere quasi completamente devolatilizzati.
- Esiste una correlazione fra l'area superficiale del char e il contenuto di cellulosa: maggiore è il contenuto di cellulosa nella biomassa iniziale, maggiore è l'area superficiale. Questa correlazione non è valida per biomasse caratterizzate da un elevato contenuto di inorganici responsabili della formazione di sali bassofondenti che occludono parzialmente i pori del char. In accordo con quanto detto, fra le biomasse testate il char da pioppo ha mostrato i valori più alti di area superficiale, mentre il char da canna il valore più basso.

Lo studio condotto al variare della temperatura finale di pirolisi ha fornito importanti indicazioni sulle condizioni termiche da adottare nel processo pirolitico in funzione delle rese e delle caratteristiche del prodotto desiderato. In particolare:
- Nell'intervallo di temperatura 380-700 °C, le rese di char e di gas sono fortemente variabili, mentre quella di liquido aumenta lievemente fino a circa 410 °C e resta costante per temperature maggiori indicando che il rilascio di specie condensabili può essere considerato quasi concluso già a 380 °C, mentre all'aumentare della temperatura il gas viene prodotto a spese del char.
- A temperatura maggiore di circa 600 °C si osserva un aumento repentino della resa di gas in corrispondenza di una forte riduzione della resa di char dovuta alla gassificazione del char ad opera del vapore. L'inizio di questo processo corrisponde ad una maggiore produzione di H_2, CO e CO_2 responsabili di un sensibile aumento del potere calorifico del gas e del recupero energetico in fase gas. Nel caso specifico il potere calorifico superiore del gas a 700 °C è uguale a circa 9 MJ/kg e corrisponde ad un recupero di energia della biomassa iniziale nella fase gassosa pari a circa il 30%.
- Il contenuto di volatili è ancora elevato nel char ottenuto a 380°C, ma diminuisce linearmente con la temperatura fino a 700°C. Al contrario il contenuto di carbonio fisso aumenta fino a 600 °C e subisce un'inversione di tendenza a temperatura maggiore a causa del consumo di carbonio dovuto alle reazioni di gassificazione. Il contenuto di ceneri del char aumenta con la temperatura di pirolisi fino a 700°C. I cambiamenti subiti dal char all'aumentare della temperatura causano un andamento non monotono del potere calorifico che presenta un massimo a 600°C sensibilmente superiore al potere calorifico della biomassa iniziale (28 MJ/kg contro circa 18 MJ/kg, nel caso specifico dell'eucalipto).
- A partire da circa 410°C si osserva una devolatilizzazione degli inorganici principali. Tuttavia, non si osservano variazioni significative nella composizione del char fino a 700°C.

investigated in this work a correlation between the char SSA and the content of cellulose in the original feedstock was found: the higher the cellulose content, the higher the SSA in the produced char. Nevertheless, in the presence of salts with low melting points this correlation is not satisfied due to the formation of fused intermediates causing a partial occlusion of the pores. In agreement with this observation *P. nigra* and *E. occidentalis* chars seem to be the most promising in terms of surface area, whereas the char obtained from *A. donax* has the lowest value of SSA.

The results from pyrolysis tests conducted at different final temperatures suggest the following general conclusions:
- in the temperature range from 380 to 700 °C the char yield decreases mainly at the expense of gas yield, whereas the yield of liquid remains almost constant with a mild increase from 380 °C up to 415 °C. At this temperature, the release of condensable volatiles can be considered almost concluded due to the devolatilization of most of the holocellulose fraction which is the main cause of the production of condensable compounds.
- At temperatures higher than 600 °C there is a sudden increase in gas yields related to a great decrease of char yield due to the onset of the gasification reactions. In this regime H_2, CO and CO_2 are the main gaseous products, the first two species leading to a great increase in the HHV of the gas phase as well as energy recovery in the gaseous product. In the specific case of Eucalyptus, the HHV of the gaseous phase is about 9 MJ/kg and corresponds to 30 % of the energy originally stored in the feedstock.
- The content of volatiles in the char is still high at 380 °C and decreases with temperature up to 700°C. By contrast, the content of fixed carbon has a maximum at 600°C due to the char gasification reactions causing a significant carbon consumption at higher temperatures. The same trend is observed for char HHV. At 600 °C a great energy densification with respect to the original feedstock can be obtained. For example, in the case of Eucalyptus, char obtained at 600 °C has a HHV equal to 28 MJ/kg versus 18 MJ/kg of the initial biomass.
- At low temperature, char morphology is very compact and is characterized by a macroporous structure. At higher temperatures, the char structure becomes mainly mesoporous with a small microporous region. These modifications determine the increase in SSA with temperature. SSA reaches a maximum in the range 500-550 °C (about 300 m^2/g for Eucalyptus char) and then decreases with temperature due to the coalescence of small pores into larger ones. Moreover, at high temperatures, salts with low melting points lead to the formation of fused intermediates responsible for the occlusion of some pores.
- The most abundant inorganics start to devolatilize at temperatures higher than 415 °C. A mild devolatilization is observed up to 600 °C, whereas it becomes more severe at 700°C. Among the main inorganic species K, Ca and P are more stable with temperature than are Na, Fe and Al.

servano variazioni del recupero di inorganici nel char tra 410 e 600°C. La devolatilizzazione è più spinta per Na, Fe e Al, mentre K, Ca e P sono termicamente più stabili. Tuttavia, l'aumento della temperatura da 600 a 700 °C determina una forte aumento della devolatilizzazione di tali inorganici.

- A bassa temperatura il char si presenta molto compatto con una struttura prevalentemente macroporosa. L'andamento della superficie specifica presenta un massimo tra 500 e 550°C (circa 300 m^2/g per il char da eucalipto), temperatura alla quale si sviluppa una struttura mesoporosa con regioni microporose. A temperatura maggiore l'assottigliamento delle pareti dei pori sfocia nella loro coalescenza e ciò determina un aumento del volume poroso, ma una riduzione della superficie specifica. Anche la formazione di intermedi fusi nel char contenete sali bassofondenti incide negativamente sulla superficie specifica del residuo solido.
- All'aumentare della temperatura di pirolisi aumenta la devolatilizzazione di tutti i metalli pesanti presenti nelle biomasse testate. In particolare il loro recupero in fase solida resta costantemente unitario all'aumentare della temperatura fino a che essa non raggiunge un valore critico variabile a seconda del metallo considerato al di sopra del quale il recupero del metallo in fase solida decresce con la temperatura critica. La devolatilizzazione del Cd comincia intorno ai 380 °C e può considerarsi quasi completa per una temperatura pari a circa 480 °C. Un comportamento differente è stato osservato per Zn, Cu e Pb, la cui devolatilizzazione comincia ad una temperatura anch'essa pari a 380 °C, ma è molto più lenta. Infatti, a 600 °C circa l'85% dei metalli è ancora immobilizzato nella fase solida.

In definitiva i risultati ottenuti mostrano che qualora si voglia adottare un processo di pirolisi lenta in vapore al fine di valorizzare la biomassa contaminata con metalli pesanti è importante individuare l'eventuale presenza di metalli particolarmente volatili come il Cd. In tal caso è necessario operare in condizioni di bassa temperatura (minore di 380 °C) per evitare il rilascio di volatili nella fase vapore combustibile. Tuttavia, in tali condizioni le caratteristiche del char non consentono di utilizzarlo con efficacia nei processi che coinvolgono fenomeni di interfaccia solido-fluido (es. adsorbimeto, catalisi, sintesi di materiali compositi). Il trattamento pirolitico rappresenta in questi casi solo un processo di smaltimento in sicurezza della biomassa che combina la riduzione del volume del solido contaminato con un aumento della sua recalcitranza e una riduzione della mobilità del metallo pesante che rimane confinato nel char in forma più stabile. Nel caso in cui le biomasse risultino contaminate solo con uno o più metalli fra Pb, Cu e Zn è possibile condurre un trattamento pirolitico a temperatura maggiore ottenendo in tal modo un residuo solido di interesse in tutte le applicazioni che richiedono un'elevata superficie specifica e una fase vapore con ridotte concentrazioni di metalli pesanti che può essere utilizzata come combustibile.

- All the heavy metals detected in the contaminated biomass (see section 2.1) start to devolatilize at about 380 °C. Nevertheless, Cd is almost absent in the char produced at temperatures higher than 480 °C, whereas a significant fraction of Zn, Cu and Pb is retained in the char even at higher temperatures. About 85 %wt of these metals are retained in the solid residue.

In conclusion, the results of this study reveal that if biomasses from contaminated soils contain Cd the feasibility of pyrolysis as a post-harvesting treatment is compromised by the release of this metal at very low temperatures. In these conditions, in order to avoid the presence of Cd in the combustible vapour phase the pyrolysis temperature should be kept low (about 380°C). Nevertheless, at this temperature char structure is still compact, thus preventing its use in applications that involve fluid/solid interface phenomena (e.g. adsorption, catalysis, composite synthesis). By contrast, when the biomasses are contaminated with one or more metals among Pb, Cu and Zn higher temperatures may be reached during pyrolysis (up to about 600°C), thus allowing chars to be obtained with higher SSA and, at the same time, a vapour phase energy carrier with limited amounts of metal contaminants.

12.4 La gassificazione in letto fluidizzato

Le biomasse sono caratterizzate da una bassa densità energetica, pertanto il loro utilizzo in molte applicazioni pratiche richiede una loro preventiva trasformazione in gas, liquidi o combustibili solidi derivati. Attraverso la gassificazione di biomasse possono essere prodotte correnti ricche di idrogeno, elemento ad alto contenuto energetico ma non disponibile in natura, la cui combustione produce acqua. Il processo di gassificazione consiste nella ossidazione parziale di una sostanza ad elevata temperatura (900 ÷ 1.000°C) per produrre un gas combustibile (gas di sintesi o syngas) composto principalmente da H_2, CO e altre specie minoritarie considerate contaminanti della corrente gassosa principale in quanto riducono l'efficienza di conversione del processo e, in alcuni casi, devono rispettare dei limiti normativi per l'immissione in atmosfera (tar, particolato carbonioso, composti dello zolfo, dell'azoto o del cloro come ad esempio H_2S, NH_3, HCl, etc.). Il syngas può poi essere utilizzato per generazione di energia elettrica e termica o convertito in combustibili liquidi o gassosi attraverso processi di sintesi di Fischer-Tropsch, del metanolo, degli alcool misti, o attraverso fermentazione. I processi differiscono per il modo in cui è alimentata la biomassa, la fonte di ossidante, la temperatura di funzionamento, la pressione e la fonte di calore fornita per far avvenire il processo di gassificazione.

Il processo di gassificazione può essere realizzato con gassificatori a letto fisso (apparato a bassa tecnologia), oppure gassificatori a letto fluido (tecnologia più sofisticata). Le proprietà e le caratteristiche della biomassa alimentata (umidità, tenore di ceneri, dimensione delle particelle, ecc.) ed eventuali trattamenti preventivi (essiccazione, macinazione, pellettizzazione, ecc.) sono i parametri chiave per la progettazione e la scelta del tipo di gassificatore.

Rispetto ai gassificatori a letto fisso quelli a letto fluido garantiscono un'ottima miscelazione tra l'agente gassificante e la biomassa, una più uniforme distribuzione della temperatura nella zona di gassificazione con aumento della velocità di reazione, una maggiore resa complessiva del syngas e la riduzione di rischio di sinterizzazione delle ceneri. Mostrano inoltre un'ottima flessibilità alle dimensioni delle particelle di combustibile alimentate. In aggiunta non vi sono parti mobili (come le griglie dei letti fissi all'interno del reattore) rendendo, in tal modo, la manutenzione semplice. Inoltre, non sono individuabili zone operanti in condizione di temperatura e atmosfera diversa come nel caso dei letti fissi, operano a temperature inferiori (700 e i 900 °C) di quelle dei reattori a letto fisso, permettono lo scale up fino a grandi dimensioni e possono essere realizzati anche in taglie sempre superiori a 1 MW. Con questi tipi di reattori è possibile operare anche a pressione maggiore della pressione atmosferica in modo tale da aumentare la capacità produttiva, ridurre o eliminare del tutto, la compressione a monte della turbina nel caso in cui il syngas venga utilizzato per alimentare un impianto turbogas. Tuttavia, i gassificatori a letto fluidizzato hanno costi maggiori e il syngas ottenuto contiene comunque un significativo quantitativo di tar (superiore rispetto a quello presente nel syngas prodotto

12.4 Gasification in fluidized bed reactors

Since biomass has a low energy density its use in many practical applications requires prior transformation into gas, liquid or solid fuel derivatives. Through the gasification of biomass hydrogen-rich currents can be produced. The gasification process consists in partial oxidation of a substance at high temperatures (900 to 1,000° C) to produce a combustible gas (synthesis gas or syngas) mainly composed by H_2, CO and other minority species considered contaminants of the produced stream, with a consequent reduction in the conversion efficiency of the whole process and, in some cases, exceeding the emission limits of the specific pollutant into the atmosphere (tar, soot, nitrogen, chlorine or sulphur compounds such as H_2S, NH_3, HCl, etc.). The syngas can then be used to generate electricity and heat or be converted to liquid or gaseous fuels through processes such as Fischer-Tropsch synthesis, methanol, mixed alcohols, or through fermentation. The processes differ in the way that the biomass is fed, the source of oxidant, the operating temperature, the pressure and the heat supplied to the gasification process.

The gasification process can be carried out using fixed bed gasifiers (low-technology apparatus), or fluidized bed gasifiers (more sophisticated technology). The properties and characteristics of biomass (moisture and ash content, particle size, etc.) and any pre-treatment (drying, grinding, pelletizing, etc.) are the key parameters for the choice and design of the gasifier.

Fluidized bed reactors guarantee better gasifying agent–biomass mixing and a more uniform temperature distribution in the reactor in comparison to fixed bed gasifiers, resulting in an increasing in the reaction rate, and a higher yield in syngas and the reduction of risk of ash sinterization. In addition, fluidized bed reactors show great flexibility to fuel particle size. Such reactors have no moving parts (like the grids of fixed beds inside the reactor), hence the maintenance operations are simple. In addition, areas operating under different conditions of temperatures and atmospheres are not present as in the case of fixed beds. Moreover, they can operate at lower temperatures (700 and 900° C) than those of fixed-bed reactors, allowing the scale up to large sizes (even > 1 MW).

With these reactors it is possible to operate at higher than atmospheric pressure in order to increase production capacity, thus reducing or eliminating the further compression step if the syngas is used in a gas turbine plant. However, fluidized bed gasifiers have higher costs and the syngas obtained still contains a significant amount of tar (higher than that found in syngas produced with fixed bed downdraft gasifiers) as well as a high concentration of solid particles, hence requiring downstream cleaning operations.

During the ECOREMED project biomass gasification tests were conducted on three different biomass species, *Populus nigra*, *Eucalyptus occidentalis* and *Arundo donax*, using a fluidized bed gasifier feeding 5 kg/h of feedstock and using a mixture of steam and air as the gasifying agent. The equivalence ratio (ER) and steam/biomass ratio (S/F) were chosen on the basis of efficiency criteria

Tab. 3: Condizioni operative dei test di gassificazione.

Table 3. Operative conditions used in the gasification tests.

Portata N_2 / N_2 flow rate	650	Nl/h
Portata aria / Air flow rate	1.1	Nm^3/h
Portata N_2 totale / N_2 total flow rate	1.6	Nm^3/h
Temperatura Letto / Bed temperature	800-850	°C
Materiale Letto / Bed material	Sabbia Safond Martini / Martini Safond sand	
H_2O nominale / H_2O nominal flow rate	1.2	Kg/h
H_2O nominale / H_2O nominal flow rate	1.5	Nm^3/h
Portata biomassa nominale / Biomass feeding rate	2.0	Kg/h
Peso Letto / Bed inventory	7.5	Kg
ER nominale / ER nominal	0.15	
S/F nominale / S/F nominal	0.65	
Velocità superficiale / Gas surface velocity	0.25	m/s
Altezza letto / Bed height	25	cm

con gassificatori a letto fisso in equicorrente) nonché di particelle solide e pertanto richiedono operazioni successive di pulizia piuttosto spinte.
Nel corso del progetto Ecoremed sono state condotte prove di gassificazione su 3 biomasse, pioppo, eucalipto e canna comune, adoperando un gassificatore a letto fluido da 5 kg/h con alimentazione a coclea in cui l'agente gassificante è costituito da una miscela di vapore e aria. Il rapporto di equivalenza (ER) e il rapporto vapore/biomassa (S/F) sono stati scelti sulla base di criteri di ottimizzazione dell'efficienza del processo definiti in precedenti studi condotti sullo stesso impianto (Ruoppolo et al., 2012). In Tabella 3 sono riportate le condizioni operative dei test di gassificazione.

I test condotti hanno evidenziato diverse criticità impiantistiche di cui è necessario tener conto in questa tipologia di impianto:

- la biomassa in forma di cippato, data la bassa densità energetica del materiale, richiede una preventiva pellettizzazione o, in alternativa, tramogge di carico ad elevato ingombro. Tuttavia, è comunque preferibile eseguire una preventiva pellettizzazione in quanto la presenza di particelle fini nel cippato può generare alte portate di solido elutriato nel gas in uscita dal reattore. Questo inconveniente è ancor più problematico nei casi in cui la biomassa sia inquinata da metalli pesanti che fuoriescono dall'impianto insieme al particolato solido presente nella corrente gassosa in uscita.
- Non sono stati riscontrati problemi di agglomerazione/fusione durante la fase di alimentazione nelle zone calde della linea di alimentazione, tuttavia è necessario prevedere un flusso di azoto secondario in modo tale da inertizzare tutte le zone calde della linea.
- A parità di condizioni operative sono stati riscontrati differenti valori della portata di ceneri elutriate e quindi di ceneri accumulate nel letto. Ciò implica un diverso carico al sistema di abbattimento delle polveri nel gas in uscita dall'impianto che quindi deve essere dimensionato per poter lavorare in condizioni ottimali

defined in previous studies on the same plant (Rajmohan et al., 2012). Table 3 shows the operating conditions of gasification tests.

Tests showed that several operational problems have to be taken into account:

- The biomass obtained in the form of wood chips requires pelletization pre-treatment in order to increase its energy density and reduce the size of the hopper. Pelletization is also suitable to reduce the presence of fine particles with a consequent reduction in the concentration of the elutriated solid fine particles. This is a very key aspect when biomass polluted by heavy metals, such as that from soil remediation processes, is used since the heavy metals present in the elutriated solid particulate can be emitted into the atmosphere.
- No problems of agglomeration/melting of the feedstock during the feeding in warm areas of the power line were observed. However, a secondary flow of nitrogen to provide not only the inertization of the feeding line but also to improve the transport of biomass is recommended.
- Different values of ash production and accumulation rate were observed for the different biomass species. This requires a system for the de-dusting able to work under variable conditions to respond to the different requirements. It should also be underlined that in the case of the presence of large amounts of alkaline metals, sintering phenomena can occur due to the formation of low melting point salts in the presence of inert material such as silica sand bed. The agglomerated bed material can produce a defluidization and consequent blockage of the plant. This is a critical issue but it can be overcome using a bed of inert not containing silica.

The synthesis gas obtained has a lower heating value between 4 and 6 MJ/kg depending on the biomass in question. *P. nigra* gives the best performance both in terms of degree of conversion and in terms of calorific value of the produced gas due to the higher concentration

a carico variabile. Inoltre, va tenuto sotto controllo l'accumulo di ceneri nel letto in quanto in presenza di elevate quantità di metalli alcalini, come nel caso della canna comune si potrebbero determinare fenomeni di sinterizzazione dovute alla formazione di sali basso-fondenti in presenza si sabbia silicea come materiale inerte del letto. L'agglomerazione del materiale del letto comporterebbe una defluidizzazione del letto e conseguente blocco dell'impianto. Pertanto, sarà opportuno tener conto di questa criticità utilizzando un letto di inerte non contenente silice.

Il gas di sintesi ottenuto dai test ha un potere calorifico inferiore variabile fra circa 4 e 6 MJ/kg a seconda del tipo di biomassa considerata. Nel caso specifico, il pioppo rappresenta la biomassa più idonea per quanto concerne sia il grado di conversione sia il potere calorifico del gas prodotto grazie alla maggiore concentrazione di H_2. Al contrario, la canna comune risulta essere quella meno adatta.

La resa e la composizione del gas di sintesi delle biomasse studiate non hanno subito sostanziali variazioni in presenza di contaminanti, essenzialmente Cd, Cu e Pb, nelle concentrazioni assunte dalle tre specie utilizzate per la fitodepurazione nell'ambito del progetto Ecoremed. Tale risultato è da considerare significativo in quanto consente, nel caso di contaminazioni moderate dei campioni vegetali provenienti da impianti di fitodepurazione, di valutare le rese energetiche aspettate sulla base della vasta letteratura disponibile senza dover ricorrere a verifiche sperimentali di volta in volta.

Per quanto riguarda la pulizia della corrente di gas in uscita i campionamenti del gas prodotto durante i test di gassificazione mostrano che è necessario prevedere:

- un sistema di abbattimento del particolato ad elevata efficienza soprattutto nel caso di biomasse contaminate da metalli pesanti. A tal proposito è possibile prendere in considerazione diverse tecnologie come ad esempio i cicloni, i filtri a manica o i precipitatori elettrostatici la cui efficienza di separazione è funzione della dimensione delle particelle. I cicloni sono utilizzabili per particelle grossolane, mentre per particelle inferiori a 10 micron sarà necessario prevedere filtri a manica o precipitatori elettrostatici.
- Un sistema di abbattimento dei tar. Nei casi esaminati, la concentrazione dei tar nel gas in uscita è elevata (25-30 g/Nm^3) non risulta compatibile con i limiti di utilizzo dello stesso in motori a combustione interna (100 mg/Nm^3), o in celle a combustibile o turbine (10mg/Nm^3). Non si rilevano differenze sostanziali fra i gas prodotti dalle tre diverse biomasse: il tar è costituito prevalentemente da idrocarburi leggeri, come tipicamente accade in presenza di vapore nel processo di gassificazione. L'acenaftilene e il naftalene sono i composti presenti in concentrazione maggiore nel tar presente nei gas ottenuti. Va sottolineato che il tar da eucalipto rispetto al tar da pioppo o canna risulta più ricco di componenti più pesanti. Una tecnologia molto efficiente per l'abbattimento del tar risulta essere lo scrubbing con olio vegetale per i tar pesanti e l'adsorbimento su biomassa e/o char per i tar più leggeri (Paethanom et al., 2012).

of H_2, while *A. donax* gives the poorest performance.

The presence of contaminants, essentially Cd, Cu and Pb, does not affect the syngas composition. This is a very important result because on the basis of the observed behaviour it may be concluded that for moderate concentrations of contaminant the gasification performance can be inferred from the data reported in the extensive literature available for biomass gasification without the need to perform an ad hoc test, with consequent savings in money and time.

As regards the cleaning of the gas produced during gasification it is necessary to provide:

- a highly efficient abatement system especially in the case of heavy-metal-contaminated biomass. Different technologies such as cyclones, electrostatic precipitators or filters whose separation efficiency is a function of particle size can be adopted. Cyclones can be used for coarse particles, while for particles smaller than 10 micron it is necessary to provide filters or electrostatic precipitators.

A system for the reduction of tar is also required. In the examined cases, the concentration of tar in the syngas is high (25-30 g/Nm^3). It is not compatible with the limits required by internal combustion engines (100 mg/Nm^3), or by fuel cells or gas turbine applications. There are no substantial differences between the gases produced by the three different biomasses in terms of the nature of the tar produced. Tar consists primarily of hydrocarbons, as typically happens in the presence of the steam gasification process. Acenaphthylene and naphthalene are the most abundant compounds. It should be emphasised that tar from *E. occidentalis* compared to tar from *P. nigra* and *A. donax* is richer in heavier components. Very efficient tar abatement technologies such as scrubbing with vegetable oil for heavy tar, adsorption on biomass and/or char for lighter tar (Paethanom et al., 2012) can be adopted.

12.5 Produzione di biodiesel di seconda generazione

La produzione di biodiesel di II generazione richiede la realizzazione di 4 stadi produttivi in serie:

- l'idrolisi della biomassa lignocellulosica;
- la fermentazione dell'idrolizzato, attraverso la quale vengono prodotti microorganismi oleaginosi;
- l'estrazione dei lipidi dai microrganismi oleaginosi;
- la transesterificazione dei lipidi ottenuti per produrre biodiesel.

Trattandosi di un processo essenzialmente biologico finalizzato alla trasformazione di biomasse agro-forestali in biocombustibili o altri prodotti, la produzione di biodiesel di II generazione corrisponde pienamente ai principi della bioraffineria (Cherubini, 2011), ovvero all'insieme di motivazioni politico-strategiche che favoriscono lo sviluppo di processi compatibili con la salvaguardia della qualità ambientale, l'impiego di risorse rinnovabili ed il riciclo completo dei residui di processo.

La maggior parte dell'attività sperimentale svolta nell'ambito di questo progetto è stata realizzata utilizzando biomasse di *Arundo donax*. Nel seguito le varie fasi del processo verranno sinteticamente descritte, con particolare riferimento al contenuto innovativo della sperimentazione effettuata nell'ambito di questo progetto.

12.5.1 I microorganismi oleaginosi

I microorganismi oleaginosi sono quelli in grado di accumulare una frazione di lipidi compresa tra il 20% e l'80% all'interno della loro biomassa. Includono numerose specie di batteri, lieviti, microalghe e muffe.

I lipidi vengono prodotti in presenza di un'abbondante fonte di carbonio, quando è carente un nutriente come azoto o fosforo. I lipidi prodotti sono endocellulari, e sono immagazzinati come fonte di energia in *oil bodies*.

I lipidi raccolti nei microorganismi oleaginosi costituiscono i cosiddetti oli microbici (detti anche SCO: Single-Cell Oils). Gli SCO raccolgono crescente interesse per la molteplicità delle loro potenziali applicazioni (Boswell et al., 1996; Huang et al., 2013). L'interesse per gli oli microbici è recentemente cresciuto per i progressi ottenuti nello studio del metabolismo dei microorganismi oleaginosi (Papanikolaou et al., 2007), e per la scoperta di microorganismi in grado di utilizzare come nutrienti i residui di altri processi industriali.

12.5.2 L'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche

L'impiego di biomasse lignocellulosiche in processi fermentativi richiede la preventiva idrolisi delle biomasse, che viene realizzata attraverso un processo a due step:

- Un pre-trattamento attraverso il quale la struttura del materiale lignocellulosico viene resa accessibile per il successivo trattamento con gli enzimi; nell'ambito della sperimentazione realizzata per il presente progetto il pretrattamento delle biomasse è stato effettuato mediante steam-explosion.
- L'idolisi enzimatica del materiale pretrattato, realizzata attraverso l'impiego sinergico di una miscela di enzimi lignocellulolitici: Endoglucanasi, che idrolizzano i legami β-1,4-D interni delle catene di cellulosa; Cel-

12.5 Production of II-generation biodiesel

The production of II-generation biodiesel consists of four stages in series:

- hydrolysis of lignocellulosic biomass;
- fermentation of the hydrolysate, to produce the oleaginous biomass;
- extraction of lipids from the oleaginous microorganisms;
- transesterification of lipids to produce biodiesel.

The production of II-generation biodiesel corresponds to principles of biorefinery (Cherubini, 2011), i.e. the politico-strategic practices promoting the protection of the environment, the exploitation of renewable resources and the complete recycle of wastes. It is based on a biological process and aims to convert agro-forestry biomass to biofuels or other products

Most of the experimental activity carried out within this project was made using *Arundo donax* biomass. The stages of the process will be synthetically described below, with specific reference to the innovative content of the research.

12.5.1 Oleaginous microorganisms

The so-called oleaginous microorganisms are able to accumulate a significant fraction of their biomass (between 20% and 80%) as lipids. They include several species of bacteria, yeasts, microalgae and fungi.

Lipids are synthesized in the presence of an abundant carbon source, under lack of nitrogen or phosphorus. Lipids are stored in endocellular oil bodies, and are used as an energy source. These lipids are called microbial oils (also called SCOs: Single-Cell Oils). The SCOs are attracting increasing interest due to their multiple potential applications (Boswell et al., 1996; Huang et al., 2013). This interest has been increased by recent advances in the knowledge of the oleaginous microorganism metabolism (Papanikolaou et al., 2007), and by the discovery of new microorganisms that are able to use agro-industrial waste as nutrients.

12.5.2 Hydrolysis of lignocellulosic biomasses

Lignocellulosic biomasses require preliminary hydrolysis to be used as feedstock for fermentation processes. This hydrolysis is usually carried out in two steps:

- Pre-treatment to increase the accessibility of the lignocellulosic material for the subsequent enzymatic treatment; within this project, the biomass pre-treatment was carried out by steam-explosion.
- Enzymatic hydrolysis of the pre-treated material, made by a cocktail of hydrolytic enzymes: Endoglucanases, which break down the β-1,4-D bonds of cellulose chains in randomized manner; Cellobiohydrolases, which are able to cleave two to four units from the ends of cellulose chains; β-glucosidases, which hydrolyse the glycosidic bonds to terminal non-reducing residues, with release of glucose; other hemicellulolytic enzymes, to degrade hemicelluloses.

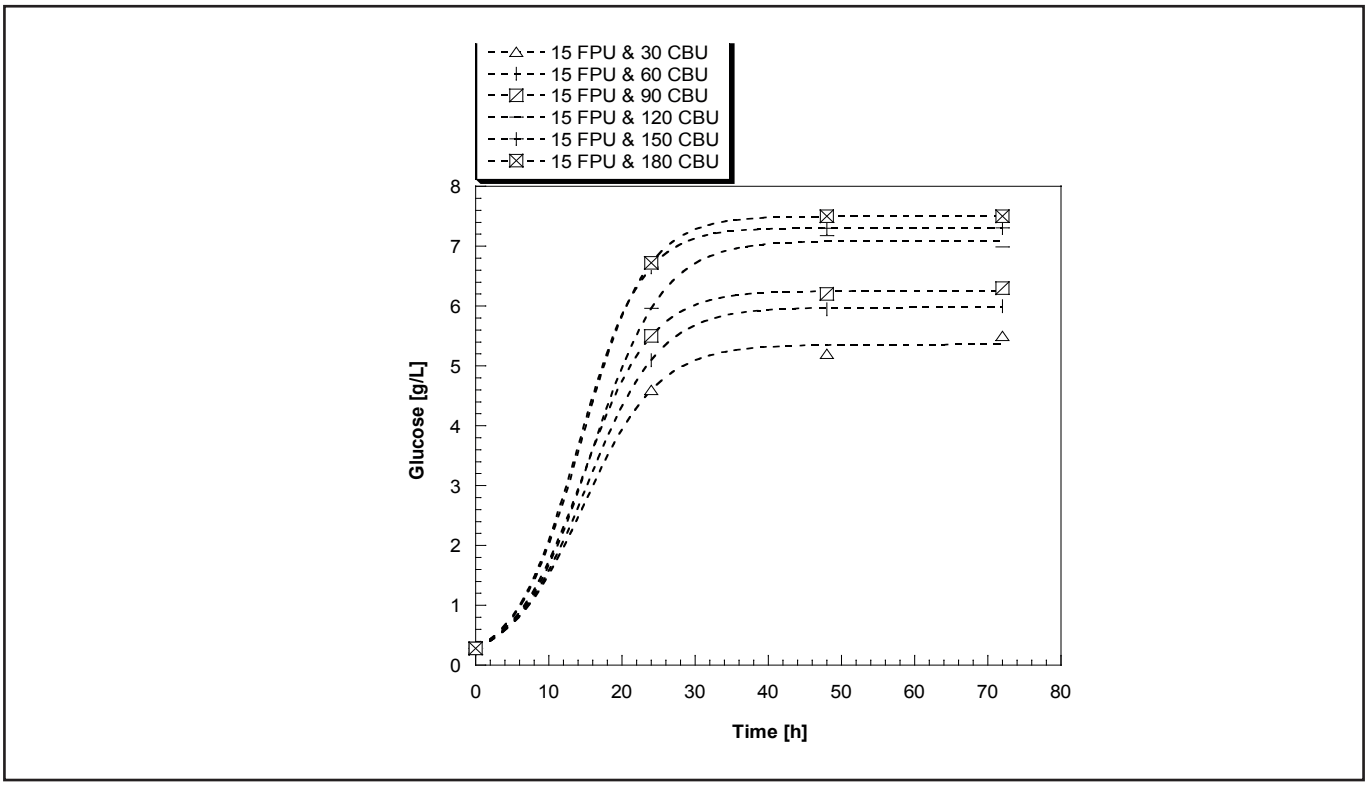


Figura 2. Profili concentrazione-tempo di glucosio prodotto da idrolizzati di Arundo donax esploso (T=40÷50°C, 160 rpm, 72 h)

Figure 2. Concentration-time profiles of glucose produced from hydrolysates of steam-exploded Arundo donax (T=40÷50°C, 160 rpm, 72 h)

lobioidrolasi, in grado di separare unità di cellobiosio alle estremità delle catene di cellulosa; β-glucosidasi, che idrolizzano il cellobiosio e sono in grado di separare unità di glucosio alle estremità delle catene di cellulosa; altri enzimi emicellulolitici, per la degradazione delle catene di emicellulosa.

La Fig. 2 rappresenta il tipico andamento dei test di idrolisi enzimatica degli idrolizzati di *Arundo donax*, utilizzando diverse concentrazioni di cellulasi (misurate in FPU: Filter Paper Unit) e di cellobiasi (misurate in CBU: Cellobiase Unit).

I dati in Figura 2 mostrano che la concentrazione di glucosio raggiunge un asintoto finale in ca. 48 ore. Aumentando la concentrazione di enzima si ottengono incrementi sempre più contenuti nella resa in glucosio, per cui attraverso questi dati è possibile determinare una miscela ottimale di enzimi ottimizzando il bilancio economico del processo.

The enzymatic hydrolysis of *Arundo donax* hydrolysates is described in Fig. 2. Different concentrations of cellulases (measured in FPU: Filter Paper Unit) and cellobiases (measured in CBU: Cellobiase Unit) were adopted.

The experimental results shown in Figure 2 indicate that, whatever the concentration of enzyme adopted, the glucose concentration reaches a final asymptote after about 48 h. The glucose yields increase with the concentration of hydrolytic enzymes. Consequently, these results enable the identification of an optimal use of the hydrolytic enzymes, to improve the economic balance of the process.

12.5.3 Impiego di lieviti oleaginosi per la produzione di oli microbici

Gli idrolizzati prodotti attraverso l'idrolisi enzimatica delle biomasse lignocellulosiche sono stati principalmente utilizzati per la produzione di SCO attraverso la fermentazione di lieviti oleaginosi. Questi ultimi sono microorganismi in grado di accumulare lipidi fino al 65% della propria biomassa (Angerbauer et al., 2008), attraverso l'impiego di vari tipi di nutrienti inclusi gli zuccheri pentosi ed esosi (Chi et al., 2010).

I lieviti oleaginosi attraggono crescente interesse nel mondo scientifico ed industriale per la semplicità delle loro esigenze colturali. Infatti, l'accumulo di lipidi intracellulari richiede un'abbondante fonte di carbonio ed una fonte limitante di azoto. In pratica è necessario un rapporto C/N > 30 (nelle stesse condizioni i microorganismi non oleaginosi sintetizzano in prevalenza polisaccaridi).

Un altro importante vantaggio offerto dai lieviti oleaginosi è rappresentato dalla possibilità di sintetizzare lipidi, in condizioni aerobiche, utilizzando residui di altri processi senza necessità di aggiuingere nutrienti costosi, come accade ad esempio per le specie *Rhodotorula glutinis* (Easterling et al., 2009), *Rhorosporidium toruloides* (Li et al., 2007), *Trichosporon fermentans* (Zhu et al., 2008) and *Lipomyces starkeyi* (*Angerbauer et al., 2008; Zhao et al., 2008*).

La maggior parte dell'attività sperimentale svolta nell'ambito di questo progetto è stata realizzata utilizzando il lievito *Lipomyces starkeyi*,che oltre ad offrire elevate rese in biomassa e lipidi presenta una tendenza minima al riutilizzo dei lipidi accumulati (Ratledge, 2004). La Figura 3 rappresenta il tipico andamento della fermentazione di *Lipomyces starkeyi* in presenza di idrolizzati di *Arundo donax*.

12.5.3 Production of SCOs by oleaginous yeasts

Hydrolysates of lignocellulosic biomasses have been used for the production of SCOs by fermentation of oleaginous yeasts, that are able to accumulate lipids up to 65% of their biomass (*Angerbauer et al., 2008*), using different compounds as nutrients, such as pentose and hexose sugars (*Chi et al., 2010*).

Oleaginous yeasts have attracted growing interest due to their simple cultural needs: they only require a C/N ratio > 30 to enable accumulation of intracellular lipids. Under the same conditions, non-oleaginous microorganisms synthesize mainly monosaccharides

Another important advantage offered by oleaginous yeasts stems from their ability to synthesize lipids, under aerobic conditions, using agro-industrial wastes as nutrients, as already shown for the species *Rhodotorula glutinis* (Easterling et al., 2009), *Rhorosporidium toruloides* (Li et al., 2007), *Trichosporon fermentans* (Zhu et al., 2008) and *Lipomyces starkeyi* (*Angerbauer et al., 2008; Zhao et al., 2008*).

Most of the experimental activity carried out within this project was made using the yeast *Lipomyces starkeyi*, which offers higher biomass and lipid yields, and ensures a minimum tendency to reuse accumulated lipids (Ratledge, 2004). A typical fermentation of *Lipomyces starkeyi* in the presence of hydrolysates of *Arundo donax* is described in Figure 3.

The experimental data in Figure 3 show that complete conversion of glucose is achieved in about 48 h. The metabolism of pentose sugars starts after about 24 h, when the concentration of glucose (easier to metabolize) is significantly reduced. Microbial growth continues until the complete exhaustion of sugars, that in this case is not limited by inhibition phenomena. The concentration

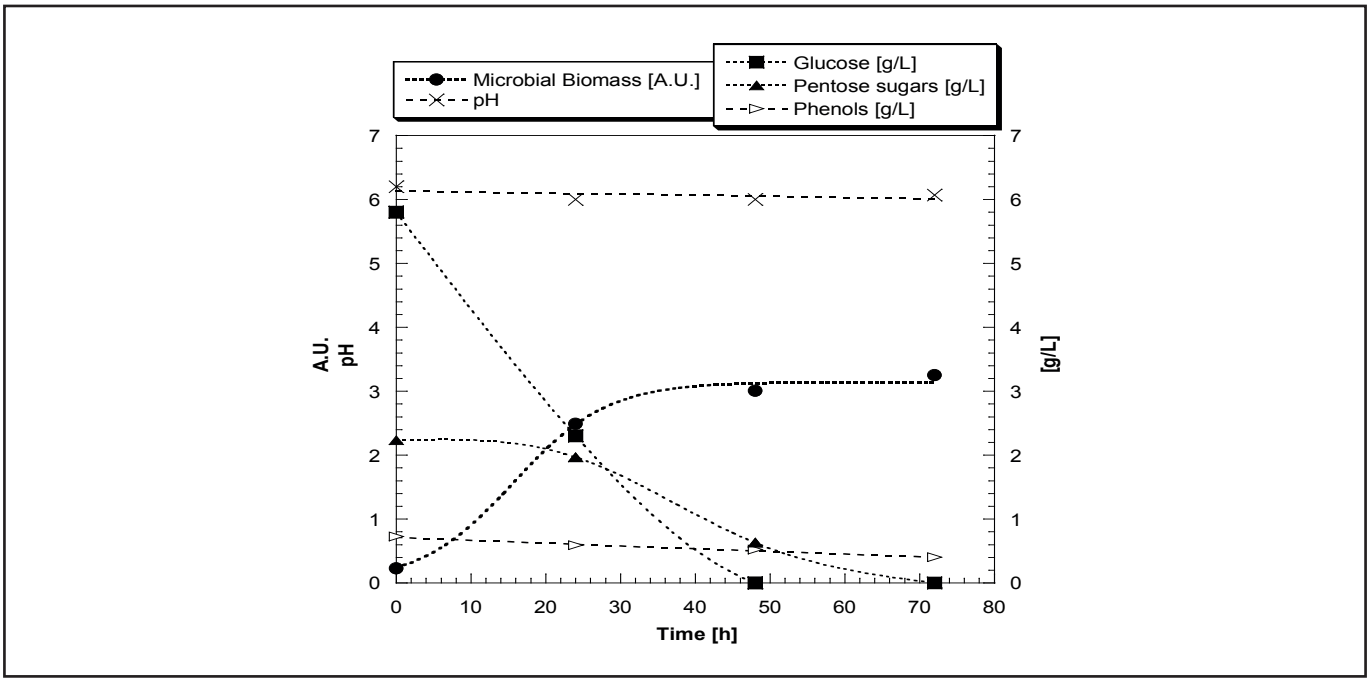


Figure 3. Profili di pH e di concentrazione di biomassa e di metaboliti in funzione del tempo. Microorganismo: Lipomyces starkeyi. Terreno di coltura: esploso Arundo donax (T=30 °C, 160 rpm, 72 h)

Figure 3. pH, biomass concentration and metabolite concentration profiles as a function of time. Microorganism: Lipomyces starkeyi. Culture medium: steam-exploded Arundo donax (T=30 °C, 160 rpm, 72 h)

Tabella 4. Distribuzione (%) dei residui degli acidi grassi negli SCO ottenuti in diverse condizioni sperimentali

Table 4. Distribution (%) of fatty acid residues in SCOs under different experimental conditions.

Hydrolyzed sample	*ADH 50% (TL100w)*	*ADH 50% (TL0w)*	*ADH 50% (CR)*	*ADH 50% (TL100w) after active carbon ads.*	*ADH 100% (TL100w) with adapted L. starkeyi*
Myristic acid C14:0	2	1,8	1,9	1,7	1,9
Palmitic acid C16:0	23,7	24,1	23,8	22,3	22,7
Palmitoleic acid C16:1	<1	<1	<1	<1	<1
Stearic acid C18:0	16,3	16,2	16,3	15,8	16,0
Oleic acid C18:1	46,5	45,8	46	49,5	48,7
Linoleic acid C18:2	6,5	6,7	6,6	6,3	6,4
Linolenic acid C18:3	1,6	1,8	1,8	1,5	1,5
Arachidonic acid C20:4	<1	<1	<1	<1	<1

ADH 50% = water-hydrolysate mixtures containing an hydrolysate fractions of 50%.
ADH 100% = raw hydrolysate.

ADH 50% = water-hydrolysate mixtures containing a hydrolysate fraction of 50%.
ADH 100% = raw hydrolysate.

I dati in Figura 3 mostrano una conversione completa del glucosio in ca. 48 ore. Gli zuccheri pentosi presenti iniziano ad essere metabolizzati dopo ca. 24 ore, quando la concentrazione di glucosio (più facile da metabolizzare) si è già notevolmente ridotta. La crescita microbica prosegue fino all'esaurimento completo degli zuccheri, che in questo caso non è limitato da fenomeni di inibizione. La concentrazione di fenoli, generati durante il pretrattamento per decomposizione della frazione ligninica, rimane sostanzialmente costante.
I lipidi prodotti dai lieviti oleaginosi sono prevalentemente costituiti da trigliceridi, con caratteristiche simili a quelli degli oli vegetali per quanto riguarda la distribuzione dei residui di acidi grassi. Infatti, la biosintesi degli acidi grassi è diretta preferenzialmente verso gli acidi grassi C16 e C18, inizialmente saturi, e successivamente modificati da una sequenza di enzimi intracellulari (elongasi e desaturasi) in grado di produrre insaturazioni. Ciò determina negli SCO dei lieviti oleaginosi frazioni relativamente elevate di residui di acido oleico (C18:1, n-9), linoleico(C18:2, n-6), palmitico (C16:0) palmitoleico (C16:1) e alfa-linolenico (C18:3). La distribuzione abbastanza equilibrata tra residui di acidi saturi ed insaturi influenza positivamente le proprietà del biodiesel prodotto.
La Tabella 4 rappresenta la distribuione dei residui di acidi grassi negli SCO ottenuti dai lieviti *Lipomyces starkeyi* coltivati in presenza di idrolizzati di *Arundo donax* in diverse condizioni sperimentali.

La frazione di residui di acidi grassi insaturi rappresenta in tutti i casi circa la metà del totale. Il contenuto non eccessivo di residui insaturi consente la produzione di un biodiesel con limitata tendenza all'autoossidazione, dunque piuttosto stabile. D'altronde la frazione di residui insaturi è sufficientemente elevata da limitare la tendenza del biodiesel alla gelificazione, il che consente un'efficiente *cold performance* del biocombustibile.

of phenols, generated during the pre-treatment by decomposition of the lignine fraction, remains substantially constant.
The lipids produced by oleaginous yeasts are mostly triglycerides, with a fatty acid distribution substantially similar to that of vegetable oils. Indeed, the biosynthesis of fatty acids is preferentially oriented towards the fatty acids C16 and C18, which are initially saturated, and are subsequently modified by a sequence of intracellular enzymes (elongases and desaturases), that produce unsaturations. As a consequence, the fatty acid residues of SCOs include significant fractions of residues of oleic (C18:1, n-9), linoleic (C18:2, n-6), palmitic (C16:0) palmitoleic (C16:1) and alpha-linolenic (C18:3) acids. The equilibrated distribution between residues of saturated and unsaturated acids positively affects the properties of the biodiesel obtained.
The distribution of fatty acid residues in SCOs obtained by fermentation of *Lipomyces starkeyi* grown in the presence of hydrolysates of *Arundo donax,* under different experimental conditions, is described in Table 4.

Whatever the conditions adopted, the fraction of unsaturated residues is about 50%. The relatively limited content of unsaturated residues reduces the tendency to autoxidation of biodiesel, thus improving the stability of the final product. In the same time, the fraction of unsaturated residues is high enough to limit the tendency to gelification of biodiesel, thus improving the *cold performance* of the biofuel.

12.5.4 Innovazioni di processo

L'esigenza di ridurre le spese di investimento e di esercizio nella produzione di oli microbici è particolarmente sentita quando il processo è finalizzato alla produzione di biodiesel, un prodotto di basso valore aggiunto il cui costo è strettamente dipendente da quello delle materie prime. Nel seguito verranno descritte alcune modifiche di processo sviluppate a tale scopo nell'ambito di questo progetto, con i principali risultati ottenuti.

Integrazione degli stadi di idrolisi e fermentazione

Un importante passo avanti ai fini della razionalizzazione del processo e della riduzione dei costi operativi è rappresentato della realizzazione in un unico reattore dei primi due stadi del processo: l'idrolisi della biomassa lignocellulosica pre-trattata e la fermentazione dell'idrolizzato (SSF: Simultanous Saccarification and Fermentation). Oltre alla semplificazione impiantistica, la SSF consente di convertire i monosaccaridi non appena essi vengono prodotti per idrolisi, evitando eccessivi accumuli e dunque facendo sì che il metabolismo dei lieviti non sia soggetto ad inibizione da substrato (Liu et al., 2012; Gong et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Il principale ostacolo all'integrazione dei due stadi di processo è rappresentato dalle diverse condizioni operative richieste dai biocatalizzatori impiegati. I lieviti hanno temperature ottimali per la crescita e la produttività comprese nel range 30÷37 °C , mentre gli enzimi idrolitici hanno una temperatura ottimale nel range 40÷50 °C (Olsson et al., 2006; Saha et al., 2005; Wingren et al., 2003). Per questo motivo è stato necessario individuare condizioni operative che rappresentassero un compromesso tra le opposte esigenze.

La Figura 4 rappresenta il tipico andamento della fermentazione di *Lipomyces starkeyi* in presenza di idrolizzati di *Arundo donax* durante una SSF effettuata a 40°C. A differenza delle fermentazioni svolte separatamente dall'idrolisi della biomassa, in questo caso è evidente come la concentrazione di zuccheri aumenti nel corso del processo (per effetto dell'idrolisi) per ridursi successivamente (per effetto della fermentazione). Comunque la conversione degli zuccheri generati è sempre completa, tranne che nel caso in cui il pH non viene controllato.

12.5.4 Process innovation

Reducing the investment and operating costs in the production of SCOs is of critical importance when the final product is biodiesel, as biodiesel is a low-added value product and its final cost is strictly dependent on the price of feedstock. In light of the above, some innovative approaches have been tested to improve the economic balance of the process.

Simultaneous hydrolysis and fermentation

An important process improvement can be obtained by integrating the first two stages of the process: hydrolysis of the pre-treated lignocellulosic biomass and fermentation of the hydrolysate (SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation). Obviously, SSF allows a simpler plant configuration. In addition, it allows the immediate conversion of monosaccharides as soon as they are produced by hydrolysis, thus avoiding their accumulation and preventing the inhibition of yeast metabolism caused by higher substrate concentration (Liu et al., 2012; Gong et al., 2013; Zhang et al., 2014).

The main obstacle for SSF stems from the different operating conditions required by the biocatalysts: the optimal temperatures for yeast growth and lipid accumulation are in the range 30-37 °C , whereas the rate of enzymatic hydrolysis peaks in the range 40-50 °C (Olsson et al., 2006; Saha et al., 2005; Wingren et al., 2003). Consequently, compromise conditions were adopted.

A typical SSF of *Lipomyces starkeyi* carried out at 40°C in the presence of hydrolysates of *Arundo donax* is described in Figure 4. An initial increase in the reducing sugar concentration can be observed (due to the prevalence of hydrolysis), followed by a subsequent reduction (due to fermentation). In any case complete conversion of reducing sugars is achieved, except the case in which no pH control is operated.

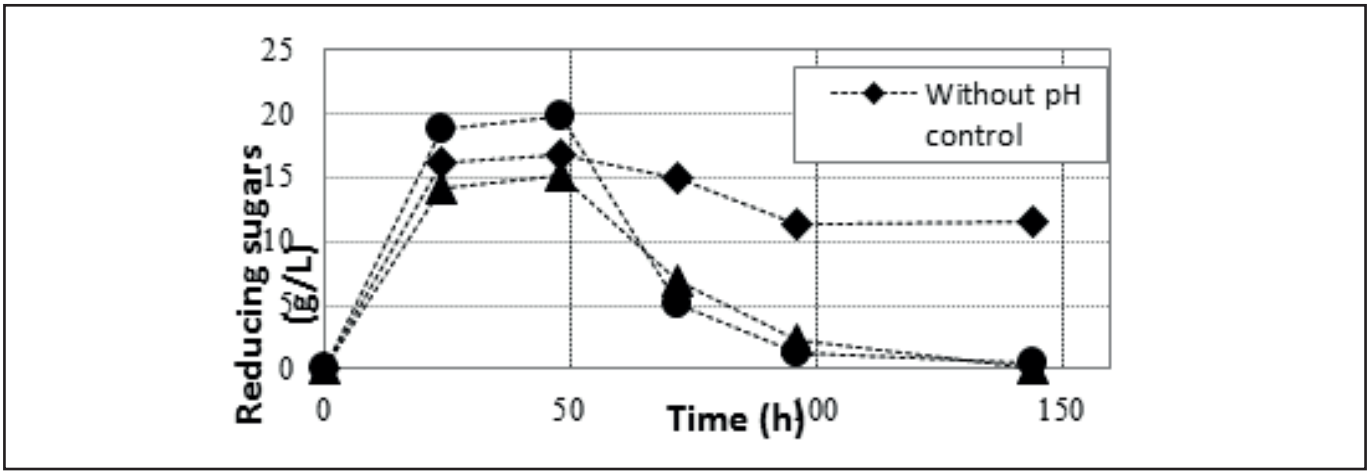


Figura 4. Profili concentrazione-tempo di zuccheri riducenti con vari metodi di controllo del pH (T=40 °C, 160 rpm, 144 h)

Figure 4. Concentration-time profiles of reducing sugars, adopting different pH-control methods (T=40 °C, 160 rpm, 144 h)

Colture miste di lieviti e microalghe

Un ulteriore miglioramento dell'efficienza del processo può essere ottenuta attraverso la realizzazione di colture miste, utilizzando due diversi tipi di microorganismi oleaginosi: lieviti e microalghe. Rispetto ai lieviti oleaginosi, le microalghe hanno esigenze colturali più complesse, in quanto richiedono un accurato controllo dell'irraggiamento luminoso e della concentrazione di anidride carbonica. In compenso, possono offrire frazioni più elevate di lipidi (fino all'80%), e produrre oltre ai lipidi sostanze ad alto valore aggiunto come prodotti per cosmetica, nutraceutici, biopolimeri (Demirbas, 2009). Anche i lipidi prodotti dalle microalghe sono prevalentemente costituiti da trigliceridi (Chen et al., 2009). Le microalghe possono avere varie tipologie di metabolismo: fotoautotrofico, fotoeterotrofico, chemoeterotrofico, mixotrofico (Mata et al., 2010; Zhao et al., 2012).

La maggior parte dell'attività sperimentale svolta nell'ambito di questo progetto è stata realizzata utilizzando il lievito *Lipomyces starkeyi* e la microalga *Chlorella emersonii*. E' stato possibile ottenere un effetto sinergico realizzando colture mixotrofiche di lieviti e microalghe, sfruttando la complementariatà tra nutrienti e prodotti coinvolti nel loro metabolismo (Cheirsilp et al., 2011):

- i lieviti, essendo eterotrofi, consumano ossigeno producendo anidride carbonica come prodotto finale del metabolismo;
- le microalghe, essendo mixotrofiche, sono in grado di utilizzare come nutriente l'anidride carbonica prodotta dai lieviti, generando come prodotto finale del metabolismo dell'ossigeno che può essere utilizzato dai lieviti stessi.

La Figura 5 rappresenta l'andamento di una coltura mixotrofica effettuata con *Lipomyces starkeyi* e *Chlorella emersonii* in presenza di idrolizzati di *Arundo donax*. Le curve indicano che nella parte iniziale del test i lieviti e le microalghe proliferano simultaneamente. In tutte le condizioni sperimentali adottate la conversione degli zuccheri presenti nel terreno di coltura è sempre completa.

Mixed cultures of yeasts and microalgae

A further improvement in process efficiency can be achieved by performing mixed cultures of oleaginous yeasts and microalgae. Microalgae have more complex cultural needs in comparison to yeasts, as they require strict control of light irradiation and CO_2 concentration. As compensation, microalgae may offer high lipid yields (up to 80%), and also produce a range of high-added value compounds, such as ingredients for cosmetics, nutraceuticals and biopolymers (*Demirbas, 2009*). Lipids from microalgae are mainly made of triglycerides, too (*Chen et al., 2009*). Microalgae may present different types of metabolism: photoautotrophic, photoheterotrophic, chemoheterotrophic and mixotrophic (*Mata et al., 2010; Zhao et al., 2012*).

Most of the experimental activity carried out within this project was made using the yeast *Lipomyces starkeyi* and the microalga *Chlorella emersonii*. A synergistic effect was obtained carrying out mixotrophic cultures of yeasts and microalgae, due to the complementarity between nutrients and products of their metabolisms (Cheirsilp et al., 2011):

- Yeasts, being heterotrophic, consume oxygen and produce CO_2 as a final product of metabolism;
- microalgae, being mixotrophic, can use the CO_2 produced by yeasts as a nutrient, and generate oxygen as a final product, which can be used by yeasts.

A typical mixotrophic culture of *Lipomyces starkeyi* and *Chlorella emersonii* carried out in the presence of hydrolysates of *Arundo donax* is described in Figure 5. The experimental data indicate an initial simultaneous proliferation of yeasts and microalgae. Whatever the experimental conditions adopted, a complete conversion of sugars is achieved.

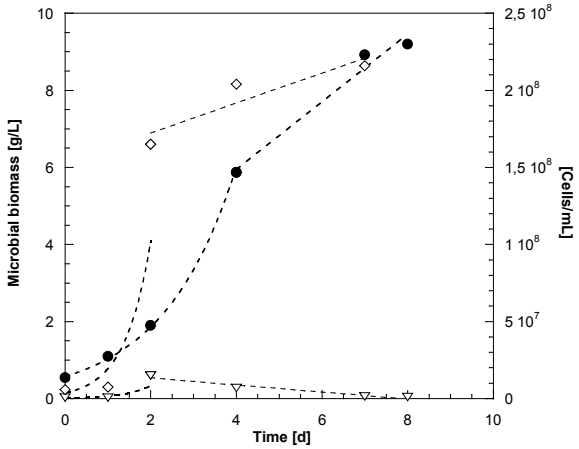


Figura 5. Profili concentrazione-tempo di biomassa totale (●), di conta cellulare su piastra (▽, Chlorella emersonii 316/25; ◇, Lipomyces starkeyi DBVG 6193). Fermentazione mixotrofica di Chlorella emersonii 316/25 e Lipomyces starkeyi DBVPG 6193 in presenza di idrolizzati di Arundo donax.

Figure 5. Concentration-time profiles: total biomass (●),plate counts (▽, *Chlorella emersonii 316/25*; ◇, *Lipomyces starkeyi DBVG 6193*). Mixotrophic fermentation of *Chlorella emersonii 316/25* and *Lipomyces starkeyi DBVPG 6193* in the presence of hydrolysates of *Arundo donax*.

12.5.5 Transesterificazione degli oli microbici

L'ultimo passaggio per la produzione di biodiesel è rappresentato dalla transesterificazione degli oli microbici ottenuti. Tradizionalmente la transesterificazione viene realizzata in presenza di catalizzatori alcalini, tipicamente NaOH, grazie ai quali i trigliceridi reagiscono con metanolo per produrre biodiesel (costituito da esteri metilici di acidi grassi) e glicerina, un sottoprodotto il cui impiego può contribuire a migliorare il bilancio economico del processo.

Obiettivo della sperimentazione realizzata nell'ambito di questo progetto è stato innanzitutto l'impiego di enzimi (lipasi) come catalizzatori in sostituzione dell'NaOH. Infatti, oli non convenzionali come gli SCO sono generalmente caratterizzati da un elevato tenore di acidi grassi liberi. Questi ultimi possono reagire con NaOH, producendo dei sali, cosa che, oltre ad aumentare il consumo di catalizzatore inorganico, determina la formazione di schiume e dunque un abbassamento nella resa del prodotto finale. L'impiego di lipasi come catalizzatore consente invece di evitare la formazione di schiume. Inoltre, le lipasi catalizzano anche l'esterificazione degli acidi grassi presenti, consentendo anche di evitare che questi ultimi rimangano inutilizzati.

Un secondo obiettivo della sperimentazione è stato il riciclo del glicerolo co-prodotto come nutriente per la fermentazione dei microorganismi oleaginosi. I test effettuati hanni dimostrato che l'aggiunta del glicerolo ai terreni di coltura utilizzati per la fermentazione dei lieviti oleaginosi può essere realizzata mantenendo elevate e rese in lipidi. Tra l'altro il glicerolo, essendo privo di atomi di azoto, può essere utilizzato per regolare opportunamente il rapporto C/N anche quando sono disponibili come materie prime reflui per i quali questo rapporto è troppo basso per le esigenze dei microorganismi oleaginosi.

Bibliografia

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M, (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by Lipomyces starkeyi for biodiesel production. Bioresour Technol 99, 3051–3056.

Basu, P., 2010. Biomass gasification and pyrolysis: practical design and theory. Academic press.

Boswell, K., Koskelo, E.K., Carl, L., Glaza, S., Hensen, D.J., Williams, K.D., Kyle, D.J., (1996). Preclinical evaluation of single-cell oils that are highly enriched with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. Food Chemic. Toxicol. 34, 585-593.

Bridgwater, A.V., Meier, D., Radlein D., 1999. An overview of fast pyrolysis of biomass. Organic Geochemistry, 30, 1479-93.

Channiwala, S. A., Parikh, P. P., 2002. A unified correlation for estimating HHV of solid, liquid and gaseous fuels. Fuel, 818, 1051-1063.

Cheirsilp, B., Suwannarat, W., & Niyomdecha, R., (2011). Mixed culture of oleaginous yeast Rhodotorula

12.5.5 Transesterification of SCOs

The transesterification of SCOs is the last stage of biodiesel production. Usually, transesterification is carried out using alkaline inorganic catalysts (typically NaOH), by reaction of triglycerides with methanol. The products are biodiesel (fatty acid methyl esters) and glycerol, a by-product that can be used to improve the economic balance of the process.

Most of the experimental activity carried out within this project was made using enzymes (lipases) as catalysts to replace NaOH. In fact, non-conventional oils such as SCOs usually present higher levels of free fatty acids. Free fatty acids may react with NaOH to produce salts, thus consuming the inorganic catalyst. In addition, salts promote foaming, reducing the final yield in biodiesel. Using lipases as a catalyst, foaming is avoided. In addition, lipases also catalyse the esterification of free fatty acids, increasing the yield in biodiesel.

A second target of experiments was to re-cycle the co-produced glycerol, as a nutrient for the fermentation of the oleaginous microorganisms. Our experiments showed that the addition of glycerol to growth media for oleaginous yeast fermentation can be carried out with no significant reduction in lipid yield. It is worth noting that glycerol is nitrogen-free, and hence can be used to increase the C/N ratio of the fermentation media, especially when the available waste feedstock has too low a C/N ratio to enable lipid accumulation in the oleaginous yeasts.

References

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M, (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by Lipomyces starkeyi for biodiesel production. Bioresour Technol 99, 3051–3056.

Basu, P., 2010. Biomass gasification and pyrolysis: practical design and theory. Academic press.

Boswell, K., Koskelo, E.K., Carl, L., Glaza, S., Hensen, D.J., Williams, K.D., Kyle, D.J., (1996). Preclinical evaluation of single-cell oils that are highly enriched with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. Food Chemic. Toxicol. 34, 585-593.

Bridgwater, A.V., Meier, D., Radlein D., 1999. An overview of fast pyrolysis of biomass. Organic Geochemistry, 30, 1479-93.

Channiwala, S. A., Parikh, P. P., 2002. A unified correlation for estimating HHV of solid, liquid and gaseous fuels. Fuel, 818, 1051-1063.

Cheirsilp, B., Suwannarat, W., & Niyomdecha, R., (2011). Mixed culture of oleaginous yeast Rhodotorula glutinis and microalga Chlorella vulgaris for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. New Biotechnology, 28, 362–368.

Chen, X., Li, Z.H., Zhang, X., Hu, F.X., Ryu, D.D.Y., Bao, J., (2009). Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. Appl Biochem Biotechnol, 159, 591-604.

glutinis and microalga Chlorella vulgaris for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. New Biotechnology, 28, 362–368.

Chen, X., Li, Z.H., Zhang, X., Hu, F.X., Ryu, D.D.Y., Bao, J., (2009). Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. Appl Biochem Biotechnol, 159, 591-604.

Cherubini, F., and Strømman, A.H., (2011). Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. Biofuels, Bioprod. Bioref. 5, 548-561.

Chi, Z., Zheng, Y., Lucker, B., Chen, S., (2010). Integrated system for productioin of biofuel feedstock. Google Patents.

Civitarese, V., Faugno, S., Pindozzi, S., Assirelli, A., Pari, L. 2015. Effect of short rotation coppice plantation on the performance and chips quality of a self-propelled harvester. Biosystems Engineering, 129, 370-377.

Demirbas, A., (2009). Production of biodiesel from algae oils. Energy Sources Part A- Recovery Utilization and Environmental Effects, 31, 163–168.

Demirbas, A., Arin, G., 2005. An overview of biomass pyrolysis. Energy Sources, 24, 471-82.

Di Blasi, C., 2009. Combustion and gasification rates of lignocellulosic chars. Progress in energy and combustion science, 35, 121-40.

Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R., Licha, M., (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of Rhodotorula glutinis. Bioresour Technol, 100, 356–361.

Giudicianni, P., Pindozzi, S., Grottola, C. M., Stanzione, F., Faugno, S., Fagnano, M., Fiorentino, N., Ragucci, R., 2017. Pyrolysis for exploitation of biomasses selected for soil phytoremediation: Characterization of gaseous and solid products. Waste Management. In press.

Gong, Z., Wang, Q., Shen, H., Hu, C., Jin, G., Zhao, Z.K., (2012). Co-fermentation of cellobiose and xylose by Lipomyces starkeyi for lipid production. Bioresour. Technol. 117, 20-24.

Huang, C., Chen, X.F., Xiong, L., Chen, X.D., Ma, L.L., Chen, Y., (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. Biotechnol Adv 31, 129–139.

Jarboe, L.R., Wen, Z.,Choi, D., Brown, R.C. (2011). Hybrid thermochemical processing: fermentation of pyrolysis-derived bio-oil. Appl Microbiol Biotechnol., 91(6),1519-23.

Kuppens, T., Van Dael, M., Vanreppelen, K., Thewys, T., Yperman, J., Carleer, R., Schreurs, S., Van Passel, S., 2015. Techno-economic assessment of fast pyrolysis for the valorization of short rotation coppice cultivated for phytoextraction. Journal of Cleaner Production, 88, 336-344.

Li, Y.H., Zhao, Z.B., Bai, F.W., (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloi-

Cherubini, F., and Strømman, A.H., (2011). Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. Biofuels, Bioprod. Bioref. 5, 548-561.

Chi, Z., Zheng, Y., Lucker, B., Chen, S., (2010). Integrated system for productioin of biofuel feedstock. Google Patents.

Civitarese, V., Faugno, S., Pindozzi, S., Assirelli, A., Pari, L. 2015. Effect of short rotation coppice plantation on the performance and chips quality of a self-propelled harvester. Biosystems Engineering, 129, 370-377.

Demirbas, A., (2009). Production of biodiesel from algae oils. Energy Sources Part A- Recovery Utilization and Environmental Effects, 31, 163–168.

Demirbas, A., Arin, G., 2005. An overview of biomass pyrolysis. Energy Sources, 24, 471-82.

Di Blasi, C., 2009. Combustion and gasification rates of lignocellulosic chars. Progress in energy and combustion science, 35, 121-40.

Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R., Licha, M., (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of Rhodotorula glutinis. Bioresour Technol, 100, 356–361.

Giudicianni, P., Pindozzi, S., Grottola, C. M., Stanzione, F., Faugno, S., Fagnano, M., Fiorentino, N., Ragucci, R., 2017. Pyrolysis for exploitation of biomasses selected for soil phytoremediation: Characterization of gaseous and solid products. Waste Management. In press.

Gong, Z., Wang, Q., Shen, H., Hu, C., Jin, G., Zhao, Z.K., (2012). Co-fermentation of cellobiose and xylose by Lipomyces starkeyi for lipid production. Bioresour. Technol. 117, 20-24.

Huang, C., Chen, X.F., Xiong, L., Chen, X.D., Ma, L.L., Chen, Y., (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. Biotechnol Adv 31, 129–139.

Jarboe, L.R., Wen, Z.,Choi, D., Brown, R.C. (2011). Hybrid thermochemical processing: fermentation of pyrolysis-derived bio-oil. Appl Microbiol Biotechnol., 91(6),1519-23.

Kuppens, T., Van Dael, M., Vanreppelen, K., Thewys, T., Yperman, J., Carleer, R., Schreurs, S., Van Passel, S., 2015. Techno-economic assessment of fast pyrolysis for the valorization of short rotation coppice cultivated for phytoextraction. Journal of Cleaner Production, 88, 336-344.

Li, Y.H., Zhao, Z.B., Bai, F.W., (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture. Enzyme Microb. Technol., 41, 312–317.

Liu, W., Wang, Y., Zhanchun, Y., Bao, J., (2012). Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast Trichosporon cutaneum. Bioresource Technol 118, 1-18.

des Y4 in fed-batch culture. Enzyme Microb. Technol., 41, 312–317.

Liu, W., Wang, Y., Zhanchun, Y., Bao, J., (2012). Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast Trichosporon cutaneum. Bioresource Technol 118, 1-18.

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14, 217-232.

Mettanant, V., Basu, P., Butler, J., 2009. Agglomeration of biomass fired fluidized bed gasifier and combustor. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 87, 656-684.

Olsson, L., Soerensen, H.R., Dam, B.P., Christensen, H., Krogh, K.M., Meyer, A.S., (2006). Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing Saccharomyces Cerevisiae. Appl Biochem Biotechnol 129-132, 117-129.

Paethanom, A., Nakahara, S., Kobayashi, M., Prawisudha, P., & Yoshikawa, K., 2012. Performance of tar removal by absorption and adsorption for biomass gasification. Fuel Processing Technology, 104, 144-154.

Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2007). Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. Eur J Lipid Sci Technol 109, 1060–1070.

Pirozzi, D., Fiorentino, N., Impagliazzo, A., Sannino, F., Yousuf, A., Zuccaro, G., Fagnano, M., (2015). Lipid production from Arundo donax under different agronomical conditions. Renewable Energy 77, 456-462.

Pirozzi, D., Yousuf, A., Fagnano, M., Mori, M., Fiorentino, N., Impagliazzo, A., (2010). Lipids production by yeast grown on giant reed biomass. J Biotechnol. 150, 167-178.

Ratledge, C., (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. Biochimie 86, 807–815.

Ruoppolo, G., Ammendola, P., Chirone, R., Miccio, F., 2012. H2-rich syngas production by fluidized bed gasification of biomass and plastic fuel. Waste Management, 32, 724-732.

Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., (2005). Dilute acid pretreatment enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. Biotechnol Prog 21, 816-822.

Savova, D., Apak, E., Ekinci, E., Yardim, F., Petrov, N., Budinova, T., Razvigorova, M., Minkova, V., 2001. Biomass conversion to carbon adsorbents and gas. Biomass and Bioenergy, 21, 133-142.

Schuster, G., Löffler, G., Weigl, K., & Hofbauer, H., 2001. Biomass steam gasification–an extensive parametric modeling study. Bioresource technology, 77, 71-79.

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14, 217-232.

Mettanant, V., Basu, P., Butler, J., 2009. Agglomeration of biomass fired fluidized bed gasifier and combustor. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 87, 656-684.

Olsson, L., Soerensen, H.R., Dam, B.P., Christensen, H., Krogh, K.M., Meyer, A.S., (2006). Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing Saccharomyces Cerevisiae. Appl Biochem Biotechnol 129-132, 117-129.

Paethanom, A., Nakahara, S., Kobayashi, M., Prawisudha, P., & Yoshikawa, K., 2012. Performance of tar removal by absorption and adsorption for biomass gasification. Fuel Processing Technology, 104, 144-154.

Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2007). Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. Eur J Lipid Sci Technol 109, 1060–1070.

Pirozzi, D., Fiorentino, N., Impagliazzo, A., Sannino, F., Yousuf, A., Zuccaro, G., Fagnano, M., (2015). Lipid production from Arundo donax under different agronomical conditions. Renewable Energy 77, 456-462.

Pirozzi, D., Yousuf, A., Fagnano, M., Mori, M., Fiorentino, N., Impagliazzo, A., (2010). Lipids production by yeast grown on giant reed biomass. J Biotechnol. 150, 167-178.

Ratledge, C., (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. Biochimie 86, 807–815.

Ruoppolo, G., Ammendola, P., Chirone, R., Miccio, F., 2012. H2-rich syngas production by fluidized bed gasification of biomass and plastic fuel. Waste Management, 32, 724-732.

Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., (2005). Dilute acid pretreatment enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. Biotechnol Prog 21, 816-822.

Sas-Nowosielska, A., Kucharski, R., Małkowski, E., Pogrzeba, M., Kuperberg, J. M., & Kryński, K. (2004). Phytoextraction crop disposal—an unsolved problem. Environmental Pollution, 128(3), 373-379.

Savova, D., Apak, E., Ekinci, E., Yardim, F., Petrov, N., Budinova, T., Razvigorova, M., Minkova, V., 2001. Biomass conversion to carbon adsorbents and gas. Biomass and Bioenergy, 21, 133-142.

Schuster, G., Löffler, G., Weigl, K., & Hofbauer, H., 2001. Biomass steam gasification–an extensive parametric modeling study. Bioresource technology, 77, 71-79.

Vigil, M., Marey-Pérez, M. F., Huerta, G. M., & Cabal,

Vigil, M., Marey-Pérez, M. F., Huerta, G. M., & Cabal, V. Á., 2015. Is phytoremediation without biomass valorization sustainable? Comparative LCA of landfilling vs. anaerobic co-digestion. Science of the Total Environment, 505, 844-850.

Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. Biotechnol Prog 19, 1109-1117.

Zevenhoven-Onderwater, M., Backman, R., Skrifvars, B. J., Hupa, M., 2001. The ash chemistry in fluidised bed gasification of biomass fuels. Part I: predicting the chemistry of melting ashes and ash–bed material interaction. Fuel, 80, 1489-1502.

Zhang, J., Zhang, W.X., You, L., Yin, L.G., Du, Y.H., Yang, J., (2014). Modified method combining in situ detoxification with Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSCF) as a single step for converting exploded rice straw into ethanol. J. Agric. Food Chem. 62, 7486-7495.

Zhao, G.L., Yu, J.Y., Jiang, F.F., Zhang, X., Tan, T.W., (2012). The effect of different trophic modes on lipid accumulation of Scenedesmus quadricauda. Bioresour. Technol., 114, 466–471.

Zhao, X., Kong, X.L., Hua, Y.Y., Feng, B., Zhao, Z.B., (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast Lipomyces starkeyi. Eur J Lipid Sci Technol 110, 405–12.

Zhu, L.Y., Zong, M.H., Wu, H., (2008). Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation. Bioresour Technol, 99, 7881–7885.

V. Á., 2015. Is phytoremediation without biomass valorization sustainable? Comparative LCA of landfilling vs. anaerobic co-digestion. Science of the Total Environment, 505, 844-850.

Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. Biotechnol Prog 19, 1109-1117.

Zevenhoven-Onderwater, M., Backman, R., Skrifvars, B. J., Hupa, M., 2001. The ash chemistry in fluidised bed gasification of biomass fuels. Part I: predicting the chemistry of melting ashes and ash–bed material interaction. Fuel, 80, 1489-1502.

Zhang, J., Zhang, W.X., You, L., Yin, L.G., Du, Y.H., Yang, J., (2014). Modified method combining in situ detoxification with Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSCF) as a single step for converting exploded rice straw into ethanol. J. Agric. Food Chem. 62, 7486-7495.

Zhao, G.L., Yu, J.Y., Jiang, F.F., Zhang, X., Tan, T.W., (2012). The effect of different trophic modes on lipid accumulation of Scenedesmus quadricauda. Bioresour. Technol., 114, 466–471.

Zhao, X., Kong, X.L., Hua, Y.Y., Feng, B., Zhao, Z.B., (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast Lipomyces starkeyi. Eur J Lipid Sci Technol 110, 405–12.

Zhu, L.Y., Zong, M.H., Wu, H., (2008). Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation. Bioresour Technol, 99, 7881–7885.

Il monitoraggio degli effetti del risanamento (messa in sicurezza/bonifica)

Monitoring the effects of reclamation (securing/remediation)

13. Qualità dell'ecosistema

13a. Biomonitoraggio di metalli e IPA aerodiffusi: linee guida per l'utilizzo delle moss bags

S. Giordano, P. Adamo, V. Spagnuolo, F. Capozzi, A. Di Palma

Stato dell'arte

Il monitoraggio biologico o "biomonitoraggio", si basa sull'analisi di particolari organismi "bioindicatori" o comunità di essi, per valutare le variazioni dello stato ambientale da situazioni considerate inalterate (naturali). Due sono le principali tecniche di biomonitoraggio: i) quelle basate sul bioaccumulo, nel quale viene valutato il contenuto di inquinanti in organismi in grado di tollerare e quindi assorbire elevate quantità di elementi/composti xenobiotici; ii) tecniche di bioindicazione, mediante le quali si studia l'effetto dell'inquinamento su organismi o comunità di questi capaci di fornire importanti informazioni sulla funzionalità di un ecosistema.

La tecnica applicata nel corso del progetto Life ENV-IT 275 ECOREMED è basata sul bioaccumulo. Quest'ultimo consente di correlare le concentrazioni di inquinanti nei tessuti vegetali ai livelli di inquinamento presenti nell'ambiente, e può essere effettuata seguendo due diverse modalità: i) analizzando il contenuto di inquinanti in specie indigene ("biomonitoraggio-passivo"); ii) trapiantando organismi con particolari caratteristiche e opportunamente trattati nei luoghi da monitorare ("biomonitoraggio-attivo").

Il biomonitoraggio attivo e passivo offre diversi vantaggi:

13. Ecosystem quality

13a. Biomonitoring of airborne PAHs and heavy metals: guidelines for the moss bag approach

S. Giordano, P. Adamo, V. Spagnuolo, F. Capozzi, A. Di Palma

State of the art

Biological monitoring, or "biomonitoring", is based on the analysis of organisms, called "bioindicators", or their communities, to evaluate variations from the natural state of the environment (undisturbed conditions). There are two main biomonitoring methodologies: first, those based on the accumulation of xenobiotics, in which the content of pollutants is assessed in tolerant organisms; secondly, bioindication techniques, based on the effects induced by pollution on sensitive organisms or their communities, able to provide comprehensive information on ecosystem functionality. In the framework of the Life ENV-IT 275 ECOREMED project we applied an approach based on bioaccumulation. This method allows the concentration of pollutants measured in plant tissues to be related to their content in the environment; the method can be performed following two approaches: i) analysing pollutants in naturally growing plant species (passive biomonitoring); ii) transplant-based technique, where specific organisms are transplanted under a rational design into the sites to be monitored (active biomonitoring). These two approaches confer several advantages: a) they provide information on the atmospheric depositions of pollutants at a high density of point measurements and reduced costs;

a) ottenere informazioni sulle deposizioni atmosferiche di inquinanti con costi ridotti ed elevata densità di punti misura; b) identificare pattern di distribuzione degli inquinanti a diversa scala spaziale e temporale; c) implementare e validare i modelli di deposizione degli inquinanti; d) controllare gli effetti prodotti dagli interventi di riduzione delle emissioni di inquinanti; e) valutare le variazioni della qualità dell'aria nel tempo; f) identificare sorgenti puntiformi di emissione di inquinanti; e, quindi, coadiuvare le Amministrazioni nella programmazione di interventi di posizionamento di strumentazioni più complesse in termini di costi di installazione e di gestione.

Tra i vari organismi, i muschi terrestri (Phylum *Bryophyta*) sono stati impiegati per anni in studi di biomonitoraggio della qualità dell'aria. Rispetto alle piante superiori, essi possiedono caratteristiche più vantaggiose per il bioaccumulo di inquinanti atmosferici tali da rendere più semplice correlare la loro composizione chimica con quella dell'ambiente in cui vivono o vengono trapiantati (Bargagli, 2006; Cenci, 1999; Figueira et al., 2002).

Il limite principale legato all'uso di specie indigene (biomonitoraggio passivo) è associato alla presenza/assenza della specie target nell'area da investigare, principalmente a causa di fattori ecologici e/o ambientali (per esempio, ridotta crescita dei muschi in ambienti industriali). Pertanto, la tecnica del trapianto (biomonitoraggio attivo), introdotta a partire dagli anni '60 (e.g. Goodman and Roberts (1971)) è risultata più vantaggiosa, in quanto ha consentito di delineare piani di monitoraggio non più dipendenti dalla crescita della specie target in un dato ambiente. Lavorando, quindi, con i trapianti di muschio qualsiasi sito è monitorabile, comprese le aree a scarsa crescita o assenza dei muschi.

Tra le diverse tecniche di biomonitoraggio attivo quella delle *moss-bags* è la più applicata, e consiste nell'esposizione nei siti da monitorare di muschi prelevati in aree prossimo-naturali e trapiantati all'interno di piccoli sacchetti, generalmente sferoidali e di nylon. Recentemente sono stati condotti studi, nell'ambito di un progetto europeo "EU-FP7 Mossclone", atti a migliorare e standardizzare la metodica espositiva delle moss-bags (Capozzi et al., 2016b, Di Palma et al., 2016). Il progetto ha previsto l'esposizione in siti selezionati di Austria, Italia e Spagna di oltre mille moss-bags contenenti muschio devitalizzato, confrontando diverse caratteristiche e criteri di esposizione. Parallelamente, è stata avviata la produzione in fotobioreattori di cloni del muschio *Sphagnum palustre* L., al fine di eliminare i problemi connessi alla raccolta in natura del muschio e di ottenere un materiale prontamente disponibile per diversi fini applicativi. Alla luce dei risultati ottenuti nell'ambito del progetto Mossclone, è stato considerato più idoneo l'uso di moss-bags con muschio devitalizzato, preferibilmente clonato e del genere *Sphagnum* spp. o *Hypnum* spp. (Beike et al., 2015; González and Pokrovsky, 2014; Di Palma et al., 2016), da esporre in bags sferoidali preparate con una rete a maglia da 2 mm, secondo un rapporto quantità di muschio/area della superficie esposta della bag compreso tra i 5 e i 15 mg cm^{-2}; le bags devono essere esposte per non meno di 6 settimane ad un'altezza di 4 metri dal suolo (Capozzi et al., 2016b).

b) they identify pollutant distribution patterns at different space and time scales; c) they implement and validate the deposition models of pollutants; d) they follow up the effects of measures set up to reduce pollutant emissions; e) they evaluate changes in air quality over time; f) they identify hot-spots of emissions and hence help public administrations to plan the positioning of power-supplied monitoring stations, which are more expensive and demanding in terms of installation and management.

Among the different plant species, terrestrial mosses (Phylum *Bryophyta*) have long been used for air biomonitoring studies. Compared to higher plants, they show particular traits which make them optimal bioaccumulators of airborne pollutants (Bargagli, 2006; Cenci, 1999; Figueira et al., 2002).

The main limitation to using native species (passive biomonitoring) is associated to the presence/absence of the target species in the area under investigation, which is mainly dependent on ecological and/or environmental factors (e.g., reduced moss growth in urban/industrial areas). Therefore, the transplant-based approach (active biomonitoring), introduced in the 1970s (e.g. Goodman and Roberts, 1971) is more advantageous because it allows biomonitoring surveys to be planned independently of the presence of naturally growing species. The most widespread transplant technique is the moss-bag approach; it consists of exposing, in small bags, mosses harvested from pristine areas and transplanted to the sites to be monitored. Recently, within the European project "EU-FP7 Mossclone", an international team of scientists worked on the standardization of the method (Capozzi et al., 2016b, Di Palma et al., 2016). The project was carried out in three different EU countries (Austria, Italy and Spain) in which more than 1000 bags with distinctive characteristics were exposed using different protocols. In parallel, the production of a clone of the moss *Sphagnum palustre* L. was established in photobioreactors, with the aim of eliminating problems connected to the collection of naturally growing mosses and obtaining homogeneous biomaterial ready to use for different applications. The findings of the MOSSclone project suggested the use of moss-bags filled with a devitalized moss clone, of the genus *Sphagnum* spp. or *Hypnum* spp. (Beike et al., 2015; González and Pokrovsky, 2014; Di Palma et al., 2016), to be exposed in spherical bags with a 2 mm mesh net, and with a moss density between 5 and 15 mg cm^{-2} (ratio between moss weight and bag surface area), for a time no shorter than six weeks at a height of 4 m above the ground (Capozzi et al., 2016b).

Protocollo di biomonitoraggio
La metodica descritta di seguito si riferisce all'uso di specie raccolte in natura. La produzione di muschio clonato non è ancora sufficientemente implementata, per cui l'utilizzo di materiale clonato è attualmente limitato ad attività di ricerca a scopi sperimentali.

Campionamento dei muschi e pre-trattamenti
Per il biomonitoraggio attivo della qualità dell'aria si preferisce il campionamento di una specie di muschio pleurocarpo (e.g. *Hypnum* spp.). I muschi vengono raccolti su corteccia di alberi, in aree boschive presumibilmente incontaminate, possibilmente lontane per almeno un raggio di 5 km da fonti note di inquinamento.
Il materiale raccolto viene pulito grossolanamente dal materiale esogeno (foglie, particelle di suolo, ramoscelli, aghi di conifere, ecc) e trasportato in laboratorio in buste di carta per alimenti. In laboratorio, i campioni di muschio vengono sottoposti ai seguenti trattamenti proposti in recenti ricerche (Ares et al., 2012; Capozzi et al., 2016a; Di Palma et al., 2016):
Selezione. Del muschio raccolto si selezionano, con l'aiuto di pinzette in plastica, solo le porzioni apicali verdi dei fusticini (c.a. 4-5 cm), escludendo le parti senescenti o eccessivamente sporche e deteriorate.
Lavaggio. Gli apici recisi vanno lavati in tre passaggi consecutivi:
1. con acqua deionizzata (5 lavaggi di 20 minuti ciascuno) con un rapporto grammi di muschio (peso secco)/litri di acqua pari a 10:1);
2. con una soluzione 10 mmol L^{-1} di EDTA (1 lavaggio di 20 minuti, con un rapporto grammi di muschio (peso secco)/litri di acqua pari a 15:1), in modo da eliminare gli ioni adsorbiti sulle superfici dei muschi;
3. con acqua deionizzata (3 lavaggi di 20 minuti ciascuno) con un rapporto grammi di muschio (peso secco)/litri di acqua pari a 10:1).

Nei lavaggi, per facilitare la rimozione di materiale esogeno per decantazione, il muschio va disposto su una rete di nylon (con maglia di circa 2 mm) e con essa immerso, rimescolando più volte manualmente, in una vaschetta in plastica contenente la soluzione di lavaggio. Al termine dei lavaggi segue una breve fase di asciugatura all'aria su fogli di carta filtro.
Devitalizzazione. Gli apici sottoposti a lavaggio vanno devitalizzati mediante essiccazione in stufa non ventilata a 120 °C per 24 ore. Al termine del processo, i muschi vengono conservati a temperatura ambiente in buste di carta.
Da ricordare che per ciascuna campagna di monitoraggio è essenziale conservare campioni di muschio trattato secondo quanto sopra descritto ma non esposto in bags. La quantità di muschio non esposto (T0) da conservare dipende essenzialmente dal tipo di analisi statistica che si intende eseguire sui dati ottenuti a fine monitoraggio, volta fondamentalmente al confronto tra contenuti pre- e post-esposizione (paragrafo 2.6).

Preparazione delle moss bags
Le *moss bags* di forma sferoidale (Figura 1) vengono preparate al fine di ottenere un rapporto peso del muschio/

Biomonitoring protocol
The following protocol relates to the use of moss collected from nature. The in vitro-cloning of mosses is not yet implemented, hence limited to research purposes.

Sampling and pre-treatment of the moss material
For active biomonitoring of air quality, sampling of a pleurocarpous moss is preferred (e.g. *Hypnum* spp.). The mosses have to be harvested from tree barks, in pristine areas (e.g. forests), at least 5 km away from pollution sources. Having been transported to the laboratory inside paper bags, the moss samples should be cleaned of exogenous material (e.g. leaves, soil particles, pine needles) and pre-treated, as described elsewhere (Ares et al., 2012; Capozzi et al., 2016a; Di Palma et al., 2016). Briefly:
Selection: with plastic tweezers, the green apical parts (4-5 cm long) are cut from moss shoots, carefully excluding senescent, deteriorated or dead portions.
Washing: moss apical parts are washed in three successive steps:
1. Water washings (5 w., 20 min each; ratio of 10 $g_{d.w.}$ moss/ 1 L distilled water);
2. EDTA washing (1 w., 20 min; ratio of 15 $g_{d.w.}$ moss/ 1 L EDTA 10 M), in order to remove ions adsorbed onto moss surfaces.
3. Water washings (3 w., 20 min each; ratio of 10 $g_{d.w.}$ moss/ 1 L distilled water).

During washes, in order to easily remove exogenous materials, it is useful to arrange mosses on a nylon net (2 mm mesh) and wash them inside a plastic basin filled with washing solutions. Once washings have been completed, preliminary drying of the mosses on blotting paper at room temperature is recommended.
Devitalization: the washed mosses are dried/devitalized in static oven, at 120 °C for 24 hours.
For moss storage, the use of clean white paper bags is recommended. The amount of mosses to collect and store depends on the number of monitoring points and hence on the statistical analysis of pollution data to perform after collection (section 2.6).
For each monitoring survey, an amount of pre-treated moss must be stored and used as baseline for comparison with moss samples exposed in bags (section 2.6.1).

Moss bag preparation
Spheroidal *moss bags* (Figure 1) are prepared in order to obtain a moss weight/bag surface area ratio of 10 mg cm^{-2} (~500 mg/50 cm^2 for metals; 2 g/200 cm^2 for PAHs; Capozzi et al., 2016b). For trace element monitoring, the bags are made by cutting nylon net squares of 12 x 12 cm, with 2 mm mesh (previously washed with distilled water and with EDTA 10 M, see section 2.1 as for mosses). Each nylon square is then filled with devitalized moss (e.g. 500 mg of moss for multi-element analysis; section 2.5.1). The spheroidal bags are obtained by closing the nylon squares with nylon thread, inserted with a needle at approximately 1 cm from the net edges, thus obtaining a final central square of about 10 x 10 cm (real size to consider for the calculation of moss weight/bag surface area ratio). For PAH monitoring, it is nec-

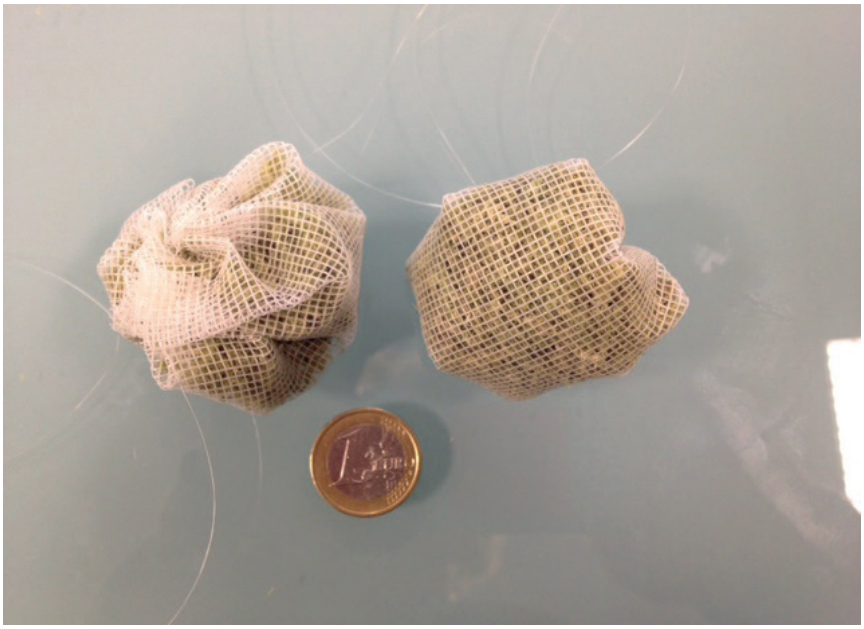


Figura 1. Moss bags sferoidali di 10 mg cm-2.

Figure 1. Spheroidal moss bags of 10 mg cm-2.

area superficiale della bag di 10 mg cm^{-2} (~500 mg/50 cm^2 per i metalli; 2 g/200 cm^2 per gli IPA; Capozzi et al., 2016b). Nel caso specifico del monitoraggio di metalli e metalloidi, le bags vengono realizzate tagliando quadrati di 12 x 12 cm di rete di nylon con maglia di circa 2 mm e precedentemente sottoposta a lavaggio con acqua distillata e con una soluzione 10 mmol L^{-1} di EDTA. Al centro di ogni quadrato vengono posizionati 500 mg di muschio (quantità sufficiente per l'analisi multielemento dei campioni; paragrafo 2.5.1). Le bags sferoidali vengono ottenute richiudendo i quadrati di nylon con filo anch'esso in nylon, inserito a mano con ago da cucito a circa 1 cm dai bordi, ottenendo così un quadrato centrale di circa 10 x 10 cm (dimensioni effettive per il calcolo del rapporto mg di muschio/area superficiale della bag). Per il monitoraggio degli IPA si esegue la stessa procedura di realizzazione delle bags, ma è necessario ritagliare quadrati di rete di nylon tali da contenere 2 g in peso secco di materiale (quantità sufficiente per l'analisi degli IPA, secondo il protocollo riportato nel par. Procedure analitiche) e mantenere lo stesso rapporto di 10 mg cm^{-2}.

La quantità di bags da preparare dipende dall'estensione dell'area da monitorare, nonché dal livello di densità di punti misura che si vuole raggiungere. In ciascun punto misura è consigliabile esporre le bags in triplicato così da poter sopperire ad eventuali perdite e/o atti vandalici, nonché avere una migliore stima della variabilità del dato. E' opportuno, inoltre, esporre le bags parallelamente anche in siti prossimo-naturali per facilitare i confronti tra diversi gradi di inquinamento/accumulo nella fase di analisi dei dati.

Le bags, sufficientemente distanziate tra loro, vengono legate con filo di nylon ad aste rigide di materiale inerte (Figura 2). L'altezza di esposizione più idonea è 4 m dal suolo e, al fine di garantire una corretta ed uniformessary to cut nylon net squares with a size suitable to contain for 2 $g_{d.w.}$ of moss (see section 2.5.2 for the PAH analytical method) and at the same time maintain the ratio of 10 mg cm^{-2}.

Planning the Experimental Design

The number of bags to be employed depends on the size of the monitoring area as well as the density of measuring points required. At each point, exposure of three moss bags (three replicas) is suggested to offset the loss of bags, sometimes due to vandalism, and to gain a more accurate estimate of data variability. Simultaneous exposure of bags in pristine areas is also recommended for an easy comparison, during data analysis, among sites with different degrees of pollution. The bags are tied well apart by a nylon net to plastic sticks (Figure 2). The best exposure height is 4 m above ground. In order to ensure uniform exposure of all bags to atmospheric deposition, it is also necessary to place the bags at least 2 m away from any physical barriers, such as walls or hedges. In addition, exposure below gutters or near railings should be avoided since they represent additional metal sources. When using tree branches as supports for bag exposure, bags must be suspended at the ends of branches and not under the tree canopy.

Figura 2. Esempio di disposizione delle moss bags

Figure 2. An example of moss bags disposition on plastic rod

me esposizione delle bags alle deposizioni atmosferiche, è necessario porre le bags a distanza di almeno 2 m da barriere fisiche di diversa natura (ad esempio, muri, siepi) e lontano da collettori di piogge o fonti di materiale metallico e ruggine (per esempio, grondaie o inferriate). Nel caso vengano utilizzati alberi come supporto per l'esposizione delle bags evitare di posizionare le bags al di sotto delle fronde fogliari, ma preferire le estremità libere dei rami.

Casi studio del progetto ECOREMED

Nell'ambito del progetto ECOREMED, la metodica delle moss-bags è stata applicata in diversi studi di biomonitoraggio finalizzati ai seguenti scopi:

Caso studio 1. Testare la capacità dei muschi esposti in bag di discriminare le differenze in termini di qualità dell'aria tra siti agricoli e urbani del Litorale Domizio Agro-Aversano, e, per ciascun sito, tra punti di esposizione in prossimità delle strade e in aree verdi.

Caso studio 2. Combinare i dati di biomonitoraggio del caso studio 1 con i dati derivanti da un inventario delle emissioni relativi alla medesima area.

Caso studio 3. Monitorare e distinguere le emissioni di IPA (*Idrocarburi Policiclici Aromatici*), di tipo puntuale ed effimero (e.g. incendi dolosi di cumuli di rifiuti e simili), comparando l'accumulo dei muschi con il contenuto degli stessi idrocarburi in foglie di *Robinia pseudoacacia* L. raccolte nei pressi dei punti di esposizione delle moss-bags.

Caso studio 4. Comprendere le relazioni esistenti tra il contenuto di diversi elementi, comprese le terre rare, dei

Case studies of the ECOREMED project

During the ECOREMED project, the moss-bag method was applied to different biomonitoring studies with the following aims:

Case study 1. To test the ability of the moss exposed in bags to discriminate different air qualities of agricultural and urban scenarios selected in the *Litorale Domizio Agro Aversano*; to distinguish at each scenario road-front sites from those not directly facing roads.

Case study 2. To compare biomonitoring data from case study 1 with data from an emission inventory of the same area.

Case study 3. To monitor and distinguish between point-based/temporary (e.g., waste fires) and background PAH emissions, by comparing PAH accumulations in moss bags and in *Robinia pseudoacacia* L. leaves collected at the same sites of moss-bag exposure.

Case study 4. To investigate the relationships between element contents (metals, metalloids and rare earths) in exposed moss and PM adsorbed to moss surface, to find out possible element markers of the different land uses.

muschi esposti e le caratteristiche qualitative e quantitative del PM adeso alle superfici muscinali, al fine di individuare possibili markers di inquinamento in funzione del diverso uso del territorio.

Casi studio 1 e 2

Nei casi studio 1 e 2 è stato impiegato il muschio pleurocarpo *Hypnum cupressiforme* Hedw., raccolto in un'area prossimo-naturale nel territorio di Sgonico (TS), lavato con EDTA e devitalizzato secondo quanto descritto precedentemente.

Il disegno sperimentale ha previsto l'esposizione di *moss bags,* in triplicato per l'analisi dei metalli in traccia e in singolo campione per gli IPA in aree agricole ed urbane selezionate in 5 comuni-del "SIR Litorale Domizio Agro-Aversano" (Acerra, Casal di Principe, Giugliano, Maddaloni e Teverola), due dei quali siti pilota del progetto LIFE, ovvero Giugliano e Teverola (Figura 3). In ogni comune, a secondo del diverso uso del territorio, sono state individuate 2 aree agricole e 2 urbane, in ciascuna delle quali sono state distinte 1 area a verde e 1 area su strada. In particolare, per area a verde si è intesa un'area caratterizzata dalla presenza diffusa ed esclusiva di piante, quali appezzamenti agricoli, parchi e giardini, anche nel contesto urbano, con il punto di esposizione delle bags messo almeno 20 metri distante dalla più vicina fonte di emissione (strade, cantieri, esercizi commerciali e attività industriali anche a basso impatto ambientale). Le strade corrispondenti a ciascuna area a verde sono state quelle a media o alta intensità di traffico e con ampia carreggiata. In ciascun sito, le moss bags sono state esposte secondo i criteri espositivi precedentemente descritti, ovvero per 6 settimane, ad un'altezza di circa 4 metri dal suolo ed a diretto contatto con l'aria lontano da barriere fisiche o fonti di inquinanti. In totale, sono state adoperate 180 moss bags (120 per le analisi dei metalli e 60 per gli IPA).

Case studies 1 - 2

In case studies 1 and 2 the pleurocarpous moss *Hypnum cupressiforme* Hedw was used. The moss was collected in a pristine area near Sgonico (Trieste, NE Italy), washed with EDTA and devitalized as described above (section 2.1).

For the experimental design, the moss bags were exposed in triplicate for the analysis of trace metals and in single samples for PAH analysis, in agricultural and urban areas selected in five sites (Acerra, Casal di Principe, Maddaloni and two LIFE pilot project sites, i.e. Giugliano and Teverola) belonging to the "SIR Litorale Domitio Agro-Aversano" area (Figure 3). In each municipality, the agricultural areas and two urban sites were identified, based on the different land use. In each agricultural and urban site, a roadside point and a corresponding "green area" were selected. In particular, the "green area" is defined as an area with the widespread and exclusive presence of plants (e.g. agricultural plots, parks and gardens), also in an urban context, and where the moss bag exposure point was at least 20 m away from the nearest emission source (i.e. roads, construction sites, commercial and industrial activities, including those with low environmental impact). In correspondence to each green area, the exposure points were selected near roads with medium to heavy traffic density. At each site, the moss bags were exposed for 6 weeks, according to the criteria described in section 2.3, at a height of about 4 m above the ground and away from barriers or direct sources of pollutants. In all, about 180 moss bags (120 for metals and 60 for PAHs) were exposed.

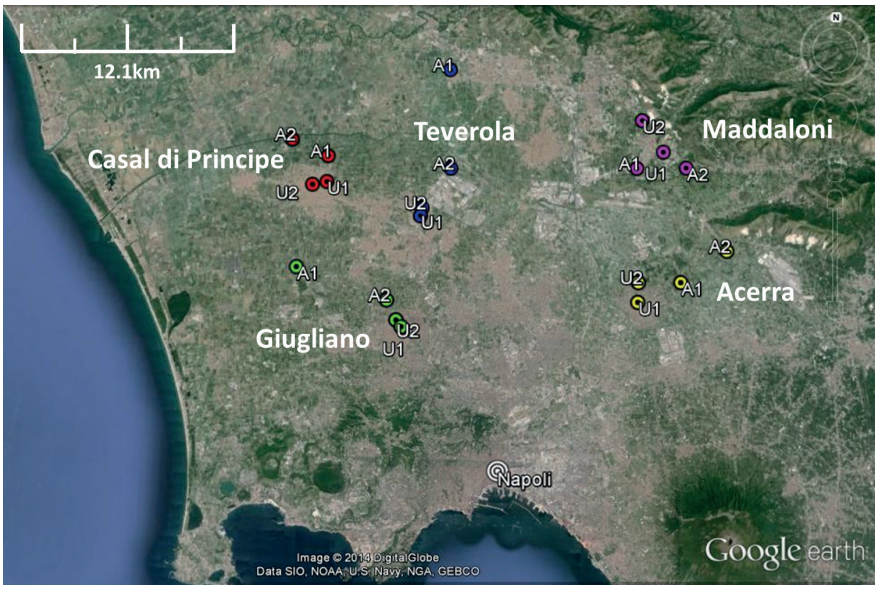


Figura 3. Comuni della Campania individuati per il monitoraggio della qualità dell'aria nei casi studio 1 e 2.

Figure 3. Municipalities of the Campania region selected for air quality biomonitoring of the case study 1-2.

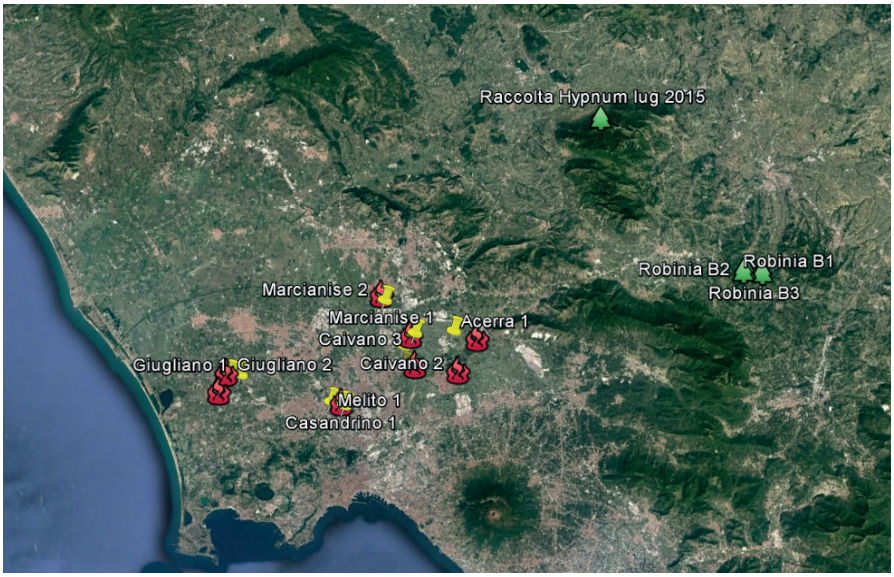


Figura 4. Siti individuati per il monitoraggio della qualità dell'aria nel caso studio 3.

Figure 4. Sites selected for air quality monitoring of the case study 3.

Caso studio 3

Il disegno sperimentale ha previsto nuovamente l'impiego del muschio *Hypnum cupressiforme*, raccolto nel parco regionale del Taburno-Camposauro (BN) ed esposto per 6 settimane (Luglio 2015), in bags di 10 mg cm^{-2} in 10 siti del territorio campano compreso tra Napoli e Caserta (Figura 4). Il contenuto di IPA nei muschi è stato poi confrontato con quello determinato in foglie di piante di *Robinia pseudoacacia* L., raccolte a fine stagione vegetativa (Novembre 2015), a distanza massima di 120 m dai siti di esposizione delle bags. Ogni campione di robinia era composto di 10 foglie raccolte in maniera random sulla chioma ed a un'altezza tra 4-5 m dal suolo. Parallelamente, sono stati analizzati campioni pre-esposizione di *Hypnum* (al fine del calcolo degli *enrichments*, paragrafo 2.6.1) e foglie di robinia provenienti da siti di background (al fine di confrontare i siti di esposizione delle bags con siti a più basso inquinamento).

Caso studio 4

In questo caso, campioni di muschio *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) M. Fleisch. lavati in EDTA e devitalizzati, sono stati esposti in bags e in triplicato, per 12 settimane (inverno 2014), in Austria, Italia e Spagna, selezionando 9 siti per ciascuna nazione caratterizzati da tre usi diversi del territorio ovvero agricolo, urbano ed industriale. Le aree agricole erano caratterizzate da bassa intensità di traffico stradale, lontane dai centri residenziali ed industriali, e dedicate per lo più a coltivazioni ed allevamenti. I siti urbani includevano aree residenziali e commerciali, con intenso traffico stradale. Le aree industriali erano caratterizzate dalla presenza di fonderie di ferro e alluminio (rispettivamente in Austria e Spagna) e da un impianto di riciclaggio di batterie al piombo esauste (in Italia). Quest'ultimo sito era incluso nell'area di studio del progetto ECOREMED.

Case study 3

For the experimental design of case study 3, the moss *Hypnum cupressiforme* was used. The moss samples were collected in the Taburno-Camposauro Regional Park (Benevento, SW Italy) and exposed in bags of 10 mg cm^{-2} for 6 weeks (July 2015) in 10 sites located in the Naples and Caserta areas (Campania, SW Italy; Figure 4). The PAH content in *H. cupressiforme* was analysed and compared to that determined in *Robinia pseudoacacia* L. leaves, harvested at the end of the growing season (November 2015) near the moss bag exposure points (max. 120 m away). Each *R. pseudoacacia* sample comprised 10 leaves randomly collected from the foliage and at a height between 4-5 m above the ground. In parallel, pre-exposure *H. cupressiforme* samples were analysed to calculate enrichments (section 2.6.1) as well as some *R. pseudoacacia* leaves collected from background sites (in order to compare the moss bag exposure sites with those at low pollution).

Case study 4

In this case, moss samples of *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) M. Fleisch., washed with EDTA and devitalized, were exposed in bags in triplicate for 12 weeks (winter 2014), in nine sites of Austria, Italy and Spain, selected on the basis of three different land uses (i.e. agricultural, urban and industrial). Agricultural sites were mainly characterized by crops and livestock, low road traffic intensity and distance from residential and industrial areas. The urban sites included residential and commercial areas with heavy traffic density. The industrial areas were characterized by the presence of iron (Austria) and aluminium foundries (Spain) and a lead batteries recycling plant (Italy, a site also investigated in the framework of the ECOREMED project).

Trattamenti post-esposizione
Al termine del periodo di esposizione, le *moss bags* vanno raccolte da tutti i siti di monitoraggio durante la stessa giornata, adoperando buste di plastica trasparenti se si intende effettuare l'analisi multielementare oppure fogli di carta alluminio per l'analisi degli IPA. I campioni opportunamente etichettati, vanno trasportati in laboratorio e, prima di qualsiasi ulteriore trattamento pre-analitico, conservati a temperatura ambiente (metalli) o a basse temperature e al buio per gli IPA.
In laboratorio è necessario:

1) Rimuovere i campioni dalle bags; a tale scopo vanno utilizzate forbici in ceramica e guanti in lattice privi di talco, evitando il più possibile perdita di materiale e contatto con fonti di contaminazione;
2) Essiccare i campioni di muschio in stufa non ventilata, a 40 °C per i metalli oppure a 20 °C massimo per gli IPA;
3) Polverizzare i campioni (≤ 150 μm) mediante mulino planetario munito di giare e sfere in agata, a velocità e tempi diversi a seconda del tipo di muschio in esame (generalmente è sufficiente polverizzare a 550 rpm per 5 min). Le giare e le sfere vanno lavate con acqua milliQ e poi con acetone per evitare cross-contaminazione tra campioni diversi. Per facilitare il prelievo dei campioni dalle giare una volta polverizzati, si utilizzano spatole e/o cucchiai in plastica (per i metalli) o di alluminio (per gli IPA) anch'essi lavati con acqua milliQ e acetone;
4) Conservare i campioni polverizzati in flaconi in plastica etichettati e sigillati con parafilm, nel caso dell'analisi dei metalli, e in vetro scuro con tappo rivestiti di alluminio per gli IPA (in alternativa al vetro scuro, boccette di vetro trasparente ricoperte con foglio di alluminio).

Procedure analitiche
Analisi multielementare
L'analisi multielemento viene effettuata mediante spettrometria di massa ICP su campioni sottoposti a digestione acida ad alta temperatura. Per i campioni di muschio adoperati nelle campagne ECOREMED, la digestione acida è stata effettuata per campioni di 0,5 g di muschio in una soluzione di HNO_3 (grado ACS) per 1 h e poi in Acqua Regia (HCl:HNO_3, rapporto 3:1) in bagno di acqua bollente a 95 °C. Le analisi sono state effettuate presso ACME Analytical Laboratories (Vancouver, Canada), laboratorio selezionato per l'elevata qualità dei dati forniti su differenti matrici ambientali, come evidenziato dalle numerose citazioni nella letteratura scientifica internazionale.

Analisi degli IPA
L'analisi quantitativa degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) viene effettuata mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) su campioni di muschio sottoposti ad estrazione (metodo EPA 3550 C 2007 ed EPA 8270 D 2007). Le analisi sono state effettuate presso Chelab S.r.l, Mérieux NutriSciences company (Resana, Italia), laboratorio selezionato per l'elevata qualità dei dati forniti su differenti matrici am-

Post-exposure treatments
At the end of the exposure period, the moss bags were collected from all monitoring sites during the same day, using transparent plastic bags (for multi-element analysis) or aluminium sheets (for PAH analysis). The samples, appropriately labelled, were transported to the laboratory and, before any further pre-analytical treatment, they were stored at room temperature, for metals, or at low temperature and under dark conditions for PAHs.
Once in the laboratory, it is necessary:

1) to remove samples from bags; for this purpose, ceramic scissors and powder-free latex gloves should be used, avoiding loss of material and contact with contamination sources;
2) to dry the moss samples in a static oven, at 40 ° C for metals or at 20 ° C max. for PAHs;
3) to pulverize the samples (≤ 150 μm) using a planetary mill equipped with agate jars and balls, at a speed and time to regulate on the basis of the type of moss sample (generally, at 550 rpm for 5 min). The jars and the balls should be washed with MilliQ water and then with acetone to avoid cross-contamination between different samples. To remove pulverized samples from the jars, plastic (for metals) or aluminium (for PAHs) spoons should be used, after washing with MilliQ water and acetone;
4) to store the powdered samples in plastic vials labelled and sealed with parafilm (metals) and in dark glass with stoppers coated with aluminium or transparent glass flasks covered with aluminium sheets (for PAH).

Analytical procedures
Multi-element analysis
Multi-element analysis was performed by ICP mass spectrometry on samples after acid digestion at high temperature. For the moss samples used in the ECOREMED campaigns, acid digestion was carried out on 0.5 g moss samples with an HNO_3 solution (ACS grade) for 1 h and then in aqua regia (HCl: HNO_3, 3: 1 ratio) at 95 ° C in a boiling water bath. Analyses were performed at the ACME Analytical Laboratories (Vancouver, Canada), a laboratory selected for the high quality of data provided on different environmental matrices, as evidenced by the numerous references in the international scientific literature.

PAH analysis
The quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) on moss samples after extraction (EPA Method 3550 C 8270 D 2007 and EPA 2007). The analyses were performed at Chelab S.r.l. (Mérieux NutriSciences, Resana, Italy), a laboratory selected for the high quality of te data provided on different environmental matrices. PAHs considered "priority toxic pollutants" are those on the Priority Chemical List of the EPA (Environmental Protection Agency) and reported in Table 1.

Tabella 1. *Priority Chemical list* dei 16 IPA secondo l'EPA

Table 1. *Priority Chemical list* of the 16 PAHs, according to EPA.

naftalene / naphthalene
acenaftilene / acenaphthylene
acenaftene / acenaphthene
antracene / anthracene
benzo(a)antracene / benzo(a)anthracene
dibenzo(a,h)antracene / dibenzo(a,h)anthracene
fluorene / fluorene
fluorantene / fluoranthene
benzo(b)fluorantene / benzo(b)fluoranthene
benzo(k)fluorantene / benzo(k)fluoranthene
pirene / pyrene
benzo(a)pirene / benzo(a)pyrene
indeno(1,2,3-c,d)pirene / indeno(1,2,3-c,d)pyrene
benzo(g,h,i)perilene / benzo(g,h,i)perylene
fenantrene / phenanthrene
crisene / chrysene

bientali. Gli IPA considerati "inquinanti tossici prioritari" sono quelli della *Priority Chemical list* dell'EPA (*Environmental Protection Agency*) e riportati in Tabella 1.

Controllo di qualità
Accuratezza e precisione del metodo analitico vengono valutate analizzando, parallelamente ai campioni, bianchi, repliche e materiale standard certificato. Generalmente l'accuratezza e la precisione si valutano attraverso il calcolo del recupero %, che confronta il valore certificato con quello analitico o della deviazione standard relativa (RSD, %), che viene calcolata considerando media e deviazione standard del valore analitico. In particolare, il metodo analitico è tanto più accurato e preciso se il valore di recupero % è prossimo a 100 % e la RSD inferiore o uguale a 10 %.
Nell'ambito del progetto Ecoremed, i calcoli per il controllo qualità sono stati effettuati sui risultati dell'analisi del contenuto elementare degli standard certificati M2 ed M3 *Pleurozium schreberi*, forniti dal *Finnish Forest Research Institute* ed impiegati nelle indagini delle deposizioni atmosferiche di metalli condotte da Steinnes et al. (1997).

Analisi dei dati
Attraverso le diverse procedure analitiche effettuate sui campioni di muschio (per esempio, ICP-MS o GC-MS), si ottengono valori di concentrazioni degli inquinanti, generalmente espresse come mg di inquinante su kg di campione, e calcolate sottraendo i valori dei bianchi analitici.
I dati ottenuti, prima di qualsiasi elaborazione statistica, vengono valutati sulla base dei limiti di rilevabilità strumentale (LRS), limiti di quantificazione (LOQ) e le informazioni ottenute attraverso il controllo di qualità (QC; paragrafo 2.5.3). Un esempio di valori di LRS è

Quality control
Accuracy and precision of the analytical method were evaluated by analysing blanks, replicates and certified standard materials, in parallel with the samples. Accuracy and precision are generally evaluated by calculating the % recovery, which compares the certified value with the analytical value, or the relative standard deviation (RSD %), which is calculated considering the average and standard deviation of the analytical value. The analytical method is much more accurate and precise if the recovery value is close to 100 % and the RSD % ≤ 10%.
Within the Ecoremed project, the calculations for quality control were carried out on the results of the elemental analysis of the certified standards M2 and M3 *Pleurozium schreberi*, provided by the Finnish Forest Research Institute and used for the metal atmospheric deposition survey conducted by Steinnes et al. (1997).

Data analysis
After moss sample analysis (for example, ICP-MS or GC-MS), pollutant concentrations were obtained, generally expressed as mg of pollutant on kg of sample, and calculated by subtracting the analytical blank values. The data obtained, prior to any statistical processing, were evaluated based on instrumental detection limits (LODs), limits of quantitation (LOQs) and the information obtained through the quality control (QC, section 2.5.3). An example of LOD values is given in Table 2, which shows the values of detection limits related to the ICP-MS analysis carried out on post-exposure moss samples.

Tabella 2. Limiti di rilevabilità strumentale (LRS) per gli elementi analizzati nei muschi, mediante ICP-MS, nel progetto Ecoremed

Table 2. Limits of detection (LODs) for the elements analyzed in mosses by ICP-MS, within the Ecoremed project.

Elemento / Element	L.R.S. / LOD	Elemento / Element	L.R.S. / LOD	Elemento / Element	L.R.S. / LOD
Ag	2 ppb	**Hf**	0,001 ppm	**S**	0,01%
Al	0,01%	**Hg**	1 ppb	**Sb**	0,02 ppm
As	0,1 ppm	**In**	0,02 ppm	**Sc**	0,1 ppm
Au	0,2 ppb	**K**	0,01%	**Se**	0,1 ppm
B	1 ppm	**La**	0,01 ppm	**Sn**	0,02 ppm
Ba	0,1 ppm	**Li**	0,01 ppm	**Sr**	0,5 ppm
Be	0,1 ppm	**Mg**	0,001%	**Ta**	0,001 ppm
Bi	0,02 ppm	**Mn**	1 ppm	**Te**	0,02 ppm
Ca	0,01%	**Mo**	0,01 ppm	**Th**	0,01 ppm
Cd	0,01 ppm	**Na**	0,001%	**Ti**	1 ppm
Ce	0,01 ppm	**Nb**	0,01 ppm	**Tl**	0,02 ppm
Co	0,01 ppm	**Ni**	0,1 ppm	**U**	0,01 ppm
Cr	0,1 ppm	**P**	0,001 ppm	**V**	2 ppm
Cs	0,005 ppm	**Pb**	0,01 ppm	**W**	0,1 ppm
Cu	0,01 ppm	**Pd**	2 ppb	**Y**	0,001 ppm
Fe	0,001 ppm	**Pt**	1 ppb	**Zn**	0,1 ppm
Ga	0,1 ppm	**Rb**	0,1 ppm	**Zr**	0,01 ppm
Ge	0,01 ppm	**Re**	1 ppb		

dato dalla Tabella 2, in cui sono riportati i valori di limiti di rilevabilità dell'ICP-MS relativi alle analisi Ecoremed effettuate sui campioni di muschi post-esposizione.
In linea generale, si tende ad escludere dall'analisi statistica dei dati tutti i valori relativi ad un inquinante di cui non si hanno dati attendibili di QC e si tende a sostituire i valori di concentrazione inferiore al LRS con il valore del LRS/2.
Il tipo di elaborazione dei dati dipende essenzialmente dalla numerosità campionaria e dal tipo di informazione che si vuole ricavare. Il calcolo delle medie delle repliche campionarie, deviazioni standard e altre elaborazione di statistica di base sono generalmente preliminari a qualsiasi ulteriore elaborazione più complessa, nonché a facilitare la rappresentazione grafica dei risultati.

Calcolo dell'enrichment

Come detto in precedenza, è essenziale determinare analiticamente le concentrazioni di inquinanti anche in campioni di muschio non esposto in bags (T0), in modo da poter valutare l'effettivo accumulo di un dato inquinante da parte del muschio. Per testare la significatività dell'accumulo, recentemente viene sempre più di frequente applicato il calcolo *dell'enrichment* (accumulo) secondo una formula proposta *in primis* da Couto et al., (2004) ed in seguito modificata da Ares et al. (2015). Secondo tale calcolo, può considerarsi significativamente accumulato l'inquinante la cui concentrazione nel muschio esposto sia superiore ad un valore, dato dalla formula:

$$xCi + 1.96\ sCi$$

dove:
xCi = valore medio (*x)* della concentrazione di un determinato inquinante (*Ci)* nel muschio non esposto T0

In general, the pollutant concentration values not supported by significant QC outputs must be excluded from the statistical analysis, and the concentrations < LODs could be replaced with the LOD/2 value. Data processing depends essentially on the sample size and the type of information required. Calculating the average of the sample replicates, standard deviations and other basic statistic is generally preliminary to any further complex data analysis.

Assessment of the enrichment

As previously mentioned, it is essential to determine the concentrations of pollutants also for moss samples not exposed in bags (T0), in order to assess the real amount of a given pollutant accumulated by the moss. To test the significance of the accumulation, calculation of the *enrichment* (i.e. accumulation) is the most widelyapplied for biomonitoring data, according to a formula first proposed by Couto et al. (2004) and later modified by Ares et al. (2015). According to this calculation, the pollutant can be considered significantly accumulated if its concentration in the exposed moss is greater than the value given by the formula:

$$xCi + 1.96\ sCi$$

where:
xCi = mean value (*x)* of the concentration of a pollutant (*Ci)* in the unexposed moss and *sCi* = the corresponding standard deviation.
To calculate the mean value *xCi* it is necessary to analyse the concentrations of a given pollutant in at least 10 unexposed moss samples T0, in order to build a Gaussian curve for the evaluation of the significance of the post-exposure accumulation values (Tf). In general, for

sCi = deviazione standard corrispondente.
Per calcolare il valore medio *xCi* è necessario analizzare le concentrazioni di un dato inquinante in almeno 10 campioni di muschio non esposto T0, in modo da costruire una gaussiana di valori di probabilità tramite cui valutare la significatività degli accumuli post-esposizione (Tf). In genere, è sufficiente avere a disposizione almeno 10 g di muschio non esposto per il calcolo dei T0 per l'analisi multielemento e 20 g per quella degli IPA.

Risultati e Conclusioni
Con l'applicazione del metodo delle moss-bags in diverse campagne di biomonitoraggio effettuate nell'ambito del progetto ECOREMED, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- Il metodo delle moss bags contenenti il muschio *Hypnum cupressiforme* è risultato sensibile ed efficace nell'ottenere informazioni sulla presenza di elementi in traccia ed idrocarburi policiclici aromatici atmosferici e nel discriminare diversi livelli di inquinamento in un paesaggio caratterizzato da una struttura complessa, in cui siti agricoli e urbani/residenziali sono strettamente mescolati tra di loro. Il contenuto di elementi in traccia nei muschi esposti nei siti agricoli è risultato significativamente più elevato rispetto a quello dei muschi esposti nei siti urbani, cosi come nei siti fronte strada rispetto alle corrispondenti aree verdi. In generale, gli inquinanti risultavano avere un pattern di distribuzione spaziale simile sull'intera area di studio, indicando una qualità dell'aria "omogenea" per l'intera area indagata e sicuramente migliore rispetto a quella registrata per la città di utilizzando la stessa tecnica (Adamo et al., 2011). In particolare, le pratiche agricole ed il traffico stradale sono state individuate come principali fonti di inquinamento nella zona indagata. Tutti i risultati sperimentali di questo lavoro sono stati pubblicati in Capozzi et al. (2016a).
- L'uso congiunto di biomonitoraggio tramite moss-bags ed inventario delle emissioni di inquinanti, ha consentito di individuare in modo più preciso le principali fonti di inquinamento nell'area indagata, risultate essenzialmente legate al traffico veicolare. In particolare, i due approcci hanno fornito risultati sovrapponibili nel caso degli inquinanti le cui fonti di emissione sono costanti nel tempo e nello spazio come per il Pb. Tutti i risultati sperimentali di questo lavoro sono stati pubblicati in Iodice et al. (2016).
- I dati ottenuti dall'analisi di campioni di muschio *Hypnum cupressiforme* trapiantati in bags, esaminati in combinazione con quelli relativi ai valori di bioaccumulo di *Robinia pseudoacacia* hanno premesso di individuare e distinguere le emissioni di IPA acute da quelle croniche. Nello specifico, *R. pseudoacacia* ha accumulato IPA a basso ed alto peso molecolare, questi ultimi in prevalenza accumulati dai muschi. Tutti i risultati sperimentali di questo lavoro sono stati pubblicati in Capozzi et al. (2017).
- I criteri di esposizione delle moss-bags applicati per rilevare la presenza di elementi atmosferici in traccia possono risultare validi anche nel caso della determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici presenti nell'aria.

the calculation of T0, it is sufficient to have at least 10 g of unexposed moss for the multi-element analysis and 20 g for PAHs.

Results and main achievements
By using the moss-bag approach in different biomonitoring surveys, in the framework of the ECOREMED project, we achieved the following outcomes:

- the moss bags filled with *Hypnum cupressiforme* proved sensitive and efficient to gain information on the presence in the air of trace elements and PAHs, and in discriminating different pollution levels in a landscape with a complex and compromised structure, in which urban\residential and agricultural sites are strictly intermingled. In general, agricultural sites showed higher moss uptake than urban ones, as did moss suspended at street sites, directly facing vehicle traffic. Based on moss uptake, the whole study area is homogeneously polluted. The current results show that moss uptakes are lower than those recorded in a previous survey carried out in the Naples urban area (Adamo et al., 2011). Agricultural practices and road traffic appear to be the major diffuse pollution sources over the whole study area, both producing polluted particulate matter that mosses can entrap. All the above results were published by Capozzi et al. (2016a);
- the combined analysis of the two data sets (trace element uptake in moss bags and the pollutant emission inventory) clearly show that, for the investigated municipalities in Campania, a considerable part of total emissions is due to road traffic. When the emission inventory is based on a reliable and constant-over-time single pollution source, as in the case of lead, the two data sets produce almost coincidental findings, whereas for those contaminants showing multiple and scattered sources, variable in time, less overlapping outputs were generated. All the above results were published by Iodice et al. (2016);
- by combining the data from devitalized *H. cupressiforme* transplants and *R. pseudoacacia* leaves for the evaluation of PAH presence in the air it was possible to distinguish long- and short-term pollution footprints, with *R. pseudoacacia* recording the chronic input of PAH compounds loaded along its vegetative growth, and moss transplants reflecting acute pollution inputs during the exposure duration. In particular, *Robinia pseudoacacia* was able to accumulate and store both LMW and HMW PAHs, while moss prevalently accumulated the latter. All the above results were published in Capozzi et al. (2017);
- the exposure protocol adopted for trace elements is also effective for assessing of PAHs in the atmosphere;
- there is a close association between the amount of PM and moss element uptake. PM is entrapped mainly through passive mechanisms of adhesion to the moss surface. Based on our tests, carried out in Austria, Italy and Spain, we found that the more the particles counted on moss leaves, the higher the metal content (i.e. the PM amount was strongly related

- Esiste una stretta relazione tra accumulo di inquinanti dei muschi e quantità di particolato atmosferico, intrappolato, esclusivamente secondo meccanismi passivi, sulle superfici di questi organismi. In particolare, a seguito dell'esposizione dei muschi in siti agricoli, urbani ed industriali selezionati in Austria, Italia e Spagna è risultato che, all'aumentare della quantità di particelle intrappolate, si registra un aumento del contenuto elementare dei muschi. La quantità di particolato trattenuto ed il contenuto elementare dei muschi è risultato essere più elevato nei siti industriali, che non, nell'ordine, in quelli urbani e agricoli.
- La composizione elementare e la quantità di particelle contate sulla superficie dei muschi può essere funzione della tipologia del sito di esposizione. Ne consegue che è possibile delineare elementi-markers di inquinamento sito-specifico, capaci di discriminare tra loro siti caratterizzati da diverso uso del territorio. Come esempio, il contenuto in terre rare e metalli preziosi nei muschi esposti è risultato utile nel discriminare input di inquinamento diversi nei siti agricoli e urbani.

Bibliografia

Adamo P., Giordano S., Sforza A., Bargagli R.. 2011. Implementation of airborne trace element monitoring with devitalised transplants of Hypnum cupressiforme Hedw.: Assessment of temporal trends and element contribution by vehicular traffic in Naples city. Environmental Pollution 159, 1620-1628.

Ares A., Aboal J.R., Carballeira A., Giordano S., Adamo P., Fernández J.A. 2012. Moss bag biomonitoring: a methodological review. Science of the Total Environment 432: 143-158.

Ares, A., Aboal, J.R., Carballeira, A., Fernandez, J.A., 2015. Do moss bags containing devitalized Sphagnum denticulatum reflect heavy metal concentrations in bulk deposition? Ecol. Indic. 50, 90-98.

Bargagli, R., 2006. Monitoraggio degli inquinanti atmosferici persistenti mediante i muschi e le piante superiori. Biologia Ambientale Vol. 20, 55-68.

Beike A.K., Spagnuolo V., Lüth V., Steinhart F., Ramos-Gomez J., Krebs M., Adamo P., Rey-Asensio A.I., Fernàndez J.A., Giordano S., Decker E.L., Reski R., 2015. Clonal in vitro propagation of peat mosses (Sphagnum L.) as novel green resources for basic and applied research. Plant Cell Tissue Organ Cult. 120(3), 1037–1049.

Capozzi F., Giordano S., Di Palma, Spagnuolo V, De Nicola F., Adamo P., 2016a. A. Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape. Chemosphere 149, 211–218.

Capozzi F., Giordano S., Aboal J. R., Adamo P., Bargagli R., Boquete T., Di Palma A., Real C., Reski R., Spagnuolo V., Steinbauer K., Tretiach M., Varela Z., Zechmeister H.,Fernandez J. A., 2016b. Best options for the exposure of traditional and innovative moss bags: a systematic

to elemental content). The PM amount and moss uptake increased from agricultural to urban and industrial scenarios, with a commonly frequent soil dust contribution;
- different land uses appear to be associated to the deposition of particles with a specific chemical composition, even if no land use marker can be assumed only based on PM profile. It is possible to highlight site-specific pollution elemental markers, able to discriminate sites characterized by different land use. Precious metals and rare earth elements could be considered novel markers of air pollution of urban and agricultural land uses, respectively.

Bibliography

Adamo P., Giordano S., Sforza A., Bargagli R.. 2011. Implementation of airborne trace element monitoring with devitalised transplants of Hypnum cupressiforme Hedw.: Assessment of temporal trends and element contribution by vehicular traffic in Naples city. Environmental Pollution 159, 1620-1628.

Ares A., Aboal J.R., Carballeira A., Giordano S., Adamo P., Fernández J.A. 2012. Moss bag biomonitoring: a methodological review. Science of the Total Environment 432: 143-158.

Ares, A., Aboal, J.R., Carballeira, A., Fernandez, J.A., 2015. Do moss bags containing devitalized Sphagnum denticulatum reflect heavy metal concentrations in bulk deposition? Ecol. Indic. 50, 90-98.

Bargagli, R., 2006. Monitoraggio degli inquinanti atmosferici persistenti mediante i muschi e le piante superiori. Biologia Ambientale Vol. 20, 55-68.

Beike A.K., Spagnuolo V., Lüth V., Steinhart F., Ramos-Gomez J., Krebs M., Adamo P., Rey-Asensio A.I., Fernàndez J.A., Giordano S., Decker E.L., Reski R., 2015. Clonal in vitro propagation of peat mosses (Sphagnum L.) as novel green resources for basic and applied research. Plant Cell Tissue Organ Cult. 120(3), 1037–1049.

Capozzi F., Giordano S., Di Palma, Spagnuolo V, De Nicola F., Adamo P., 2016a. A. Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape. Chemosphere 149, 211–218.

Capozzi F., Giordano S., Aboal J. R., Adamo P., Bargagli R., Boquete T., Di Palma A., Real C., Reski R., Spagnuolo V., Steinbauer K., Tretiach M., Varela Z., Zechmeister H.,Fernandez J. A., 2016b. Best options for the exposure of traditional and innovative moss bags: a systematic evaluation in three European countries. Environmental Pollution 214, 362-373.

Capozzi F., Di Palma, Adamo P., Spagnuolo V., Giordano S., 2017. Monitoring chronic and acute PAH atmospheric pollution using transplants of the moss *Hypnum cupressiforme* and *Robinia pseudoacacia* leaves. Atmospheric Environment 150, 45-54

evaluation in three European countries. Environmental Pollution 214, 362-373.

Capozzi F., Di Palma, Adamo P., Spagnuolo V., Giordano S., 2017. Monitoring chronic and acute PAH atmospheric pollution using transplants of the moss *Hypnum cupressiforme* and *Robinia pseudoacacia* leaves. Atmospheric Environment 150, 45-54

Cenci, R.M., 1999. L'utilizzo di muschi indigeni e trapiantati per valutare in micro e macro aree le ricadute al suolo di elementi in tracce: proposte metodologiche. Workshop Proceedings: Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale. Roma, 26-27 Novembre 1998. ANPA Serie Atti 2: 241-263.

Couto, J.A., Aboal, J.R., Fernandez, J.A., Carballeira, A., 2004. A new method for testing the sensitivity of active biomonitoring: an example of its application to a terrestrial moss. Chemosphere 57, 303-308.

Di Palma A., Crespo Pardo D., Spagnuolo V., Adamo P., Bargagli R., Cafasso D., Capozzi F., Aboal J. R., González A. G., Pokrovsky O., Beike A. K., Reski R.3, Tretiach M., Varela Z., Giordano S., 2016. Molecular and chemical characterization of a Sphagnum palustre clone: key steps towards a standardized and sustainable moss bag technique. Ecological Indicators 71, 388–397

Iodice P., Adamo P., Capozzi F., Di Palma A., Senatore A., Spagnuolo V., Giordano S.,2016. Air pollution monitoring using emission inventories combined with the moss bag approach. Science of the Total Environment 541, 1410-1419.

Figueira, R., C. Sérgio & A.J. Sousa, 2002. Distribution of trace metals in moss biomonitors and assessment of contamination sources in Portugal. Environmental Pollution 118: 153-163.

González A.G., Pokrovsky O.S., 2014. Metal adsorption on mosses: Toward a universal adsorption model. J. Colloid Interface Sci. 415, 169-178.

Goodman G.T., Roberts T.M., 1971. Plants and soils as indicators of metals in the air. Nature (Lond.), 231–287.

Steinnes E., Rühling Å., Lippo H., Makinen A. 1997. Reference materials for large-scale metal deposition surveys. Accreditation and Quality Assurance 2: 243-249.

Cenci, R.M., 1999. L'utilizzo di muschi indigeni e trapiantati per valutare in micro e macro aree le ricadute al suolo di elementi in tracce: proposte metodologiche. Workshop Proceedings: Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale. Roma, 26-27 Novembre 1998. ANPA Serie Atti 2: 241-263.

Couto, J.A., Aboal, J.R., Fernandez, J.A., Carballeira, A., 2004. A new method for testing the sensitivity of active biomonitoring: an example of its application to a terrestrial moss. Chemosphere 57, 303-308.

Di Palma A., Crespo Pardo D., Spagnuolo V., Adamo P., Bargagli R., Cafasso D., Capozzi F., Aboal J. R., González A. G., Pokrovsky O., Beike A. K., Reski R.3, Tretiach M., Varela Z., Giordano S., 2016. Molecular and chemical characterization of a Sphagnum palustre clone: key steps towards a standardized and sustainable moss bag technique. Ecological Indicators 71, 388–397

Iodice P., Adamo P., Capozzi F., Di Palma A., Senatore A., Spagnuolo V., Giordano S.,2016. Air pollution monitoring using emission inventories combined with the moss bag approach. Science of the Total Environment 541, 1410-1419.

Figueira, R., C. Sérgio & A.J. Sousa, 2002. Distribution of trace metals in moss biomonitors and assessment of contamination sources in Portugal. Environmental Pollution 118: 153-163.

González A.G., Pokrovsky O.S., 2014. Metal adsorption on mosses: Toward a universal adsorption model. J. Colloid Interface Sci. 415, 169-178.

Goodman G.T., Roberts T.M., 1971. Plants and soils as indicators of metals in the air. Nature (Lond.), 231–287.

Steinnes E., Rühling Å., Lippo H., Makinen A. 1997. Reference materials for large-scale metal deposition surveys. Accreditation and Quality Assurance 2: 243-249.

13b. Caratterizzazione idrogeologica dei siti sperimentali

A. Corniello, D. Ducci, M. Sellerino

Gli inquinanti, eventualmente presenti in un suolo, possono trasferirsi alle falde idriche soggiacenti determinando un deterioramento dello *stato qualitativo* (D.Lgs. 152/06 e D.Lgs. 30/09), soprattutto se queste sono di tipo *freatico* e poco profonde rispetto al p.c (Fig. 1). Gli interventi di bonifica del suolo possono a loro volta ridurre o eliminare tale trasferimento e quindi migliorare lo *stato qualitativo* delle falde.
Nell'ottica di valutare tali effetti sulle falde è necessario monitorare il chimismo delle acque sotterranee, ma anche determinarne diverse caratteristiche, quali tipologia e soggiacenza, direzione e verso di moto delle stesse etc. È altresì necessaria una caratterizzazione idraulica (in termini di porosità efficace: n_e, conducibilità idraulica: k, trasmissività: T etc.) degli acquiferi che le contengono, anche ai fini di una eventuale modellazione dei flussi idrici sotterranei.
In ogni caso, prima di procedere alla definizione delle caratteristiche idrogeologiche di un sito, è bene inquadrare lo stesso in un contesto areale e più ampio, procedendo cioè ad una *indagine a scala di acquifero*, per poi passare all'indagine di dettaglio del sito sperimentale (*scala di sito*).

13b. Hydrogeological characterization of a test site

A. Corniello, D. Ducci, M. Sellerino

Pollutants that may be present in a soil can move to the underlying aquifer and degrade groundwater quality, especially in the case of unconfined, shallow aquifers (Fig. 1). Soil remediation, in turn, can reduce or eliminate this transfer and thus improve groundwater quality.
In order to evaluate such effects on groundwater, it is necessary to monitor the chemical composition of groundwater and determine: type and depth of the aquifers, groundwater flow direction, etc. Hydraulic characterization of the aquifers is also required, especially to build a groundwater flow model.
However, before proceeding with the hydrogeological characterization of a test site, it is recommended to study a wider areal context (*survey at aquifer scale*), and then move on to the detailed survey of the test site (*survey at test site scale*).

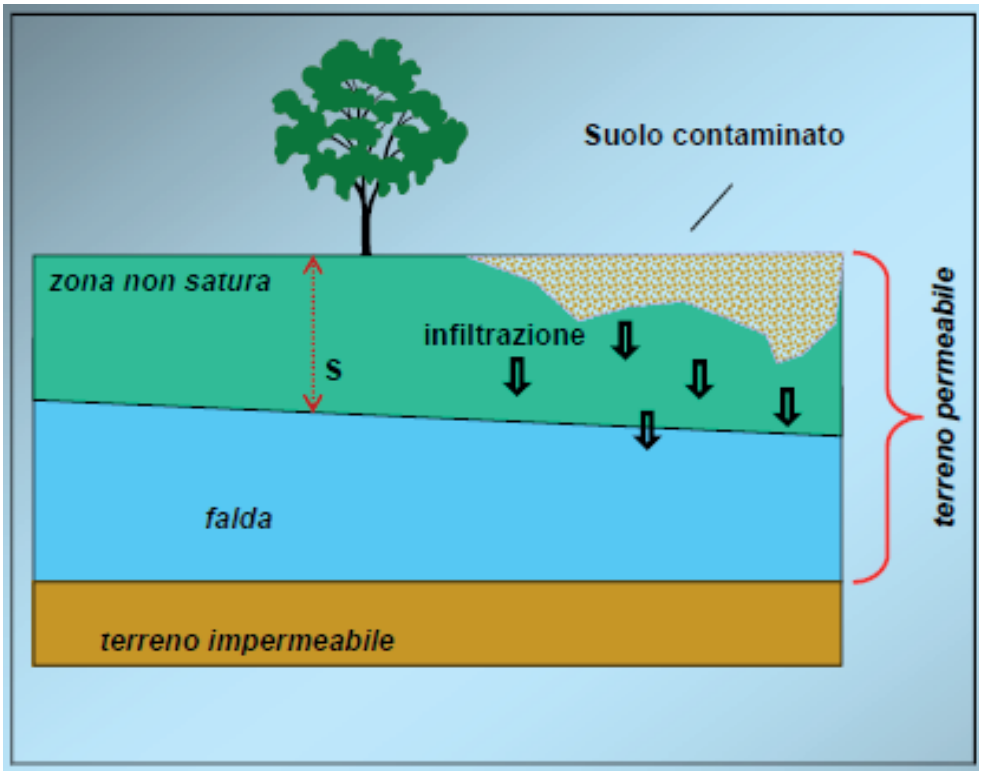


Fig. 1: Schema di falda freatica con possibilità di contaminazione dai suoli; S: soggiacenza

Figure 1. Scheme of an unconfined aquifer, showing the possibility of groundwater contamination from the soil; S. depth to water

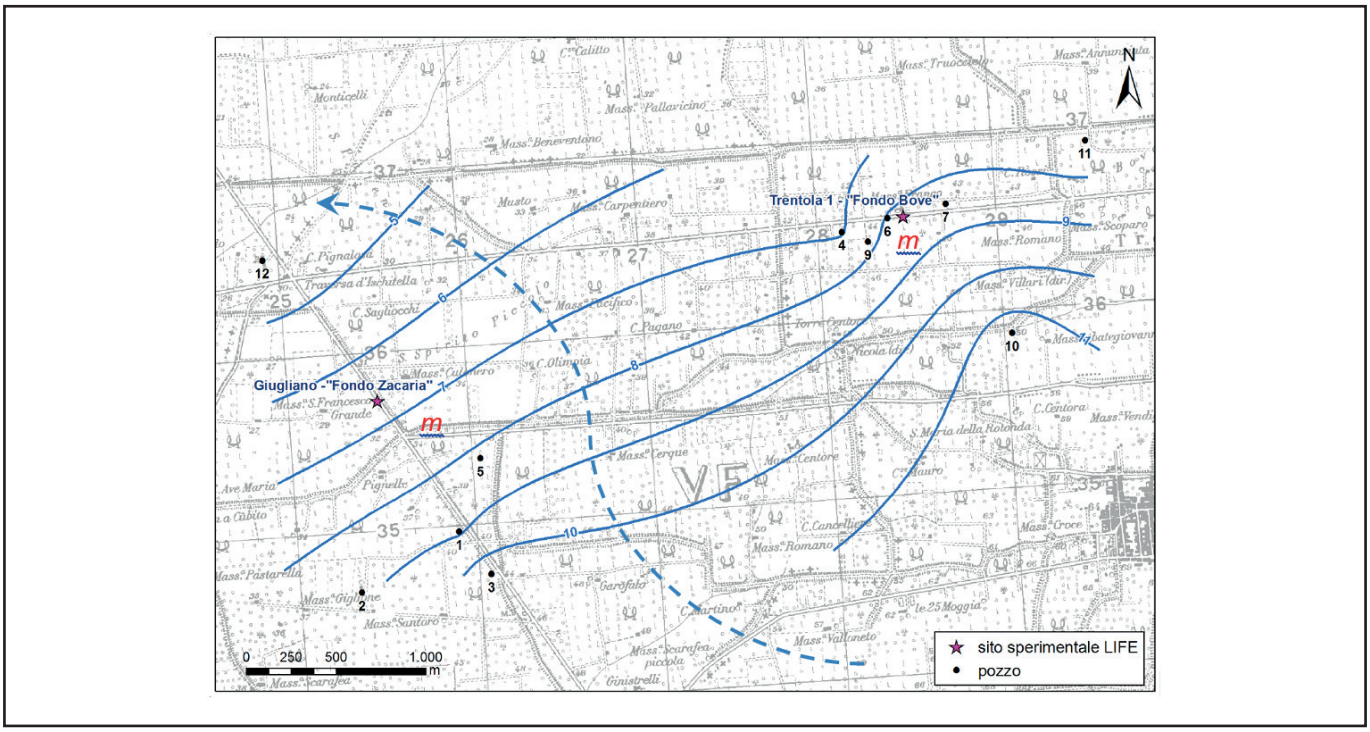


Fig. 2: Curve piezometriche in m s.l.m. con indicati direzione e verso di flusso delle acque sotterranee (linea tratteggiata blu scuro e freccia) (rilievi del settembre 2014); m: aree a monte dei siti sperimentali (su queste Carte va sempre indicato il periodo in cui sono state effettuate le misure alla base della ricostruzione)

Figure 2. Groundwater levels contours (m a.s.l.) in blue and groundwater flow direction in dashed dark blue (September 2014); m. areas upstream to the test sites (the period of measurement of groundwater levels must be always indicated on this kind of maps)

Indagine a scala di acquifero

Tale indagine è finalizzata a:

a. definire l'assetto stratigrafico generale dell'area di interesse, cioè le litologie che formano l'insaturo e l'acquifero, i loro spessori etc.
b. individuare la presenza di uno o più corpi idrici sotterranei sovrapposti e la loro soggiacenza (Fig.1) e determinare il moto delle acque sotterranee (direzione e verso di flusso in base alle isopiezometriche (Fig. 2)
c. definire le caratteristiche chimiche delle acque sotterranee, con particolare riferimento, alla situazione a *monte* del sito (cioè prima che le acque sotterranee vi pervengano, m in Fig. 2) .

Per definire l'*assetto stratigrafico* dell'area all'interno di un sito è utile la raccolta e l'analisi di dati di perforazioni eseguite nel passato per vari scopi (es.: pozzi per acqua, sondaggi a supporto di progetti per infrastrutture etc.). Per queste perforazioni viene allestito un *database* geografico tramite GIS, previa la loro codifica che ne permetta l'identificazione univoca (es.: TEV_4); è necessaria altresì una lettura critica delle varie stratigrafie (in quanto redatte da operatori diversi e con conoscenze geo-litologiche differenziate) per renderle omogenee e accorpare le differenti litologie in *complessi idrogeologici*[1]. Un esempio di database alfanumerico è in Tab. 1 dove, per ogni perforazione, sono riportati: le coordinate (in

[1] Per *complesso idrogeologico* si intende un insieme di tipi litologici, aventi una comprovata unità spaziale e giaciturale, un prevalente tipo di permeabilità ed un grado di permeabilità relativa che si mantiene in un campo di variazione piuttosto contenuto.

Survey at aquifer scale

This survey aims to:

a. define the stratigraphy of the area, i.e. the lithology of the unsaturated zone and of the aquifer, their thickness etc.
b. identify the presence of one or more aquifers and their depth to water (S in Fig.1); draw up the groundwater level contours and consequently the flow direction (Fig. 2)
c. define the chemical characteristics of groundwater, with special focus on the areas upstream of the site (m in Fig. 2).

For defining the *stratigraphy* of the area surrounding the test site, it is useful to collect data of drillings carried out in the past for various purposes (e.g. water wells, monitoring wells for building projects, roads, etc.). These drilling data will be stored in a geographic database using a GIS. After their coding (e.g. TEV_4), a critical reading of the stratigraphic data (as compiled by different operators and with differentiated geological knowledge) is also necessary to make them homogeneous and to group the different lithological types in *hydrogeological units*[1]. An example of a geo-database is presented in Tab. 1 where, for each well, there are: coordinates (in a specified reference system and projection), the elevation (a.s.l.) of the wellhead (e.g. derived from a DEM at 5 m resolution), the intercepted lithological types, their

[1] A *hydrogeological unit* is a set of rocks with a prevailing type and degree of permeability.

Tab. 1: Esempio di database stratigrafico; nella colonna LITO è presentato un accorpamento dei terreni in "complessi idrogeologici"

Table 1. Example of stratigraphic database; LITO column shows the "hydrogeological units"

COORDINATE / COORDINATES WGS 84 / UTM zone 33N		**Comune / Municipality**	***Sigla / ID***	***Quote p.c. (m s.l.m.) / Elevation (m a.s.l.)***	***Profondità (m) / Depth (m)***	**TOP (m)**	**BOTTOM (m)**	**LITO**
X	**Y**							
434387	4543314	Casaluce	**Tev_1**	16	15,90	0,00	6,90	**al**
434387	4543314	Casaluce	**Tev_1**			6,90	9,80	**pr**
434387	4543314	Casaluce	**Tev_1**			9,80	15,90	**IC**

LITO	***Complesso Idrogeologico / Hydrogeological unit***
al	Deposito alluvionale recente / Alluvial deposits
pr	Piroclastiti risedimentate prevalentemente sabbiose / Loose pyroclastics
IC	Ignimbrite Campana (il grado di cementazione è variabile lungo la verticale) / Campanian Ignimbrite

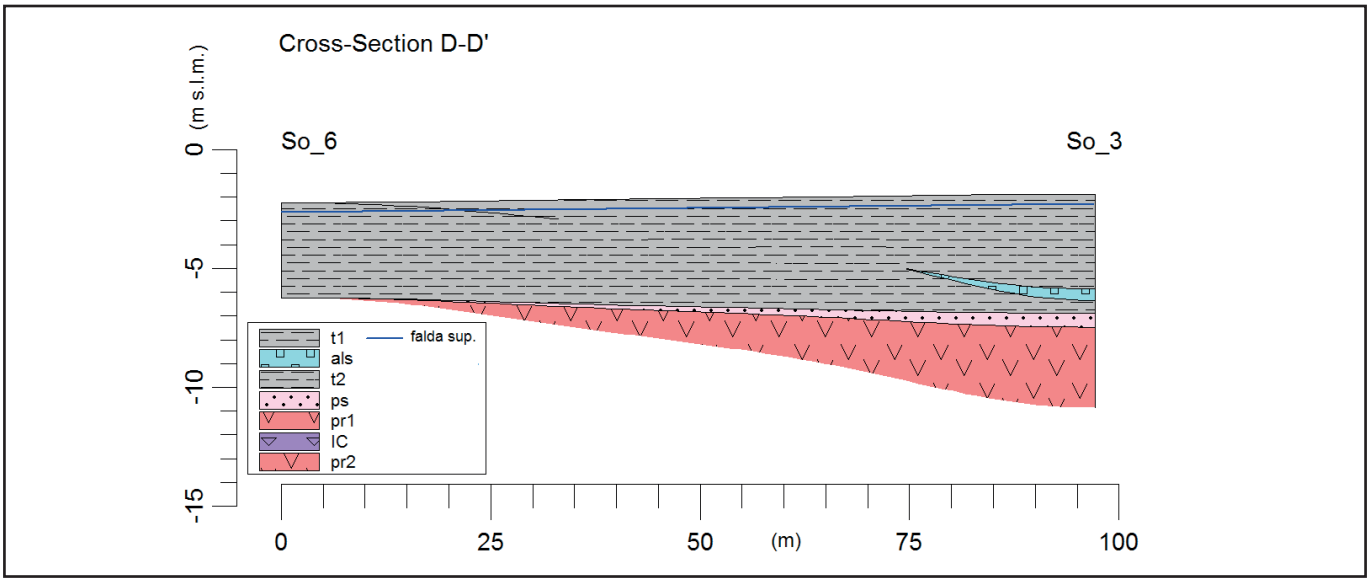


Fig. 3: Sezione idrogeologica con indicazione del livello della falda (ricostruzione tramite Rockworks16): per determinare tetto e base delle varie litologie è stato usato il kriging come metodo di interpolazione geostatistica)

Figure 3. Hydrogeological section with groundwater table drawn up using Rockworks 16 (the kriging interpolation method was used to determine the top and the bottom of the different units).

uno specifico sistema di riferimento), la quota assoluta del boccaforo (ad esempio desunta da un DEM a 5 m), i terreni attraversati, i loro spessori etc.

I dati acquisiti e inseriti nel *database* possono essere elaborati, manualmente o tramite software (es.: RockWorks), ad esempio per disegnare Sezioni idrogeologiche (Fig. 3). Con questi software (e/o tramite GIS) è inoltre possibile ricostruire la morfologia sepolta di complessi di particolare interesse idrogeologico, realizzare Carte a curve isopache (cioè di iso-spessore), costruire modelli 3D del sottosuolo, etc.

Per individuare la presenza di uno o più *corpi idrici sotterranei* è necessario ricostruire l'assetto piezometrico dell'area di interesse (Fig. 2). Per esso ci si potrà riferire a dati di letteratura o, se i documenti sono datati o poco rappresentativi, si dovranno eseguire misure di livello

thickness, and so forth.

Data acquired and stored in the database can be processed, either manually or via software for subsurface data visualization (e.g. RockWorks). This kind of software allows the reconstruction of the buried morphology of the hydrogeological units, the production of hydrogeological sections (Fig. 3) and maps with iso-thickness contour lines (that can also be drawn up using a GIS), 3D models of the subsoil and so on.

The definition of the *groundwater level contours* of the area (Fig. 2) allows identification of the groundwater flow direction and can help in detecting the presence of one or more aquifers. These lines derive from the interpolation of groundwater level points (e.g. data of wells). These piezometric data (points and/or contour lines) are data from the literature (e.g. maps) or, in

Tab. 2: Esempio di tabella con dati relativi ai livelli idrici di falda

Table 2. Example of a table with groundwater data

ID	**COORDINATE** / **COORDINATES** WGS 84 / UTM zone 33N		*Prof. pozzo (m) / Well depth (m)*	*Data / Date*	*Prof. falda dal p.c. (m) / Depth to water (m)*	*Falda (m s.l.m.) / Groundwater elevation (m a.s.l.)*
	X	**Y**				
11	435016	4542979	7	19/02/2014	1.90	**12.1**
1	435034	4542423	8	19/02/2014	1.60	**12.4**
7	435219	4542175	10	19/02/2014	1.90	**14.1**
4	434664	4542797	11	19/02/2014	1.30	**11.7**
19	434633	4541995	13	22/05/2014	2.20	**12.8**

idrico in pozzi individuati nell'area. Anche per questi pozzi andrà allestito un database geografico tramite GIS, nel quale per ogni punto (adeguatamente codificato e georiferito) vi saranno le informazioni indicate nella Tab. 2. Particolare attenzione andrà posta alla profondità dei pozzi presi a riferimento in quanto perforazioni diversamente profonde potrebbero essere indice di falde sovrapposte, per le quali ovviamente andranno predisposti differenti elaborati piezometrici. La conoscenza del campo di moto delle falde all'intorno del sito potrà inoltre fornire un utile indirizzo per l'ubicazione dei piezometri di nuova costruzione nel sito stesso.

Le *caratteristiche chimiche* delle acque sotterranee, in mancanza di dati pregressi, potranno essere definite dall'esame di campioni prelevati nei pozzi in cui sono state effettuate le misure piezometriche. Oltre agli ioni fondamentali (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, HCO_3^-, Cl^-, SO_4^{2-}, NO_3^-), sarà essere utile anche la determinazione di altre sostanze, ad esempio ferro e manganese, che possono contribuire a individuare ambienti riducenti.
È evidente poi la necessità di determinare in falda tutte le sostanze contaminanti già individuate nel suolo del sito sperimentale.
I dati chimici possono essere elaborati in forma di grafici (di Piper, di Schoeller-Berkaloff etc) ovvero, tramite GIS o altri software, in forma di "carte a curve isocone" (cioè di eguale valore).
Gli scenari che le indagini precedenti possono delineare sono:

1. assenza di contaminazione delle acque sotterranee a *monte* e a *valle* del sito;
2. assenza di contaminazione a *monte* del sito e presenza a *valle*;
3. presenza di contaminazione a *monte* e a *valle* del sito con a) tipologia uguale (a) nelle due zone o diversa (b).

Nei casi 2 e 3b è verosimile un contributo alla contaminazione riconducibile alle condizioni del sito.

Indagine di dettaglio del sito

Nel sito di interesse la ricostruzione stratigrafica sarà effettuata eseguendo sondaggi a carotaggio continuo realizzati con accorgimenti tali da evitare di trasferire alla falda eventuali inquinanti presenti nel suolo (APAT, 2006). Le perforazioni (tutte o in parte) vanno poi attrezzate a piezometro per successive misure del livello

their absence, are obtained from new measurements of the water levels in wells identified in the area. Also for these data, we will set up a GIS; Tab. 2 shows the information required for each point (properly codified and geo-referenced). Attention will be given to the depth of the wells, because different depths might be indicative of more than one aquifer (multilayer aquifer), with different groundwater levels, that have to be represented in different maps. Moreover, knowledge of the groundwater flow around the test site will provide useful guidance for the location of new monitoring wells (piezometers) in the site itself.

In the absence of previous data, the *chemical characteristics* of groundwater will derive from analysis of samples collected in the wells used for piezometric measurements. In addition to the main ions (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, HCO_3^-, Cl^-, SO_4^{2-}, NO_3^-), it will also be useful to analyse other parameters and substances (e.g. iron and manganese in reducing environments) in the laboratory and, obviously, the contaminants already identified in the soil of the test site.
The chemical data can be processed in the form of graphs (Piper, Schoeller-Berkaloff etc.) or, spatially interpolated, using GIS or other software, in the form of maps with contour lines of the chemical content (e.g. contour lines of the Fe ion).
All the previous surveys can outline the following different scenarios:

1. absence of groundwater contamination upstream and downstream of the test site;
2. absence of contamination upstream of the test site and presence of contamination downstream;
3. presence of contamination upstream and downstream of the site with the same (a) or different (b) kind of contamination.

The soil site is likely to contribute to groundwater contamination in cases 2 and 3b.

Survey at test site scale

The stratigraphic succession of the test site will be defined by continuous core recovery drilling, carried out carefully to avoid transfers of pollutants from the soil to groundwater (APAT, 2006). All the boreholes (or part of them) will be equipped as piezometers to measure groundwater levels and to collect water samples. For such purposes it is appropriate that the inner diameter

idrico e prelievo di campioni d'acqua sotterranea; per tali finalità è opportuno che il diametro interno non sia inferiore a 9 cm.
Particolare cura andrà portata alle diverse fasi del condizionamento dei piezometri (studio della sezione filtrante, posa in opera del dreno e successiva cementazione dell'intercapedine tra il terreno e il tubo di rivestimento definitivo).
In presenza di più falde sovrapposte di norma è opportuno realizzare piezometri con diversa profondità, ognuno attestato in un diverso corpo idrico sotterraneo, piuttosto che ricorrere a piezometri multipli.
I boccafori dei piezometri andranno accuratamente quotati in modo che i livelli di falda e quelli delle diverse litologie abbiano tutti a riferimento il livello marino.
I dati acquisiti dai sondaggi, da sintetizzare in stratigrafie del tipo riportato in Fig. 4, potranno consentire la realizzazione di Sezioni interpretative (Fig. 3), la ricostruzione del top o della base dei complessi idrogeologici di interesse, il disegno di Carte degli spessori di questi etc.

Per definire direzione e verso di flusso di un corpo idrico presente nel sottosuolo sarà necessaria la realizzazione di almeno tre perforazioni poste ai vertici di un triangolo. Falde sovrapposte possono presentare flussi idrici concordanti o marcatamente diversi.
La conoscenza della profondità delle acque sotterranee dal p.c. e dell'andamento dei flussi idrici consente di:

a. determinare il tipo di falda (incrociando i dati piezometrici con le litologie incontrate nel sottosuolo);
b. identificare la zona *a monte idrogeologico* del sito, cioè il margine lungo il quale si verifica l'ingresso della falda, cosa che può consentire la corretta esecuzione di eventuali prove con *traccianti* per valutare la *velocità effettiva* della falda.

La conoscenza della zona *a monte* permette inoltre di definire, attraverso prelievi in piezometri realizzati in essa e a *valle* del sito, quale sia lo stato qualitativo delle acque sotterranee e quindi di seguire la sua evoluzione nel tempo, anche in relazione alla eventuale migrazione di inquinanti dal suolo del sito. Assai utile, in tale ottica, sarà anche l'installazione di sonde multi-parametriche per il controllo in continuo di parametri di interesse contingente.
Le modalità di prelievo dei campioni d'acqua di falda sono ben indicate nel Manuale APAT (2006). Le determinazioni analitiche e le elaborazioni conseguenti sono quelle riportate per le indagini a *scala di acquifero*.
In presenza di falde sovrapposte i prelievi riguarderanno in prevalenza il corpo idrico più superficiale, in quanto potenzialmente più esposto ad essere interessato da inquinanti presenti nel suolo.

Ove si voglia modellare il flusso della falda sarà poi indispensabile determinare i principali parametri idraulici dell'acquifero (conducibilità idraulica, trasmissività, coefficiente di immagazzinamento etc.). Per la conducibilità idraulica si può far riferimento a *slug-tests* da eseguire nei piezometri (Fetter, 1980) mentre per gli

of the piezometers be wider than 9 cm. Attention will be paid to the completion of the piezometers: study of the well screen section and of the drain, grouting of the space between the casing and the borehole wall. Where more than one aquifer is present, one overlying the other, it is appropriate to drill piezometers of different depths for each aquifer, rather than a multiple piezometer. The elevation of the wellheads (in m a.s.l.) will be carefully reported to compare groundwater levels and top and bottom of different hydrogeological units.
The acquired data will be summarised in the form of stratigraphy, as shown in Fig. 4. Using such data combined with the hydrogeological sections (Fig. 3), the top and bottom of the hydrogeological units will be able to be visualized, and maps drawn up of the same thickness as the units, and so forth. At least three piezometers, placed at the vertices of a triangle, will be required to define the groundwater flow pathway; overlapping aquifers may present the same or markedly different groundwater levels and flows. Knowledge of the groundwater depth and flows allows the:

a. determination of the type (unconfined, confined etc.) of aquifer (crossing groundwater levels and hydrogeological units);
b. identification of the upstream zone of the test site where tracer tests can be conducted to evaluate groundwater velocity.

Knowledge of the upstream zone also allows definition (through analyses of water samples collected in piezometers made therein and downstream of the test site) of groundwater quality and its evolution over time, with a view to detecting a possible migration of pollutants from the soil of the site. In this context, it will be very useful to install in the piezometers multi-parametric probes for the continuous monitoring of several parameters (pH, EC, etc.).
The methods of groundwater sampling are clearly indicated in the APAT Handbook (2006). Analytical determinations and elaborations have already been shown in the section *survey at aquifer scale*. In the presence of overlapping aquifers, sampling will mainly concern the shallow aquifer as it is potentially more exposed to pollutants.
To model the groundwater flow it will be necessary to determine the hydraulic parameters (hydraulic conductivity, transmissivity, storage coefficient etc.). Slug-tests can be performed in the piezometers for hydraulic conductivity (Fetter, 1980), while pumping tests are need to determine other parameters (Civita, 2005). Pumping tests require the drilling and completion of a production well in the test site. This will be drilled with cable tool percussion or rotary (without core recovery) since the drilling of the piezometers will have already provided all the information about the hydrogeological units intercepted and about groundwater, useful for well completion (screen height, slots etc.). The inner diameter of the well must be at least 15 cm.

Different computer codes (eg.: MODFLOW; Harbaugh,

altri parametri occorre eseguire *prove di falda* (Civita, 2005).

Tale ultima esigenza di fatto comporta anche quella di realizzare un pozzo nel sito. Questo potrà essere perforato a percussione o a rotazione con distruzione di nucleo dal momento che la perforazione dei piezometri avrà già fornito tutte le indicazioni sui terreni presenti, sulle acque sotterranee e di conseguenza sulle modalità di condizionamento del pozzo (altezza del filtro, finestrature etc.) il cui diametro interno dovrà essere almeno di 15 cm.

Per la modellazione del flusso idrico sotterraneo si potrà far riferimento a diversi codici di calcolo (es.: MODFLOW; Harbaugh, 2005). MODFLOW è un modello a differenze finite, che simula il flusso di acque sotterranee nelle tre dimensioni spaziali (X,Y,Z); esso incorpora i modelli bi e tridimensionali ampiamente utilizzati dall'USGS (open source e scaricabili al sito https://water.usgs.gov/ogw/modflow/MODFLOW.html)

2005) are available for groundwater flow modelling. MODFLOW is a finite difference model, which simulates the flow of groundwater in the three spatial dimensions (X, Y, Z). It incorporates the two and three dimensional models. It is distributed free by the USGS at the website https://water.usgs.gov/ogw/modflow/MODFLOW.html.

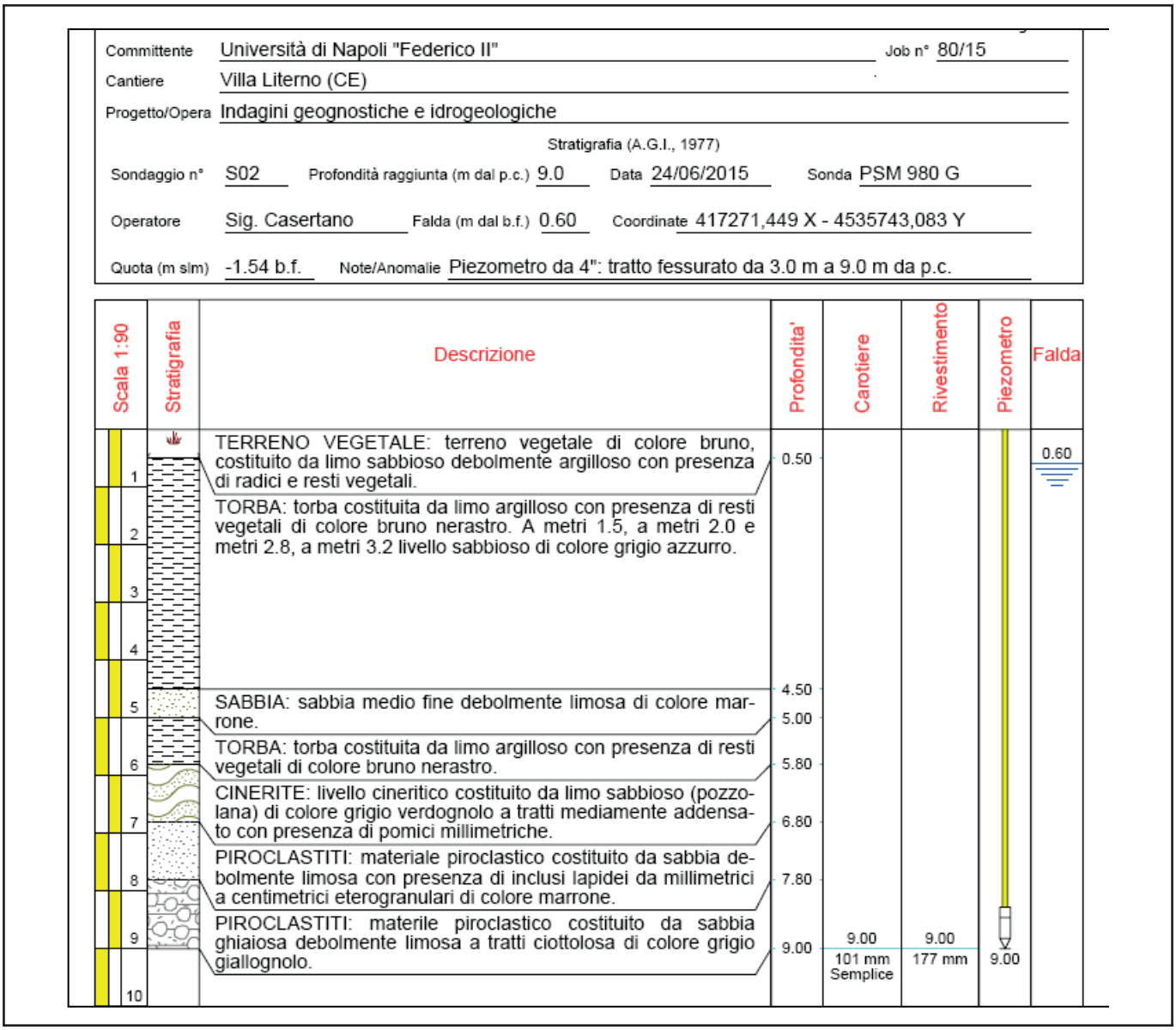


Fig. 4: Stratigrafia di un sondaggio effettuato a carotaggio continuo con indicazioni su diametro, rivestimento e falda e sulla ubicazione della perforazione(coordinate)

Figure 4. Stratigraphy of a drilling with continuous core recovery, completion (diameter, water level etc.) and location (coordinates)

Caratterizzazione idrogeologica di un sito sperimentale

Sito nel Comune di Teverola (CE)

Il sito sperimentale ricade nel territorio del Comune di Teverola (CE) e ha un'estensione di 1843 m^2; verso NE l'area è limitata da un modesto argine che la separa dal canale dei Regi Lagni (Fig. 5).

Indagine a scala di acquifero

Per la ricostruzione stratigrafica dell'area all'intorno del sito di interesse ci si è basati sui dati di 9 perforazioni eseguite nel passato che hanno evidenziato una coltre di piroclastiti sciolte (rimaneggiate e non) a tetto di una formazione tufacea (Ignimbrite Campana – I.C.; De Vivo et al. 2001). Questo tufo presenta spessori variabili e diverso grado di diagenesi, ad esso seguono in basso depositi sciolti piroclastici e sedimentari.

Le acque sotterranee

Tra i molti pozzi (realizzati da privati) presenti all'intorno del sito di interesse ne sono stati scelti 24 utilizzati per la ricostruzione dell'assetto piezometrico a piccola scala. La profondità dei pozzi è variabile. Questo dato, e la presenza nel sottosuolo di un significativo spessore di Ignimbrite Campana poco permeabile, hanno portato a considerare verosimile la presenza di due falde sovrapposte separate proprio dall'Ignimbrite, e ciò in accordo con quanto noto dalla letteratura scientifica (Corniello 2004; Corniello & Ducci 2014). Sulla scorta dei dati stratigrafici si è considerato che pozzi con profondità fino a 15 metri avessero verosimilmente interessato la falda superficiale (cioè al di sopra dell'Ignimbrite campana) mentre gli altri (soprattutto quelli più profondi) la falda sottostante il tufo. Sono state così realizzate due Carte piezometriche,

Hydrogeological characterization of a test site

The test site falls within the territory of the municipality of Teverola (CE) and has an area of 1843 m^2; the area is bounded on the NE by a small embankment which separates the site from the Regi Lagni channel (Fig. 5).

Aquifer scale investigation

The stratigraphy of the area around the test site, based on data from nine drillings carried out in the past, shows loose pyroclastics (disturbed and undisturbed) on the top of tuff (Campanian Ignimbrite – C.I.; De Vivo et al., 2001). This tuff has variable thickness and different welded degrees; below the tuff, ancient loose pyroclastic-alluvial deposits are present.

Groundwater

Among the large number of wells (drilled by private individuals) in the surroundings of the site, we selected 24 wells to reconstruct the piezometric pattern through groundwater level measurements. The depth of the wells is variable. These data, and the presence in the subsoil of a significant impervious thickness of Campanian Ignimbrite, suggest the presence of two overlapping aquifers separated by the Ignimbrite (see also Corniello 2004; Corniello & Ducci 2014). According to the stratigraphic data, it was considered that wells up to 15 metres deep had probably reached the shallow aquifer (above the Campanian Ignimbrite), while the other wells (generally deeper) the aquifer below the tuff. We drew up two contour line maps, one for shallow and one deep groundwater levels. In the above-mentioned wells, we collected water samples for physico-chemical analysis. Groundwater is almost always of a calcium-sodium-bicarbonate type, with electrical conductivity of 1000 µS/cm. There were no significant differences in

Fig. 5: Sito di Teverola, ubicazione delle perforazioni eseguite e tracce delle Sezioni idrogeologiche (Sez. A-A' = S5-S3-S2 Fig. 5); a) perforazioni a rotazione con carotaggio continuo; b) perforazioni a rotazione con distruzione di nucleo; P1: pozzo

Figure 5. Teverola test site with location of the drillings and traces of hydrogeological Sections (Sec. A-A '= S5, S3, S2; Figure 6); a) rotary drilling with continuous core; b) rotary drilling without core recovery; P1. Well

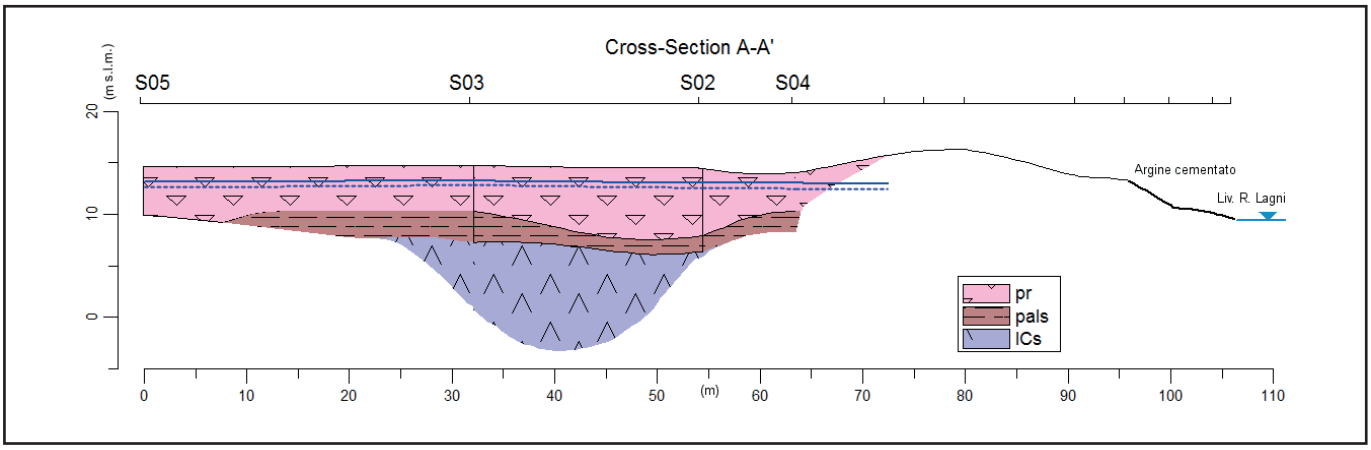


Fig. 6: Sezione idrogeologica con indicazione dei livelli di falda; l'ubicazione è in Fig. 5; la linea azzurra continua si riferisce alla superficie piezometrica della falda profonda, quella a tratti alla superficie freatica della falda meno profonda, (pr: piroclastiti risedimentate prevalentemente sabbiose; pals: paleosuolo limo argilloso; ICs: Ignimbrite Campana poco diagenizzata)

Figure 6. Hydrogeological section and groundwater tables; the location is in Figure 5; the blue line refers to the piezometric surface of the deep aquifer, the dotted blue line indicates the water table of the shallow aquifer, (pr. reworked loose pyroclastics, mainly sandy; pals. silt-clayey paleosol; C.I.s. low-welded Campanian Ignimbrite)

relative alla falda superficiale e a quella profonda.
Nei pozzi utilizzati per misure di livello idrico sono stati prelevati campioni d'acqua per analisi fisico-chimiche. Si tratta quasi sempre di acque bicarbonato-calcico-sodiche con conducibilità elettrica di norma non superiore a 1000 µS/cm. Non sono state riscontrate significative differenze nel chimismo di acque campionate in pozzi con diverse profondità, verosimilmente perché l'acquifero è sempre costituito da depositi piroclastici. La contaminazione più estesa arealmente sia nella falda superficiale che nella profonda è determinata dai nitrati che sono presenti con valori assai spesso superiori ai limiti di legge (50 mg/l – D. Lgs. 31/2001). Di origine naturale sono invece le concentrazioni di F (anche superiori ai limiti del Decreto citato – 1.5 mg/l) in quanto rilasciate nelle acque sotterranee.

Indagine di dettaglio del sito

In base alle indicazioni (stratigrafiche e sulle acque sotterranee) ricavate dagli accertamenti precedenti, sono state pianificate le indagini nel sito il cui suolo presentava (a luoghi) contaminazione di Berillio e Stagno.
Nel sito sono stati realizzati 5 sondaggi a rotazione con carotaggio continuo e due a distruzione di nucleo (Fig. 5), tutti successivamente attrezzati a piezometri (per lo studio delle acque sotterranee e del loro chimismo).
Anche nel sito di Teverola i sondaggi (S1, 2 e 3) hanno incontrato l'IC (Fig. 6) sulla quale poggia un paleosuolo, arealmente continuo, il cui spessore (attraversato per intero dai sondaggi S1, S2 e S3) risulta maggiore a sud mentre va rastremandosi verso nord.

Acque sotterranee

Il paleosuolo, di notevole spessore ed a consistenza limo-argillosa (quindi assai poco permeabile), di fatto funge da *letto* per una modesta falda accolta nei pochi metri di piroclastiti sciolte che separano il paleosuolo dal p.c. Allo stesso tempo il paleosuolo agisce da *confinante* per le acque sotterranee presenti nei terreni alla sua

the chemical composition of water sampled in wells with different depths, probably because both aquifers are always made up of pyroclastic deposits. Nitrates, which very often have values exceeding the legal limits (50 mg/L - Law Decree No. 31/2001), represent the most widespread contamination both in shallow and in deep groundwater. The concentrations of F (even exceeding the limits of the mentioned Decree = 1.5 mg/L) are of natural origin, deriving from leaching of pyroclastic deposits.

Survey at test site scale

According to the previous investigations, surveys were planned on the test site, where the soil occasionally presented contamination due to the content in beryllium and tin.
In the site, five drillings with continuous core recovery and two without core recovery have been made (Fig. 5), subsequently equipped as piezometers for groundwater levels measurements and survey of the chemical composition.
Also in the Teverola site drillings S1, S2 and S3 intercepted the CI (Fig. 6) on which rests a paleosol with thickness increasing towards south.

Groundwater

The silt-clayey and impervious paleosol forms the base of the aquifer, made of a few metres of loose pyroclastics between the paleosol and the ground level. At the same time, the paleosol confines groundwater at the bottom (Fig. 6). In the site, two overlapping aquifers were identified, whose flows are not very dissimilar. In the deep aquifer (piezometers S1, S2 and S3), the water level is about one metre higher than in the shallow aquifer (piezometers S1bis, S3bis, S4, S5), reflecting their separation.
Based on all the acquired data, a well 10 m deep was drilled, whose position is shown in Fig. 5. This well was conditioned with non-toxic PVC (Ø 15 cm), with a 3 m

base riconducibili alla *facies* incoerente dell'Ignimbrite Campana (Fig. 6).

Nel sito pertanto sono state identificate due falde sovrapposte i cui andamenti non sono tra loro molto dissimili. La falda relativamente più profonda (intercettata dai sondaggi S1, S2, S3) presenta inoltre il livello idrico più alto di circa un metro rispetto alla falda più superficiale (interessata dai sondaggi S1bis, S3bis, S4, S5) a testimonianza della separazione netta dei due corpi idrici sovrapposti.

In base a tutti i dati acquisiti è stato infine perforato un pozzo profondo 10 metri la cui ubicazione è in Fig. 5. Questo pozzo è stato condizionato con tubo in P.V.C. atossico (diametro 6"), cieco per i primi 3 metri quindi fessurato con *slot* di 0,5 mm. All'esterno del filtro è stato posto del ghiaietto siliceo (3 - 5 mm) e la parte cieca del tubo è stata sigillata con una miscela di cemento – bentonite.

Caratteristiche chimiche delle acque di falda

Nel pozzo e nei piezometri sono stati eseguiti campionamenti quasi con cadenza mensile. Nei vari prelievi ci si è concentrati sulla falda meno profonda (che è interessata dal P1 e dai sondaggi S1 bis, S4 e S5) per valutare eventuali trasferimenti di inquinanti contenuti nei suoli e la possibile influenza su tale fenomeno delle essenze vegetali messe a dimora sul sito.

Nelle acque sotterranee il limite dei 50 mg/l per i nitrati viene quasi sempre superato. Fa eccezione la situazione all'intorno del sondaggio S4 (Fig. 7); qui i nitrati sono costantemente inferiori ai 10 mg/l benché questo

screen section (0.5 mm slots). Around the screen was placed siliceous gravel (3-5 mm) and the casing was cemented with cement and bentonite.

Chemical characteristics of groundwater

In the production well and in the piezometers groundwater was sampled almost monthly. The sampling was concentrated in the shallow aquifer (reached from the drillings P1, S1bis, S4 and S5), to individuate any transfers of pollutants from the soil.

Nitrates in groundwater almost always exceed the limit of 50 mg/L, except around piezometer S4 (Fig. 7), where nitrates were consistently below 10 mg/L, although the drilling was downstream of piezometer S1bis. In the same piezometer S4 there are low levels of sulphates, while Mn is higher than elsewhere. This set of elements is consistent with the presence in this area of a *reducing environment*.

Given the presence of beryllium and tin in the soil, these elements were also analysed in groundwater. The elements in question were detected in all the sampling points, but always with concentrations < 1 µg/L, which did not change significantly during the entire monitoring period (Fig. 8). Therefore, chemical data indicate the absence of migration of contaminants present in the soil to the shallow aquifer.

The Sheba Hydrometrie Dipper-PTEC multi-parametric probe was placed in the well to determine, with an interval of 1 h, water level, temperature and electrical conductivity. Data acquired and stored in the probe are periodically downloaded for processing.

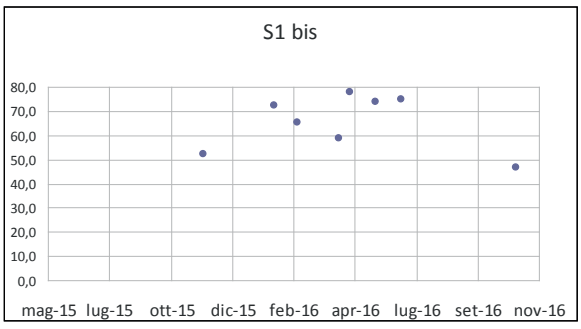


Fig. 7: Variazione nel tempo dei nitrati (mg/l) in alcune perforazioni del sito sperimentale

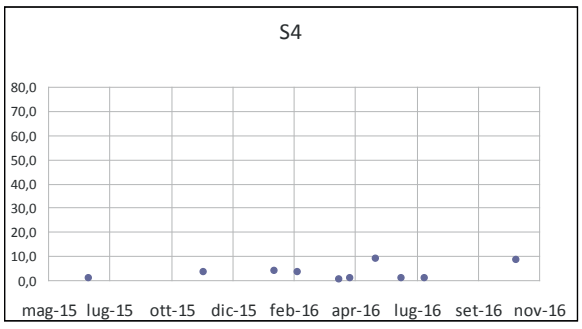


Figure 7. Monitoring of nitrate content (mg /L) in some piezometers of the test site

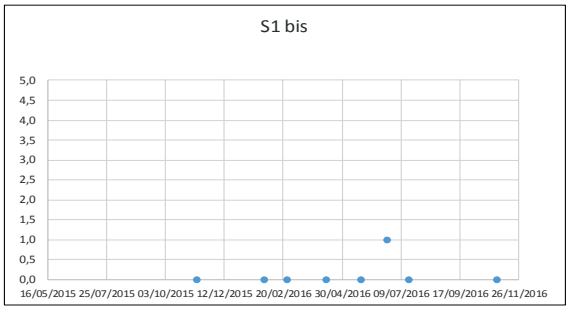


Fig. 8: Variazione nel tempo del Berillio (a destra) e dello Stagno (μg/l) in una perforazione del sito sperimentale

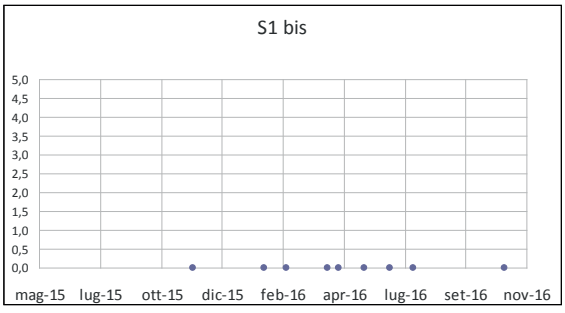


Figure 8. Monitoring of Beryllium (right) and tin content (μg/L) in an piezometer of the test site

sondaggio sia *a valle* rispetto al sondaggio S1 bis. Nello stesso sondaggio S4 si osservano bassi tenori di solfati mentre il Mn è più alto che altrove. Questo insieme di elementi è coerente con la presenza in questo settore della falda di un ambiente *riducente*.
Dal momento che le analisi su campioni di suolo del sito sperimentale avevano evidenziato a luoghi la presenza di Berillio e Stagno con valori superiori ai limiti di legge, questi elementi sono stati determinati anche nelle acque di falda. Qui questi elementi sono stati rilevati in tutti i punti di prelievo ma quasi sempre con concentrazioni < 1 µg/l che, durante tutto il tempo di monitoraggio, non sono variate in maniera significativa (Fig. 8).
I dati del monitoraggio chimico indicherebbero pertanto l'assenza di migrazione dei contaminanti presenti nei suoli verso la falda superficiale. L'entità (minima) delle concentrazioni e la loro costanza nel tempo inoltre hanno reso difficile valutare se le essenze vegetali messe a dimora nel sito (*canna comune*) abbiano (e in quale misura) condizionato il tenore di inquinanti presenti nei suoli.
Nel pozzo è stata collocata (con la protezione di un coperchio metallico con lucchetto) la sonda multi-parametrica *Seba Hydrometrie Dipper-PTEC* per determinare, con un intervallo di acquisizione di 1 h, del livello idrico, della temperatura, della conducibilità elettrica e del TDS. I dati acquisiti e memorizzati nella sonda vengono periodicamente "scaricati" per la loro elaborazione.

Caratterizzazione idraulica degli acquiferi al fine della modellazione del flusso idrico
Nei sondaggi S1bis, S2 e S4 sono state eseguite prove di permeabilità mediante *slug-test*. I risultati delle prove (interpretati con formule diverse) sono sintetizzati nella Tab. 3.

Hydraulic characterization of the shallow aquifer
Slug-tests were carried out in piezometers S1bis, S2 and S4 to determine hydraulic conductivity. The results are summarized in Tab. 3.
In the well a non-equilibrium aquifer test was conducted (6 hours and 30 minutes). In this time the flow rate was constant (0.95 L/s); depressions in the production well and in piezometer S1bis (9 m deep) were continuously monitored with a pressure transducer connected to a datalogger. The results of the acquired data are summarised in Tab. 4.

Tab. 3: Risultati degli slug – test; pr: piroclastiti risedimentate

Table 3. Results of the slug - test; pr. loose pyroclastics

Sondaggio / Piezometer	**Tratto di prova (m dal p.c.) / Section test (m from g.l.)**	**Litologia / Lithology**	**K (cm/s)**	**K (m/s)**	**K (cm/s)**	**K (m/s)**
			metodo Bouwer & Rice / Bouwer & Rice method		**metodo Hvorslev / Hvorslev method**	
S1 bis	3.0 – 6.0	pr	5.26×10^{-4}	5.26×10^{-6}	1.16×10^{-3}	1.16×10^{-5}
S2	3.0 – 6.0	pr	8.84×10^{-5}	8.84×10^{-7}	1.32×10^{-4}	1.32×10^{-6}
S4	1.0 – 5.0	pr	1.81×10^{-5}	1.81×10^{-7}	2.96×10^{-5}	2.96×10^{-7}

Tab. 4: Parametri idraulici dell'acquifero a tetto del paleosuolo ricavati dalla prova di pompaggio

Tab. 4: Parametri idraulici dell'acquifero a tetto del paleosuolo ricavati dalla prova di pompaggio

	Q ***(l/s)***	**Theis-Jacob**		**K (T *medio* /H) con H=7 m**
		T ***(m^2/s)***	***S***	***(m/s)***
Pozzo / Well	0.95	2.9×10^{-3}		4.6×10^{-4}
Piez. S1bis / Piezometer S1bis		4.3×10^{-3}	1.2%	6.1×10^{-4}

Nel pozzo è stata invece condotta una prova di falda in regime di non equilibrio della durata di 6 ore e 30 minuti. In questo tempo è stata mantenuta costante una portata di emungimento di 0.95 l/s; le depressioni nel pozzo e nel piezometro S1bis (profondo 9 metri) sono state monitorate, periodicamente, con un freatimetro e, in continuo, con trasduttori di pressioni collegati ad un *datalogger*. L'elaborazione dei dati acquisiti ha portato ai valori sintetizzati nella Tab. 4.

Bibliografia citata

APAT (2006) – *Manuale per le indagini ambientali nei siti contaminati.* Manuali e Linee Guida, 43

Civita M. (2005) – *Idrogeologia applicata e ambientale*. Casa Editrice Ambrosiana

Corniello A. (2004) - *Caratterizzazione idrogeologica del territorio dell'Autorità di Bacino Nord-Occidentale della Campania.* In AA.VV.: Lo stato delle conoscenze acquisite sulle acque sotterranee del Bacino NordOccidentale propedeutico alla redazione del Piano di tutela delle Acque. Volume II, pp 9-47. TPS Selca.

Corniello A., Ducci D. (2014) - *Hydrogeochemical characterization of the main aquifer of the "Litorale Domizio-Agro Aversano NIPS" (Campania—southern Italy)*. Journal of Geochemical Exploration, vol. 137, p. 1-10, ISSN: 0375-6742, doi: 10.1016/j.gexplo.2013.10.016

De Vivo B, Rolandi G., Gans P.B., Calvert A., Bohrson W.A., Spera F. J., Belkin H. E., 2001. *New contstraints on the pyroclastic eruptive history of Campanian volcanic Plain (Italy)*. Mineralogy and Petrology, 73, 47-65, ISSN: 09300708.

Fetter C.W. (1988) – *Applied ydrogeology.* (fourth edition). Prenctice Hall

Harbaugh, A.W. (2005) - *MODFLOW-2005, the U.S. Geological Survey modular ground-water model - the Ground-Water Flow Process.* U.S. Geological Survey Techniques and Methods 6-A16, variously p.

References

APAT (2006) – *Manuale per le indagini ambientali nei siti contaminati.* Manuali e Linee Guida, 43

Civita M. (2005) – *Idrogeologia applicata e ambientale*. Casa Editrice Ambrosiana

Corniello A. (2004) - *Caratterizzazione idrogeologica del territorio dell'Autorità di Bacino Nord-Occidentale della Campania.* In AA.VV.: Lo stato delle conoscenze acquisite sulle acque sotterranee del Bacino NordOccidentale propedeutico alla redazione del Piano di tutela delle Acque. Volume II, pp. 9-47. TPS Selca.

Corniello A., Ducci D. (2014) - *Hydrogeochemical characterization of the main aquifer of the "Litorale Domizio-Agro Aversano NIPS" (Campania—southern Italy)*. Journal of Geochemical Exploration, vol. 137, pp. 1-10, ISSN: 0375-6742, doi: 10.1016/j.gexplo.2013.10.016

De Vivo B, Rolandi G., Gans P.B., Calvert A., Bohrson W.A., Spera F. J., Belkin H. E., 2001. *New constraints on the pyroclastic eruptive history of Campanian volcanic Plain (Italy)*. Mineralogy and Petrology, 73, 47-65, ISSN: 09300708.

Fetter C.W. (1988) – *Applied hydrogeology.* (fourth edition). Prentice Hall

Harbaugh, A.W. (2005) - *MODFLOW-2005, the US Geological Survey modular ground-water model: the ground-water flow process (pp. 6-A16). Reston, VA, USA: US Department of the Interior, US Geological Survey.*

13c. Monitoraggio della microflora del suolo

O. Pepe, V. Ventorino

13c.1. Biomonitoraggio della struttura delle comunità microbiche

Gli effetti nocivi dell'inquinamento ambientale non ricadono solo sulla salute umana, ma alterano anche gli equilibri degli ecosistemi, il paesaggio e la biodiversità dei suoli. Diversi studi hanno dimostrato che il numero delle specie, non solo animali e vegetali, ma anche e soprattutto microbiche, in grado di sopravvivere in un ambiente inquinato si riduce notevolmente (Øvreås et al., 1998). Pertanto un sito contaminato perde valore sia sotto il profilo ecologico sia sotto quello economico e diventa più vulnerabile alle esposizioni di altre pressioni sia antropiche sia naturali (Sorlini, 2005).

La presenza di particolari inquinanti, così come l'uso di tecniche di biorisanamento, può perciò alterare la struttura dell'intera comunità microbica di un suolo. In tale contesto è necessario l'uso di tecniche di biomonitoraggio per valutare la biodiversità di un suolo. Poiché è generalmente accettato che i metodi di coltivazione recuperano meno dell'1% dei microrganismi presenti in campioni ambientali (Amann et al., 1995), tra i diversi approcci utilizzabili, le tecniche molecolari *culture–independent,* come la PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) o tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS), permettono di valutare minimi cambiamenti nella struttura delle comunità microbiche. Infatti, negli ultimi decenni, le tecnologie molecolari basate su un approccio metagenomico, sono state impiegate per studiare l'ecologia microbica. Queste nuove tecniche hanno facilitato l'analisi delle popolazioni microbiche in ambienti naturali, poiché le comunità microbiche sono studiate direttamente nel loro habitat naturale, senza che vi sia la necessità di isolare e coltivare le diverse specie presenti nel rispetto delle loro diverse esigenze di crescita. Infatti, gli acidi nucleici (DNA o RNA) sono estratti direttamente dai campioni ambientali e poi analizzati mediante varie tecniche permettendo un'analisi filogenetica ad alta risoluzione.

13c.2. Tecniche di monitoraggio microbico

13c.2.1 Estrazione del DNA genomico totale

Il DNA genomico totale può essere estratto dai campioni di suolo utilizzando diversi kit presenti in commercio, come ad esempio il "*Fast DNA Spin kit for Soil*" (MP Biomedicals). Tale metodologia permette la lisi diretta delle cellule microbiche grazie a diversi fattori quali: una matrice di lisi contenente una miscela di particelle di ceramica e silice e soluzioni che stabilizzano il DNA; pirofosfato di sodio (deflocculante del suolo) che permette la disgregazione delle particelle di argilla a cui sono adesi i batteri; una matrice contenente guanidina isotiocianato che permette il legame con il DNA. Il DNA estratto è poi utilizzato come "*template*" per amplificare determinate regioni genomiche dell'intera comunità microbica presente nei campioni di suolo.

13c. Soil microflora

O. Pepe, V. Ventorino

13c.1. Biomonitoring of the microbial community structure

The harmful effects of environmental pollution do not impact only on human health, but also alter the balance of ecosystems, landscape and soil biodiversity. Several studies have shown that the number of animal, plant and microbial species that can survive in a polluted environment is greatly reduced (Øvreås et al., 1998). Therefore, a contaminated site loses both ecological and economical value, and it becomes more vulnerable to other anthropogenic and natural pressures (Sorlini, 2005).

Therefore, the presence of specific pollutants, as well as the use of bioremediation techniques, could alter the microbial community structure of a soil. In this context, it is necessary to use biomonitoring techniques to assess the microbial biodiversity in a soil. Since it is generally accepted that using culture-dependent methods it is possible recover less than 1% of the microbial populations living in environmental samples (Amann et al., 1995), among the different approaches used, the culture-independent methods, such as PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) or NGS (Next Generation Sequencing), allow to evaluate subtle changes in the microbial community structure. In fact, in the last few decades, molecular technologies based on a metagenomic approach, have been developed to study microbial ecology. These new techniques have endorsed the analysis of microbial populations in the natural environments since microbial communities are analysed directly in their habitat, without the isolation and cultivation of the different microbial species according to their growth requirements. In fact, the nucleic acids (DNA and RNA) are directly extracted from the environmental samples and then analysed by various techniques allowing high-resolution phylogenetic analysis, so obtaining the direct determination of the genetic diversity of different samples.

13c.2. Microbial monitoring techniques

13c.2.1 Extraction of the total genomic DNA

The total genomic DNA could be extracted from soil samples by using several commercial kits, such as "Fast DNA Spin kit for Soil" (MP Biomedicals). This methodology allows the lysis of the microbial cells due to several factors such as a lysing matrix containing a mixture of ceramic and silica particles and reagents developed to protect and solubilize nucleic acids. The extracted DNA is then used as template to amplify specific genomic regions of the entire microbial community present in the soil samples.

13c.2.2 Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE)

La PCR-DGGE è una tecnica impiegata per determinare la presenza delle differenti specie e per ottenere un profilo sia qualitativo (presenza/assenza di bande) che semi-quantitativo (intensità delle bande) delle comunità microbiche oggetto di studio. Diversi studi hanno confermato l'efficacia della PCR-DGGE per monitorare le comunità microbiche di un suolo contaminato da idrocarburi. La caratterizzazione della struttura delle comunità microbiche di un sito contaminato (ex Carbochimica, Trento, Italia) da idrocarburi policiclici aromatici (IPA) è stata effettuata grazie a una valutazione preliminare sull'eterogeneità e sull'attività metabolica delle popolazioni microbiche mediante DGGE e RT-DGGE (DGGE retro-trascrizionale) (Zocca et al., 2004). Questa tecnica è stata utilizzata anche per determinare e monitorare negli anni la comunità microbica presente in suoli contaminati da petrolio in Corea del Sud (Jin et al., 2012).

In dettaglio, la DGGE è una tecnica elettroforetica mediante la quale frammenti di DNA, amplificati mediante PCR, aventi lo stesso peso molecolare, ma con differenti sequenze nucleotidiche, sono separati su un gel di poliacrilammide a gradiente denaturante linearmente crescente. La doppia elica di DNA, durante la corsa nel gel, subisce una denaturazione che comporta una variazione della conformazione spaziale dei filamenti, nonché una parziale apertura della doppia elica del frammento con conseguente rallentamento della corsa elettroforetica, nel punto in cui il frammento incontra sul gel la concentrazione denaturante, equivalente alla sua temperatura di denaturazione ($T_{melting}$) che è specifica per ciascuna sequenza.

Il DNA estratto totale genomico estratto da un suolo contaminato può utilizzato come "*template*" per amplificare una o più regioni ipervariabili del 16S rDNA dei batteri presenti nel suolo. Infatti, il DNA che codifica per l'RNA ribosomiale 16S contiene regioni conservate in tutte le specie batteriche, intervallate da regioni (da V1 a V9) in cui le sequenze nucleotidiche sono variabili da una specie batterica all'altra.

13c.2.2 Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE)

The DNA template could be used to amplify different hypervariable regions (V1-V9) of 16S rDNA gene of bacterial populations present in the soil and resolved using DGGE.

The PCR-DGGE is a technique used to determine the presence of different microbial species and to obtain both a qualitative (presence / absence of bands) and semi-quantitative (intensity of bands) profiles of microbial communities. Several studies have confirmed the effectiveness of the PCR-DGGE for monitoring microbial communities of hydrocarbons contaminated soils. The characterization of the microbial community structure of a polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated site (ex Carbochimica, Trento, Italy), was carried out through a preliminary assessment of the diversity and metabolic activity of microbial populations by DGGE and RT-PCR-DGGE (reverse transcriptase-denaturing gel electrophoresis) (Zocca et al., 2004). This technique was also used to determine and monitor over time the microbial communities in petroleum contaminated soils from South Korea (Jin et al., 2012).

In detail, the DGGE is an electrophoretic technique by which DNA fragments amplified by PCR, having the same molecular weight but with different nucleotide sequences, could be separated by using a polyacrylamide gel with a linear denaturant gradient. In fact, during the run, the double-stranded DNA is subjected to an increasing denaturant environment (formed with urea and formamide) and partially melted when the melting temperature (T_m) is reached so creating branched molecules. Since the T_m is sequence-specific, different DNA sequences will encounter mobility shift at different positions in the gel.

In figure 1 is shown an example of this analysis. In particular, 12 representative soil samples from the Giugliano site, before (Figure 1a) and after (Figure 1b) compost amendment, were chosen on the basis of the presence or the absence of pollutants, such as aliphatic hydrocarbons (C> 12), copper and zinc, and on the

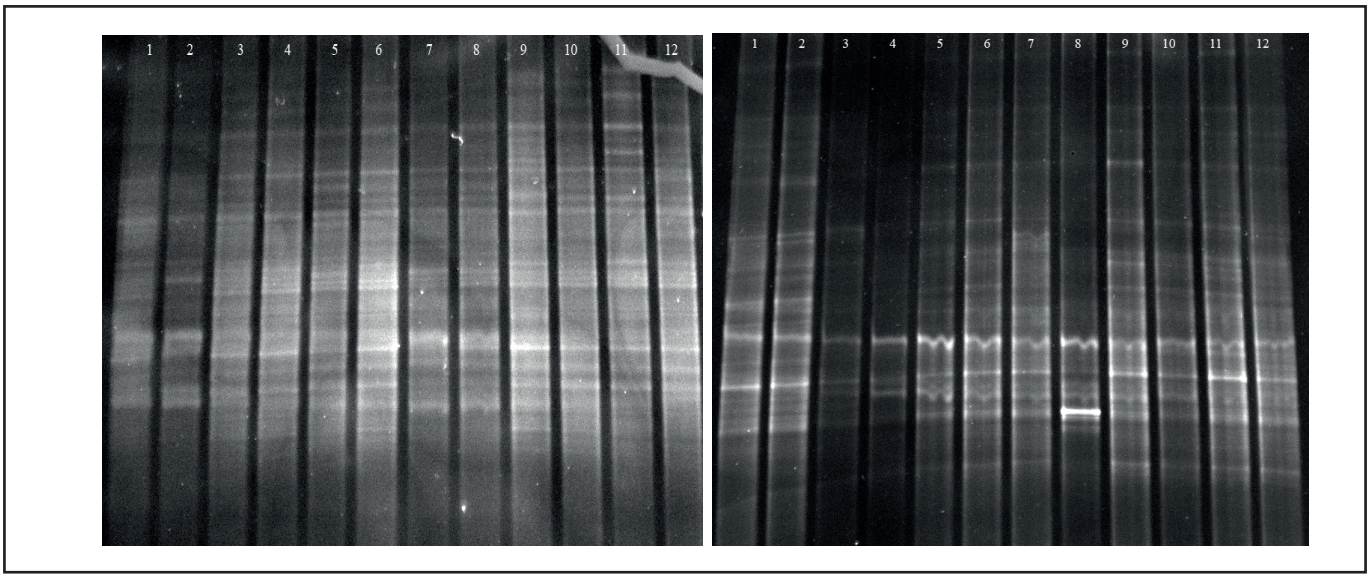


Figura 1. PCR-DGGE di 12 campioni rappresentativi di suolo provenienti dal sito di Giugliano prima (pannello 1a) e dopo (pannello 1b) l'apporto di compost.

Figure 1. DGGE profiles of 12 representative soil samples of Giugliano site, before (panel 1a) and after (panel 1b) compost amendment, respectively.

Tabella 1. Composizione della miscela di reazione.

Componenti / Reagent	Concentrazione in reazione / concentration in reaction	Quantità in reazione / Volume in reaction
DNA template	50 ng	1,0 µl
Buffer *Taq* polimerasi	1 X	5,0 µl
$MgCl_2$	2,5 mM	2,5 µl
dNTPs mix	250 µM	0,5 µl
V3F-GC	0,2 µM	0,1 µl
V3R	0,2 µM	0,1 µl
Taq polimerasi	2,5 U/50 µl	0,5 µl
H_2O bidist. sterile		40,3 µl

In figura 1 è riportato un esempio di tale analisi. In particolare, 12 campioni rappresentativi di suolo provenienti dal sito di Giugliano prima (Figura 1a) e dopo (Figura 1b) l'apporto di compost, sono stati scelti in base alla presenza o meno di inquinanti quali idrocarburi alifatici (C>12), rame e zinco ed in base ai differenti trattamenti di bonifica effettuati nell'ambito del progetto Ecoremed.
Per effettuare tale analisi l'amplificazione PCR è stata condotta utilizzando i primer V3F-GC (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') e V3R (5'-ATTACC GCGGCTGCTGG -3') che amplificano una regione di circa 200 bp della regione V3. Inoltre al primer V3F è stato aggiunto un "GC-clamp", ossia una sequenza in GC per permettere la separazione degli amplificati nella successiva corsa in ambiente denaturante (DGGE).
La composizione della miscela di reazione, nel volume totale di 50 µl, è riportata in Tabella 1.

Il programma utilizzato prevede un trattamento termico di denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, seguito da 30 cicli di amplificazione con una temperatura iniziale di annealing di 65 °C diminuita di 1 °C ad ogni ciclo per 10 cicli fino a raggiungere una temperatura di 55 °C, utilizzata per 20 cicli. Ogni ciclo di amplificazione prevedeva una temperatura di denaturazione di 94 °C per 1 minuto ed una temperatura di estensione del frammento a 72 °C per 3 minuti. Infine il programma prevedeva una fase di estensione finale a 72 °C per 10 minuti. Per verificare l'avvenuta amplificazione del DNA, piccole aliquote degli ampliconi sono state caricate su gel di agarosio ed è stata effettuata un'elettroforesi convenzionale in cui avviene una migrazione dei frammenti di DNA per effetto di un campo elettrico e quindi una loro separazione in base al peso molecolare. Il tampone utilizzato, sia per la preparazione del gel che per la corsa elettroforetica, è stato il Tris-borato (TBE) 1X, preparato a partire dal 10X contenente Tris-HCl 0,89 M (potente tampone tra pH 7 e 9), acido borico 0,89 M (per la forza ionica) ed EDTA 0,02 M (agente che complessa gli ioni bivalenti, importanti cofattori delle DNasi). Al gel, preparato al 2% di agarosio (peso/volume), è stato aggiunto SYBR Safe (Invitrogen) per permettere la visualizzazione del DNA con un transilluminatore UV. Sono stati caricati 5 µl di ogni amplificato addizionati con 2 µl di una soluzione colorante (40% di saccarosio, con funzione di aumentare il peso specifico dei campioni e quindi facilitarne il caricamento, e blu di bromofenolo che permette la visualizzazione dei campioni durante la corsa) e 3 µl di H_2O. La

basis of the different remediation treatment carried out during Ecoremed project.
The primers V3f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') and V3r (5'-ATTACC GCGGCTGCTGG -30), spanning the 200-bp region of the 16SrDNA of *Escherichia coli* (Muyzer et al., 1993), were used for bacterial DGGE analysis. A GC-clamp was added to the forward primer according to Muyzer et al. (1993).
The composition of the reaction mixture, in a total volume of µl, is reported in the Table 1.

PCR conditions consisted of initial denaturing step at 94°C for 5 minutes, followed by a touchdown PCR in which the annealing temperature was lowered from 65 to 55 °C at a rate of 1°C every cycle followed by 20 additional annealing cycles at 55 °C. A denaturation step at 94 °C for 1 minute was used, and extension was performed at 72 °C for 3 minutes; a final extension step at 72 °C for 10 minutes ended the amplification cycle. 5 µl of amplicons were checked by electrophoresis through 2.0% (wt/vl) agarose-TBE gel. The composition of the TRIS-borate-EDTA 10X buffer (TBE) consisted of 0.89 M Tris, 0.89 M boric acis and 0.02 M EDTA. Electrophoresis was performed at 100 V for 1 hour and the gel was visualized by UV-transillumination after SYBR Safe (Invitrogen) staining.
Then, V3 amplicons were analyzed by DGGE by using a Bio-Rad DCode Universal Mutation System (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Samples were loaded in a 0.8-mm polyacrylamide gel to (8% [wt/vol] acrylamide-bisarylamide [37.5:1] by using a denaturant gradient from 30 to 60%. Electrophoresis was run at a constant voltage of 200 V for 240 min and a temperature of 60 °C. After electrophoresis, the gels were stained with SYBR Gold (20 min) (Invitrogen, Milan, Italy) and rinsed in distilled water (5 min).
The composition of the 0% and 100% stock denaturing solutions used to prepare the gel were:

- 0% denaturing solution: 20 ml of 40% acrylamide/bisacrylamide (37,5:1), 2 ml of TAE buffer 50X (Tris base 2 M, acetic acid, glacial 1M, 50 mM EDTA 0,5M, pH 8.0), 78 ml of dH_2O;
- 100% denaturing solution: 20 ml of 40% acrylamide/bisacrylamide (37,5:1), 2 ml of TAE buffer 50X (Tris base 2 M, acetic acid, glacial 1M, 50 mM EDTA 0,5M, pH 8.0), 40 ml of formamide (deionized), 42 g of urea, dH_2O to 100 ml.

Finally, both solutions were degassed for 15 minutes,

corsa è stata effettuata a 100 V per 1 ora.
In seguito, gli ampliconi ottenuti dalla PCR della regione V3 sono stati sottoposti ad analisi DGGE. In particolare, i prodotti PCR sono stati caricati in un gel di poliacrilammide [8% (w/v) acrilammide/bisacrilammide (37,5:1)] utilizzando un gradiente di denaturazione dal 30% al 60% che aumentava in direzione dell'elettroforesi.
Le soluzioni stock allo 0% ed al 100% di agente denaturante per la preparazione del gel sono state ottenute nel seguente modo:

- Soluzione allo 0%: 20 ml di 40% acrilammide/bisacrilammide (37,5:1), 2 ml di TAE buffer (2 M Tris base, 1M Acido aceticoglaciale, 50 mM EDTA 0,5M, pH 8), H_2O bidistillata fino a 100 ml;
- Soluzione al 100%: 20 ml di 40% acrilammide/bisacrilammide (37,5:1), 2 ml di TAE buffer (2 M Tris base, 1M Acido aceticoglaciale, 50 mM EDTA 0,5M, pH 8), 40 ml Formammide, 42 g Urea, H_2O bidistillata fino a 100 ml.

Le due soluzioni sono state degasate per 15 min, passate attraverso un filtro con pori di 0,45 µm e conservate a 4 °C fino al loro utilizzo.
Per ottenere un gel di poliacrilammide con un gradiente di denaturazione dal 30% al 60%, le soluzioni High e Low sono state preparate nel seguente modo:

- High: 9 ml della soluzione 100%, 6 ml della soluzione 0%, 135 µl di Ammonio persolfato (APS) al 10%, 13,5 µl di tetraetil-metilen-diammina (TEMED), 150 µl di Blu di bromofenolo al 2%;
- Low: 4,5 ml della soluzione 100%, 10,5 ml della soluzione 0%, 135 µl di APS, 13,5 µl di TEMED.

Il blu di bromofenolo, aggiunto nella soluzione High, ha consentito di verificare se si fosse creato il gradiente. Inoltre, in entrambe le soluzioni sono stati aggiunti APS, per permettere la polimerizzazione del gel, ed il TEMED, come catalizzatore.

filtered through a 0.45 µm filter and stored at 4 °C.
To obtain a denaturing gradient from 30 to 60%, the high and low solutions were prepared as follow:

- High: 9 ml of 100% denaturing solution, 6 ml of 0% denaturing solution, 135 µl of 10% ammonium persulfate (APS), 13.5 µl of tetramethylethylenediamine (TEMED), 150 µl of 2% bromophenol blue;
- Low: 4.5 of 100% denaturing solution, 10.5 ml of 0% denaturing solution, 135 µl of 10% APS, 13.5 µl of TEMED.

The bromophenol blue added to high solution allowed to verify the gradient; whereas APS and TEMED were used to catalyze the polymerization of acrylamide and bisacrylamide when preparing gels for electrophoresis.
DGGE profiles were analyzed to evaluate the similarity level (S) among samples performing a cluster analysis. In Figure 2 it is reported an example of the cluster analysis obtained by comparing the DGGE profiles of bacterial populations during the composting process of chestnut waste biomass.

Finally, dominant bands were excised from the gel and suspended in 20 µl of sterile dH_2O. The eluted DNA was re-amplified using the PCR conditions described above and the amplicons were verified by DGGE using DNA amplified from soil samples as the control. The products that migrated as a single band and at the same position with respect to the control were purified and sequenced. The DNA sequences were then compared to the GenBank nucleotide data library using the BLAST program at the National Center of Biotechnology Information web site (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) to determine their closest phylogenetic relatives.

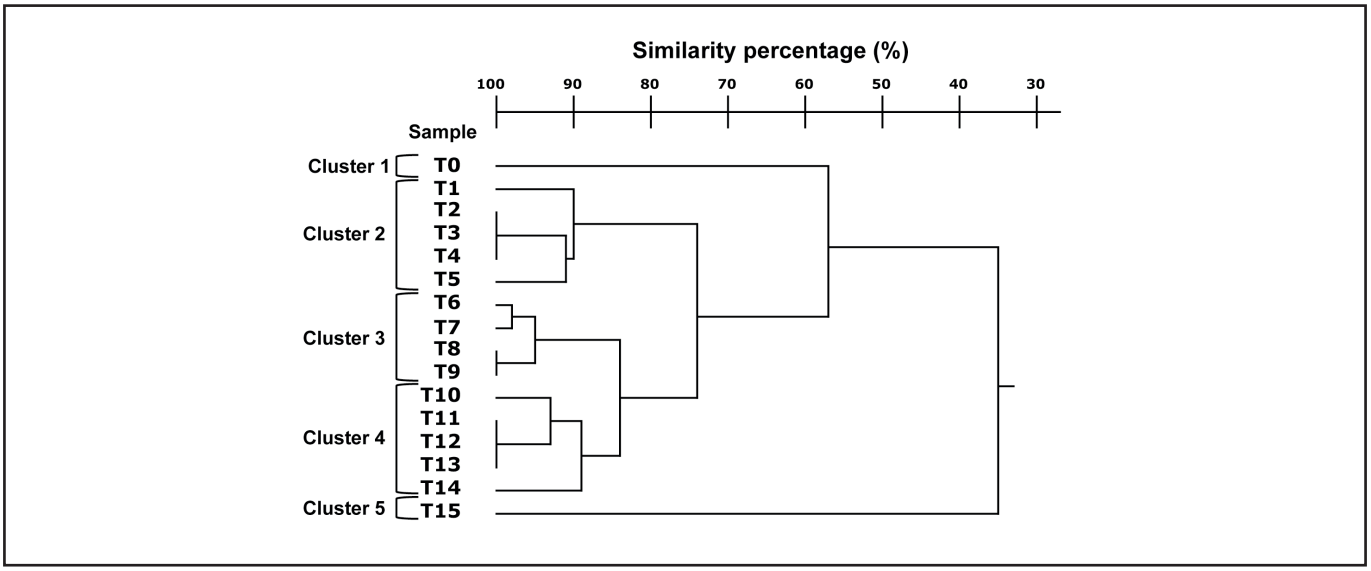


Figura 2. Dendrogramma che mostra la percentuale do similarità (%) dei profili DGGE delle popolazioni procariotiche durante il compostaggio dei residui di castagno (Ventorino et al., 2016).

Figure 2. Dendrogram showing the degree of similarity (%) of PCR-DGGE profiles of the prokaryotic populations during composting of the chestnut waste biomass (Ventorino et al., 2016).

25 µl degli amplificati PCR sono stati miscelati con 15 µl di 2 X Gel Loading buffer (0,5% blu di bromo fenolo, 70% glicerolo). La corsa elettroforetica è stata effettuata applicando un voltaggio di 50 V per 5 min e 75 V per 16 h. Al termine della corsa il gel è stato posto in una soluzione di SYBR Gold (Invitrogen) e visualizzato tramite un trans illuminatore UV.
Inoltre, i profili DGGE ottenuti erano utilizzati per valutare il livello di similarità (S) tra i diversi campioni tramite *cluster analysis*. In Figura 2 è riportato un esempio dell'analisi di similarità tra i profili DGGE di popolazioni batteriche durante un processo di compostaggio.
Infine, diverse bande rappresentative per le differenti ipotetiche specie microbiche ottenute da ciascun profilo DGGE dei campioni di suolo, sono tagliate, risospese in 20 µl di H_2O sterile e riamplificate tramite PCR-V3. Gli ampliconi sono poi ulteriormente sottoposti a DGGE finché non sono ottenute delle bande pure. Infine il prodotto PCR risultante dall'amplificazione delle bande pure ottenute in seguito alla DGGE può essere purificato mediante l'impiego di differenti kit presenti in commercio. Il DNA purificato può essere poi quantificato e sequenziato. Le sequenze nucleotidiche ottenute possono essere comparate con quelle depositate nella *GenBank* del *National Center of Biotecnology Information*, tramite il programma BLAST (www.ncbi.nlm.nhi.gov/BLAST) per poter determinare le specie presenti nei diversi campioni.

13c.2.3 High-throughput sequencing (HTS)

Le tecnologie di nuova generazione basate sull'uso di piattaforme di sequenziamento massivo (high-throughput sequencing - HTS) negli ultimi anni, hanno permesso di ottenere un'analisi approfondita sia delle popolazioni microbiche sia delle attività potenziali e/o reali presenti in un ecosistema complesso. Infatti, dopo l'estrazione di DNA o RNA, è possibile seguire due approcci:

1. analisi del microbiota: basata sull'*amplicon sequencing*, prevede l'amplificazione e il sequenziamento di un gene target di interesse tassonomico (per i batteri è di solito una porzione del gene codificante per la subunità 16S del ribosoma). Tale analisi permette l'identificazione dei microrganismi presenti in un dato ecosistema e di determinare la loro abbondanza relativa;

2. analisi del microbioma: basata sullo *shotgun sequencing*, prevede la frammentazione e il successivo sequenziamento del genoma ottenendo informazioni sull'intero corredo genetico presenti in un dato ecosistema. Tale analisi permette di ottenere, oltre alle informazioni sulla biodiversità totale di un dato ambiente identificando le specie presenti, anche informazioni sulle attività presenti (se inizialmente è stato estratto e analizzato l'RNA) o potenziali (se inizialmente è stato estratto e analizzato il DNA).

In commercio esistono diverse piattaforme di sequenziamento che permettono di ottenere migliaia di sequenze con una singola corsa. E' però da prendere in considerazione che per gestire e analizzare e la grande mole di dati e di informazioni che si ottengono con tali tecnologie è

13c.2.3 High-throughput sequencing (HTS)

In the last decade, the next generation sequencing based on the use of high-throughput sequencing (HTS) allow to obtain a deep analysis of both microbial populations and potential and/or real activities present in a complex ecosystem. In fact, after DNA and RNA extraction, it possible to follow two different approaches:

1. microbiota analysis: based on the *amplicon sequencing*, it involves the amplification and sequencing of a target gene useful for phylogenetic classification (for the bacteria was usually used a variable region of 16S rRNA). This analysis allows to identify the microorganisms present in the ecosystem and to determine their relative abundance;

2. microbiome analysis: based on the *shotgun sequencing*, it involves randomly breaking up DNA sequences into lots of small pieces, reassembling the sequence by looking for regions of overlap and sequencing. This approach allows to obtain information about the entire genome present in an ecosystem. Therefore, beside information about the total biodiversity identifying microbial species, it is also possible to obtain information about the microbial activities.

Among the several platforms, Illumina MiSeq system was used during the Ecoremed project for studying and monitoring the microbiota of the contaminated soils also evaluating the impact on the microbial communities of pollutants as well as of the remediation techniques applied. In this context, the Illumina MiSeq technology based on *amplicon sequencing* approach to study the microbiota, involved the amplification of the V3-V4 of the 16S rRNA. Later, the amplicons were purified and amplified again using the Nextera XT Index kit to attach Illumina sequencing adapters and dual-indices. The libraries obtained from the different soil samples were purified, quantified, diluted at the same concentration and combined. Finally, libraries were sequenced using MiSeq platform.
The reads obtained by sequencing were analysed using bioinformatic tools comparing them with specific database to classify microbial populations to different taxonomic levels (Figure 3).

However, in complex ecosystems, such it is the soil, the percentage of total reads classified to a taxonomic level decreases as increases the taxonomic depth (Table 2).

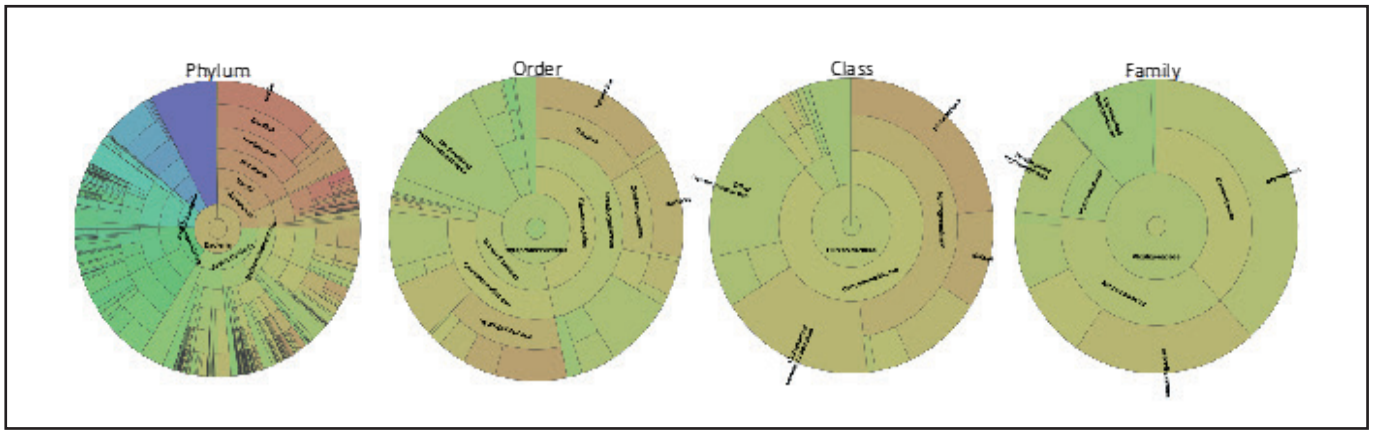


Figura 3. Esempio di output ottenuto in seguito all'analisi bioinformatica per la classificazione filogenetica delle popolazioni batteriche a diversi livelli tassonomici in un campione di suolo contaminato.

Figure 3. Output obtained by bioinformatic analysis to classify microbial populations to different taxonomic levels in a polluted soil sample.

Tabella 2. Percentuale e numero di sequenze identificate a diversi livelli tassonomici in un campione di suolo contaminato.

Table 2. Reads and % total reads classified to taxonomic level in a polluted soil sample.

Livello tassonomico / Taxonomic level	Numero di sequenze identificate / Reads classified to taxonomic level	Percentuale delle sequenze totali identificate / % Total reads classified to taxonomic level
Regno / Kingdom	360240	99,79 %
Phylum / Phylum	353597	99,79 %
Ordine / Order	349224	96,74 %
Classe / Class	339792	94,12 %
Famiglia / Family	332137	92,00 %
Genere / Genus	308687	85,51 %
Specie / Species	216378	59,94 %

necessario il ricorso ad avanzati sistemi bioinformatici.
Tra le diverse piattaforme, il sistema Illumina MiSeq ha un elevatissimo impatto nel mondo scientifico. Tale tecnologia è stata utilizzata anche nell'ambito del progetto Ecoremed per studiare e monitorare il microbiota dei suoli contaminati, valutando l'impatto dei contaminanti e dei programmi di biorisanamento applicati sulle popolazioni microbiche. In questo contesto, la tecnologia Illumina MiSeq per lo studio del microbiota basato sull'*amplicon sequencing*, ha previsto l'amplificazione PCR del DNA genomico usando primer specifici per una regione del gene 16S rRNA, la regione V3-V4. Successivamente gli ampliconi erano purificati e sottoposti ad un ulteriore amplificazione per l'attacco degli index e degli adattatori per il sequenziamento Ilumina utilizzando il kit Nextera XT Index. Le librerie ottenute dai diversi campioni erano successivamente purificate, quantificate tramite saggio fluorimetrico, diluite alla stessa concentrazione e unite. Infine, le librerie erano denaturate e sequenziate utilizzando la piattaforma MiSeq.
Le migliaia di sequenze ottenute devono poi essere analizzate tramite sistemi bioinformatici confrontandole con database specifici ottenendo, infine, una classificazione filogenetica delle popolazioni batteriche a diversi livelli tassonomici (Figura 3).
Tuttavia, in ecosistemi complessi come ad esempio il suolo, la percentuale di sequenze identificate diminuisce all'aumentare della profondità tassonomica (Tabella 2).

References

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59:143-169.

Jin H.M., Kim J.M., Lee H.J., Madsen E.L., Jeon C.O. (2012). *Alteromonas* as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil-contaminated coastal sediment. *Environmental Science & Technology*, 46:7731-7740.

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:695-700.

Øvreås L., Jensen S., Daae F.L., Torsvik V. (1998). Microbial communities changes in perturbed agricoltural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:2739-2742.

Sorlini C. (2005). La bonifica dei siti contaminati. *McGraw-Hill Milano*, 365-389.

Ventorino V., Parillo R., Testa A., Viscardi S., Espresso F., Pepe O. (2016). Chestnut green waste composting

Riferimenti bibliografici

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59:143-169.

Jin H.M., Kim J.M., Lee H.J., Madsen E.L., Jeon C.O. (2012). *Alteromonas* as a key agent of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in crude oil-contaminated coastal sediment. *Environmental Science & Technology*, 46:7731-7740.

Øvreås L., Jensen S., Daae F.L., Torsvik V. (1998). Microbial communities changes in perturbed agricoltural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:2739-2742.

Sorlini C. (2005). La bonifica dei siti contaminati. *McGraw-Hill Milano*, 365-389.

Ventorino V., Parillo R., Testa A., Viscardi S., Espresso F., Pepe O. (2016). Chestnut green waste composting for sustainable forest management: Microbiota dynamics and impact on plant disease control. *Journal of Environmental Management*, 166:168-177.

Zocca C., Di Gregorio S., Visentini F., Vallini G. (2004). Biodiversity amongst cultivable polycyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria isolated from an abandoned industrial site. *FEMS Microbiology Letters*, 238:375-382.

for sustainable forest management: Microbiota dynamics and impact on plant disease control. *Journal of Environmental Management*, 166:168-177.

Zocca C., Di Gregorio S., Visentini F., Vallini G. (2004). Biodiversity amongst cultivable polycyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria isolated from an abandoned industrial site. *FEMS Microbiology Letters*, 238:375-382.

13d. Biomonitoraggio di vertebrati e invertebrati

G. Guerriero, G. Ciarcia

13d.1 Metodologia

Siti ed animali

La selezione di organismi animali, biosentinelle dei suoli degradati, è stata effettuata previa individuazione delle aree di campionamento e loro caratterizzazione che ha previsto l'acquisizione di dati relativi al numero di abitanti/ kmq (dati ISTAT), all'attività economica prevalente (dati Italiapedia), alle industrie (censimento), all'indice della qualità del suolo e dello stato ecologico in relazione ai principali microinquinanti (dati ARPAC). La selezione è avvenuta mediante riconoscimento a vista per i vertebrati (Sutherand, 2006) ed il setaccio del suolo e successivo controllo macro e microscopico per gli invertebrati (Oliver e Beattie, 1993). Campioni rappresentativi di lucertole come vertebrati e chiocciole come invertebrati sono stati catturati da ciascun sito del Litorale Domizio Agro-Aversano del comune di Teverola (41°01'52.5"N; 14°13'47.0"E), Giugliano (40°57'36.8"N; 14°07'06.3"E), Trentola-Ducenta (40°58'32.07"N ; 14°8'58.69"E) durante la fase iniziale del progetto, prima (2013) e dopo le azioni di risanamento (anno 2015, stadio intermedio, ed anno 2016), nel mese di ottobre, mediante tecnica riportata da Clergeau et al., (2011) per chiocciole e da Sutherand, (2006) per lucertole. Dagli esemplari, selezionati in terrario per dimensioni e dove possibile per sesso, sono stati prelevati tessuti somatici e gonadici da conservare a -86°C ed in fissativi e, dopo annotazione dei dati biometrici, utilizzati per analisi istologiche, molecolari, biochimiche ed immunoistochimiche. Il sito di Monti di Lauro (Avellino, SIC code IT804001) è stato scelto come sito di controllo. Previo barcoding, sono state esaminate solo le chiocciole *Eobania vermiculata* (n=20-25 /sito con peso corporeo pari a 4,43±1,74g e peso gonadico 220±68mg,) e lucertole *Podarcis sicula* (n=30-35 maschi adulti/sito per anno, con peso corporeo circa 11,24±0,40g e peso testicolo di circa 40±1,89mg).

Identificazione molecolare della specie dei bioindicatori selezionati

- *Estrazione del DNA da tessuti dei bioindicatori del suolo*

  L'estrazione del DNA dai campioni avviene a partire da 50 mg di tessuto. Al tessuto somatico omogenizzato, sono stati aggiunti il buffer di estrazione del DNA (50 mMNaCl, 10 mM EDTA e 10 mM Tris base) e le cellule sono lisate aggiungendo sodio dodecil solfato 2%. L'RNA è stato rimosso aggiungendo RNAse (10 mg/ml) e poi incubando a 37°C per 30min. La proteinase K (0,5 mg/mL) è stata aggiunta per rimuovere le proteine e i campioni sono stati incubati per 1 h a 37°C nel bagnetto termostato. Gli estratti sono stati ulteriormente purificati mediante estrazione con fenolo: cloroformio: alcool isoamilico (25:24:1 v / v) per due volte e centrifugati a 10.000 g per 15 min

13d. Biomonitoring of health status of vertebrate and invertebrate species

G. Guerriero, G. Ciarcia

13d.1 Methodology

Sites and animals

Selection of animal organisms, bioindicators of degraded soil, was made after identifying the sampling areas and their characterization. Characterization provided the acquisition of data relating to the number of inhabitants/ km² (ISTAT data), chief economic activity (Italiapedia data), firms (census), index of soil quality and environmental status in relation to the state of the main micropollutants (ARPAC data). The selection was made by recognizing vertebrates at sight and sieving the soil and following macro and microscopic control for invertebrates (Oliver and Beattie, 1993). Representative samples of snails as invertebrates and lizards as vertebrates were captured from each site on the Litorale Domitio Agro-Aversano, namely the town of Teverola (41° 01'52.5 "N; 14° 13'47.0" E), Giugliano (40° 57'36.8 "N; 14 ° 07'06.3" E) and Trentola-Ducenta (40° 58'32.07 "N; 14° 8'58.69" E) during the initial phase of the project, (2013) and after remediation (years 2015 and 2016), in October, using techniques reported by Sutherand (2006) for lizards. From the specimens, selected in terrarium size and where possible by sex, somatic and gonadal tissues were taken and stored at -86 ° C or in fixatives and after recording biometric data utilized for histological, immune histochemical, biochemical and molecular procedures. As a control site we selected Monti di Lauro (Avellino, SIC code IT804001). After barcoding, we examined snails *Eobania vermiculata* (20-25 adult males/site each year, with a body weight of around 4.43± 1.74g and individual gonad weight of around 220± 68mg) and the lizard *Podarcis sicula* (30-35 adult males/site each year, with a body weight of around 11.24± 0.40g and individual testis weight of around 40± 1.89mg).

Species identification of selected bioindicators

- *DNA extraction from soil bioindicator tissues*

  DNA extraction from the tissues of bioindicators was performed as reported in Guerriero et al. (2010) with a phenol/chloroform standard method using autoclaved glassware and equipment. About 50 mg samples of ground freeze dried tissues were mixed in a DNA extraction buffer (50 mM NaCl, 10 mM EDTA and 10 mM Tris base) and the cells were lysed by adding 2% sodium dodecyl sulphate. The RNA was removed by adding RNAse (10 mg/mL) followed by incubation at 37°C for 30min. Proteinase K was added (0.5 mg/mL) to remove protein and the samples were incubated for 1h 37°C in a shaking water bath. The extracts were further purified by extracting twice with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 v/v) and by centrifuge at 10,000×g for 15 min at 4°C. The upper aqueous layer was transferred into a new micro-centrifuge tube and the DNA was

a 4 ° C. Il surnatante è stato trasferito in una nuova eppendorf e il DNA è stato precipitato aggiungendo a ciascun campione 3 M di acetato di sodio, in rapporto 1:10 volume, a pH 5,2 e due volumi di 100% etanolo refrigerato, mescolando e centrifugando a 15.000 g per 30 minuti a 4 ° C. Il pellet è lavato con etanolo 70%, essiccato e infine risospeso in 50 ml di acqua deionizzata sterile. La densità ottica (OD) di ciascun campione è stata misurata a 260 e 280 nm, rispettivamente, mediante uno spettrofotometro-UV (Biochrom Bilancia S12). La purezza del DNA è stata misurata dal rapporto OD260/OD280 (rapporto ideale = 1,7-2,0) e la qualità mediante elettroforesi su gel di agarosio 0,8% visualizzata sotto luce UV.

- *Amplificazione mediante PCR e sequenziamento*
  L'amplificazione per PCR è stata eseguita come riportato in Guerriero et al. (2010) utilizzando i seguenti primers: 5'-GGTCAACAAT CATAAAGATATTGG-3'(COI UP) e 5'-TATACTTCTGGATGACCAAAAAAT CA-3' (COI DW) per COI rRNA (Cadahia, et al., 2013) per le chiocciole e 5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3' (16Sar) e 5'- CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' (16Sbr) per il 16S rRNA e/o 5'AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT - 3 ' (12SA) e 5'-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3 ' (12SB) per il 12S rRNA per le lucertole.
  La reazione di PCR è stata eseguita in termociclatore Techgene (Thecne Ltd, Cambridge, UK) con trentacinque cicli di amplificazione in un tampone di reazione contenente 50 mM KCl; 10 mM Tris/HCl, pH 9.0; NaCl 10 mM; EDTA 0,01 mM; 2,5 mM di ciascun dNTP; 1 mM di ciascun primer; 10 ng di DNA; 0,5 unità di Taq DNA polimerasi (Invitrogen, Milano, Italia). Le condizioni di amplificazione per la PCR sono: denaturazione a 94 ° C per 45 s, annealing a 55 ° C per 50 s ed estensione a 72 ° C per 90 s. Al termine dell'incubazione, 5 microlitri di prodotto di PCR sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2 % e visualizzati sotto luce UV. Una scala di 100 bp (Invitrogen, Milano, Italia , Fermentas, M-Medical srl, Milano, Italia) è stata utilizzata per stimare la dimensione degli ampliconi generati. Il DNA amplificato è stato purificato mediante colonne di purificazione MicroCon 100 (Millipore - Amicon, Belford, MA, USA) secondo le istruzioni del produttore e sequenziato usando Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) di un sequenziatore automatico (ABI 310 Genetic Analizer, Applied Biosystems).

- *Analisi di sequenza*
  I primer per il sequenziamento sono gli stessi utilizzati per l'amplificazione per PCR. L'analisi delle sequenze è stata effettuata allineando mediante i software Chromas 1.45 vs (Technelysium 186 Pty, Tewantin, Australia) e BioEdit (Tom Hall Ibis Therapeutics, Rutherford Strada Carlsbad, CA) e confrontando le sequenze ottenute con quelle presenti in GenBank utilizzando FASTA (Monte 2007, FASTA SIMILARITY SEARCH).

precipitated by adding 1/10th volume of 3 M sodium acetate at pH 5.2 and two volumes of 100% chilled ethanol to each sample and centrifuged at 15,000×g for 30 min at 4°C. The pellet was washed with 70% ethanol, air dried, and finally re-suspended in 50 µl sterilized deionized water. Optical density (OD) of each sample was measured at 260 and 280 nm, respectively, by UV-spectrophotometer (Biochrom Libra S12), and the purity of DNA was measured by the OD260/OD280 ratio (ideal ratio = 1.7–2.0), and the quality by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and visualized under UV light.

- *PCR amplification and sequencing*
  PCR amplification was performed as previously published in Di Finizio et al. (2007) using the following primers: 5'-GGTCAACAAT CATAAAGATATTGG-3'(COIUP) and 5'-TATACTTCTGGATGACCAAAAAAT CA-3' (COI DW) for COI rRNA of snails (Cadahia, et al., 2013) and 5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3' (16Sar) and 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT- 3' (16Sbr) for the 16S rRNA gene and/ or 5'AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3' (12Sa) and 5'-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3' (12Sb) for the 12S rRNA gene for lizards. PCR reaction was performed in a Techgene Thermal Cycler (Thecne Ltd., Cambridge, UK). Thirty-five cycles of amplification were carried out in a reaction buffer containing 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9.0; 10 mM NaCl; 0.01 mM EDTA; 2.5 mM of each dNTP; 1 µM of each primer; 10 ng of template DNA; 0.5 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Milan, Italy). PCR amplification conditions were as follows: denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 50 s, and extension at 72°C for 90 s. At the end of the incubation, 5 µl of PCR products were separated by electrophoresis through 2% agarose gel and visualized under UV light. A 100 bp ladder (Invitrogen, Milan, Italy, or Fermentas, M-Medical srl, Milan, Italy) was used to estimate the fragment size of the amplicons generated. Amplified DNA was desalted with Microcon 100 spin columns (Millipore-Amicon, Belford, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and sequenced using Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an automatic capillarity sequencer (ABI 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Primers for sequencing were the same used for PCR amplification.

- *Sequence analysis*
  The resulting sequences were analysed and aligned using Chromas 1.45 vs (Technelysium 186 Pty, Tewantin, Australia) and BioEdit (Tom Hall Ibis Therapeutics, Rutherford Road Carlsbad, CA) software and compared for control with GenBank sequences data for rRNA fragment belonging to those species examined using FASTA (Mount, 2007, FASTA SIMILARITY SEARCH).

Determinazione e quantificazione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) in tessuti delle specie bioindicatrici del suolo selezionate

- *Spin-trapping ed estrazione radicalica*
  La procedura di spin-trapping e di estrazione radicalica è stata realizzata ottimizzando il metodo riportato in letteratura da Ashton et al., (1998). La soluzione di 140 mmol/L di spin-trap N-tert-butil-α-fenilnitrone (PBN) della Sigma, è stata preparata in acqua deionizzata in una stanza buia. Per l'analisi sono stati utilizzati circa 20mg di tessuto di gonade.
  I campioni di tessuto sono stati pesati su una bilancia di precisione e omogeneizzati in soluzione fisiologica. La quantità di soluzione salina aggiunta è stata ottimizzata per ciascun campione, senza mai superare 1 mL per grammo di tessuto. Un adeguato volume della soluzione PBN è stato aggiunto al campione omogeneizzato così da avere un rapporto 1: 5 vol / vol.
  Questo passaggio è stato effettuato su ghiaccio al buio e i campioni sono stati lasciati a riposo per 10 minuti prima di essere centrifugati per 10 min a 3500 rpm. Il surnatante è stato prelevato e accuratamente miscelato con pari volume di toluene per HPLC (Sigma). 10 mL della fase organica contenente l'addotto PBN è stato recuperato e posto in un capillare di quarzo, che è stato degassato sotto vuoto e sigillato a fiamma.

- *Spettroscopia ESR (Electron Spin Resonance)*
  Le misure ESR (Electron Spin Resonance) o EPR (Electron Paramagnetic Resonance) sono state eseguite entro le 24 ore successive alla preparazione del campione. I capillari sono stati collocati in tubi di quarzo ESR di 3 mm di diametro. Gli esperimenti sono stati effettuati a temperatura ambiente su banda X con spettrometro Elexys E-500 (Bruker), utilizzando le seguenti condizioni operative: frequenza microonde 9,871 GHz; potenza incidente a microonde 6,4 mW; larghezza di scansione 6.000 mT; modulazione di ampiezza 0.1000 mT; frequenza di modulazione 100 kHz; centro campo magnetico 351,0 mT; costante di tempo, 10 ms.
  L'intensità dello spettro ESR è stata ottenuta mediante doppia integrazione del primo segnale. I dati sono stati normalizzati per i grammi di tessuto dei campioni sottoposti alla procedura di estrazione radicalica e quantitativamente analizzati in termini di variazioni relative. Per confrontare i dati ottenuti da diversi esemplari e dai diversi siti, tutti i valori sono stati ulteriormente normalizzati per il valore medio del doppio integrale (DI) rilevato per i campioni provenienti dal sito di controllo di Monti di Lauro, scelto come riferimento.

Danno al DNA nei tessuti delle specie bioindicatrici del suolo selezionate

- *Elettroforesi su gel di agarosio e colorazione per la stima del DNA*
  Il DNA purificato estratto dai tessuti è stato caricato con un marcatore su un gel di agarosio non denaturante al 0,5 % in tampone TBE (45 mM di acido borico, 2,5 mM EDTA , 135 mM Tris base, pH 8). Prima

Reactive oxygen species detection and quantification in selected soil bioindicator tissues

- *Radical extraction procedure*
  The spin-trapping and adduct extraction procedure was optimized starting from a method previously reported in the literature by Ashton et al. (1998). Briefly, a 140 mmol/L solution of the spin-trap N-tert-butyl-α-phenylnitrone, PBN (Sigma), in de-ionized water was freshly prepared in a darkened room. One testis of each lizard (around 20 mg) was used for the analysis. The tissue samples were weighed on a precision balance and homogenized in physiological saline. The quantity of added saline was optimized for each sample, but never exceeded 1mL per gram of tissue. An appropriate volume of the PBN solution was added to the homogenized sample so as to have a 1:5 vol/vol ratio. This step was carried out on ice in the dark and the samples were allowed to equilibrate for 10 min before being centrifuged for 10 min at 3500 rpm. The supernatant was transferred to another vial, and thoroughly mixed with an equal volume of HPLC-grade toluene (Sigma). 10 µL of the organic phase containing the PBN adduct was recovered and placed in a quartz capillary, which was vacuum degassed and flame-sealed. Blank experiments were also carried out using the above extraction procedure.

- *ESR spectroscopy*
  ESR measurements were performed within 24 hrs after sample preparation. Capillaries were placed in a 3 mm i.d. ESR quartz tube. Room-temperature experiments were carried out on an Elexys E-500 X-band spectrometer (Bruker) using the following operating conditions: microwave frequency, 9.871 GHz; incident microwave power, 6.4 mW; scan width, 6.000 mT; modulation amplitude, 0.1000 mT; modulation frequency, 100 kHz; magnetic field centre, 351.0 mT; time constant, 10 ms. The ESR spectrum intensity was obtained by double integration of the first derivative signal. The data were normalized by the weight of the tissue samples subjected to the radical extraction procedure and quantitatively analysed in terms of relative variations. Radical content in the analysed samples was quantified by double integration of the EPR signal and normalised per weight of treated tissue. In order to allow a ready comparison among data from different specimens from different sites, all the values were further normalised by the mean value of the DI detected for samples coming from the natural site Monti di Lauro, chosen as reference.

DNA damage in selected soil bioindicator tissues

- *Agarose gel electrophoresis and staining for gonad DNA*
  The purified gonad DNA extracts from bioindicators of the degraded area (pre, n equal to 3 and after remediation, n equal to 3) and one from unpolluted areas (Monti di Lauro) were obtained following the procedure applied for the DNA extraction fol-

di essere caricati nel gel a ciascun campione è stato aggiunto il blu di bromofenolo per contrassegnare la migrazione di questi estratti. L'elettroforesi su gel è stata effettuata a 70 V per circa 1h utilizzando un mini sistema di elettroforesi su gel orizzontale. La migrazione del DNA è stata osservata colorando il gel per circa 40 minuti al buio in 200 ml di tampone TBE e 20 microlitri di SYBR Green l. La distanza di migrazione delle molecole di DNA dalla parte superiore del gel è stata utilizzata come misura del danno al DNA ed è stata eseguita come precedentemente riportato in Chaudhry e Jabeen (2011). La migrazione del DNA è inversamente proporzionale alla lunghezza delle molecole di DNA e di conseguenza è stata usata per stimare la distribuzione dei diversi frammenti e il valore della mobilità relativa (Rf). Dove Rf è uguale alla distanza dall'origine al centro di ciascuna banda di DNA frammentato sul gel divisa per la distanza totale percorsa dal colorante dalla parte superiore alla parte inferiore di tale gel. E' noto che i filamenti di DNA altamente frammentati a basso peso molecolare migrano più lontano dei filamenti di DNA non danneggiati ad alto peso molecolare. Le fotografie del gel sono state usate per stimare i valori di Rf dei frammenti di DNA dei tessuti somatici e gonadici dei bioindicatore. I frammenti di DNA ed i loro valori di Rf sono stati poi confrontati con quelli dei marcatori del DNA per determinare l'effetto del degrado ambientale sul DNA dei tessuti dei bioindicatori del suolo.

Riparo al DNA dei tessuti delle specie bioindicatrici del suolo selezionate

- *Preparazione degli omogenati, isolamento della frazione nucleare*
  Per isolare i nuclei dai tessuti dei bioindicatori del suolo è stato utilizzato il metodo modificato di Adamietz e Böttcher (1994) riportato in Arena et al. (2011). Tutte le operazioni sono state effettuate su ghiaccio. Il tessuto è stato raccolto, tagliato, risospeso e omogeneizzato a bassa velocità in 10 mM TrisHCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 0,5 mM PhMeSO2F, 3mM MgCl2, 0.5 % NP-40 e 5-10 μg/ml di cocktail di inibitori (tampone A, 1:4 w/v). Dopo centrifugazione a 2000g per 15 minuti a 4°, il surnatante contenente la frazione citoplasmatica è stato congelato a -20 ° C e il pellet è stato risospeso in tampone A (1:2 peso/volume). Il tampone B (tampone A contenente 0.88 M saccarosio) è stato aggiunto v/v. Successivamente, la sospensione è stata stratificata su un cuscino di tampone B (81.0.5, v/v) e centrifugata a 3000g per 10 minuti a 4°C. Il pellet è stato sospeso in tampone DBT (tampone A/0.3M saccarosio/1mM EGTA/1 % Triton X-100, 1:1 w/v) e centrifugato come sopra. Il pellet, lavato una volta in tampone DB (tampone A/0.3M saccarosio/1mM EGTA/1 %, 1:1 w/v), è stato centrifugato a 750g per 10 minuti a 4°C. Il pellet nucleare è stato risospeso in tampone DB contenente glicerolo al 20 % e conservati a -80°C.

- *Saggio di attività della Poli (ADP-ribosil)azione*
  Le condizioni del saggio di attività della Poli (ADP-ribosil)azione sono quelle descritte in Ciarcia et al. (1986). L'attività PARP nei nuclei (400 µg di proteine) è stata saggiata per 15 minuti a 30°C in presenza di 0.51mM [^{32}P] NAD+ (10,000 cpm/nmole). In un esperimento parallelo, il saggio enzimatico è stato effettuato aggiungendo DNA (1mg/ml) e DNAsi (0.5mg/ml) alla miscela di reazione. Il fi-

lowing Guerriero et al. (2010). DNA together with a marker were loaded on a non-denaturing 0.5% agarose gel in TBE buffer (45 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, 135 mM Tris base, pH 8). Bromophenol blue was added to each sample before its loading on each gel to mark the migration of these extracts. Gel electrophoresis was carried out at 70 V for around 1h using a horizontal mini gel electrophoresis system (VWR, UK). DNA migrating was observed by staining the gel for about 40 min in the dark in 200 ml TBE buffer and 20 µl SYBR Green l. The migration distance of the DNA molecules from the top of the gel was used as a measure of DNA damage and was performed as previously published in Chaudhry and Jabeen (2011). Since migration of the DNA is inversely proportional to the length of the DNA molecules, it was used to estimate the distribution of different strand lengths (fragments). It is recognized that the highly fragmented, low molecular weight DNA strands will migrate farther than non-damaged high molecular weight DNA strands. The gel photographs were used to estimate the DNA fragments of lizard samples. The DNA fragments were then compared with those of the DNA markers to determine the effect of contaminated soil on the DNA of the bioindicator tissues.

DNA repair in selected soil bioindicator tissues

- *Homogenate preparation, nuclear fraction isolation*
  Modified method of Adamietz and Böttcher (1994) reported in Arena et al. (2011) was used to isolate nuclei from tissues of soil bioindicators. All operations were carried out on ice. The tissues were harvested, cut, resuspended and homogenized at low speed in 10 mM TrisHCl pH 7.4, 10mM NaCl, 0.5 mM PhMeSO2F, 3mM MgCl2, 0.5% NP-40 and 5-10µg/ml inhibitor cocktail (buffer A, 1:4 w/v). After centrifugation at 2000g for 15 minutes at 4°C, the supernatant containing the cytoplasmic fraction was frozen at -20 ° C and the pellet was resuspended in buffer A (1:2 weight/ volume). Buffer B (buffer A, containing 0.88 M sucrose,) was added v/v. Subsequently, the suspension was layered on a cushion of buffer B (81.0.5, v/v) and centrifuged at 3000g for 10 minutes at 4°C. Pellet was suspended in buffer DBT (buffer A/0.3M sucrose/1mM EGTA/1% Triton X-100, 1:1 w/v) and centrifuged as above. Pellet, washed once in buffer DB (buffer A/0.3M sucrose/1mM EGTA/1% , 1:1 w/v), was centrifuged at 750g for 10 minutes at 4 ° C. Nuclear pellet was resuspended in buffer DB, containing 20% glycerol and stored at -80°C.

- *Poly(ADPribosyl)ation activity assay*
  Activity assay conditions were those described in Ciarcia et al. (1986). PARP activity in nuclear (400 µg of proteins) was assayed for 15 minutes at 30°C in the presence of 0.51mM [^{32}P] NAD+ (10,000 cpm/nmole). In a parallel experiment, enzyme assay was carried out by adding DNA (1mg/ml) and DNAse (0.5mg/ml) to the reaction mixture. The fi-

bosil)azione sono quelle descritte in Ciarcia et al. (1986). L'attività di PARP nelle frazioni nucleari (400 μg di proteine) è stata saggiata per 15 minuti a 30 ° C in presenza di 0,51 mM [32P] NAD+ (10.000 cpm/nmole). In un esperimento parallelo, il saggio enzimatico è stato effettuato aggiungendo alla miscela di reazione DNA (1mg/ml) e DNAsi (0.5mg/ml). La radioattività specifica finale (10.000 cpm/nmole) e la concentrazione (0,51 mm) sono state raggiunte mescolando 0.51mM NAD+ marcato e non. La miscela di reazione era composta da tampone 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM MgCl2 e 10 mM DTT (50 μl volume finale). In un esperimento parallelo, l'attività di PARP è stata anche determinata aggiungendo alla miscela di reazione DNAsi (0.5mg/ml). La reazione è stata bloccata con acido tricloroacetico (TCA) al 30 % ghiacciato e la radioattività presente nel materiale insolubile acido, raccolto sul filtro HAWP (0.45, Millipore), è stata determinata con uno spettrometro per scintillazione liquida Beckman LS 1701. Una unità PARP è definita come la quantità di enzima necessaria per convertire, in condizioni standard, 1nmol di NAD +/min.

Attività antiossidante nei tessuti delle specie bioindicatrici del suolo selezionate

- *Saggio della Glutatione S-Transferasi*
  L'attività del Glutatione S-Transferasi (GST) è stata misurata spettrofotometricamente secondo il metodo modificato suggerito da Habig et al. (1974) in cui è stato utilizzato il 1-cloro-2,4- dinitrobenzene (CDNB) come substrato. Prima dell'analisi, i campioni di pelle congelati sono stati estratti con un tampone fosfato (pH 6.5). Dopo l'aggiunta del tampone, la miscela è stata omogeneizzata e poi centrifugata a 5400 g per 30 min a 4 ° C. Il surnatante è stato utilizzato per il saggio del Glutatione S-Transferasi (GST). La miscela di reazione è stata preparata miscelando 0,900 mL di tampone fosfato di sodio 0,1 M pH 6,5, 0,050 mL di GSH 9.2 mM, 0,025 mL di CDNB 0,1 M e 0,025 ml di campione. E' poi stato misurato l'incremento dell' assorbanza a 340 nm che è causa della formazione del coniugato 1-cloro-2,4-dinitrobenzene alla presenza di glutatione ridotto (GSH). La cinetica di reazione è stata analizzata a 25 ° C per 5 min a 340 nm. La miscela di reazione priva del campione è stata usata come bianco. Una unità di attività GST è stata espressa come mmol del prodotto formato/(min/g di tessuto).

- *Capacità antiossidante*
  La determinazione della capacità antiossidante in gonade di biosentinelle in tutti i siti esaminati pre e post risanamento è stata realizzata secondo Arena et al., (2013). Il saggio è basato sulla riduzione di Mo (VI) per Mo (V) con conseguente formazione di un complesso fosfo-molibdato/ Mo (V) a pH acido. I campioni una volta pesati (0,3 g), sono stati congelati in azoto liquido e polverizzati con mortaio. Ai campioni è stato aggiunto 1mL di acqua dopodichè sono stati omogenizzati con l'utilizzo del Polytron Ultra Turrax

nal specific radioactivity (10,000 cpm/nmole) and concentration (0.51mM) were reached by mixing labelled and unlabelled 0.51mM NAD+. The reaction mixture was composed of 100mM Tris-HCl buffer, pH 7.5; 50mM MgCl2 and 10mM DTT (final volume 50µl). In a parallel experiment, PARP activity was also determined by adding DNAse (0.5mg/ml) to reaction mixture. The reaction was stopped with ice-cold 30% trichloroacetic acid (TCA) and the radioactivity present in the acid insoluble material, collected on HAWP filter (0.45µm, Millipore), determined on a Beckman LS 1701 liquid scintillation spectrometer. One PARP unit is the amount of enzyme required to convert 1nmol of NAD+/min. under standard conditions.

Antioxidant activity in selected soil bioindicator tissues

- *Glutathione S-Transferase (GST) assay*
  In order to estimate the activity of GST in accordance with Habig et al. (1974), 250 mg of tissue of three different pools of gonads of the degraded site, before and after remediation, and of the unpolluted site were homogenized under liquid nitrogen with mortar and pestle to a fine powder. The dust was suspended in 750 μL cold potassium phosphate buffer 0.1 M pH 6,5, EDTA 1mM. The homogenate was centrifuged at 4° C at 7000 g for 30 min and the supernatant was used for the assay. The GST was evaluated spectrophotometrically on three determinations in duplicate for each pool (n=3) by following the increase in the absorbance (340 nm) for 5 min at 25°C due to the conjugation of reduced glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at the final concentration of 1mM reduced glutathione, 1mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, and 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) and subtracting the blank values. GST activity was expressed as nM/min/g tissue.

- *Antioxidant capacity*
  The antioxidant capacity in gonad of biosensors in pre- and post-remediation in all sites examined was determined according to Arena et al. (2013).The assay is based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the sample analyte and the subsequent formation of a green phosphate/Mo(V) complex at acidic pH. The samples (0.3 g) were frozen under liquid nitrogen and ground with a pestle and mortar to a fine powder. A volume of water (1 ml) was added to the samples, and they were then homogenized through Polytron Ultra Turrax T8 (IKA-WERKE) for about 30 seconds at medium-high speed. The suspension, left in the dark stirring at room temperature overnight, was subsequently centrifuged at 10000g for 15 min at 4 ° C with Eppendorf centrifuge 5417 (Bio-Rad, rotor F 45-30-11). The pellets were re-suspended in solvent v/v and centrifuged once more. The two supernatants were combined and kept at 4 °C. For the spectrophotometric determinations, 1 ml of reagent solution (0.6 mol/L sulphuric acid, 28 mmol/L sodi-

T8 (IKA-WERKE) per circa 30 secondi a velocità medio-alta. La sospensione, lasciata in agitazione al buio a temperatura ambiente per tutta la notte, è stata successivamente centrifugata a 10000g per 15 min a 4°C. I pellet sono stati risospesi in egual volume di solvente e centrifugati di nuovo. I due surnatanti sono stati prelevati e conservati a 4°C. Per le determinazioni spettrofotometriche è stato aggiunto 1 ml di tampone (0,6 mol/ L di acido solforico, 28 mmol / L di fosfato di sodio, e 4 mol / L di molibdato di ammonio) ad aliquote di campioni (0,1 ml) che in seguito sono state incubate a 95°C per 90 min in bagnetto termostatato. L'assorbanza delle soluzioni acquose è stata misurata a 695 nm. Il bianco è stato preparato con 1 ml della soluzione reagente ed è stato incubato nelle stesse condizioni previste per i campioni.

Caratterizzazione dello stato di salute riproduttiva delle specie bioindicatrici del suolo selezionate

- *Istologia e immunolocalizzazione degli antiossidanti e dei recettori sessuali steroidei*

  La colorazione morfologica è stata condotta su sezioni istologiche (5 mm di spessore) con ematossilina/eosina (H/E, Bio-Optica). Le sezioni sono state preparate da tessuti inclusi in paraffina. Le sezioni degli stessi campioni sono state anche utilizzate per immunorivelazione di biomarkers con il metodo standard dell'immunofluorescenza. Le condizioni di analisi sono quelle riportate in Guerriero et al., (2009). I siti di legame non specifici per le immunoglobuline sono stati bloccati mediante incubazione per 1 h con siero normale di capra (NGS) in PBS (1:5). Le sezioni sono state incubate per una notte in una camera umida a 4°C con gli anticorpi commerciali primari anti-antiossidanti diluiti come da indicazioni delle ditte produttrici: anti GST (*Abcam*) ed anti ER (SANTA CRUZ/BIOTECNOLOGY sc-8002). Dopo un lavaggio in PBS per 10 minuti, le sezioni sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente con isotiocianato di fluoresceina (FITC) coniugato anti-IgG (Sigma). La specificità di marcatura dei peptidi è stata verificata incubando sezioni con antisiero pre-assorbito con il rispettivo antigene (10-100 g/ml). Le procedure di pre-assorbimento sono state effettuate un'intera notte a 4°C. I controlli negativi per la colorazione immunoistochimica sono stati eseguiti sostituendo il siero bianco (senza anticorpi) con gli antisieri primari. Tutte le osservazioni sono state effettuate con un microscopio confocale Zeiss LSM 700.

- *SDS-PAGE e immunoblotting di PARP e di recettori sessuali steroidei*

  L'SDS-PAGE di omogenato e delle frazioni nucleare e citoplasmatica dei tessuti gonadici dei bioindicatori è stata eseguita come riportato in Guerriero et al. (2000). Le proteine (20 µg) sono state analizzate su gel di poliacrilammide al 12 % in presenza di SDS allo 0,1 % ed elettrotrasferite su membrana di PVDF (0,2 μm BioRad) a 200 V per 2 ore a 4°C nello stesso tampone utilizzato per la corsa elettroforetica. Il gel è stato colorato con Coomassie Brillant Blue allo 0,25% in acido acetico 10%/metanolo 50%. Per gli esperimenti di immunoblot procedure e tamponi sono stati eseguiti secondo Guerriero et al. (2000). Polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets sono stati trattati per 1.5 hr con la soluzione bloccante (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 % (v/v) Tween 0.5%, TBST) e 3 % (w/v) gelatina. L'incubazione con l'anticorpo primario commerciale anti-recettore steroideo: anti-recettore estrogeno (SANTA CRUZ/BIOTECNOLOGY sc-8002) e anti

um phosphate, and 4 mol/L ammonium molybdate) was added to aliquots of samples (0.1 ml) and they were then incubated at 95°C for 90 min in a water-bath. The absorbance of the aqueous solutions was measured at 695 nm. The blank solution contained 1 ml of the reagent solution; the appropriate volume of the same solvent used for the sample was incubated under the same conditions as the rest of the samples.

Characterization of reproductive health status in selected soil bioindicator tissues

- *Histology and antioxidants and sex steroid receptor immune localization*

  Morphological staining was carried out on histological sections (5µm thick) using haematoxylin/eosin (H/E, Bio-Optica). Sections were prepared from paraffin-embedded tissues. Sections from the same samples were also used for immune detection of biomarkers with the standard immunofluorescence method. Assay conditions were those reported in Guerriero et al. (2009). Non-specific binding sites for immunoglobulins were blocked by incubations for 1 h with normal goat serum (NGS) in PBS (1:5). The sections were incubated overnight in a humid chamber at 4 ° C with the primary commercial antibodies diluted as instructed by the manufacturers: anti GST (Abcam) and anti-ER (SANTA CRUZ / Biotechnology sc-8002). After a rinse in PBS for 10 min, the sections were incubated for 2 h at room temperature with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-IgG (Sigma). Labelling specificity of the peptides was verified by incubating sections with antiserum pre-absorbed with the respective antigen (10–100 g/ml). The pre-absorption procedures were carried out overnight at 4°C. Negative controls for immuno-histochemical labelling were performed by substitution of blank sera (without antibodies) for the primary antisera. All observations were made with a Zeiss LSM 700 confocal microscope.

- *SDS-PAGE and Western analysis of PARP and sex steroid receptor immunoblotting*

  SDS-PAGE of homogenate, nuclear and cytoplasmic fractions from the gonad of bioindicators was performed according to Guerriero et al. (2000). Proteins (20 µg) were analysed on 12 % polyacrylamide gel in the presence of 0.1% SDS and electrotransferred onto PVDF membrane (0.2 µm BioRad) at 200 V for 2 hours at 4°C in the same buffer used for the electrophoretic run. Gel was stained in 0.25% Coomassie Brillant Blue in 10% acetic acid/50% methanol. For immuno-blot experiments procedures and buffers were carried out according to Guerriero et al. (2000). Polyvinylidene fluoride (PVDF) sheets were treated for 1.5 hr with the blocking solution (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 % (v/v) Tween 0.5%, TBST) and 3 % (w/v) gelatine. Incubation with the commercial primary anti-steroid receptor antibody: anti-estrogen receptor (SANTA CRUZ/BIOTECHNOLOGY sc-8002) and anti

lorato con Coomassie Brillant Blue R-250 allo 0,25 % in acido acetico al 10%/metanolo al 50%. Le procedure sperimentali per l'immuno-blot e i tamponi sono quelli riportati in Guerriero et al. 2000. Il filtro di polivinilidene di fluoruro (PVDF) sono stati trattati per 1h e 30 minuti con soluzione di bloccaggio (50 mM Tris-HCl a pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 % (v/v), Tween 0,5%, TBST) e gelatina al 3% (w/v). L'incubazione con gli anticorpi primari commerciali: anti-ERα (SANTA CRUZ/BIOTECNOLOGY sc-8002) e anti PARP (H-250, Santa Cruz, CA, USA) è stata eseguita per 2 ore a temperatura ambiente nella stessa soluzione aggiuntiva di gelatina allo 0,3 % e diluiti come da indicazioni delle ditte produttrici. Il blot è stato quindi lavato diverse volte con tampone TBST e il legame dell'anticorpo è stato rilevato mediante anti-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP). La reazione HRP è stata rivelata utilizzando un kit per chemiluminescenza (Super Signal West Dura Extended Substrate, 34075, PIERCE) e letta con Chemidoc XRS (BioRad, Milano, Italia).

Espressione genica di antiossidanti e recettori sessuali steroidei nelle gonadi delle specie bioindicatrici del suolo selezionate

- *Estrazione RNA totale e sintesi DNA*
  L'RNA totale è stato purificato da 40 mg di gonade utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen). Campioni di RNA sono stati quantificati e la loro qualità è stata verificata con spettrofotometro UV-Vis NanoDropH ND-1000 e mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio all'1% in condizioni denaturanti secondo Rave et al. (1979). L'RNA totale estratto è stato purificato dal DNA genomico attraverso la reazione della DNasi in accordo col protocollo Ambion DNA-free kit prima della retrotrascrizione per evitare l'amplificazione del DNA genomico contaminante. Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando M-MLV trascrittasi inversa in base al protocollo di PromegaImpProm II kit. cDNA diluito 1: 5 è stato utilizzato nella PCR in tempo reale, utilizzando 5 µl di ciascun primer forward e reverse in un volume finale di 20 µl, per determinare l'espressione genica.

- *Real-time PCR semi-quantitativa dei recettori degli estrogeni (ER) in gonade di* Eobania vermiculata
  Il recettore degli estrogeni (ER) ed il gene di controllo endogeno 18S sono stati testati in gonade di Eobania vermiculata con PCR semiquantitativa usando i seguenti primer: ER forward AGCGAGGCATCGCCTACTTC; ER reverse TCTACCGTCCAGGCTCACCA (Hultin et al., 2014); 18S, forward GCGACGCATCTTTCAAATGT; 18S reverse GCCAGGAGTGGGTAAGTTGC/ GenBank, accession number Ay 546397).
  La reazione di PCR è stata eseguita in termociclatore Techgene (Thecne Ltd, Cambridge, UK) con trentacinque cicli di amplificazione in un tampone di reazione contenente 50 mM KCl, 10 mM Tris / HCl, pH 9,0; 10 mM NaCl; 00:01 mM EDTA; 2.5 mM di ciascun dNTP; 1 mM di ciascun primer; 10

PARP (H-250, Santa Cruz, CA,USA) was performed for 2 hr at room temperature in the same solution supplemented with 0.3 % gelatin and diluted as instructed by the manufacturers. The blot was then washed several times with buffer TBST and antibody binding was detected by using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-IgG. HRP reaction was revealed by using a kit for chemiluminescence (Super Signal West Dura Extended Substrate, 34075, PIERCE) and reading by Chemidoc XRS (BioRad, Milan, Italy).

Antioxidants and sex steroid receptor gene expression in gonad of selected soil bioindicator species

- *Total RNA extraction, DNA synthesis*
  Total RNA was purified from 40 mg of gonad using the Trizol reagent (Invitrogen). RNA samples were quantified and their quality was checked with the UV-Vis spectrophotometer NanoDropH ND-1000 and by electrophoretic analysis on 1% agarose gel in denaturant condition according to Rave et al. (1979). All the total RNA extracted were purified to genomic DNA with DNase reaction according to the protocol Ambion DNA-free kit before retrotranscription to avoid the amplification of contaminant genomic DNA. cDNA was synthesized using M-MLV reverse transcriptase according to the protocol of PromegaImpProm II kit. cDNA diluted 1:5 was applied in the real-time PCR assay, using 5 µl of each forward and reverse primers in a final volume of 20µl, to determine gene expression.

- *Semiquantitative real-time PCR of alpha and beta estrogen receptor in* Eobania vermiculata *testis*
  Estrogen receptor (ER) and endogenous control 18S gene in *Eobania vermiculata* gonad were tested with semiquantitative PCR using the following primers: ER forward AGCGAGGCATCGCCTACTTC; ER reverse TCTACCGTCCAGGCTCACCA; 18S, GenBank accession number Ay 546397). PCR reaction was performed in a Thermal Cycler Techgene (Thecne Ltd, Cambridge, UK) with thirty-five cycles of amplification were carried out in a reaction buffer containing 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9.0; 10 mM NaCl; 0.01 mM EDTA; 2.5 mM of each dNTP; 1 µM of each primer; 10 ng of template DNA; 0.5 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Milan, Italy). The PCR program included the following steps: 50 °C for 2 min, 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 62/64 °C for 30 s. At the end of the incubation 5 µl of PCR products were separated by electrophoresis through 2% agarose gel and the size of the amplified 150 bp obtained were visualized under UV light. The bands were subjected to densitometric analysis using a computerized sequencer and Quantity One software (BioRad). The gel image was acquired by the program and amplification is quantified and represented graphically.

- *Quantitative real-time qPCR of the genes: glutathione peroxidase 4 (gpx4), alpha and beta estrogen re-*

ng del DNA stampo; 0.5 unità di Taq DNA polimerasi (Invitrogen, Milano, Italia). Il programma di PCR comprendeva i seguenti steps: 50° C per 2 min, 95° C per 2 min, seguiti da 40 cicli di 95° C per 15 s, 62/64° C per 30 s. Al termine dell'incubazione, 5 µl di ciascun prodotto di PCR è stato separato tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2% e gli amplificati della dimensione di 150 bp ottenuti sono stati visualizzati sotto luce UV. Le bande sono state sottoposte ad analisi densitometrica tramite un sequenziatore computerizzato e il software Quantity One (BioRad). L'immagine del gel viene acquisita dal programma e l'amplificato viene quantificato e rappresentato graficamente.

- *PCR quantitativa in tempo reale dei geni: glutatione perossidasi 4 (GPX4), recettore degli estrogeni alfa e beta* (ERα e ERβ)*; recettore degli androgeni (AR), citocromo P4501A (7CYP1A) in gonade di* Podarcis sicula

  L'espressione genica è stata quantificata utilizzando 10 µl di SYBR green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) e primer specifici su Step One Plus reale Time PCR (Applied Biosystems). Le condizioni di PCR in tempo reale sono 95° C (5min). La fase di denaturazione successiva consiste di 40 cicli a 95°C (30s), annealing a 60° C (30s) ed estensione a 72° C (60 s). Abbiamo eseguito le reazioni PCR utilizzando: 12s forward CCATAGTAGACACAATAGCC; 12S reverse CACTCTTGTCTGTTTTACTACT come riferimento interno (GenBank, accession number AY 770911). I primer utilizzati per GPX4 sono stati progettati utilizzando il software open source Primer3: GPX4 forward GATGAGTTTGCGGCGTTTG; GPX4 reverse TCTTGACCACCTGTCCTTCC. I primer per i recettori degli estrogeni adottati sono: ERα forward AGACCATATCCATCGCGTTC; ERα reverse GGCTCCCATTCCTTTATTGC; ERβ forward AAGAGAGCGCTGTGGCTATC; ERβ reverse CAGTGCATTGACCAGCAGTT. Mentre per il recettore degli androgeni abbiamo usato: AR forward TTCCTCAATGTCCTGGAAGC; AR reverse AATGTACCAGGTGCCTCTCG. Infine abbiamo testato l'aromatasi Cytochome P4501A con la coppia di primer: CYP1A forward ACCCCATCAAACATCTCTGC; CYP1A reverse TACGTCTCGGTGGATGTGAG. Ogni coppia di primer è stato preliminarmente sottoposta a PCR per garantire la presenza di un singolo amplicone primario. Le curve di dissociazione dei prodotti qPCR per tutte le trascrizioni hanno mostrato picchi singoli. Abbiamo calcolato i valori di espressione genica relativi al metodo ΔΔCt (Livak et al., 2001). Tutti i campioni e il riferimento interno sono stati analizzati e amplificati in triplicato. Prima dell'analisi quantitativa relativa, è stata prodotta una curva standard utilizzando quattro diluizioni seriali dei prodotti RT mixati provenienti da tutti i punti di dose e le efficienze corrispondenti per ciascuna coppia di primer sono state calcolate in base all'equazione E = 10 (-1/ pendenza) (i coefficienti di correlazione sono stati > 0,98).

ceptor (ERα e ERβ); androgen receptor (AR), Cytochrome P4501A (cyp1A) in Podarcis sicula *testis*

Gene expression was quantified using 10 µl SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) and specific primers on the Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Real-time PCR conditions were 95°C (5min). The subsequent denaturation step consisted of 40 cycles at 95°C (30s) and annealing at 60°C (30s) and extension at 72°C (60s). We performed the PCR reactions using: 12S forward CCATAGTAGACACAATAGCC; 12S reverse CACTCTTGTCTGTTTTACTACT as internal reference (GenBank, accession number A770911). The primers set used for gpx4 were designed using the open source software Primer3: gpx4 forward GATGAGTTTGCGGCGTTTG; gpx4 reverse TCTTGACCACCTGTCCTTCC. For estrogen receptors the following primer set was adopted: ERα forward AGACCATATCCATCGCGTTC; ERα reverse GGCTCCCATTCCTTTATTGC; ERβ forward AAGAGAGCGCTGTGGCTATC; ERβ reverse CAGTGCATTGACCAGCAGTT. By contrast, for androgen receptors we used: AR forward TTCCTCAATGTCCTGGAAGC; AR reverse AATGTACCAGGTGCCTCTCG. Finally, we tested the aromatase Cytochome P4501A with pair primers: cyp1A forward ACCCCATCAAACATCTCTGC; cyp1A reverse TACGTCTCGGTGGATGTGAG. Each primer pair was preliminarily subjected to PCR to ensure the presence of a single primary amplicon. The dissociation curves of the qPCR products for all transcripts showed single peaks. We calculated the relative gene expression values with the ΔΔCt method (Livak et al. 2001). All samples and the internal reference were run and amplified in triplicate. Prior to the relative quantitative analysis, a standard curve was produced by using four serial dilutions of the mixed RT products from all the dose points and the corresponding efficiencies for each primer pair were calculated according to the equation E= 10(-1/ slope) (correlation coefficients were >0.98).

Analisi statistica dei dati

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando la versione Graph-Pad Prism 7.00 (GraphPad Software). È stato eseguito il test di normalità di D'Agostino e Pearson e i gruppi che mostrano una distribuzione normale sono stati analizzati mediante il t-test, mentre i gruppi che mostrano la distribuzione non-normale sono stati analizzati mediante test di Mann-Whitney U; $P < 0.05$ è stato scelto come soglia di significatività.

13.d.2 Salute riproduttiva e antiossidanti nella lucertola Podarcis sicula (Rafinesque 1810) di Teverola: studio pre e post risanamento

Studi recenti mostrano che diversi fattori di trascrizione modulano l'espressione genica durante fasi specifiche della spermatogenesi evidenziando il loro ruolo come biomarkers indiretti degli effetti biologici delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) (Guerriero et al., 2014). La spermatogenesi, espressione della salute riproduttiva, è un processo relativamente conservato tra i vertebrati. Gli spermatogoni subiscono molte divisioni mitotiche; gli spermatociti diploidi in seguito a due divisioni meiotiche diventano spermatidi aploidi. A questo punto inizia il processo di spermiogenesi che comporta profonde modifiche morfologiche e biochimiche, come la formazione di un acrosoma e di un flagello, per arrivare allo spermatozoo maturo. C'è comunque una variazione nello sviluppo delle cellule germinali e la maturazione varia, nei vertebrati, in relazione all'organizzazione del testicolo e alle fasi della spermatogenesi. L'attività dei ROS è indispensabile nel complesso processo di proliferazione delle cellule germinali maschili e nella maturazione da spermatogoni diploidi attraverso la meiosi a spermatozoi aploidi indipendentemente dalla classe di vertebrato considerato. La spermatogenesi può essere, però, interrotta in varie fasi e portare ad infertilità quando i ROS sono maggiormente espressi, e gli antiossidanti non sono in grado di neutralizzarli o limitare il loro danno. Tali condizioni possono avere una base genetica, o possono anche essere dovuti a difetti nella produzione o azione di ormoni riproduttivi, o in alternativa essere indotti dall'esposizione di inquinanti ambientali o chimici con conseguente potenziale distruzione endocrina (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Nella ricerca condotta nell'ambito della sub azione C2c del progetto LIFE/ENV/IT/275 Ecoremed abbiamo concentrato la nostra attenzione sul riproduttore stagionale maschile, la biosentinella *Podarcis sicula* e sulla sua salute riproduttiva. Qui, riportiamo le analisi di espressione genica mediante RTqPCR dell'*antiossidante* glutatione perossidasi idroperossido fosfolipide (*gpx4*, gene codificante la PHGPx) la cui sequenza parziale è stata, precedentemente, da noi depositata (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed; GenBank, numero di accesso: JN689224.1) unitamente a quelle dell'attività enzimatica dell'*antiossidante Glutatione S-transferasi (GST)*, indice di degrado legato al potenziale di detossificazione. Le valutazioni sono state condotte su testicolo di lucertole in regressione spermatogenetica identificate mediante barcoding dopo essere state catturate ad ottobre a Teverola, uno dei siti della "Terra dei Fuochi", prima e dopo risanamento (anno 2013 e 2015 rispettivamente).

Statistical treatment of data

Statistical analyses were performed using the Graph-Pad Prism version 7.00 (GraphPad Software). The D'Agostino and Pearson normality test was performed and groups showing normal distribution were analysed by the t-test, while groups showing non-normal distribution were analysed by Mann-Whitney U test; $P < 0.05$ was chosen as the significance threshold.

13d.2. Reproductive health and antioxidant evaluation in the lizard *Podarcis sicula* at Teverola: pre- and post-remediation investigations

Recent studies show that different categories of transcription factors in relation to their regulatory function modulate cellular and stage-specific gene expression during spermatogenesis, highlighting their role as indirect biomarkers of the biological effects of reactive oxygen species (ROS) (Guerriero et al., 2014). Spermatogenesis, an expression of reproductive health , appears to be a process conserved throughout vertebrates. Thus spermatogonia undergo several mitotic divisions; diploid spermatocytes subsequently undergo two meiotic divisions and result in the production of haploid round spermatids. They then enter the process of spermiogenesis in which profound morphological and biochemical restructuring, such as the formation of acrosome and flagellum, occur and give rise to mature spermatozoa. There is, however, variation amongst vertebrates in how germ cell development and maturation is accomplished in relation to the testis organization and stage of spermiogenesis. ROS activity in all of them becomes beneficial or even indispensable in the complex process of male germ cell proliferation and maturation from diploid spermatogonia through meiosis to mature haploid spermatozoa or detrimental. Indeed, spermatogenesis can be disrupted at various stages in conditions of infertility when oxidants (i.e. ROS) are overexpressed and antioxidants are not able to neutralize or limit the damage. Such conditions can have a genetic basis, but may also be due to defects in the production or action of reproductive hormones, or alternatively, be a consequence of exposure to environmental or chemical toxicants resulting in potential endocrine disruption (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). We focus our subaction of 11 Env/IT/275 Ecoremed project work on the male seasonal breeder, the biosentinel *Podarcis sicula* and its reproductive health. Here, we report the analysis of gene expression by RTqPCR of the antioxidant glutathione peroxidase phospholipid hydroperoxide (gpx4, gene encoding the protein PHGPx) whose partial sequence was previously deposited by us (https: // www.ncbi.nlm.nih. gov / pubMed; GenBank, accession number: JN689224.1) together with those of the enzymatic activity of antioxidant glutathione S-transferase (GST), a pollution index associated with detoxification potential. Evaluations were conducted on testis in spermatogenetic regression of lizards identified by barcoding after being captured in October in Teverola, one of the sites of the "Land of Fires", before and after remediation (2013 and 2015, respectively).

Risultati

Barcoding delle lucertole

Il DNA estratto da tessuto somatico e/o gonadico di ciascuna lucertola ha mostrato una buona resa di prodotto di PCR. Il set di primer, descritto nella sezione del report metodologico, ha amplificato con successo i frammenti della regione mitocondriale esaminata, pari a circa 420bp di lunghezza (dati non riportati). I prodotti di PCR isolati dal gel, sequenziati ed allineati con sequenze GenBank di dati per il 12S rRNA di *Podarcis sicula*, Rafinesque 1810 (numero di accesso AY 770.911) e *Podarcis muralis*, Laurenti, 1768 (numero di accesso AY151988) utilizzando FASTA hanno confermato l'identificazione morfologica e hanno permesso la selezione dei campioni di *Podarcis sicula*.

Espressione gonadica mediante Real Time PCR quantitativa dell'antiossidante gpx4 in Podarcis sicula

I risultati relativi ai livelli di espressione gpx4 in campioni di gonadi maschili di *Podarcis sicula*, raccolti a Monti di Lauro e a Teverola in pre e post risanamento sono riportati in Fig.1 e mostrano che l'espressione gonadica di questo gene risulta circa 24 volte superiore a quello Monti di Lauro, sito di controllo negativo, e diminuisce dopo risanamento di circa 20 volte in testicolo paragonati ai dati di esemplari pre risanamento. L'analisi comparata di gpx4 in testicolo di *Podarcis sicula* mostra una differenza significativa tra il sito di Teverola (pre e post risanamento) e l'area di controllo incontaminata, Monti di Lauro ($P < 0,05$).

Results

Lizard barcoding

DNA extracted from somatic and /or gonadal tissue of each lizard constitutes a more efficient template, indicating a good yield of PCR products. The described set of primers successfully amplified the mitochondrial region fragments examined, approximately 420bp long (data not shown). The PCR products isolated from gel, sequenced and aligned with GenBank sequence data for 12S rRNA of *Podarcis sicula*, Rafinesque 1810 (accession number AY 770911) and *Podarcis muralis*, Laurenti, 1768 (accession number AY151988) using FASTA confirmed morphological identification and allowed selection of *Podarcis sicula* samples.

Gonadal expression by Real Time qPCR of the antioxidant gpx4 in Podarcis sicula

The results relative to gpx4 expression levels in male gonads of *Podarcis sicula* specimens collected in Monti di Lauro and in Teverola pre- e post-remediation are reported in Fig. 1. They show that the gonadal expression of this gene is around 24 times higher than that of Monti di Lauro and decreases after remediation around 20 times in testis compared to the pre-remediation specimen data. Comparative analysis of gpx4 in *Podarcis sicula* testis shows a significant difference between the Teverola site (pre- and post-remediation) and the unpolluted control area, Monti di Lauro ($P<0.05$)

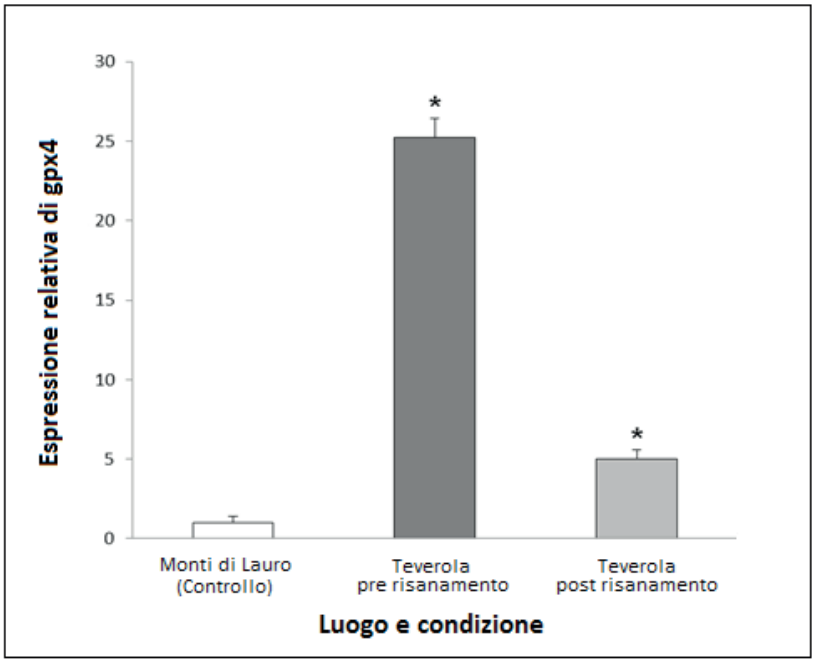


Figura 1. Livelli di espressione di gpx4 nel testicolo di Podarcis sicula raccolti a Teverola (sito della Terra dei Fuochi), prima e dopo risanamento, e a Monti di Lauro (area di controllo incontaminata). Le differenze significative (*: $P < 0,05$) sono stati testati con il test di Mann-Whitney U.

Figure 1. Expression level of gpx4 in testis of Podarcis sicula collected from Teverola (Land of Fire site), before and after remediation, and in Monti di Lauro (unpolluted area control). The significance differences (*: $P < 0.05$) were tested by the Mann-Whitney U test.

Attività gonadica dell'antiossidante Glutatione S-Transferasi (GST) in Podarcis sicula

L'analisi comparata delle attività di GST in testicolo di *Podarcis sicula* mostra una differenza significativa tra il sito di Teverola (pre e post risanamento) e il controllo incontaminato, Monti di Lauro (P <0,05, dati non riportati). L'attività GST ha mostrato l'aumento della detossificazione in relazione al sito di controllo non degradato e la sua diminuzione dopo biorisanamento, rispetto ai campioni di controllo.

Conclusioni

I dati suggeriscono che nel testicolo di *Podarcis sicula* il gene gpx4, antiossidante sotto controllo stereoideo, è altamente sensibile e coinvolto nell'insulto ossidativo. Le analisi quando la gonade non rilascia spermatozoi e cioè durante la regressione spermatogenica, ci permettono di verificare gli effetti dello stress ossidativo indotto dal degrado dei suoli della Terra dei Fuochi, confermando i risultati degli studi condotti su gpx4 da de Almeida et al., (2004) e Prakash, (2012).

Il nostro approccio mutimarker che ha utilizzato vari antiossidanti e recettori steroidei, sostiene fortemente il ruolo di gpx4 nella valutazione dell'azione di biorisanamento. Un aumento significativo dell'espressione genica di gpx4 è stata osservato rispetto al controllo negativo non degradato prima del risanamento, mentre è stato osservato un suo calo significativo corrispondente al decremento dell' indice di degrado della GST.

Si può, quindi, concludere che nella subazione C2c del progetto LIFE/ENV/IT/275 Ecoremed l'utilizzo della biosentinella *Podarcis sicula* si è dimostrato un potenziale strumento per la valutazione dello stato di qualità del suolo e degli effetti biologici del degrado sulla salute riproduttiva prima e dopo il risanamento. Inoltre, lo studio dei meccanismi di trascrizione del gpx4 in testicolo, suggerisce la sua utilità nel monitoraggio ai fini della conservazione della specie (Guerriero et al., 2014). La sensibilità di questo gene e la variazione quantitativa rilevata utilizzando qPCR in Tempo Reale nella zona degradata, prima del risanamento e la sua diminuzione dopo decontaminazione indicano il suo ruolo emergente per la valutazione della conservazione della biodiversità del suolo, essendo correlata alla salute riproduttiva (Maiorino et al., 2003; Guerriero et al., 2014). Inoltre, la presente ricerca dimostra che nelle gonadi della specie selezionata l'attività antiossidante del GST, risulta, in accordo con le variazioni dell'espressione di gpx4 gonadica. L'espressione quantitativa di gpx4 in questo tessuto, caratterizzato da abbondanza di acidi grassi insaturi, alti tassi di divisione cellulare, e molto vulnerabili alla sovraespressione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), conferma la sua relazione con il diverso livello di Glutatione S-Transferasi pre e post risanamento come indice di degrado. In conclusione, nella valutazione dello stato di salute riproduttiva di *Podarcis sicula*, l'espressione dell'antiossidante gpx4 e del pattern dell'antiossidante GST si dimostrano validi biomarkers del suo miglioramento ed indirettamente dell'efficacia del risanamento ambientale di Teverola.

Gonadal activity of the antioxidant glutathione S-transferase in Podarcis sicula

Comparative analysis of GST activity in *Podarcis sicula* testis shows a significant difference between the Teverola site (pre and post remediation) and the unpolluted control, Monti di Lauro (P<0,05, data not not shown). GST activity showed the detoxification increase in relation to the unpolluted control area and its decrease after remediation, compared to control samples.

Conclusions

Our data suggest that in *Podarcis sicula* testis the gene gpx4, antioxidant under steroid control, is highly sensitive and involved in high oxidative insult. The analyses carried out when the gonad does not release sperm, i.e., during spermatogenic regression, allowed us to verify the effects of oxidative stress induced by exposure to soil degradation of the "Land of Fires", confirming the results of studies conducted on gpx4 by de Almeida et al. (2004) and Prakash (2012). Our multiplex approach using various antioxidants and steroid receptors strongly supports the role of gpx4 in assessing remediation. It can therefore be concluded from the whole subaction of the 11 Env/IT/275 Ecoremed project that the use of the biosentinel, *Podarcis sicula*, is a potential tool for assessing soil quality status and the biological effect on its reproductive health by the contaminant before and after remediation. Thus the study of the mechanisms of gpx4 transcription in testis suggests the usefulness in the screening of a potential threat to species conservation too (Guerriero et al., 2014). The sensitivity of this gene and the quantitative variation detected using Real Time qPCR in the degraded area before remediation and its decrease after decontamination indicate its emerging role for assessing the conservation of soil biodiversity, being correlated to its reproductive health (Maiorino et al., 2003; Guerriero et al., 2014). Furthermore, current applied research demonstrates that gonadal GST antioxidant activity was sensitive too in this species and in good agreement with the variation in gpx4 gonadal expression. Quantitative gpx4 expression in this tissue, characterized by abundance of highly unsaturated fatty acids and high rates of cell division, and very vulnerable to the overexpression of reactive oxygen species (ROS), confirms its relation with the different level of glutathione S-transferase in pre- and post-remediation as a degradation index. In conclusion, expression of the antioxidant gpx4 and the pattern of antioxidant GST performed on the gonad of *Podarcis sicula* represent valid biomarkers of improvements in reproductive health and indirectly demonstrate the effectiveness of environmental restoration at the Teverola site.

Bibliografia

Adamietz, I.A., Böttcher, H.D. (1994). Estimation of radiotherapy effect in multiple myeloma. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 29: 221.

Ashton, T., Rowlands, C., Jones, E., Young, I., Jackson, S., Davies, B., Peters, J. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology 77(6):498-502.

Arena, C., De Micco, v., aronne G., pugliese, M., De Santo, A.V., De Maio, A. (2013). Response *of Phaseolus vulgaris L. plants* to low-let ionizing radiation: Growth and oxidative stress. Acta Astronautica 91:107–114.

Arena, C., Mistretta, C., Di Natale, E., Mennella, M.R., De Santo, A.V., De Maio, A. (2011).Characterization and role of poly(ADP-ribosyl)ation in the Mediterranean species *Cistus incanus* L. under different temperature conditions. Plant Physiol. Biochem. 49: 435-440.

Ciarcia, G., Lancieri, M., Suzuki, H., Manzo, C., Vitale, L., Tornese Buonamassa, D., Botte, V. (1986). A specific nuclear protein and poly(ADPribose)transferase activity in lizard oviduct during the reproductive cycle. Molecular and Cellular Endocrinology 47(3):235-41.

De Almeida, E.A., Miyamoto , S., Celso Dias Bainy, A., Gennari De Medeiros, M.H., Di Mascio P. (2004). Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. Marine Pollution Bulletin, 49 (5–6): 386–392.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocrine Review, 30:293-342.

Di Finizio, A., Guerriero, G., Russo, G.L., Ciarcia, G.(2007).Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments. European Food Research and Technology 225: 337-334.

Fasta Similarity Search http://www.ebi.ac.uk/fasta33/.

Guerriero, G., Di Finizio, A., Ciarcia, G. (2010). Biological Pollution: Molecular Identification of Non-Native Species in the Central Tyrrhenian Sea. Catrina 5 (1): 41-47.

Guerriero G. (2009). Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. Annals of the New York Academy of Sciences 1163:154-68.

Guerriero, G., Di Finizio, A., Ciarcia, G. (2003).Oxidative defenses in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Oxygen Transport to Tissue XXIV. Book Series: Advances In Experimental Medicine and Biology 530, 681-688.

Guerriero G., Di Finizio A., Ciarcia G. (2002). Stress-induced changes of plasma antioxidants of aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Journal Comparative Bio-

References

Adamietz, I.A., Böttcher, H.D. (1994). Estimation of radiotherapy effect in multiple myeloma. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 29: 221.

Ashton, T., R0wlands, C., Jones, E., Youngs, I., Jackson, S., Davies, B., Peters, J. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology 77(6):498-502.

Arena, C., De Micco, v., aronne G., pugliese, M., De Santo, A.V., De Maio, A. (2013). Response *of Phaseolus vulgaris L. plants* to low-let ionizing radiation: Growth and oxidative stress. Acta Astronautica 91:107–114.

Arena, C., Mistretta, C., Di Natale, E., Mennella, M.R., De Santo, A.V., De Maio, A. (2011).Characterization and role of poly(ADP-ribosyl)ation in the Mediterranean species *Cistus incanus* L. under different temperature conditions. Plant Physiol. Biochem. 49: 435-440.

Chaudhry A.S., Jabeen F. 2011. Assessing metal, protein, and DNA profiles in Labeo rohita from the Indus River in Mianwali, Pakistan. Environmental Monitoring and Assessment, 174, 665-679.

Ciarcia, G., Lancieri, M., Suzuki, H., Manzo, C., Vitale, L., Tornese Buonamassa, D., Botte, V. (1986). A specific nuclear protein and poly(ADPribose)transferase activity in lizard oviduct during the reproductive cycle. Molecular and Cellular Endocrinology 47(3):235-41.

De Almeida, E.A., Miyamoto , S., Celso Dias Bainy, A., Gennari De Medeiros, M.H., Di Mascio P. (2004). Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. Marine Pollution Bulletin, 49 (5–6): 386–392.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocrine Review, 30:293-342.

Di Finizio, A., Guerriero, G., Russo, G.L., Ciarcia, G.(2007).Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments. European Food Research and Technology 225: 337-334.

Fasta Similarity Search http://www.ebi.ac.uk/fasta33/.

Guerriero, G., Di Finizio, A., Ciarcia, G. (2010). Biological Pollution: Molecular Identification of Non-Native Species in the Central Tyrrhenian Sea. Catrina 5 (1): 41-47.

Guerriero G. (2009). Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. Annals of the New York Academy of Sciences 1163:154-68.

Guerriero, G., Di Finizio, A., Ciarcia, G. (2003).Oxida-

chemisty and Physiology 132:205-211.

Guerriero, G., Roselli, C.E, Paolucci., M. Botte , v. Ciarcia G. (2000).Estrogen receptors and aromatase activity in the hypothalamus of the female frog, *Rana esculenta*. Fluctuations throughout the reproductive cycle. Brain Research 880: 92-101.

Guerriero, G., Trocchia, S., Abdel-Gawad, F.Kh, Ciarcia, G. (2014). Roles of Reactive Oxygen Species in the Spermatogenesis Regulation. Frontiers in Endocrinology, 5:56.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974).Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal Biological Chemistry 249:7130–7139.

Hodkinson, I.D. and Jackson, J.K. (2005). Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring, with Particular Reference to Mountain Ecosystems. Environmental Management 35(5):649–666.

Hultin C.L., Hallgren P., Persson A., Hansson M.C. (2014). Identification of an estrogen receptor gene in the natural freshwater snail *Bithynia tentaculata*. Gene 540:26–31.

Maiorino M., Bosello V., Ursini F., Foresta C., Garolla A., Scapin M., Sztajer H., AND Flohé L. (2003). Genetic Variations of gpx-4 and Male Infertility in Humans. Biology of Reproduction, 68 (4): 1134-1141.

Oliver, I. and Beattie, A.J. (1993). A Possible Method for the Rapid Assessment of Biodiversity. Conservation Biology 7(3): 562–568.

Pfaffl, M.W. (2001).A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29, e45.

Prakash M., Gopalakrishnan N., Park S.Y., Choi J. (2012). Characterization and expression analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA from *Chironomus riparius* on exposure to cadmium. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 163(1):37-42.

Shakoor, C. A. and Jabeen, F. (2010). Assessing metal, protein, and DNA profiles in *Labeo rohita* from the Indus River in Mianwali, Pakistan. Environmental Monitoring Assessment 174 (1): 665–679.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3 (7) (RESEARCH00341-11).

tive defenses in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Oxygen Transport to Tissue XXIV. Book Series: Advances In Experimental Medicine and Biology 530, 681-688.

Guerriero G., Di Finizio A., Ciarcia G. (2002). Stress-induced changes of plasma antioxidants of aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology 132:205-211.

Guerriero, G., Roselli, C.E, Paolucci., M. Botte , v. Ciarcia G. (2000).Estrogen receptors and aromatase activity in the hypothalamus of the female frog, *Rana esculenta*. Fluctuations throughout the reproductive cycle. Brain Research 880: 92-101.

Guerriero, G., Trocchia, S., Abdel-Gawad, F.Kh, Ciarcia, G. (2014). Roles of Reactive Oxygen Species in the Spermatogenesis Regulation. Frontiers in Endocrinology, 5:56.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974).Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal Biological Chemistry 249:7130–7139.

Hodkinson, I.D. and Jackson, J.K. (2005). Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring, with Particular Reference to Mountain Ecosystems. Environmental Management 35(5):649–666.

Hultin C.L., Hallgren P., Persson A., Hansson M.C. (2014). Identification of an estrogen receptor gene in the natural freshwater snail *Bithynia tentaculata*. Gene 540:26–31.

Maiorino M., Bosello V., Ursini F., Foresta C., Garolla A., Scapin M., Sztajer H., AND Flohé L. (2003). Genetic Variations of gpx-4 and Male Infertility in Humans. Biology of Reproduction, 68 (4): 1134-1141.

Oliver, I. and Beattie, A.J. (1993). A Possible Method for the Rapid Assessment of Biodiversity. Conservation Biology 7(3): 562–568.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29, e45

Prakash M., Gopalakrishnan N., Park S.Y., Choi J. (2012). Characterization and expression analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA from *Chironomus riparius* on exposure to cadmium. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 163(1):37-42.

Shakoor, C. A. and Jabeen, F. (2010). Assessing metal, protein, and DNA profiles in *Labeo rohita* from the Indus River in Mianwali, Pakistan. Environmental Monitoring Assessment 174 (1): 665– 679.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3 (7) (RESEARCH00341-11).

14. Monitoraggio della qualità e salubrità della produzione agricola

L.G. Duri, N. Fiorentino, M. Fagnano

In considerazione del fatto che il regolamento per le aree destinate alla produzione agricola, previsto dall'art. 241 del c.d. Testo Unico ambientale (D.Lgs 152/06) non è stato ancora emanato, (vedi cap. 2), ad oggi non esistono specifici riferimenti normativi che consentano di definire l'idoneità dei suoli all'uso agricolo. Pertanto non risultano regolamentati neanche metodi per monitorare le tecniche di fitorisanamento, finalizzati a definire quando il processo di bonifica ha completato il risanamento di un area riducendone i rischi al di sotto di livelli di accettabilità.
Tuttavia, considerando che il modello scientifico previsto dal regolamento proposto al Governo da GdL (Ministero Ambiente, 2014) (vedi cap. 7), prevede di valutare i rischi indiretti per i consumatori mediante test biologici, nel protocollo Ecoremed sono state utilizzate diverse specie coltivate per scopi alimentari che sono conosciute per le loro capacità di accumulo degli EPT nelle parti eduli.
Quindi valutare l'avvenuta o meno assimilazione da parte della pianta è un metodo sicuro e diretto per analizzare il rischio di contaminazione degli alimenti ed i conseguenti rischi (indiretti) per la salute dei consumatori (Fig. 1).

14.1 Monitoraggio dei rischi indiretti

Una volta identificate le aree critiche, mediante le diverse tecniche per la caratterizzazione inziale del sito (vedi cap. 5,6,7), in ciascuna di essa è necessario procedere a campionamenti di coppie suolo-vegetazione al fine di va-

14. Biomonitoring agricultural production quality and safety

L.G. Duri, N. Fiorentino, M. Fagnano

Given that the specific legislation regulating agricultural areas, provided for by Art. 241 of Italian Legislative Decree No. 152/06 has not yet been enacted (see ch. 2), there are as yet no specific normative requirements that enable the suitability of agricultural land use to be defined. Therefore there are no regulated methods for monitoring phytoremediation techniques, aimed at determining when the remediation process has reduced health risks below acceptable levels. However, the scientific model of the regulation proposed to the government by the task force (Ministero Ambiente, 2014, see ch. 7) aims to evaluate the indirect risks to consumers by using biological tests. In the Ecoremed protocol we used different food crops which are known for their ability to accumulate potentially toxic elements (PTEs) in the edible organs. Therefore, evaluating the occurrence, or otherwise, of PTE assimilation by the plant is a certain and direct mode for analysing the risks of food contamination and the consequent (indirect) risks for consumer health (Fig. 1).

14.1 Monitoring the indirect risks

After identifying the critical areas by using various techniques for initial site characterization of the (see sections 5,6,7), in each area pairs of soil-vegetation samples have to be set up in order to assess variations in both the bioavailable fraction of PTEs in soil, and the accumulation of contaminants in plant organs. The

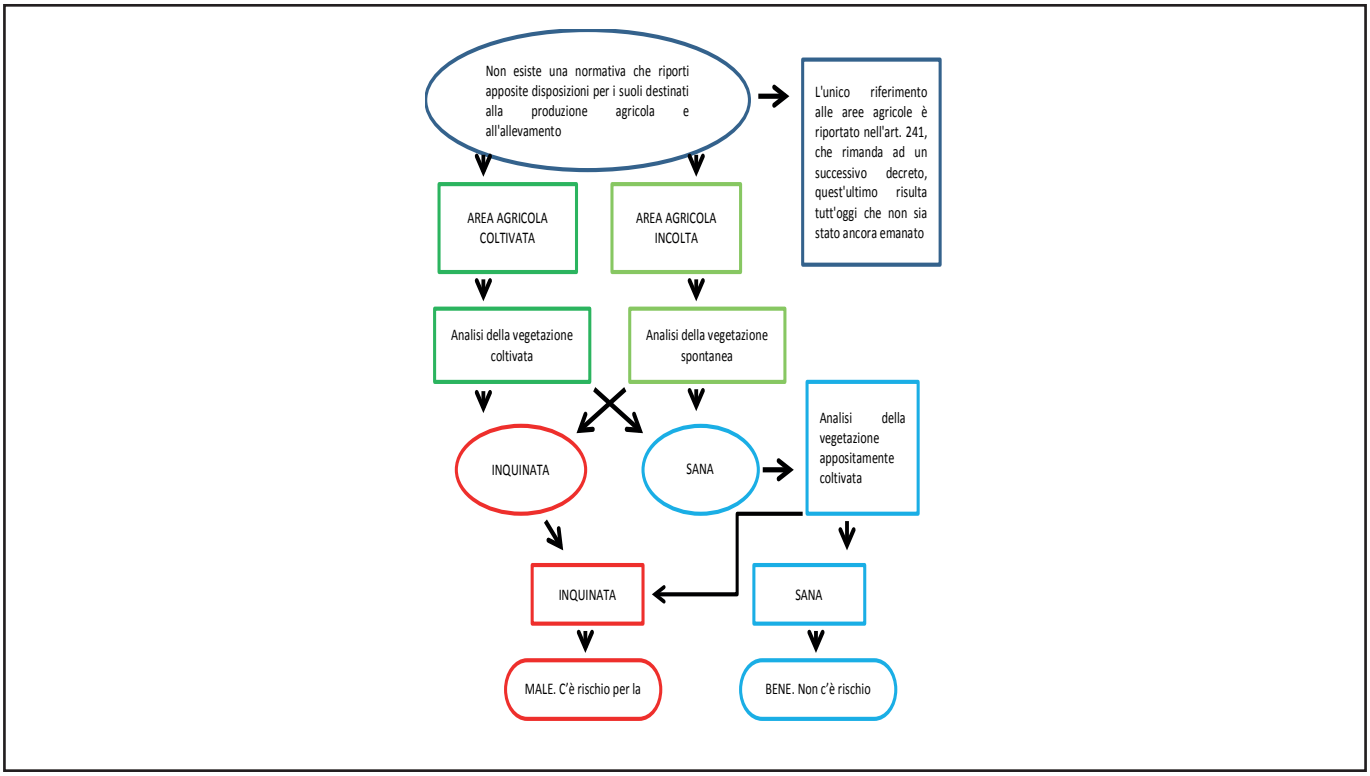


Figura 1. Mappa concettuale della valutazione dei rischi indiretti per i consumatori.

Figure 1. Conceptual map of evaluation of indirect risks.

lutare le variazioni sia della frazione di EPT biodisponibili nel suolo, sia dell'accumulo di contaminanti da parte delle piante.
Il campione vegetale deve essere costituito dalle piante presenti sul sito, se l'area è regolarmente coltivata verranno prelevate le specie presenti e dovrà essere valutata l'eventuale pericolosità per i consumatori (Reg CE 1881/06 e ss.mm.); se invece dovesse essere un'area non produttiva, dovranno essere campionate le specie spontanee, valutandone l'eventuale pericolosità assimilandole ai foraggi (Direttiva 2002/32/CE).
Nello specifico, il campionamento viene effettuato secondo i seguenti protocolli:

- Vegetali: prelevare, nel caso di piante erbacee, l'intera pianta e separare radici da parte edibile; si suggerisce di prelevare almeno 300 g (tenendo presente che il peso secco dei vegetali in media è inferiore al 25% del peso fresco, in maniera tale da avere una quantità sufficiente di materiale per le analisi). Nel caso in cui la pianta sia di ridotte dimensioni (es. rucola) si preleva un numero di piante sufficienti al raggiungimento del peso necessario intorno al punto di prelievo del suolo. Nel caso di piante arboree il prelievo riguarderà i frutti. La pianta o il punto di prelievo dovrà essere georeferenziato, nel caso in cui si ritenesse necessario dover ricampionare sullo stesso punto.
  Le parti eduli dei vegetali appena raccolti vengono messe in buste di plastica e trasportate in contenitore refrigerato. I campioni, devono essere lavati con acqua deionizzata e consegnati in laboratorio entro 24 ore. Nel caso in cui non sia possibile consegnare rapidamente i campioni in laboratorio, questi vanno liofilizzati, polverizzati e conservati in ambiente refrigerato fino alla consegna nel laboratorio. Su un'aliquota dei campioni deve essere misurato il peso fresco e secco per determinare la percentuale di sostanza secca al fine di poter esprimere i valori di concentrazione in mg/kg di peso fresco, come prevede la normativa di riferimento (Reg CE 1881/06 e ss.mm.).
- Suolo: prelevare un'aliquota di circa 250 g in corrispondenza dell'apparato radicale della pianta campionata. I campioni prima delle analisi devono essere essiccati all'aria, quartati con il metodo *cone and quarter* (DM 13/09/99), setacciati a 2 mm e conservati in barattoli di plastica. Per ogni campione viene prelevata un'aliquota di 2 g per effettuare la determinazione del contenuto totale di EPT (Arsenico, Berillio, Cadmio, Cobalto, Cromo totale, Nichel, Piombo, Rame, Selenio, Tallio, Vanadio, Zinco), mentre per la frazione mobile e biodisponibile vengono utilizzati 10 g di suolo per l'estrazione in acqua, 10 g di suolo per l'estrazione in NH_4NO_3 1M e 5 g di suolo in EDTA 0.05M (vedi cap. 6).

Le coppie suolo-pianta devono essere rappresentative dell'area, quindi si deve cercare, dove possibile, di effettuare vari prelievi in più punti all'interno dell'area da monitorare, così da avere delle ripetizioni (5-10) che permettano di avere una maggiore rappresentatività dei risultati.
Monitorando i suoli possiamo, in prima battuta, seguire

vegetative sample must be collected from the plants present on the site. If the area is regularly cultivated, field crops must be collected and analysed to evaluate any potential hazards for consumers (EC Reg. 1881/2006); if the area is not cultivated, the wild species have to be sampled to evaluate the possible hazards, assimilating them to forage crops (EC Dir. 32/2002).
Specifically, sampling will be carried out according to the following protocols:

- Vegetables: for herbaceous plants, to collect the entire plant and to separate the roots from the edible part, we suggest picking at least 300 g (where plant dry weight is on average less than 25% of the fresh weight, so as to have sufficient material for analysis). For small plants (e.g. rocket salad) around the soil sampling point it is necessary to pick a sufficient number of plants to obtain the necessary weight. For fruit crops, sampling will concern the fruits alone. The plants or the sampling points must be georeferenced if it is considered necessary to return to the same point.
  The edible parts of the picked vegetables are placed in plastic bags and transported in a refrigerated container. The samples must then be washed with deionized water and delivered to the laboratory within 24 hours. Should it be impossible to deliver the samples rapidly to the laboratory, they must be lyophilized, pulverized and kept cool until delivery. On a sample fraction, the fresh and dry weight must be measured to determine the percentage of dry matter in order to express the concentration values in mg/kg of fresh weight, as required by the relevant legislation (EC Reg. 1881/2006).
- Soil: to take a sample of about 250 g near the roots of the sampled plants, the collected soil samples must be air-dried before analysis, quartered with the *cone and quarter* method (Ministerial Decree 13/09/99), sieved to 2 mm and stored in plastic bags. For each sample a fraction of 2 g is required to carry out the analysis of the total content of PTEs (arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, total chromium, nickel, lead, copper, selenium, thallium, vanadium, zinc), while for mobile and bioavailable fraction analysis, 10 g are required for water extraction, 10 g for NH_4NO_3 1M extraction and 5 g for EDTA 0.05M extraction (see Ch. 6).

The soil-plant pairs must be representative of the area. Therefore attempts must be made, where possible, to take various samples at several points inside the monitored area, so as to have (5-10) replications that allow more robust results to be obtained.

In the first instance, by monitoring the soils we can follow the variations in PTE concentrations and the progressive reduction in the readily bioavailable fraction (see Ch. 6b). By analyzing vegetation data, we can determine when a site becomes suitable for food crops once again, there being no further risk of accumulation of contaminants in foods.
In Italy, today, for lead and cadmium contents in food,

le variazioni nelle concentrazioni degli EPT ed il progressivo abbassamento della frazione prontamente biodisponibile (vedi cap. 6b). Analizzando i dati della vegetazione, si può determinare quando un sito ritorna idoneo all'attività agricola in quanto non vi è più rischio di accumulo di contaminanti nei prodotti alimentari.
In Italia, ad oggi, per i tenori di Piombo e Cadmio nei prodotti alimentari, si fa riferimento alle soglie riportate dal Regolamento Comunitario 1881/2006 e ss.mm. (Tab.2), per varie tipologie di prodotti agro-alimentari. Mentre per quanto riguarda i tenori di Arsenico e Mercurio si può far riferimento alla Direttiva 2002/32/CE e ss.mm relativa alle sostanze indesiderabili nei mangimi e nei foraggi (Tab.3).
Per gli altri elementi non normati, la valutazione del rischio sanitario prevede la stima dell'esposizione della popolazione mediante assunzione degli alimenti più comunemente usati nei normali regimi alimentari, come descritto nel capitolo 6 dello studio dell'Istituto Superiore di Sanità "Criteri per la valutazione del rischio sanitario connesso alla presenza di aree agricole all'interno di siti contaminati", secondo la seguente formula di calcolo relativa, ad una dose tollerabile definita su base giornaliera (TDI):

$$\%A = [(C \times IR) \times 100]/(TDI \times BW)$$

Dove:
C = è il valore rappresentativo di concentrazione di un elemento (μg g^{-1});
IR = è il tasso di consumo alimentare *pro capite* differenziato per fasce d'età, il valore da considerare è in relazione alla mediana si può scegliere di essere più o meno cautelativi (g $giorno^{-1}$);
TDI = è il *Tolerable Daily Intake* espresso in μg Kg peso $corporeo^{-1}$ che rappresenta il valore massimo accettabile (100% dell'accettabilità);
BW = è il peso corporeo (Kg), nelle valutazioni internazionali viene ad esso attribuito, generalmente, un valore pari a 60 (adulto);
%A = è la percentuale di assunzione del contaminante rispetto al TDI, in base alla gravità e alla cautela che si vuole adoperare è possibile avere diversi valori. Ad esempio si possono usare valori dell'IR riferito ad un percentile più alto rispetto alla mediana, facendo variare l'incidenza nella dieta del prodotto, o si potrebbe prendere il peso corporeo medio degli abitanti dell'area interessata, invece di utilizzare un valore convenzionalmente attribuito.

Proviamo con un esempio: ipotizziamo che interessi sapere l'apporto percentuale del contenuto di Zinco, rilevato all'interno di broccoli rispetto alla dose tollerabile giornaliera nella dieta di un uomo adulto. Sempre per ipotesi diamo come valore di concentrazione dello Zn (C) 12.3 mg kg^{-1} (che corrispondono ai μg g^{-1}); nel database dell'EFSA il tasso di consumo alimentare per gli adulti è di 50 g $giorno^{-1}$ (seguendo una linea estremamente cautelativa è stato riportato il valore del 99°percentile); il TDI dello Zinco è 0.3 mg kg di peso $corporeo^{-1}$ (poiché serve espresso in μg kg^{-1}, si moltiplica il valore per 1000,

reference may be made to the thresholds reported by EC Reg. 1881/2006 (Tab. 2), for various types of agri-food products, while for arsenic and mercury contents, reference can be made to EC Dir 32/2002 relative to undesirable substances in feeds and forages (Tab. 3).
For the contaminants not governed by legislation, health risk assessment can be made by estimating exposure of the population through the intake of the most commonly used foods in normal diets, as described in chapter 6 of the Istituto Superiore di Sanità (2013) study, according to the following calculation method, relating to the tolerable daily intake (TDI):

$$\%A = [(C \times IR) \times 100]/(TDI \times BW)$$

where:
C is the concentration of an element (μg g^{-1});
IR, the per capita rate of food consumption, differentiated by age group, the value to be considered is in relation to the average. (g day^{-1});
TDI, the *Tolerable Daily Intake* expressed as μg kg^{-1} body weight that represents the maximum acceptable value (100% of acceptability);
BW, *Body Weight* (kg): a mean value of 60 kg (adult) is generally considered;
%A = percentage of contaminant intake compared to TDI. On the basis of the severity and caution to be used, different values may be obtained. For example, we could use IR values related to a higher or lower percentile than the median, in relation to the product incidence in the diet; or we could use the average body weight of inhabitants in the area concerned, instead of using a conventional value.

To give a practical example, let us assume we need to know the contribution of zinc content detected in broccoli as a percentage of the total tolerable daily intake of zinc in the diet of an adult. Let us assume a Zn concentration (C) of 12.3 mg kg^{-1} (which corresponds to μg g^{-1}). In the EFSA database the food intake rate for adults is 50 g day^{-1} (following an extremely cautionary line, the 99th percentile value is reported); the zinc TDI is 0.3 mg kg^{-1} of body weight (because it has to be expressed in μg kg^{-1}, this value has to be multiplied by 1000, obtaining in this case 300 μg kg^{-1}); the average weight of an adult is 60 kg.

$$\%A = [(12.3\ \mu g\ g^{-1} \times 50\ g\ day^{-1}) \times 100] / (300\ \mu g\ Kg\ body\ weight^{-1} \times 60\ Kg)$$
$$[615\ \mu g\ day^{-1} \times 100] / 18000\ \mu g$$
$$61500\ \mu g\ day^{-1} / 18000\ \mu g$$
$$= 3.416$$

Hence, within a normal diet, consumption of this broccoli would lead to the intake of 3.4% of the total tolerable daily intake of zinc, and hence does not represent a risk to human health.

Because the toxicological benchmarks such as ADI, TDI, TWI etc. are often not available, we can use other toxicological benchmarks such as the *Reference Dose*

in questo caso 300 μg kg^{-1}); il peso medio di un adulto è di 60 kg.

$$\%A = [(12.3\,\mu g\,g^{-1} \times 50\,g\,giorno^{-1}) \times 100] / (300\,\mu g\,Kg\,peso\,corporeo^{-1} \times 60\,Kg)$$
$$[615\,\mu g\,giorno^{-1} \times 100] / 18000\,\mu g$$
$$61500\,\mu g\,giorno^{-1} / 18000\,\mu g$$
$$= 3.416$$

Quindi all'interno di una dieta questi broccoli permetterebbero l'assunzione del 3.4% della dose giornaliera tollerabile di Zinco, e quindi non rappresenta un rischio per la salute umana.

Poiché non sempre i parametri tossicologici di confronto come ADI, TDI, TWI ecc. sono reperibili, è possibile usare altri parametri tossicologici di confronto come ad esempio la *Reference Dose* (RfD), per eseguire la stima quantitativa del rischio. Per le sostanze caratterizzate da effetti tossici con soglia, la stima viene effettuata mediante calcolo dell'*Hazard Quotient* (HQ), che costituisce il confronto tra la dose media giornaliera assunta (ADD) e la RfD:

$$HQ = ADD/RfD = A$$

Dove:
HQ = *Hazard Quotient* (adimensionale);
ADD = Dose Media Giornaliera assunta dell'elemento (mg Kg $giorno^{-1}$);
RfD = Dose di riferimento dell'elemento (mg Kg $giorno^{-1}$);
A = indica l'Accettabilità del rischio, in rapporto al non superamento della RfD, e varia da 0 a 1, dove 1 è il valore massimo attribuibile, tale oscillazione dipende dal livello di cautela che si vuole avere nel determinare l'esposizione ad un elemento. Se il livello di esposizione (ADD) superasse questa soglia (ADD/RfD >1), ci potrebbero essere potenziali rischi per la salute umana (US EPA 1986,1989,2016).
L'esposizione all'elemento viene stimata mediante il calcolo delle dosi medie giornaliere assunte, rappresentate dalla *Average Daily Dose* (ADD).

$$ADD = [(C \times IR) \times EF \times ED]/(BW \times ATADD)$$

Dove:
ADD = Dose Media Giornaliera dell'elemento (mg Kg $giorno^{-1}$);
C = è il valore rappresentativo di concentrazione di un elemento (mg g^{-1});
IR = è il tasso di consumo alimentare *pro capite* differenziato per fasce d'età, il valore da considerare è in relazione alla mediana si può scegliere di essere più o meno cautelativi (g $giorno^{-1}$);
EF = Frequenza d'esposizione (giorni $anno^{-1}$), indica il numero di giorni in un anno in cui una persona viene a contatto con il contaminante (parametro variabile che può dipendere della stagionalità e dalla reperibilità degli alimenti considerati). Il più alto grado di conservatività è pari a 365;
ED = Durata d'esposizione (anni) indica il numero di

(RfD), to perform the quantitative risk estimation. For substances with a threshold for their toxic effects, the estimate is made by calculating the *hazard quotient* (HQ), which is the comparison between the average daily dose (ADD) and the RfD:

$$HQ = ADD/RfD = A$$

where:
HQ is the *hazard quotient* (adimensional);
ADD, the average daily dose of the element (mg Kg^{-1} day^{-1});
RfD, the reference dose of the element (mg Kg^{-1} day^{-1});
and A indicates risk acceptability, in relation to not exceeding the RfD, ranging from 0 to 1, where 1 is the maximum value attributable. Such variability depends on the desired level of caution in determining exposure to a contaminant. If the exposure level (ADD) exceeds this threshold (ADD/RfD >1), there could be a potential risk to human health (US EPA 1986,1989,2016).
The exposure to contaminants is estimated by calculating the average daily dose (ADD) as follows:

$$ADD = [(C \times IR) \times EF \times ED]/(BW \times ATADD)$$

where:
ADD is the average daily dose of the element (mg Kg^{-1} day^{-1});
C, the concentration of an element (mg g^{-1});
IR, the per capita food consumption rate differentiated by age group. The value to be considered is in relation to the average. It is possible to decide to be more or less cautious (g day^{-1});
EF, the exposure frequency (day $year^{-1}$), indicating the number of days in one year in which an individual comes into contact with the contaminant (it is a variable parameter which may depend on seasonality and the availability of the food in question). The highest degree of caution is to consider 365;
ED, the exposure duration (years), indicating the number of years during which the population is exposed to intake of contaminated food. If the real exposure time is unknown, we can as a precaution consider a value of 70. If the risk assessment is for children, we consider the maximum value of the age group (e.g. for the 0-3 years age group, ED is equal to 3);
BW is body weight (Kg). Internationally a value of 60 (adult) is generally considered;
$\mathbf{AT_{ADD}}$ is the time over which exposure is averaged (days), AT_{ADD} = ED x 365 .

To give a practical example, let us assume we need to know the acceptability of the copper content in broccoli for an adult. We suppose a Cu concentration (C) of 4.58 mg kg^{-1} (because we need to express it in mg g^{-1}, divide it by 1000, thus obtaining in this example 0.00458 mg g^{-1}). In the EFSA database the food intake rate for adults is 50 g day^{-1} (following an extremely cautious line the 99th percentile was reported). Let us assume 350 days of exposure frequency; in precautionary terms we consider the exposure period of 70 years; the average

anni in cui la popolazione è esposta all'ingestione di alimenti contaminati, se non fosse possibile conoscenza di tempi reali di esposizione si può, cautelativamente, attribuire un valore pari a 70. Se la valutazione del rischio è per i bambini, si attribuisce il valore massimo dell'arco di età considerato (es. per la fascia d'età 0-3 anni, ED è pari a 3);
BW = è il peso corporeo (Kg), nelle valutazioni internazionali viene ad esso attribuito, generalmente, un valore pari a 60 (adulto);
$\mathbf{AT_{ADD}}$ = Tempo sul quale l'esposizione viene mediata (giorni), AT_{ADD} = ED x 365 .

Ad esempio, ipotizziamo che interessi sapere l'accettabilità dei contenuti di Rame all'interno dei broccoli per un uomo adulto. Sempre per ipotesi diamo come valore di concentrazione (C) 4.58 mg kg^{-1} (poiché serve espresso in mg g^{-1}, basterà dividere per mille per convertirlo in questa unità di misura = 0.00458 mg g^{-1}); nel database dell'EFSA il tasso di consumo alimentare per gli adulti è di 50 g $giorno^{-1}$ (seguendo una linea estremamente cautelativa è stato riportato il valore del 99°percentile); ipotizziamo una frequenza d'esposizione di 350 giorni; la durata d'esposizione cautelativamente la riteniamo di 70anni; il peso medio di un adulto è di 60 kg; il tempo di esposizione sarà quindi di 70x365=25550 giorni.

[(0.00458 mg g^{-1} x 50 g $giorno^{-1}$) x 350 giorni x 70 anni] / (60 kg x 25550 giorni)
[(0.229 mg $giorno^{-1}$) x 24500 giorni] / 1533000 Kg giorno
5610.5 mg / 1533000 Kg giorno
0.00366 mg Kg $giorno^{-1}$

ADD = 0.00366 mg Kg $giorno^{-1}$

Dalla banca dati del ISS in collaborazione con INAIL la dose di riferimento del Rame è 0.04 mg Kg $giorno^{-1}$, per cui l'*Hazard Quotient* (rapporto tra ADD e RfD) dell'esempio è:

0.00366 mg Kg $giorno^{-1}$ / 0.04 mg Kg $giorno^{-1}$
= 0.0914954

Seguendo una linea estremamente cautelativa che considera un'assunzione del prodotto in tutti i giorni dell'anno per l'intero arco di vita, con un valore di assunzione (IR) che tiene presente il 99% delle osservazioni, il quoziente di pericolosità per la concentrazione di Cu rilevata all'interno dei broccoli, è di 0.0915, ben 10 volte al di sotto dell'unità, motivo per il quale vi è ragionevole sicurezza nel definire il prodotto "non pericoloso per la salute umana". Il prodotto broccoli per essere ritenuto "pericoloso per la salute umana", con i parametri sopra descritti (estremamente cautelativi), avrebbe dovuto contenere 59 mg di Cu su Kg^{-1} di prodotto.
A supporto di quanto riporta lo studio dell'ISS si può far riferimento agli indici di assunzione (ADI, TDI, TWI, PMTDI, RfD, ecc.), alle banche dati dell'USEPA; dell'ISS in collaborazione con l'INAIL e dell'European Food Safety Authority (EFSA 2015) che risultano essere un valido strumento per ricercare i parametri tossicolo-

weight of an adult is 60 kg; the exposure period will be 70x365=25550 days.

[(0.00458 mg g^{-1} x 50 g day^{-1}) x 350 day x 70 years] / (60 kg x 25550 days)
[(0.229 mg day^{-1}) x 24500 days] / 1533000 Kg day
5610.5 mg / 1533000 Kg day
0.00366 mg Kg day^{-1}
ADD = 0.00366 mg Kg day^{-1}

From ISS in partnership with INAIL database, the Copper reference dose is 0.04 mg Kg^{-1} day^{-1}, thus the Hazard Quotient (ratio between ADD and RfD) of this example is:

0.00366 mg Kg day^{-1} / 0.04 mg Kg day^{-1}
= 0.0914954

Following a precautionary line that considers an intake for all days of the year for a lifetime, with an intake rate (IR) considering 99% of observations, the hazard quotient of Cu detected in broccoli is 0.0915, about 10 times less than unity. Therefore the product can be reasonably defined "not dangerous for human health". For broccoli to be considered "dangerous for human health", using the parameters described above (extremely precautionary), it should contain at least 59 mg of Cu per Kg of product.
To support the ISS study, we can use the intake indexes (ADI, TDI, TWI, PMTDI, RfD, etc.). The databases of USEPA databases, ISS in collaboration with INAIL and the European Food Safety Authority (EFSA 2015), can be considered very useful for searching for toxicological parameters and estimating food intake on the part of the population. Because several variables may influence the soil-plant relationship (Tab.1), it is important not to sample a single species, but many species, repeating samplings in other seasons (i.e. autumn-winter and spring-summer).

Given that the bioavailable content of an element in the soil is a dynamic fraction of the total content, the reduction of this fraction is not progressive due to exchanges between these fractions. Monitoring must therefore be repeated over time, including species cultivated throughout the year, until the plants stop taking up contaminants and the readly bioavailable fraction is exhausted.
The approach to follow is the so-called "worst case", which means growing and analysing the edible parts of a crop which under normal conditions is able to accumulate high concentrations of one or more PTEs (see Tab.4). If it thus proves safe, we would consider that the site is free of contamination risk of the food chain. It is also important to include both summer and autumn-winter crops, so as to be able to evaluate the responses of larger numbers of crops in relation to both contaminants and climatic conditions.
To monitor accumulation and detect a possible risk for human health, we may carry out *in situ* or *ex situ*

gici e stimare l'assunzione degli alimenti da parte della popolazione. In considerazione del fatto che le variabili che condizionano la relazione suolo-pianta possono essere molteplici (Tab.1), risulta importante non campionare una sola specie, ma cercare di analizzare più specie, ripetendo le analisi anche in altri mesi (cicli autunno-invernali e primaverili-estivi).

surveys:
- In the first case we grow the targeted species on the most contaminated areas of the site;
- In second case, the soil sample is collected from the points where the vegetation proved contaminated, with the aim of performing the uptake tests under controlled conditions.

Tabella 1. Variabili che potrebero condizionare la relazione suolo-pianta

Table 1. Variables that may influence the soil-plant relationship.

Relazione Pianta - Metallo / Plant-metal relationship	la coltura potrebbe non avere alcun affinità con determinati EPT e non assimilarli anche se presenti in grandi quantità; the crop could be an excluder of PTEs and not take them up, even if present in large amounts;
Le caratteristiche fisico-chimiche del suolo / Soil physico-chemical properties	pH, CSC, Sostanza organica, possono rendere un elemento più o meno scambiabile; pH, CSC, organic matter, can make the element more or less exchangeable;
Caratteristiche dell'elemento / Contaminant features	l'elemento potrebbe essere presente in una forma più o meno mobile/biodisponibile the element may be present in a more or less mobile/bioavailable form

Tabella 2. Tenori massimi per Piombo e Cadmio (Reg. CE.1881/06 e ss.mm.)

Table 2. Thresholds for Lead and Cadmium (CE Reg. 1881/2006)

3.1	**Piombo** / Lead	**Tenori massimi (mg kg^{-1} di p.f.)** / Maximum levels (mg kg-1 f.w.)
3.01.12	Cereali e leguminose Cereals and legumes	0,20
3.01.13	Ortaggi esclusi cavoli a foglia, salsefrica, ortaggi a foglia ed erbe fresche, funghi, alghe marine e ortaggi a frutto Vegetables excluding leafy brassica, salsify, leafy vegetables and fresh herbs, fungi, algae and fruiting vegetables	0,10
3.01.14	Cavoli a foglia, salsefrica, ortaggi a foglia escluse erbe fresche e i seguenti funghi: *Agaricus bisporus* (prataioli),*Pleurotus ostreatus* (orecchioni), *Lentinula erode* (Shitake) Leafy brassica, salsify, leafy vegetables excluding fresh herbs and the following fungi: Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus, Lentinula erode (Shitake)	0,30
3.01.15	Ortaggi a frutto Fruit and vegetables	
	granturco dolce sweetcorn	0,10
	altri diversi dal granturco dolce Other than sweetcorn	0,05
3.01.16	Frutta, esclusi mirtilli rossi, ribes a grappoli, bacche di sambuco e frutti del corbezzolo Fruit, excluding cranberries, currants, elderberries and fruits of the strawberry tree	0,10
3.01.17	Mirtilli rossi, ribes a grappoli, bacche di sambuco e frutti del corbezzolo Cranberries, currants, elderberries and fruits of the strawberry tree	0,20
3.2	**Cadmio** / Cadmium	**Tenori massimi (mg kg^{-1} di p.f.)** / Maximum levels (mg kg-1 f.w.)
3.02.01	Ortaggi e frutta, esclusi ortaggi a radice e tubero, ortaggi a foglia, erbe fresche, cavoli a foglia, ortaggi a stelo, funghi e alghe Vegetables and fruits, except root and tuber vegetables, leaf vegetables, fresh herbs, leafy brassica, stem vegetables, mushrooms and algae	0,050
3.02.02	Ortaggi a radice e tubero (esclusi sedano rapa, pastinaca, salsefrica e rafano), ortaggi a stelo (escluso il sedano). Nel caso delle patate il tenore massimo si applica alle patate sbucciate Root and tuber vegetables (except celeriac, parsnip, salsify and horseradish), stem vegetables (except celery). In the case of potatoes the maximum level applies to peeled potatoes	0,10
3.02.03	Ortaggi a foglia, erbe fresche, cavoli a foglia, sedano, sedano rapa, pastinaca, salsefrica, rafano e i seguenti funghi: *Agaricus bisporus* (prataioli), *Pleurotus ostreatus* (orecchioni), *Lentinula erode* (Shiitake) Leaf vegetables, fresh herbs, leafy brassica, celery, celeriac, parsnips, salsify, horseradish and the following fungi: Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus, Lentinula erode (Shiitake)	0,20
3.02.04	Funghi, esclusi quelli elencati al punto 3.2.3 Fungi, except those listed in point 3.02.03	1,0
3.02.05	Cereali, esclusi fumento e riso Cereals, except wheat and rice	0,10
3.02.06	Chicchi di frumento, grani di riso Grains of wheat, rice grains	0,20
	Crusca di frumento e germi di frumento destinati al consumo diretto Wheat bran and wheat germ for direct consumption	0,20
	Semi di soia Soybeans	0,20

Tabella 3 Sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali: materie prime per mangimi/foraggi (Direttiva 2002/32/CE)

Table 3. Undesirable substances in animal feed (CE Dir. 32/2002)

	mg kg^{-1} di foraggio al 12 % di umidità / mg kg^{-1} fodder (12 % humidity)
Arsenico / **Arsenic**	2
Piombo / **Lead**	30
Mercurio / **Mercury**	0,1
Cadmio / **Cadmium**	1

Poiché il contenuto biodisponibile di un elemento all'interno del suolo è una frazione dinamica, non è detto che la riduzione di questa frazione sia progressiva, poiché ci può essere un equilibro dinamico tra le differenti frazioni. Per tali motivi l'attività di monitoraggio si dovrà ripetere nel tempo, includendo specie coltivate durante l'intero anno, fino a quando le piante non assorbiranno più i contaminanti e quindi fino all'esaurimento della frazione prontamente biodisponibile.
L'approccio da seguire è quello del *worst case* (caso peggiore), cioè coltivare ed analizzare le parti eduli di una pianta che in condizioni normali accumuli uno o più EPT, in quanto dotata di una naturale capacità di bio-accumulo (vedi Tab.4). In tal modo, se dovesse risultare sana, si potrebbe ragionevolmente ritenere il sito esente dal rischio di contaminazione della catena alimentare. Inoltre è importante poter comprendere sia colture primaverili-estive che autunno-vernine, cercando di coprire l'intera annata, in maniera tale da poter valutare le risposte del maggior numero di colture in rapporto sia all'elemento da monitorare che all'andamento climatico.
Per monitorare l'accumulo ed evidenziare un eventuale rischio per la salute dei consumatori, si possono effettuare indagini *in situ* o *ex situ*:

- nel primo caso si coltivano le specie prescelte sulle aree maggiormente contaminate del sito da valutare;
- nel secondo si preleva il suolo dai punti in cui la vegetazione è risultata contaminata e si effettuano le prove di asportazione in condizioni controllate.

Per le misure *in situ*: nei punti con elevate concentrazioni di EPT coltivare le piante più diffuse nell'areale ed analizzarle a maturità commerciale.
Per le misure *ex situ*: prelevare dallo strato 0-30cm (profondità maggiormente esplorata dalle radici delle piante erbacee) circa 80 kg di suolo, da ogni punto che presenta concentrazioni elevate di EPT, allevando in coltura protetta (vaso) le piante maggiormente prodotte nell'areale di appartenenza del sito (5-10 ripetizioni per pianta). Rispetto alla misura *in situ* si riducono, sicuramente, i fattori di incertezza (come variabili meteorologiche; stress idrici; ecc.), ma sono da tenere presente i costi di trasporto del suolo ed i tempi per l'allestimento delle prove e delle misure in ambiente controllato.
In entrambe le misure, per avere un margine di sicurezza, è consigliabile usare piante con spiccata capacità di accumulo (es. *Brassica rapa ssp. Sylvestris*). È da sottolineare che questa specie appartiene alla famiglia delle

For measurements *in situ*: in the points with high PTE concentrations, we can cultivate the most widely grown plants of the area and analyse them at commercial maturity.

For measurements *ex situ*: we can pick about 80 kg of soil from the 0-30 cm layer (the depth most explored by herbaceous plant roots) at the points with the highest PTE concentrations, with the aim of cultivating under protected conditions (i.e. pots in a greenhouse) the most widely grown crops of the area and using 5-10 replications per crop. Unlike the *in situ* assessment, we reduce the uncertainty factors (like meteorological variables, water stress, etc.), but we have to consider other factors such as soil transport costs and times for preparing the test and measurements to make in a controlled environment.
In both measurement types, it is advisable to use plants with well-known metal uptake capacity (e.g. *Brassica rapa ssp. Sylvestris*). This species belongs to the family of *Brassicaceae* (Tab.4) which includes both very important agricultural crops from an economic point of view, and well-known PTE-accumulating species, This species is equipped with mechanisms such as increased levels of citrate and phytochelatins, that facilitate translocation and accumulation of PTE, reducing their toxicity, thus allowing higher resistance (Mourato et al. 2015).

Tabella 4. Propensione di differenti specie ad assorbire vari EPT.

Table 4. Aptitude of different species to uptake PTEs.

Specie / Species	**Metallo** / Metal	**Riferimento** / Reference
Specie a ciclo autunno-primaverile / Species with autumn-spring cycle		
Brassica juncea	As, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn	Mahbuboor et al. 2016; Clemente et al. 2005; Marchiol et al. 2004; Mourato et al. 2015
Brassica napus	As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Marchiol et al. 2004; Mourato et al. 2015
Brassica rapa	Cd, Pb, Zn	E. Meers et al. 2005; Mourato et al. 2015
Cichorium intybus	Cd, Co, Cu, Pb, Zn	Bandiera et al. 2016
Eruca vesicaria	Cu, Pb, Zn	Nikaido et al. 2010
Hordeum vulgare	As, Cd, Cu, Pb, Zn	Soriano and Fereres 2003
Lactuca sativa	As, Cu, Ni, Hg, Pb, Zn	Franca et al 2016; Antoniadis et al. 2016
Lolium multiflorum	Zn	Lambrechts et al. 2011
Lolium perenne	Pb	Alvarenga et al.2009
Medicago sativa	As, Cd, Cu, Pb	Pajuelo et al. 2007
Pisum sativum	Pb	Chen et al. 2004
Raphanus sativus	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb	Liu et al.2006
Spinacia oleracea	As, Cd, Cr, Pb	Agrawal et al. 2007
Triticum secalotriticum	As, Cd, Cu, Pb, Zn	Soriano and Fereres 2003
Specie a ciclo primaverile-estivo / Species with spring-summer cycle		
Glycine max	As, Cd, Cu, Pb, Zn	Fellet et al. 2007
Helianthus annuus	As, Cd, Co, Cu, Pb, Zn	Tassi et al. 2008; Fellet et al. 2007; Marchiol et al. 2007
Oryza sativa	Cu, Pb, Zn	Murakami and Ae 2009
Phaseolus vulgaris	Cd, Cu, Pb, Zn	Luo et al. 2005; Luo et al. 2008
Sorghum bicolor	As, Cd, Co, Cu, Pb, Zn	Fellet et al. 2007; Marchiol et al. 2007
Zea Mays	As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Murakami et al. 2009; Fellet et al. 2007; Luo et al.2005

brassicaceae (Tab.4) che comprende sia colture agricole molto importanti dal punto di vista economico, sia note accumulatrici di metalli pesanti, come dimostrato dai numerosi studi in merito a meccanismi di difesa, tolleranza e assorbimento degli EPT. Questa specie è dotata di meccanismi come l'aumento dei livelli di Citrato e Fitochelatine, che ne facilitano la traslocazione e l'accumulo degli EPT e ne riducono la tossicità permettendo una maggiore resistenza (Mourato et al. 2015).

14.2 Valutazione di un periodo minimo di fitoestrazione prima del ripristino colturale.

In aggiunta alle analisi sui prodotti vegetali, può essere necessario anche stimare il numero dei cicli colturali necessari alle piante iperaccumulatrici per riportare un suolo in condizioni di normale utilizzo.

Per la scelta delle piante per la fitoestrazione si rimanda ai cap. 7 e 9.

I test biologici descritti nel precedente paragrafo dovranno essere eseguiti al termine di ciascun ciclo di fitoestrazione. Il risultato permetterà di determinare, con ragionevole sicurezza, dopo quanti cicli il rischio di contaminazione dei prodotti alimentari sia assente.

14.2 Evaluation of a minimum time of phytoextraction prior to completing remediation

In addition to the analysis of plant products, it may be useful to estimate the number of crop cycles that are required by hyperaccumulator plants to restore a soil to normal conditions. In sum, how many phytoextraction cycles must be carried out to ensure that normal cultivation of the site can be restored? For the choice of plants for phytoremediation, see chapters 7 and 9.

The biological tests described in the previous section have to be carried out at the end of each phytoextraction cycle. The result will determine, with a sufficient safety margin, after how many cycles the risk for human health will be tolerable.

14.3 Esempio applicativo

Il sito in esame è un'area agricola di 60.000 m² situato nell'area vasta di Giugliano in Campania (NA), oggetto dello sversamento di fanghi industriali e sottoposta a sequestro giudiziario (vedi cap. 19).

Per la determinazione dei rischi diretti è stata effettuata una caratterizzazione di estremo dettaglio, e dalle analisi sono state rilevate concentrazioni superiori alle CSC (D.lgs. 152/06), distribuite su gran parte della superficie del fondo per quanto riguarda il Cromo, lo Zinco e gli idrocarburi pesanti (C> 12), e in alcune aree del sito, per altri elementi quali Piombo, Arsenico e Cadmio.

Date le premesse è stata eseguita un'Analisi di Rischio diretto, valutando i percorsi che avrebbero potuto portare i contaminanti dalla sorgente (sito) ai vari bersagli (lavoratore, falde acquifere ecc.). Con l'analisi è stata esclusa la pericolosità del sito per i lavoratori agricoli e per le falde, ma nessuna indicazione è stata ottenuta sul rischio di accumulo degli EPT nei prodotti agricoli coltivabili sul sito.

In alcune zone del campo, nelle quali la presenza di alcuni EPT era elevata, è prevista la semina di *Brassica juncea* allo scopo di escludere la possibilità di un eventuale ingresso nella catena alimentare di tali elementi.

Analisi vegetazione spontanea

In Tab.5 sono riportate le analisi sulla vegetazione spontanea, raccolta dopo il trapianto del pioppeto; i valori rilevati riguardano le concentrazioni, nel suolo e nelle parti delle piante, per Piombo, Cadmio, Arsenico, Zinco e Cromo.

Dopo aver eseguito le operazioni di messa in sicurezza dell'area e aver avviato i protocolli per il fitorisanamento, l'area è, ad oggi, oggetto di monitoraggio continuo (pioppo, prato, *B.juncea*) per valutare i progressi della fitoestrazione.

Tenendo presente che i valori riportati in Tab.5 sono inerenti alla sostanza secca, e confrontando con i limiti del Reg.CE.1881/06 e ss.mm. per Piombo e Cadmio e della Direttiva 2002/32/CE per l'Arsenico, i valori della vegetazione spontanea raccolta, espressi per unità di peso fresco, sono inferiori ai limiti di legge.

Poiché la legislazione europea non prevede limiti per Zinco e Cromo, è stato valutato l'*Hazard Quotient* ipotizzando un IR di 13.8 g giorno^{-1} (97° percentile dell'assunzione di *Brassicaceae*) ed un RfD di 0.3, 1.5 e 0.003 mg kg giorno^{-1} (rispettivamente per Zn, CrIII e CrVI), mantenendo la linea precauzionale adottata in precedenza. Nel peggiore dei casi (H14-2), per lo Zinco l'HQ è di 0.0016, valore nettamente inferiore alla soglia limite di 1; mentre il valore più alto di Cromo (H9-2), (utilizzando il restrittissimo valore del RfD del Cromo esavalente) è di 0.006 che risulta comunque di molto inferiore all'unità.

14.3 Practical case

The San Giuseppiello site is an agricultural area of 60,000 m² situated in the larger area of Giugliano in Campania (NA), sequestered from a criminal as it was used for disposal of industrial sludge (see Ch. 19). For determination of the direct risks, extremely detailed characterization was carried out, from which concentrations above the Italian screening values (Law Decree 152/06) were detected for chromium, zinc and heavy hydrocarbons (C> 12), and only in some points, also for other elements such as lead, arsenic and cadmium.

Direct risk was analysed by evaluating the exposure pathways of the contaminants from the source (soil) to the targets (workers, groundwater etc.). With such an analysis we excluded risks for agricultural workers and the groundwater, but no indication was obtained about the risk of PTE accumulation in food crops that could be cultivated in this site. In some parts of the field, where the presence of some PTEs proved higher, it is planned to sow *Brassica juncea* to exclude the possibility of input of such elements in the food chain.

Analysis of spontaneous vegetation

The analytical data for the natural vegetation, harvested after transplant of poplar, are reported in Table 5. The values detected concern concentrations, in soil and plant organs, of lead, cadmium, arsenic, chromium and zinc. After ring-fencing the site and starting phytoremediation protocols, the area is, today, under continuous monitoring (poplar, meadow, *B. juncea*) for assessing the efficacy of phytoremediation.

Given that the values reported in Tab. 5 are expressed on a dry weight basis, they proved lower than the thresholds established by European Regulation (1881/06) for lead and cadmium and European Directive 32/2002 for arsenic.

EU legislation does not set limits for zinc and chromium. The hazard quotient was therefore assessed by using an IR of 13.8 g day^{-1} (97th percentile of intake of Brassicaceae) and an RfD of 0.3, 1.5 and 0.003 mg kg^{-1} day^{-1} (respectively for Zn, CrIII and CrVI), by using the previous precautionary line. In the worst case (i.e. H14-2), for zinc the HQ was 0.0016, significantly lower than the threshold of 1. The highest value of chromium (i.e. H9-2), using the very restrictive value of the RfD of hexavalent chromium, is 0.006, which is nonetheless much lower than 1.

Tabella 5 Valori degli EPT investigati, presenti nella vegetazione spontanea e nel suolo (mg kg^{-1} di sostanza secca)

Table 5. Values of PTEs in natural vegetation and soil.

ID	Zn		Cr		As		Pb		Cd	
	Suolo / Soil	Parte Aerea / Aerial Part	Suolo / Soil	Parte Aerea / Aerial Part	Suolo / Soil	Parte Aerea / Aerial Part	Suolo / Soil	Parte Aerea / Aerial Part	Suolo / Soil	Parte Aerea / Aerial Part
	mg kg^{-1} s.s.	mg kg^{-1} p.f.	mg kg^{-1} s.s.	mg kg^{-1} p.f.	mg kg^{-1} s.s.	mg kg^{-1} p.f.	mg kg^{-1} s.s.	mg kg^{-1} p.f.	mg kg^{-1} s.s.	mg kg^{-1} p.f.
H8-1	356.0	1.51	457.0	0.03	27.0	0.02	91.9	0.01	1.0	0.003
H8-2	337.0	1.91	441.0	0.03	28.0	nr	89.5	0.01	0.5	0.001
H9-2	333.0	1.21	703.0	0.09	21.0	0.04	78.6	0.05	0.5	0.003
H13-1	512.0	0.59	870.0	0.03	23.0	nr	77.5	0.02	0.6	0.001
H13-2	417.0	1.79	650.0	0.03	24.0	nr	82.3	0.01	0.7	0.001
H14-1	444.0	1.18	411.0	0.04	26.0	nr	94.5	0.01	0.8	0.001
H14-2	420.0	2.28	492.0	0.03	26.0	0.02	90.8	0.01	0.8	0.001
Medie / Average	*402.7*	*1.49*	*574.9*	*0.04*	*25.0*	*0.03*	*86.4*	*0.01*	*0.7*	*0.001*
Limite / Threshold						*2***		*0.3**		*0.2**

* Reg.CE.1881/06 e ss.mm.
** Direttiva 2002/32/CE

* EC Reg..1881/06.
** EC Dir. 32/02

Coltivazione specie ortive accumulatrici.
Come detto in precedenza sul sito è stata eseguita una caratterizzazione di estremo dettaglio (cap. 5 e 6), la quale è stata utilizzata come guida per identificare le 15 aree, dove effettuare le prove per la valutazione del rischio di contaminazione della catena alimentare, mediante la coltivazione e l'analisi di varie specie alimentari (Fig. 1).

Per garantire l'omogeneità di distribuzione degli EPT, in ciascuna delle 15 aree selezionate, sono stati effettuati degli scavi (1,5m^2 x 0.2 m), miscelando il suolo e prelevando 4 aliquote (250g cad.) in punti diversi del campione miscelato, per avere un dato preciso sulla concentrazione degli EPT nel nuovo campione composito. Sulla base di questi dati (Tab. 7) sono state selezionate 4 aree: una che non presentasse alcuna criticità (usata come controllo) le altre con valori elevati di Piombo, Cadmio, Cromo e Zinco.
In queste 4 aree, sono stati prelevati 250 kg di suolo, mentre i restanti 11 punti sono stati ricoperti.
Il suolo prelevato è stato usato come substrato in vasi da 1.5 L nei quali, sono state coltivate 5 specie ortive, con 5 ripetizioni per singola coltura. Sono state selezionate specie accumulatrici, per le quali sono riportati fenomeni di accumulo dei diversi EPT (Fig.3), con l'obiettivo di mettersi precauzionalmente nel caso peggiore (*worst case*):

- **Lattuga -** Composita annuale che presenta un "cespo" costituito da foglie serrate in modo da costituire un "grumolo" o "cappuccio" più o meno compatto. I tipi di lattuga più importanti dal punto di vista commerciale sono: la lattuga cappuccio (rese unitarie si aggirano sui 200-250 quintali ad ettaro) e la lattuga romana (rese unitarie si aggirano sui 300-400 quintali ad ettaro). Questa specie è stata spesso segnalata per l'accumulo nelle parti eduli (foglie) di Pb, As e Hg

Cultivation of accumulator species
As mentioned above, extremely detailed in situ characterization was carried out(sections 5 and 6), which was used as a guide for identifying 15 areas in which to carry out the tests to evaluate the risk of food chain contamination by growing and analysing various food species (Fig. 1).

To obtain homogeneous distribution of PTEs, each of the 15 selected areas were excavated (1.5m^2 x 0.2 m), mixing the soil and picking four aliquots (250g each) at different points of the mixed sample, with the aim of obtaining precise data of the PTE concentration in the new composite sample. Based on these data (Tab. 7) four areas were selected: one without a critical PTE level (control), and the others with high values of lead, cadmium, chromium and zinc.
In these four areas, 250 kg of soil were removed, while the remaining 11 points were covered. The soil removed was used in 1.5-litre pots in which five vegetable species were grown, with five replicates per crop. Well-known PTE accumulating species were selected (Fig.3), so as to obtain a so-called "worst case":

- **Lettuce -** an annual plant of the Asteraceae family with heads composed by more or less compact leaves. The most widely consumed types of lettuce are: butterhead lettuce (with a yield of 20-25 tons per hectare) and romaine lettuce (with a yield of 30-40 tons per hectare). This species is often indicated for accumulation in the edible parts (leaves) of Pb, As and Hg (Antoniadis et al. 2016), and Zn (França et al. 2016);
- **Spinach -** is an annual herbaceous plant belonging to the Amaranthaceae family, with a short cycle (40-60 days) and an average productivity of 20 tons

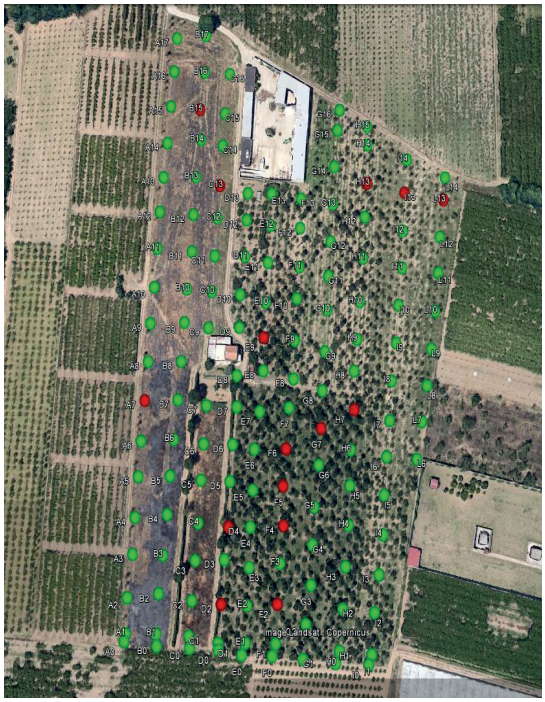


Figura 2. Punti analisi, in rosso sono evidenziati i punti con valori elevati degli elementi investigati

Figure 2. Points analysed: the points with the highest levels of contaminants are shown in red.

(Antoniadis et al. 2016), e di Zn (França et al. 2016);

- **Spinacio -** Lo spinacio è una pianta erbacea a ciclo annuale appartenente alla famiglia delle Chenopodiaceae, con un ciclo breve (40-60 giorni) ed una produzione media di 200 quintali ad ettaro. Presenta una radice fittonante rossa vicino al colletto. È una specie a basse esigenze termiche e buona tolleranza al freddo, longidiurna con rapida induzione a fiore (lunghezze del giorno superiore a 14 ore). Questa specie è stata segnalata nel lavoro di Agrawal et al. 2007 per l'accumulo nelle parti eduli di vari EPT (Pb, Cd, Cr e As);
- **Cicoria -** Composita molto comune anche allo stato spontaneo, della quale esistono numerose forme coltivate per il consumo sia fresco che cotto di foglie e radici. E' stata segnalata per l'accumulo di Pb, Cd e Zn (Bandiera et al. 2016);
- **Rucola -** Pianta erbacea annuale della famiglia delle Brassicaceae con ciclo vegetativo molto breve (dal momento della semina al completamento del ciclo, trascorrono poche settimane). Questa specie è stata segnalata per l'accumulo nelle foglie di Pb e Zn (Nikaido et al. 2010);
- **Ravanello -** Pianta erbacea della famiglia delle Brassicaceae, coltivata per l'ipocotile ingrossato comunemente chiamato radice. Il ciclo colturale dura da 3 settimane a 2-3 mesi (rispettivamente ciclo estivo ed invernale). La coltivazione si avvantaggia di terreni di medio impasto tendenzialmente calcarei ben dotati di sostanza organica. La produzione ad ettaro è di circa 30 quintali. E' una specie nota per l'accumulo di Pb, Cd, As e Cr (Liu et al. 2006).

per hectare. It has a taproot which is red near the collar. It is a species with low heat requirements and good tolerance to cold. This species is indicated by Agrawal et al. 2007 as accumulating various PTEs (Pb, Cd, Cr and As) in its edible parts;

- **Chicory -** a very common Asteraceae also growing wild, which includes many varieties grown for consumption of fresh or cooked leaves and roots. It is indicated as accumulating Pb, Cd and Zn (Bandiera et al. 2016);
- **Rocket** salad **-** annual herbaceous plant of the Brassicaceae family with a very short growth cycle (a few weeks from sowing to harvest). This species is indicated for accumulating leaves of Pb and Zn (Nikaido et al. 2010);
- **Radish -** Herbaceous plant of the Brassicaceae family, cultivated for its swollen hypocotyl commonly called root. The growing cycle lasts from 3 weeks to 2-3 months (respectively, for the summer and winter cycle). The production per hectare is about 3 tons. It is known for its accumulation of Pb, Cd, As and Cr (Liu et al. 2006).

The use of spring and summer cycle crops (tomato, pepper, courgette, etc.) is also planned.
The plants are harvested when commercial maturity is reached. During this step it was decided to pick the whole plant (including roots) of each replicate. The harvested plants were weighed and washed in deionized water to remove any residual soil from the samples. They were then divided into roots, stems and leaves. The samples thus prepared were then delivered to the laboratory for chemical analyses. The results will be

Tabella 6. Concentrazioni degli EPT nei 15 punti di prelievo

Table 6 PTE concentrations in the 15 sampling points

ID	As		Cr		Zn		Cd		Pb		Note
	mg kg^{-1}	*dev. st.*	mg kg^{-1}	*dev. st.*	mg kg^{-1}	*dev. st.*	mg kg^{-1}	*dev. st.*	mg kg^{-1}	*dev. st.*	
A7	19	*1*	81	*20*	108	*24*	nd	*nd*	50	*8*	Controllo / Control
B15	18	*2*	404	*221*	277	*168*	nd	*nd*	56	*8*	
C13	20	*3*	391	*66*	488	*37*	nd	*nd*	114	*19*	Piombo
D2	19	*2*	185	*103*	151	*7*	nd	*nd*	66	*4*	
D4	23	*3*	379	*109*	344	*55*	nd	*nd*	83	*17*	
E9	24	*2*	104	*10*	138	*5*	nd	*nd*	66	*4*	
F2	24	*1*	1034	*312*	532	*63*	17	*nd*	66	*9*	Cromo & Zinco
F4	23	*2*	299	*96*	239	*29*	19	*3*	66	*6*	Cadmio
F5	24	*1*	264	*49*	250	*13*	22	*3*	64	*5*	
F6	25	*2*	255	*80*	251	*27*	27	*nd*	69	*20*	
G7	23	*2*	559	*106*	428	*47*	nd	*nd*	65	*3*	
H7	22	*3*	669	*91*	407	*29*	nd	*nd*	69	*8*	
H13	22	*2*	372	*139*	273	*40*	nd	*nd*	62	*5*	
I3	19	*1*	242	*36*	210	*12*	nd	*nd*	66	*2*	
L13	18	*2*	264	*45*	200	*16*	nd	*nd*	74	*7*	

Figura 3. Parte di scavo (1,5 m2 x 0,20 m)
Figure 3. Excavation (1.5 m2 x 0.20 m)

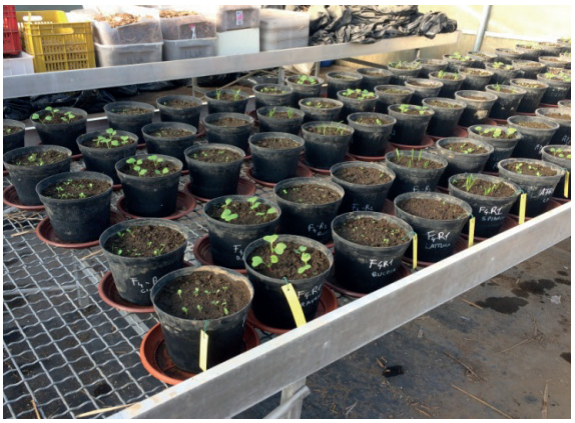


Figura 4. Fasi sviluppo delle Specie appositamente coltivate per valutare l'eventuale rischio per la salute pubblica: Sx Germinazione; Dx Piante sviluppate

Figure 4. Development stages of species grown to assess risk for human health: (Left) germination; (Right) grown plants

Figura 5. *Brassica Juncea*, piante disposte ad X

Figure 5. *Brassica juncea* plants placed to X

Raggiunta la maturità commerciale, le piante sono state raccolte. Durante questa fase si è provveduto al prelievo dell'intera pianta (comprensiva di radici) di ciascuna ripetizione. Le piante raccolte sono state pesate e lavate in acqua deionizzata per eliminare eventuali residui di terreno dai campioni. Questi sono stati scomposti (radice, fusto, foglie), imbustati e cartellinati separatamente. I campioni così preparati sono stati portati in laboratorio per le analisi. I risultati verranno confrontati con i limiti di legge per gli elementi normati e con l'*Hazard Quotient* per gli altri, per discriminare un'eventuale pericolo per la salute dei consumatori.
Per valutare l'efficacia della fitoestrazione nel ridurre i rischi di accumulo degli EPT nelle parti eduli dei prodotti agricoli, il suddetto protocollo di coltivazione ed analisi dovrà essere effettuato dopo i diversi cicli fitoestrattivi con piante iperaccumulatrici (vedi cap. 9).
A tale scopo è stata utilizzata la *Brassica juncea*, nota pianta accumulatrice di As, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn. Sono stati prelevati circa 100 kg di suolo su ognuno dei 4 punti scelti, nello strato 0-0.30 m. I vasi sono stati preparati dopo aver omogeneizzato i suoli, e sono stati seminati 15 semi per vaso.
Nelle settimane successive, è stata fatta una cernita basata sulla selezione delle piante che presentavano le caratteristiche migliori (robustezza, dimensioni, ecc) ed estirpando, di conseguenza, le piante meno promettenti. Il risultato ha portato alla presenza infine di sole 5 piante per vaso, disposte in maniera da permettere alle radici di esplorare il maggior volume di suolo possibile, limitando i fenomeni di competitività tra le stesse piante (Fig.4).
Al termine del ciclo (fine fioritura, inizio maturazione semi) le piante saranno estirpate e separate in radici e parte aerea per analizzarne il contenuto in EPT. Successivamente saranno coltivate le specie utilizzabili per l'analisi dei rischi indiretti (Tab.4). Se queste dovessero risultare non contaminate, significherebbe che, in quelle condizioni sito-specifiche, è stato sufficiente un unico

compared with the legal limits for regulated elements and with the hazard quotient for the others so as to aim to evaluate the possible hazard risk for consumer health.

To assess the efficacy of phytoextraction in lowering risks of PTE accumulation in the edible parts of food crops, the adopted protocol of cultivation and analysis must be carried out after every cycle of phytoextraction with hyperaccumulators (see Ch. 9). To do so, *Brassica juncea* was used, known as an accumulator of As, Cd, Cr, Cu, Pb and Zn. About 100 kg of soil at each of the four selected points were removed in the 0-0.30 m layer. Pots were prepared by homogenising the soils, and 15 seeds per pot were seeded.
In the weeks after sowing, a selection based on the best plant features (sturdiness, size, etc.) was made and the others were thinned out, thus leaving only five plants per pot, placed in such a way as to enable the roots to explore the largest possible volume of soil, limiting competitiveness between the plants themselves (Fig.4).

At the end of the cycle (end of flowering, beginning of seed ripening), the plants will be harvested and separated into roots and aerial parts to analyse the concentration of PTEs. In a second step the species suitable for the analysis of indirect risks (Tab.4) will be grown. If the latter are not contaminated, this means that, in such site-specific conditions, a single cycle of phytoextraction was sufficient. If, on the contrary, the crop is still contaminated, x^n cycles of phytoextraction will need to be repeated until subsequent tests show the absence of risks of PTE accumulation in the food crops concerned.

ciclo di fitoestrazione. Se invece la coltura dovesse risultare ancora contaminata si dovranno ripetere x^n cicli di fitoestrazione finché i successivi test su colture alimentari non dimostreranno la assenza di rischi di accumulo di EPT negli alimenti vegetali.

Bibliografia

Agrawal S.B., Singh A., Sharma R.K., Agrawal M. Bioaccumulation of Heavy Metals in Vegetables: A Threat to Human Health, Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology 2007 Global Science Books;

Alvarenga P., Gonçalves A.P., Fernandes R.M., de VarennesElizabeth Duarte A., Cunha-Queda A.C., Vallini G. Reclamation of a mine contaminated soil using biologically reactive organic matrices, Waste Management & Research 2009, Vol 27, Issue 2 Pages 101-111;

Antoniadis V., Shaheen S.M., Boersch J., Frohne T., Du Laing G., Rinklebe J. Bioavailability and risk assessment of potentially toxic elements in garden edible vegetables and soils around a highly contaminated former mining area in Germany Journal of Environmental Management 2016,186 (2017) 192-200;

Bandiera M., Dal Cortivo C., Barion G., Mosca G. and Teofilo Vamerali Phytoremediation Opportunities with Alimurgic Species in Metal-Contaminated Environments, Sustainability 2016, 8, 357;

Chena Y., Shena Z., Li X. The use of vetiver grass (Vetiveria zizanioides) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals Applied Geochemistry 2004, 19 1553–1565;

Choudhury M.R., Islam, M.S., Ahmed, Z.U., Nayar, F. Phytoremediation of heavy metal contaminated buriganga riverbed sediment by Indian mustard and marigold plants, Environmental Progress and Sustainable Energy 2016, Volume 35, Issue 1, Pages 117-124;

Clemente R., Walker D.J., Bernal M.P. Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effect of soil amendments, Environmental Pollution 2005, Volume 138, Issue 1, Pages 46–58;

Direttiva 2002/32/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO - http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:aca28b8c-bf9d-444f-b470-268f71df28fb.0008.02/DOC_1&format=PDF ;

EFSA 2006 Tolerable Upper Intake Levels For Vitamins And Minerals http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf;

EFSA 2015. http://www.efsa.europa.eu/it/food-consumption/comprehensive-database;

Fellet G., Marchiol L., Perosab D., Zerbi G. The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders, Ecological Engineering 2007, 31 207–214;

França F.C.S.S., Albuuerque A.M.A., Almeida A.C., Silveira P.B., Filho C.A., Hazin C.A., Honorato E.V. Heavy metals deposited in the culture of lettuce (Lactuca sativa L.) by the influence of vehicular traffic in Pernambuco Brazil, Food Chemistry 2016, 215, 2017, 171–176;

Istituto Superiore di Sanità – INAIL, 2013 Documento di supporto alla Banca dati "ISS-INAIL", http://www.

References

Agrawal S.B., Singh A., Sharma R.K., Agrawal M. Bioaccumulation of Heavy Metals in Vegetables: A Threat to Human Health, Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology 2007 Global Science Books;

Alvarenga P., Gonçalves A.P., Fernandes R.M., de Varennes E.D. A., Cunha-Queda A.C., Vallini G. Reclamation of a mine contaminated soil using biologically reactive organic matrices, Waste Management & Research 2009, 27, 101-111;

Antoniadis V., Shaheen S.M., Boersch J., Frohne T., Du Laing G., Rinklebe J. Bioavailability and risk assessment of potentially toxic elements in garden edible vegetables and soils around a highly contaminated former mining area in Germany. Journal of Environmental Management 2016,186 2017 192-200;

Bandiera M., Dal Cortivo C., Barion G., Mosca G. and Teofilo Vamerali Phytoremediation Opportunities with Alimurgic Species in Metal-Contaminated Environments, Sustainability 2016, 8, 357;

Chena Y., Shena Z., Li X. The use of vetiver grass (Vetiveria zizanioides) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals Applied Geochemistry 2004, 19 1553–1565;

Choudhury M.R., Islam, M.S., Ahmed, Z.U., Nayar, F. Phytoremediation of heavy metal contaminated buriganga riverbed sediment by Indian mustard and marigold plants, Environmental Progress and Sustainable Energy 2016, Volume 35, Issue 1, Pages 117-124;

Clemente R., Walker D.J., Bernal M.P. Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effect of soil amendments, Environmental Pollution 2005, Volume 138, Issue 1, Pages 46–58;

EC Directive 2002/32- http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:aca28b8c-bf9d-444f-b470-268f71df28fb.0008.02/DOC_1&format=PDF ;

EFSA 2006 Tolerable Upper Intake Levels For Vitamins And Minerals http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf;

EFSA 2015. http://www.efsa.europa.eu/it/food-consumption/comprehensive-database;

Fellet G., Marchiol L., Perosab D., Zerbi G. The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders, Ecological Engineering 2007, 31 207–214;

França F.C.S.S., Albuuerque A.M.A., Almeida A.C., Silveira P.B., Filho C.A., Hazin C.A., Honorato E.V. Heavy metals deposited in the culture of lettuce (Lactuca sativa L.) by the influence of vehicular traffic in Pernambuco Brazil, Food Chemistry 2016, 215, 2017, 171–176;

Istituto Superiore di Sanità – INAIL, 2013 Documento di supporto alla Banca dati "ISS-INAIL", http://www.

veira P.B., Filho C.A., Hazin C.A., Honorato E.V. Heavy metals deposited in the culture of lettuce (Lactuca sativa L.) by the influence of vehicular traffic in Pernambuco Brazil, Food Chemistry 2016, 215 (2017) 171–176;

Istituto Superiore di Sanità – INAIL, 2013 Documento di supporto alla Banca dati "ISS-INAIL", http://www.iss.it/binary/iasa/cont/Documento_di_supporto_alla_Banca_dati_ISS_INAIL.pdf;

Istituto Superiore di Sanità – INAIL, 2015, Banca dati "ISS-INAIL", http://www.iss.it/binary/ampp/cont/Banca_dati_ISS_INAIL_Marzo_2015_FINAL_PR.xlsx;

Istituto Superiore di Sanità, - 2013-07-09 Criteri per la valutazione del rischio sanitario connesso alla presenza di aree agricole all'interno di siti contaminati - http://www.iss.it/binary/iasa/cont/Criteri_per_la_valutazione_del_rischio_sanitario_connesso_alla_presenza_di_aree_agricole_all_interno_di_siti_contaminati.pdf;

Liu W.-X., Li H.-H., Li S.-R., Wang Y.-W. Heavy Metal Accumulation of Edible Vegetables Cultivated in Agricultural Soil in the Suburb of Zhengzhou City, People's Republic of China, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 2006, 76:163–170;

Lambrechts T., Gustot Q., Couder E., Houben D., Iserentant A., Lutts S. Comparison of EDTA-enhanced phytoextraction and phytostabilisation strategies with Lolium perenne on a heavy metal contaminated soil, Chemosphere 2011 Volume 85, Issue 8, Pages 1290–1298;

Luo C., Shen Z., Li X. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS, Chemosphere 2005, 59 1–11 ;

Luo C., Shen Z., Li X. Hot NTA Application Enhanced Metal Phytoextraction from Contaminated Soil, Water, Air, and Soil Pollution 2008, Volume 188, Issue 1, pp 127–137;

Marchiol L., Sacco P., Assolari S., Zerbi G. Reclamation Of Polluted Soil: Phytoremediation Potential Of Crop-Related Brassica Species, Water, Air, & Soil Pollution 2004, 158: 345;

Marchiol L., Fellet G., Perosa D., Zerbi G. Removal of trace metals by Sorghum bicolor and Helianthus annuus in a site polluted by industrial wastes: A field experience, Plant Physiology and Biochemistry 2007, 45 379-387;

Meers E., Ruttens A., Hopgood M., Lesage E., Tack F.M.G. Potential of Brassic rapa, Cannabis sativa, Helianthus annuus and Zea mays for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils, Chemosphere 2005, 61 561–572;

Mourato M.P., Moreira I.N., Leitão I., Pinto F.R., Sales J.R., Louro L. Martins Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus Brassica, International Journal of Molecular Sciences 2015, 16, 17975-17998;

Murakami M., Ae N. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (Oryza sativa L.), soybean (Glycine max [L.] Merr.), and maize (Zea mays L.), Journal of Hazardous Materials 2009, 162 1185–1192;

Nikaido M., Tonani K.A.A., Julião F.C., Trevilato T.M.B., Takayanagui A.M.M., Sanches S.M., Domingo J.L., Segura-Muñoz S.I. Analysis of Bacteria, Parasites, and Heavy Metals in Lettuce (Lactuca sativa) and

(Glycine max [L.] Merr.), and maize (Zea mays L.), Journal of Hazardous Materials 2009, 162 1185–1192;

Nikaido M., Tonani K.A.A., Julião F.C., Trevilato T.M.B., Takayanagui A.M.M., Sanches S.M., Domingo J.L., Segura-Muñoz S.I. Analysis of Bacteria, Parasites, and Heavy Metals in Lettuce (Lactuca sativa) and Rocket Salad (Eruca sativa L.) Irrigated with Treated Effluent from a Biological Wastewater Treatment Plant, Biological Trace Element Research 2009, (2010) 134:342–351;

Pajuelo, E., Carrasco, J.A., Romero, L.C., Chamber, M.A., Gotor, C. Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine (thiol)lyase under metal stress, Plant Biology 2007, Volume 9 Issue 5 Pages 672-681;

Regolamento Comunitario 1881/2006 - http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=URISERV%3Al21290 ;

Regolamento (UE) N. 1275/2013 DELLA COMMISSIONE - http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:328:0086:0092:IT:PDF;

Regolamento (UE) 2015/1005 della Commissione - http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=CELEX%3A32015R1005;

Regolamento (UE) 2015/1006 della Commissione - http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2015.161.01.0014.01.ENG;

Soriano M.A., Fereres E. Use of crops for in situ phytoremediation of polluted soils following a toxic flood from a mine spill, Plant and Soil 2003 256: 253;

Tassi E., Pouget J., Petruzzelli G., Barbafieri M. The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals, Chemosphere 2008, 71 66–73;

USEPA Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures. Federal Register 1986;51(185):34014–25, https://www.epa.gov/risk/guidelines-health-risk-assessment-chemical-mixtures;

US EPA Risk assessment guidance for superfund. Human Health Evaluation Manual (Part A). Interim Final, vol. I.Washington (DC): United StatesEnvironmental ProtectionAgency, 1989; EPA/540/1-89/002, https://www.epa.gov/risk/risk-assessment-guidance-superfund-rags-part;

US EPA Handbook for non-cancer health effects evaluation. Washington (DC): US Environmental Protection Agency; 2000;

US EPA Integrated Risk Information System (IRIS). Last Revised 9/20/16. Available on-line at: http://www.epa.gov/iris/; 2016.

Rocket Salad (Eruca sativa L.) Irrigated with Treated Effluent from a Biological Wastewater Treatment Plant, Biological Trace Element Research 2009, (2010) 134:342–351;

Pajuelo, E., Carrasco, J.A., Romero, L.C., Chamber, M.A., Gotor, C. Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine (thiol)lyase under metal stress, Plant Biology 2007, Volume 9 Issue 5 Pages 672-681;

EC regulation 1881/2006 - http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=URISERV%3Al21290 ;

EC regulation 1275/2013

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:328:0086:0092:IT:PDF;

EC regulation 2015/1005 http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=CELEX%3A32015R1005;

EC regulation 2015/1006 http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2015.161.01.0014.01.ENG;

Soriano M.A., Fereres E. Use of crops for in situ phytoremediation of polluted soils following a toxic flood from a mine spill, Plant and Soil 2003 256: 253;

Tassi E., Pouget J., Petruzzelli G., Barbafieri M. The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals, Chemosphere 2008, 71 66–73;

USEPA Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures. Federal Register 1986;51(185):34014–25, https://www.epa.gov/risk/guidelines-health-risk-assessment-chemical-mixtures;

US EPA Risk assessment guidance for superfund. Human Health Evaluation Manual (Part A). Interim Final, vol. I.Washington (DC): United StatesEnvironmental ProtectionAgency, 1989; EPA/540/1-89/002, https://www.epa.gov/risk/risk-assessment-guidance-superfund-rags-part;

US EPA Handbook for non-cancer health effects evaluation. Washington (DC): US Environmental Protection Agency; 2000;

US EPA Integrated Risk Information System (IRIS). Last Revised 9/20/16. Available on-line at: http://www.epa.gov/iris/; 2016.

15. Aspetti territoriali del cambiamento di uso del suolo

E. Cervelli, M. Sacchi, M. Rigillo, L. Boccia

La saturazione del territorio, gli squilibri ambientali e sociali, la limitatezza delle risorse, la gestione dei rischi ambientali, comportano la consapevolezza di un governo complesso del territorio e delle sue trasformazioni, per far fronte alle necessità di sviluppo ed, allo stesso tempo, di sostenibilità degli interventi posti in atto (Crafts and Toniolo, 1996; Herzog et al., 2000; Murdoch, 2000; Gobattoni et al., 2015).
Occorre una visione integrata del territorio, fin dall'inizio del processo di trasformazione, pianificazione o governo. L'urgenza e l'obbligo di tale integrazione derivano dalla constatazione degli effetti registrabili per effetto delle politiche di sviluppo poste in essere a partire dal secondo dopoguerra, in un contesto di marginalità del diritto ambientale, di perdurante assenza di una cultura dell'ambiente e dell'assenza di un sistema normativo capace di regolare il rapporto tra produzione e sviluppo. Recenti documenti e direttive internazionali e comunitarie, recepite e fatte proprie a livello legislativo nazionale, mettono in crisi il modello di sviluppo basato sul crescente sfruttamento delle risorse naturali non rinnovabili: dal 1992 la Conferenza di Rio de Janeiro sancisce quale "sviluppo sostenibile", lo sviluppo in cui si coniugano le tre dimensioni di ambiente, economia e società; tra gli anni novanta e duemila documenti, libri bianchi, direttive, progetti europei affrontano il tema della tutela non più solo come mitigazione dei danni, ma come prevenzione e controllo rispetto allo sfruttamento delle risorse e come bilanciamento tra conservazione e valorizzazione; a partire dalla fine degli anni ottanta il legislatore italiano vara leggi e recepisce direttive internazionali per la salvaguardia dell'ambiente e l'integrazione delle dinamiche ambientali all'interno della pianificazione del governo del territorio.
La valutazione degli aspetti territoriali connessi ad un processo di trasformazione, può fornire un significativo contributo al processo decisionale, pianificatorio e di governo del territorio, contribuendo alla definizione delle prevedibili conseguenze ambientali, attraverso analisi empiriche, monitoraggio ed impostazione di algoritmi e modelli di simulazione del comportamento degli ecosistemi, da cui far scaturire diagnosi oggettive e conseguenti norme e vincoli (Pelorosso, 2009; Leone, 2011). Il contesto, la sua conoscenza, la costruzione di scenari di cambiamento di uso del suolo, la valutazione dei possibili impatti sul territorio, il monitoraggio degli effetti, sono i nodi essenziali di tale processo.

Scenari di cambiamento di uso del suolo

In primo luogo, la costruzione di scenari di cambiamento di uso del suolo aiuta a "pensare fuori dagli schemi", stimolando riflessioni sui possibili effetti del LUC ipotizzati; gli scenari non realizzano previsioni esatte di ciò che accadrà in futuro, ma aiutano ad ipotizzare alternative nel lungo termine, di assetti del territorio il più possibile diverse, per valutare opzioni, politiche ed interventi nel breve-medio termine.

15. Legacies of land use change on landscape

E. Cervelli, M. Sacchi, M. Rigillo, L. Boccia

The need for a land management policy sensitive to issues of socio-economic development and environmental sustainability arises from concerns about land saturation, environmental and social imbalances, increasing limited resources and environmental risks management (Crafts and Toniolo, 1996; Herzog et al., 2000; Murdoch, 2000; Gobattoni et al., 2015).
A spatial and landscape integrated analysis is recognized as a primary condition to overcoming development policies not inclusive of environmental issues. Recent European regulatory framework adoption, try to undermine this development model mainly based on an increasing use of not renewable natural resources. The long process toward sustainability started since 1992 during the Rio de Janeiro Conference where the concept of "sustainable development" was introduced to bring together environmental protection and quality of life. Later, White Papers and European directives considered environmental issues not only in terms of damage mitigation, but also as prevention and control measures to act (against uncontrolled resources exploitation) as a trade-off between conservation and development. At the end of the eighties, the Italian government also adopted specific laws and guidelines to protect the environment by integrating environmental dynamics in the land management process.
Environmental impacts assessment becomes a key issue in the landscape management analyses ex ante or ex post, thanks to empirical investigations based on algorithms and simulation models of ecosystems dynamics. These procedures enable objective diagnosis and consequent rules and constraints (Pelorosso et al., 2009; Leone, 2011). Knowledge of land context, land use change (LUC) scenarios building and potential impacts assessment and monitoring, are the essential points of land planning.

Land use change scenarios

Firstly, **land use change scenarios building** helps "thinking outside the box", stimulating reflections on the possible LUC consequence. Scenarios do not provide exact predictions of what will happen in the future, but help speculate alternatives, in long term, to evaluate alternatives policies and interventions in the short - medium term (EEA, 2009).
In LUC scenarios building, the Multicriteria Decision Analysis (MCDA) has become a central tool in the cultural, scientific, and political debates. The multicriteria Decision Analysis supports creation of compromise solutions and provides the perfect platform for analyzing, structuring and solving problems related to the environment and land management (Geneletti, 2008). In landscape planning, the MCDA techniques are finding increasing application: the dynamic approach allows to make transparent and shared decision-making process, to integrate contributions

Per la costruzione degli scenari, l'analisi multicriteriale per scopo decisionale, "*MultiCriteria Decision Analysis*" (MCDA), è ormai uno strumento centrale nel dibattito culturale, scientifico e politico, in quanto supporta la creazione di soluzioni di compromesso e trasparenti, e costituisce una piattaforma ideale per l'analisi, la strutturazione e la risoluzione dei problemi inerenti alla gestione dell'ambiente e del territorio (Geneletti, 2000). Nella pianificazione territoriale, le tecniche di MCDA stanno trovando un'applicazione crescente: l'approccio dinamico consente di rendere il processo decisionale trasparente e condiviso, di integrare saperi e contributi di tecnici di estrazioni diverse, con le volontà politiche del decision-maker e gli interessi degli stakeholders (Zhang et al., 2012), inoltre, l'integrazione delle funzioni spaziali tipiche dei Geographic Information Systems (GIS) con quelle di Analisi Multicriterio (AMC) tipiche dei Decision Support Systems (DSS), genera i modelli di Spatial - Multicriteria Decision Suppoprt Systems (S-MCDS), che strutturano procedure finalizzate all'identificazione ed al confronto di soluzioni ad un problema decisionale spaziale semi-strutturato, sulla base di una combinazione di fattori che possono essere, almeno parzialmente, rappresentati da mappe (Malczewski, 2006). Gli Spatial - Multicriteria Decision Suppoprt Systems trovano larga applicazione nella costruzione di scenari (Malczewski, 2006; Geneletti et al., 2008; Gbanie et al, 2013; Lami et al., 2011; Staal et al., 2013), nella definizione di sistemi di vulnerabilità (Rashed et al., 2007; Cervelli et al., 2016; Rigillo and Cervelli; 2014; Ferretti et al., 2014; Torresan et al., 2012), nella valutazione degli impatti (de Groot et al, 2010; Okello et al., 2014; Lahdelma et al., 2010; Bojórquez-Tapia et al., 2005; Janssen, 2001).

Il processo di costruzione delle alternative attraverso analisi spaziali multicriteriali, si articola generalmente in flussi di attività strutturati: la definizione degli obiettivi, la conoscenza mirata del territorio con la descrizione del sistema attraverso specifici criteri, la definizione delle relazioni tra gli obiettivi, gli attributi e le preferenze del decision maker, la valutazione delle alternative.

from different backgrounds (Zhang et al., 2012). When Multicriteria Analysis (AMC) and typical of Decision Support Systems (DSS) are integrated with a spatial analysis through Geographic Information Systems (GIS), a Spatial - Multicriteria Decision Support Systems (S-MCDS) is generated. Structure procedures are aimed at identifying and comparing solutions to a semi-structured spatial decision problem. This is done by combining factors that can be, albeit incompletely, represented by mapping units (Malczewski, 2006).

The alternatives building process, through multi-criteria spatial analysis, is generally organized according to subsequent steps: goal setting, a landscape and spatial targeted knowledge (with the system description using specific criteria), the criteria relationships definition, the decision makers and stakeholders preferences, the alternatives assessment.

The work begins with a knowledge process, based on the holistic principle of meaningful indicators group definition. Using a GIS support, this process leads to a multi-scale, interdisciplinary information organization (Fig. 1).

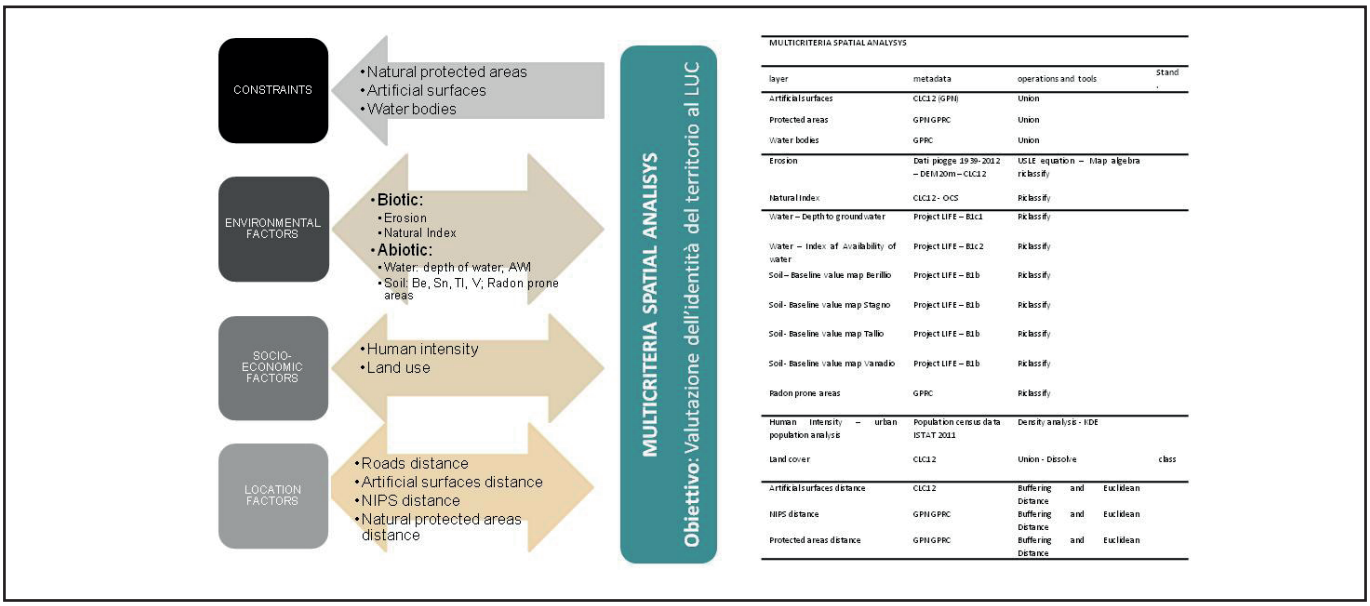


Figura 1. Analisi spaziale e criteri di definizione

Figure 1 Spatial Analysis and criteria definition

Il lavoro parte da un processo di conoscenza basato sul principio olistico di un gruppo di indicatori significativi del sistema ambientale nel suo complesso e, attraverso lo strumento GIS, perviene ad un'organizzazione multiscalare e interdisciplinare delle informazioni. I "criteri", alla base della conoscenza del territorio, scaturiscono dalle analisi ed elaborazioni eseguite in funzione delle matrici ambientali e socio-economiche e sono di fatto gli elborati/layer/strati prodotti, rappresentativi delle dinamiche che interessano un territorio, in funzione degli obiettivi del progetto (Figura 1).

Nel processo di S-MCDA, i criteri vengono organizzati in una struttura ad albero, al fine di evidenziarne rapporti reciproci ed i gradi di importanza; si articolano in "*constrains*" e "*general factor*", in accordo con l'approccio di Ferretti (2011). I vincoli costituiscono condizioni non favorevoli rispetto all'obiettivo (per esempio per la costituzione di un parco naturale, la presenza di industrie o centri abitati…); un vincolo implica che la superficie interessata non verrà inclusa nelle valutazioni successive, è un criterio di non-inclusione. I fattori esprimono e condizionano il grado di "vocazione" finale del territorio, rispetto agli obiettivi prefissati. Le basi informative sono costituite da una serie di strati vettoriali e raster, di classificazione (coperture ed usi del suolo, SIC e ZPS, aree con particolari caratteri, ecc.) e di valore (pendenza, elevazione, erosione, distanze, ecc.), generalmente desumibili dai geoportali dei rispettivi Enti, Amministrazioni e soggetti operanti sul territorio di riferimento, nonché da elaborazioni derivate attraverso operazioni GIS di base (*overlay, buffering*, mappatura distanza, *query* spaziali...). Tutti i criteri (vincoli e fattori) sono rasterizzati in un comune *cell size* e in un medesimo sistema di riferimento.
Di seguito, a titolo esemplificativo, si riporta l'organizzazione dei criteri nella struttura ad albero adottata per il progetto LIFE Ecoremed, azioni B1e e C5 (Figura 2).

Tutti i criteri sono organizzati all'interno di un albero di criteri, derivante dalla categoria più generale degli alberi decisionali, uno strumento di supporto alle decisioni che utilizza un grafo o modello per visualizzare un algoritmo. I "Criteria Tree" sono comunemente utilizzati nell'analisi decisionale, per aiutare a identificare le strategie più probabili per raggiungere determinati obiettivi.
La fase successiva è costituita dal confronto dei criteri. Per consentire tale confronto, è necessaria una prima operazione in grado di ricondurre tutti i *layer* o criteri, ad una medesima scala di valutazione, per garantirne il confronto reciproco. Tale operazione è definita "standardizzazione" o "normalizzazione".
Nella fase di Standardizzazione, i valori e le classi di tutte le mappe sono convertiti in una scala comune (generalmente da 0 a 1) in cui i valori rappresentano «la misura per l'apprezzamento del decisore (DM) rispetto ad un particolare criterio» (Sharifi e Retsios, 2004). Tali operazioni sono generalmente condotte mediante panel di esperti, per garantire la corretta interpretazione di ciascun criterio, e sono gestite mediante funzioni (lineari e non) costi/benefici.
La fase successiva è quella della "ponderazione", ovvero

In the S-MCDA process, criteria are organized in a tree structure, in order to highlight the mutual relations and importance degrees. They are divided into "constrains" and "general factors" (Ferretti et al., 2011). The constraints are not favorable to the objective; a constraint implies that the study area will not be included in the subsequent evaluations. This is a criterion of non-inclusion. The factors express and influence the "vocation" degree of each grid of the area compared to the set goals. The informative bases are made up by a series of vector and raster layers, classification map (Land use/cover, SCI and SPA etc.) and value map (slope, elevation, erosion, distances, etc.). Generally, the informative bases are inferred from administrative institutions geoportals as well as calculations derived through basic GIS operations (overlay, buffering, remote mapping, spatial queries, ...). All of the elements (constraints and factors) are rasterized into a common cell size and in the same reference system.
Figure 2 depicts the organization of the criteria - tree structured for the LIFE Ecoremed Project, B1 and C5 actions.

All elements/criteria are organized in a criteria tree commonly used in decision analysis process, helping identify the most likely strategies to achieve objectives. The next phase is the criteria comparison. To allow for comparison, it is necessary a preliminary step enabling all the layers or criteria to be set at the same rating scale. This operation is called "standardization" or "normalization". In the Standardization phase, the values and classes of all maps are converted into a common scale (generally ranging from 0 to 1) in which the numerical values "is a measure of appreciation of the decision maker with respect to a particular criterion" (Sharifi and Retsios, 2004 pp. 5). These operations are generally carried out by the panel of experts to ensure a proper interpretation of each criterion, and are managed by means of cost/benefit functions (being linear or nonlinear).
The "weighting" is the next step, i.e. assigning a multiplication coefficient to each criterion, depending on its role / importance with respect to the intervention targets. The weighting phase is one of the critical points of the evaluation system, because of highly dependence on personal experience and to the evaluator rigorousness. The weights measure the priorities assigned to each traits of the problem through a-dimensional numerical values, for this reason they have not an absolute value. Each indicator is multiplied by its weight before being aggregated to others. Generally, the methods used for criteria comparison are Pairwise comparison, Ranking or Rating.
In the pairwise comparison, the scores are attributed according to Saaty's scale (Saaty, 2005) (Fig. 3). Scores to be used at each comparison generally correspond to the number of quality levels to be considered during the pairwise comparisons. Generally, the scale ranges from 1 to 9.

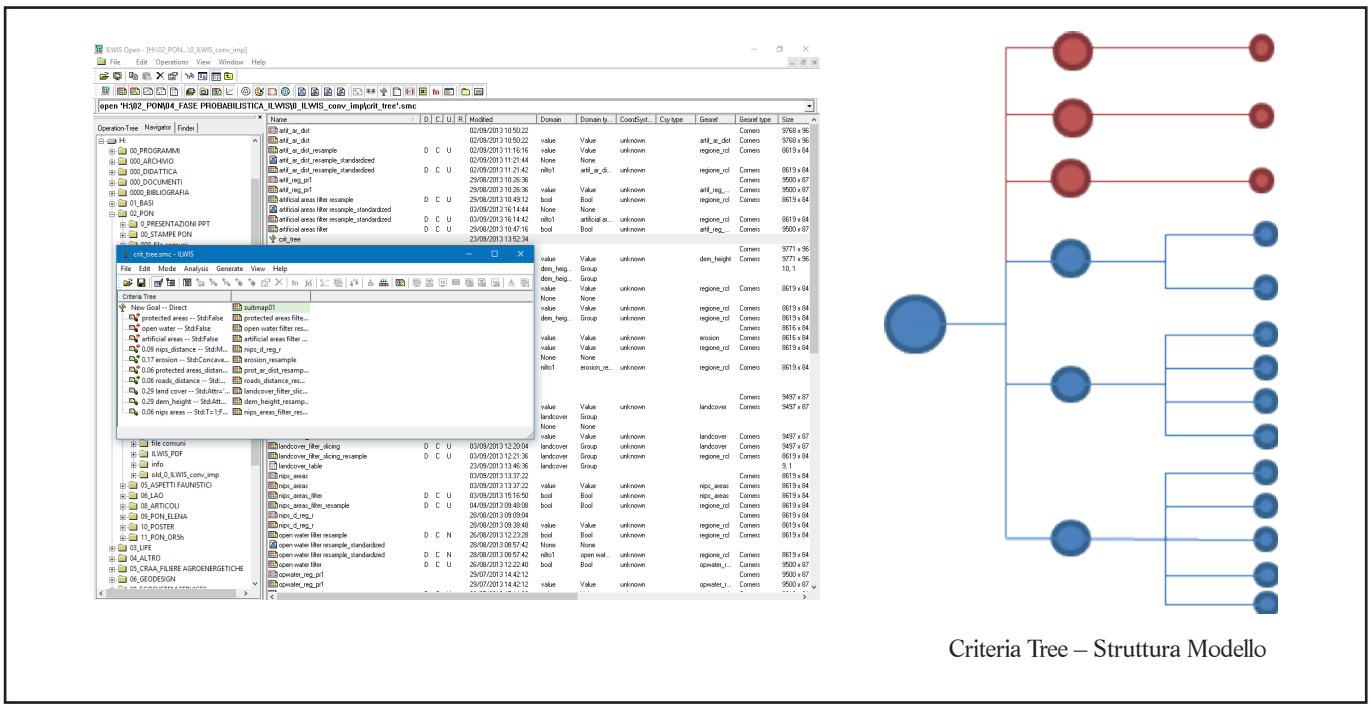


Figura 2. Struttura dei criteri e modello

Figure 2. Criteria Tree Structure and Model

l'assegnazione di un coefficiente moltiplicativo a ciascun criterio, in funzione del ruolo/importanza rispetto agli obiettivi di intervento. La fase di ponderazione rappresenta uno dei punti critici del sistema di valutazione, in quanto fortemente soggetta alle esperienze personali e alla professionalità del valutatore o del decisore o del panel di esperti. I pesi misurano, attraverso valori numerici a-dimensionali, le priorità che si assegnano ai vari aspetti del problema e per tale motivo non hanno un valore assoluto ma relativo. Ciascun indicatore viene moltiplicato per il suo peso prima di essere aggregato agli altri. I metodi generalmente utilizzati per la ponderazione sono: la *Pairwise comparison*; il *Ranking*; il *Rating*.
Nella *pairwise comparison*, i punteggi, su una scala definita *Saaty' scale* (Figura 3), vengono assegnati ad ogni criterio, confrontandolo con tutti gli altri, a coppie.
Generalmente si considera la scala di valutazione che varia da 1 a 9.

Nel Ranking i pesi vengono attribuiti assegnando un ordine di importanza (ordinamento delle variabili, generalmente da parte di un esperto). È un metodo utilizzato quando le variabili non sono numericamente elevate. Nel Rating i pesi vengono assegnati direttamente, sulla base di una scala di punteggio prestabilita (da 1 a 100, da 1 a 1.000, …), ovvero assegnando dei valori arbitrari di importanza e ridistribuendo tra tutti i criteri il punteggio in funzione della somma complessiva.
Il risultato delle operazioni descritte è l'elaborazione di una "Suitability Map", un elaborato grafico che fornisce il "grado di idoneità" del territorio rispetto all'obiettivo prefissato, in funzione dei parametri scelti e su una scala da 0 a 1 (Figura 4).

In Ranking technique, weights are assigned by an importance order (generally made by an expert). This method is used when the variables are not numerically high.

In Rating technique, weights are assigned directly, on the basis of a predetermined rating scale (from 1 to 100, from 1 to 1,000, ...), or by assigning arbitrary values of importance and redistributing among all criteria the score as a function of the total sum .
The process result is the "Suitability Map" that provides the land "compliance degree" with respect to the intended objective, depending on the chosen parameters and on a shared scale (for example from 0 to 1).

Scala di Saaty	
Intensità	Definizione
1	Uguale importanza
2	Da uguale a moderatamente più importante
3	Moderatamente più importante
4	Da moderatamente a molto più importante
5	Molto più importante
6	Da molto a fortemente più importante
7	Fortemente più importante
8	Da fortemente ad estremamente più importante
9	Estremamente più importante

Figura 3 Scala di Saaty

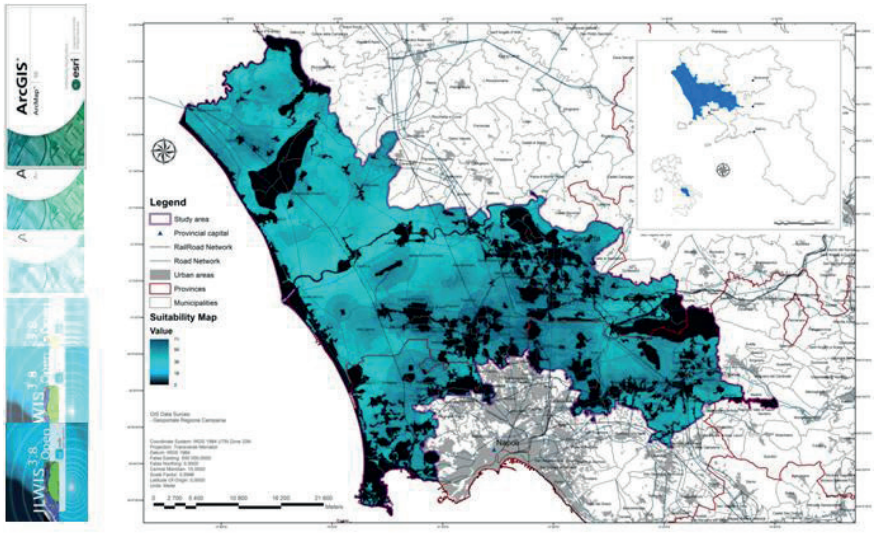
Figure 3. Saaty scale

La *Suitability Map* è generalmente sottoposta a classificazione in funzione di una scala di valori che articola i risultati in poche classi al fine di consentire una rapida individuazione delle aree che realisticamente in tempi brevi hanno maggior idoneità agli obiettivi prefissati (ad esempio alla conversione di uso del suolo). Molti studi fanno riferimento a 5 classi (Geneletti et al., 2007; Comino E. et al., 2014), che descrivono le seguenti condizioni:

1. Irrilevante (value: 0-0,2)
2. Poco rilevante (value: 0,2-0,4)
3. Mediamente rilevante (value: 0,4-0,6)
4. Altamente rilevante (value: 0,6-0,8)
5. Molto altamente rilevante (value: 0,8-1).

The Suitability Map (Fig. 4) is generally subjected to classification in order to allow a rapid identification of areas that are suitable to respond at the targets (e.g. the conversion of land use) in a short-medium time. Many studies refer to 5 classes (Geneletti et al., 2008; Comino E. et al., 2014), describing the following conditions:

1. Irrelevant (value: 0-0,2)
2. Few relevant (value: 0,2-0,4)
3. Medium relevant (value: 0,4-0,6)
4. High relevant (value: 0,6-0,8)
5. Very high relevant (value: 0,8-1).



$$P_i = \sum_{j=1}^{n} (w_j * x_{ij})$$

dove Pi è il risultante valore di plausibilità/suscettibilità al LUC nel pixel i-esimo; n = è il numero delle variabili in input, i è l'indice del pixel, xij indica il valore che la variabile j-esima assume nel pixel i-esimo, e wj sono i pesi della combinazione lineare, normalizzati

where: "Pi" is the resulting LUC plausibility / susceptibility value in the i-th pixel; "n" is the input variables number, "j" is the j-th variable, "xij" indicates the value that the j-th variable assumes in the i-th pixel, "wj" is the weight assigned to the j-th variable

Figura 4. Carta dell'idoneità dei suoli

Figure 4. Suitability Map

Di seguito si riportano, a titolo di esempio, i risultati della costruzione di 3 scenari di LUC nell'ambito del progetto LIFE Ecoremed (Figura 5).

The following figures show results of 3 LUC scenarios building, within the LIFE Ecoremed Project (Fig. 5). Scenario 0 refers to current conditions of the area.

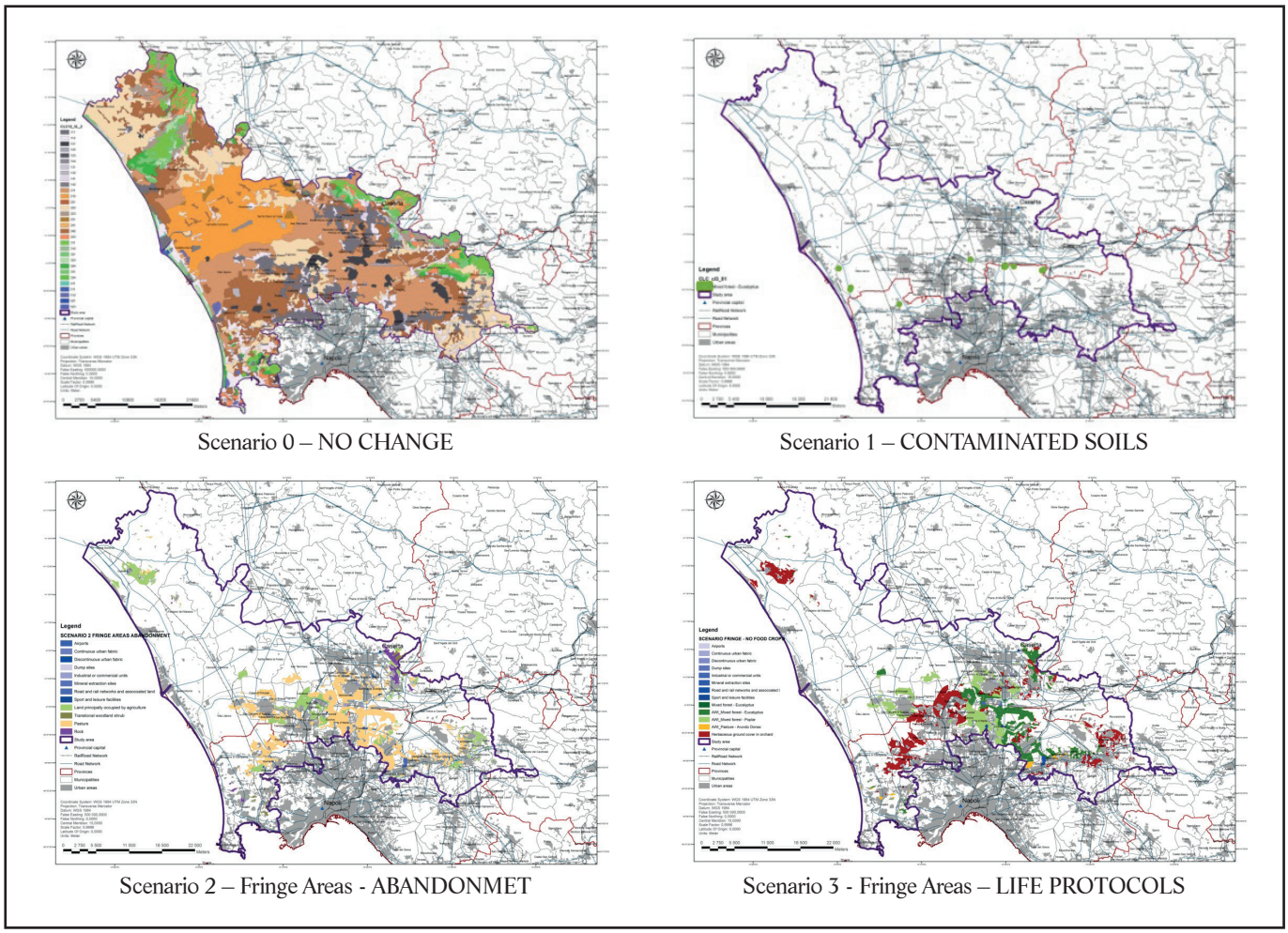


Figura 5. Scenari di cambiamenti di uso del suolo e localizzazione delle aree

Figure 5. LUC scenarios and areas location

LUC scenarios - LUC areas location

Esistono numerosi software che supportano il processo di valutazione multicriteriale descritto. Tra questi, ILWIS (ILWIS 3.8) è un GIS software, open source, dotato di specifico spatial multicriteria evaluation module.

Ecosystem Services

La costruzione di scenari consente la valutazione di differenti scelte e politiche, in termini di sostenibilità e di sviluppo, e la calibrazione degli interventi nel breve-medio termine.

Fin dagli anni ottanta, gli **Ecosystem Services (ES)** sono definiti come "the benefits people obtain from ecosystems" by the Millennium Ecosystem Assessment (MEA, 2003 and 2005), is a shared approach for environment assessment. Il tema è particolarmente di attualità: in base alla EU Biodiversity Strategy to 2020 - Action 5, tutti gli Stati Membri sono tenuti a valutare e mappare lo stato degli ecosistemi e dei loro servizi, nel proprio territorio (Cervelli et al., 2017).

L'importanza (il "valore") degli ecosistemi e dei loro servizi sono espressi di solito in modi diversi: ecologico, socio-culturale ed economico (MEA, 2003). Il valore ecologico comprende lo stato di salute di un sistema; il valore

Ecosystem Services

LUC scenarios allow the evaluation of different choices and political effects, in terms of sustainability and development, and allow the calibration of the interventions in the short to medium term. Since the 80s the **Ecosystem Services (ESs),** defined as "the benefits people obtain from ecosystems" by the Millennium Ecosystem Assessment (MEA, 2003 and 2005), is a shared approach for environment assessment. The topic is particularly relevant according to the EU Biodiversity Strategy to 2020 - Action 5, for which all Member States are obliged to assess and map the state of ecosystems and their services in their territory (Cervelli et al., 2017). ESs are nowadays considered crucial in pursuing conditions of "human well-being, livelihoods quality and efficiency for the human habitat" (Costanza, 1997) and an essential framework applied from scholars and in the field of land-use planning.

The importance ("value") of ecosystems and their services can be expressed in different ways: ecological, socio-cultural and economic (MEA, 2003). The ecological value of a system includes the health state whereas the socio-cultural value comprises the importance that people give, for example, to cultural

socio-culturale comprende l'importanza che le persone danno, ad esempio, all'identità culturale ed al rapporto con i servizi eco sistemici. La valutazione ES in termini economici è sicuramente l'approccio più utilizzato, non solo per valutare gli effetti di strategie di uso del suolo alternative, ma anche per dimostrare e giustificare le esigenze di conservazione della biodiversità (Bayon and Jenkins, 2010; Chan et al., 2007; Comino E. et al., 2014; Costanza et al., 1997; de Groot et al., 2002; Fisher et al., 2009; Ghazoul, 2007a, 2007b; Ridder, 2008; Wallace, 2007; Schneiders A. et al., 2012; Cervelli et al., 2016).

Al fine di effettuare una valutazione economica degli ES si riconoscono due grandi tipo di valore ("valore d'uso" e "valore di non uso", de Groot et al., 2010) e si fa spesso ricorso al concetto del "surrogate market", un ipotetico mercato di servizi e benefici, costituito da un insieme di valori economici (derivati da review da letteratura), che aiutano a definire i servizi ecosistemici associati agli usi del suolo (Scolozzi et al., 2012).

Numerosi sono gli studi che hanno elaborato una definizione ed una quantificazione monetaria degli ES in funzione del tipo di uso/copertura del suolo (Costanza et al., 1997; Willia and Garrod, 1991; Goio et al., 2005; Rein, 1999; Scolozzi et al., 2012). Generalmente, l'approccio economico (Scolozzi et al., 2012) deriva dal benefit transfer method (Costanza et al., 2006) ed associa il valore degli ES ad ogni poligono con specifico uso del suolo, come da Eq. (1):

$$VSE_{i,k} = A_k \text{ *•} w_i\,(LC) \text{ *•} v_i\,(LC) \qquad (1)$$

In cui VSEi,k è il valore (D/year) degli i-ES per un definito k-poligono di un uso del territorio, Ak è l'area del k-poligono (ha), wi è un coefficiente [0,1] per il valore dell' i-ES dello specifico LU, in funzione delle variabili del contesto, v_i costituisce il valore monetario dell' i-ES per una definita classe di uso del suolo).

A titolo esemplificativo, si riporta la tabella con i valori utilizzati nell'ambito del Progetto LIFE Ecoremed, in cui si fa riferimento a sette tipi di uso del suolo (terreni agricoli, pascoli, foreste, aree urbane, suoli nudi, verde urbano, zone umide ed acque salate e dolci), cui è stata integrata, per esigenze progettuali, un'ulteriore classe, quella dei frutteti inerbiti. Per ogni classe di copertura del suolo sono stati definiti i valori relativi ai diversi ES, integrando i dati elaborati da Scolozzi et al., (2012) (aggiornandoli e contestualizzandoli alle specifiche condizioni dell'area ed alle esigenze progettuali), con le classi del Corine Land Cover 2012 e con le classi degli Scenari di LUC costruiti (Figura 6).

Accanto alla valutazione monetaria degli ES, di cui è stato descritto uno dei possibili approcci, sono stati sviluppati, in ambito scientifico, diversi strumenti (modelli e software) di modellazione e valutazione degli ES: Ecometrix, InVEST, ARIES, MIMES.

Tra i vari strumenti che supportano l'attività del pianificatore nella definizione degli ES, InVEST, in particolare, è generalmente riconosciuto il più sensibile alle minori modificazioni di produttività ed il più rilevante per la definizione di politiche ambientali e di meccanismi di compensazione/remunerazione degli ES (LIFE, Making good

identity and to ecosystem services relationship. The monetary valuation of ESs is certainly the most widely used approach. It allows not only to assess the effects of land use change alternatives, but also to demonstrate and justify the conservation of biodiversity needs (Costanza et al., 1997; de Groot et al., 2002; Fisher et al., 2009; Cervelli et al., 2016b).

In order to perform the ESs monetary valuation, one should distinguish two major types of value: "value in use" and "value of non-use". The definition of "surrogate market" is provided as a hypothetical services and benefits market, consisting of a set of economic values derived from the literature review, which help define the ecosystem services expressed by land use classes.

Many studies developed a ES definition and a monetary quantification, according to the type of use / land cover. In Italy a useful reference of ESs monetary values is provided by Scolozzi et al., 2012, using a database updated to 2004 that integrates various economic variables (willingness to pay, travel costs, avoided costs, etc.), and international studies. Generally, the economic approach derived from the benefits transfer method links the value of ESs to each land use class polygon, as Eq. (1):

$$VSE_{i,k} = A_k \cdot w_i\,(LC) \cdot v_i\,(LC) \qquad (1)$$

where VSEi,k is the value (€/year) of i-ES for a k-polygon of a defined land use, Ak is the k-polygon area (ha), wi is a coefficient [0,1] for i-ES and specific LC, v_i stands for monetary value of i-ES for defined LC (€/ha) (Scolozzi et al., 2012).

Fig 6 reports the ESs monetary values used within the LIFE Ecoremed Project. They refers to seven land use classes from the Corine Land Cover (farmland, pastures, forests, urban areas, bare soil, urban green wetland and salty and sweet water) and the additional class, herbaceous ground cover in orchard, considered in order to match specific project requirements. For each land cover class, ESs values were defined, integrating data processed by Scolozzi et al., 2012 (updating them and setting them to the specific conditions of the area and the design requirements), with classes of Corine Land Cover 2012 and with LUC classes sorted from scenarios building (Fig. 6).

The ESs monetary assessment is one of the possible approaches devoted to LUC assessment. Other tools concerning the use of models and software for ESs modeling and valuation are the following: Ecometrix, Invest, ARIES, MIMES.

InVEST is generally considered suitable to establish environmental policies and ESs compensation/remuneration mechanisms (LIFE, Making good Nature, 2013). This software highlights the close connection between ecosystems variation and the resulting impacts on well-being of wildlife population. The objective is to provide information about changes in ESs provision sorted out from LUC scenarios and political choices and to support policy makers in the alternatives evaluation.

The InVEST toolset allows the quantification and spatial allocation of benefits deriving from terrestrial, marine and freshwater ecosystems. The module is organized

Natura, 2013). InVEST, in particolare, evidenzia la stretta connessione tra variazione degli ecosistemi e impatti di tali variazioni sul benessere della popolazione. Obiettivo di InVESt è di fornire informazioni sulle eventuali variazioni degli ES, in funzione di LUC ipotizzati e scelte politiche e trova sempre maggiore applicazione in sede di governo del territorio e quale strumento di supporto al decisore politico.

Il toolset di INVEST consente di quantificare e mappare i benefici derivabili dai sistemi terrestri, marini e di acqua dolce. Invest è organizzato secondo 3 tre categorie principali: 1) servizi di supporto – ovvero alla base di altri servizi eco sistemici, ma che non forniscono direttamente i benefici alle persone; 2) servizi finali – che forniscono benefici diretti alle persone e si distinguono generalmente in fornitura biofisica e servizio alle persone; e 3) strumenti per facilitare le analisi di servizi eco sistemici – quali analisi di sovrapposizione.

In particolare, il modulo Habitat Quality del software InVEST permette di sintetizzare le valutazioni attraverso un parametro a-dimensionale, rappresentativo della qualità degli habitat, in una scala tra 0 e 1, ovvero del valore ecosistemico espresso dal territorio in funzione degli usi del suolo presenti e delle minacce (con relativa fascia di impatto e legge di decadimento) individuate.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti nell'ambito del progetto, con il modulo Habitat Quality di InVEST (Figura 7).

according to three main categories: 1) support services, not providing direct benefits to the people; 2) final services - that provide direct benefits to the people, distinguished in biophysics and delivery service; 3) tools to facilitate the analysis of ecosystem services such as the overlap analysis.

Among others the Habitat Quality module of InVEST allows to synthesize LUC assessment in terms of habitats quality with dimensionless parameter in a scale ranging from 0 to 1. The ecosystem value so expressed is dependant from land use class and threats (considered with their impacts range and decay law) identified.

The following figures below show the results obtained with the InVEST Habitat Quality (Fig. 7) in the case of LIFE Ecoremed project.

ES assessment classes	CLC12 Level 1 classes	CLC12 Level 2 classes	ES monetary values updated to 2014 (€/ha per years)
Fresh-water	Water bodies	Inland waters - Marine waters	3 290,24
Cropland	Agricultural areas	Permanent crops - Arable land - eHterogeneous agricultural areas	1 980,02
Pastures	Agricultural areas	Pastures	125,61
	Forest and semi natural areas	Scrub and/or herbaceous vegetation associations	
Forest	Forest and semi natural areas	Forests	6 060,03
Rock	Forest and semi natural areas	Open spaces with little or no vegetation	-
Urban	Artificial surfaces	Mine, dump and construction sites - Industrial, commercial and transport units - Urban fabric	-
Urban green	Artificial surfaces	Artificial, non-agricultural vegetated areas	5 556,84
Fresh-water wetland	Wetlands	Inland wetlands	18 195,82
Herbaceous grand cover in orchard (by authors)	Agricultural areas	Permanent crops - Heterogeneous agricultural areas (Annual crops associated with permanent crops in Level 3)	2 105,63

Figura 6. Valori economici dei servizi ecosistemici.

Figure 6. ES Monetary values

Valutazione dell'impatto sulla fauna selvatica

Nel governo del territorio, per confrontare gli effetti prevedibili per effetto di politiche differenti e di diversi scenari di LUC, la valutazione d'impatto sulla fauna selvatica è un ulteriore elemento a supporto del decisore, nell'ambito della valutazione complessiva dell'impatto ambientale. *Mid term EU's biodiversity strategy* (Feb 2th 2016) evidenzia l'importanza della tutela della biodiversità in Europa, non solo in termini etici, ma anche per il valore intrinseco della perdita di biodiversità, stimato in 50 miliardi di euro l'anno.

Tra gli approcci per valutare gli impatti di LUC sulla biodiversità, generalmente si fa riferimento a valori a-dimensionali, che pongono in evidenza le variazioni di condizioni tra i diversi scenari. Tali variazioni possono essere studiate attraverso modelli deduttivi o induttivi o attraverso l'approccio tipico della VIA (Valutazione di Impatto ambientale).

Nei modelli induttivi si parte da un set di localizzazioni per identificare le condizioni ottimali per una specie e stimarne

Wildlife impact assessment

To compare the effects exerted by different policies and/or LUC scenarios, the wildlife impact assessment is a further element of the overall environmental impact assessment for supporting decision-making process. Midterm EU's biodiversity strategy (Feb 2th 2016) highlights the importance of biodiversity protection in Europe, not only in ethical terms, but also with respect to the intrinsic value of biodiversity loss, estimated at 50 billion Euros per year.

Approaches devoted to LUC impacts assessment on biodiversity are generally based on dimensionless values referring to biodiversity changes of conditions under different scenarios. Changes assessment can be studied through deductive or inductive methods or with indexes calculation.

In the inductive models a set of locations is delineated to identify optimal conditions for the single species and thus estimating its probability of occurrence over wide area (Russo and Sulli, 2011). Some of this type

Figura 7. Qualità degli habitat (Scenari InVEST)

Figure 7. InVEST scanarios - Habitat Quality

così la probabilità di occorrenza su un'area ampia (Russo and Sulli, 2011). Nell'ambito di quest'ultima categoria di modelli, ne esistono di classici, basati su dati di presenza/assenza (regressione logistica, analisi discriminante, reti neurali, modelli generalizzati lineari o modelli generalizzati additivi), e di più recenti (Ecologica Niche Factor Analysis ENFA, Maxent di Massima Entropia), che offrono il vantaggio di basarsi solo su dati di presenza, pur se di elevata qualità, in modo da generare funzioni statistiche o regole di discriminazione che possano classificare correttamente l'idoneità ambientale (Guisan e Zimmerman, 2000; Phillips et al., 2006; Phillips and Dudìk, 2008).

Accanto a modelli induttivi, sono stati sviluppati modelli deduttivi; questi ultimi si basano sul giudizio di esperti, pubblicazioni e informazioni condivise. In particolare, i modelli deduttivi trovano larga applicazione nell'individuazione delle regioni più idonee per una data specie.

Le ricerche sull'ecologia animale hanno da tempo messo in evidenza la stretta interconnessione esistente tra gli animali e le caratteristiche ecologiche all'interno dei singoli ecosistemi. Tra le caratteristiche ambientali e territoriali utili per la definizione dei contesti più idonei ad ospitare determinate specie di fauna selvatica, utili parametri fanno riferimento all'areale (distribuzione geografica della specie, home range, …), alle condizioni di Habitat (caratteri fisici quali altimetria, orografia; caratteri climatici quali temperature e piovosità, interazione con altri elementi paesaggistici naturali e/o artificiali), alla nidificazione (caratteri specifici delle aree di nidificazione), alle abitudini alimentari (specie vegetali e loro distribuzione spaziale, specie animali e loro distribuzione spaziale, …), all'interazione con altre specie animali (predazione, simbiosi, parassitismo) all'interazione con specie vegetali (fonte trofica, …), all'interazione con l'antropico (agricoltura: pesticidi, fertilizzanti, lavorazioni, usi del suolo agricolo, …; urbanizzato: centri abitati, rete della mobilità, infrastrutture del territorio, …; industria: scarichi ed emissioni, …), al paesaggio (siepi, frammentazione).

Definite le caratteristiche ambientali significative per ciascuna specie, vengono elaborate specifiche tavole raster per ciascun aspetto. L'approccio mediante valutazione multicriteriale ed il supporto di esperti, consentono di sintetizzare le informazioni, con opportune operazioni di standardizzazione dei valori e ponderazione dei parametri, in modo da ottenere le tavole di possibile distribuzione/spazializzazionie della specie. Data la complessità delle elaborazioni, di solito tale metodologia viene applicata allo studio di mirate specie di fauna selvatica, significative per un determinato territorio per rarità, ruolo, … (Figura 8).

Noti i fattori ambientali che determinano la distribuzione spazio-temporale degli animali è possibile formulare ipotesi sugli effetti che eventuali cambiamenti dell'ambiente possono avere sulle comunità di fauna selvatica, sia in termini di struttura delle comunità che di distribuzione sul territorio.

Le elaborazioni sulla possibile distribuzione nel territorio di determinate specie di fauna selvatica diventa un utile supporto in termini di pianificazione e progettazione degli interventi, in quanto consente di ipotizzare, a monte del processo decisionale, gli ambiti di possibile conflitto/

of models are classical ones based on presence/absence data (logistic regression, discriminant analysis, neural networks, generalized linear models and generalized additive models). On the other hand, more recent models (Ecological Niche Factor Analysis ENFA, Maximum Entropy) offer the advantage of relying solely on actual data, although of high quality, to generate statistical functions or discrimination rules that can properly classify the environmental suitability (Russo and Sulli, 2011).

Deductive models have been developed together with inductive models. First ones are based on experts judgment, on shared knowledge, and on literature data. In particular, the deductive models are widely used in the identification of the most suitable regions for a given species.

For a long time, studies on wildlife ecology have highlighted the close interconnection between animals and ecological characteristics within individual ecosystems. Parameters useful to define suitable areas for wildlife species are species range (geographical distribution of home range, ...), habitat conditions (physical characteristics such as altimetry , topography, climatic features, temperature and rainfall, interaction with other natural and/or artificial landscape elements, ...), nesting (specific characteristics of the nesting areas), eating habits (plant species and their spatial distribution, species and their spatial distribution, ...), interaction with other species (predation, symbiosis, parasitism), interaction with plant species (trophic source, ...), interaction with the anthropic (agriculture: pesticides, fertilizers, processing, use agricultural land, ...; urbanized population centres, mobility, network, local infrastructure, ...; Industry: discharges and emissions, ...), interaction with landscape (hedges, fragmentation, ...).

Once environmental characteristics meaningful for each species are defined, singular raster maps are processed for each one of them. The approach through multi-criteria analysis and panel of experts, allows synthesizing all gathered data , standardizing and weighting parameters, so as to obtain maps of likely distribution / spatialization of the species. Usually this methodology is applied to the study of targeted species of wildlife (Fig. 8), relevant to a given territory for rarity, role, etc. given the processing complexity.

Once the environmental factors governing the spatial and temporal distribution of animals are known, it is possible to formulate hypotheses on the effects that any environment changes may exert on wildlife communities, in terms of both community structure and distribution in the territory.

The potential distribution maps (of certain wildlife species) become a useful support in terms of planning and design for interventions. Upstream of the decision-making process, it allows to identify areas of possible conflict / overlap between the specific species, and the project interventions. This assessment is the basis for any corrective, preventive and mitigation measures.

The figures below show some wildlife possible

Figura 8. Specie selezionate per verificare i possibili ambiti di presenza

Figure8. Wildlife species selected to match possible ranging areas

sovrapposizione tra la singola specie e gli interventi di progetto. Tale valutazione è alla base di eventuali preventive misure correttive e di mitigazione.
Di seguito si riportano, alcune elaborazioni sulla possibile distribuzione di alcune specie di fauna selvatica e le aree di sovrapposizione con gli scenari di LUC del progetto (Figura 9).

Un ulteriore metodo di valutazione dei possibili impatti dei cambiamenti di uso sulla fauna selvatica fa riferimento all'approccio proprio delle Valutazioni di Impatto Ambientali (VIA): supponendo che gli habitat interagiscono con la percezione ed il comportamento degli organismi che li occupano, in modo da guidare l'evoluzione di una popolazione e lo sviluppo di una comunità, il mantenimento della biodiversità e dello stato di conservazione/salute degli ecosistemi, nella struttura del paesaggio, divengono uno strumento essenziale per sostenere una pianificazione attenta ai temi ecologici e ambientali.
Queste ultime metodologie si basano generalmente su indicatori. L'obiettivo è la quantificazione degli effetti delle azioni previste dal progetto (anche mediante la loro categorizzazione in classi d'impatto) su tutta la componente faunistica (fauna vertebrata), sui singoli gruppi sistematici e sulle singole specie.
L'uso di indici è molto utile nelle situazioni in cui non sia possibile effettuare un campionamento sistematico di tutti i gruppi interessati (ad esempio per una grande estensione del territorio) e si debbano utilizzare dati bibliografici (da atlanti, pubblicazioni, ricerche già effettuate). Tale metodo permette di abbracciare la totalità a delle specie potenzialmente presenti valutandone sommariamente il possibile vantaggio o svantaggio dovuto al LUC. La sommatoria degli effetti generici sulle singole specie permette una valutazione generale degli effetti sull'intera componente faunistica tetrapode. L'indice permette anche la valutazione differenziale per gruppi sistematici in modo da evidenziare se esistano maggiori pressioni a carico di uno di essi in particolare.
Uno dei possibili metodi, prevede l'utilizzo di matrici che calcolino i valori numerici indicanti il possibile miglioramento o peggioramento delle condizioni di partenza per un gran numero di specie (Indice di Valutazione Specifico) e valutino quindi un miglioramento o peggioramento

distribution map and the overlapping areas with the LUC scenarios of the project (Fig. 9).
An additional method of assessment of the LUC possible impacts on wildlife, refers to Environmental Impact Assessments (EIA): assuming that habitats interact with the perception and behaviour of wildlife species living here, and drive the population evolution and the community development, the biodiversity maintenance and the conservation of ecosystems / health, in landscape structure, become an essential tool to support careful planning to ecology and environmental issues.
These methods are generally based on indices. The goal is to quantify the effects of the project actions (including by categorizing into impact classes) across the faunal component (vertebrates), on individual taxonomic groups and individual species.
Indexes are very useful in situations where a systematic sampling of all relevant groups cannot be made (for example to a great extent of the territory) and bibliographic data should be used (from atlases, publications, searches). This method allows to embrace the totality of the species potentially present providing in first instance possible advantage or disadvantage due to LUC. The index also enables the systematic groups to be assessed distinctly in order to highlight whether there are specific threats.
One of the possible methods involves the use of matrices to compute the numerical values indicating the possible improvement or worsening of the starting conditions for a large number of species (Evaluation Specific). These matrices evaluate then an improvement or worsening of the wildlife components all together (LUC Sensitivity Index).

The Sensitivity Index is derived from further sub-indices calculation. These sub-indices refer to the environment characteristics, to the relationship between the single species and the environment, to the characteristics of individual species. Some examples of sub-indices, in particular those used in the Life ECOREMED project are (Cervelli et al, 2017):

- Habitat Index (HI) measures the suitability of an area for the species. It is calculated through the natural logarithm of the surface (in hectares) of each

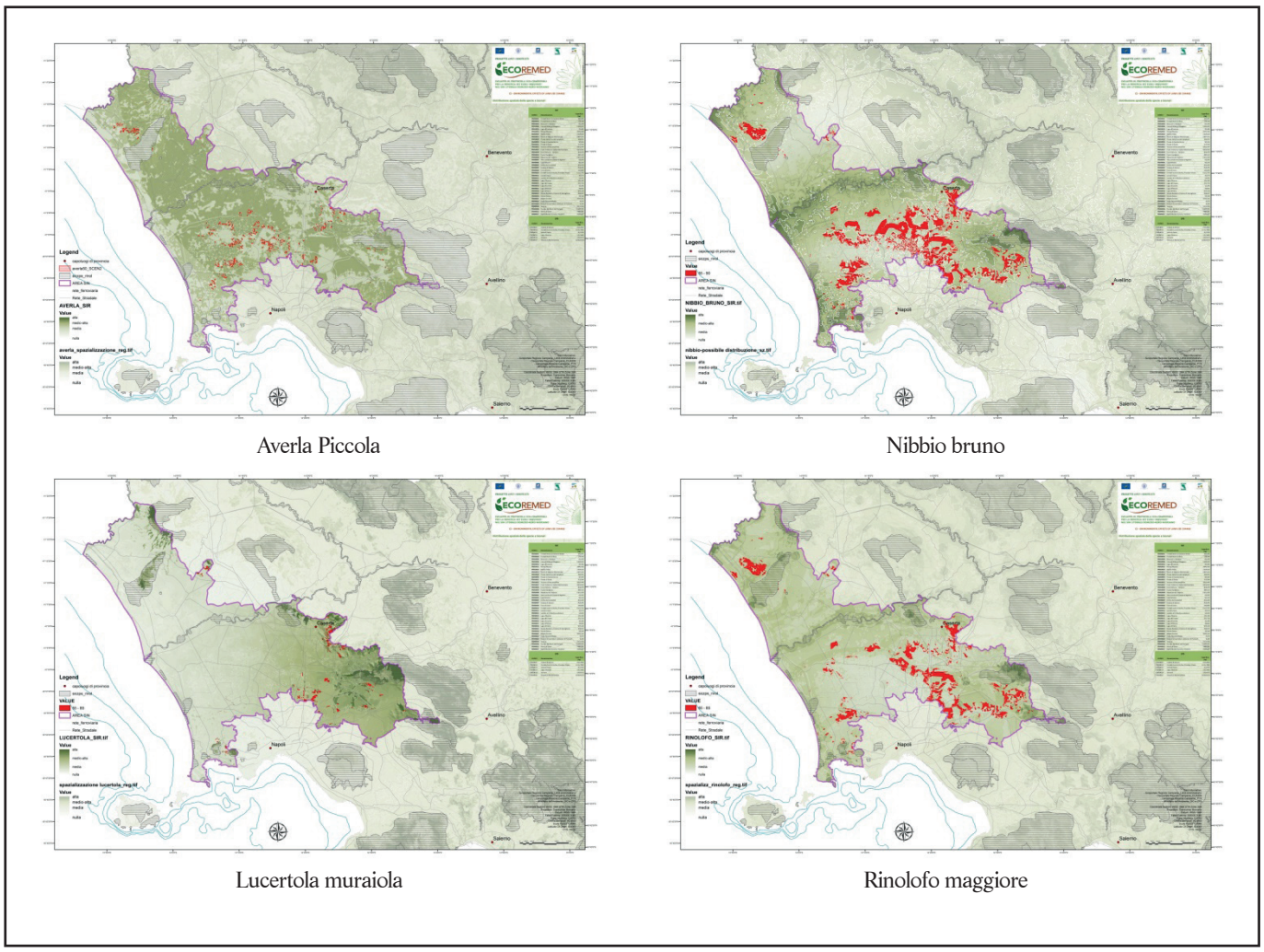


Figura 9. Aree delle specie selvatiche e aree marginali

Figure 9. Wildlife species areas and Fringe areas

delle componenti faunistiche analizzate nel complesso (Indice di Sensibilità al LUC).

L'indice di Sensibilità deriva dal calcolo di ulteriori sotto-indici, che fanno riferimento alle caratteristiche dell'ambiente, al rapporto tra la singola specie e l'ambiente, alle caratteristiche delle singole specie. Alcuni esempi di sotto-indici, nello specifico quelli utilizzati nel progetto Life ECOREMED sono:

- Indice di Habitat (IH) che misura l'idoneità del territorio per la specie. Si calcola attraverso il logaritmo naturale della superficie in ettari di ogni categoria ambientale (Ai) moltiplicata per un fattore di elezione per la specie di quel particolare habitat (wi). Il logaritmo viene utilizzato per mantenere i risultati maggiormente confrontabili anche con grandi differenze di superficie.

$$IH = \sum_{i=1}^{N} ln(A_i * w_i)$$

  Il grado di elezione di un determinato habitat per la specie viene assegnato sulla base della bibliografia disponibile e sulla base delle conoscenze di esperti.
- Indice di permeabilità (IP) che indica la permeabilità del territorio per una specie. Si calcola considerando l'estensione e la frammentazione degli habitat che consentono maggiore mobilità alla specie, sempre in rapporto al fattore di elezione di quel particolare habitat

environmental category (A_i) multiplied by a election factor (w_i) for the species of that particular habitat. The logarithm used to maintain the most comparable results even with large differences in area is:

$$IH = \sum_{i=1}^{N} ln(A_i * w_i)$$

The degree of election factor (w_i ranging from 1 to 3) of a given habitat for the species is assigned on the basis of the available literature (Guarino et al., 2012; Lanza, 2009; Beaman2010; Cramp and Simmons, 1977, 1980 e 1983, Cramp, 1985, 1988, e 1992, Cramp and Perrins, 1993, 1994a e 1994b; Spagnesi e De Marinis, 2002) and based on the knowledge of experts.

- Permeability Index (PI) indicates land permeability for each species. It is calculated considering the extension and fragmentation of habitats that allow greater mobility to the species, always in relation to the election factor (w_i) of that particular habitat for the species. Land fragmentation, can be measured as the ratio of the total patch perimeter (which constitute a specific environmental category) and the perimeter of a circle of area equal to its total area. Small values indicate big or branched little patches,

per la specie.
La frammentazione del territorio, può essere misurata come il rapporto tra il perimetro complessivo dei patch che costituiscono una determinata categoria ambientale e il perimetro di un cerchio di area uguale alla sua superficie complessiva. Valori piccoli indicano patch grandi e poco ramificati, valori grandi indicano invece patch piccoli e sparsi sul territorio.

$$IP = \sum_{i=1}^{N} \frac{A_i}{k_i} * w_i$$

- Indice di Conservazione (IC) che rappresenta l'importanza della specie dal punto di vista conservazionistico. Varia da uno a cinque a seconda che la specie rientri in una o più categorie che indicano rilevanza per la conservazione.
- Indice di Rarità (IR) che rappresenta la rarità della specie sul territorio, indicata in modo qualitativo con un valore continuo compreso tra uno e cinque. Il valore generalmente è assegnato secondo i criteri specificati di seguito:
  - Per tutte le componenti faunistiche, Formulari standard dei SIC e ZPS dell'area, Dati IUCN Italia
  - Per gli Uccelli nidificanti, Monitoraggio Italiano Ornitologico (MITO 2000) (frequenza nei punti d'ascolto effettuati nel progetto); Dati Ornitho (progetto di monitoraggio degli uccelli tramite liberi avvistamenti e segnalazioni)
  - Per gli Uccelli svernanti, Dati Ornitho (progetto di monitoraggio degli uccelli tramite liberi avvistamenti e segnalazioni); International Waterbird Census (IWC ISPRA) (frequenza nei censimenti coordinati da ISPRA nelle aree umide italiane); Dati Ornitho
  - Per gli Uccelli di passo, Dati Ornitho
  - Per Rettili e Anfibi, Dati Ornitho (progetto di monitoraggio erpetofauna e batracofauna tramite liberi avvistamenti e segnalazioni).

Ottenuti i valori dei sottoindici soggetti a variazione (indici di idoneità ambientale e di permeabilità) si definiscono le variazioni ricalcolando gli stessi per ogni diverso scenario ipotizzato. Le variazioni percentuali definiscono due nuovi indici che, categorizzate in sette fasce rappresentano l'Indice Differenziale di Habitat (IDH) (differenza tra i valori di idoneità ambientale (IH) e l'Indice Differenziale di Permeabilità (IDP) (differenza dei valori di permeabilità (IP) modificati secondo la sensibilità della specie alla frammentazione). Il confronto matematico dei due indici (K) mostra se esista un'influenza del LUC di qualunque tipo sulla specie.

$$K = (IDH - 4) + (IDP - 4)$$

L'indice di Sensibilità permette di avere la valutazione finale dell'esistenza o meno di un impatto generale sulle componenti faunistiche analizzate facendo un bilancio di vantaggi e svantaggi ottenuti per le singole specie. Per il calcolo dell'IS viene generalmente attribuito a ogni specie un valore numerico, ad esempio, come nel caso del progetto Life ECOREMED, compreso tra -3 e +3, a seconda

big values indicate rather small patches scattered throughout the territory:

$$IP = \sum_{i=1}^{N} \frac{A_i}{k_i} * w_i$$

- Conservation Index (CI) represents importance of species, from the conservation point of view. It varies from one to five, depending on the species that falls within one or more categories, which indicate conservation relevance.
- Rarities Index (RI), indicates qualitatively rarity of the species on the territory ranging from one to five. The value is generally assigned according to the criteria specified below:
  - for all faunal components, data from International Union for Conservation of Nature (IUCN) Italy were used; also standard templates of SCIs and SPAs area were used as the data concerning the number of species sightings;
  - for the breeding birds, data from Italian Ornithological Monitoring (MITO 2000) and data from Ornitho (www.ornitho.it) were used;
  - for wintering birds, data from Ornitho database and International Waterbird Census (IWC ISPRA) were used;
  - for passing migrating birds, data from Ornitho database were used;
  - for reptiles and amphibians, data from Ornitho database (regarding herpetofauna monitoring project and batracofauna) were used.

The sub-indices values, subject to change (habitat suitability indices and permeability - HI and PI) are evaluated for each scenario. The ratio between HI calculated for one scenario and the HI calculated for scenario 0, expressed as a percentage, identify new values, named HDI. The same approach have been used for calculating PDI, starting from PI value.

A comparison between the two indexes (K) shows whether there is an influence of the LUC of any type on the species. The Valuation Specific Index (VSI) can be evaluated on the value of K.

$$K = (IDH - 4) + (IDP - 4)$$

The Sensitivity Index allows the final evaluation of general LUC impact on faunal components by a balance of advantages and disadvantages obtained for individual species. For the calculation of the SI it is generally attributed to each species a numerical value, for example, as in the case of Life ECOREMD project, between -3 and +3. The Sensitivity Index is the pure sum of all the values obtained:

$$IS = \sum_{i=1}^{N} IVS_i$$

where *i* indicates the i-th species of the N total species number analyzed.
The sum of all scores gives a value between three times the number of species in the negative and three times the number of species in the positive. These values are

della categoria di vantaggio-svantaggio risultante dall'IVS. L'Indice di sensibilità è la pura sommatoria di tutti i valori così ottenuti:

$$IS = \sum_{i=1}^{N} IVS_i$$

dove *i* indica la specie i^{esima} del totale delle specie analizzate N. La somma di tutti i punteggi ci dà un valore compreso tra tre volte il numero delle specie in negativo e tre volte il numero delle specie in positivo. Questi valori sono irraggiungibili nella realtà, in quanto è infatti altamente improbabile che possa esistere una situazione ambientale in cui tutte le specie abbiano forte svantaggio o viceversa forte vantaggio. Ci sarà sempre un certo numero di specie che si avvantaggeranno, mentre altre saranno svantaggiate e altre ancora non verranno influenzate affatto. In ogni caso i due valori estremi possono essere presi come riferimento per realizzare un indice confrontabile in tutte le situazioni di valutazione e con qualunque numero di specie immesse nell'analisi. Tale indice confrontabile si ottiene trasformando il risultato in percentuale rispetto ai possibili punteggi estremi (Indice di Sensibilità percentuale (IS%). Poichè la forbice di tali punteggi estremi corrisponde a sei volte N e l'insieme dei valori positivi o negativi corrisponde a 3N, la formula per il calcolo di IS% sarà:

$$IS\% = \left(\frac{IS + 3N}{6N} - 0.5\right) * 100$$

dove N indica il numero delle specie analizzate.
Il risultato esprime quanto si discosti l'indice in percentuale dalla condizione di partenza (IS% = 0) sia in positivo che in negativo, dando un indicazione immediata e di facile lettura.
In pratica l'indice esprime quanta parte delle specie incluse nell'analisi raggiungono il massimo vantaggio o svantaggio dal mutamento delle condizioni ambientali. A titolo di esempio si riportano i risultati delle valutazioni effettuate per l'area SIR del Progetto Life Ecoremed, attraverso la metodologia descritta. Tali risultati hanno evidenziato la necessità di integrare diversi approcci metodologici al fine di mitigare il più possibile gli impatti derivanti dai LUC, sulle componenti faunistiche ed ecosistemiche.

unattainable in reality: it is indeed highly unlikely that all species have all a strong disadvantage or vice versa a strong advantage in order to environmental conditions changes. There will always be a number of species that will obtain benefits, while others will be disadvantaged and others will not be affected at all. In any case the two extreme values can be taken as a reference to achieve a comparable index in all the evaluation situations and with any number of species entered in the analysis. Such comparable index is obtained by transforming the result as a percentage compared to the possible extreme scores (Percent Sensitivity Index - SI%). Because of the gap of such extreme scores corresponds to six times N and because of the set of positive or negative values corresponds to 3N, the formula for the calculation of SI% will be:

$$IS\% = \left(\frac{IS + 3N}{6N} - 0.5\right) * 100$$

Where N is the number of analysed species.
The result expresses how deviates, in percentage, the index from the starting condition (SIS = 0%) in both positive and negative, giving an immediate indication and easy to read.
In practice, the index expresses how much of the species included in the analysis reach the maximum advantage or disadvantage by the change of environmental conditions.
As an example, we report the results of the assessments carried out for SIR area of the Life Ecoremed Project, through the described methodology.

These results highlighted the need to integrate different methodological approaches in order to mitigate, as much as possible, the LUC impacts on wildlife and ecosystem components.

Bibliografia
Bojórquez-Tapia, L.A., Sánchez-Colon, S., Florez, A. 2005. Building consensus in environmental impact assessment through multicriteria modeling and sensitivity analysis. Environmental management. 36(3), 469-481.

Cervelli, E., Micheletti, S., Rigillo, M. 2016. 2016a. Proactive Risk Management and Integrated Knowledge for the Governance of Urban Systems: Urban Vulnerability in the Case of Gran Santo Domingo. Procedia-Social and Behavioral Sciences. 223, 750-757.

Cervelli, E., Pindozzi, S., Capolupo, A., Okello, C., Rigillo, M., Boccia, L. 2016. 2016b. Ecosystem services and bioremediation of polluted areas. Ecological Engineering 87 (2016), 139-149. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.045

Cervelli, E., Pindozzi S., Sacchi M., Capolupo A., Cialdea D., Rigillo M., Boccia L. 2017. Supporting land use change assessment through Ecosystem Services and Wildlife Indexes. Land Use Policy 65C. 249-265. 10.1016/j.landusepol.2017.04.01

Comino, E., Bottero, M., Pomarico, S., Rosso, M. (2014). Exploring the environmental value of ecosystem services for a river basin through a spatial multicriteria analysis. Land use policy, 36, 381-395.

Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M. 1997. The value of the World's Ecosystem Services and Natural Capital. Nature. 387, 253–260.

Crafts, N., Toniolo, G. 1996. Economic growth in Europe since 1945. Cambridge University Press.

de Groot, R.S., Alkemade, R., Braat, L., Hein, L., Willemen, L. 2010. Challenges in integrating the concept of ecosystem services and values in landscape planning, management and decision making. Ecological complexity. 7(3), 260-272.

de Groot, R.S., Wilson, M.A., Boumans, R.M. J. 2002. A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. Ecol. Econ. 41, 393–408.

European Environment Agency (EEA). 2009. Available at the following web site: http://www.eea.europa.eu/it/themes/scenarios/intro.

Ferretti, V., Bottero, M., Mondini, G. 2014, June. An integrated approach for exploring opportunities and vulnerabilities of complex territorial systems. In International Conference on Computational Science and Its Applications. Springer International Publishing. 667-681.

References
Bojórquez-Tapia, L.A., Sánchez-Colon, S., Florez, A. 2005. Building consensus in environmental impact assessment through multicriteria modeling and sensitivity analysis. Environmental management. 36(3), 469-481.

Cervelli, E., Micheletti, S., Rigillo, M. 2016. 2016a. Proactive Risk Management and Integrated Knowledge for the Governance of Urban Systems: Urban Vulnerability in the Case of Gran Santo Domingo. Procedia-Social and Behavioral Sciences. 223, 750-757.

Cervelli, E., Pindozzi, S., Capolupo, A., Okello, C., Rigillo, M., Boccia, L. 2016. 2016b. Ecosystem services and bioremediation of polluted areas. Ecological Engineering 87 (2016), 139-149. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.045

Cervelli, E., Pindozzi S., Sacchi M., Capolupo A., Cialdea D., Rigillo M., Boccia L. 2017. Supporting land use change assessment through Ecosystem Services and Wildlife Indexes. Land Use Policy 65C. 249-265. 10.1016/j.landusepol.2017.04.01

Comino, E., Bottero, M., Pomarico, S., Rosso, M. (2014). Exploring the environmental value of ecosystem services for a river basin through a spatial multicriteria analysis. Land use policy, 36, 381-395.

Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M. 1997. The value of the World's Ecosystem Services and Natural Capital. Nature. 387, 253–260.

Crafts, N., Toniolo, G. 1996. Economic growth in Europe since 1945. Cambridge University Press.

de Groot, R.S., Alkemade, R., Braat, L., Hein, L., Willemen, L. 2010. Challenges in integrating the concept of ecosystem services and values in landscape planning, management and decision making. Ecological complexity. 7(3), 260-272.

de Groot, R.S., Wilson, M.A., Boumans, R.M. J. 2002. A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. Ecol. Econ. 41, 393–408.

European Environment Agency (EEA). 2009. Available at the following web site: http://www.eea.europa.eu/it/themes/scenarios/intro.

Ferretti, V., Bottero, M., Mondini, G. 2014, June. An integrated approach for exploring opportunities and vulnerabilities of complex territorial systems. In International Conference on Computational Science and Its Applications. Springer International Publishing. 667-681.

Fisher, B., Turner, R.K., Morling, P. 2009. Defining and classifying ecosystem services for decision making. Ecol. Econ. 68, 643–653.

Gbanie, S.P., Tengbe, P.B., Momoh, J. S., Medo, J., Kabba, V.T.S. 2013. Modelling landfill location using geographic information systems (GIS) and multi-criteria decision analysis (MCDA): case study Bo, Southern Sierra Leone. Applied Geography. 36, 3-12.

Geneletti, D., van Duren, I. 2008. Protected area zoning for conservation and use: A combination of spatial multicriteria and multiobjective evaluation. Landscape and urban planning. 85(2), 97-110.

Gobattoni, F., Pelorosso, R., Leone, A., Ripa, M. N. (2015). Sustainable rural development: The role of traditional activities in Central Italy. Land Use Policy, 48, 412-427.

Herzog, T.R., Herbert, E.J., Kaplan, R., Crooks, C.L. 2000. Cultural and developmental comparisons of landscape perceptions and preferences. Environ. Behav., 32 (3) (2000), pp. 323–346 http://dx.doi.org/10.1177/0013916500323002

Leone, A. 2011. Ambiente e Pianificazione, Analisi processi e sostenibilità. Franco Angeli, Milano, Italy.

Malczewski, J., 2006. GIS-based multicriteria decision analysis: a survey of the literature. International Journal of Geographical Information Science. 20(7), 703–726.

Millenium Ecosystem Assessment (MEA). 2003. Ecosystems and Human Well-being: A Framework for Assessment. Island. Press, Washington.

Millenium Ecosystem Assessment (MEA). 2005. Ecosystems and human well-being: wetlands and water. World Resources Institute, Washington, DC, 5.

Murdoch, J. 2000. Networks—a new paradigm of rural development? J. Rural Stud., 16 (4) (2000), pp. 407–419 http://dx.doi.org/10.1016/S0743-0167(00)22-X

Pelorosso, R., Leone, A., Boccia, L. (2009). Land cover and land use change in the Italian central Apennines: A comparison of assessment methods. Applied Geography, 29(1), 35-48.

Rashed, T., Weeks, J., Couclelis, H., & Herold, M. 2007. An integrative GIS and remote sensing model for place-based urban vulnerability analysis. Integration of GIS and remote sensing. Wiley, Chichester. pp 199-224.

Russo, D., Sulli, C. 2011. Conservazione della natura e gestione delle aree protette. Liguori Editore. Napoli, Italy.

Fisher, B., Turner, R.K., Morling, P. 2009. Defining and classifying ecosystem services for decision making. Ecol. Econ. 68, 643–653.

Gbanie, S.P., Tengbe, P.B., Momoh, J. S., Medo, J., Kabba, V.T.S. 2013. Modelling landfill location using geographic information systems (GIS) and multi-criteria decision analysis (MCDA): case study Bo, Southern Sierra Leone. Applied Geography. 36, 3-12.

Geneletti, D., van Duren, I. 2008. Protected area zoning for conservation and use: A combination of spatial multicriteria and multiobjective evaluation. Landscape and urban planning. 85(2), 97-110.

Gobattoni, F., Pelorosso, R., Leone, A., Ripa, M. N. (2015). Sustainable rural development: The role of traditional activities in Central Italy. Land Use Policy, 48, 412-427.

Herzog, T.R., Herbert, E.J., Kaplan, R., Crooks, C.L. 2000. Cultural and developmental comparisons of landscape perceptions and preferences. Environ. Behav., 32 (3) (2000), pp. 323–346 http://dx.doi.org/10.1177/0013916500323002

Leone, A. 2011. Ambiente e Pianificazione, Analisi processi e sostenibilità. Franco Angeli, Milano, Italy.

Malczewski, J., 2006. GIS-based multicriteria decision analysis: a survey of the literature. International Journal of Geographical Information Science. 20(7), 703–726.

Millenium Ecosystem Assessment (MEA). 2003. Ecosystems and Human Well-being: A Framework for Assessment. Island. Press, Washington.

Millenium Ecosystem Assessment (MEA). 2005. Ecosystems and human well-being: wetlands and water. World Resources Institute, Washington, DC, 5.

Murdoch, J. 2000. Networks—a new paradigm of rural development? J. Rural Stud., 16 (4) (2000), pp. 407–419 http://dx.doi.org/10.1016/S0743-0167(00)22-X

Pelorosso, R., Leone, A., Boccia, L. (2009). Land cover and land use change in the Italian central Apennines: A comparison of assessment methods. Applied Geography, 29(1), 35-48.

Rashed, T., Weeks, J., Couclelis, H., & Herold, M. 2007. An integrative GIS and remote sensing model for place-based urban vulnerability analysis. Integration of GIS and remote sensing. Wiley, Chichester. pp 199-224.

Russo, D., Sulli, C. 2011. Conservazione della natura e gestione delle aree protette. Liguori Editore. Napoli, Italy.

Scolozzi, R., Morri, E., Santolini, R. 2012. Delphi-based change assessment in eco system service value to support strategic spatial planning in Italian Landscape. Ecological indicators. 21, 134-144.

Sharifi, M.A., Retsios, V. 2004. Site selection for waste disposal through spatial multiple criteria decision analysis. Journal of Telecommunications and Information Technology. 3, 28-38.

Zhang, Y.J., Li, A. J., Fung, T. 2012. Using GIS and multi-criteria decision analysis for conflict resolution in land use planning. Procedia Environmental Sciences. 13, 2264-2273.

Scolozzi, R., Morri, E., Santolini, R. 2012. Delphi-based change assessment in eco system service value to support strategic spatial planning in Italian Landscape. Ecological indicators. 21, 134-144.

Sharifi, M.A., Retsios, V. 2004. Site selection for waste disposal through spatial multiple criteria decision analysis. Journal of Telecommunications and Information Technology. 3, 28-38.

Zhang, Y.J., Li, A. J., Fung, T. 2012. Using GIS and multi-criteria decision analysis for conflict resolution in land use planning. Procedia Environmental Sciences. 13, 2264-2273.

16. Monitoraggio e processi di trasporto nel sistema suolo-pianta-atmosfera: Il caso studio di Trentola-Ducenta

M. Palladino, P. Nasta, A. Capolupo, N. Romano

L'obiettivo di questo capitolo è la messa a punto di un approccio basato su simulazioni numeriche per stimare l'efficacia della fitoestrazione. A tale scopo sono stati elaborati e valutati scenari alternativi di fitorimedio relativamente al sito sperimentale di Trentola Ducenta (CE) oggetto di alcune attività sperimentali nell'ambito del progetto Life+ EcoRemed. La bonifica del sito, che presenta moderate concentrazioni di cadmio, tramite una piantagione di pioppo (*Populus nigra spp*) è stata simulata utilizzando due distinti modelli: uno mono-dimensionale Hydrus-1D (Šimůnek et al., 2013) e l'altro tri-dimensionale HydroGeoSphere (Therrien et al., 2010). Il moto dell'acqua nel suolo è descritto dall'equazione di Richards, mentre il trasporto di soluti è modellato con l'equazione advettiva-dispersiva (v. Cap. 8 di Romano et al., 2017). Nelle equazioni del moto e del trasporto, il termine sorgente tiene conto dell'estrazione di acqua e soluti da parte delle radici delle piante. L'adsorbimento dei metalli esercitato dalle particelle solide del suolo è descritto usando delle isoterme lineari di scambio. Le locali condizioni climatiche sono state ottenute da stazioni meteorologiche presenti nella zona e sono stati simulati diversi scenari considerando anche differenti densità di piantumazione. I parametri del modello relativi alla pianta sono stati determinati e calibrati utilizzando anche i dendrometri installati nel campo sperimentale. Le proprietà idrauliche del suolo da utilizzare nei due modelli sono state determinate mediante prove su campioni non rimaneggiati di suolo svolte presso il Laboratorio di Idrologia del Suolo dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Opportune analisi di sensitività hanno consentito di identificare particolari caratteristiche del processo di fitoestrazione, uno dei processi del protocollo EcoRemed: l'efficienza della fitoestrazione diminuisce significativamente allorquando aumenta l'adsorbimento del contaminante (fattori di ritardo più elevati); invece, la fitoestrazione è più efficace nel tempo per i contaminanti più mobili. Tale situazione può essere interpretata considerando la velocità del trasporto advettivo del contaminante nella zona interessata dall'apparato radicale delle piante, dal tasso di traspirazione potenziale e alle condizioni di prevalente stress idrico identificate all'interno della zona radicale.

16.1. Premesse

La fitoestrazione è una nuova tecnica di bonifica di siti agricoli contaminati che si distingue per la sua semplicità e il modesto costo di realizzazione (Bonomo, 2005). Si basa sull'azione di sequestramento di una sostanza tossica da parte delle radici delle piante e del loro susseguente accumulo nei tessuti vegetali. È una tecnica promettente soprattutto per la sua semplicità e basso costo, ma anche per un effetto positivo nel paesaggio in cui è applicata. Tuttavia, non è ancora ampiamente utilizzata princi-

16. Transport process in the soil-plant-atmosphere system: The case study at Trentola-Ducenta

M. Palladino, P. Nasta, A. Capolupo, N. Romano

The goal of this chapter is to present and discuss an approach based on numerical simulations to estimate the effectiveness of phytoremediation in a polluted agricultural field. For this purpose, two scenarios (with and without phytoextraction actions) have been developed and evaluated at the experimental site of Trentola-Ducenta (Province of Caserta, Italy) within the framework of the Life+ EcoRemed project. This experimental site was subjected to low cadmium contamination. Phytoremediation is implemented through a poplar (*Populus nigra*) plantation. The simulations are carried out by using two different soil-plant-atmosphere models: one is the one-dimensional Hydrus-1D model (Šimůnek et al., 2013), the other is the three-dimensional HydroGeoSphere model (Brunner and Simmons, 2012).

Both models describe the water flow in soil by the Richards equation, whereas solute transport is modeled through the advective-dispersive equation [see Chapter 8 of this book by Romano et al. (2017)]. The source term of the water flow and solute transport equations accounts for the extraction of both water and solutes from plant roots. The adsorption of the metals exerted by the solid particles of the soil is described by a linear exchange isotherms. The climate forcings are determined using data from a weather station nearby the experimental area, whereas the plant characteristics are determined and calibrated using measured data from dendrometers installed at two pilot poplars. The soil hydraulic properties are determined on undisturbed soil cores by direct techniques performed out at the Soil Hydrology Laboratory of the University of Naples Federico II. A sensitivity analysis allowed the identification of particular features of the phytoextraction process employed by EcoRemed project. The efficiency of phytoextraction decreases significantly when contaminant adsorption increases (higher delay factors). Instead, phytoextraction is more effective in the case of most mobile contaminants. This situation can be interpreted considering the rate of advective transport of the contaminant in the area affected by the roots of the plants, the rate of potential transpiration and water stress conditions identified within the root zone.

16.1. Introduction

Phytoremediation is a relatively new remediation technique of contaminated agricultural sites that stands out for its simplicity and low cost of implementation (Bonomo, 2005). It is based on the action of sequestration of a toxic substance by plant roots and their subsequent accumulation in plant tissues. It is a promising technique primarily for its simplicity and low cost, but also for a positive effect on the landscape where it is applied. However, it is still not widely used mainly because of the time interval required for the remediation

palmente perché non sono ancora ben stimati in modo analitico la sua potenziale efficienza e il tempo richiesto per la bonifica di un sito inquinato. I risultati dipendono dall'intreccio di una complessa moltitudine di fattori che vedono interagire le componenti suolo, acqua, soluto contaminante, pianta e atmosfera. Per questi motivi, nonostante le caratteristiche interessanti, la fitoestrazione, quando è comparata con altre tecniche tradizionali di bonifica di siti contaminati, conduce a risultati di ripristino ambientale incerti sia in termini di quantificazione delle riduzioni di concentrazione del soluto sia in termini dei tempi di raggiungimento di condizioni non più pericolose. Una delle principali cause di queste incertezze è senz'altro da ascriversi alla difficoltà di previsione in modo rigoroso della velocità del processo di fitoestrazione da parte della vegetazione.

Un discorso a parte meritano gli effetti della presenza della vegetazione sui processi che compongono il ciclo idrologico a scala di parcella, anche senza considerare i processi di fitoestrazione e di fitoaccumulo. Di seguito sono descritti brevemente gli effetti positivi connessi allo sviluppo vegetativo di una coltura arborea a elevata densità di piante per ettaro per la produzione di biomassa allevata su di un sito inquinato; in particolare, si evidenzia come i diversi effetti esercitati dalla presenza della vegetazione operano in maniera sinergica fino ad avere una intensa azione di protezione della falda profonda dalla traslocazione di sostanze estranee apportate alla superficie del suolo. In maniera schematica, la presenza della vegetazione può influire in modo più o meno significativo sui seguenti processi del ciclo idrologico:

- intercettazione per opera della copertura vegetale;
- modifiche in senso migliorativo delle caratteristiche di ritenzione nel profilo di suolo (effetto a lungo termine);
- sottrazione di acqua e soluti per attingimento radicale, secondo le necessità fisiologiche di accrescimento e per soddisfare la richiesta traspirativa;
- sottrazione di acqua e soluti sotto forma di biomassa.

L'effetto sinergico di queste modifiche determina una riduzione della redistribuzione profonda delle acque di origine meteorica, con sostanziale riduzione del rischio di trasferire nella falda superficiale, o peggio ancora in quella profonda, le sostanze presenti nei primi strati di suolo, giunte a esso per via di attività illecite di sversamento.

Per favorire un maggiore utilizzo dei procotolli di fitorimedio si può ricorrere ad approcci analitico-numerici. In altre parole, la conoscenza sempre più approfondita dei processi fisici, chimici e biologici che hanno sede nella zona non satura del suolo, nonché le interazioni suolo-vegetazione, e la trasposizione in equazioni matematiche di tali processi rende più agevole la messa a punto di protocolli di fitorimedio grazie all'utilizzo di simulazioni numeriche.

16.2. Obiettivi dello studio

La bonifica dei suoli contaminati si propone di minimizzare o annullare il trasferimento di sostanze potenzialmente tossiche nella catena alimentare e nelle acque sotterranee (Kutilek e Nielsen, 1998). La maggior parte

of a contaminated site is not plainly predictable. Results depend on the complex interaction of many processes that link soil, water, contaminated solutes, plant, and atmosphere. For these reasons and despite its attractive features, phytoremediation yields unpredictable results when compared with other traditional techniques of reclamation of contaminated sites. The uncertainty is in terms of both solute concentration reductions and time needed to achieve restoration of contaminated site. A major cause of this uncertainty is certainly attributable to the difficulty of predicting the rate of solute extraction and consequently the velocity of the phytoextraction by vegetation process. The following part briefly describes the positive effects related to the growing of a specific tree type with high density of plants per hectare for biomass production on a polluted site. In particular, we show how the different effects exerted by the presence of vegetation operate synergistically to obtain an intense protective action of the groundwater from translocation of metal substances spread on the soil surface.

In a schematic way, the presence of vegetation can affect more or less significantly the following processes of the hydrological cycle:

- Rain interception;
- Soil hydraulic response;
- Water and solute uptake;
- Biomass adsorption of metal solutes.

The synergistic effect of these possible changes leads to a reduction of the redistribution of rainfed infiltrated water, with substantial reductions of the risk of transferring contaminants from the soil surface to the deepest soil layers. To encourage a wider use of phytoremediation, one can use analytical-numerical approaches. In other words, an in-depth knowledge of the physical, chemical, and biological processes and the soil-vegetation interactions, by including contaminant transport into mathematical models, enables phytoremediation protocols to be suitably implemented by exploiting the outcomes of numerical simulations.

16.2. Goals of this study

The remediation of contaminated soils aims at minimizing the transfer of potentially toxic substances in the food chain and toward the groundwater (Kutílek and Nielsen, 1998). Most of the techniques dedicated to the remediation of soils contaminated by heavy metals act directly on the movable and bioavailable fraction of contaminants. As can be found in many national guidelines, a concentration threshold is fixed and is given by the sum of the fraction adsorbed on the solid phase and the fraction dissolved in the liquid phase. An overall reduction in the concentration can be achieved through processes that promote desorption and subsequent removal from the liquid phase. In general this is the basic mechanism by which the most modern techniques (e.g. soil washing techniques, electrokinetic methods, heat treatments) work to reclaim a contaminated site. Even phytoremediation (implying assimilation and accumulation of metals by the plants) can be considered to belong to the so-called *bio-contaminant*

delle tecniche dedicate alla bonifica di suoli contaminati da metalli pesanti agiscono direttamente sulla frazione mobile e biodisponibile dei contaminanti. Come si può trovare in molte linee guida nazionali, è fissato di solito un limite alla concentrazione totale che è dato dalla somma della frazione adsorbita sulla fase solida e la frazione disciolta nella fase liquida. Una riduzione globale della concentrazione si può ottenere attraverso processi che promuovono il desorbimento e la successiva rimozione dalla fase liquida. Questo è generalmente il meccanismo attraverso il quale la maggior parte delle tecniche moderne di bonifica lavora: ad esempio, le tecniche di *soil washing*, i metodi elettrocinetici, i trattamenti termici e così via. Anche la fitoestrazione, nella quale le piante assimilano e accumulano metalli, si può considerare appartenere a questa categoria di bonifiche perché opera attraverso il cosiddetto *stripping del contaminante biodisponibile*. Diversi autori hanno mostrato un successo non eclatante delle tecniche di fitoestrazione principalmente a causa di una serie di problemi tra i quali la fitotossicità, la bassa produzione di biomassa delle piante iperaccumulatrici, o anche la naturale propensione delle radici a evitare di attingere dalle zone con maggiori concentrazioni della sostanza inquinante. In funzione del livello di contaminazione, spesso la fitoestrazione non è applicabile perché richiede tempi lunghi di bonifica e non compatibili con certe esigenze del soggetto gestore del territorio e della collettività. Un approccio alternativo consiste nell'utilizzare la vegetazione per aumentare i fattori di partizione in maniera tale da diminuire la frazione mobile. Questa tecnica conosciuta come fitostabilizzazione, immobilizzazione o bonifica naturale, opera sia fisicamente (traspirazione delle piante) che chimicamente aumentando la capacità tampone del suolo grazie all'aumento della biomassa rappresentata degli essudati radicali. La componente specificamente idraulica del suolo, modificata dell'evapotraspirazione, può essere sufficiente a prevenire il movimento degli ioni metallici attraverso la zona insatura fino alla falda. Meccanismi chimici possono essere promossi aggiungendo ammendanti specifici come per esempio agenti fertilizzanti che possono aumentare la capacità tampone del suolo. Con questi accorgimenti, la fitostabilizzazione è vista come un'alternativa che fornisce una migliore percentuale di successo.

Il presente studio è incentrato sulla modellazione numerica di un progetto di fitorimedio, considerando il sistema suolo-pianta-atmosfera come sede dei processi fisici, chimici e biologici alla base della fitoestrazione. L'approccio proposto intende valutare l'efficacia di bonifica esaminando l'influenza esercitata da alcuni dei principali parametri del sistema sulla gestione agronomica di una coltura fitoestrattrice. Alcuni specifici scenari sono stati progettati per valutare la massima penetrazione della piuma di contaminante e l'effetto della vegetazione sulla velocità di migrazione del soluto verso le parti più profonde del suolo e verso l'acquifero sottostante.

Nell'ambito delle sperimentazioni effettuate nel campo sperimentale di Trentola-Ducenta durante il progetto Life+ EcoRemed, il software Hydrus-1D è stato usato

stripping. Several authors have shown a poor effect of phytoextraction techniques mainly due to a number of problems including the phytotoxicity, the low production of biomass of hyperaccumulator plants, or even the propensity of the roots to avoid tapping from the areas with higher concentrations of the pollutant. Depending on the level of contamination, phytoextraction is not always applicable because it takes too long to achieve a sufficient result, which often is not compatible with the needs of stakeholder and the community. An alternative approach is to use the vegetation stand to increase the partitioning factors in such a way as to decrease the mobile fraction. This technique, known as phytostabilization, immobilization or natural reclamation, operates both physically (transpiration of plants) and chemically by increasing the buffer capacity of the soil thanks to the increase of biomass represented by root exudates. Chemical mechanisms can be promoted by adding specific soil amendments such as fertilizers agents that can increase the buffer capacity of the soil. With these measures, the phytostabilization is seen as an alternative that provides a better success rate.

This study presented in this chapter is focused on the numerical modeling of a phytoremediation project, considering the soil-plant-atmosphere system as the spatial domain of the physical, chemical, and biological processes controlling the phytoextraction process. The proposed approach intends to evaluate the effectiveness of phytoremediation by examining the influence exerted by some system parameters on the agronomic management. Two different scenarios are designed to evaluate the fate of contaminant plume and the effect of vegetation on the migration velocity of the solute to the deepest soil layers and toward the underlying aquifer.

Experimental campaigns were carried out in the field of Trentola-Ducenta and the Hydrus-1D model was used to evaluate different scenarios for phytoremediation at the scale of individual poplar plants. Moreover, the 3-D HydroGeoSphere (HGS) model was used to simulate the water flow and solute transport in the entire field. Information on weather characteristics as well as soil and vegetation properties were retrieved directly in the study area through direct field measurements.

per valutare diversi scenari di fitorimedio alla scala di singole piante di pioppo e considerando solo i movimenti di acqua e soluto essenzialmente in direzione monodimensionale verticale. Il software HydroGeoSphere (Therrien et al., 2007), invece, è stato impiegato per simulare in tre dimensioni la dinamica dell'acqua e dei soluti nell'intero campo sperimentale. Le informazioni relative alle caratteristiche climatiche e alle proprietà del suolo e della vegetazione sono state ottenute direttamente nell'area sperimentale e alcune parametri sono stati anche calibrati con misure dirette eseguite in campo.

16.3. Indagine sperimentale

Il sito sperimentale di Trentola-Ducenta

Il sito sperimentale del progetto EcoRemed (40°58'32.2"N; 14°08'59.0"E) è ubicato nel Comune di Trentola-Ducenta (CE), uno dei 77 Comuni del SIN Litorale Domizio Flegreo e Agro-Aversano. L'appezzamento di terreno ha forma pressoché quadrangolare (indicato in Figura 1 con il riquadro rosso), presenta un'altitudine di 68 m s.l.m. e una estensione di circa 4500 m^2. Questo appezzamento è stato eletto a sito pilota perché in passato è stato utilizzato per lo stoccaggio illecito di materiale di risulta di natura sconosciuta.

Nella zona delimitata nel riquadro con linea rossa sono stati innanzi tutto eseguiti campionamenti per determinare le proprietà fisico-chimiche e idrauliche del suolo. Inoltre, in diversi punti del campo e nello strato più superficiale del suolo (profondità 0 – 15 cm), sono state eseguite misure periodiche di contenuto di acqua del suolo con la tecnica TDR, utilizzando un sistema mobile e molto agevole da trasportare messo a punto presso il Laboratorio di Idrologia del Suolo dell'Ateneo Federico II di Napoli.

Nel sito pilota di Trentola-Ducenta è stato installato il seguente sistema di acquisizione di dati in continuo (vedi foto di seguito):

- per n° 2 piante di pioppo e per tre diverse profondità dal piano campagna:
  - n° 3 sensori FDR (riflettometri nel dominio delle frequenze) per il rilievo simultaneo di contenuto volumetrico di acqua, di temperatura e di conducibilità elettrica (EC) del suolo alle profondità di -20 cm, -40 cm e -60 cm (fig. 2);
  - n° 2 sonde per il rilievo del potenziale matriciale alle profondità di -20 cm e -40 cm (fig. 2).

In corrispondenza del fusto di ciascuna delle due piante è stato installato un dendrometro elettronico. Tutti i sensori sono stati collegati a un datalogger programmato per l'acquisizione di ogni singolo segnale (vedi fig. 3).

L'acquisizione in continuo dei dati dei dendrometri ha consentito di calibrare in modo ottimale i parametri della coltura nell'ambito della schematizzazione numerica degli algoritmi di calcolo utilizzati in questo studio. In fig. 4 possiamo notare l'andamento nel tempo del diametro di un pioppo. Si nota il passaggio dal periodo di stasi vegetativa al successivo rapido accrescimento. Durante la fase di accrescimento si notano le variazioni infra-gior-

16. 3. Materials and methods.

The experimental site of Trentola-Ducenta

The experimental site of the project EcoRemed (40° 58'32.2 "N, 14° 08'59.0" E) is located near the town of Trentola-Ducenta (Province of Caserta, Italy), which is one of the 77 municipalities of the Site of National Interest (italian acronym: SIN) *Litorale Domitio Flegreo ed Agro Aversano*. Figure 1 shows the boundary (red line) of the study site that has an area of approximately 4500 m^2 at an altitude of about 68 m above sea level. This field was identified as one of the pilot sites because in the past it has been subjected to illegal storage of material of unknown nature.

Soil samples were collected to determine the soil physical, chemical, and hydraulic properties. Frequent measurements of surficial (soil depth 0-15 cm) soil water content were also carried out in different points of the field by using the Time Domain Reflectometry (TDR) technique, with a mobile tool system specifically designed at the Laboratory of Soil Hydrology of the University of Naples Federico II.

The study area was equipped with following monitoring system:

- In close proximity of two poplar trees and at three different soil depths (see Figure 2):
- 3 Frequency Domain Reflectometers (FDR) sensors for simultaneous measurements of soil water content, temperature, and electrical conductivity (EC) at three soil depths of 20 cm, 40 cm, and 60 cm; sensors for measuring soil matric potential at the soil depths of 20 cm e 40 cm.

An electronic dendrometer has been fixed in the stem of each of the two plants (see Figure 3). All sensors were connected to a datalogger for logging all signals.

The dendrometric data enabled the direct calibration of the crop parameters that are then used in the numerical simulations. The graph of Figure 4 shows the time course of the trunk diameter of a poplar and highlights the transition from the period of vegetative stasis to the next rapid growth. During the growth phase, the daily variations in the diameter are evident. Due to the transpiration fluxes linked to the circadian rhythm, the trunk diameter follow a fairly sinusoidal pattern.

The two photos of Figure 5 show the sensors installation in the soil profile for water balance monitoring.

Figura 1. Inquadramento del sito pilota di Trentola-Ducenta.

Figure 1. Trentola-Ducenta Pilot site.

Figura 2. Sensori impiegati per la calibrazione del modello Hydrus-1D.

Figure 2. Sensors used for calibration of Hydrus-1D model.

Figura 3. Dendrometro per la calibrazione dei flussi traspirativi della coltura di pioppo.

Figure 3. Dendrometer for calibrating poplar transpirative fluxes.

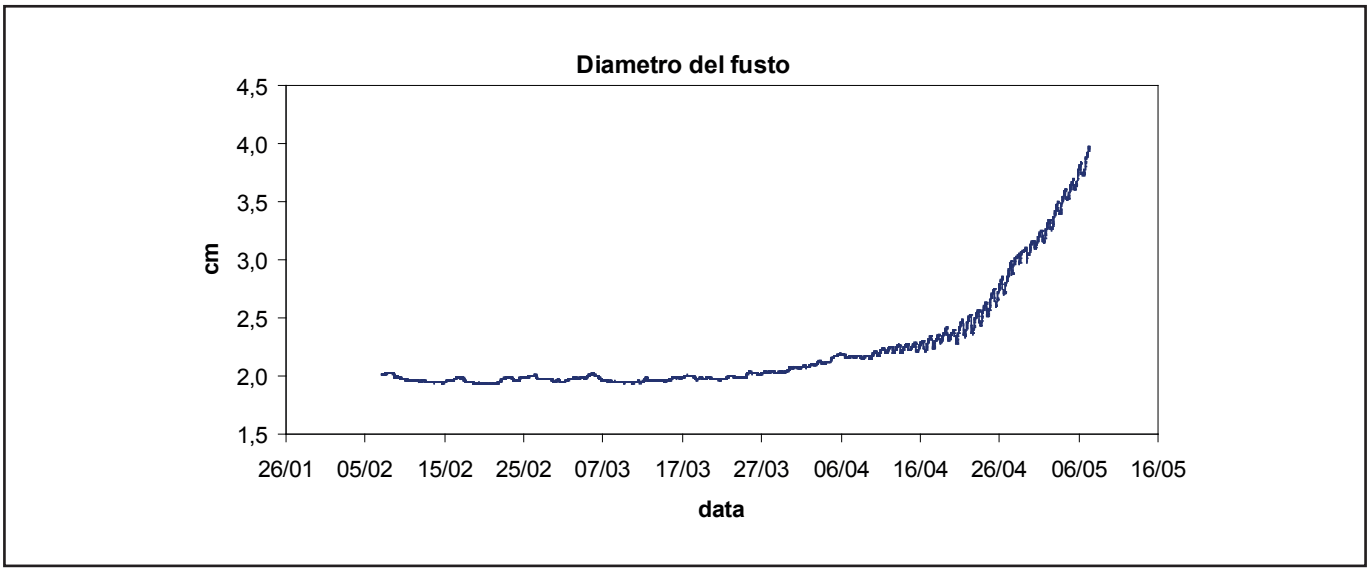


Figura 4. Variazione del diametro di una pianta di pioppo

Figure 4. Variation of poplar plant diameter

Figura 5. Profili di scavo e posizionamento dei sensori.

Figure 5. Soil profiles and sensor placement.

naliere del diametro, dovute ai flussi traspirativi, che essendo legati al ritmo circadiano, seguono un andamento sinusoidale.

Le foto riportate in fig. 5 illustrano le fasi di posizionamento dei sensori nelle due posizioni in corrispondenza delle 2 piante di pioppo per il monitoraggio dell'impatto delle azioni di fitorimedio.

Attività di laboratorio per la determinazione delle proprietà idrauliche del suolo

Le proprietà idrauliche del suolo sono state determinate prelevando campioni non rimaneggiati in tre orizzonti distinti da sottoporre a prove di evaporazione in accordo con la tecnica proposta da Romano e Santini (1999). La Tabella 1 riporta i valori dei parametri che descrivono le proprietà idrauliche secondo il modello idraulico bimodale proposto da Durner (1994). Per un approfondimento sulla descrizione matematica delle proprietà idraulica si può far utilmente riferimento al manuale del software HYDRUS-1d.

Laboratory activities for the determination of the soil hydraulic properties.

The soil hydraulic properties were determined by collecting undisturbed soil samples into three distinct soil horizons in order to be subjected to the evaporation tests in accordance with the technique proposed by Romano and Santini (1999). Table 1 shows the values of parameters that describe the hydraulic properties according to the bimodal hydraulic model proposed by Durner (1994). For a discussion on the mathematical description of the hydraulic properties may usefully refer to HYDRUS-1d of the software manual.

Tab. 1. Parametri idrologici del suolo (z profondità in cm, BD è la densità apparente, K_s la conducibilità alla saturazione, θ_s è il contenuto d'acqua saturo, i successivi parametri (α1,n1, ω, α2,n2) descrivono le proprietà idrologiche dei tre orizzonti secondo la formula bimodale (Durner, 1994).

Table 1. Soil hydrological parameters (z depth in cm, BD bulk density, K_s saturation conductivity, θs water content at saturation, the other parameters (α1,n1, ω, α2,n2) depict hydrological properties in three layers according to bimodal formula (Durner, 1994)

campione / soil sample	z / Soil depth, z (cm)	BD / Bulk density (g cm-3)	K_s (cm min^{-1})	θ_s	α1	n1	ω	α2	n2
29	5-12	1,1	3,0	0,5	0,3	1,2	0,4	0,0	1,3
371	40-47	1,2	0,0	0,5	0,0	1,3	0,1	0,0	2,6
127	70-77	1,1	0,4	0,6	0,0	1,2	0,3	0,2	1,4

Gli scenari simulati

Il codice di calcolo HYDRUS 1-D usa il metodo di Galerink agli elementi finiti per la discretizzazione spaziale e il metodo delle differenze finite per la discretizzazione temporale dell'equazione di Richards che, come noto, descrive il movimento dell'acqua nel suolo. Per il trasporto dei soluti, ci si è basati sulla risoluzione delle equazioni di advezione-dispersione agli elementi finiti. Le principali ipotesi di questo studio sono state:

- approccio monodimensionale
- assenza di vie preferenziali
- invarianza dell'attingimento radicale di contaminanti
- processo di fitorimedio basato solo sull'estrazione del contaminante
- assenza di crescita, senescenza, intossicazione della pianta
- contaminanti considerati indipendenti.

Il modello di attingimento radicale

Il modello di attingimento radicale è stato definito attraverso un approccio macroscopico determinando il termine sorgente dell'equazione di Richards. In particolare il termine sorgente che descrive la maggiore o minore capacità della coltura ad attingere acqua dall'ambiente radicale, e quindi il modello dello stress idrico, è stato considerato in accordo con la formulazione data da Feddes. Il termine di attingimento radicale è calcolato attraverso la parametrizzazione delle soglie di attingimento, definite e calibrate per la coltura allo studio.

Il modello di estrazione dei soluti

L'attingimento radicale dei contaminanti, quando la coltura era presente nella simulazione, è stato calcolato con due modelli, uno definito passivo e uno attivo. Il primo assume che l'attingimento del soluto avviene localmente in maniera proporzionale all'attingimento idrico radicale e alla concentrazione del soluto disciolto in acqua. Il processo di uptake radicale attivo è stato calcolato usando la cinetica di Michaelis-Menten. Il massimo uptake teorico è stato definito uptake potenziale Ap(t), ed è caratteristico della coppia pianta soluto. La costante Km di Michaelis-Menten constant [ML^{-3}] è stata fissata al valore Km = 0,09537 µg/cm^3 e per l'attingimento potenziale Ap = 0,0271 µg cm^{-2} d^{-1} per il Cd^{2+}.

Simulated scenarios

The HYDRUS 1-D model use the Richards equation to describe water flow in soil and the advection-dispersion equation to represent solute transport. The main assumptions in this study are as follows:

- One-dimensional flow domain;
- Preferential flow paths are neglected;
- Time-invariant contaminant root uptake;
- Phytoremediation based on on root extraction of solutes;
- Contaminants are assumed as independent.

Root uptake

The root uptake model was defined by a macroscopic approach to determining the sink term in the Richards equation. Such term describes the capacity of the roots to draw water from the soil. Root uptake process is limited when water availability is limited, following the formulation of Feddes model. The sink term is delimited by specific thresholds values, as calibrated in this study.

Solutes phytoextraction

The contaminant root uptake has been calculated with two methods, one passive and one active. The former assumes that solute uptake is proportional to water sink term and to the concentration of the solute dissolved in water. The active uptake was calculated using the Michaelis-Menten kinetics. The maximum theoretical uptake was defined uptake potential Ap(t), and it is characteristic of the plant-solute coupling. The Michaelis-Menten constant Km [$M\ L^{-3}$] is assumed as Km = 0.09537 µg/cm^3 and Ap = 0.0271 µg cm^{-2} d^{-1} for Cd^{2+}.

Le condizioni al contorno del campo di moto
Le condizioni al contorno superiore sono state imposte usando valori giornalieri di pioggia, evaporazione potenziale dal suolo e traspirazione potenziale dalla coltura. La evapotraspirazione di riferimento è stata calcolata usando l'equazione di Penman-Monteith (FAO). Le condizioni iniziali sono state imposte pari all'equilibrio idrostatico, imponendo come condizione al contorno inferiore un potenziale matriciale pari a zero.

Le Interazioni ione-matrice
L'adsorbimento degli ioni sulla matrice solida è stato considerato ben descritto da un modello lineare applicabile a tutti gli orizzonti componenti il profilo. Il coefficiente di distribuzione K_d è stato desunto da studi effettuati su suoli simili, impiegando il valore $K_d = 140$ cm^3/g, mentre per il coefficiente di diffusione in acqua libera si sono usati i valori standard di riferimento.

Simulazioni numeriche
Le simulazioni numeriche sono state organizzate in tre fasi: pre-contaminazione, contaminazione e bonifica. La prima fase (un anno) è stata necessaria al fine di fissare un profilo medio potenziale matriciale iniziale. Alla superficie del suolo è stata considerata presente una vegetazione arbustiva spontanea. Durante la successiva fase di contaminazione, è stata simulata la contaminazione vera e propria con la presenza di contenitori pervi alla pioggia. È stata inoltre considerata una severa perdita di efficienza traspirativa per la vegetazione a causa della tossicità del contaminante. Pertanto, i valori di traspirazione sono stati considerati equivalenti al 20% del riferimento. In questa fase, non è stato considerato alcun fitoassorbimento del contaminante da parte della vegetazione. Il periodo simulato è stato di due anni. Per il risanamento del suolo, la vegetazione originale è stata sostituita da *Populus nigra spp*. Secondo uno studio sperimentale questa specie non subisce alcun effetto di tossicità alle concentrazioni considerate. I parametri di Feddes per l'attingimento radicale sono stimati per analogia con piante simili appartenenti alla medesima famiglia. Un modello di assorbimento di tipo attivo è stato utilizzato per il Cd^{2+}.

Simulazioni 3-D
Il software HydroGeoSphere (HGS) comprende il file grok per determinare i vari input del sistema. Si procede quindi con la generazione di un grigliato rettangolare di dimensioni pari all'area sperimentale di Trentola (circa 4500 m^2). Un Digital Elevation Model (DEM) ad alta risoluzione è stato caricato per impostare le quote delle celle di calcolo. Il profilo di suolo profondo 3 m è suddiviso in 3 orizzonti distinti ciascuno dei quali con proprietà idrauliche definite dalle prove di evaporazione svolte sui campioni di suolo indisturbati (Tabella 1). I parametri della forma di van Genuchten di ciascun orizzonte di suolo sono elencati nel file di testo *.mprops. Le condizioni iniziali del dominio sub-superficiale di suolo sono impostate alla capacità di campo.
Lo strato superficiale è modellato separatamente dal profilo di suolo poiché il flusso idrico è caratterizzato dalla equazione bidimensionale di Saint-Venant i cui parametri

Boundary conditions
The upper boundary conditions are imposed using the daily values of rainfall and potential evaporation, whereas potential transpiration represents the potential root water uptake exerted along the soil profile. The reference evapotranspiration was calculated using the equation of Penman-Monteith (FAO). The initial conditions were imposed at hydrostatic equilibrium, while lower boundary was free drainage.

Ion-matrix interactions
The adsorption of ions on the solid matrix has been considered to be well described by a linear model applicable to all soil horizons. The distribution coefficient Kd has been inferred from studies carried out on similar soils, using the value of $K_d = 140$ cm^3+/g, while the diffusion coefficient in free water was set according to the standard reference values.

Numerical simulations
Numerical simulations have been organized in three phases: pre-contamination, contamination and remediation. The first phase (lasting one year) is a spin-up time step necessary to establish realistic initial conditions in the soil profiles. Spontaneous shrubby vegetation is present at the soil surface. During the second phase, the true contamination was simulated. We also considered a severe loss of transpiration efficiency due to contaminant toxicity. Therefore, the transpiration values were considered to be equivalent to 20% of the reference one. The simulated period lasts two years. Finally, in the third phase, phytoremediation of soil occurs by replacing the original vegetation with *Populus nigra* spp. According to an experimental study, this species is not affected by toxicity at experimental concentrations. The Feddes parameters for root water uptake are estimated by analogy with similar plants. An active type of absorption model was used for the Cd^{2+}.

3-D simulations
The HydroGeoSphere (HGS) model comprises the "grok file" to setup input parameters. It generates a rectangular grid of experimental area (about 4500 m^2). A high-resolution Digital Elevation Model (DEM) has been implemented. The deep soil profile 3 m is divided into 3 distinct horizons each of which with hydraulic properties defined by the evaporation tests conducted on undisturbed soil samples (Table 1). The parameters of the van Genuchten shape of each soil horizon are listed in the text file *.mprops. The initial conditions of the sub-surface soil domain are set with the soil water content at the condition of field capacity. The surface layer is modeled separately from the soil profile because the water flow is characterized by two-dimensional Saint-Venant equation whose parameters are given in the text file * .oprops. The upper boundary condition is the daily rain and evapotranspiration which is modulated on the basis of specific parameters listed in * .etprops file. The bottom boundary condition of the soil profile is set as free drainage, as it allows the water flow with unitary hydraulic gradient.

sono riportati nel file di testo *.oprops. La condizione al contorno superiore consiste nel riportare la pioggia giornaliera e l'evapotraspirazione giornaliera la quale è modulata in base a specifici parametri elencati nel file *.etprops. La condizione al contorno inferiore del profilo di suolo è il drenaggio libero, ossia si impone il flusso idrico con gradiente idraulico unitario.

16.4. Risultati e considerazioni conclusive

Simulazioni 1-D con HYDRUS-1D

Usando dati meteorologici, desunti da stazioni vicine alla parcella indagata, è stato possibile effettuare delle simulazioni del bilancio idrologico, usando due scenari differenti. Il primo scenario è relativo alla condizione pre-impianto del pioppeto, e quindi non prevede la presenza di una vegetazione attiva. Il secondo scenario è quello relativo alla situazione colturale in atto, per cui, nella parametrizzazione del modello HYDRUS-1D, si è tenuto conto anche dei reali valori dei parametri colturali, necessari per la quantificazione dei flussi di intercettazione delle precipitazioni, di attingimento radicale e di traspirazione. La fig. 1 mostra l'andamento temporale dell'evapotraspirazione di riferimento, calcolata a partire dalle temperature massima, minima e media, per mezzo della formula di Hargreaves (FAO 56).

In figura 6, degno di nota è il valore massimo di tale andamento, che corrisponde al picco occorso durante l'estate del 2015, pari a circa 6 mm/d.

In fig. 7 sono riportati gli andamenti grafici delle variabili inerenti la traspirazione della coltura. In particolare dalla sovrapposizione della curva di traspirazione effettiva su quella relativa alla traspirazione potenziale, si deduce che il periodo di stress durante l'estate 2015 è stato relativamente poco importante. Questo è un elemento da confermare certamente negli anni successivi, ma è un ottimo segno per quanto riguarda l'utilizzo di tale coltura nei protocolli di fitorimedio della zona in studio. In fig. 8

16.4. Results and discussion

1-D simulations with HYDRUS-1D

Weather data, taken from the weather station close to the parcel under investigation, were implemented in the water balance simulations, using two different scenarios. The first scenario is related to the condition of the pre-implantation, and therefore does not require the presence of an active vegetation. The second scenario is related to the presence of poplar plantation with specific parameters set in HYDRUS-1D. Fig. 6 shows the time trend of reference evapotranspiration, calculated from the maximum, minimum and average temperatures, by means of Hargreaves formula (FAO 56).

It is interesting to point out that the maximum value of this trend, which corresponds to the peak occurred during the summer of 2015, is approximately equal to 6 mm/d.

Figure 7 provides an overview of the potential (blue area) and actual (pink area) transpiration trends over time. The simulated water stress during summer 2015 has scant importance. This is certainly an element to be confirmed in the following years, but it is anyhow encouraging with reference to the use of this crop in phytoremediation protocols. Figure 8 shows the cumulated flows computed for the study site with trees. Visual inspection reveals the beneficial presence of the trees on the fluxes at the lower end of the soil domain. The selected vegetation represents a pseudo-barrier protecting from water flow that infiltrates from soil surface.

By the results show in fig. 8 and in table 2 we can notice the effect of phytoremediation on the bottom flux reduction compared to the one in the absence of vegetation. Biomass adsorption of metals has prompted also a substantial change in the hydrologic balance. According to numerical simulations in HYDRUS-1D, it is estimated that poplar plantation during the period of observation the poplar presence has reduced drainage by more than 30%.

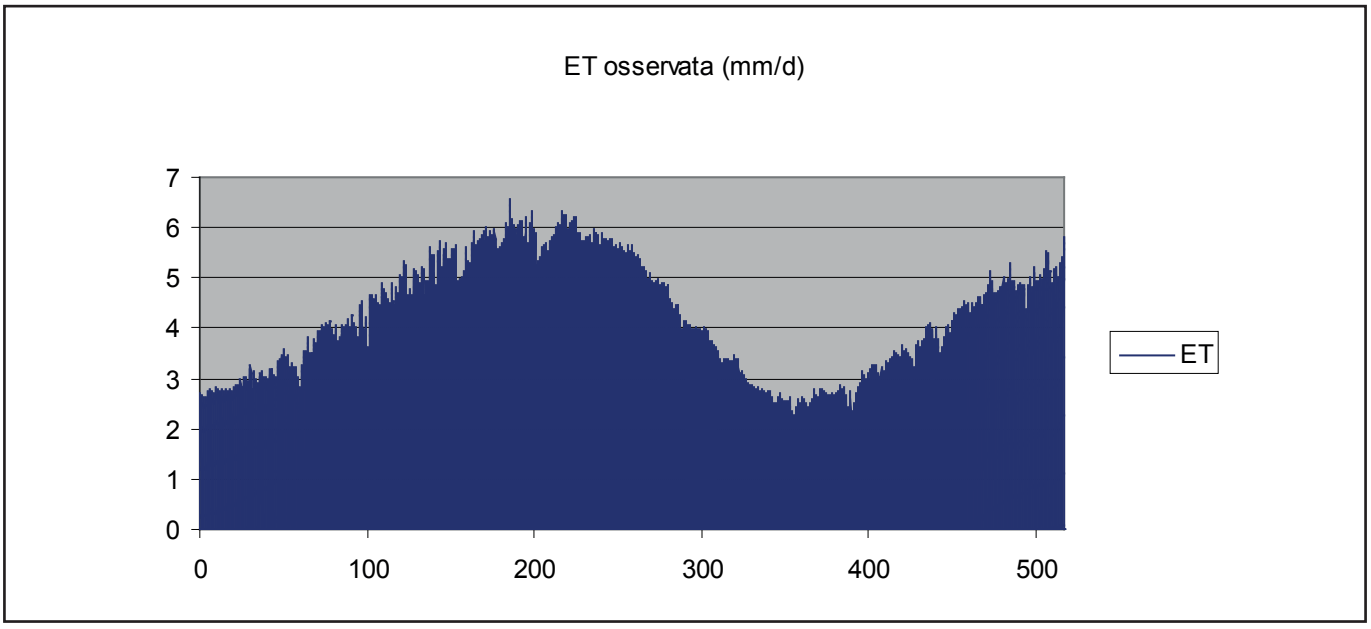


Fig. 6. Andamento dell'evapotraspirazione di riferimento

Figure 6. Reference Evapotranspiration.

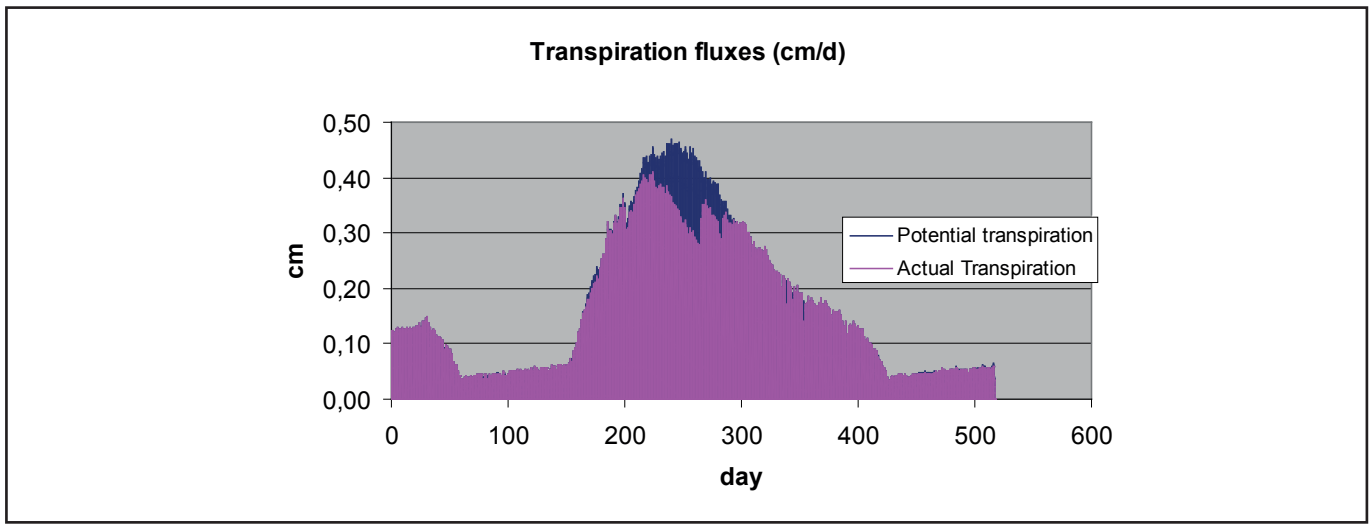


Fig. 7. Periodo di moderato stress idrico, evidenziato dalla differenza tra la curva blu, che indica la traspirazione potenziale della coltura di pioppo, e la curva viola, indicante la reale traspirazione calcolata per il periodo di osservazione.

Figure 7. Period with moderate water deficit showed by the difference between the blue line (potential transpiration of poplar) and violet line (effective transpiration).

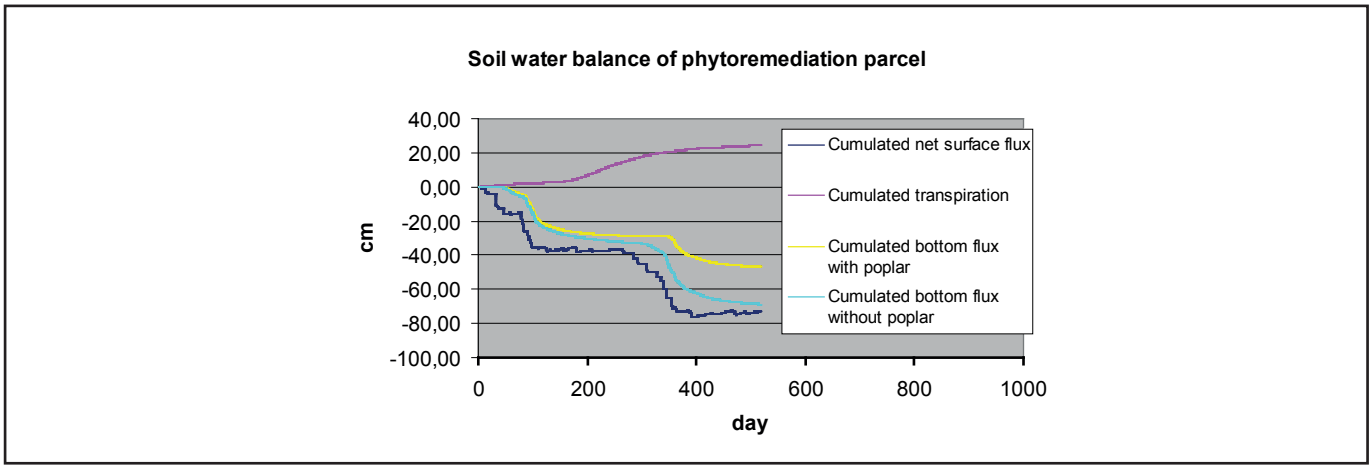


Fig. 8. Valori cumulati dei flussi più importanti calcolati durante il periodo di simulazione del bilancio idrico della parcella

Figure 8. Cumulated values of fluxes calculated during simulation period of plot water balance.

sono rappresentati i flussi cumulati calcolati per la parcella arborata allo studio. Dall'analisi visuale si desume l'effetto cumulato della presenza della coltura sui flussi che attraversano la frontiera inferiore del dominio considerato. La presenza della coltura ha rappresentato una sorta di barriera al flusso idrico profondo, verso la falda superficiale, delle acque meteoriche che si sono infiltrate attraverso la superficie in seguito alle precipitazioni.
In particolare possiamo notare l'effetto della riduzione del flusso in profondità dall'analisi visuale della curva celeste, che rappresenta l'andamento cumulato in assenza di vegetazione, in contrapposizione con l'andamento della curva gialla, che mostra i valori in presenza della coltura di pioppo. Valori quantitativi di tale riduzione si possono desumere dalla tabella 2. Oltre le asportazioni tramite la produzione di biomassa, con asporti di metalli da valutare in sede analitica, la presenza della coltura ha permesso una modifica sostanziale nel bilancio idrologico. Impiegando la modellazione deterministica, si calcola che nel periodo di osservazione la presenza del

Several scenarios were considered by changing the affinity of solute with the soil solid matrix. Significant differences emerged, depending on the behavior of soil contaminants. In the case of high affinity between desorbed ions and the solid phase of the soil, the radical uptake is irrelevant for reclamation. Considering intermediate-adsorbed ions, the reclamation time has been shorter and migration of the pollutants is greatly mitigated by plant action. The vegetation seized more than 40% of the contaminant present in the soil. The case study of cadmium (Figure 9) showed intermediate results. The tests have shown that the most mobile chemical species (which cause greater concern for the environment) have shown better results in terms of phyto-extraction. Conversely, the most reactive species (with high Kd) tend to be "naturally attenuated" without being interested in the proper processes of defeat. In fig. 9 it is noted the mitigating effect due to the presence of fouling culture in the case study of cadmium. Assuming that the crop potential evapotranspiration is constant within the investigated sowing density, the only

Tab. 2. Flussi calcolati col modello di bilancio idrologico

Table 2. Fluxes calculated by the Model of Hydrological balance.

Volume netto in ingresso (pioggia meno evaporazione dal suolo) / Input volume on soil surface (Rain minus evaporation)	7260	m3/ha
Volume traspirato dalla coltura / Transpired volume	2455	m3/ha
Volume infiltrato in profondità in presenza di pioppo / Infiltrated volume in presence of poplar	4700	m3/ha
Volume infiltrato in profondità in assenza di pioppo / Infiltrated volume in absence of poplar	6880	m3/ha

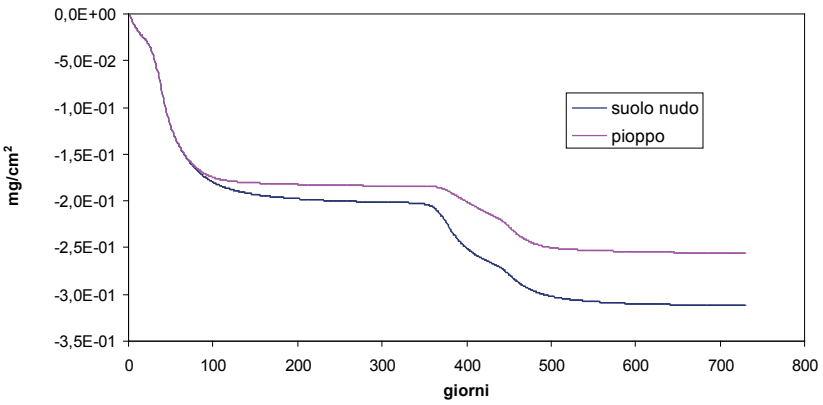


Fig. 9. Valori cumulati dei flussi di Cd2+ che attraversano il confine inferiore del profilo di suolo considerato

Figure 9. Cumulated values of Cd2+ fluxes that overcome the lower boundary of soil profile.

pioppo abbia ridotto di oltre il 30% il drenaggio delle acque superficiali verso la zona profonda del profilo di suolo.
Sono stati ipotizzati due scenari, confrontando i risultati della fase di bonifica con la coltura con uno scenario senza la presenza della vegetazione oppure con vegetazione degradata. Sono emerse notevoli differenze, al variare del comportamento dei contaminanti del suolo. Nel caso di ioni fortemente adsorbiti dalla fase solida del suolo, l'assorbimento radicale nel complesso è risultato di entità irrilevante per la bonifica. Considerando ioni adsorbiti con forze intermedie, il tempo per la bonifica è risultato essere più breve e migrazione della piuma è notevolmente mitigata dall'azione delle piante. La vegetazione ha sequestrato più del 40% del contaminante presente nel terreno. Il caso studio del cadmio (fig. 9) ha mostrato risultati intermedi. Le prove hanno messo in luce che le specie chimiche più mobili (che sono per questo causa anche di una maggiore preoccupazione per l'ambiente), hanno mostrato risultati migliori in termini di fito-estrazione. Al contrario, le specie più reattive (con elevata Kd) tendono a essere "naturalmente attenuate", senza essere interessate ai processi propri del fitorimedio. In fig. 9 si nota l'effetto mitigante dovuto alla presenza della coltura di fitorimedio.

Supponendo che l'evapotraspirazione potenziale della coltura in oggetto sia costante all'interno delle densità di semina investigate, l'unica variabile che influenza la richiesta idrica della vegetazione sarà il LAI o indice di area fogliare. Così, per misurare l'efficienza della fitoestrazione al variare della spaziatura tra le piante è stato comparato il caso del cadmio dove il LAI era uguale a

variable that influences the water demand of vegetation will be the LAI or foliar index. Thus, in order to measure the efficiency of phytoestration with the variation of spacing between plants, the case of cadmium was compared where the LAI was equal to 3 and the case with LAI value corresponds to 5. The water balance at elevated LAI values are correlated with an increased transpirational activity. For this reason contaminant uptake by the root apparatuses is expected to be greater. Because potential evapotranspiration was considered unchanged between the two experiments, potential evaporation decreased. This effect was completely offset by a corresponding increase in potential transpiration. Despite this, we did not observe any significant increase in transport within the rhizosphere. In addition, the water stress index has increased due to insufficient soil water conditions to fully compensate for the increase in transpiration.

3 e il caso con valore di LAI corrisponde è 5. Dal punto di vista del bilancio idrico con elevati valori di LAI sono correlati con una significativa attività traspirativa. Il trasporto advettivo del contaminante nella rizosfera è atteso essere maggiore. Secondo i risultati ottenuti dal test è stata osservata una diminuzione del tempo di fitorimedio. Perché l'evapotraspirazione potenziale è stata considerata invariata tra i due esperimenti, si è diminuita l'evaporazione potenziale. Questo effetto è stato completamente compensato da una corrispondente crescita nella traspirazione potenziale. Nonostante questo, non abbiamo osservato nessuno apprezzabile incremento del trasporto all'interno della rizosfera. Inoltre l'indice di stress idrico è aumentato a causa delle condizioni idriche del suolo non sufficienti per compensare appieno l'incremento della traspirazione.

Simulazioni 3-D con HGS

Le concentrazioni iniziali di cadmio misurate sono state interpolate sull'intera superficie dell'area sperimentale mentre i parametri caratteristici del cadmio sono stati presi dalla letteratura scientifica.
La simulazione ha la durata di 365 giorni. L'esecuzione della simulazione numerica è gestita dal file eseguibile phgs.exe che produce i file di output di bilancio idrico e del trasporto di cadmio. Infine il file eseguibile hsplot.exe genera file dat che sono caricati sul software Tecplot per consentire all'utente la visualizzazione dei risultati. Due scenari di simulazione sono considerati ai fini dell'effetto del fitorimedio: il primo scenario si basa sulla simulazione del suolo nudo (SN) mentre nel secondo scenario è riprodotto un impianto di pioppo (IP) su griglia rettangolare di 5×10 m. Il pioppo esercita una fitoestrazione con intensità presa in letteratura scientifica e pari a 7.5 mg/kg in 2 anni, ossia 0.01 mg/kg ogni giorno.

3-D simulations with HGS

The initial measured concentrations of cadmium were interpolated over the entire surface of the experimental area while cadmium key-parameters were taken from the scientific literature.
The simulation lasts 365 days. The execution of the numerical simulation is run by phgs.exe that produces the water balance and the transport of cadmium output file. Finally hsplot.exe executable generates .dat files that are uploaded in the Tecplot software to allow the user to view the results. Two simulation scenarios are considered for the effect of phytoremediation: the first scenario is based on the bare soil (SN) simulation while the second scenario considers a poplar plantation (IP) on a rectangular grid of 5 × 10 m. The poplar exerts a phytoextraction retrieved in the scientific literature and equal to 7.5 mg / kg in two years, corresponding to 0.01mg / kg each day.

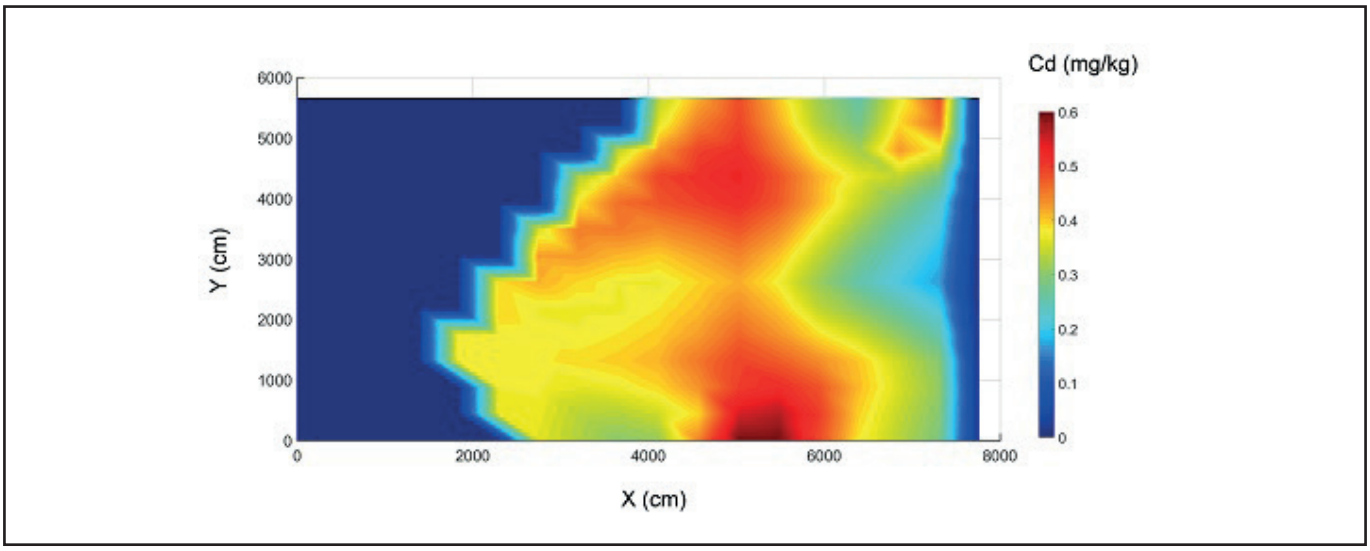


Fig. 10. Distribuzione delle concentrazioni di cadmio nell'area di studio

Figure 10. Distribution of cadmium concentrations in the study area.

E' evidente l'effetto della fitoestrazione di cadmio da parte delle radici di pioppo sulla superficie del suolo. La figura sottostante corrobora i risultati mostrati in Fig. 11 poiché sono riportate e confrontate le quantità di cadmio nell'intero dominio di suolo calcolate nello scenario SN (linea rossa) e IP (linea rossa). La riduzione dovuta alla fitoestrazione si quantifica in 23%, 29% e 41% dopo 15 giorni, 30 giorni e 100 giorni, rispettivamente. Il cadmio perso per outflow dopo 100 giorni di simulazione nello scenario SN è del 20%, mentre quello perso per outflow e fitoestrazione nello scenario IP è del 48%. Si deduce che il cadmio assorbito dalle radici sia il 28% rispetto alla quantità iniziale.

The effect of phytoextraction of cadmium is evident when comparing the results of these two scenarios. Fig. 12 compares the amount of cadmium in the entire soil domain calculated in the SN (red line) and IP (red line) scenarios. The reduction due to phytoextraction is quantified in 23%, 29% and 41% after 15 days, 30 days and 100 days, respectively. Cadmium loss in outflow after 100 days in SN simulation scenario is 20%and 48% in SN and IP respectively. It is inferred that the cadmium absorbed by the roots is 28% compared to the initial amount.

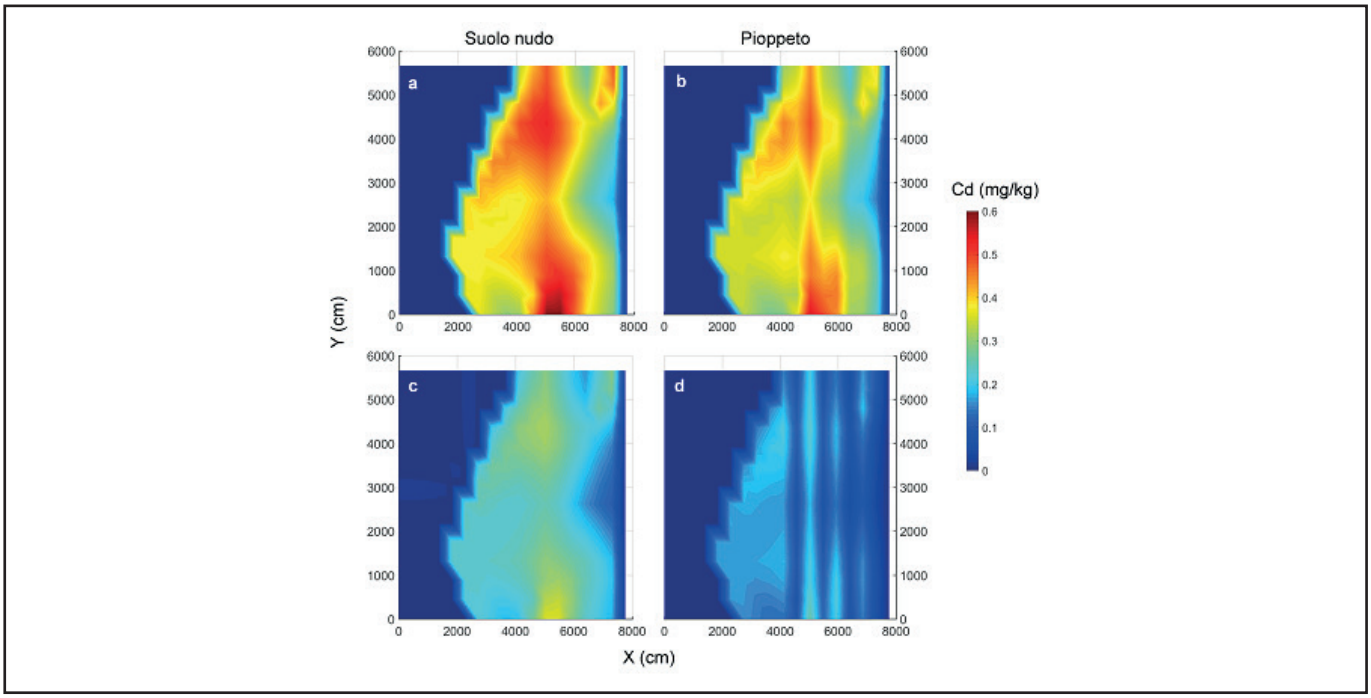


Fig. 11. Mappe interpolate delle concentrazioni di cadmio nell'area di studio (riprodotte in 2D) nei due scenari a 10 e 60 giorni dall'inizio della simulazione numerica in HGS. a) SN dopo 10 giorni; b) IP dopo 10 giorni; c) SN dopo 60 giorni; d) IP dopo 60 giorni.

Figure 11. Interpolated maps of cadmium concentrations in the study area (2D) in two scenarios: at 10 and 60 days from the starting of numeric simulation in HGS. a) SN after 10 days; b) IP after 10 days; c) SN after 60 days; d) after 60 days.

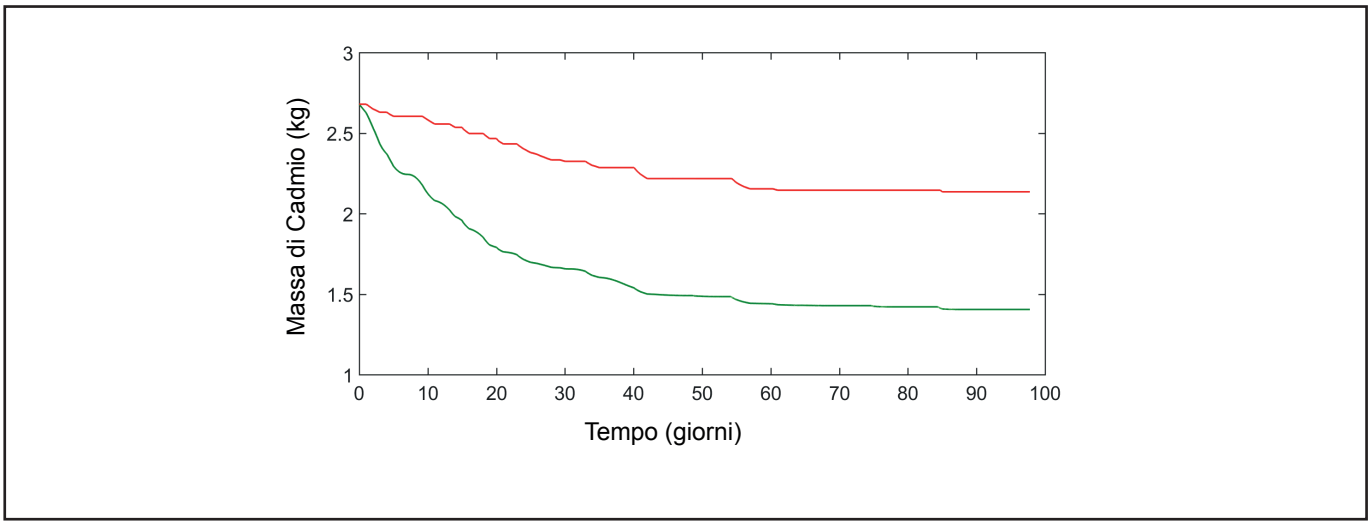


Fig. 12. Massa di cadmio nell'intero dominio di suolo in 3D nello scenario SN (linea rossa) e IP (linea verde) fino a 100 giorni di simulazione in HGS

Figure 12. Cadmium amount in the whole soil volume (3D) in SN (red line) and IP (green line) scenarios until to 100 days simulation in HGS.

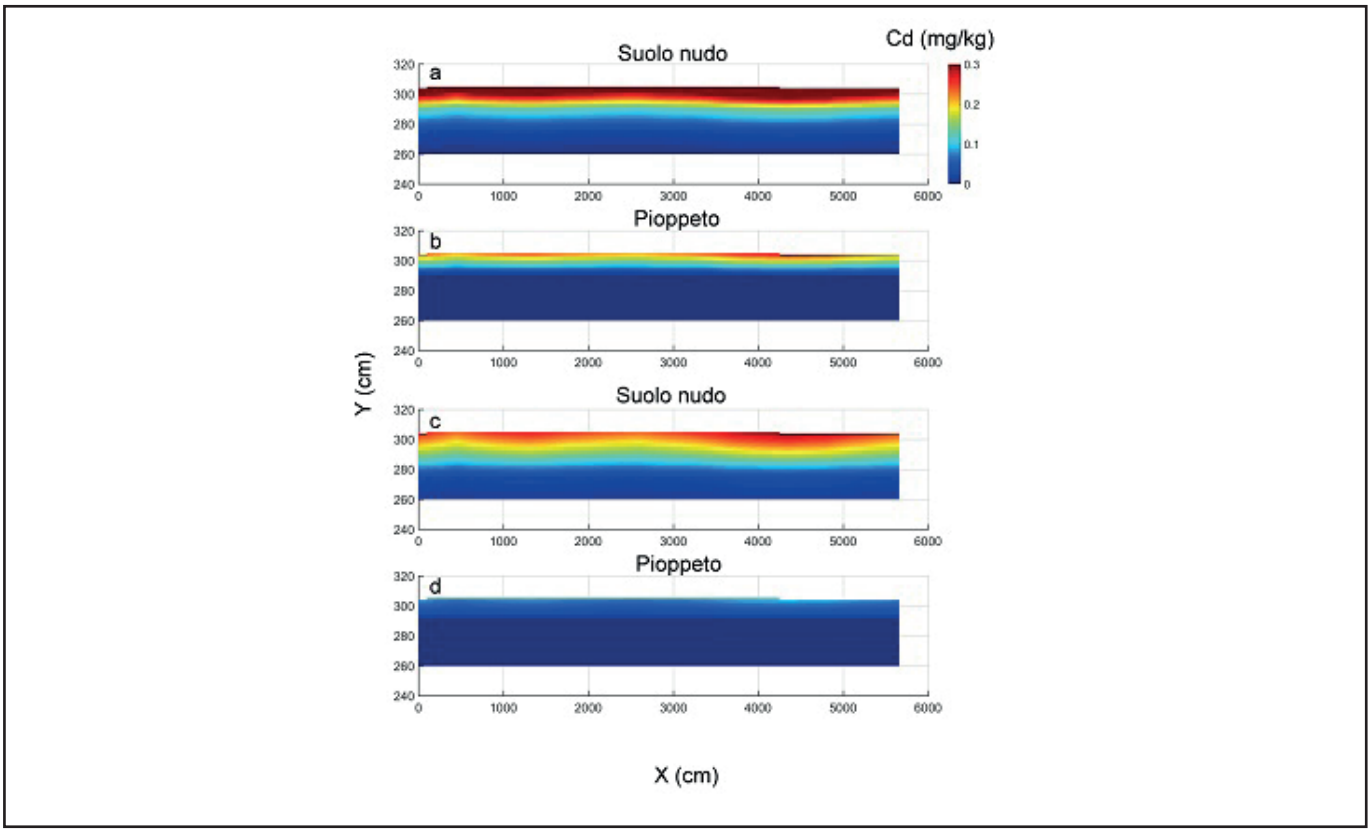


Fig. 13. Trasporto di cadmio lungo l'asse verticale del suolo nella sezione trasversale considerata dopo 15 giorni di simulazione a) SN; b) IP e dopo 60 giorni di simulazione c) SN; d) IP

Figure 13. Cadmium transport along the vertical axis of soil in the transversal section after 15 days of simulation a) SN; b) IP after 60 days of simulation c) SN; d) IP.

Infine abbiamo valutato il trasporto di cadmio lungo l'asse verticale nella sezione trasversale del sito con maggiore quantità di cadmio a due tempi di simulazione (dopo 15 e 60 giorni dall'inizio della simulazione in HGS).
Si dimostra così l'importanza fondamentale dell'effetto della fitoestrazione di Cd da parte delle radici di pioppo che riducono notevolmente il trasporto di Cd lungo il profilo di suolo. Si osserva infatti un rapido trasporto di Cd lungo il profilo di suolo nello scenario SN nei primi 20 cm di profondità dopo 60 giorni. Questo risultato implica un potenziale trasferimento di Cd fino a 12 m di profondità se il trasporto conserva l'attuale entità. Al contrario, l'impianto di pioppo riesce a impedire il trasporto verticale di Cd che potrebbe notevolmente rallentare il trasporto verticale del metallo inquinante.

16.5 Conclusioni

In questo studio sono state valutate le prestazioni di una tecnica di fito-rimedio di un sito contaminato da ioni metallici usando modelli numerici che descrivono i complessi processi in gioco sia a scala monodimensionale di pianta sia a scala tri-dimensionale di un intero appezzamento di terreno contaminato. In accordo con le assunzioni fatte e in relazione al modello e agli scenari analizzati, è stata verificata la bontà e la pratica utilità di una metodologia che consente di fornire utili informazioni per una efficace progettazione e implementazione di una tecnica di fito-rimedio. Lo stress idrico inibisce parzialmente l'attingimento del contaminante e previene la migrazione della piuma di inquinanti verso la falda idrica sotterranea.

Finally, we evaluated cadmium transport along the vertical axis in the inset of the site with larger amounts of cadmium at two simulation times (after 15 and 60 days after the start of the HGS in simulation).
This demonstrates the fundamental importance of the effect of Cd phytoextraction by poplar roots which greatly diminish the transport of Cd along the soil profile. It is in fact observed a rapid transport of Cd along the soil profile in the scenario SN in the first 20 cm of depth after 60 days. This result implies a potential transfer of Cd up to 12 m depth if transport to maintain current entity. On the contrary, the poplar plant can prevent the vertical transport of Cd that could dramatically slow the vertical transport of contaminant metal.

16.5. Conclusions

In this study were evaluated the performance of a technique of phytoremediation of a contaminated site by metal ions using numerical models that describe the complex processes involved both in terms of plant-dimensional scale is in 3D scale of an entire plot of land contaminated. According to the assumptions made at the beginning, and depending on the model and analyzed scenarios, it has been verified the goodness and the practical use of a methodology that allows to provide useful information for effective planning and implementation of a phytoremediation technique. Water stress partially inhibits the contaminant uptake and prevents the migration of the pollutants to the aquifer.

Bibliografia citata

Bonomo Luca (curatore), Bonifica di siti contaminati - Caratterizzazione e tecnologie di risanamento, 2005. ISBN: 9788838672682.

Kutilek, M., D.R. Nielsen, 1994. Soil hydrology. Geo-Ecology textbook. Cremlingen-Destedt, Germany.

Durner, W. 1994. Hydraulic conductivity estimation for soils with heterogeneous pore structure. Water Resour. Res. 30:211–223.

Romano, N. and A. Santini, 1999. Determining soil hydraulic functions from evaporation experiments by a parameter estimation approach: Experimental verifications and numerical studies. Water Resour. Res. 35:3343-3359.

Šimůnek, J., M.T. van Genuchten, M. Šejna, 2015. Recent Developments and Applications of the HYDRUS Computer Software Packages. Vadose Zone J. 15:1-25, doi:10.2136/vzj2016.04.0033.

Therrien R., R.G. Mclaren, E.A. Sudicky, S.M. Panday, 2007. HydroGeoSphere: A Three-dimensional Numerical Model Describing Fully-integrated Subsurface and Surface Flow and Solute Transport.

References

Bonomo, L. (editor), 2005. Bonifica di siti contaminati - Caratterizzazione e tecnologie di risanamento. ISBN: 9788838672682.

Kutilek, M., D.R. Nielsen, 1994. Soil hydrology. GeoEcology textbook. Cremlingen-Destedt, Germany.

Durner, W. 1994. Hydraulic conductivity estimation for soils with heterogeneous pore structure. Water Resour. Res. 30:211-223.

Romano, N., A. Santini, 1999. Determining soil hydraulic functions from evaporation experiments by a parameter estimation approach: Experimental verifications and numerical studies. Water Resour. Res. 35:3343-3359.

Romano, N., P. Nasta, M. Palladino, 2017. On characterizing the hydraulic response of soil for risk assessment. This book (Chaper 8).

Šimůnek, J., M.T. van Genuchten, M. Šejna, 2015. Recent Developments and Applications of the HYDRUS Computer Software Packages. Vadose Zone J. 15:1-25.

Brunner, P, C.T. Simmons, 2012. HydroGeoSphere: A Fully Integrated, Physically Based Hydrological Model. Ground Water 50:170-176.

17. Analisi dei costi di intervento e degli impatti economici sulle aziende agricole

T. Del Giudice, A. Coppola, G. Cicia

17.1 Premessa

La valutazione degli impatti economici derivanti dall'attività di risanamento è stata implementata grazie all'utilizzo di dati economici e tecnologici. In particolare, questi ultimi sono stati prodotti da diverse Unità di ricerca presenti nel progetto. L'obiettivo dell'analisi è stato quello di stimare l'impatto economico e sociale dell'azione di fitoremediation così come proposta nel progetto LIFE-ECOREMED. Le peculiarità di tale intervento, unite alle specificità economiche e sociali dell'area di riferimento, hanno imposto la strutturazione di un'analisi socio-economica maggiormente articolata.
Il primo aspetto da sottolineare è rappresentato dal fatto che l'area coinvolta presenta un'incidenza, a livello regionale, in termini di ampiezza, ricchezza prodotta e popolazione residente rilevante (8,4% della SAU campana; 22,5% della PLV agricola regionale; 51% della popolazione regionale[1] – stime ottenute nell'ambito delle attività progettuali di monitoraggio). Inoltre, le peculiarità connesse ai danni derivanti dall'inquinamento di un territorio unitamente ai costi e ai benefici relativi ad opere di risanamento costringono ad un ampliamento delle dimensioni dell'analisi. La valutazione, infatti, ha dovuto tener conto sia delle variabili classiche connesse a costi diretti, indiretti e ai benefici del risanamento in senso stretto sia di costi e benefici connessi ad elementi immateriali come la reputazione dell'area coinvolta e dei prodotti agro-alimentari locali. I beni alimentari prodotti nell'area interessata da ECOREMED sono stati percepiti dal mercato al consumo come cibi caratterizzati da un elevato rischio igienico-sanitario, nonostante la presenza di prodotti agricoli di elevata qualità, si pensi alle fragole, e con spiccato carattere di tipicità, come la Mozzarella di Bufala Campana DOP.
Sul piano metodologico, la valutazione socio-economica è stata strutturata su quattro direttrici di analisi.
La prima ha riguardato il territorio coinvolto nel suo insieme. L'obiettivo è stato quello di verificare l'impatto che l'emergenza ambientale produce sul settore agricolo in senso stretto in termini di perdita di competitività sui mercati nazionali ed esteri.
La seconda ha riguardato la valutazione dell'impatto sulle filiere agroalimentari dell'area, in termini di legami formali ed informali e di costi di transazione.
La terza è stata dedicata alla valutazione dei costi derivanti da una modifica della disponibilità a pagare dei consumatori relativamente ai prodotti ottenuti nell'area.
La quarta, infine, ha riguardato la stima dei costi e dei benefici derivanti dalla implementazione del protocollo ECOREMED nelle aree potenzialmente contaminate.
La differenza tra costi e benefici è stata utilizzata per identificare il costo sociale netto dell'attività di risanamento.

[1] Comprende la città di Napoli

17. Analysis of intervention costs and economic impact on farms

T. Del Giudice, A. Coppola, G. Cicia

17.1 Introduction

The economic impact of remediation was estimated on the basis of economic and technological data. The latter were produced by different research units within the project. The objective of the analysis was to estimate the economic and social impact of the phytoremediation as proposed by the LIFE-ECOREMED project. The characteristics of this intervention, together with the economic and social characteristics of the area concerned, created the need for a highly structured socio-economic analysis.
The first aspect to be considered is that the study area is relevant from different points of view: surface area, produced value and resident population (8.4% of Campania UAA; 22.% of gross output; 51% of regional population[1] – these estimates were obtained within the project monitoring activities). Furthermore, the nature and extent of damage from pollution to the areas concerned together with the costs and benefits of remediation make the analysis quite broad. Indeed, our evaluation had to consider basic variables linked to direct and indirect costs and benefits of the remediation activity, but also costs and benefits of intangibles such as the area's reputation and the reputation of its agro-food produce. Some examples of high-quality agricultural products are strawberries, while PDO Campania Buffalo Mozzarella is a highly typical product. In general, food products from the area affected by the ECOREMED project are perceived by the market as products with high safety risks.
On the methodological side, socio-economic analysis was structured on four levels. The first considered the area as a whole, the objective being to ascertain the impact of the environmental emergency upon the agricultural sector in terms of loss of competitiveness on national and international markets. The second regarded the evaluation of the impact on agro-food supply chains, in terms of formal and informal links and transactional costs. The third was devoted to evaluating costs stemming from a different willingness to pay by consumers for products from the area concerned. The fourth concerned estimation of costs and benefits linked to the implementation of the ECOREMED protocol in the polluted areas. The difference between costs and benefits was used to determine the net social cost of remediation.

[1] The city of Naples is included in this area.

17.2 Analisi socio-economica

La verifica dell'impatto causato dall'emergenza ambientale sul settore agricolo in senso stretto in termini di perdita di competitività sui mercati nazionali ed esteri e l'impatto sulle filiere agroalimentari dell'area sono stati valutati attraverso questionari implementati ad hoc.

L'emergenza ambientale ha avuto un impatto negativo su diversi aspetti legati alla salute e all'economia dell'area. Riguardo alla salute della popolazione residente studi scientifici hanno evidenziato un livello di rischio superiore a quello medio ma ancora non è stato possibile individuare il preciso legame fra patologie ed inquinanti presenti in loco.

Per gli aspetti economici, invece, una difficoltà notevole per la stima è stata rappresentata dalla notevole dinamicità, complessità e non omogeneità della filiera agroalimentare.

La stima dell'impatto causato dall'emergenza ambientale sul settore agricolo e sulle filiere è stata realizzata sia con un approccio qualitativo che con uno quantitativo. Il primo è stato implementato attraverso interviste a testimoni privilegiati (grandi imprenditori, commercianti, operatori pubblici). Queste hanno fornito una prima indicazione su come tutta la situazione ha agito sulla performance del settore agroalimentare, sui rapporti fra i vari operatori delle filiere, sulle tendenze in atto e sui possibili interventi pubblici e privati da implementare per attenuare gli effetti negativi. L'analisi quantitativa, invece, è stata effettuata attraverso un altro questionario somministrato ad un ampio campione di aziende agricole della zona. L'obiettivo di questo momento di analisi è stato quello di rilevare dati fisici ed economici delle produzioni, gli andamenti di questi nei periodi prima e dopo la diffusione mediatica della crisi ambientale dell'area, la propensione degli imprenditori nei confronti di diverse scelte strategiche.

L'ultimo stadio di analisi ha riguardato direttamente i consumatori. Al fine di stimare i possibili benefici derivanti dalle strategie di bonifica dell'area e di certificazione della salubrità dei prodotti locali, si è scelto come approccio l'analisi delle preferenze e dei comportamenti di acquisto dei consumatori.

La prima è stata realizzata attraverso l'applicazione di un modello a scelta qualitativa per le preferenze dichiarate (stated preference). La base teorica di tale modellistica è strutturata su due pilastri. Il primo è rappresentato dalla teoria di Lancaster (1966), secondo cui il valore dell'utilità di un consumatore per un bene può essere decomposta nelle utilità delle singole caratteristiche di questo. Il secondo, invece, fa riferimento alla Random Utility Theory (McFadden, 1974; Hanneman, 1984). Tale approccio teorico si basa sull'assunzione che benché si ipotizzi che il consumatore sia razionale e che quindi scelga massimizzando la propria utilità sotto il vincolo di bilancio, il processo di scelta sia affetto da errori derivanti da una cattiva percezione dell'individuo o da una incapacità di questo a valutare correttamente tutte le alternative presenti.

La stima di tale modello viene condotta spesso con tecniche econometriche del tipo Multinomial o Conditional logit model o, Logit con mistura di distribuzioni o a parametri

17.2 Socio-economic analysis

Appropriately designed surveys were used to ascertain the impact of the environmental emergency on the agricultural sector in terms of loss of competitiveness on national and international markets, but also the impact on the agro-food supply chains in the area.

The environmental emergency had a negative impact on the area in several respects linked to public health and the local economy. As regards health, scientific studies have highlighted higher health risks than the Italian average, although it is still not possible to point to pollution as a cause. In terms of economic aspects, a major difficulty has been the dynamicity, complexity and heterogeneity of the agro-food supply chain.

In order to evaluate the impact of the environmental emergency on the agricultural sector and on supply chains, the tools used belonged to both qualitative and quantitative methods. Qualitative analysis was implemented through interviews with stakeholders (entrepreneurs, retailers, public operators). The latter indicated how this situation harmed the performance of the agro-food sector, the relationships between the actors of the chains, but also how public and private interventions might soften the negative consequences. By contrast, quantitative analysis was carried out through a survey submitted to a wide sample of farms within the area. The aim of the survey was to gather technical and economic data about agricultural production in the periods before and after the circulation on the media of the news linked to the environmental emergency, and the propensity by entrepreneurs to undertake some strategies to overcome the problem.

The last phase of the analysis focused on consumers. In order to evaluate the possible benefits stemming from remediation of the area and the health certification of the local products, the approach selected entailed analysis of consumer preferences and purchasing behaviour. Preferences analysis was undertaken through the application of a qualitative choice model for the stated preferences. The theoretical base of the model is made of two pillars. The first is Lancaster's Theory (1966), which states that the value of the consumer's utility from a product can be defined as the sum of the utilities deriving from each attribute. The second pillar consisted of Random Utility Theory (RUM) (McFadden, 1974; Hanemann, 1984). This theory is based on the assumption that consumers, despite being rational and choosing to maximise their utility within budget constraints, can make mistakes from poor perception and incapacity to correctly evaluate all the available alternatives while shopping. Estimation of this model is usually undertaken with econometric tools such as Multinomial, Conditional, Random Parameters or Mixed Logit Models (Revelt & Train, 1998; Bennett & Blamey, 2001), which also allow calculation of the implicit prices of attributes and the measures of welfare changes.

The results of the different phases of the study were integrated in a single output as shown in Table 1. The results obtained can be grouped into three main categories. The first is related to the environmental

Tabella 1. Struttura dello studio – Stima degli impatti dell'emergenza ambientale.

Table 1. The structure of the study – Estimation of environmental emergency impact

Obiettivo	Analisi	Risultato	
		Qualitativo	Quantitativo
Impatto causato dall'emergenza ambientale sul settore agricolo in senso stretto	Interviste a testimoni privilegiati	Performance del settore agroalimentare Rapporti fra i vari operatori delle filiere tendenze in atto indicazioni supossibili interventi pubblici e privati Indicazioni supossibili interventi pubblici e privati	
Impatto causato dall'emergenza ambientale sugli operatori delle filiere agriocole	Somministrazione questionario ad aziende agricole	Aumento dei costi di transazione	Variazione della produzione Variazione dei prezzi
Analisi delle preferenze e del comportamento dei consumatori	Questionario sommministrato ad un panel rappresentativo di consumatori italiani	Strategie per mitigare la percezione negativa della proveninza del prodotto	Prezzi impliciti dei diversi attributi - stima della Disponibilità a Pagare (DAP) (focus su proveninza, certificazioni) Riduzione dell'Utilità derivante da attibuti non preferiti

randomizzati (random parameters logit; mixed logit) (Revelt e Train., 1998; Bennett e Blamey, 2001), grazie alle quali possono essere calcolati anche i prezzi impliciti degli attributi e le misure di cambiamento di benessere.

Con i risultati ottenuti nei diversi momenti di analisi descritti, si è potuto così ottenere un risultato complesso descritto in tabella 1.

I risultati ottenuti sono riconducibili a tre aree distinte di discussione. La prima è relativa all'impatto che la problematica ambientale ha avuto sulle filiere agroalimentari. In particolare la fase agricola appare indebolita dall'effetto congiunto dello scandalo ambientale e della crisi economica. La fase distributiva, rappresentata dalla grande distribuzione organizzata, è quella che maggiormente ha utilizzato questa vulnerabilità per applicare condizioni contrattuali ancora meno favorevoli per gli agricoltori. Riguardo alle aziende, seconda area di discussione, queste hanno visto aumentare i costi di transazione nei rapporti contrattuali con i clienti. Infatti, le aziende con maggiore vocazione all'export o rivolte a

impact of pollution on the agro-food supply chains: the agricultural part is weakened both by the environmental scandal and the economic crisis. Distribution, here represented by large retailers, is what most profited from this weakness to obtain far less favourable contracts for farmers. The second category is represented by farms: their transaction costs in contractual relationships with customers increased markedly. This scenario differed for the more export-oriented farms and those mostly focusing on intermediate clients, which experienced the lowest decreases in price and quantity of productions, but also had increasing contractual demands (their production underwent more extensive analysis during sales; the contracts had higher penalties, etc.). Finally, the third category concerns consumer behaviour during and after food scandals. In particular, analysis of food preferences shows that the origin of products negatively affects the choice of consumers. This behaviour can be mitigated only by implementing public and private

clienti intermedi moderni, hanno visto in maniera minore diminuire le quantità e i prezzi delle produzioni e in maniera maggiore aumentare diverse richieste contrattuali (maggiori analisi sulle produzioni al momento della vendita, maggiori penali ecc,). Infine, la terza area di discussione riguarda il comportamento dei consumatori durante e dopo gli scandali alimentari. In particolare, le analisi svolte sulle preferenze alimentari, indicano come la provenienza dei cibi dall'area interessata influenzi negativamente le scelte alimentari. Tale comportamento può essere mitigato solo dall'implementazioni di politiche pubbliche e private aventi come obiettivo l'informazione e la costruzione della fiducia nei consumatori.

17.3 Analisi della redditività delle aziende agricole

La stima dei costi e della redditività dei fattori produttivi che caratterizza le aziende ricadenti nelle aree inquinate scaturisce da una triplice esigenza:

- Fornire un contributo sull'economia agricola della zona interessata dai fenomeni di inquinamento.
- Disporre dei parametri economici necessari per stimare i mancati redditi cui mediamente vanno soggette le aziende agricole colpite direttamente dai fenomeni di inquinamento e, pertanto, destinatarie delle azioni di risanamento.
- Contribuire alla formazione di una base informativa utilizzabile per la determinazione di eventuali azioni di sostegno pubblico.

I criteri metodologici adottati per le stime in questione sono i seguenti:

a) Individuazione delle aziende da analizzare
Selezione delle aziende agricole aderenti alla Rete di Contabilità Agricola (RICA) che ricadono nell'area inquinata; in alternativa, rilevamento dei bilanci di un gruppo ragionato di aziende

b) Stratificazione del sub-campione
Al fine di cogliere le differenziazioni delle performance economiche in rapporto alle dimensioni delle unità e agli ordinamenti produttivi adottati, il campione di aziende RICA può essere stratificato per classe di SAU (Superficie Agricole Utilizzata) e per OTE (Orientamento Tecnico Economico) [2].

c) Informazioni fornite dai bilanci delle aziende RICA

- Fattori produttivi conferiti dall'imprenditore: capitale di esercizio, capitale fondiario, lavoro familiare
- Poste di bilancio: Ricavi, Costi espliciti e Reddito Netto

d) Reddito Netto di Riferimento (RNR) (Tosco, 2014)

- Per poter procedere alle valutazioni sulla redditività delle aziende vanno stimati anche i costi impliciti, o Reddito Netto di Riferimento (RNR), quale sommatoria delle remunerazioni attribuibili ai fattori conferiti dall'imprenditore, ricorrendo al criterio di costo di opportunità per la fissazione delle Remunerazioni Unitarie di Riferimento (RUR) dei fattori stessi
- Fissazione delle RUR: Per la fissazione del compenso

[2] L'indirizzo produttivo dell'azienda viene determinato sulla base dell'incidenza percentuale della Produzione Standard delle varie attività produttive, rispetto al totale aziendale.

policies with the aim of informing, and building the trust in, consumers.

17.3 Analysis of farm profitability

The estimation of costs and profitability of investments of farms in polluted areas stems from three needs:

- to contribute to the agricultural economics of the polluted area;
- to define the economic parameters required to estimate the average loss in revenues experienced by farms which directly encounter pollution problems; they are also beneficiaries of remediation;
- to contribute to an information base that can be used to determine possible public interventions.

The methodological criteria used for the estimation, herein described, are as follows:

a) *Identification of the farms to be analysed*. Selection of farms from the FADN database (Farm Accountancy Data Network) located in the area concerned. Collection of balance sheets from an appropriately selected sample of farms.

b) *Stratification of the sub-sample.* In order to identify the difference in economic performance in relation to size and type of production, the sample of FADN farms can be grouped according to UAA class and to type of farming (TOF)[2].

c) *Information from balance sheets of FADN farms*. Inputs: operating capital, land, family work. Budgetary factors: revenues, explicit costs and net income.

d) *Baseline net revenue (BNR) (Tosco, 2014)*. To be able to evaluate farm profitability, it is necessary to estimate the implicit costs, or baseline net revenue (BNR), as a sum of the revenues of each input, using the opportunity costs to estimate the baseline unit revenues (BUR) of each input. Identification of BUR: to estimate the revenue from family work (BUR_work) reference can be made to data from the agricultural workforce collective agreement[3]. Concerning the operating capital (BUR_cap) the comparison was made with the Government Bond Yields[4] and for the land (BUR_land) with the average ratio rent/value of land, estimated on FADN data. The computation of BNR can thus be expressed as follows: BNR=BUR_work*WORK+BUR_cap*CAP+BUR_land*LAND; where: WORK= family work (hours); CAP=operating capital; LAND= land.

e) *Baseline total cost (BTC)*. The sum of explicit costs from inputs: BTC=EC+BNR; where: EC=Explicit Costs;

f) *Profitability Index (PI)*. The general profitability of the farm is the ratio between NR/BNR; where NR=Net Revenue

[2] Type of farming is determined on the percentage of standard production activities in relation to whole-farm business.

[3] In Italy, the Ministry of Work and Social Policy publishes yearly the data relative to Identification of average daily remunerations of agricultural workforce for social security schemes.

[4] In Italy, the Ministry of Economics and Finance publishes yearly the total average yields of all types of bonds issued.

atteso attribuibile del lavoro familiare (RUR_lav) si può fa riferimento al contratto collettivo degli operai agricoli[3].

Per il capitale di esercizio (RUR_cap) si può far riferimento ai rendimenti dei Titoli di Stato[4] e per il capitale fondiario (RUR_capf) al rapporto medio canoni di affitto/valore fondiario dei terreni, stimato sui dati RICA.

Il calcolo del RNR può essere, pertanto, espresso come di seguito:

RNR = RUR_lav * LAV+RUR_cap*CAP+RUR_capf * CAPf

Dove: LAV = lavoro familiare impiegato (ore); CAP = capitale di esercizio; CAPf = capitale fondiario

e) Il Costo Totale di Riferimento
Corrisponde alla somma dei costi espliciti e dei costi attribuibili ai fattori produttivi conferiti, ovvero CTR= Ce + RNR

f) Indice di redditività
L'Indice di Redditività generale dell'azienda è dato dal rapporto RN/RNR

g) Remunerazioni unitarie dei fattori
La stima è effettuata ripartendo il RN in modo proporzionale alla composizione del RNR e, per ciascun fattore, dividendo la quota parte attribuita per la quantità conferita.

Tale criterio può essere formalizzato come indicato di seguito:

$$RUE_lavf = \frac{RN * \frac{RUR_lavf * LAVF}{RNR}}{LAVF} = \frac{RN}{RNR} * \frac{(RUR_lavf * LAVF)}{LAVF} = R * RUR_lavf$$

$$RUE_cap = \frac{RN * \frac{RUR_cap * CAP}{RNR}}{CAP} = \frac{RN}{RNR} * \frac{(RUR_cap * CAP)}{CAP} = R * RUR_cap$$

$$RUE_capf = \frac{RN * \frac{RUR_capf * CAPF}{RNR}}{CAPF} = \frac{RN}{RNR} * \frac{(RUR_capf * CAPF)}{CAPF} = R * RUR_capf$$

RUE_lavf = Remunerazione unitaria effettiva del lavoro familiare
RUE_cap = Remunerazione unitaria effettiva del capitale di esercizio
RUE_capf = Remunerazione unitaria effettiva del capitale fondiario

g) *Unit Input Remunerations*. The estimation is made by dividing the NR proportionally to the composition of BNR, and, for each input, dividing the share relative to the actual quantity. This criterion can be formalized as follows:

$$RUE_lavf = \frac{RN * \frac{RUR_lavf * LAVF}{RNR}}{LAVF} = \frac{RN}{RNR} * \frac{(RUR_lavf * LAVF)}{LAVF} = R * RUR_lavf$$

$$RUE_cap = \frac{RN * \frac{RUR_cap * CAP}{RNR}}{CAP} = \frac{RN}{RNR} * \frac{(RUR_cap * CAP)}{CAP} = R * RUR_cap$$

$$RUE_capf = \frac{RN * \frac{RUR_capf * CAPF}{RNR}}{CAPF} = \frac{RN}{RNR} * \frac{(RUR_capf * CAPF)}{CAPF} = R * RUR_capf$$

where:
EUR_{FWORK}= Effective Unit Remuneration of family work;
EUR_{CAP}= Effective Unit Remuneration of operating capital;
EUR_{LAND}= Effective Unit Remuneration of land.

[3] In Italia il Ministero del lavoro e delle politiche sociali, pubblica annualmente le tabelle relative alle Determinazioni delle retribuzioni medie giornaliere dei lavoratori agricoli ai fini previdenziali

[4] In Italia il Ministero dell'Economia e delle Finanze pubblica annualmente i redimenti medi totali e delle diverse tipologie dei titoli emessi.

Schema di rappresentazione dei risultati delle analisi effettuate sulle colture bio – depuranti

(Dati per ettaro, importi in euro)

Scheme for results of analysis made on phytoremediation crops.

Classe SAU / UAA Class	Numero Aziende / No of farms	SAU media / Average UAA	Lavoro (ore) / Work (hours)	Ricavi / Revenues	Costi espliciti / Explicit Costs	Reddito Netto / Net Revenue	Indice di redditività (IR) / Profitability Index (PI)	Remunerazioni unitarie reali / Real Unit Remunerations		
								Lavoro €/ora / Work €/hour	Capitale esercizio % / Operating Capital %	Capitale fondiario % / Land %
< 5										
5-10										
10-20										
20-50										
>50										
Medie										

Fonte: ns. elaborazioni su BDN RICA, INEA, 2014.

Source: Calculation from FADN data, INEA, 2014.

17.4 Analisi dei costi e della redditività delle colture bio - depuranti

La scelta delle colture bio – depuranti va operata tenendo presente:

- la natura dei suoli inquinati
- la disponibilità o meno di acque di irrigazione
- la sussistenza o meno degli sbocchi commerciali per le biomasse prodotte
- il quadro conoscitivo disponibile sulle tecniche e sui risultati produttivi ipotizzabili
- le performance economiche delle colture prescelte
- gli eventuali aiuti pubblici previsti a sostegno della diffusione di alcune specie.

I criteri adottabili per l'elaborazione del bilancio dei singoli processi produttivi elementari, per fornire indicazioni utili ai fini della formulazione di un giudizio di convenienza circa la scelta delle colture bio – depuranti, comprendono:

a) Definizione delle agrotecniche
   Le informazioni da utilizzare per la definizione delle agrotecniche e la determinazione dei costi e dei ricavi possono essere reperite attraverso i rilevamenti di campo e la letteratura tecnico-scientifica.
b) Definizione delle tipologie aziendali di riferimento
   Per la caratterizzazione delle tipologie aziendali con riferimento alle quali effettuare le stime vanno considerate:
- La forma di conduzione
- Il parco macchine
- Le quantità dei fattori produttivi conferiti:
  - lavoro manuale dei componenti della famiglia
  - capitale fondiario
  - capitale di esercizio

c) Aiuti pubblici
   Rilevare la eventuale possibilità di fruire di aiuti pubblici da conteggiare per il calcolo del Reddito Netto
d) Determinazione degli indicatori di performance economica
   In relazione alle ipotesi circa il tempo occorrente affinché l'operazione di bio – risanamento sortisca gli effetti sperati, gli indicatori vanno stimati su base

17.4 Analysis of costs and profitability of phytoremediation crops

The choice of phytoremediation crops has to be made according to:

- The type of polluted soils;
- The availability of irrigation water;
- The existence of a market for biomass;
- Knowledge of techniques and possible production results;
- Market performance of selected crops;
- Possibility of state subsidies for growing certain crops.

The criteria to draw up a balance sheet for each production activity, aimed at determining the viability of the phytoremediation crops, are as follows:

a) *Definition of agronomic techniques.* The information to be used to define the agricultural techniques and to determine costs and benefits can be collected through field collection and technical and scientific literature.
b) *Definition of the baseline farm type.* In order to characterize the farm type to be analysed, there are several elements to be considered:
- Type of farm management
- Pool of machinery
- Quantities of inputs:
  - Manual work from family members:
  - Land;
  - Operating Capital;

c) *Public Interventions.* Investigate the possibility of benefiting from state aid, in order to compute the net revenue.
d) *Determine the economic performance indexes.* Concerning the hypothesis that phytoremediation can yield results in ten years, the indexes take into account:
- Revenues;
- Explicit costs;
- Implicit costs (Remunerations of inputs)
- Net revenue;
- Profitability index;

decennale e comprendono:
- Ricavi
- Costi espliciti
- Costi impliciti (remunerazioni attribuibili ai fattori conferiti)
- Reddito Netto
- Indice di redditività
- Remunerazioni reali dei fattori produttivi conferiti

I criteri generali di stima degli indicatori di risultato sono gli stessi definiti per le analisi dei bilanci aziendali di cui al paragrafo 3.

- Remunerations of inputs.

The general criteria used to estimate the indexes are the same as those relative to the analyses of farm balance sheets in section 3.

Schema di rappresentazione degli indicatori di redditività delle aziende agricole per classe di SAU (Dati per ettaro, importi in euro)

Scheme for profitability indicators of farms per area size.(data per hectar and euro)

A -	**TIPOGIA DEL PROCESSO PRODUTTIVO / TYPE OF PRODUCTION ACTIVITY**			
	(specie, irrigazione, livello di meccanizzazione delle aziende, forma di conduzione delle aziende, destinazione, del prodotto finale, ecc.) *(species, irrigation, farm mechanization level, type of tenure, intended purpose of the final output, etc.)*			
B -	**COSTO DI PRODUZIONE DI RIFERIMENTO (CPR) / BASELINE PRODUCTION COST (BPC)**	(Euro)	Valori %	
	B1. Costi espliciti (Ce) / B1. Explicit costs (EC)			
	1.Salari / 1.Wages			
	2.Noleggi / 2.Rent			
	3.Mezzi tecnici e materiali / 3.Material and technical resources			
	4.Quote (ammortamenti, manutenzioni, ass.ni) / 4.Charges (depreciation, maintenance, assurances)			
	5.Oneri generali / 5.General costs			
	Totale / Total			
B2.	**Reddito Netto di Riferimento (RNR) / Baseline net revenue (BNR)**			
	1.Lavoro familiare / 1.Family work			
	2.Interessi / 2.Interest			
	3.Costo d'uso del capitale terra / 3.Land use cost			
	4.Direzione e amministrazione / 4.Direction and management			
	Totale / Total			
	Totale CPR / Total BPC			
C -	**ANALISI DEI RISULTATI / ANALYSIS OF RESULTS**			
	1. Ricavi (Ri) / 1. Revenues (R)			
	- Prodotto principale / Principal product			
	- Prodotto secondario / Secondary product			
	Totale / Total			
	2.Aiuti / 2.State aid			
	3.Reddito netto (RN = Ri – Ce + aiuti) / 3.Net revenue (NR = R – EC + aids)			
	4. Indice di redditività al lordo degli aiuti (RN/RNR) / 4. Profitability index with aid (NR/BNR			
	5. Indice di redditività al netto degli aiuti / 5. Profitability index before aid			
	6. Remunerazioni unitarie fattori prod., al netto degli aiuti / 6. Unit input remunerations before aid			
	- Lavoro familiare (euro/ora) / Family work (euro/hour)			
	- Capitale di esercizio e di investimento (%) / Business and operating capital (%)			
	- Capitale terra (%) / Land (%)			
	- Direzione e amministrazione (% sui ricavi) / Direction and management (% revenues)			
	7.Fabbisogno di lavoro manuale (ore) / 7.Manual work requirement (hours)			

17.5 Stima dei costi di intervento

L'ultima fase delle analisi comprende la stima degli impatti economici derivanti dagli interventi di risanamento, sulla base di una distinzione delle aree per tipo e livello di inquinamento e, per ognuna di esse, della natura delle misure di risanamento adottabili.

Nel caso della Terra dei Fuochi, le indagini propedeutiche del GdL interministeriale hanno consentito di individuare tre tipologie di aree di intervento (vedi capitolo 1):

- Aree interdette alle coltivazioni alimentari (classe D)
- Aree sottoposte al vincolo di analizzare i campioni delle derrate prima della loro immissione sul mercato (classe B)
- Aree circostanti i siti già destinati alla discarica dei rifiuti, definite anche aree di rispetto

La principale funzione della terza categoria di aree consiste nella separazione fisica tra le discariche e le produzioni agricole circostanti, con finalità soprattutto di tipo paesaggistico-ambientale, tesa a favorire, in particolare, il recupero della reputazione delle produzioni dell'area presso i consumatori. Va precisato che la creazione di buffer è ipotizzata per i soli suoli agricoli circostanti le discariche[5].

Le informazioni utilizzabili per la stima degli impatti scaturiscono:

- dalle analisi economiche sull'agricoltura delle aree in cui ricadono i siti inquinati
- dalle analisi economiche sulle colture bio – depuranti
- dai rilevamenti di campo riguardanti le aziende agricole coinvolte
- dalle analisi sui costi di monitoraggio dei fenomeni di inquinamento
- dalle informazioni disponibili sui metodi di risanamento di altra natura

A - Aree interdette alle coltivazioni alimentari

In relazione ai risultati degli accertamenti, dette aree possono essere a loro volta distinte in tre categorie:

A1 – Aree inquinate

a) Stima dell'eventuale diminuzione di valore fondiario dovuto all'inquinamento dei suoli, mediante la capitalizzazione delle remunerazioni del capitale fondiario quali risultano dalle analisi dei bilanci RICA e dei bilanci delle colture bio-depuranti e tenendo altresì conto dei riscontri operanti attraverso interviste a testimoni di qualità
b) Stima dei mancati redditi, provocati dal divieto di praticare colture alimentari, per un periodo di 10 anni
c) Scelta della coltura bio – depurante e stima dei redditi ritraibili dalla stessa
d) Messa a punto di un protocollo (Fiorentino et al. 2013) e dei relativi costi di applicazione, che comprenda:
   - caratterizzazione dei suoli
   - interventi miglioratori (es. fertilizzazione con compost)
   - monitoraggio nel tempo dei fenomeni di inquinamento

[5] Per la Terra dei Fuochi la delimitazione delle prime due tipologie di aree è stata operata con provvedimento ministeriale, sulla base degli esami compiuti da una apposita Commissione tecnico-scientifica.

17.5 Estimation of intervention costs

The last phase of analysis is the estimation of economic impacts from phytoremediation interventions, dividing the area according to type and intensity of pollution, and, for each, the viable remediation activities.

In the case of the *Terra dei Fuochi* (Land of Fires), early investigations made by the government identified three types of intervention areas (see Chapter 1):

- Areas with a ban on food crops (Class D);
- Areas in which food products have to be analysed before entering the market (Class B);
- Areas surrounding landfill sites, defined as buffer zones. Their role is the physical separation between landfills and agricultural lands; mainly with a landscape feature, aimed at restoring the reputation of such products among consumers. It should be pointed out that the creation of buffer zones is only envisaged for farmland surrounding landfill sites[5].

The information used to estimate the impacts come from:

- Economic analysis of the agriculture of polluted areas;
- Economic analysis of phytoremediation crops
- Field data about the farms concerned;
- Analysis of pollution monitoring costs;
- Information on other types of remediation activities.

A – Areas where food crops are prohibited

In relation to the results of our investigations, such areas can, in turn, be grouped into three categories, for which the estimation of economic impacts from phytoremediation was implemented in different steps:

A1 – Polluted areas

a) Estimation of the possible decrease in land value due to the contamination of soils, carried out by computing land income, stemming from FADN data and phytoremediation crop balance sheets, together with information from stakeholders;
b) Estimation of lost revenues, due to the ban on food crops, for ten years;
c) Choice of phytoremediation crop and estimation of its revenues;
d) Definition of a protocol (Fiorentino et al., 2013) and of implementation costs, which include:
   - Soil characterization;
   - Soil improvement measures (e.g. compost fertilization);
   - Pollution monitoring.

A2- Polluted areas with waste above ground

a) Estimation of the possible decrease in land value due to soil contamination;
b) Estimation of lost revenues for ten years;
c) Choice of phytoremediation crop and estimation of its income;
d) Definition of a protocol, which includes:
   - Removal of aboveground waste;
   - Soil characterization;
   - Soil improvement measures (e.g. compost

[5] Identification of the first two groups of areas, in the case of the Terra dei Fuochi, was made by a special commission appointed by the government.

A2 – Aree inquinate con rifiuti in superficie
a) Stima dell'eventuale diminuzione di valore fondiario dei terreni attribuibile all'inquinamento dei suoli
b) Stima dei mancati redditi per un periodo di 10 anni
c) Scelta della coltura bio - depurante e stima dei redditi ritraibili
d) Messa a punto di un protocollo che comprenda:
- asportazione dei rifiuti superficiali
- caratterizzazione dei suoli
- interventi miglioratori (es. fertilizzazione con compost)
- monitoraggio nel tempo dei fenomeni di inquinamento

A3 – Aree inquinate con rifiuti interrati
Per questo tipo di aree si ritiene che il risanamento mediante colture bio - depuranti non sia efficace. Pertanto, dato l'elevato costo cui si andrebbe incontro se sottoposte a risanamento mediante asportazione dello strato di suolo inquinato, se ne ipotizza l'abbondono ai fini agricoli.
In tale prospettiva il danno che ne scaturisce per l'economia agricola dell'area può essere assimilato al valore fondiario di terreni interessati.

B - Aree sottoposte al vincolo di analisi di campioni delle derrate prima della loro immissione sul mercato
Stima del costo delle analisi, riferito a ciascun ordinamento produttivo adottato e per una durata del vincolo stabilita dalle autorità preposte

C – Calcolo dei costi totali
- Calcolo del costo totale delle operazioni di biorisanamento
  CBR = MR + AR + CM + AF - RB
  Dove:
  o CBR = Costo del bio - risanamento
  o AR = Asportazione rifiuti superficiali
  o CM = Controlli e monitoraggi
  o MR = Mancati redditi
  o AF - Abbassamento dei valori fondiari
  o RB = Redditi ritraibili dalle colture bio-depuranti
- Calcolo del costo di risanamento dei terreni inquinati ricorrendo ai metodi usuali (es. Soil flushing, asportazione e deposito in discarica dello strato di suolo inquinato, ecc.) e confronto con il costo di risanamento tramite colture bio - depuranti.

D - Aree di rispetto (Buffer), circostanti le discariche
a) Messa a punto di un protocollo che comprenda:
- Caratterizzazione dei suoli
- Monitoraggio nel tempo dei fenomeni di inquinamento

b) Stima dell'eventuale diminuzione di valore fondiario dovuto al cambiamento dell'ordinamento produttivo
c) Stima dei mancati redditi, quale differenza tra i redditi mediamente fruibili con le attività produttive ordinarie e quelli derivanti dalla coltura bio - depurante prescelta.

fertilization);
- Pollution monitoring.

A3 – Polluted areas with underground waste
For such areas, phytoremediation is not effective. Furthermore, due to the high costs of removing the first layer of polluted soil, agricultural use is not contemplated. Thus the loss for the agricultural economy is the total land value.

B - Areas in which food production has to be analysed before entering the market
Analysis of estimated costs in relation to the crops chosen and with timing defined by the authorities.

C- Computation of total costs
- Total cost of phytoremediation
  PRC=MR+WR+IM+VD+RC
  where:
  o PRC= Phytoremediation cost
  o MR= Missed revenues
  o WR= Aboveground waste removal
  o IM= Inspections and Monitoring
  o VD= Land value decrease
  o RC= Revenues from phytoremediation crops
- Calculation of conventional remediation costs (e.g. soil flushing, removal of the first layer of soil, etc…) and comparison with phytoremediation costs.

D- Landfill buffer zones
a) Definition of a protocol with:
- Soil characterization
- Pollution monitoring

b) Estimation of the possible land value decrease due to the change in crop
c) Estimation of lost revenues, as a difference between the average revenues from normal production and revenues from the phytoremediation crop chosen.

E – Costs of exploratory studies and investigations
The pollution status for part of the area is defined after field investigations and analyses imposed by the authorities in charge. The relative costs are borne by different participating authorities. Such costs include suitably allocated financial resources, but also indirect costs of using their staff to perform special tasks.

F – Considerations about the results of the analyses
The final part is devoted to analysing the results, in the light of the project objectives. In the case of the so-called "*Terra dei Fuochi*", the salient elements emerging from the analyses are:
- The main cost of the interventions subsequent to the early emergency concerns the direct and indirect costs borne by Public Administration for the large-scale field investigations on possible water and soil pollution;
- The economic impact on the normal pre-existing agricultural activities in the polluted areas where farming was banned but also in future buffer zones, mostly consists of lost revenue due

E - Costi relativi agli studi e alle indagini preliminari
La dichiarazione dello stato di potenziale contaminazione di una determinata parte del territorio è operata sulla base delle risultanze delle indagini di campo e di accertamenti strumentali disposti dalle autorità preposte. I costi relativi sono sostenuti dai diversi soggetti istituzionali coinvolti e comprendono sia le risorse finanziarie specificamente stanziate e sia gli oneri indiretti dovuti all'utilizzo del personale dipendente per compiti straordinari.

F – Considerazioni sui risultati delle analisi
La parte finale degli accertamenti e delle stime attiene all'esame dei risultati, valutati con riferimento alle finalità perseguite. Con riferimento al caso della Terra dei Fuochi, si segnalano alcune fra le più significative evidenziazioni emerse dalle analisi:

- la principale voce di costo degli interventi che hanno fatto seguito ai primi allarmi è rappresentata dagli oneri diretti e indiretti sostenuti dalla Pubblica Amministrazione per i vasti accertamenti strumentali sui possibili inquinamenti del suolo e delle acque;
- l'impatto economico sulle ordinarie attività agricole già praticate nelle aree inquinate e interdette e in quelle che dovrebbero in futuro svolgere la funzione tampone attiene soprattutto ai mancanti redditi correlati all'introduzione delle colture biodepuranti, che hanno carattere estensivo;
- i costi diretti e indiretti correlati al disinquinamento con la tecnica del fitorisanamento sono enormemente inferiori a quelli previsti con azioni di altra natura;
- l'impatto economico su una parte delle aziende coinvolte sono contenuti in conseguenza del fatto che gli inquinamenti in molti casi riguardano particelle disseminate e di piccole dimensioni;
- un danno che non riguarda solo le aree classificate inquinate ma anche quelle circostanti è rappresentato dall'abbassamento dei valori fondiari.

to the growing of usually extensive crops for phytoremediation;
- Direct and indirect costs of conventional soil remediation are much lower compared to other methods;
- In some cases, the economic impact on farms is small, due to the fact that the pollution can be limited to some small scattered areas;
- The decrease in land value constitutes damage that affects not only the polluted areas, but all the surrounding zones.

Riferimenti bibliografici

Bennett J., Blamey R. (2001), *The choice modelling approach to environmental valuation*, Edward Elgar, USA

Hanemann W.M. (1984), Welfare Evaluations in Contingent Valuationexperiments with Discrete Responses, *Amaerican Journal of Agricoltural Economics*, 66, 332-41.

Lancaster K. J. (1966), A new approach to consumer theory, *Journal of Political Economy*, LXXIV, April.

McFadden D. (1986), The choice theory approach to Marketing Research, *Marketing Science*, vol.5(4), 257-297.

Revelt D., Train K. (1998), Mixed Logit with repeated choices: households choices of appliance efficiency level, *The Review of Economics and Statistcs*, vol. LXXX, n. 4, 647-57.

Fiorentino N., Fagnano M., Adamo P., Impagliazzo A., Mori M., Pepe O., Ventorino V., Zoina A. (2013), Assisted phytoextraction of heavy metals: compost and Trichoderma effects on giant reed (Arundo donax L.) uptake and soil N-cycle microflora, Italian Journal of Agronomy 2013; volume 8:e29.

Tosco D. (2014). Redditività e costi di produzione delle aziende agricole: aspetti metodologici e procedure applicative, in Redditività e costi delle aziende agricole: Un'analisi basata sul campione RICA (a cura di Coppola A., Tosco D.), Collana Manlio Rossi-Doria, volume n.25, ISBN 978-88-495-2788-9, ESI, Napoli.

References

Bennett J., Blamey R. (2001), *The choice modelling approach to environmental valuation*, Edward Elgar, USA

Hanemann W.M. (1984), Welfare Evaluations in Contingent Valuation experiments with Discrete Responses, *American Journal of Agricultural Economics*, 66, 332-41.

Lancaster K. J. (1966), A new approach to consumer theory, *Journal of Political Economy*, LXXIV, April.

McFadden D. (1986), The choice theory approach to Marketing Research, *Marketing Science*, vol.5(4), 257-297.

Revelt D., Train K. (1998), Mixed Logit with repeated choices: households' choices of appliance efficiency level, *The Review of Economics and Statistics*, vol. LXXX, n. 4, 647-57.

Fiorentino N., Fagnano M., Adamo P., Impagliazzo A., Mori M., Pepe O., Ventorino V., Zoina A. (2013), Assisted phytoextraction of heavy metals: compost and Trichoderma effects on giant reed (Arundo donax L.) uptake and soil N-cycle microflora, Italian Journal of Agronomy 2013; volume 8(4), 29

Tosco D. (2014). Redditività e costi di produzione delle aziende agricole: aspetti metodologici e procedure applicative, in Redditività e costi delle aziende agricole: Un'analisi basata sul campione RICA (Coppola A., Tosco D. Eds.), Collana Manlio Rossi-Doria, volume no. 25, ISBN 978-88-495-2788-9, ESI, Naples.

Conclusioni

Conclusions

18. Limiti e prospettive dell'applicazione del protocollo Ecoremed

M. Fagnano

Per definire se un sito necessita di interventi di bonifica, di messa in sicurezza o di ripristino ambientale, la cosa più importante è ottenere dati di buona qualità sulle condizioni fisiche e chimiche del suolo. L'aspetto cruciale quindi è definire dei protocolli di campionamento e di caratterizzazione che consentano di conoscere nel dettaglio l'entità della contaminazione e soprattutto la sua variabilità spaziale all'interno degli appezzamenti in esame. Come detto nel capitolo 1, è del tutto evidente che un solo campione di terreno non può essere rappresentativo delle condizioni di 1 ha (10.000 m^2). Pertanto, le metodologie proposte nei capitoli 5, 6, 7 e 8 rappresentano la scelta migliore in termini sia di contenimento dei costi, sia di qualità e rappresentatività spaziale dei dati. Ottenere una mappatura di grande dettaglio spaziale sul livello di contaminazione può orientare gli interventi verso una "bonifica di precisione" che coniuga le esigenze economiche (riduzione dei costi) con le esigenze di protezione ambientale (identificazione delle tecniche più idonee nelle diverse aree di un sito), riservando, ad esempio, le tecniche più onerose come il *soil washing* (cfr. cap. 11), alle piccole superfici fortemente contaminate e quindi non trattabili con il fitorisanamento.

Per quanto riguarda le diverse azioni specifiche delle tecniche di bio-fitorisanamento (cfr. cap. 9 e 10), le prospettive ed i limiti di applicabilità dipendono dalle caratteristiche del sito:
A) Sito inquinato da Elementi Potenzialmente Tossici (c.d. metalli pesanti)

18. Limits and perspectives of the application of the Ecoremed Protocol

M. Fagnano

To determine whether a site requires remediation, safety interventions or environmental restoration, the most important thing is to obtain good data on the physical and chemical conditions of the site. Therefore the crucial aspect is to define sampling and characterization protocols which allow the extent of contamination and especially its spatial variability within the plots under exam to be ascertained in detail.
As mentioned in the foreword, it is clearly evident that a single soil sample may not be representative of the conditions found in one hectare (10,000 m^2). Therefore, the proposed methodologies in Chapters 5, 6, 7 and 8 represent the best choice in terms of cost containment, quality and spatial representativeness of the data. Very detailed spatial mapping on the level of contamination can steer action towards "precision remediation" which combines economic requirements (cost reduction) with those of environmental protection (identification of the most suitable techniques in different areas of a site), reserving, for example, the more expensive techniques, such as soil washing (see Chap. 11), for small highly contaminated surfaces which cannot be treated with phytoremediation.

With regard to the different specific actions of bio-phytoremediation techniques (see Chap. 9 and 10), the perspectives and limits of applicability depend on site characteristics :

A) Sites polluted by potentially toxic elements (so-called heavy metals)
In this case it is necessary to carry out r**emediation**

In questo caso è necessario effettuare la **Bonifica** (eliminazione progressiva della frazione biodisponibile degli EPT) quando gli EPT sono presenti in forma biodisponibile (cfr. cap. 6b) e assorbibile dalle colture agrarie in concentrazioni superiori alle normative Comunitarie (cfr. cap. 7 e 9) determinando quindi un rischio inaccettabile per la salute e per l'ambiente, ipotizzando il mantenimento dell'uso agricolo del suolo. In questo caso le biomasse potrebbero essere contaminate se la specie che usiamo assorbe i metalli e li trasloca verso la parte aerea (**es. pioppo, eucalipto, brassicacee**). Invece, le biomasse potrebbero non essere contaminate nel caso in cui la specie usata assorbe i metalli ma NON li trasloca verso la parte aerea, accumulandoli nella parte ipogea (es. radici, rizomi, come nel caso dell'**Arundo donax**). In questo caso i sottoprodotti del fitorisanamento sono sia la parte aerea (canne, rami,...) non contaminata, sia la parte ipogea contaminata. Pertanto queste 2 frazioni della pianta dovranno essere trattate con tecnologie differenti.

In questi siti, si potrebbe invece usare il fitorisanamento per la **Messa in sicurezza** (interruzione del percorso di esposizione) quando vogliamo impedire che i contaminanti si sollevino in aria e da lì raggiungano l'uomo minacciandone la salute, ma anche nel caso in cui non si prevede di restituire il suolo all'uso agricolo (es. aree industriali, pertinenze stradali,..). La messa in sicurezza può essere ottenuta sia con piante che non traslocano (es. **A.donax** o **Phragmites australis** per realizzare un canneto) sia piante che traslocano nella parte aerea (es. **pioppi + prato** permanente per realizzare un bosco inerbito). In quest'ultimo caso facciamo sia messa in sicurezza (immediata) che bonifica (molto più lenta). Nel caso una messa in sicurezza operativa che si applica

(progressive elimination of the PTE bioavailable fraction) when the PTEs are present in their bioavailable form (see Chap. 6) and when they are absorbed by crops in concentrations exceeding EU standards (see Chap. 7 and 9), thereby resulting in an unacceptable risk for human health and the environment, and if the ultimate aim is to restore the agricultural use of the land. In this case, the biomass may be contaminated if the species that we use absorbs metals and translocates them towards the aerial part (**e.g. poplar, eucalyptus, brassicaceae**). Instead, the biomass may not be contaminated in the case in which the species used absorbs metals but does NOT translocate them to the aerial part but accumulates in below-ground parts (eg. roots, rhizomes, as in the case of **Arundo donax**). In this case the by-products of phytoremediation are both the non-contaminated aerial part (reeds, branches, ...) and the contaminated underground part. Therefore, these two fractions of the plant must be treated with different technologies.

On such sites, phytoremediation can be used for **safety measures and securing the site** (interrupting the exposure pathway) when the aim is to prevent suspension in the air of contaminants, and hence any contact with the resident population, but also when there is no plan to restore the soil for agricultural use (e.g. intended use as industrial areas or for infrastructures). Safety measures can be obtained both with plants that do not translocate (eg. **A. donax or Phragmites australis** to create a field of reeds) and plants that translocate into the aerial part (e.g. **poplars** + permanent **grassland** to achieve a turfed forest). In the latter case we carry out both safety measures (immediate) and remediation (much slower). In the case of operational safety measures, applied for non-disused and still active sites, phytoremediation techniques proposed in the Ecoremed protocol are sufficient to

per siti non dismessi ed ancora in attività, le tecniche di fitorisanamento proposte nel protocollo Ecoremed sono sufficienti a garantire il raggiungimento degli obiettivi (interruzione dei percorsi di esposizione).
Invece, nel caso della messa in sicurezza permanente, che si applica ai siti dismessi, si deve prevedere l'isolamento definitivo delle fonti inquinanti rispetto alle matrici ambientali circostanti. In questo ambito il protocollo Ecoremed è in grado di garantire l'isolamento superiore, ma deve essere affiancato ad altre tecniche ingegneristiche per garantire anche l'isolamento laterale ed inferiore (es. Jet grouting, barriere ad iniezione, barriere idrauliche, diaframmi *cemento*-bentonite,…).

B) Inquinamento da EPT non biodisponibili e/o da composti organici
Diverso è il caso in cui il sito presenta inquinamento da EPT non biodisponibili (es. cromo) o da inquinanti organici (es. idrocarburi, DDT, IPA,…). In questi casi il fitorisanamento si pone l'obiettivo della messa in sicurezza del sito, mentre la bonifica eventualmente si fa con i batteri e funghi che biodegradano gli inquinanti organici (Bioremediation), come riportato nel cap. 10. In tutti questi casi le biomasse usate non saranno contaminate, qualunque sia la specie usata, e potranno essere utilizzate senza limitazioni normative.

C) Siti degradati fisicamente e paesaggisticamente.
Il caso più frequente riscontrato non solo nell'Agro Aversano, ma anche in diverse zone della regione Campania (cfr. cap. 3 e 4) è invece il degrado fisico e paesaggistico legato, ad esempio, al compattamento dei suoli, alla sua destrutturazione ed alla presenza di rifiuti. In questi casi, oltre alla rimozione ed allo smaltimento dei rifiuti, se separabili dalla matrice suolo, il fitorisanamento può essere usato per il **Ripristino ambientale** e delle funzioni agricole ed ecosistemiche dei suoli destinati ad uso agricolo. In questo caso sono più opportune le tecniche di fitorisanamento assistito, come previsto dal protocollo Ecoremed, che prevedono l'uso della vegetazione congiuntamente a tecniche agronomiche di risanamento fisico-biologico dei suoli (fertilizzazione con compost, inoculo di micorrize, lavorazioni profonde, inerbimenti, sovesci, ...).

In entrambe le tipologie di siti A e B, sono obbligatorie le tecniche di monitoraggio degli effetti dell'intervento che sono riportati nei cap.13 e 14.
Sono anche opportune tecniche di valutazione degli impatti degli interventi sul paesaggio, sul sistema suolo-pianta-atmosfera, sulle condizioni socio-economiche (cfr. cap. 15, 16 e 17).

ensure the achievement of the objectives (interruption of exposure pathways). Instead, in the case of permanent safety measures, applied to disused sites, the polluting sources in relation to the surrounding environmental matrices have to be definitively isolated. In this context, the Ecoremed protocol is able to ensure isolation on the upper side, but it must also be linked to other engineering techniques to ensure lateral and bottom isolation (e.g. jet grouting, injection barriers, hydraulic barriers, cement-bentonite diaphragms, ...).

B) Pollution from non-bioavailable PTEs and/or organic compounds
The case in which there is pollution in the site from non-bioavailable PTEs (e.g. chromium) or from organic pollutants (eg. hydrocarbons, DDT, PAHs, …) is different. In such cases, phytoremediation has the objective of a safety measure/securing the site, while remediation is possibly carried out with bacteria and fungi that biodegrade the organic pollutants (bioremediation), as reported in chapter 10. In all such cases, the biomass used will not be contaminated, whatever the species used, and it can be used without regulatory restrictions.

C) Physically and scenically degraded sites
The most frequently case found not only in the Agro Aversano, but also in various areas in the region of Campania (see Chap. 3 and 4), is the physical and landscape degradation due, for example, to soil compaction, to its destructuring and to the presence of waste. In such cases, in addition to the removal and disposal of the waste in question, if separable from the soil matrix, phytoremediation can be used for **environmental restoration**, comprising restoration of agricultural and ecosystem functions of soils to be used for farming. In this case the most appropriate technique is assisted phytoremediation, as envisaged by the Ecoremed protocol, involving the use of vegetation in conjunction with agronomic physical-biological soil remediation techniques (fertilization with compost, inoculum of mycorrhiza, deep tillage, turfing, green manure, ...).

In site types A and B, the effects of measures presented in chapters 13 and 14 have to be monitored. Techniques for evaluating the impact of interventions on the landscape, on the soil-plant-atmosphere system and on socio-economic conditions (see Chap. 15, 16 and 17) are also appropriate.

19. I casi studio del progetto: Teverola, Trentola, Giugliano, San Giuseppiello

M. Mori

Il progetto prevedeva l'utilizzo di tre siti pilota identificati in: Trentola-Ducenta (Fondo Bove); Teverola (Fondo comunale) e Sito di Soglitelle; visto il ritardo con cui è stato possibile accedere a quest'ultimo se ne è aggiunto un quarto, il Sito di Giugliano (Fondo Zacaria).
La scelta dei campi è stata effettuata sulla base delle segnalazioni da parte delle autorità comunali.
In corso d'opera a questi quattro se ne è aggiunto un altro: San Giuseppiello (Fondo sequestrato alla camorra ed affidatoci dal Commissario alle Bonifiche dott. M.De Biase)
Nei due campi di Trentola Ducenta e Teverola (siti di stoccaggio temporaneo di rifiuti), prima di procedere con le attività, è stato necessario smaltire i rifiuti presenti sul sito.
Nei tre siti sperimentali a marzo 2013, sono stati trapiantati rizomi di Arundo Donax, delle talee di Pioppo Nero e Bianco e delle piantine di 24 mesi di Eucalipto e se ne è valutato il livello di accrescimento a fine ottobre. Ad un anno dalla piantumazione è risultato che solo l'Arundo donax presenta il 100% di attecchimento (cosa peraltro prevista). Tra le arboree l'Eucalipto è riuscito ad acclimatarsi meglio nei siti pilota (60-70% di attecchimento) mentre nessuna delle due specie di pioppo propagate per talea è risultata in grado crescere regolarmente.

19.1 Sito di Trentola-Ducenta (Fondo Bove)

A fine inverno 2013, una volta avuta la disponibilità del fondo, è stata effettuata la pulizia dei campi portando in discarica tutto il materiale accumulato previa separazione per l'attribuzione dei codici CER (vedi foto su www.ecoremed.it).
A seguire, nell'estate del 2013, vista la presenza di molto materiale pietroso, è stato eseguito un intervento di spietramento. Nello stesso periodo sono stati effettuati nuovi campionamenti di terreno, con maglia 3x3 m e 10x10 m, sui quali sono state effettuate le analisi per accertare la presenza e la tipologia dei contaminanti.
In particolare, sono stati rilevati, in alcuni punti (7% della superficie), valori elevati di zinco (valore massimo 256 ppm) e rame (valore massimo 137 ppm), mentre la contaminazione da idrocarburi è apparsa molto diffusa (78% della superficie).
Nell'autunno dello steso anno si è provveduto ad effettuare un profilo del terreno a 2 m per valutarne le caratteristiche fisiche trovandolo fortemente compattato a 30 cm.
Infine, nell'inverno è stato effettuato il parcellamento e distribuito il compost (20 t ha^{-1}), proveniente dall'impianto di Conza della Campania, ottenuto da scarti di

19. The project case studies: Teverola, Trentola, Giugliano, San Giuseppiello

M. Mori

The project provided the use of four pilot sites: Trentola-Ducenta, Teverola, Soglitelle and Giugliano. During the project, two other sites were added: San Giuseppiello (Site confiscated from a criminal) and Ecobat (a private site).
In Trentola-Ducenta and Teverola (temporary waste storage), it was necessary to remove and dispose of the waste in question. In March 2013, in the three experimental sites rhizomes of *Arundo donax*, cuttings of black and white poplar and two-year plants of Eucalyptus were transplanted and their growth was verified until October. After one year only *Arundo donax* showed 100% survival, Eucalyptus proved fairly well adapted (60-70% survival), whereas the poplar cuttings were unable to grow regularly.

19.1 Trentola-Ducenta

At the end of winter 2013, the waste was removed, codified (ERC codes) and taken to landfill. In summer 2013 stony material was removed. In the same period, the new soil samples were made with a 3x3 and 10x10 grid, and were analyzed. In particular, in some points we found high values of hydrocarbons (max 541 ppm), zinc (max 256 ppm) and copper (max 137 ppm). In autumn 2013, a soil profile was made at 2 m to determine physical properties and at 30 cm a strongly compacted layer was found. Finally, in the winter compost fertilization (20 t ha^{-1}) was carried out (Tab.1 and 2).
In 2014, 1250 plants of poplar (*Populus nigra*), 200-250 cm high, were transplanted at a distance of 2 x 1 m (Fig. 3). Near the roots of all plants, Micosat (Bacteria: *Agrobacterium, Radiobacter*, *Bacillus subtilis*, Streptomyces spp; Fungus: *Beauveria* spp and *Trichoderma harzianum*; Yeast: *Pichia pastoris*) was distributed (100 kg ha^{-1}). In the summer months, some mechanical weeding was performed to limit the spread of weeds and their negative effect on crop growth in the first year of their cycle. The first cut was postponed to the second growth cycle (January 2016) to allow trunk thickening and hence better sprouting. In the first months of 2015 there was an attack of weevil (*Cryptorhynchus lapathi L.*) and woodworm-wasp (*Paranthrene tabaniformis Rott.*). Thus three treatments with Confidor (imidacloprid) were applied on a monthly basis from April to June. At the beginning of May 2015, fertilization with calcium nitrate was performed (120 kg

Tabella 1. Composizione del compost utilizzato

Table 1. Composition of compost

	pH	Umidità / Humidity	C org tot	N tot	N org / N tot	C / N	Salinità / Salinity
		%	%	%	%		microS/cm
RSU_2	6.10	14.05	21.22	1.28	95	17	6432.0

Tabella 2. Contenuto di metalli potenzialmente tossici nel compost utilizzato

Table 2. Content of potentially toxic elements in the compost

	Cadmio / Cadmium	Cromo VI / Chromium VI	Rame / Copper	Piombo / Lead	Mercurio / Mercury	Nichel / Nickel	Zinco / Zinc
				mg kg^{-1} s.s.			
valore medio / mean value	0.1	< 0.1	48.2	19.5	1	2.4	130.2
soglia / threshold	<1,5	< 0.5	<230	140	<1,5	50	500

Tabella 3. Produzione del pioppo al primo taglio

Table 3. Yield (fresh weight) of poplar at the first *harvest*

Coltura / Crop	Altezza / Height	Diametro / Diameter	Produzione / Yield	Rami / Branches	Tronco / Trunk
	m	cm	t ha^{-1}	%	%
Pioppo / Poplar	5,4	5,5	17,7	12,5	87,5

Tabella 4. Produzione del pioppo al secondo taglio

Table 4. Yield (fresh weight)of poplar at the second *harvest*

Tesi / Crop	Altezza / Height	Produzione / Yield	Branche / Branches
	m	t ha^{-1}	n°/ceppaia / n°/stump
Pioppo / Poplar	2,1	6,8	4,9

potatura e con la composizione riportata in tabella 1.
In tabella 2 sono riportati i valori dei metalli potenzialmente tossici nel compost, che come si nota sono sempre abbondantemente al di sotto dei limiti di legge.
Nel 2014 si è passati dalla fase organizzativa e di pulizia dei campi, alla fase di preparazione e piantumazione delle parcelle. Allo scopo, presso un vivaio sono stati acquistati astoni di pioppo (*Populus spp*), alti circa 200-250 cm, visto il fallimento ottenuto con le talee; il campo è stato parcellato e sono stati effettuati, con l'ausilio di trivelle meccaniche, fori di circa 50 cm di diametro, necessari per la messa a dimora degli stessi (marzo 2014). In particolare in questo sito sono state impiantate 1250 piante di pioppo con un sesto di impianto di 2 m x 1 m. Nei fori, a contatto con le radici, per tutte le piante, è stata effettuata una distribuzione di Micosat (Composizione - Batteri: *Agrobacterium Radiobacter, Bacillus Subtilis e Sptreptomyces* spp; Funghi: *Beauveria spp e Trichoderma Harzianum*; Lieviti: *Pichia Pastoris*) con una dose di 100 kg ha^{-1}.
Nei mesi estivi sono stati effettuati, viste le frequenti piogge, diversi interventi di diserbo meccanico per contenere la diffusione delle piante infestanti e limitare il loro effetto negativo sullo sviluppo delle colture nella loro prima stagione di crescita.
Data l'abbondanza delle piogge nel periodo luglio-agosto, non è stato necessario fornire acqua alla coltura per il superamento della stagione estiva.
La prima raccolta è stata posticipata al secondo ciclo di crescita (gennaio 2016) per consentire un maggiore irrobustimento del fusto ed un conseguente ricaccio ottimale.
Nel primi mesi del 2015 è stato riscontrato un attacco di

N ha^{-1}). In January 2016, the first poplar cut was made (Tab.3).
The poplar yield was not very high, amounting to less than 10 t ha^{-1} per year. In 2016, there were new attacks of weevil and woodworm-wasp and starting in April the same treatments as the previous year were applied. The following treatments were subsequently carried out: fertilization with ammonium nitrate (120 kg N ha^{-1}) in April 2016, two mechanical weeding interventions in May and June 2016, and the second harvest in January 2017 (Tab. 4).

In this site, after disposing of the waste, the chemical conditions of the soil gave no cause for alarm, due to the low toxicity of the PTEs (copper and zinc). Instead, the compacted soil impeded the regular growth of the plants. However, standard agronomic practices (tillering and compost fertilization) were sufficient to restore the normal ecosystem functions of the soil. Therefore, at the end of the project, the site will be returned to the owner without restriction for normal agricultural use.

due parassiti del pioppo: il Punteruolo (*Cryptorhynchus lapathi L.*) ed il Tarlo-vespa (*Paranthrene tabaniformis Rott.*), contro i quali a partire da aprile, con cadenza mensile, sono stati effettuati tre trattamenti con Confidor (imidacloprid).
Agli inizi di maggio 2015 è stata effettuata la concimazione con nitrato di calcio (120 kg di azoto ha^{-1}).
Anche nel secondo anno di crescita sono state effettuate da maggio a luglio diverse scerbature per mantenere puliti i campi.
A gennaio 2016 è stata effettuata la prima raccolta del pioppo di cui vengono riportate le produzioni tal quali nella tabella 3.

La produzione del pioppo risulta non particolarmente alta non superando le 10 t ha^{-1} ad anno.
Anche nel 2016 avendo riscontrato l'attacco del Punteruolo e del Tarlo-vespa, sono stati effettuati da aprile i trattamenti antiparassitari con le stesse modalità dell'anno precedente.
Ad aprile 2016 è stata effettuata anche la concimazione con nitrato ammonico (120 kg ha^{-1} di azoto).
Come ogni anno sono state effettuate due scerbature a maggio ed a giugno.
A gennaio 2017 è stata effettuata la seconda raccolta del pioppo di cui vengono riportate le produzioni tal quali nella tabella 4.

La produzione risulta leggermente inferiore a quella per anno della raccolta precedente, probabilmente perché nell'anno dopo il taglio la pianta investe nel ricaccio delle branche che nel secondo anno si ispessiscono.
In questo sito, una volta raccolti e smaltiti i rifiuti presenti, le condizioni chimiche del terreno non destavano preoccupazioni, in considerazione della bassissima tossicità degli EPT presenti (rame e zinco).
Il compattamento del terreno invece impediva la normale crescita delle piante, ma le normali operazioni agronomiche (discissura profonda e fertilizzazione con compost) sono state sufficienti a ripristinare le normali funzioni ecosistemiche dei suoli.
Pertanto a fine progetto il sito sarà restituito al proprietario senza limitazioni per il normale uso agricolo.

19.2 Sito di Teverola (Fondo comunale)
Anche per il sito di Teverola nell'annata 2013, una volta avuta la disponibilità del fondo, è stata effettuata la pulizia del campo, portando in discarica tutto il materiale accumulato previa separazione per l'attribuzione dei codici CER.
Nell'estate del 2013 sono stati effettuati campionamenti di terreno, con maglia 3x3 m e 10x10 m, sui quali sono state effettuate le analisi per accertare la presenza e tipologia di inquinanti (Tab. 5).

In particolare è stata riscontrata la presenza solo di idrocarburi pesanti (valore max 66 ppm) in 2 parcelle su 14; è stato, però riscontrato un forte degrado fisico del terreno.
In questo sito, in quanto ex-discarica per la quale non è possibile ipotizzare un utilizzo agricolo nel breve-medio

19.2 Teverola
In 2013, the waste was removed, codified (EWC codes) and taken to landfill. In summer 2013, the soil samples were made with a 3x3 and 10x10 grid and analysed (Tab. 5).

In particular, in two plots out of 14, we only found low levels of heavy hydrocarbons (max 66 ppm), although the soil was severely physically degraded. Based on the results of the preliminary test of adaptability of different crops, giant reed was chosen because it was the only one adapted to the conditions in question. As regards treatments, at the beginning of February 2014 deep tillage was performed with a ripper, and compost (20 t ha^{-1}) was distributed at the end of the same month. The compost was the same as that used in Trentola-Ducenta.
In March 2014, 800 rhizomes of *Arundo donax* were collected in the experimental farm "Torre Lama" of the Department of Agriculture and were planted with a 2 m x 1 m density. The first harvest was postponed to the second year of the cycle (January 2016), to allow the plants to better cover the soil. At the beginning of May 2015, fertilization with calcium nitrate (150 kg N ha^{-1}) was applied, and in January 2016 the first harvest was made (Tab.6).

High productivity of giant reed is also confirmed in the second year with a yield of about 28 tons per hectare.
Also in this site, the chemical conditions gave little cause for concern. High hydrocarbon values, found initially in only two plots, were reduced by standard agronomic practices (i.e. tillage): the greater presence of air in the soil stimulated biodegrading microflora and restored the soil's physical fertility.

Tabella 5. Presenza di inquinanti nel campo di Teverola

Table 5. Presence of contaminants in the Teverola soil

Antimony (Sb)	1.08	0.69	0.91	1.62	1.22	1.09	0.66	0.93	0.58	0.81	1	0.6	0.47	0.55
Arsenic (As)	15.9	13.1	10.2	12	13.2	12.7	10.6	12.2	11	10.8	10.5	10.2	11.6	9.9
Beryllium (Be)	6.17	6.66	4.3	5.88	5.82	6.88	5.24	6.06	5.06	4.2	4.55	4.43	5.42	4.41
Cadmium (Cd)	0.24	0.17	0.13	0.24	0.25	0.1	0.17	0.22	0.22	0.2	0.19	0.2	0.17	0.17
Cobalt (Co)	7.67	7.5	4.77	6.61	6.79	7.13	5.83	6.8	5.9	5.2	5.2	5.1	6	5.1
Total Chromium (Cr)	14	15	15	19	20	13	16	15	18	18	17	20.6	17	18
Mercury (Hg)	0.08	0.1	0.09	0.11	0.12	0.07	0.08	0.09	0.1	0.1	0.1	0.1	0.11	0.1
Nickel (Ni)	7.1	7.6	5.5	7	7	7	5.9	6.6	6.6	5.6	6	5.9	7.1	5.9
Lead (Pb)	39	40	26	44	39	32	34	35	36	28	29	31.7	35	29
Copper (Cu)	40.9	40.9	30.1	44.4	42.6	35.7	38.3	38.8	37.6	31.8	22.3	40.2	39.9	34.8
Selenium (Se)	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
Tin (Sn)	3.72	3.44	2.64	3.61	3.72	2.5	2.02	2.52	2.96	1.47	2.18	2.26	2.63	2.08
Thallium (Tl)	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
Vanadium (V)	63	60	42	54	56	60	50	57	49	47	44	42.3	50	44
Zinc (Zn)	68.2	63.9	43.1	77.6	72.8	67.1	59.3	59	61.7	59.5	48.7	56.9	53.3	50.5
HYDROCARBONS	//////	//////	//////	//////	//////	//////	//////	//////	//////	//////	//////	//////	//////	//////
Heavy Hydrocarbons (C10÷C40) mg/Kg	66.1	34.3	23.9	51.5	23.8	27.2	28.8	31.2	25.9	27	25.2	32.3	27.4	31

periodo si è optato per l'impiego di *Arundo donax* (canna comune), specie conosciuta per la sua adattabilità agli ambienti più marginali. Anche perchè la maggior parte delle piante arboree messe a dimora nel 2013 per le verifiche preliminari sono morte a causa di un fortissimo degrado fisico.

In particolare, dopo una lavorazione profonda (discissura) effettuata agli inizi di febbraio, si è passati a fine febbraio alla distribuzione del compost (20 t ha^{-1}), lo stesso utilizzato per gli altri siti (impianto di Conza della Campania).

Nel mese di marzo 2014 è stata effettuata la messa a dimora dei rizomi. Allo scopo sono stati prelevati rizomi di *Arundo donax* nell'azienda Torre Lama del Dipartimento di Agraria e, dopo una selezione per uniformarli per dimensione e numero di gemme, è stato effettuato il parcellamento e la distribuzione degli stessi. In particolare in questo sito sono stati impiantati 800 rizomi di Arundo donax con un sesto di impianto di 2 m x 1 m.

La prima raccolta è stata posticipata al secondo ciclo di crescita (gennaio 2016) per consentire una maggiore colonizzazione del sito.

Da gennaio 2015 sono stati effettuati numerosi sopralluoghi per controllare l'andamento della coltura e non sono stati riscontrati problemi di gestione.

In particolare a inizi di maggio si è effettuata la concimazione con nitrato di calcio (150 kg ha^{-1} di azoto).

Sono continuati i sopralluoghi anche nel periodo tra fine 2015 ed inizio 2016 ed è stata effettuata la raccolta dell'Arundo, le cui produzioni tal quali sono riportate nella tabella 6.

La produzione di Arundo donax, pur considerando che non è stata effettuata la raccolta nel primo anno, risulta comunque interessante superando le 20 t ha^{-1} ad anno.

Sono continuati i sopralluoghi fino ad aprile 2016, data in cui è stata effettuata la concimazione con 150 kg ha^{-1} di azoto (nitrato ammonico).

A gennaio 2017 è stata effettuata la seconda raccolta dell'Arundo donax di cui vengono riportate le produzioni tal quali nella tabella 7.

Tabella 6. Produzione dell'A.donax al primo taglio

Table 6. Yield (fresh weight) of giant reed at the first harvest

Coltura / Crop	Altezza / Height	Diametro / Diameter	Produzione / Yield
	m	cm	t ha^{-1}
Arundo	5,2	2,2	47,0

Tabella 7. Produzione dell'A.donax al secondo taglio

Table 7. Yield (fresh weight)of giant reed at the *second harvest*

Coltura / Crop	Altezza / Height	Diametro / Diameter	Produzione / Yield
	m	cm	t ha^{-1}
Arundo	6,3	2,8	28,4

Anche nel secondo anno si conferma un'ottima produzione di Arundo superando abbondantemente le 25 t ha^{-1}.
Anche in questo sito, le condizioni chimiche non destano preoccupazioni: anche i valori di idrocarburi, risultati lievemente superiori alle CSC in un paio di parcelle, sono stati velocemente ridotti grazie alle normali attività agronomiche (es. lavorazioni del terreno) che arieggiando il terreno, hanno stimolato la microflora biodegradatrice ed hanno anche consentito di ripristinare la fertilità fisica del suolo, come testimoniato dalle produzioni dell'*Arundo donax*.
Pertanto, le normali funzioni ecosistemiche del suolo sono state ripristinate ed a fine progetto il sito sarà restituito al legittimo proprietario, senza limitazioni per la sua utilizzazione.

19.3. Sito di Giugliano (Fondo Zacaria)

Il sito di Giugliano, al contrario dei precedenti, è di proprietà privata ed ha sempre avuto un uso agricolo, quindi non è stato necessario effettuare nessuna operazione di pulizia del campo. Nell'estate del 2013 sono stati effettuati campionamenti di terreno, con maglia 3x3 m e 10x10 m, sui quali è stata accertata la presenza e tipologia di inquinanti.
In particolare, sono stati rilevati, in alcuni punti, valori molto elevati di idrocarburi (valore massimo 705 ppm), zinco (valore massimo 972 ppm) e rame (valore massimo 1707 ppm).
Nell'inverno è stato effettuato il parcellamento e distribuito il compost (20 t ha^{-1}), sempre proveniente, come per gli altri siti, dall'impianto di Conza della Campania.
Nel 2014 è stata programmata la piantumazione delle parcelle. Allo scopo sono state acquistate dall'azienda Improsta pianticelle di Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) alte circa 50-60 cm e messe a dimora, a marzo 2014, dopo il parcellamento e l'effettuazione di fori di circa 10 cm di diametro con l'ausilio di trivelle manuali. In particolare in questo sito sono state impiantate 300 piante con un sesto di impianto di 2 m x 1 m.
Nei fori, a contatto con le radici, per tutte le piante, è stata effettuata una distribuzione di Micosat (Composizione - Batteri: *Agrobacterium Radiobacter, Bacillus Subtilis e Sptreptomyces* spp; Funghi: *Beauveria* spp e *Trichoderma Harzianum*; Lieviti: *Pichia Pastoris*) con una dose di 100 kg ha^{-1}.
Nei mesi estivi sono stati effettuati, viste le frequenti

19.3. Giugliano

Giugliano is a private site used for agricultural purposes in the past. There was therefore no waste to dispose of. In summer 2013, soil samples were made with a 3x3 and 10x10 grid and analysed. At some points we found high values of hydrocarbons (max 705 ppm), zinc (max 972 ppm) and copper (max 1707 ppm). In the winter the soil was plotted and the compost (20 t ha^{-1}) was distributed.
In March 2014, 300 eucalyptus plants (*Eucalyptus camaldulensis*) 50-60 cm high were planted at a distance of 2 x 1 m. Near the roots of all plants, Micosat (Bacteria: *Agrobacterium, Radiobacter, Bacillus subtilis* and *Streptomyces* spp; Fungus: *Beauveria* spp and *Trichoderma harzianum*; Yeast: *Pichia pastoris*) was applied (100 kg ha^{-1}). In the summer months, some mechanical weeding was carried out to limit the spread of weeds and their negative effect on crop growth in the first year of their cycle. The first cut was postponed to the second growth cycle (January 2016) to allow trunk thickening and hence better sprouting.
The following treatments were subsequently carried out: fertilization with ammonium nitrate (120 kg N ha^{-1}) in May 2015, two mechanical weeding interventions in May and July 2015, and the first harvest in January 2016 (Tab.8).

In this site the biomass yield was lower than 20 t ha^{-1} per year and fell between the yields of the other two sites (Trentola-Ducenta and Teverola). In April 2016, ammonium nitrate was applied at a rate of 120 kg N per hectare. In May and June 2016, two mechanical weeding interventions were carried out to promote regrowth of plants. In January 2017, the second cut was made (Tab.9).

At the second harvest, the yield was particularly high. Also in this site, agronomic practices proved sufficient to restore soil fertility, as shown by the high eucalyptus yield. Therefore, at the end of the project, the site will be returned to the owner without any restriction for normal agricultural use.

Tabella 8. Produzione dell'eucaliptus al primo taglio **Table 8. Yield (fresh weight) of Eucalyptus at the first harvest**

Coltura / Crop	Altezza / Height	Diametro / Diameter	Produzione / Yield	Rami / Branches	Tronco / Trunk
	m	cm	t ha^{-1}	%	%
Eucalipto	4,2	6,3	37,5	41,3	58,7

Tabella 9. Produzione dell'eucaliptus al secondo taglio **Table 9. Yield (fresh weight) of Eucalyptus at the second harvest**

Coltura / Crop	Altezza / Height	Produzione / Yield	Ramaglia / Branches	Tronco / Trunk
	m	t ha^{-1}	%	%
Eucalipto	2,9	39,7	51,3	48,7

piogge, diversi interventi di diserbo meccanico per limitare la diffusione delle piante infestanti ed il loro effetto competitivo sullo sviluppo della coltura.
La prima raccolta è stata posticipata al secondo ciclo di crescita (gennaio 2016) per consentire un maggiore irrobustimento del fusto ed un conseguente ricaccio ottimale.

Agli inizi di maggio 2015 è stata effettuata la concimazione con nitrato calcio (120 kg ha^{-1} di azoto).
Da maggio a luglio 2015 sono state effettuate diverse scerbature per mantenere puliti i campi.
A gennaio 2016 è stata effettuata la raccolta dell'eucalipto. In tabella 8 sono riportate le produzioni tal quali.

In questo sito sono stati ottenuti valori di biomassa leggermente al di sotto delle 20 t ha^{-1} all'anno ed intermedi, rispetto alle produzioni degli altri due siti.
Ad aprile 2016, come per l'anno precedente, è stata effettuata la concimazione con nitrato ammonico (120 kg ha^{-1} di azoto). Sono state effettuate, a maggio e a giugno 2016, due scerbature per permettere una ripartenza ottimale delle piante di eucalipto.
A gennaio 2017 è stata effettuata la seconda raccolta dell'Eucaliptus di cui vengono riportate le produzioni tal quali nella tabella 9.

In questo secondo anno le produzioni risultano particolarmente alte superando le 35 t ha^{-1}.
Anche in questo sito, le operazioni effettuate hanno consentito il ripristino ambientale e il risanamento delle condizioni di fertilità del terreno, confermate dagli ottimi livelli produttivi della specie coltivata. Per questo sito si propone il mantenimento dell'impianto per ridurre il sollevamento delle polveri contaminate.

19.4 Sito di Soglitelle

La disponibilità del sito di Soglitelle è stata ritardata rispetto agli altri tre poiché le procedure di esproprio avviate dalla Regione Campania sono durate più del previsto. Per questo motivo, tutte le operazioni di caratterizzazione iniziale del campo e di piantumazione sono state effettuate con circa un anno di ritardo rispetto agli altri siti. A novembre 2014 sono stati effettuati i campionamenti di suolo per l'individuazione dei contenuti e della tipologia di inquinanti (Tab. 10).

In particolare, sono stati rilevati, in alcuni punti, valori elevati di arsenico (valore massimo 37.9 ppm), cromo (valore massimo 194 ppm) e piombo (valore massimo 461 ppm). Inoltre, i suddetti terreni, a causa della presenza di una falda salina superficiale, sono caratterizzati anche da valori elevatissimi di conducibilità elettrica.
Ad inizio 2015, sono state acquistate, presso il vivaio Allasia Plant di Soveria Mannelli (CZ), piantine di *Eucalyptus camaldulensis*, cv. Albacutia.
A fine marzo 2015, si è provveduto al parcellamento del campo, e alla messa a dimora delle piantine, previa effettuazione di fori di circa 10 cm di diametro mediante l'ausilio di trivelle manuali. Al trapianto è seguita un'irrigazione di soccorso.
In totale sono state messe a dimora 1250 piantine con un sesto di impianto di 2 m x 1m.
Inoltre, nello stesso periodo, si è provveduto ad effettuare anche un impianto di rizomi di *Phragmites australis* (cannuccia di palude), prelevando i suddetti rizomi da un'area contigua al campo, dove la specie cresceva spontaneamente, e selezionandoli per omogeneità di lunghezza e numero di gemme.
In totale sono stati messi a dimora circa 2500 rizomi con un sesto di impianto di 0.4 m x 0.4 m.
Sull'appezzamento con l'eucalipto, a maggio 2015 è stato effettuato un diserbo, sia meccanico che chimico, per contenere lo sviluppo delle infestanti ed il loro effetto competitivo sull'attecchimento delle piantine trapiantate.
Sempre a maggio 2015 è stata effettuata anche una con-

19.4 Soglitelle

The availability of the Soglitelle site was delayed, due to the greater duration of expropriation procedures carried out by the Campania regional authority. Therefore initial soil sampling and transplanting were conducted approximately about one year later than the other sites. In November 2014, the soil samples were made (Tab.10).

At some points we found high arsenic values (max 37.9 ppm), while chromium (max 194 ppm) and lead (max 461 ppm) were widely distributed throughout the area. Furthermore, in this site the shallow groundwater was highly saline.
At the end of March 2015, 1250 eucalyptus were planted at a distance of 2 m x 1 m; after transplanting irrigation was applied. In the same period, in an area next to the field, 2500 rhizomes of common reed (*Phragmites australis*) were collected and transplanted with a 0.4 m x 0.4 m density. In May 2015, on the eucalyptus field, mechanical and chemical weeding were carried out to limit the spread of weeds and their negative effect on the survival of transplanted plants, and calcium nitrate was applied at the rate of 120 kg N per hectare. During 2015, some hand-weeding was done.
Between the end of 2015 and the beginning of 2016 many surveys were performed to ascertain crop conditions. In April 2016, ammonium nitrate was applied at the rate of 120 kg N per hectare. In May and June 2016 two mechanical weeding interventions were performed to limit the spread of weeds.
From transplanting and during the whole duration of the project, plant survival was monitored. In November 2015, 250 plants of Eucalyptus were replaced: along the rows closer to the lateral furrow, a greater number of plants died; by June 2016 about 30% of the plants had died. Because the Eucalyptus plants showed limited growth at the end of their first year of growth, the cut was postponed to the second year (January 2017,

Tabella 10. Presenza di inquinanti nel campo di Soglitelle

Table 10. Presence of contaminants in the Soglitelle site

Antimony (Sb)	3.87	3.57	3.74	4.75	4.28	3.67	3.51	3.32	2.43	3.82	1.99	6.87	3.53	2.65	2.93	4.47	3.56	2.81
Arsenic (As)	17	16.3	15.2	37.9	22.6	25.6	14.6	15.1	21	12.5	12.7	12	11.4	10.7	10	11	10.1	13.6
Beryllium (Be)	3.54	3.49	3.45	4.76	3.24	3.66	3.73	3.14	3.45	4.24	3.48	3.69	3.83	3.28	3.47	3.77	4.05	3.98
Cadmium (Cd)	0.36	0.4	0.36	0.42	0.37	0.35	0.33	0.36	0.28	0.33	0.31	0.34	0.34	0.35	0.32	0.32	0.33	0.36
Cobalt (Co)	7.89	7.86	7.6	9.22	7.69	9.34	8.89	8.27	9.46	11.6	9.56	10.2	10.1	10.3	11.1	11.7	12.3	9.39
Total Chromium (Cr)	168	171	168	200	156	167	174	166	181	194	175	175	182	176	181	159	159	182
Mercury (Hg)	0.12	0.12	0.12	0.12	0.16	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.1	0.1	0.1	0.1	0.09	0.09	0.13
Nickel (Ni)	48	52.6	48.3	56.5	50.7	49.7	48.2	53.6	50.1	58.4	55.4	54.1	54.3	63.4	60.5	57.1	62.8	66.5
Lead (Pb)	206	206	194	225	246	185	184	167	140	189	93	461	163	139	148	207	161	124
Copper (Cu)	31.3	31	29.5	33.9	28	30.8	30.8	34.9	31.6	35.1	28.6	31.5	30.5	31.5	32.8	33.5	34.2	35.8
Selenium (Se)	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Tin (Sn)	3.14	4.16	9.42	3.31	3.23	3.34	3.39	3.58	3.18	3.99	2.92	3.27	3.19	2.91	2.91	5.52	5.14	5.29
Thallium (Tl)	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Vanadium (V)	164	148	149	238	153	162	138	122	141	142	121	134	126	117	126	138	141	157
Zinc (Zn)	65.2	68.2	62.7	73.4	61.5	69.8	72.3	67.5	68.7	82.3	67.5	74.4	78.9	76	76.9	82.1	79	79.3
HYDROCARBONS	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////	/////
Heavy Hydrocarbons (C10+C40) mg/Kg	14.6	11.8	10.8	15	14.8	14.5	16.2	15.4	113.2	13.3	15.5	7.1	34.1	47.5	33.2	11.9	32.4	10.1

cimazione di azoto con nitrato di calcio alla dose di 120 kg ad ettaro di azoto.
Nel corso del 2015 sono state effettuate diverse scerbature manuali per mantenere puliti i campi.
Negli ultimi mesi del 2015 ed i primi mesi del 2016 sono stati effettuati numerosi accessi per valutare le condizioni delle piante.
Ad aprile 2016 è stata effettuata la concimazione con nitrato ammonico (120 kg ha^{-1} di azoto).
Anche nel 2016, a maggio ed a giugno, sono state effettuate due scerbature per il contenimento delle infestanti.
Dal trapianto e per tutta la durata del progetto, è stato monitorato l'attecchimento delle piantine, valutate le fallanze e, a novembre 2015, è stato eseguito un unico rimpiazzo con circa 250 piantine. In particolare, è stata riscontrata una maggiore mortalità delle piante sulle file più vicine alle scoline; a giugno 2016 circa il 30% delle piante erano morte.
Alla fine del primo anno di crescita, le piantine di eucalipto si presentavano ancora a sviluppo contenuto, per cui si è deciso di rimandare la prima raccolta al secondo anno (gennaio 2017). In tabella 11 sono riportate le produzioni tal quali.
Le produzioni dell'eucalipto risultano molto basse rispetto al sito di Giugliano a causa della salinità del terreno di Soglitelle.
Relativamente alla *Phragmites*, alla fine del primo anno di crescita (gennaio 2016) è stata effettuata la raccolta, e le produzioni tal quali sono riportate nella tabella 12.
Le produzioni del primo anno sono risultate particolarmente basse sia in quanto poliennale al primo anno di crescita sia per effetto della salinità del suolo.
A gennaio 2017, è stata effettuata la seconda raccolta le cui produzioni tal quali si riportano nella tabella 13.
Anche nel secondo anno le produzioni sono risultate piuttosto basse sempre a causa della salinità del terreno.
Per entrambi gli appezzamenti, al fine di monitorare l'andamento della conducibilità elettrica del terreno, dall'impianto in poi, ogni 45 giorni circa, sono stati effettuati campionamenti di suolo a due profondità (0-20 e 20-40 cm).

Tab.11).
The yield was lower than that in Giugliano, mainly due to the high soil salinity. With regard to common reed, the harvest was made at the end of the first year of the cycle (January 2016, Tab.12).

The yield of the first year was particularly low, probably due to soil salinity but also because the common reed is a perennial crop and its production has an increasing trend in the first years of growth. In January 2017, the second harvest was made (Tab. 13).
Also in the second year the yield was lower, due to soil salinity. For both crops (eucalyptus and common reed), the electrical conductivity of soil (EC) was monitored with soil samples in two layers (0-20 and 20-40 cm); samples were made approximately every 45 days (Fig.1).

The EC trend shows typical fluctuations, as a function of rainfall and temperature dynamics, but without an apparent long-term trend. The high soil salinity conditions interfere with the regular growth of crops and are a limitation for phyto-remediation with alien species.
In these conditions, it is preferable to increase the activity of the spontaneous flora, which is well adapted to the particular site-specific conditions of stress (*P. australis* in this case), so as to obtain both securing (covering of soil to avoid the rise and dispersion of contaminated soil particles), and remediation (absorption of the bio-available fraction of PTE).

Tabella 11. Produzione dell'eucaliptus al primo taglio

Table 11. Yield (fresh weight) of Eucalyptus at the first cut

Coltura / Crop	Altezza / Height	Produzione / Yield	Rami / Branches	Tronco / Trunk
	m	t ha^{-1}	%	%
Eucalipto / Eucaliptus	1,5	12,7	62,3	37,7

Tabella 12. Produzione della phragmites al primo taglio

Table 12. Yield (fresh weight) of Phragmites at the first harvest

Coltura / Crop	Altezza / Height	Diametro / Diameter	Produzione / Yield	Foglie / Leaves	Steli / Stems
	cm	mm	t ha^{-1}	%	%
Phragmites	85,7	4,04	3,8	9,1	90,9

Tabella 13. Produzione della phragmites al secondo taglio

Table 13. Yield (fresh weight) of Phragmites at the second harvest

Coltura / Crop	Altezza / Height	Diametro / Diameter	Produzione / Yield	Foglie / Leaves	Steli / Stems
	cm	mm	t ha^{-1}	%	%
Phragmites	92,6	4,54	5,1	8,2	91,8

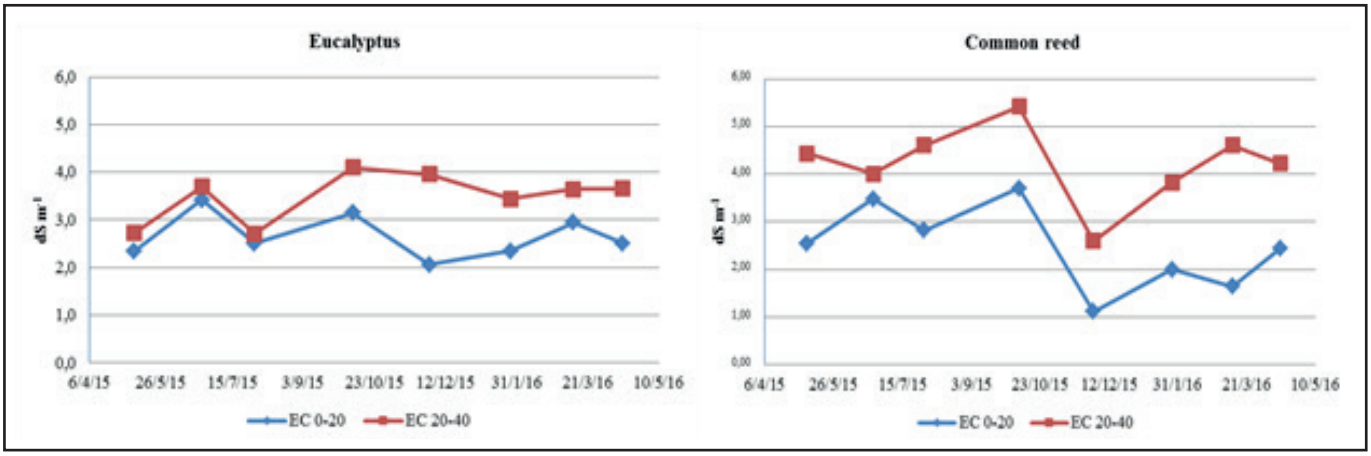


Figura 1. Andamento della conducibilità elettrica dei due appezzamenti.

Figure 1. EC soil trends in the two fields

Nella figura 1 è riportato l'andamento del primo anno di rilievi.
Il trend della conducibilità mostra le tipiche fluttuazioni in funzione delle piogge e delle temperature non mostrando differenze tra il campionamento iniziale e quello finale.
Le condizioni di estrema salinità che interferiscono con la normale crescita delle piante rappresentano un limite per le azioni di fitorisanamento con specie estranee.
In queste condizioni, risulta preferibile potenziare l'attività della flora spontanea adattata alle particolari condizioni di stress sito-specifiche (*P. australis* in questo caso), al fine di ottenere congiuntamente sia la messa in sicurezza (copertura del suolo per evitare il sollevamento e la dispersione delle particelle di terreno contaminato), sia la bonifica (assorbimento della frazione biodisponibile di EPT).

19.5. San Giuseppiello
Questo sito agricolo di 60.000 m² è stato sottoposto a sequestro giudiziario perché oggetto di sversamento di fanghi industriali ed è gestito dal Commissariato di Governo alle Bonifiche ex L.11/2013 e s.s. Il progetto di risanamento, finalizzato alla caratterizzazione di dettaglio, all'analisi dei rischi diretti ed indiretti ed eventualmente alla messa in sicurezza, è stato approvato dal Commissario, dott. De Biase, ed autorizzato dalla Autorità giudiziaria. Le attività svolte su questo sito sono state così articolate:

A) Caratterizzazione indiretta di dettaglio (vedi cap 5)
Le misure dirette ed indirette riportate nel cap. 5, hanno permesso di individuare diverse aree di sotterramento di rifiuti solidi e liquidi (fanghi industriali) che hanno determinato punte di concentrazioni di 1800 mg/kg di idrocarburi (C>12), 4000 mg/kg di Cromo e 1800 mg/kg di Zinco.
Le analisi pedologiche hanno evidenziato l'alta variabilità laterale e verticale dei sedimenti ricchi in Cromo e Zinco; in particolare : sono state evidenziate 3 diverse tipologie di materiali ricchi in Cromo ed altrettanti meccanismi di messa in posto dei fanghi industriali ed ognuno di questi ha riguardato una diversa profondità (approssimativamente 50 cm, <150 cm; > 150-260 cm). Inoltre queste

19.5. S. Giuseppiello
This 60000 m² agricultural site was confiscated from a criminal because he had previously used it to discharge industrial sludge and now this site is managed by Government's Special Commissioner. The remediation project, aimed at detailed characterization, analysis of direct and indirect risks and ultimately securing the site or remediation, was approved by the Commissioner, Dr. De Biase, and authorized by the judicial authority. The activities on this site were divided as follows:

A) Indirect detailed characterization (see chap. 5)
Direct and indirect measurements allowed detection of several areas of buried solid and liquid industrial waste, which recorded concentration peaks of 1800 ppm of hydrocarbons (C>12), 4000 ppm of chromium and 1800 ppm of zinc. Soil analysis showed the high lateral and vertical variability of sediments rich in chromium and zinc; in particular, we found three different types of chromium-rich materials at different depths (approximately 50 cm, > 150 cm; 150-260 cm). Our studies also allowed leaching of these pollutants towards the groundwater to be excluded. Indeed, the palaeosoils under the layer in which the waste was buried were always non-polluted (about 40 ppm Cr). By analysing geo-physical anomalies it was also possible to detect the burial of 22 tons of leather scraps.
The lack of Cr leaching, combined with the great complexity of geo-spatial and vertical distribution of contamination – more homogeneous on the soil surface and strongly heterogeneous (patchy) at depth – does not allow application of simple protocols of material removal. Instead, it requires a procedure of securing the site which considers its complexity.

B) Chemical characterization (see chap. 6a and 6b)
Studies concerning the chemical speciation of metals and their bioavailability for ascertaining indirect risks showed that, despite the high total chromium content found in soils and buried materials, the mobility and bioavailability of this element is very limited due to the nature of chromium, mainly in trivalent form mostly insoluble at the pH values found in the soil.

indagini hanno permesso di escludere la lisciviazione di tali inquinanti verso le falde infatti i paleosuoli – anche quando sepolti da quantità molto elevate di fanghi contaminati (fino a 23,000 ppm di Cr) sono risultati sempre non contaminati (circa 40 ppm di Cr).
L'assenza di lisciviazione del Cr, combinata con la grande complessità della distribuzione geospaziale e verticale della contaminazione - più omogenea in superficie e fortemente eterogenea (a macchia di leopardo) in profondità - impedisce l'applicazione di semplici protocolli di rimozione dei materiali e rende necessaria una procedura di messa in sicurezza che tenga conto della complessità del sito.
Dalle analisi delle anomalie geofisiche è stato anche possibile rilevare un sotterramento di 22 tonnellate di ritagli di pellami.

B) Caratterizzazione chimica (vedi cap. 6a e 6b)
Le indagini sulla speciazione chimica dei metalli e le analisi della loro biodisponibilità per la verifica dei rischi indiretti, riportate nel cap. 6, hanno messo in evidenza che, nonostante gli elevati contenuti di cromo totale riscontrati nei suoli e nei materiali interrati, la mobilità e la biodisponibilità di questo elemento è molto limitata, per la natura stessa del cromo, prevalentemente in forma trivalente per lo più insolubile ai valori di pH riscontrati nel suolo.
Più mobile e biodisponibile è risultato invece lo zinco, anche se le concentrazioni dell'elemento nel suolo e nei materiali sono minori di quelle del cromo. Lo zinco, infatti, è stato estratto in quantità significative sia in EDTA sia in NH_4NO_3 e risulta prevalentemente distribuito tra le frazioni HOAc-estraibile e riducibile del suolo. L'indice di biodisponibilità dell'elemento (rapporto tra le quantità estratte in EDTA/NH_4NO_3), in media pari a 247, è molto più elevato del cromo (15) e costituisce indicazione di più elevata capacità del suolo di reintegrare il metallo allontanato dalla fase liquida per assorbimento da parte delle piante. Tale risultato rappresenta un importante presupposto al successo del fitorisanamento e verrà validato dall'analisi delle quantità di Zn asportate dalle piante fatte crescere nel sito.

C) Impianto e gestione della vegetazione (vedi cap.9)
La vegetazione preesistente composta da peschi senescenti e ciliegi è stata estirpata anche per poter effettuare le analisi chimiche sui vari organi delle piante, al fine di conoscere le capacità di accumulo e traslocazione dei contaminanti da parte di queste specie.
Successivamente è stata effettuata la distribuzione del compost proveniente dall'impianto del Comune di Salerno al fine di stimolare la biodegradazione degli idrocarburi da parte della microflora del terreno e di migliorare le condizioni di fertilità del suolo.
Ad aprile si è provveduto al trapianto di 20.000 astoni di pioppo nero (con sesto 3 x 1 m), in considerazione delle ben note capacità di assorbimento ed accumulo di metalli pesanti da parte di questa specie.
Nei mesi di maggio e giugno sono stati effettuati 2 trattamenti con inoculi di batteri biodegradatori, per velocizzare la biodegradazione degli idrocarburi presenti nel suolo.

By contrast, the zinc was more mobile and bioavailable, even if the concentration of this element in the soil and waste materials is lower than those of chromium. Zinc was extracted in significant quantities both by EDTA and NH4NO3. The bioavailability index of the element (ratio between the quantities extracted in EDTA / NH4NO3), 247 on average, is much higher than that of chromium (15), thus indicating a higher soil capacity to replenish the metal removed from the liquid phase due to the absorption by plants. This represents an important prerequisite for the success of phytoremediation and will be validated by the analysis of Zn removed by plants grown *in situ*.

C) Planting and management of plants (see chap. 9)
The pre-existing flora consisting of peach and cherry trees was uprooted and chemical analyses were performed on the different plant parts in order to ascertain the storage capacity and translocation of the contaminants by these species. Compost was then distributed in order to stimulate the biodegradation of hydrocarbons by the soil microflora and improve the conditions of soil fertility. In April, 20000 black poplar plants were transplanted (3 x 1m density), in consideration of the well-known capacity of absorption and accumulation of heavy metals by this species. In the months of May and June, two treatments with inoculum of bio-degrading bacteria were carried out to speed up the biodegradation of hydrocarbons in the soil. Analysis of indirect risks for consumers (see chap. 14) was made with herbaceous accumulator species of metals (Indian mustard, turnip greens, rocket, lettuce, chicory, spinach ....).

The activities carried out in this site will allow us to:
1) develop and validate a protocol for detailed characterization that allows realistic information to be obtained about the scale (concentrations and extent) of pollution on the specific site, identifying the areas with anomalies on which to focus the subsequent phase of sampling and direct analysis of pollutants;
2) develop and validate a protocol for analysis of indirect risks with chemical (bioavailability of PTEs) and biological tests (cultivation of horticultural crops sensitive to accumulation of PTEs in the edible parts);
3) define a protocol for cultivating perennial crops for risk management (phyto-extraction of bioavailable fraction of PTEs, biodegradation of organic pollutants, securing by prevention of rising and dispersion of polluted soil particles).

La verifica dei rischi indiretti per i consumatori (vedi cap. 14) è stata effettuata con specie erbacee iperaccumulatrici di metalli (senape indiana, cime di rapa, rucola, lattuga, cicoria, spinacio….) per verificare in condizioni reali il rischio di contaminazione dei prodotti vegetali.
Le attività svolte su questo sito, hanno consentito di:

1) Mettere a punto e validare un protocollo per la **caratterizzazione di dettaglio** che consenta di avere informazioni realistiche sulle dimensioni (concentrazioni ed estensione) dell'inquinamento di un determinato sito, identificando le aree con anomalie su cui orientare la successiva fase di campionamento ed analisi diretta degli inquinanti. Ciò è coerente con quanto teoricamente previsto nel piano di caratterizzazione il D.Lgs 152/06 che «deve verificare l'esistenza dell'inquinamento nei diversi comparti ambientali, definirne il grado e l'estensione volumetrica" (cfr. cap. 5 e 6).
2) Mettere a punto e validare un protocollo per la **valutazione dei rischi indiretti** con test chimici (biodisponibilità degli EPTs) e biologici (coltivazione specie ortive suscettibili all'accumulo di EPTs) nelle parti eduli degli ortaggi (rucola, lattuga, cime di rapa, ravanello, spinacio, cicoria, vedi cap. 14).
3) Protocollo di coltivazione di specie poliennali per la **gestione dei rischi** (fitoestrazione frazione biodisponibile degli EPTs, biodegradazione degli inquinanti organici, prevenzione sollevamento e dispersione delle particelle di suolo contaminate, vedi cap. 9).

20. Processi partecipativi per la pianificazione e la gestione degli interventi

A. Di Gennaro

Considerazioni generali

Oltre che gli aspetti tecnico-scientifici ed operativi, il protocollo ECOREMED comprende fasi specificatamente dedicate alla partecipazione pubblica ed alla divulgazione. Gli obiettivi sono molteplici. Da un lato, il protocollo ECOREMED presenta aspetti fortemente innovativi rispetto agli approcci tradizionalmente impiegati per la caratterizzazione e la bonifica/messa in sicurezza dei siti contaminati. In qualche misura, il protocollo occupa quello che era un vuoto regolamentare ed operazionale della legislazione vigente, concernente gli approcci specifici da impiegare per il risanamento dei suoli agricoli. Le linee guida governative redatte dal Gruppo di lavoro nazionale attivato ai sensi del Dlgs 153/2014 "Terra dei fuochi", hanno infatti riconosciuto l'idoneità, per questo specifico scopo, delle tecniche di fito-bio-risanamento sulle quali si basa il protocollo ECOREMED, che sono attualmente indicate come metodi di riferimento per il trattamento dei suoli agricoli. Ai fini di una ampia diffusione ed applicazione del protocollo, si pone pertanto l'esigenza di condividere attivamente, con i diversi attori coinvolti, una base appropriata di conoscenze, concernente i presupposti tecnico-scientifici del protocollo, il suo corretto campo di applicazione (vedi tab. 1), come anche la natura delle operazioni tecniche e i fabbisogni tecnico-economici ed operativi necessari per la sua applicazione, per l'impianto, la gestione e il monitoraggio dei siti. Dall'efficacia delle attività di divulgazione e partecipazione può dipendere il grado di legittimazione e credibilità degli approcci innovativi proposti per il recupero dei siti agricoli degradati; la predisposizione degli attori pubblici e privati a mobilitarsi concretamente per l'adozione del protocollo; la creazione del necessario clima di cooperazione tra i soggetti pubblici e privati, ai fini di superare i problemi e le difficoltà specifiche che possono verificarsi in sede di applicazione del metodo, di impianto, gestione e monitoraggio dei siti di trattamento. In definitiva, come verrà descritto nei successivi paragrafi, le diverse forme di coinvolgimento attivo e di partecipazione pubblica possono essere di volta in volta attivate nelle differenti fasi di applicazione del protocollo, con riferimento ai possibili obiettivi di:

- definizione del problema (portata effettiva dei processi di degradazione e contaminazione dei suoli agricoli, funzionamento delle catene di rischio in rapporto alla sicurezza alimentare e alla salute pubblica, rapporto tra la percezione pubblica del rischio e valutazioni su base tecnico-scientifica);
- definizione di strategie di intervento, basate sul protocollo ECOREMED;
- presentazione e discussione di esperienze concrete di attuazione della strategia.

In chiave propositiva, i momenti di partecipazione pubblica possono utilmente contribuire a:

- Favorire la costruzione nelle comunità e nei gruppi

20. Planning and management of the interventions through participatory processes

A. Di Gennaro

Introduction

ECOREMED protocol includes specific actions for the public participation for the implementation of the protocol in different contexts and the dissemination of the main outcomes of a bio-reclamation strategy. This because the innovative approach proposed for the environmental characterization and reclamation/securing of contaminated sites is aimed at improving the current legislation with a specific protocol for agricultural soils. These specific guidelines have been included in the legislative decree 153/2014 "Terra dei Fuochi" who recognized phyto-bioremediaiton included in the ECOREMED protocol as the reference technique for agricultural sites.

A wide application of this protocol can be reached only when the scientific baseline (see Table 1) as well as the technical (transplantation, management and monitoring) and economic aspects are properly shared with the stakeholders. By this way the proposed reclamation strategies can be legitimized by public and private subjects, enforcing the local cooperation for the application of the protocol.

As below described, participatory processes can be activated at the different stages of implementation of the protocol in order to:

- Target the problem with a qualitative and qualitative definition of main degradation paths of a specific agricultural site. This in order to verify if some risk related to food security and public health occurs, limiting the idiosyncrasy between public opinion and the technical-scientific assessment of the risks;
- Definition of the intervention strategies according to the ECOREMED protocol;
- Presentation and discussion of the outcomes of the remediation strategies.

Participatory processes can significantly contribute to:

- The formation of local action groups with the objective of preserving the identity of the territory and increasing the comprehension of landscape evolution;
- Straighten the motivation of the actions;
- Favor the frequentation and the "adoption" of the reclamation sites from the local population in a mid-long term perspective.

di azione locali, di un rapporto con il territorio e il paesaggio rurale, basato sulla conoscenza dei valori in gioco, sul recupero delle conoscenze tradizionali, sulla comprensione delle dinamiche di evoluzione del territorio e del paesaggio;
- rafforzare le motivazioni per un'azione;
- favorire un rapporto di conoscenza, frequentazione, "adozione" dei siti di trattamento, in vista della loro gestione e presidio di medio-lungo periodo.

I soggetti della partecipazione
Le attività di partecipazione pubblica e divulgazione possono essere di volta in volta specificatamente rivolte ad attori differenti, coinvolti a diverso titolo, o semplicemente come "pubblico interessato", nell'applicazione del protocollo.
Amministratori pubblici, Autorità competenti
Le attività di divulgazione e partecipazione pubblica possono essere in primo luogo rivolte ai decisori istituzionali, cioè ai diversi soggetti portatori di specifiche competenze/responsabilità in merito all'attuazione degli interventi, alla loro autorizzazione ed eventuale finanziamento. A titolo di esempio, nell'ambito del progetto ECOREMED, specifiche iniziative di divulgazione e partecipazione sono state rivolte ad esponenti delle Amministrazioni ai diversi livelli:
- amministratori e funzionari regionali, sindaci, assessori comunali;
- esponenti di Enti specialistici: Commissariati di governo, Agenzie di protezione ambientale ecc.;
- membri delle forze dell'ordine a diverso titolo coinvolte nelle attività di prevenzione e controllo del territorio.

Si tratta come si vede di una pluralità di soggetti, ciascuno portatore di un segmento specifico di competenze/responsabilità/poteri. L'obiettivo del loro coinvolgimento, oltre quello di una corretta informazione circa le potenzialità del protocollo nell'ambito delle politiche pubbliche ai diversi livelli, è quello di creare un clima di cooperazione e collaborazione istituzionale necessario per l'impiego del protocollo e l'attuazione degli interventi.

Associazionismo, comitati
Il tema della contaminazione dei suoli agricoli e del possibile rischio per la salute pubblica è al centro dell'attenzione e dell'azione di una pluralità di comitati ed associazioni operanti sul territorio. Riguardo a tali aspetti, il variegato mondo dell'associazionismo pone alle Autorità pubbliche una domanda pressante, non sempre coordinata, non sempre coerente, di azioni ed interventi, che possono riguardare il diritto ad un'informazione effettiva e trasparente sugli effettivi livelli di rischio; la sicurezza alimentare; l'attuazione di interventi di bonifica e riqualificazione del territorio; il rafforzamento dei livelli di monitoraggio, prevenzione e assistenza in campo sanitario. Anche in riferimento all'esperienza concreta condotta nell'ambito del progetto ECOREMED, le attività di divulgazione e di partecipazione pubblica specificatamente rivolte all'associazionismo e ai comitati locali, si pongono i seguenti obiettivi:
- fornire una informazione corretta sulle effettive catene di rischio che riguardano le attività agricole e la

The subjects of participatory processes
The dissemination activities and participatory processes can be addressed to involve different stakeholders as well as the "public concerned".

Public administrators and competent authorities
The dissemination and public participation activities ca by primarily addressed to the institutional decision-makers, according to their specific skills/responsibilities in the implementation of the different interventions (e.g. operative authorization; funding). In example, within the ECOREMED project many specific participatory activities and dissemination events have been addressed to:
- local administrators and officials, mayors, municipal councilors;
- representatives of specialized institutions: government Commissariat, Environmental Protection Agency;
- security forces involved in the prevention and control of territory.

It is a variety of subjects, each one bringing a specific segment of competencies/responsibilities/powers, whose involvement with the participatory activities can enforce the cooperation for the application of the ECOREMED protocol.

Associations and committees
Several associations and committees are very attentive to soil contamination and the subsequent risks for the public health; from their activity it emerges an urgent claim for an effective information concerning: the actual risks in specific circumstances; the food security; the strategies for soil reclamation and land improvement; the actual monitoring, prevention and health-care levels.
According to the activities carried out with the ECOREMED project, the main aim of participatory activities and meetings with associations and committees is to share a correct information about:
- the risks for agricultural activities and food production in potentially contaminated and degraded areas;
- the suitability of ECOREMED protocol for securing and reclaiming contaminated agricultural sites, for landscape management, for straightening the control of agricultural soils in critical areas.

Farmers and related professional associations
The claim for a correct information is strongly promoted by farmers and related professional associations; focusing on the debate carried out in Campania region, it is clear that sharing partial and low quality information can have a negative impact on the perception of consumers and the market price of local food.
The dissemination events carried out in the framework of ECOREMED project highlighted the lack of technical-operative solutions to cope with this problems both at farm that at corporative scale. In this context, dissemination events can be effective in informing farmers about:
- the actual risks of contamination of food production processes in rural areas included in urban, industrial and infrastructural systems (e.g. Piana Campana);
- the operative strategies for protecting the work of

produzione alimentare;
- le potenzialità del protocollo ECOREMED ai fini della messa in sicurezza e del recupero dei suoli agricoli contaminati, della rigenerazione del paesaggio, del rafforzamento del presidio delle aree rurali maggiormente esposte al rischio di degrado.

Gli agricoltori, le aziende agricole
Non deve sorprendere il fatto che tra i soggetti che esprimono una domanda di informazione e partecipazione ci siano gli imprenditori agricoli e le associazioni professionali del mondo agricolo. L'esperienza della crisi della Piana campana ha evidenziato come il dibattito pubblico sui problemi di degradazione/contaminazione del territorio agricolo abbia avuto dirette conseguenze sulla fiducia dei consumatori, con effetti economici assai negativi per le imprese agricole operanti nei territori interessati. Ora, le esperienze divulgative e di partecipazione pubblica specificatamente rivolte agli imprenditori agricoli, svolte nel progetto ECOREMED, hanno mostrato come, in molti casi, i produttori agricoli non dispongano delle conoscenze tecnico-scientifiche ed operative per affrontare questi problemi, a scala sia aziendale che associativa. I momenti partecipativi che sono stati organizzati in ECOREMED si sono rivelati allora estremamente utili per informare correttamente i produttori circa:
- le effettive catene di rischio che possono riguardare i processi produttivi nei quali essi sono coinvolti, nel contesto di un territorio rurale, quale quello della Piana campana, sottoposto ad una pressione particolarmente intensa da parte del sistema urbano, industriale ed infrastrutturale;
- le strategie che possono essere messe in campo, a scala aziendale e associativa, per tutelare l'azione dei produttori agricoli; alle possibilità di impiego del protocollo ECOREMED per la riqualificazione ambientale e paesaggistico di siti rurali degradati;
- il ruolo attivo che gli imprenditori agricoli possono svolgere in tali processi e azioni di recupero.

Il mondo della scuola
L'esperienza condotta in ECOREMED ha evidenziato come le attività formative/divulgative indirizzate agli studenti e i docenti della scuola pubblica ai differenti livelli (primaria, secondaria inferiore e superiore) siano in grado di conseguire effetti positivi di estrema rilevanza e interesse. Sotto molti profili, il lavoro con le scuole si è rivelato un potente moltiplicatore: gli studenti e i docenti che approfondiscono i diversi temi legati al valore e alla tutela degli ecosistemi agricoli in ambito metropolitano, alle effettive possibilità di recupero dei siti degradati e contaminati, agli effettivi meccanismi di rischio che possono minacciare la salute degli individui, si sono dimostrati estremamente attivi nella diffusione delle conoscenze apprese, oltre che in ambito scolastico e familiare, in contesti relazionali più vasti. La buona riuscita di queste esperienze è strettamente legata all'interazione coi docenti, alla progettazione di percorsi di approfondimento che si sviluppino in un arco temporale più lungo, in stretta integrazione coi programmi didattici.

agricultural producers at farm and corporative scale, including also the ECOREMED protocol;
- the effective role of farmers in reclaiming of polluted agricultural areas and in preserving the rural landscape.

School and education
The interaction with students and teachers from public educational system (primary, senior and high school) can be a fruitful and inspiring experience being a multiplier of ideas and points of view. Sharing and discussing with students topics related to the preservation of agricultural activities in urban areas, land reclamation and landscape protection, health risks in polluted areas allows an effective shift of this debate from school to family and other contexts.
The success of this activity is strictly dependent from the interaction with teachers, who must be encouraged to deepen this discussion in line with the educational program.

Media workers
The direct interaction with media workers can strengthen the role of the different communication channels both traditional (papers, radio, television) and innovative (web, blogs and social media), in supplying a correct information about the risks related to the contamination of agricultural soil and the availability of tools for solving this problem. This approach can by fruitful in overcoming the tendency in storytelling of certain media, devoted more to alarm population than to inform them about the actual problems and risks. According to the experience of ECOREMED project the continuative interaction with journalist can be helpful in balancing the public debate encouraging the publication of news, reportages well describing the real environmental risks in agricultural areas of Campania region as well as the potential of phyo-bioremediation for securing agricultural sites.

Scientists and researchers
Tough environmental reclamation involves different scientific sectors - engineering, ecology, health-care, law – it prevails the tendency to mono-disciplinary approaches in solving specific problems. This limits multi-disciplinary co-working that is mandatory for solving complex environmental problems as the recovery of contaminated/degraded agricultural sites. The experience of ECOREMED project highlighted the need of specific dissemination events (i.e. summer and winter schools, seminars) with scientists and researchers in order to legitimate new approaches, as phyto-bioremediation, for solving environmental problems.

Gli operatori dell'informazione
Ancor prima di considerare il ruolo degli strumenti e dei canali differenziati di comunicazione - sia quelli tradizionali (giornali, radio, TV), che quelli più innovativi legati al web e ai social - l'esperienza di progetto ha mostrato come un elemento fondamentale nelle attività di disseminazione del protocollo ECOREMED, sia consistito nell'interazione/collaborazione sistematica e personale con operatori della comunicazione con i quali è stato possibile instaurare un rapporto diretto. La difficoltà da superare era soprattutto quella di una certa predilezione/inerzia dei media nei confronti di una narrazione particolarmente incentrata sugli aspetti di allarme generalizzato. A questo scopo, un lavoro specifico si è reso necessario nei confronti di giornalisti della carta stampata, della radio e della televisione, per aggiornarli e informarli sulle esperienze in corso, affinché essi potessero correttamente riferirne ad un pubblico più ampio. Questo lavoro sistematico ha prodotto una serie alla fine piuttosto nutrita di articoli e reportage, che hanno comunque, entro certi limiti, contribuito progressivamente a riequilibrare il dibattito pubblico, introducendo elementi di conoscenza e informazione circostanziata circa la reale portata della crisi ambientale della piana campana, il ruolo svolto dai processi di produzione agricola, la sicurezza delle produzioni alimentari, il ruolo e le potenzialità delle tecniche ECOREMED ai fini del recupero dei siti agricoli contaminati/degradati.

Il mondo della ricerca
Nonostante il vasto settore delle bonifiche ambientali coinvolga campi disciplinari assai diversi - ingegneristico, ecologico, sanitario, giuridico - prevale nell'azione concreta il ricorso ad approcci spiccatamente mono-disciplinari, il più delle volte di tipo ingegneristico, con una predisposizione assai scarsa alla cooperazione multi-disciplinare, in vista della risoluzione di problemi complessi, come quelli rappresentati dal recupero dei siti contaminati/degradati. L'esperienza ECOREMED ha mostrato come sia a volte necessario, ai fini della legittimazione delle nuove metodiche presso le diverse comunità disciplinari-specialistiche, l'organizzazione di momenti specifici di comunicazione e confronto specificatamente rivolti a settori mirati della comunità scientifica.

Metodi e strumenti della partecipazione
Le attività di divulgazione e partecipazione che accompagnano l'applicazione del protocollo ECOREMED possono di volta in volta fare ricorso alle diverse forme e strumenti comunicativi. Così, a titolo di esempio, nel progetto LIFE ECOREMED sono state organizzate le seguenti attività:
- svolgimento di incontri, meeting, seminari, che solitamente hanno previsto sia momenti espositivi che momenti di dibattito/confronto con i partecipanti;
- visite in loco ai siti pilota di applicazione del protocollo ECOREMED, con presentazione sul campo delle tecniche impiegate, degli obiettivi, dei problemi da superare, degli aspetti di monitoraggio, della possibile evoluzione futura dei siti;
- il web e i social, con la creazione di un sito web, di un blog, di una pagina facebook per la divulgazione delle attività svolte;

Participative tools and methods
Dissemination activities linked to the application of ECOREMED protocol can be carried out adopting specific tools/approaches in the different situations. A list of the possible events/activities is provided below:
- meetings and seminars with the exhibition of the operative approach (e.g. poster, stands or other dissemination materials) and a session for the debate with participants;
- visits to the pilot sites in which ECOREMED protocol is applied in order to clarify the main objectives and characteristics of phyto-bioremediation, the potential problems, the main monitoring techniques and the potential future scenarios at the end of the reclamation period;
- web tools (e.g. web sites, facebook accounts and blogs) for the dissemination of the activities;
- traditional media: articles, reportages and participation to radio shows

- impiego dei media tradizionali: articoli giornalistici (anche redatti da personale ECOREMED), servizi e reportage televisivi, partecipazione a trasmissioni radiofoniche.

Conclusioni

L'esperienza condotta ha mostrato come il tempo e le energie spese per comunicare con idonee iniziative divulgative e partecipative, del tipo di quelle presentate, i presupposti, gli obiettivi, gli aspetti realizzativi e di gestione degli interventi ECOREMED, non possano essere considerate uno sforzo aggiuntivo, in qualche misura facoltativo o addirittura superfluo. La comunicazione pubblica si è invece rivelata indispensabile per costruire un clima di credibilità e di fiducia intorno agli approcci fortemente innovativi introdotti da ECOREMED per il recupero dei suoli agricoli, rispetto alle tecniche disciplinari più consolidate e routinarie, di tipo ingegneristico. L'esperienza ha mostrato come, nell'applicazione del protocollo ECOREMED, la previsione di un momento preliminare di riflessione sulle esigenze comunicative, collaborative e partecipative specifiche, nei confronti dei diversi attori coinvolti e del pubblico interessato, si sia rivelato di grande utilità per una proficua attuazione degli interventi e per la risoluzione dei problemi autorizzativi, realizzativi, e gestionali. L'esperienza di questi cinque anni di progetto ha mostrato come la creazione di un'atmosfera di convinta e larga accettazione e condivisione istituzionale e pubblica degli interventi è uno dei segreti del successo. Gli strumenti a disposizione come si è visto sono assai diversificati, e sta alla sensibilità dei soggetti responsabili dell'attuazione del protocollo ECOREMED il saper di volta in volta selezionare quelli più idonei a supportare la realizzazione degli specifici progetti. Tutto ciò, sulla base di una presentazione chiara ed onesta dei limiti di applicazione del protocollo ECOREMED, e dei suoi rapporti con gli altri protocolli di tipo tradizionale, basati sulla rimozione dei materiali di suolo contaminati, o su tecniche di confinamento e capping.

Conclusions

The experience carried out during the five years of the Ecoremed project, tech us that time and energy spent for communicating basics, aims, operational and management problems of the Ecoremed protocol, cannot be considered an additional or superfluous effort .

On the contrary, public communication proved to be necessary for building a climate of confidence and credibility about the innovative approaches of Ecoremed for agricultural soil remediation. The experience showed us that sharing the information with citizens was very useful for an effective implementation of the actions and for solving the authorization, implementation and management problems. The institutional and public agreement and the sharing is the secret of the success.

The tools can be very different and the entities in charge for Ecoremed protocol implementation have to choose the ones more suitable in the different contexts.

All this, on the basis of a clear and honest presentation of limits and perspectives of the Ecoremed protocol and on its comparison with the pother more traditional remediation protocols that are based on removal and disposal or on capping and containment techniques of the contaminated soils.

Tab. 1. Tipologie di aree di intervento, in funzione della destinazione originaria e dei processi di degrado

Table 1. Pilot sites in relation to land use and degradation processes.

Siti / Sites	Tipologia di area / Use					Processi di degrado / Degradation processes			
	di valore naturalistico / Naturalistic	agricola / Agriculture	di frangia / Fringe area	di stoccaggio/ trattamento rifiuti / Waste disposal/ treatment	pertinenza impianti produttivi / Industrial/ commercial	fisico / physical	chimico (inorganici) / chemical (inorganic pollutants)	chimico (organici) / chemical (organic pollutants)	estetico-percettivo / Aesthetic-perceptive
Soglitelle – Laghetti di Villa Literno	■						■		■
Giugliano - Fondo Zacaria			■				■	■	■
Teverola - Fondo Comunale		■		■		■			■
Trentola-Ducenta fondo Bove		■		■		■	■		■
Marcianise (Ecobat)					■	■	■		■
Giugliano (San Giuseppiello)		■					■	■	■

ELENCO DEGLI AUTORI

Università degli Studi di Napoli Federico II
M.Fagnano (editor, cap. 1, 2, 7, 9, 14, 18)
D. Ducci (cap. 4, 13b)
L. Boccia, M. Rigillo (cap. 4, 15)
F. Terribile, A. Agrillo, M., Iamarino, P. Moretti, A.F. Mileti, L. Minieri, S. Scognamiglio, S. Vingiani (cap. 5)
P. Adamo (cap. 6a, 6b, 13a)
C. Rocco (cap. 6a, 6b)
D. Agrelli, A. G. Caporale (cap. 6b)
N. Fiorentino (cap. 7, 9, 14)
D. Visconti (cap. 7, 9)
N. Romano, P. Nasta, M. Palladino (cap. 8, 16)
V. Cenvinzo, A. De Rosa (cap. 9)
M. Mori (cap. 9, 19)
V.Faraco, A. Di Donato, V. Cafaro (cap. 10)
O. Pepe, V. Ventorino (cap. 10, 13c)
R. Andreozzi, M. Fabbricino, L. Onotri, R. Marotta, F. Pirozzi, M. Race (cap. 11)
S.Pindozzi, S. Faugno, D. Pirozzi (cap. 12)
S. Giordano, P. Adamo, V. Spagnuolo, F. Capozzi, A. Di Palma (cap. 13a)
A. Corniello, M. Sellerino (cap. 13b)
G. Guerriero, G. Ciarcia (cap. 13d)
L.G. Duri (cap. 14)
E. Cervelli, M. Sacchi (cap. 15)
A. Capolupo (cap. 16)
T. Del Giudice T, A. Coppola, G. Cicia (cap. 17)

Regione Campania
A.D'Antonio (cap. 2, 3)

Risorsa SrL
A.Di Gennaro (cap. 3, 4, 20)

ARPAC
S.Di Rosa (cap. 6a)

Con la collaborazione di
CNR-ISAFOM
A. Basile, A. Bonfante, R. De Mascellis, G. Langella, P. Manna, N. Orefice (cap. 5)
CNR-IRC
P. Giudicianni, R. Ragucci, G. Ruoppolo (cap. 12)

Ediguida