

Tecnologie di biorimediazione in una prospettiva Europea: il programma Life BIOREST e il recupero ambientale di suoli inquinati

Virginia Ferruccio

INDICE

Tecnologie di biorimedia in una prospettiva Europea: il programma Life BIOREST e il recupero ambientale di suoli inquinati.

Introduzione..... p.3

CAPITOLO I: Il suolo e le minacce a cui è esposto;

1.1 La complessità del suolo..... p. 4

1.2 Le funzioni del suolo..... p.6

1.3 Le minacce a cui sono esposti i suoli..... p.8

1.4 L' inquinamento del suolo. p.10

CAPITOLO II: Le tecniche di bonifica dei suoli e il biorisanamento

2.1 Tecniche tradizionali di decontaminazione dei suoli; p.17

2.2 Biorisanamento; p.21

2.3 Tipi di Biorisanamento; p.23

2.4 Proprietà dei microrganismi coinvolti nel biorisanamento; p.27

2.5 Un particolare tipo di biorimedia: il fitorimedia.p.38

CAPITOLO III: Riqualificazione dei suoli in Europa e il progetto Bioest;

3.1 L'inquinamento in Europa e strumenti politici adottati per la riqualificazione dei suoli p. 44

3.2 Il progetto LIFE Bioest;p.48

3.3 Il Life Cycle Assessment p.56

Conclusioni p.61

Bibliografia p. 62

Il presente testo è stato formulato e presentato come elaborato finale a completamento di un Corso di Laurea Triennale in “Scienze Ambientali” presso la “Università degli Studi di Roma La Sapienza”, assieme all’aiuto e alle preziose indicazioni della docente di riferimento, la Professoressa Anna Maria Persiani.

Nel presente elaborato finale, viene discusso in che modo la contaminazione di origine antropica da parte di inquinanti organici ed elementi potenzialmente tossici interessi il sistema suolo e in che modo comprometta la sua funzionalità. Tra gli obiettivi di sviluppo sostenibile proposti dall’Organizzazione delle Nazioni Unite, è incluso l’obiettivo 15, che recita: “Entro il 2030, combattere la desertificazione, ripristinare le terre degradate, comprese quelle colpite da desertificazione, siccità e inondazioni, e battersi per ottenere un mondo privo di degrado del suolo”. Il degrado e la contaminazione del suolo sono alcune tra le principali minacce a cui prestare attenzione, a livello mondiale e a livello europeo. Per riqualificare i suoli contaminati da attività umane occorre pianificare una strategia: se questa stessa strategia per lungo tempo è consistita nella bonifica dei suoli mediante trattamenti chimici, fisici, o termici negli ultimi anni la ricerca si è occupata di trovare un metodo alternativo e meno invasivo per la bonifica dei suoli. Il biorisanamento, tema principale di questo elaborato finale, è una tecnologia di bonifica dei suoli che sfrutta le naturali abilità biodegradative dei microrganismi presenti nel suolo per degradare efficacemente sostanze xenobiotiche. I microrganismi si sono adattati nel corso del tempo alla presenza di composti chimici estranei nella matrice suolo e hanno sviluppato per selezione naturale numerose modalità di degradazione di contaminanti di ogni tipo. Ad oggi sono numerose le tecnologie che rientrano nella definizione di “biorisanamento” e vengono ampiamente discusse nell’elaborato: la scelta del trattamento biologico più adatto dipende da diversi fattori, come le caratteristiche dei contaminanti presenti, le caratteristiche dei consorzi microbici presenti e il tipo di suolo contaminato. Viene discusso infine un caso studio: il progetto Life BIOREST; un progetto di bonifica e riqualificazione di un sito inquinato di interesse nazionale situato a Fidenza, in Emilia-Romagna. L’analisi del progetto Life BIOREST, coordinato dal consorzio Italbiotec e co-finanziato dal programma Life dell’Unione Europea, ci pone nella condizione di seguire da vicino la riqualificazione di un sito mediante biorisanamento. Vengono analizzate le fasi di cui si compone l’intero processo di riqualificazione e i risultati ottenuti, viene inoltre commentato il *Life Cycle Assessment* redatto da D’imporzano et al. (2018) per il progetto in questione, per capire infine, se e come lo stesso modello di bonifica possa essere applicato in altri siti contaminati che necessitano di interventi urgenti.

CAPITOLO I: IL SUOLO E LE MINACCE A CUI È ESPOSTO

1.1) La complessità del suolo

Il suolo è un sistema complesso che ricopre, con una continuità interrotta solo da ghiacci, acque e rocce nude, le parti emerse della superficie terrestre e rappresenta il supporto di tutta l'attività biotica all'interno degli ecosistemi terrestri. Esso deriva da complessi e continui fenomeni di interazione tra aria (atmosfera), acqua (idrosfera), substrato geologico (litosfera), organismi viventi (biosfera), attività umane (antroposfera) e rappresenta la "membrana" attraverso la quale avvengono gli scambi di energia e materia con la litosfera e gli altri comparti ambientali regolati mediante emissione o ritenzione di flussi e sostanze. L'energia e la materia incorporate al suo interno vengono trasformate, tramite un laboratorio biologico straordinariamente differenziato e non ancora totalmente compreso, composto da una grande varietà di organismi, in forme utili a sostenere la vita. Il suolo è pertanto sistema complesso in continuo divenire, composto da particelle inorganiche, sostanze organiche, aria ed acqua, in cui si esplicano i cicli biogeochimici necessari per il mantenimento degli esseri viventi sulla superficie del pianeta.

Pedogenesi

Il processo di formazione del suolo è chiamato *pedogenesi*. La pedogenesi comincia con l'alterazione di una roccia madre, chiamata materiale parentale, da parte degli agenti atmosferici. Una roccia affiorante infatti subisce processi di degradazione meteorica, che consistono nell'alterazione e nella disgregazione del materiale roccioso. Questo avviene perché le rocce si formano in condizioni di temperatura e pressione diverse rispetto a quelle in cui si trovano una volta che emergono in superficie a seguito di eventi faglienti o frane. I minerali che compongono tali rocce, non energeticamente stabili alle condizioni di T e P in cui si trovano una volta emersi, subiscono delle modificazioni che danno luogo a prodotti più stabili per le nuove condizioni ambientali: gli agenti meteorologici quali piogge, venti, e variazioni di temperatura, modificano la struttura delle rocce e tendono a trasformare le rocce in frammenti. I processi di degradazione meteorica si dividono in

disgregazione fisica (o meccanica), operata ad esempio dalla dilatazione termica dovuta ad elevate temperatura o dall'alternanza di fasi liquide e solide dell'acqua nei pori rocciosi che tendono a creare fratture, e alterazione chimica. Le reazioni chimiche implicate in quest'ultimo tipo di alterazione sono principalmente reazioni di soluzione, idrolisi e ossidazione, in cui l'acqua di precipitazione è il principale solvente, che trasformano la forma, la composizione, la dimensione dei minerali costituenti le rocce. Pur non potendo soffermarci a lungo su questi concetti, è fondamentale sottolineare la loro importanza: sono questi fenomeni che degradano la roccia madre e contribuiscono a creare una fitta trama di sedimenti e frammenti rocciosi a cui daremo il nome di regolite, "materiale uno" per la formazione del suolo. I frammenti rocciosi che costituiranno la regolite possono accumularsi o sulla roccia madre stessa o essere trasportati altrove dai venti, dai corsi d'acqua o dalla gravità e depositarsi in un altro luogo. Sul substrato pedogenetico si accumula sostanza organica. Dapprima organismi semplici come batteri, muschi e licheni continuano l'azione di alterazione biochimica e forniscono al substrato sostanze organiche e ioni minerali che verranno sfruttati poi da organismi più complessi. Andando avanti nel tempo, il suolo assume un profilo più maturo; ospitando non solo specie vegetali più complesse ma anche organizzandosi in orizzonti a diversa composizione e dalle diverse proprietà chimico-fisiche, importanti per la corretta funzionalità del suolo stesso. Schematicamente elenchiamo gli orizzonti:

- Orizzonte O: orizzonte organico indecomposto, in cui si distingue la lettiera forestale;
- Orizzonte A: Sostanze minerali derivanti dalla roccia madre e abbondante materia organica decomposta, ricca di humus;
- Orizzonte E: detto orizzonte di eluviazione, da cui sono stati rimossi i colloidali, l'argilla, il ferro e l'alluminio e rimangono concentrate particelle di sabbia più grossolane;
- Orizzonte B: dove vengono depositi i materiali rimossi negli orizzonti più alti;
- Orizzonte C: completamente minerale composto dal materiale prodotto per degradazione meteorica della roccia madre.

Bisogna fare tuttavia una precisazione: con il termine suolo infatti si usa indicare la porzione superiore della regolite, in cui assieme alla frazione minerale frammentata si rinviene sostanza organica in decomposizione, organismi viventi, aria e soluzioni liquide (Ciccacci, 2019).

Il tipo di suolo che si viene a creare dipende da diversi fattori pedogenetici, tra cui la natura della roccia madre, il clima presente (T e umidità), il tipo di organismi pionieri e decompositori che abitano il suolo e il tempo di formazione. Per questo motivo si formano in base ai processi fisico-chimico-biologici predominanti suoli di tipo diverso e dalle proprietà diverse.

1.2) Le funzioni del suolo

Gli ecosistemi, attraverso le loro normali funzioni, forniscono un'ampia gamma di beni e servizi, fondamentali per il benessere dell'uomo: i servizi ecosistemici. Essi, secondo la definizione data dal Millenium Ecosystem Assessment (MA, 2005), sono “i benefici multipli forniti dagli ecosistemi al genere umano”. Il *Millennium Ecosystem Assessment* cataloga i servizi ecosistemici in quattro grandi gruppi, che sono:

- Supporto alla vita: servizi necessari alla produzione degli altri servizi ecosistemici, come la formazione del suolo, il ciclo dei nutrienti;
- Approvvigionamento: gli ecosistemi forniscono prodotti come cibo, fibre, legno, acqua, risorse genetiche;
- Regolazione: tra i servizi ecosistemici vengono annoverati quei processi naturali di regolazione del clima e dell'acqua;
- Valori culturali.

Il suolo fornisce un'ampia gamma di servizi ecosistemici, che dipendono dalle diverse funzioni e capacità del suolo stesso. Per esempio alla capacità del suolo di trattenere acqua nei propri pori e supportare la crescita di piante e microrganismi è associata la produzione di alimenti di cui si cibano tutte le specie viventi; la capacità del suolo di distribuire l'acqua di precipitazione alle falde acquifere profonde garantisce la disponibilità di acqua e sali minerali per gli esseri viventi. I suoli hanno una funzione di *carrier*, dal momento che la vita terrestre degli animali e dell'uomo si svolge quasi interamente su queste “piattaforme” complesse; qui sono costruite infrastrutture e centri urbani e qui sono insediati gli habitat terrestri delle specie animali e vegetali esistenti. I suoli hanno capacità di purificare l'aria e le acque contaminate, grazie all'interazione dei contaminanti depositi al suolo con i microrganismi, trattengono o riducono la quantità di gas serra presenti in atmosfera e hanno un ruolo centrale nel corretto svolgimento dei cicli biogeochimici necessari per il corretto funzionamento degli ecosistemi. Le complesse funzioni dei suoli

vengono esaminate più nel dettaglio nei paragrafi successivi. I suoli interagiscono continuamente con l'atmosfera, l'idrosfera e la biosfera. Il loro ruolo vitale e centrale per gli ecosistemi e il ventaglio di servizi che forniscono all'uomo li rende –o li dovrebbe rendere– protagonisti del dibattito ecologico e privilegiati destinatari delle azioni di salvaguardia e riqualificazione ambientale.

Le comunità del suolo

Prima di parlare delle funzioni del suolo, bisogna fare una considerazione circa la vivace comunità di organismi che lo abita. Pochi grammi di terreno possono ospitare un numero incredibile di batteri, ife fungine, alghe, protozoi, nematodi e altri artropodi. Sono i microrganismi presenti nel suolo che trasformano la sostanza organica in composti ricchi di carbonio, attraverso un processo chiamato “mineralizzazione”: sarà questa sostanza organica morta e trasformata a conferire al suolo le caratteristiche di fertilità così importanti per il pianeta. La frazione organica presente nel terreno è costituita da necromasse vegetali, animali e microbiche in fase di decomposizione, da molecole che vengono liberate a seguito della decomposizione, e da molecole umiche che si originano dalle unità organiche più semplici per effetto di una serie di reazioni biochimiche.

Il suolo come sito di stoccaggio del carbonio

Il suolo è un imponente serbatoio di carbonio, e partecipa al ciclo biogeochimico di quest'ultimo interagendo continuamente con l'atmosfera e con la componente vegetale. La maggiore quantità di carbonio nei suoli è trattenuta dalla materia organica del suolo, la *soil organic matter* (SOM): durante i processi di decomposizione, una parte del carbonio è rilasciata nell'atmosfera sotto forma di CO₂, mentre un'altra parte è stabilizzata e “fissata” nel suolo, dove viene trasformata in humus. L'umificazione è essenzialmente un processo di ossidazione in cui molecole organiche complesse sono ridotte ad acidi organici, che possono essere in seguito mineralizzati in forme inorganiche, disponibili per la crescita delle piante.

La quantità di carbonio organico presente in un suolo varia in base alla quantità di carbonio in entrata attraverso detriti vegetali ed essudati radicali, e la quantità di carbonio in uscita attraverso mineralizzazione microbica e lisciviazione. Fattori climatici come la temperatura del suolo e il contenuto di acqua controllano l'entità dell'attività microbica: è generalmente accettato che temperature alte incrementano la decomposizione batterica. Anche il contenuto di acqua influenza lo stoccaggio del carbonio, dal momento che suoli

umidi e ben aerati sono i più favorevoli per la decomposizione microbica.

Il suolo nei cicli di nutrienti

I suoli forniscono alla biomassa vegetale nutrienti come azoto, fosforo, potassio, calcio, magnesio, zolfo e altri elementi che servono alla corretta crescita delle piante. La biomassa vegetale d'altro canto è sfruttata dall'uomo e dagli animali come primaria fonte di cibo, nonché nella produzione di energia e fibre. L'azoto è l'elemento più abbondante nelle forme di vita dopo il carbonio. Gli animali e gli uomini lo acquisiscono dalle piante che a loro volta lo assorbono dal suolo, dove si trova in forma minerale. L'azoto entra nel suolo attraverso dei meccanismi di azoto-fissazione operati da microrganismi, le piante sono in grado di appropriarsi di queste forme di azoto ed eventualmente restituirle al suolo una volta morte e in decomposizione. L'ulteriore apporto è dato dai processi di decomposizione microbica. Il fosforo invece arriva nei suoli dalla regolite: qui si lega facilmente a molecole biochimiche, viene assorbito dagli organismi e ritorna nella forma minerale dopo la decomposizione di questi ultimi. Essendo presente in quantità limitate e legandosi facilmente a ioni-inorganici, il fosforo è un fattore limitante per la crescita della biomassa vegetale.

Il suolo e il ciclo dell'acqua:

Il suolo ha un'importante funzione nella regolazione dei cicli idro-geochimici: l'acqua di precipitazione che arriva ai suoli può andare incontro a destini diversi. Parte dell'acqua viene trattenuta nei pori del suolo dove supporta la crescita delle piante e l'attività microbica. L'acqua in eccesso si infiltra nei suoli e viene persa dal sistema suolo per deflusso (questo meccanismo è particolarmente importante per proteggere il suolo e le arie circostanti da situazioni di allagamento); inoltre parte di quest'acqua può percolare nelle falde acquifere e ricaricare così il contenuto degli acquiferi sotterranei. L'acqua che entra nel sistema suolo, infine, passando attraverso la matrice di materiali eterogenei sia inorganici che organici, interagisce con le particelle di suolo e con gli organismi e viene filtrata e pulita.

1.3) Le minacce a cui sono esposti i suoli

Dopo aver sintetizzato le funzioni del suolo bisogna ricordare che il suolo è considerato una risorsa non rinnovabile, dal momento che i processi di pedogenesi possono durare centinaia, se non migliaia di anni. È quindi di fondamentale importanza, considerato il

ruolo critico che svolge in ogni ecosistema, tutelarne l'estensione e la salute.

L'obiettivo 15 del programma delle Nazioni Unite *Sustainable Development Goals* (obiettivi per lo sviluppo sostenibile), si impone di "gestire le foreste in maniera sostenibile, combattere la desertificazione, fermare il degrado del suolo e riportarlo a condizioni sane, e fermare la perdita di biodiversità." I suoli del pianeta oggi sono esposti ad una serie di minacce che compromettono la loro corretta funzionalità e la realizzazione di tutti i servizi ad essi correlati. Al momento, si stima che l'Europa perda tra gli 8 e i 10 chilometri quadrati di suolo fertile al giorno (Blum, 2008). Le minacce a cui sono esposti maggiormente i suoli in Europa sono:

- a) La diminuzione di sostanza organica;
- b) Erosione del suolo;
- c) Compattazione;
- d) Salinizzazione;
- e) Frane e allagamenti;
- f) Contaminazione;
- g) Impermeabilizzazione.

Queste minacce sono tutte correlate all'urbanizzazione del territorio, a pratiche agricole che vogliono massimizzare la produttività dei raccolti a scapito della salute del suolo o alle attività svolte dalle industrie. La diminuzione di sostanza organica e la compattazione del suolo sono legate a pratiche agricole intensive: per massimizzare la produttività dei raccolti si usano pesticidi e fertilizzanti che alterano la quantità e la qualità di sostanza organica e macchine agricole pesanti che compattano il suolo e modificano la sua tessitura. Anche l'erosione del suolo, assieme all'attività naturale degli agenti esogeni, è legata ad un uso improprio del terreno durante le pratiche agricole. Un suolo non in salute, può non espletare al meglio la sua funzione di drenaggio e causare allagamenti, o può essere soggetto a fenomeni franosi. L'impermeabilizzazione del suolo (*soil sealing*) avviene quando vengono create dall'uomo nuove infrastrutture o abitazioni: il suolo viene coperto da una coltre di materiali impermeabili che compromette la sua efficienza. L'industria, i trasporti e le attività domestiche, producono degli inquinanti organici e inorganici che si disperdono per via aerea e possono avere come destinazione ultima il suolo, attraverso le piogge acide o la deposizione atmosferica. L'ingresso nel suolo di materiali inquinanti, come metalli pesanti, composti inorganici e composti xenobiotici

causa fenomeni di degradazione, salinizzazione e acidificazione del suolo. Anche l'uso intensivo di fertilizzanti e pesticidi, assieme alla deposizione di inquinanti, presenti nell'atmosfera può avere effetti severi sulla qualità del suolo, sulla qualità delle acque sotterranee e del cibo prodotto dall'agricoltura.

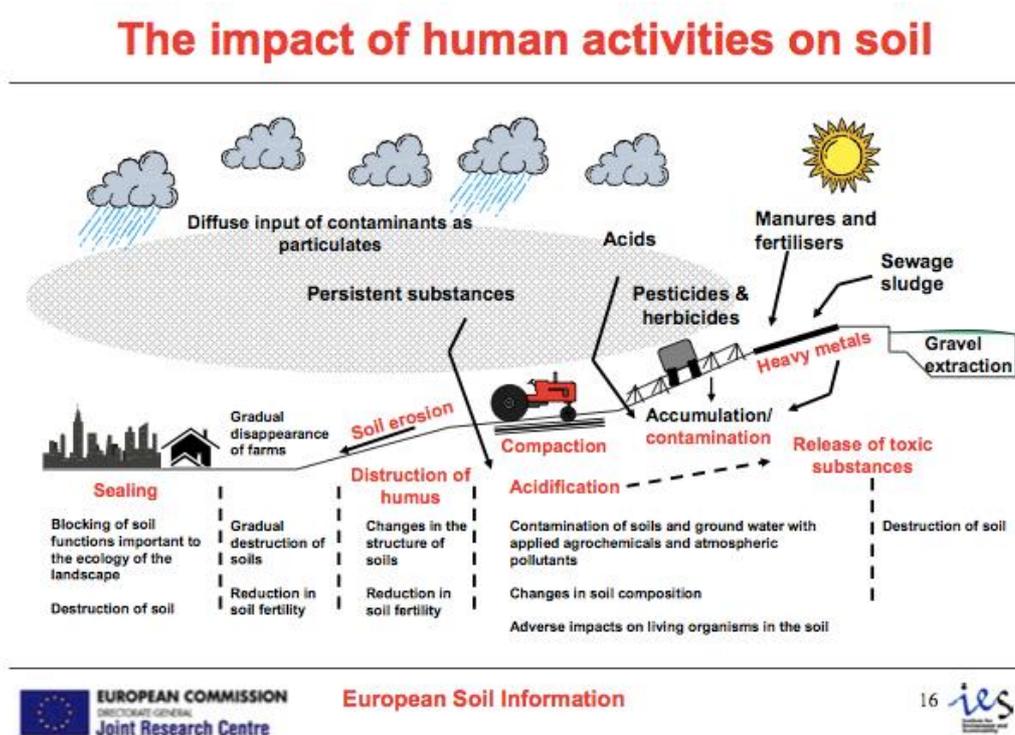


Figura 1: Impatto delle attività umane sul suolo (EC, JRC; IES https://www.researchgate.net/publication/259820224_Soil_Erosion_a_main_threats_to_the_soil_in_Europe/figures?lo=1).

1.4) L'inquinamento del suolo;

Il termine "inquinamento del suolo" si riferisce alla presenza di una sostanza chimica aliena e/o presente in quantità superiori alla normale concentrazione che ha effetti avversi su altri organismi (FAO et ITPS, 2015). È stato stimato che ci sono circa 2.5 milioni di siti potenzialmente inquinati nell'area Economica Europea (EEA, 2011) e l'inquinamento del suolo è stato identificato come la terza minaccia per gravità rispetto alla perdita di funzionalità dei suoli in Europa ed Eurasia, tanto da convincere la comunità europea a redigere programmi di salvaguardia o riqualificazione del suolo sempre più stringenti. L'inquinamento del suolo può avere origini differenti: quando la causa dell'inquinamento è uno specifico evento in una determinata area in cui i contaminanti sono rilasciati nei suoli, si parla di inquinamento puntiforme (*point source pollution*). Le sorgenti puntiformi hanno principalmente origine antropica. L'inquinamento diffuso (*diffuse pollution*) è un tipo di inquinamento che riguarda grandi aree, che non ha una singola e facilmente definibile fonte. Gli inquinanti che si disperdono causando inquinamento diffuso molto spesso hanno

subito delle trasformazioni e hanno interagito con l'interfaccia aria o acqua. Le fonti dell'inquinamento sono diverse, ed è anche vero che prima di valutare la concentrazione di inquinanti in un suolo -affinché la valutazione non sia fuorviante- bisogna conoscere la natura del materiale parentale. Molto spesso infatti il materiale parentale è naturalmente ricco di metalli pesanti e altri elementi potenzialmente tossici, come l'arsenico (As) e il gas radon (Rn). Molto più frequentemente si parla di inquinamento del suolo causato da attività umane: le più pericolose per la salute del terreno sono quelle che nelle lavorazioni utilizzano composti chimici altamente tossici che possono causare seri danni al sistema suolo una volta che vi arrivano. La tabella 1 elenca le attività dannose per la salute del suolo e i composti maggiormente rilasciati da quest'ultime.

Tabella 1: A sinistra attività antropiche potenzialmente inquinanti e a destra i principali contaminanti rilasciati da quest'ultime. (Dati estratti dal rapporto FAO "Soil pollution: a hidden reality", 2015).

Attività inquinanti	Inquinanti rilasciati
Attività industriali	<ul style="list-style-type: none"> -Gas e radionuclidi rilasciati in atmosfera -Composti chimici o scarti industriali possono raggiungere il terreno per pratiche scorrette di smaltimento; -Acqua e fluidi di raffreddamento contenenti cloro e metalli pesanti rilasciati nei corsi d'acqua; -Altri composti inquinanti sono rilasciati dal sito industriale sotto forma di polvere, sabbia, cenere o fumi.
Attività estrattive	<ul style="list-style-type: none"> -I processi di fusione e di estrazione rilasciano inquinanti nel terreno.; -I residui minerali formati da particolato fine possono essere dispersi dal vento o dall'acqua e diffondere il loro contenuto di metalli pesanti; -L'estrazione di petrolio e gas naturale può rilasciare petrolio greggio e acqua salata, talvolta ricchi di composti radioattivi.
Mezzi di trasporto	<ul style="list-style-type: none"> -I prodotti della combustione della benzina possono essere rilasciati in atmosfera ed essere depositi a livello dei suoli anche a centinaia di chilometri dal sito di rilascio; -L'acqua di precipitazione può portare ai suoli particelle ricche di metalli pesanti prodotte dalla corrosione del metallo del

<p>Infrastrutture urbane</p>	<p>veicolo, dall'abrasione degli pneumatici e della strada, nonché residui di plastica, gomma e idrocarburi.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Discariche urbane e acque di scarico non trattate rilasciano nell'ambiente metalli pesanti e inquinanti organici; -I prodotti per la cura personale (PPCP) possono finire nella rete fognaria ed essere incorporati nei "biosolidi", materia organica solida recuperata dalle acque reflue e usata come fertilizzante. I PPCP sono così introdotti negli ambienti terrestri e acquatici; -La vernice a base di piombo, quando polverizzata durante restauri o demolizioni, può entrare nell'ambiente; -Le plastiche enormemente impiegate per la creazione di imballaggi, buste, o oggetti quotidiani di vario tipo, sono teoricamente chimicamente inerti. Possono rilasciare oligomeri come poliuretani, poliacrilonitrili e polivinilcloruri; -Le plastiche hanno inoltre la capacità di frammentarsi e assorbire composti come i POP, PAH, e metalli pesanti. Più le particelle di plastica sono piccole, maggiori sono le loro capacità di assorbimento.
<p>Smaltimento di rifiuti e acque reflue</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Lo smaltimento e l'incenerimento di rifiuti liberano inquinanti in atmosfera o nel suolo, tra cui metalli pesanti, idrocarburi poli-aromatici, composti farmaceutici e PPCP; -Gli stabilimenti che riciclano le batterie al piombo sono stati identificati come alcuni tra i maggiori responsabili della contaminazione del suolo; -I rifiuti elettronici contengono metalli preziosi come oro e rame, ma quando non vengono smaltiti secondo una regolamentazione adeguata possono liberare metalli pesanti e alcuni metalloidi; -I fanghi di depurazione estratti dalle acque reflue possono essere validi fertilizzanti, ma quando non opportunamente trattati possono contenere diversi inquinanti come metaboliti secondari umani o prodotti per

<p>Settore agricolo e zootecnia</p>	<p>l'igiene e la salute.</p> <ul style="list-style-type: none"> -I rifiuti animali potrebbero contenere residui di prodotti veterinari, antibiotici o parassiti che possono accumularsi nel suolo e portare ad una proliferazione di batteri resistenti agli antibiotici; -L'uso inefficiente dei fertilizzanti e dei nutrienti come azoto e fosforo provoca una perdita di qualità del suolo, inoltre l'azoto in eccesso viene perso sotto forma di gas e il fosforo contribuisce all'eutrofizzazione dei corsi d'acqua vicini; -L'industria dei fertilizzanti è considerata una tra le maggiori cause della produzione di metalli pesanti e radionuclidi; -I pesticidi di vecchia generazione ancora usati in alcuni paesi contengono composti chimici che causano danni alla salute umana a seguito di lunghe esposizioni.
--	---

Come si può notare dalle informazioni contenute nella tabella, ogni aspetto della vita quotidiana è potenzialmente e indirettamente dannoso per la salute del suolo. Prendere la macchina per andare al lavoro, acquistare un telefono decidendo di buttarne uno vecchio, restaurare la propria casa: ogni gesto, grande o piccolo che sia, ha il potere di intaccare la salubrità del suolo. Due note sono necessarie riguardo ai dati contenuti nella tabella: seppure sia vero che l'inquinamento del suolo in Europa è un problema preoccupante e di grande rilevanza, molti composti chimici, contenuti ad esempio nei fertilizzanti o nei pesticidi, sono vietati dalla CE. Così come il trattamento dei rifiuti e delle acque reflue è regolamentato da standard di sicurezza elevati (almeno in teoria). La Comunità europea negli ultimi anni si è vivacemente attivata per la progressiva sostituzione di prodotti in plastica usa e getta con prodotti bio-degradabili. Nelle sezioni successive saranno presenti ulteriori riferimenti alle più rilevanti cause di inquinamento del suolo in Europa.

Come già detto, i composti chimici che si ritrovano nei suoli sono perlopiù di natura antropica, prodotti da varie attività. L'assorbimento e la persistenza di tali composti nel suolo variano in base alla natura chimica dei composti e in base a caratteristiche del suolo come la quantità di sostanza organica, la tessitura e composizione del suolo e il contenuto di argilla, il pH, la temperatura e il livello di idratazione dei suoli. A seconda di questi parametri, i composti chimici estranei che entrano nel sistema suolo possono essere più o meno accumulati e più o meno evitati nell'ambito delle varie funzioni del suolo che, come

ricordiamo, ha capacità di filtrare, tamponare e trasformare i contaminanti organici e inorganici con cui viene a contatto (Blum, 2008). I contaminanti possono essere trattenuti nel suolo a causa delle capacità di adsorbimento delle molecole che lo compongono: infatti la sostanza organica morta e l'argilla hanno elevate capacità di scambio cationico. Essi sono carichi negativamente e possono trattenere sulla loro superficie dei cationi carichi positivamente: nelle naturali condizioni del suolo la capacità di scambio cationico permette ai colloidi umici e argillosi di immobilizzare e rendere disponibili per le piante importanti composti come il calcio, il magnesio, il potassio. Questo meccanismo fa sì che le suddette molecole siano in grado di trattenere sulla loro superficie (adsorbire) anche elementi/composti potenzialmente tossici che posseggono i requisiti chimici per essere adsorbiti. Il pH del terreno e la quantità di ossigeno influiscono sugli stati di ossidazione dei vari composti e possono attenuare o incrementare la mobilità degli inquinanti affini. Anche l'acqua contenuta nel terreno ha la capacità di formare legami idrogeno con contaminanti che presentano polarità. In generale, molecole non polari e idrofobiche vanno incontro ad una serie di interazioni con la sostanza organica morta che determinano il loro sequestro a lungo termine e la loro persistenza nel terreno. Composti di ogni tipo sono oggi presenti nei nostri suoli, e hanno effetti diversi sulla nostra salute, sia a breve termine che a lungo termine. I metalli pesanti, presenti in molti suoli, sono tra i composti chimici più persistenti e più difficili da rimuovere dai suoli. I metalli si accumulano nei tessuti degli organismi viventi perché non sono coinvolti nelle reazioni metaboliche: zinco, nichel, cobalto e rame sono tossici per le piante, mentre cromo, mercurio e arsenico sono più tossici per gli animali. L'eccesso di azoto e fosforo nei suoli dovuto all'uso smodato di fertilizzanti rendono le coltivazioni più suscettibili ai patogeni, determinando una minore resa nella produttività e portando all'eutrofizzazione dei sistemi acquosi vicini. L'azoto è perso dai suoli sotto forma di gas, uscendo dal sistema contribuisce in maniera negativa all'aumento dei gas serra; esso può lisciviare nelle falde acquifere e causare, qualora usate come acque potabili, disfunzionalità cardiache e cancro. Una grande classe di composti, gli idrocarburi, è presente in molte forme nei suoli contaminati. Gli idrocarburi si dividono in alifatici e aromatici, a seconda del numero di legami presenti e alla presenza di anelli aromatici. Gli idrocarburi sono liberati in atmosfera a seguito di processi di combustione incompleta delle sostanze ad alto contenuto di carbonio, come il carbone e i combustibili fossili, dalla combustione dei rifiuti e dalla lavorazione del petrolio, mentre in ambiente urbano vengono immessi nell'ambiente dalle emissioni dei veicoli stradali o dai distributori di benzina. Tali composti possono raggiungere il suolo attraverso deposizione

o piogge acide. Elementi di notevole pericolosità appartenenti al gruppo degli idrocarburi sono i composti organici volatili, di cui fa parte la particolare classe di composti BTEX, gli idrocarburi policiclici aromatici e gli idrocarburi clorurati. BTEX è l'acronimo di benzene, toluene, etilbenzene e xilene: questi prodotti estremamente volatili sono legati all'industria dei combustibili fossili, e hanno effetti negativi sul sistema nervoso centrale. Gli idrocarburi clorurati, o organocloruri, sono degli idrocarburi legati ad uno o più atomi di cloro. La presenza di cloro, come verrà specificato a breve, rende gli inquinanti più recalcitranti e difficili da smaltire. Gli idrocarburi policiclici aromatici sono un altro gruppo di composti chimici la cui presenza si riscontra spesso nei suoli: alcuni tra questi (elencati nella tabella 2) sono stati dichiarati tossici, mutagenici e cancerogeni per la salute umana. Questi composti si accumulano nei suoli a causa della loro persistenza e della loro idrofobicità. In seguito, risalendo la catena alimentare si accumulano nei tessuti adiposi degli organismi, ma non si accumulano nei tessuti vegetali con un alto contenuto di acqua. Parte di questi composti sono inclusi in un'altra categoria di composti pericolosi, chiamata *persistent organic pollutants* (POP). Dei POP fanno parte composti chimici eterogenei accomunati dalla stessa capacità di persistere nell'ambiente e bioaccumularsi lungo la catena alimentare, con tutti gli effetti dannosi che questa persistenza può avere sulla salute umana e sull'ambiente. Sono composti idrofobici e lipofilici, che quindi si accumulano con facilità nei tessuti adiposi. Sono composti estremamente mobili, e quindi possono depositarsi nei suoli a grande distanza dal luogo dove sono stati rilasciati: una volta legati alla sostanza organica è difficile rimuoverli, e questa caratteristica rende i POP's ancora più pericolosi per la salute umana, seppure l'uso di tali composti sia stato gradualmente vietato già a partire dagli anni '70. I radionuclidi sono presenti nei suoli sia per cause naturali legate alla geologia del luogo che per cause antropiche: lo sfruttamento dell'energia nucleare e del materiale radioattivo per la costruzione di armi di distruzione di massa è stato complice del rilascio in atmosfera di tali radionuclidi, che poi si sono depositati al suolo. Senza dimenticare poi i numerosi incidenti nucleari che si sono verificati nel secolo scorso e nel 2011 (Fukushima) che hanno portato all'abbandono di migliaia di ettari di aree coltivabili per la pericolosa concentrazione di radionuclidi lì arrivati a causa del *fall-out* radioattivo. Infine, un ulteriore riferimento va fatto agli inquinanti emergenti, ossia ad un largo ventaglio di composti chimici naturali o sintetici: gli effetti sulla salute umana e sull'ambiente sono ancora oggetto di studio, ma si pensa che possano essere potenzialmente pericolosi. Tra questi compaiono prodotti farmaceutici, pesticidi, surfattanti, prodotti per la cura personale, trovati di frequente in acque di falda,

acque reflue, suoli e alimenti (Rosenfeld, 2011). Di questi composti fanno anche parte gli interferenti endocrini (analgesici, antibiotici, ormoni): sostanze che sono in grado di alterare il sistema endocrino e possono procurare disfunzioni tiroidee, ridurre la fertilità, alterare il metabolismo o compromettere il sistema immunitario (EPA). Tra gli interferenti endocrini sono presenti composti plastificanti e additivi come il bisfenolo e gli ftalati, trovati in elevate concentrazioni nei suoli vicini alle aree urbane e peri-urbane.

La degradabilità di questi composti, definita come la capacità con cui essi possono essere ridotti o rimossi dai suoli, dipende dalla complessità del composto stesso, espressa come numero di anelli benzenici presenti, peso molecolare del composto, numero di ramificazioni e numero di atomi di cloro presenti. Gli idrocarburi alifatici vengono degradati con facilità, seguiti dagli idrocarburi aromatici che hanno uno o due anelli: alcoli esteri e nitrobenzeni sono degradati relativamente presto. Idrocarburi che hanno subito numerose sostituzioni con atomi di cloro (come i policlorobifenili) e i pesticidi sono i più recalcitranti in natura. Nella tabella 2 sono indicate alcune classi di inquinanti frequentemente ritrovate nei suoli contaminati d'Europa e del mondo. Nella figura 2 invece vengono indicati i principali contaminanti presenti nei suoli e nelle acque sotterranee in Europa e in Italia.

Tabella 2: Alcuni esempi di contaminanti presenti nei suoli particolarmente pericolosi dal punto di vista ambientale e per la salute. (Dati estratti dal rapporto FAO "Soil pollution: a hidden reality", 2015)

Classe di inquinanti	Esempi di inquinanti appartenenti a tali classi
Metalli Pesanti ed elementi in traccia	As, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Sb, F, Be, Mn
BTEX	Benzene, toluene, etil-benzene, xilene
Idrocarburi policiclici aromatici	Naftalene, Antracene, Fluorantene, Benzo[a]pirene, Fenantrene, Fluorene
Pesticidi	DDT, Aldrin, Dieldrin, Lindano, Atrazina
Persistent organic pollutants	Aldrin, Dieldrin, DDT, Diossino, Furano, PCB, Esaclorobenzene, Toxafene

**Contaminants affecting the solid matrix (soil, sludge, sediment) as reported in 2011 –
Contaminants affecting soil and groundwater in Europe**

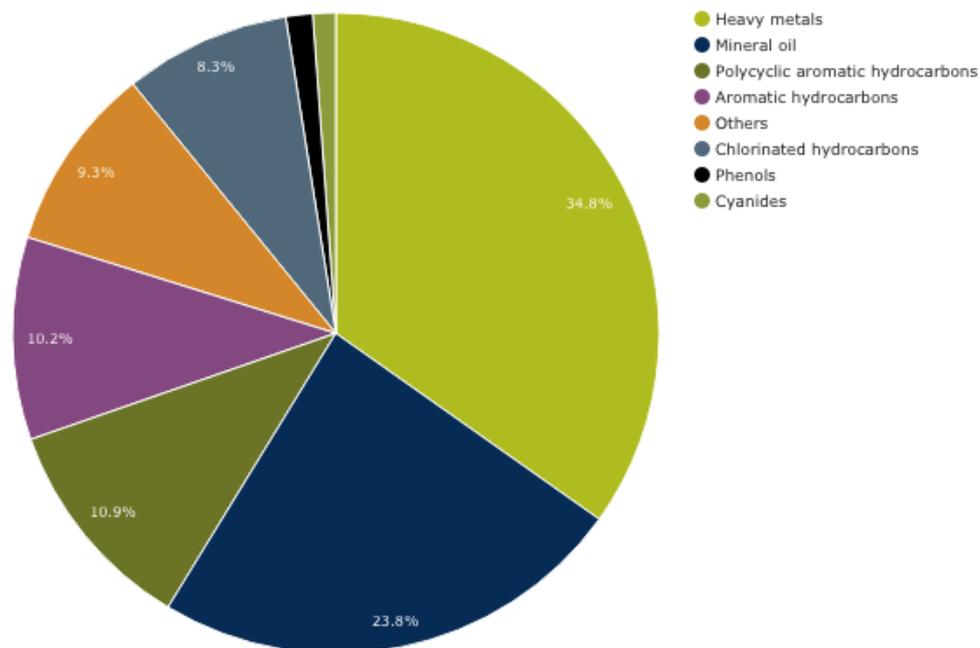


Figura 2: I principali contaminanti presenti nei suoli e nelle acque sotterranee in Europa. (EEA <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment>)

CAPITOLO 2: LE TECNICHE DI BONIFICA DEI SUOLI E IL BIORISANAMENTO

2.1) Tecniche di decontaminazione dei suoli

I suoli sono dei delicati sistemi che svolgono numerose funzioni vitali per il pianeta. Nella comunità Europea la loro salute è in parte compromessa. Se un suolo è altamente contaminato, lo sfruttamento delle sue risorse potrebbe influenzare la salute umana e animale. I suoli inquinati richiedono dunque degli interventi di bonifica. Tuttavia, le tecniche di “bonifica” più usate nella Comunità Europea sino ad ora, riguardano principalmente la rimozione dei suoli inquinati e il loro smaltimento, come mostrato nella figura 3:

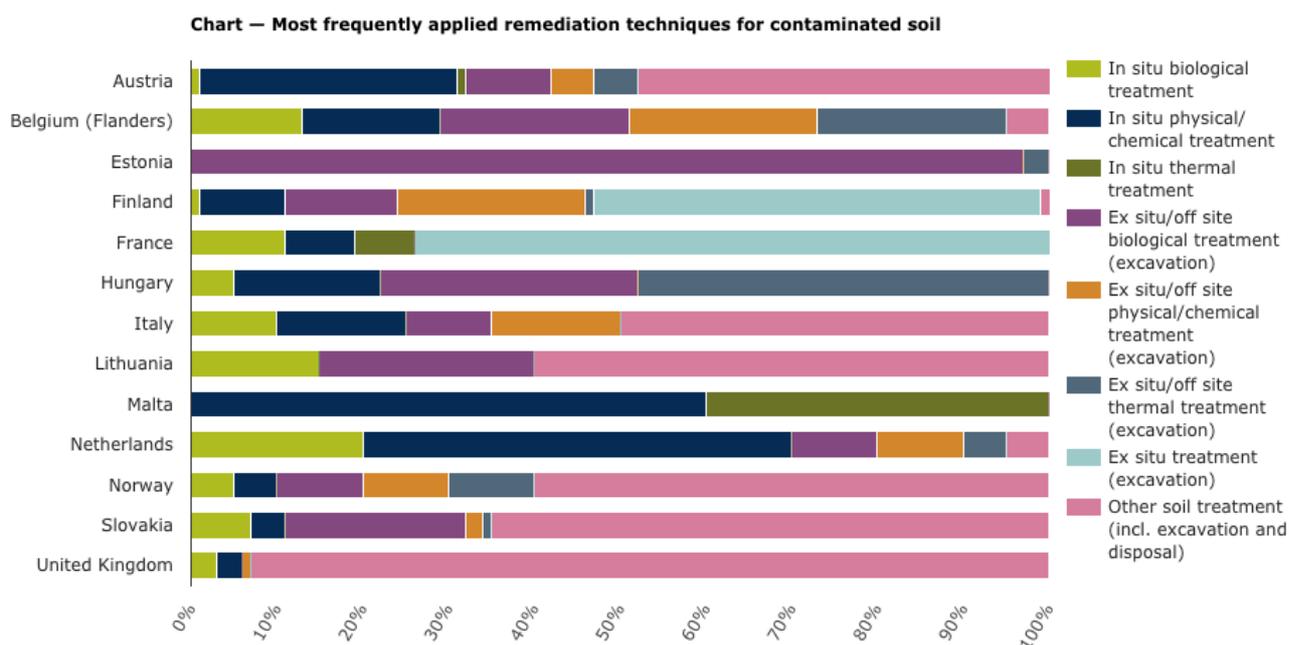


Figura 3: Tecniche di bonifica applicate più frequentemente in 13 paesi europei (EEA <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment>).

La rimozione dei suoli contaminati e il loro successivo smaltimento comporta un costo enorme in quanto a perdita di servizi ecosistemici e biodiversità, e risulta chiaro che ad oggi questi trattamenti sono inadeguati e inefficienti, anche a fronte del numero sempre maggiore di siti contaminati e della richiesta in crescita di risorse nutritive dovute all'impressionante aumento della popolazione. I trattamenti di suoli contaminati con tecniche che non prevedano il loro smaltimento si dividono in trattamenti *ex situ* e *in situ*. I metodi di bonifica *ex-situ* prevedono che il sito contaminato sia trasportato e trattato in un luogo diverso rispetto a quello in cui si trova. Invece i trattamenti *in-situ* tendono a rimuovere i contaminanti dal suolo senza spostare il suolo stesso o i sedimenti: la decontaminazione *in-situ* ha il vantaggio di essere meno costosa di quella *ex-situ* e di trattare porzioni importanti di suolo causando il minimo impatto possibile al sistema. Ad ogni modo, i metodi di decontaminazione con cui i suoli inquinati vengono trattati sono di diverso tipo e possono essere divisi in trattamenti chimici, fisici, termici e biologici. I trattamenti fisici, riassunti nella tabella 3, sfruttano processi fisici per immobilizzare o allontanare i contaminanti dal suolo. Le tecnologie più comuni sono:

Tabella 3: La bonifica dei suoli secondo trattamenti fisici si avvale principalmente di queste tecnologie. (Dati estratto da: Thomé et al. 2020.)

Surface capping	Il sito contaminato viene coperto da
------------------------	--------------------------------------

	<p>materiale scarsamente permeabile. In questo modo viene ridotta la mobilità dei contaminanti; è una strategia di contenimento perché i contaminanti non vengono rimossi e il suolo viene deteriorato dalla copertura con sostanze impermeabili.</p>
<i>Vapor extraction</i>	<p>Tecnologia <i>in-situ</i> usata per rimuovere contaminanti organici volatili. Sono installati dei pozzi verticali o orizzontali nel terreno che aspirano i gas contaminanti. I vapori devono poi essere trattati prima del rilascio in atmosfera. Il successo di questa tecnologia dipende dalla pressione del vapore e dalla solubilità dei contaminanti presenti.</p>
<i>Electrokinetic remediation</i>	<p>Vengono installati degli elettrodi nel suolo che creano un debole campo elettrico: i cationi migrano dunque verso il catodo e gli anioni verso l'anodo. Questa tecnica è efficace per suoli saturi a bassa conduttività. (Liu et al. 2018)</p>

I trattamenti chimici (tabella 4) sfruttano i meccanismi di adsorbimento, precipitazione e complessazione dei composti per immobilizzare o rimuovere i contaminanti dal sistema suolo (Song et al. 2017).

Tabella 4: Trattamenti chimici a cui sono comunemente sottoposti i suoli che necessitano di bonifica. Dati estratti da: Thomé et al. 2020.

<i>Solidification and stabilisation</i>	<p>Questi processi catturano e immobilizzano i contaminanti <i>in-situ</i> o <i>ex-situ</i> attraverso l'introduzione di agenti chimici nel suolo che convertono i contaminanti mobili in forme più stabili. Nel processo di solidificazione il contaminante è incapsulato in una forma solida, come cemento, asfalto o termoplastica; il blocco solido che contiene il contaminante è resistente all'acqua e previene la migrazione dei contaminanti. Nel processo di stabilizzazione invece vengono aggiunti al suolo composti come carbonati, fosfati, materia organica, argille, minerali contenenti ferro, che interagiscono con i contaminanti formando precipitati,</p>
--	--

	complessi chimici, o reazioni di adsorbimento, e riducono per questo la mobilità dei contaminanti stessi.
Soil washing	Questa tecnologia <i>ex-situ</i> utilizza l'acqua per separare le varie classi granulometriche del terreno: i contaminanti rimangono adsorbiti alla frazione fine del suolo, che viene per questo motivo smaltita. Invece la frazione del suolo costituita da sabbia e ghiaia viene reinserita in loco.
Nanotechnology	Nano molecole di metalli a valenza zero, come il ferro, nichel e palladio, sono iniettate nel suolo dove hanno la capacità di stabilizzare composti come cromo e arsenico e dealogenare composti organici.

I trattamenti termali utilizzano il calore per volatilizzare, mobilizzare o distruggere i contaminanti nel suolo; essi sono riassunti nella tabella 5.

Tabella 5: Due tecnologie comunemente usate quando si effettua una bonifica del suolo sfruttando il calore. Dati estratti da: Thomé et al. 2020.

Vitrification	Il suolo viene riscaldato fino a raggiungere una consistenza vetrosa. Si forma una matrice inerte che incapsula i contaminanti e ne permette la rimozione. Questa procedura è particolarmente efficace e può essere applicata persino su suoli radio-attivi, mentre è sconsigliata per suoli ricchi di materia organica.
Thermal Desorption	I contaminanti vengono rimossi dai suoli sfruttando le alte temperature che trasformano i contaminanti organici in gas. I gas devono essere trattati prima di essere rilasciati in atmosfera. Questa tecnica può essere applicata sia <i>in-situ</i> , attraverso l'escavazione di pozzi dove vengono inserite piastre riscaldanti, sia <i>ex-situ</i> .

In Italia, come si può notare dalla figura 4, le tecnologie più usate per trattare i suoli contaminati –escluse le pratiche di smaltimento dei suoli, che costituiscono una buona

percentuale dei metodi usati nel nostro paese- sono i trattamenti fisico-chimici *in situ* ed *ex-situ* e i trattamenti *in-situ* ed *ex-situ* biologici.

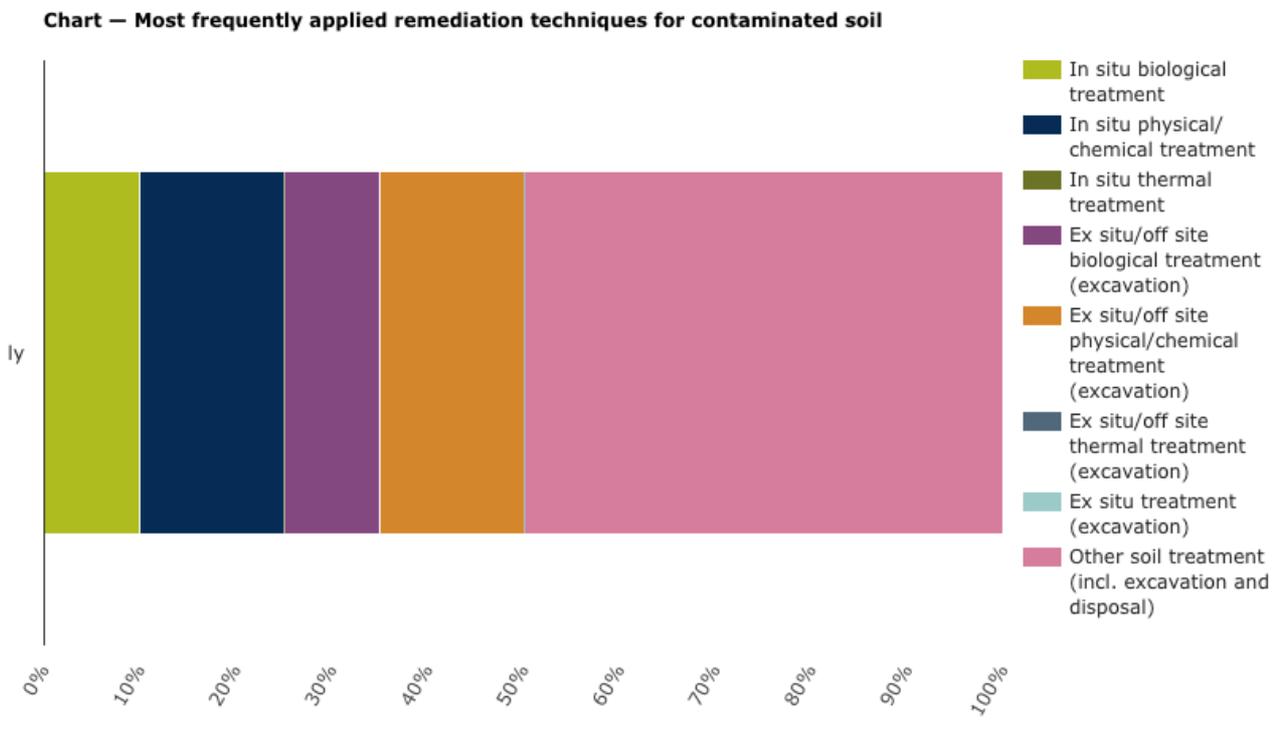


Figura 4; Tecniche di bonifica applicate più frequentemente in Italia. (EEA <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment>)

In effetti, c'è un'altra ampia classe di tecnologie di risanamento che non è stata ancora citata e viene messa in pratica, con proporzioni diverse, da quasi tutti i paesi appartenenti all'Unione Europea. Stiamo parlando dei trattamenti biologici, che prendono il nome generale di biorimediazione o biorisanamento.

2.2) Il biorisanamento

Le tecnologie di biorisanamento comprendono tutti quei trattamenti che sfruttano i processi biologici dei microrganismi naturalmente presenti nei suoli (lieviti, funghi, batteri) al fine di ridurre la concentrazione di contaminanti nel suolo a livelli accettabili di tossicità per il sistema (Azubuike et al.2016). Le reazioni biologiche di catalisi di questi microrganismi agiscono sugli inquinanti, eliminando o riducendo la tossicità di composti chimici presenti in acque reflue, fanghi di depurazioni, suoli e acquiferi. L'idea di utilizzare i processi biologici per trattare matrici contaminate si sviluppa a partire dal 1900, e inizialmente riguarda il trattamento di acque reflue e fanghi di depurazione. Solo negli anni '70 si delinea la prospettiva di applicare le medesime tecnologie anche *in-situ* nei suoli, ma

devono passare ancora vent'anni prima che queste vengano considerate sicure da un punto di vista economico e più affidabili e produttive dei trattamenti alternativi che sfruttano reazioni chimico/fisiche discussi nel paragrafo precedente. Il biorisanamento offre diversi vantaggi, ma anche numerosi svantaggi. Una delle caratteristiche che rendono il biorisanamento una tecnica valida è il suo costo contenuto rispetto alle altre tecnologie, come mostrato in figura 5. La decontaminazione avviene per lo più *in-situ*, permettendo la riduzione di pericolo associato al trasporto di materiale contaminato e un minore impatto per l'ambiente. Altre caratteristiche rilevanti riguardano il fatto che i contaminanti organici possono in certi casi essere totalmente rimossi (ossia convertiti in acqua, diossido di carbonio e sali) e non trasformati in una fase diversa o rimossi meccanicamente. I naturali processi di biodegradazione sono più economici degli altri trattamenti analizzati e sono in grado di attaccare anche alcuni contaminanti idrofobi recalcitranti. Inoltre i trattamenti biologici godono di un importante consenso pubblico. Gli svantaggi riguardano invece il fatto che i metalli pesanti possono solo essere biotrasformati da parte dei microrganismi, in forme più stabili e quindi non biodisponibili, oltre alla difficoltà dei microrganismi di sopravvivere in contesti ambientali estremamente inquinati e il fatto che questo tipo di tecnologia preveda un lungo e costante monitoraggio, che potrebbe rendere questo strumento non economico nel corso del tempo. La tabella 6 mostra una comparazione dei costi medi delle opzioni di bonifica disponibili oggi; si noti che il biorimediazione è competitivo da un punto di vista economico rispetto ad altre tecniche tradizionali considerate.

Tabella 6: Comparazione dei costi dei diversi metodi per trattare i suoli contaminati con inquinanti potenzialmente tossici (Hellemans, Bunch, 1993).

Table 1.6. Costs of Alternative Methods to Treat Soil Contaminated with Hazardous Wastes

Treatment Method	Average Cost (U.S. \$/m ³)	Typical Range (U.S. \$/m ³)
Incineration	975	350–1600
Landfilling	350	100–600
Thermal desorption	125	50–200
Soil washing	237	125–350
Above-ground bioremediation	95	40–150

Adapted from *Bioremediation Report* (1993).

2.3) Tipi di biorisanamento

Le tecnologie di biorisanamento possono essere effettuate *ex-situ* o *in-situ*, in base al tipo di contaminante presente, al tipo di microrganismi più adatti, all'intensità di contaminazione e alle caratteristiche geologiche e geografiche del sito considerato. Le tecnologie *ex-situ* prevedono la rimozione di parte del suolo contaminato e il suo trattamento in un altro luogo. Il vantaggio nell'impiego di questo tipo di tecnologia risiede soprattutto nel fatto che parametri abiotici e biotici possono essere artificialmente controllati per ottenere i risultati desiderati. Lo svantaggio è rappresentato dall'importante impatto arrecato al sistema e dai costi relativi al trasporto del materiale contaminato. A seguire le tecnologie *ex-situ* maggiormente utilizzate:

- **Biopila:** Il biorimedio mediato da biopila è una tecnologia *ex-situ* che consiste nell'impilamento di cumuli di suolo in cui viene migliorata l'aerazione, l'idratazione, e l'apporto di nutrienti al fine di favorire la crescita dei ceppi batterici presenti e incrementare le loro opportunità di risanamento. Solitamente questa tecnica viene applicata su terreni inquinati da idrocarburi, gli idrocarburi più leggeri evaporano dal sistema, mentre quelli più pesanti subiscono delle reazioni di degradazione aerobica da parte dei batteri presenti. È una tecnica efficace per risanare suoli che si trovano in ambienti estremi come le regioni molto fredde del pianeta (Dias et al. 2015).
- **Windrow:** È una tecnica di bonifica *ex-situ* in cui i suoli sono interessati da rotazioni periodiche per stimolare l'attività di biodegradazione degli organismi presenti nel suolo, come schematizzato in figura 5. La rotazione periodica dei cumuli di terreno, assieme ad una maggiore idratazione di questi ultimi, stimola l'aerazione e l'attività microbica, e favorisce una distribuzione uniforme di contaminanti (Barr 2002). Questa tecnica è usata preferibilmente per la rimozione di idrocarburi, mostrando persino tassi di degradazione più elevati della tecnica di *biopiling*, tuttavia l'utilizzo di questo trattamento, a causa della creazione di zone anaerobiche, può rilasciare in atmosfera il metano, un gas serra.

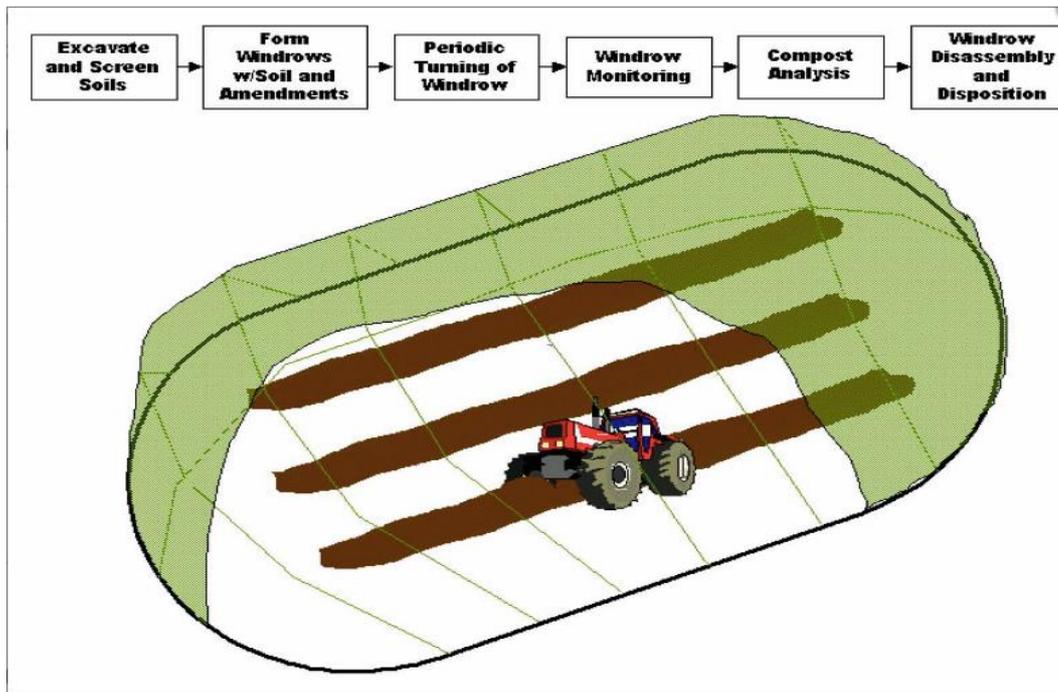


Figura 5: Schematizzazione della tecnica windrow per trattare un terreno contaminato (Federal remediation technologies roundtable <https://frtr.gov/matrix/Composting/>)

- **Bioreattori:** I bioreattori sono dei grandi contenitori in cui vengono inseriti materiali contaminati e in cui vengono riprodotte artificialmente le condizioni chimico-fisiche migliori per la proliferazione dei microrganismi coinvolti nella biodegradazione. L'utilizzo di bioreattori permette di avere una certa flessibilità nel controllo delle reazioni metaboliche di degradazione degli inquinanti; non solo è possibile aggiustare parametri come pH, temperatura, tasso di aerazione, ma si può anche decidere di aumentare la quantità di batteri degradanti, la quantità di contaminanti, la quantità di nutrienti, massimizzando i tassi di degradazione e riducendo la perdita abiotica, come dimostrato dalle applicazioni pratiche nell'ambito del progetto Life BIOREST, di cui parleremo nella successiva sezione. La bonifica in bioreattori mostra una grande efficacia per quanto riguarda lo smaltimento di composti organici volatili (VOC) e BTEX (Benzene, Toluene, Etilene, Xilene), anche se la versatilità di questa tecnica permette di ottenere risultati soddisfacenti con un ampio ventaglio di composti. Inoltre, essendo una tecnica *ex-situ*, è anche possibile inoculare nei bioreattori microrganismi geneticamente modificati (GEM) che hanno abilità degradative superiori ai microrganismi selvatici, e poi rimuoverli prima di reintrodurre il suolo in natura.
- **Land farming:** I suoli inquinati dopo il prelievo da un sito, vengono mescolati con soluzioni nutritive e poi stesi su un letto drenante, dove sono mantenute le

condizioni di aerazione e idratazione ottimali per la proliferazione dei microrganismi e le reazioni di biodegradazione. I principali limiti di questa tecnica di bonifica abbastanza semplice ed economica da applicare e mantenere si incontrano con la tipologia di contaminanti trattati. I contaminanti volatili tossici potrebbero lasciare il sistema attraverso volatilizzazione e inquinare l'atmosfera, mentre un'altra fonte di preoccupazione risiede nella lisciviazione dei materiali inquinanti nelle acque sotterranee o nei terreni sottostanti. Ad ogni modo, la tecnica di *land-farming*, schematizzata nella figura 6, rimuove con efficienza idrocarburi di petrolio, rifiuti organici, pentaclorofenoli (PCP), idrocarburi policiclici aromatici (PAH) e alcuni pesticidi (Center for public environmental oversight).

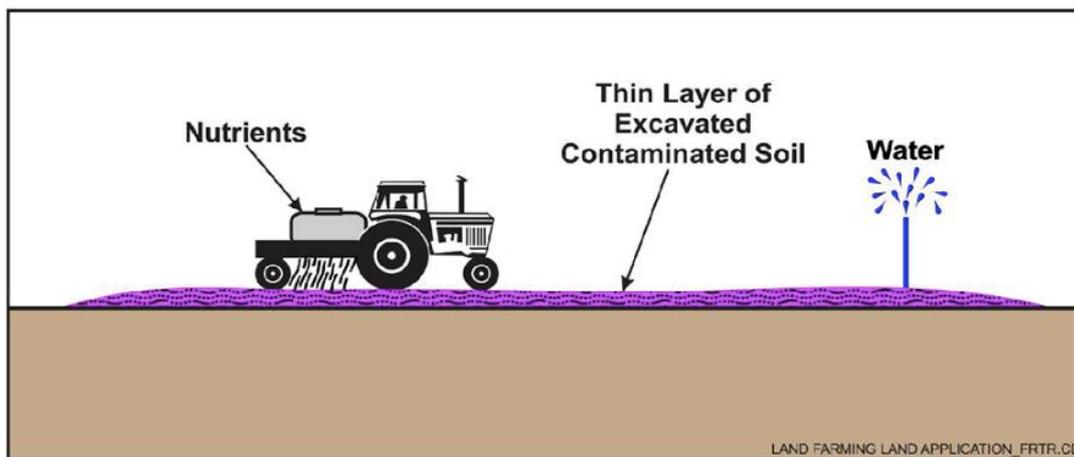


Figura 6: Schematizzazione della tecnica di bonifica mediante land farming (Federal remediation technologies roundtable <https://frtr.gov/matrix/Landfarming/>)

Le tecnologie di biorimediazione *in-situ* invece sono state usate con successo per trattare solventi contenenti cloro, tinte, metalli pesanti e siti contaminati da idrocarburi. Le tecniche *in-situ* hanno il grande vantaggio di evitare la fase di estrazione e trasporto dei materiali inquinanti e di conseguenza, comportano anche un minore disturbo dell'ecosistema.

Tuttavia esse non sono necessariamente più economiche delle tecniche *ex-situ*.

Le tecniche *in-situ* utilizzate maggiormente sono:

- Bioventilazione: La bioventilazione (*bioventing*) consiste nell'aggiunta di correnti d'aria e ossigeno nelle zone vadose (insature) dei suoli per stimolare l'attività di biodegradazione operata dai batteri che, come detto nel primo capitolo sono in grado di degradare le sostanze più velocemente quando la quantità di ossigeno è

più elevata. Nelle tecniche di bioventilazione uno dei parametri che assicurano un migliore risultato, è il numero di punti di ingresso delle iniezioni di aria, che permette di avere una distribuzione uniforme nell'intera matrice (Azubuike et al. 2016). La bioventilazione può essere utilizzata anche in zone vadose contaminate da composti contenenti cloro, che sono recalcitranti in condizioni aerobiche. Insufflando ossigeno, azoto e anche anidride carbonica si può ottenere una buona riduzione del contenuto di cloro.

- *Bioslurping*: Combina elementi di bioventilazione con pompaggio potenziato del vuoto attraverso l'utilizzo di un tubo, chiamato *slurp*, che risucchia liquidi e gas dalla matrice contaminata (Gidakos e Aivalioti, 2007). Questa tecnica è particolarmente efficace per la rimozione di *light non-aqueous phase-liquids* (LNAPL), sostanze organiche liquide meno dense dell'acqua che rimangono insolubili nella matrice acquosa o del suolo (Azubuike et al. 2016)
- *Biosparging*: Il *biosparging* sfrutta l'immissione d'aria nel suolo al fine di stimolare la degradazione microbica dei contaminanti, in maniera molto simile al *bioventing*. L'aria viene iniettata dove il suolo è saturo d'acqua, affinché i contaminanti siano indirizzati verso la zona insatura dove verranno degradati dai batteri aerobici. I contaminanti volatilizzati devono essere catturati mediante un pozzo di estrazione. Questa tecnica è risultata efficace per la decontaminazione di acque sotterranee contaminate da diesel, kerosene e BTEX (Kao et al. 2008).

In figura 7 sono schematizzate le tecniche di biorimediazione ad oggi utilizzate e i composti che sono sensibili alla rimozione da parte di tali tecniche.

Per l'applicazione delle tecniche che immettono aria e nutrienti in-situ nel terreno bisogna considerare che i risultati ottenuti variano in base a caratteristiche del terreno come porosità, permeabilità e umidità, e a caratteristiche dell'inquinante come pressione di vapore, coefficiente di diffusione molecolare e biodegradabilità. Prima di discutere delle abilità di degradazione dei batteri è bene ricordare che vi sono diversi fattori limitanti da considerare prima di scegliere di utilizzare una delle tecniche di biorisanamento. Uno dei fattori limitanti è la concentrazione di un inquinante, e il modo in cui il composto chimico interagisce con le particelle del suolo: alcuni inquinanti sono infatti saldamente legati alle particelle del suolo e la loro rimozione è più difficile da un punto di vista applicativo. La quantità e la qualità di nutrienti hanno un impatto notevole sulle capacità biodegradative dei microrganismi: in un suolo ricco di carbonio il tasso di biodegradazione è elevato

(Cooney, 1984), mentre è stato osservato che un eccesso di azoto, fosforo e potassio potrebbe avere effetti negativi sulla degradazione di idrocarburi aromatici (Carmichael and Pfaender, 1997). L'acclimatazione dei microrganismi al suolo e la biodisponibilità del contaminante sono due fattori che hanno un'influenza importante nell'aspettativa di successo di un progetto di biorimediazione. È stato osservato l'effetto dei parametri ambientali come temperatura, pH e disponibilità di ossigeno sulla degradazione di idrocarburi da parte dei microrganismi: ad elevate temperature si riscontrano migliori capacità di biodegradazione dei microrganismi, specialmente di quelli termofili. Vari studi suggeriscono che le condizioni di pH migliori per la degradazione dei derivati del petrolio siano a pH neutri, anche se alcuni organismi acidofili riescono ad operare bene anche a pH acidi (Stapleton et al. 1998). La quantità di ossigeno presente ha un ruolo centrale nel biorimediazione di composti aromatici che vengono degradati in condizioni aerobiche.

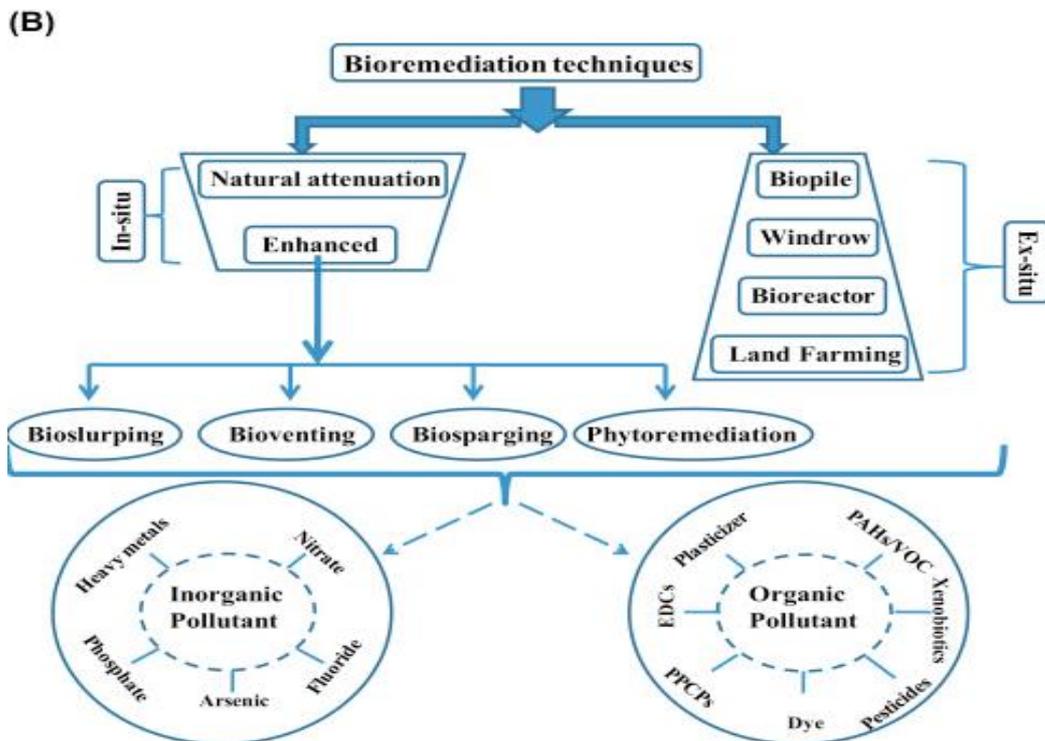


Figura 7: Schematizzazione dei differenti metodi di biorimediazione di vari composti organici e inorganici (Singh et al. 2020)

2.4) Proprietà dei microrganismi coinvolti nel biorisanamento

Quando parliamo di biodegradazione, ci riferiamo a quell'insieme di reazioni chimiche operate dagli organismi che trasformano i composti chimici in altri composti più semplici. Molto spesso questa definizione è associata al concetto di biorimediazione, che sfrutta proprio queste reazioni, che avvengono naturalmente, per bonificare dei siti dagli inquinanti.

I microrganismi del suolo trasformano la sostanza organica attraverso processi metabolici o attraverso la produzione di enzimi. Le principali vie di biodegradazione operate dai microrganismi presenti nel suolo sono due: in un processo definito di “crescita” i microrganismi possono sfruttare il carbonio contenuto nell’inquinante come fonte di cibo ed energia per crescere, oppure in un processo chiamato “co-metabolismo” i microrganismi consumano l’inquinante ma utilizzano come substrato di crescita e nutrienti un’altra fonte di carbonio. Le reazioni di degradazione dei composti chimici possono essere aerobiche, quindi avvenire in presenza di ossigeno, o anaerobiche. Prima di discutere dei microrganismi presenti nei suoli, è importante sottolineare che per una migliore applicazione delle tecniche di biorimediazione la quantità e il tipo di organismi presenti può essere artificialmente alterata a seconda del risultato che si vuole ottenere. Per questo motivo esistono tre diverse pratiche di impiego dei microrganismi, nella tabella 7 sintetizzate:

Tabella 7: I microrganismi possono essere sfruttati secondo tre metodi diversi, elencati nella colonna di sinistra. La biostimolazione e la bioaugmentazione comportano per ovvie ragioni costi economici maggiori rispetto all’attenuazione naturale. (Dati ricavati dallo studio di Azubuike et al. 2016)

Attenuazione naturale	Si lascia che i microrganismi indigeni del suolo svolgano le loro naturali azioni di biodegradazione senza intervenire sulla quantità o qualità delle specie presenti.
Biostimolazione	“Biostimolare” gli organismi vuol dire aggiungere al substrato ossigeno e nutrienti per accelerare le reazioni di biodegradazione dei composti.
Bioaugmentazione	La bioaugmentazione implica l’aggiunta di ceppi selezionati di microrganismi più adatti al suolo o al contaminante in questione.

In generale si può dire che comunità eterogenee di microrganismi hanno un potenziale superiore di degradare determinati contaminanti presenti nel suolo perché affinché un contaminante sia degradato sono necessarie le informazioni genetiche e le capacità catalitiche di un ampio consorzio di organismi (Fritsche e Hofrichter, 2000).

Abilità degradative dei batteri

I batteri sono dei microrganismi unicellulari e procarioti, che si ritrovano in ogni habitat naturale e la cui presenza è particolarmente imponente nei suoli: infatti un cucchiaino di suolo generalmente contiene tra i 100 milioni e 1 miliardo di batteri. I batteri nei suoli, come osservato anche nelle sezioni precedenti, hanno un ruolo fondamentale per la stabilità dell'ecosistema, partecipando attivamente al ciclo del carbonio e dell'azoto. Le loro abilità degradative non solo trasformano la sostanza organica morta in *humus* o altri composti nutrienti, ma sono anche in grado di trasformare i contaminanti organici, utilizzando il carbonio presente in essi. Nel suolo sono presenti quattro gruppi di batteri dalle funzioni e caratteristiche diverse: i batteri *decompositori* utilizzano il carbonio come fonte primaria di energia, convertendo la sostanza organica in altri composti utili per il tessuto del suolo. I batteri *mutualisti* stabiliscono rapporti simbiotici con le piante per ottenere un mutuo vantaggio; tra questi sono presenti ad esempio i batteri azoto-fissatori. Vi sono poi batteri *patogeni*, che possono infettare le piante o altri organismi presenti nel suolo e i batteri *chemioautotrofi*, che utilizzano come fonte di energia composti come azoto, zolfo, ferro o idrogeno. Le reazioni operate dai batteri nel processo di biodegradazione di un composto sono la *mineralizzazione* (i contaminanti sono usati come fonte primaria di carbonio per la loro crescita e sono completamente metabolizzati) e la *trasformazione* (i contaminanti non sono completamente metabolizzati, ma vengono trasformati in composti meno aggressivi).

Numerosi batteri sono stati studiati in relazione alla loro capacità di degradare composti inquinanti: i maggiori decompositori dei suoli inquinati sono quei batteri chemio-organotrofici che usano composti xenobiotici come fonti di carbonio o di elettroni per la generazione di energia. I batteri predominanti nei suoli inquinati da idrocarburi alifatici, idrocarburi aromatici, PAH e composti contenenti cloro appartengono ai generi elencati nella tabella 8.

Tabella 8: Batteri predominanti in campioni di suolo inquinati da idrocarburi alifatici e aromatici, PAH, e PCB. (Fritsche, Hofrichter, 2000).

Gram-Negative Bacteria	Gram-Positive Bacteria
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Nocardia</i> spp.
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> spp.
<i>Flavobacterium</i> !	<i>Arthrobacter</i> spp.
<i>Cytophaga</i> group	
<i>Xanthomonas</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.

Il processo di degradazione aerobica si svolge principalmente in quattro fasi:

1. In un primo momento viene ottimizzato il contatto tra la parete batterica e l'inquinante. Esso deve essere accessibile all'organismo per far sì che le reazioni avvengano. Gli idrocarburi sono insolubili e la loro degradazione richiede la presenza di biosurfattanti;
2. Grazie alla presenza di ossigeno avviene una reazione enzimatica catalizzata dall'*ossigenasi* e dalla *perossidasi* che ha lo scopo di ossidare il contaminante organico;
3. Diversi processi degradativi convertono il contaminante in una serie di intermedi metabolici;
4. Gli intermedi metabolici stimolano la crescita di massa cellulare a partire da precursori metabolici centrali come Acetil-CoA, succinato, piruvato. (Fritsche, Hofrichter, 2000)

Nei processi di co-metabolismo invece i microrganismi che crescono su un determinato substrato ossidano un secondo substrato che non viene assimilato (come succede nella crescita), ma che può essere usato come substrato da altri microrganismi. Composti inquinanti alogenati sono più recalcitranti alla biodegradazione, perché resistono grazie alla presenza di alogeni all'attacco degli enzimi ossidativi dei batteri aerobici. Per questo motivo per trattare tali inquinanti potrebbero essere utilizzati simultaneamente sia batteri aerobici che batteri anaerobici. I batteri anaerobici riducono il grado di alogenazione dei composti (dealogenazione riduttiva), e rendono i composti modificati più attaccabili dai batteri aerobici. (Fritsche, Hofrichter, 2000). Questo lavoro sinergico assicura che anche inquinanti che contengono dosi elevate di cloro, solitamente molto persistenti, come DDT, PCB, alcuni pesticidi e diossine, possano essere ridotti in quantità o rimossi dai suoli. I fattori che interferiscono sull'efficienza della biodegradazione da parte dei batteri sono la quantità di ossigeno, che è necessario per il catabolismo delle specie aerobiche e che

attiva specifici enzimi coinvolti nelle reazioni di biodegradazione, la quantità di nutrienti come ferro, azoto, fosforo, il pH e la temperatura, mentre nelle reazioni di biodegradazione che avvengono in matrici acquose sono importanti anche l'acidità e la salinità del mezzo. Da un punto di vista di applicazione della tecnica, vi sono diversi passaggi che vanno svolti per capire quali siano le specie migliori da utilizzare in un determinato suolo. Anzitutto si prelevano delle porzioni di suolo da un sito e si identificano i batteri che hanno capacità degradative rispetto agli inquinanti presenti. Tali ceppi vengono isolati, purificati e subiscono dei processi di dereplicazione attraverso cui i ceppi identici vengono inseriti in un unico gruppo. In seguito i ceppi batterici vengono identificati tassonomicamente e si cerca di capire quali siano i meccanismi coinvolti nella biodegradazione, quanto la biodegradazione sia efficiente e se vengano prodotti dei biosurfattanti. I biosurfattanti sono dei composti chimici anfipatici caratterizzati da regioni idrofobiche e regioni idrofile, tra cui rientrano i glicolipidi, i lipopeptidi, i fosfolipidi, le glicoproteine e altri biosurfattanti polimerici. La maggior parte di questi composti sono anionici o neutri. (Biermann et al. 1997) Alcuni batteri devono nutrirsi su substrati insolubili e la produzione di biosurfattanti permette loro di assorbire, emulsionare, bagnare o solubilizzare il materiale idrofobo (Healy et al. 1996). Tale principio è sfruttato anche nei propositi di biodegradazione: spesso i contaminanti presenti nei suoli non sono biodisponibili, pur essendo numerosi hanno delle caratteristiche fisico-chimiche che rendono difficile il loro sfruttamento come fonte di carbonio da parte dei batteri. I biosurfattanti prodotti dai batteri aumentano la solubilità dei composti inquinanti idrofobi e li rendono disponibili per l'attacco da parte dei microrganismi (Spina et al. 2017). Inoltre riducono l'adsorbimento di contaminanti organici da parte delle particelle del suolo e riducono i fenomeni di precipitazione. Molto spesso gli studi condotti sulle abilità di biodegradazione di suoli inquinati riguardano principalmente l'inquinamento da contaminanti derivanti dal petrolio, quindi si concentrano sulla rimozione di idrocarburi aromatici (BTEX) o policiclici aromatici e idrocarburi alifatici. I generi che hanno mostrato di poter degradare i contaminanti in quantità elevate sono mostrati nella figura 11.

Molto lavoro è stato svolto però anche per capire quali fossero le abilità degradative dei batteri a contatto con altri tipi di sostanze, utilizzate ad esempio dall'industria tessile o agricola per la produzione di fertilizzanti e pesticidi. I coloranti azoici sono stati degradati con successo (Chaube et al. 2010) da un consorzio di batteri in cui spiccano i generi *Proteus* sp. *Pseudomonas* sp. *Enterococcus* sp., anche in questo caso utilizzando sia reazioni aerobiche che anaerobiche (solo reazioni anaerobiche producono metaboliti

secondari tossici o mutagenici). *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas* sono in grado di degradare il diclorodifeniltricloroetano DDT (Kanade et al. 2012). Batteri aerobici e anaerobici sono in grado di degradare i PCB: i batteri anaerobici riducono il grado di alogenazione dei composti in cui sono presenti elevate quantità di cloro (più recalcitranti), mentre i PCB a basso contenuto di cloro vengono preferibilmente ossidati dai batteri aerobici. I batteri in grado di degradare PCB appartengono ai generi *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Comamonas* (Gram negativi) e ai generi Gram-positivi *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Bacillus* (Petric et al. 2007). I metalli pesanti invece non possono essere biodegradati, ma il contatto con i batteri modifica il loro stato di ossidazione (Garbisu, Alkorta, 2001). Inoltre, essendo numerosi i suoli in cui sono presenti importanti quantità di metalli pesanti, i batteri hanno sviluppato diversi meccanismi per proteggersi dal contatto con questi ultimi. Adsorbimento, metilazione, ossidazione, sono solo alcuni dei processi che regolano l'interazione batteri-metalli pesanti e che rendono questi composti meno pericolosi per la salute del suolo.

Abilità degradative dei funghi:

Assieme ai batteri, i principali microrganismi presenti nei suoli, sono i funghi e i lieviti. Essi appartengono al Regno funghi, definiti come "organismi eterotrofi unicellulari o pluricellulari". I funghi, a differenza dei batteri, sono più resistenti rispetto a condizioni ambientali estreme di scarsa idratazione o di pH acidi. I funghi unicellulari come i lieviti, usano un substrato organico per la loro crescita, e si nutrono degradando tale substrato. I funghi più complessi, appartenenti alle divisioni degli Ascomycota e dei Basidiomycota, sviluppano invece un tallo fungino complesso, chiamato micelio, costituito da una fitta e intricata rete di ife. Le ife sono dei filamenti pluricellulari, non assimilabili ai vasi di conduzione delle piante propriamente dette, il cui compito è quello di degradare la sostanza organica attraverso la secrezione di enzimi.

In effetti i funghi, sia unicellulari che pluricellulari, sono definiti organismi eterotrofi, che quindi acquisiscono il loro nutrimento da una fonte esterna, e lo fanno attraverso la secrezione di un set di enzimi chiamati *depolimerasi* che sono in grado di degradare il substrato di cui il fungo si deve nutrire, prima che lo assorba. I funghi sono dunque naturali decompositori di sostanze organiche che trasformano in composti semplici come lipidi, polisaccaridi, proteine, e le loro elevate capacità di degradazione possono essere sfruttate anche per rimuovere in maniera naturale dei composti che inquinano i suoli. Oltre ad essere vincenti colonizzatori di suoli in cui le condizioni di vita sono limitanti per altri

microrganismi, altri fattori che li rendono ottimi biodegradatori sono la presenza del micelio, con la sua estesa rete di ife che esplorano il terreno e riescono a penetrare senza difficoltà nei pori del suolo e il fatto che le ife stesse, una volta danneggiate, possono essere decomposte e sostituite, senza che l'attività di degradazione del micelio si fermi. La forma e la struttura del micelio e delle ife rendono il tallo fungino un corpo estremamente abile nelle attività di esplorazione del suolo; il micelio influenza la struttura del suolo e i processi di decomposizione della sostanza organica. Il ruolo fondamentale dei funghi è confermato anche dalla loro imponente presenza nella matrice considerata: essi, infatti, costituiscono il 75% della biomassa microbica dei suoli (Harms, et al. 2011)

Anche i funghi possono essere definiti sulla base principalmente del ruolo trofico che essi svolgono: i funghi saprotrofi si nutrono di sostanza organica morta (*sapròs* dal greco vuol dire "decomposto") e la riducono in composti semplici che verranno assimilati da altri microrganismi del suolo o dalle radici delle piante. I funghi parassiti instaurano relazioni di parassitismo con un ospite, che sovente portano alla morte, e i funghi simbiotici instaurano invece delle relazioni di reciproco vantaggio con altri organismi. I funghi simbiotici assumono una particolare importanza all'interno degli ecosistemi, un esempio ne sono i licheni, associazioni mutualistiche tra funghi e alghe, che sono oggi utilizzati come bioindicatori della qualità ambientale. Le simbiosi micorriziche sono un altro tipo di simbiosi tra fungo e radice della pianta, che presenta numerosi vantaggi per i partner coinvolti; i funghi hanno una fonte di carbonio assicurata, ossia il prodotto della fotosintesi clorofilliana operata dalla pianta. A loro volta le piante aumentano la loro superficie di assorbimento dei nutrienti nel suolo grazie alla estesa rete di ife del fungo; questo fa sì che esse abbiano capacità nutritive più sviluppate, e siano più resistenti rispetto ad una serie di stress ambientali. E ancora, potremmo dividere i funghi in base alla loro capacità di degradare oppure no la lignina. La lignina è un composto complesso ad alto contenuto di carbonio; la sua forma e composizione chimica la rendono difficilmente attaccabile da molti microrganismi. Alcuni funghi che posseggono un set di enzimi specifico riescono a degradarla. Questo stesso set di enzimi, e le proprietà ad esso associate, può essere sfruttato nella biodegradazione di inquinanti. Distinguiamo funghi ligninolitici –in grado di degradare sia la cellulosa che la lignina- da funghi non ligninolitici –in grado di degradare soltanto la cellulosa. Il Regno *Fungi* conta numerose divisioni al suo interno: i funghi maggiormente impiegati nelle tecnologie di biodegradazione appartengono alle divisioni Ascomycota, Basidiomycota e Zigomycota Possono essere sia unicellulari che pluricellulari, e possedere o meno gli enzimi per la degradazione della lignina. Oltre alla

biodegradazione con mineralizzazione del substrato degradato, i funghi sono in grado di utilizzare altri meccanismi per assorbire o ridurre composti inquinanti; questi sono il bioadsorbimento e la bioconversione (Kulshreshta et al. 2014). Il bioadsorbimento è un processo basato sull'assorbimento di metalli, ioni, inquinanti xenobiotici che si svolge in due fasi: in una fase di bioaccumulo i contaminanti vengono incamerati nei tessuti del fungo, nella fase seguente di bioadsorbimento vero e proprio i contaminanti si legano alla biomassa fungina attraverso legami covalenti, adsorbimento, scambi ionici. Molto spesso anche la biomassa fungina morta (inattivata) è coinvolta nell'adsorbimento dei composti contaminanti: utilizzare la biomassa fungina morta ha una serie di vantaggi, tra cui il fatto che la sostanza non è sensibile alle concentrazioni di inquinanti e ai loro effetti tossici e può operare in qualsiasi condizione ambientale. La bioconversione invece è una tecnica che nasce per sfruttare rifiuti industriali a base di legno o rifiuti agricoli come substrato per la crescita di specie fungine che da una parte degradano il legno e dall'altra offrono come prodotto per il consumo il corpo fruttifero del fungo. Per sfruttare le capacità di biorimediazione dei funghi vanno fatte alcune considerazioni preliminari circa i parametri ambientali che caratterizzano un determinato sito e le caratteristiche fisiologiche delle specie utilizzate. Il successo del biorecupero di un sito attraverso funghi dipende da tre fattori: la quantità e il tipo di specie presenti, l'accessibilità (e attaccabilità dei contaminanti) e un ambiente che presenti i parametri fisico-chimici idonei (Martin et al. 2004). Alcuni svantaggi legati all'uso di funghi nelle pratiche di biorimediazione riguardano il tempo che è impiegato dai funghi per adattarsi all'ambiente in cui si trovano e il fatto che alcune reazioni di biodegradazione potrebbero portare alla produzione di composti tossici o genotossici. Quest'ultima condizione di tossicità riguarda soprattutto gli organismi che usano tecniche di bioadsorbimento; seppure i meccanismi biologici permettano di assorbire sostanze difficilmente degradabili come i metalli pesanti, i corpi fruttiferi non possono essere consumati e devono essere rimossi dal suolo e smaltiti altrove. Ad ogni modo, i funghi sono dei validi alleati nei processi di bonifica dei suoli contaminati, come è stato dimostrato da numerose ricerche, che si sono concentrate sulle potenzialità di biodegradazione di idrocarburi, metalli pesanti, pesticidi, coloranti industriali. Come precedentemente accennato, ciò che rende questi organismi abili nella biodegradazione sono i particolari enzimi che essi posseggono e che di norma utilizzano per nutrirsi, essendo organismi eterotrofi. È già stata fatta una distinzione tra funghi che sono in grado di degradare la lignina, chiamati ligninolitici e in modo più specifico saproxilici o *white rot fungi*, a cui appartengono i basidiomiceti, e funghi che sono in grado

di degradare soltanto la cellulosa e non la lignina, i *brown-rot fungi*, di cui fanno parte ascomiceti e zigomiceti. I meccanismi enzimatici di cui sono dotati questi funghi sono diversi: i *white-rot fungi* sono dotati del complesso di enzimi della ligninasi (*lignina-perossidasi, manganese-perossidasi, laccasi*) in grado di attaccare la struttura complessa e compatta della lignina e altri composti chimici. I meccanismi di degradazione impiegati dai *brown-rot fungi* utilizzano invece altri enzimi per operare: due importanti gruppi di enzimi ossidativi, chiamati *citocromo P450 monossigenasi* e *eossido idrolasi*, attaccano il contaminante attraverso reazioni di ossidazione. I metaboliti prodotti possono o essere rilasciati nell'ambiente o subire altre trasformazioni catalizzate da un gruppo di enzimi definiti "enzimi della Fase 2" (Urrea et al. 2015). In generale si può dire che gli enzimi prodotti dai funghi, siano o enzimi di *ossidoreduttasi* extracellulare o enzimi intracellulari che reagiscono "internamente" col contaminante. Per quanto riguarda i primi, gli enzimi extracellulari quali *ossidoreduttasi* utilizzano l'ossigeno molecolare per ossidare gli inquinanti. Gli enzimi intracellulari, come quelli del citocromo P450 catalizzano reazioni di eossidazione e idrossilazione di inquinanti organici. Anche se i funghi solitamente degradano i contaminanti attraverso reazioni di co-metabolismo (ossia non utilizzando il contaminante come substrato), talvolta possono crescere su substrati chimici come composti alifatici e aromatici e VOC. L'attacco iniziale dell'inquinante avviene per via extracellulare o per via intracellulare. Un metabolita secondario prodotto da una reazione extracellulare può poi essere preso in carico dalla cellula ed essere ulteriormente degradato dal metabolismo intracellulare e viceversa. La degradazione –sia intra-cellulare che extracellulare- può essere completa oppure restituire come risultato un prodotto meno complesso di quello iniziale che non può essere ulteriormente ridotto o degradato (Harms et al. 2011). Sia i *white-rot fungi* che i *brown-rot fungi* sono stati studiati in relazione alla loro abilità di degradare o trasformare i composti chimici inquinanti. Gli idrocarburi policiclici aromatici vengono attaccati sia dai funghi ligninolitici che dai funghi non ligninolitici, anche se raramente il contaminante è mineralizzato completamente; non di rado accade che sia trasformato in composti più semplici in seguito attaccati dai batteri (Nezha et al. 2013). Nel primo caso la degradazione è realizzata dagli enzimi quali le ligninasi, dal momento che i PAH presentano strutture chimiche simili a quella della lignina: nel secondo caso invece gli enzimi dei complessi non-ligninolitici ossidano il contaminante e lo trasformano in chinone. Il fungo può degradare totalmente il composto, trasformandolo in acqua o diossido di carbonio, oppure degradarlo solo in parte e produrre dei composti più semplici che vengono poi ulteriormente ridotti dai batteri. Tra i funghi

ligninolitici *Phanerochaete chrysosporium* ha la capacità di degradare numerosi composti appartenenti agli idrocarburi policiclici aromatici (Bumpus et al. 1985). Questa specie è stata in grado di degradare, come dimostrato da numerosi studi, antracene (Vyas et al. 1994), naftalene (Mollea et al. 2005), fenantrene, DDT e lindano (Bumpus et al. 1985). Altre specie come *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, e *Coriolopsis polyzona* hanno mostrato capacità di ossidazione di inquinanti organici pari, se non superiori a *P.chrysosporium*.

In effetti, *Pleutorus ostreatus* è un'altra specie di basidiomicete che possiede abilità degradative notevoli, come dimostrato da numerosi studi. *Pleutorus ostreatus* è stato in grado di degradare diversi PAH (Eggen, 1999), decolorare li coloranti chimici (Erkurt et al. 2007) e attaccare il bisfenolo A (Hirano et al. 2000). Basidiomiceti che instaurano rapporti simbiotici con le piante possono essere ugualmente sfruttati, in certi casi, per la decontaminazione del suolo. Le fonti di carbonio di cui essi si nutrono sono direttamente fornite dalle piante, e mancando un sistema enzimatico complesso per l'attacco del materiale nutritivo si è spesso messo in dubbio il potenziale di biodegradazione delle specie mutualistiche. Tuttavia, pur mettendo in atto meccanismi diversi rispetto ai basidiomiceti a vita libera, varie specie sono state in grado di degradare PCB (Donnelly and Fletcher, 1994), specie come *Boletus edulis*, *Gomphidus viscidus*, *Laccaria bicolor* hanno degradato il DDT (Huang et al. 2007), e altre specie sono state in grado di degradare o bioassorbire alcuni PAH. Molti organismi della rizosfera, nonché le piante coinvolte nella simbiosi, potrebbero contribuire in sinergia alla degradazione degli inquinanti o dei metaboliti prodotti dal fungo. Anche specie non-ligninolitiche hanno mostrato capacità di degradazione di diversi composti, tra cui gli idrocarburi policiclici aromatici. Spesso le specie appartenenti agli Ascomycota e agli Zygomycota presentano abilità di adattamento ad ambienti a pH acido o poco idratati superiori rispetto ai Basidiomycota e questo rende le specie appartenenti a tali gruppi più fruibili per gli scopi del biorimediazione. Nella tabella 9 sono richiamati i risultati ottenuti da alcuni studi che hanno utilizzato ascomiceti o zigomiceti saprotrofi del suolo nell'ambito del biorimediazione.

Tabella 9: Idrocarburi policiclici aromatici, pesticidi e composti clorurati sono stati parzialmente o totalmente degradati da specie fungine saprotrofe del suolo. Gli studi citati hanno dimostrato quindi come anche i complessi enzimatici degli ascomiceti e degli zigomiceti possano essere sfruttati per biodegradare i contaminanti.

Inquinante	Specie fungina osservata o genere	Referenze
------------	-----------------------------------	-----------

Antracene (PAH)	<i>Fusarium, Aspergillus , Penicillium, Trichoderma Absidia (generi)</i>	Giraud et al. (2001)
Pirene (PAH)	<i>C. elegans Aspergillus sclerotorium, Mucor racemosus</i>	Cerniglia et al (1986) Passarini et al (2011)
Benzo[a]pirene	<i>Fusarium solani Penicillium, Trichoderma, Aspergillus. A. sclerotiorum, M.racemosus</i>	Chulalaksananukul et al. (2006) Machín Ramirez et al. (2010) Passarini et al. (2011)
Lindano	<i>Aspergillus sp. Fusarium solani</i>	Sagar, Singh (2011)
PCB	<i>Aspergillus Niger Penicillius sp.</i>	Dmochewitz, Ballschmiter (1988) Tigini, Prigione (2009)
PCD	<i>Fusarium sp. Pseudallescheria boydii</i>	Nam et al. (2008) Nakamiya et al. 2002

I metalli pesanti vengono rimossi dai suoli attraverso bioadsorbimento, bioaccumulo e biovolatilizzazione: i funghi indigeni non solo riducono la quantità di contaminanti e il pericolo per la salute legato all'esposizione, ma sono anche in grado di stimolare la crescita delle piante e il raccolto nelle aree contaminate. La resistenza dinanzi alle alte concentrazioni di metalli pesanti potrebbe essere dovuta alla produzione da parte dei funghi di maggiori concentrazioni di enzimi antiossidanti. Varie specie appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Emericella*, sono state in grado di rimuovere arsenico dai suoli contaminati (Singh. et al. 2015) *Aspergillus* ha mostrato capacità di rimozione del cadmio e del cromo (Khan et al. 2019). *Pleurotus Ostreatus* rimuove il manganese dalle acque contaminate (Wu et al. 2016) ed è stata studiata la sua capacità di degradazione di piombo, zinco, rame, nichel, cromo, cobalto presenti in effluenti derivanti da strutture di lavorazione del carbone (Vaseem et al. 2017). Numerose altre ricerche sono state condotte e pubblicate con l'intento di mostrare come i funghi siano in grado di degradare altre classi eterogenee di composti inquinanti presenti nei suoli come i coloranti (Bumpus, 2004) la pellicola cinematografica (Abruscia et al. 2007) e i pesticidi di varia natura (Chaplain et al., 2011). Sia i funghi saproxilici che i saprotrofi del suolo hanno la capacità

di rimuovere o ridurre il contaminante nel suolo; ai funghi deve essere assicurata una fonte di carbonio, che può essere la lignina, l'essudato vegetale, o il contaminante stesso. Deve essere fatta un'accurata analisi del contaminante presente, delle caratteristiche del suolo e degli altri organismi presenti in un suolo prima di decidere quale specie utilizzare per il biorimediaio.

2.5) Un particolare tipo di biorimediaio: il fitorimediaio

Anche le piante che abitano un suolo possono essere sfruttate per il biorimediaio: il fitorimediaio sfrutta le interazioni delle piante con il substrato inquinato per mitigare gli effetti tossici dei contaminanti presenti. Le piante infatti hanno la capacità di catturare, accumulare e degradare sostanze organiche e inorganiche. In base al contaminante presente e al tipo di substrato, vi sono diversi meccanismi che possono essere sfruttati che sono anche illustrati nella figura 8:

- Fitofiltrazione e rizofiltrazione: La fitofiltrazione è l'utilizzo delle piante per rimuovere i contaminanti dall'acqua, o nel caso della rizofiltrazione, è l'utilizzo della radice delle piante per il medesimo scopo.
- Fitoestrazione e iperaccumulazione: Per fitoestrazione si intende la capacità delle piante di sequestrare contaminanti inorganici (principalmente metalli) dal mezzo in cui si trovano. Le piante possono essere poi smaltite o possono essere recuperati i metalli contenuti nei loro tessuti (*Phytomining*). Nelle condizioni naturali, le piante estraggono dal suolo ioni inorganici che usano come nutrienti; questo meccanismo può essere sfruttato al fine di sequestrare ioni inorganici tossici dal suolo o dalle acque correnti. Da un punto di vista chimico, il sequestro di ioni avviene perché alcuni composti alterano il pH dei tessuti della radice e creano un gradiente elettrochimico che stimola l'assorbimento, o avviene a seguito di formazione di complessi di chelazione con i metalli. Le piante che crescono in suoli metalliferi possono adottare diverse strategie per proteggersi dall'esposizione di questi composti. Le piante *excluders* bloccano l'entrata degli ioni metallici, e l'effetto tossico è sentito solo a livello delle radici. Non sono molte le piante capaci di accumulare "grandi" quantità di composti tossici nei loro tessuti, mentre una quantità considerevole di specie vegetali sono tolleranti all'esposizione dei metalli. Alcune specie, chiamate iper-accumulatrici, di cui fanno parte i generi *Brassica*, *Thlaspi*, *Apocynum*, *Aeollanthus*, sono in grado di estrarre e accumulare metalli a

concentrazioni maggiori dello 0.1% del loro peso secco (Brooks, 1998). Queste piante accumulatrici, estraggono i metalli dai suoli, riescono a tollerarli grazie alla presenza di fitochelatine (proteine ricche di zolfo) e ad incorporarli nella biomassa che producono. Le specie iper-accumulatrici però non possono essere sfruttate al meglio, dal momento che crescono lentamente e producono poca biomassa rendono la pratica di fitoestrazione molto lenta. Inoltre un altro problema riguarda lo smaltimento della biomassa vegetale colma di composti inorganici.

- Fitoimmobilizzazione e fitostabilizzazione: La fitostabilizzazione riduce la mobilità e la disponibilità nel mezzo del contaminante. Le radici delle piante formano dei complessi chelanti con i metalli che hanno lo scopo di immobilizzarli e di renderli non più pericolosi per il suolo.
- Fitodegradazione e rizodegradazione: La pianta incorpora l'inquinante nei suoi tessuti che viene trasformato o degradato dagli enzimi dell'organismo come *dealogenasi* e *ossigenasi*. Quando tale meccanismo avviene nella rizosfera, attraverso la secrezione di enzimi e coadiuvato dall'azione dei microrganismi, si parla di rizodegradazione.
- Fitovolatilizzazione: I contaminanti vengono sequestrati dai suoli, convertiti in una forma volatile e rilasciati in atmosfera.
- *Phytomining*: Con il termine *phytomining* si intende il recupero dei metalli dalle specie iperaccumulatrici che li hanno accumulati nei loro tessuti e il loro successivo sfruttamento.

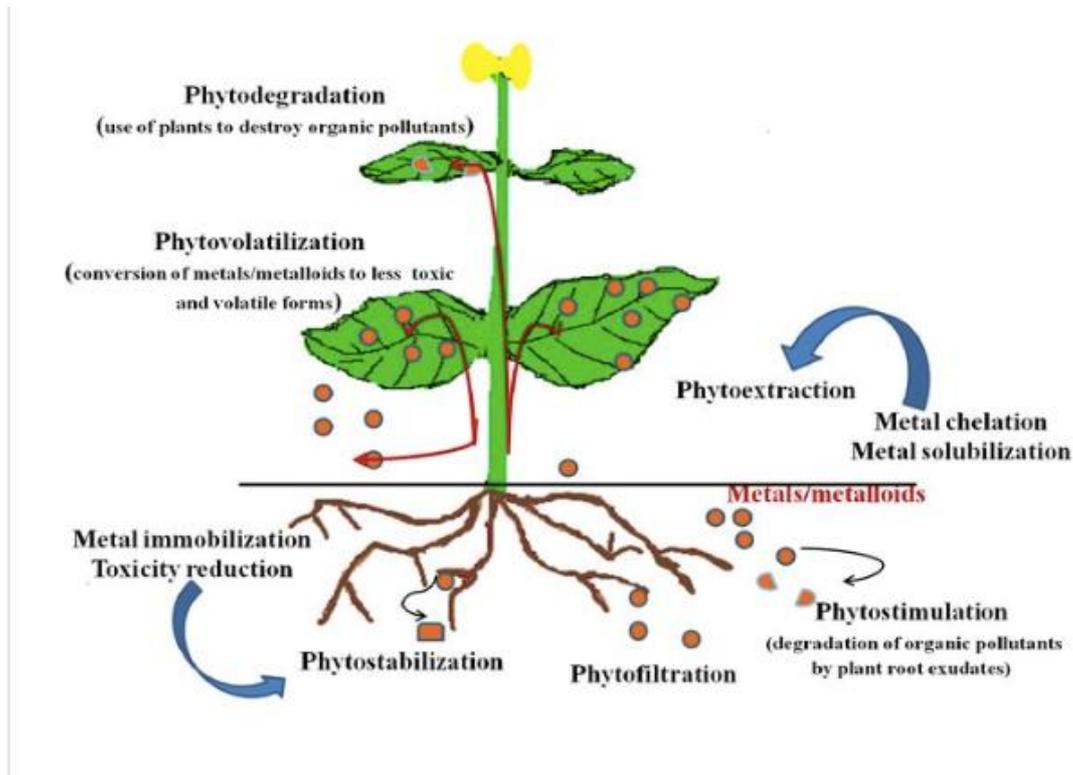


Figura 8: processi usati nel fitorimedio di siti contaminati da metalli pesanti (Ojouderie, Babalola, 2017)

Gran parte della ricerca degli ultimi anni che ha riguardato le tecnologie di fitorimedio si è occupata principalmente della rimozione dei metalli pesanti dai suoli, attraverso varie tecniche tra quelle citate sopra. Generalmente il fitorimedio si applica quando la rimozione dei contaminanti non è particolarmente urgente, avendo i processi mediati dalle piante, bisogno di un tempo abbastanza lungo per attuarsi. La fitostabilizzazione e la fitoestrazione sono le tecniche più usate per il trattamento dei metalli pesanti nel suolo. Nel primo caso, le piante riducono la mobilità e la disponibilità del contaminante, mentre nel secondo caso esse lo sequestrano al suolo e lo “trasferiscono” nei loro tessuti; il contaminante dunque viene incorporato nella biomassa vegetale e poi rimosso attraverso mietitura. Come già detto, alcune specie di piante sono definite “iper-accumulatrici”, perché riescono ad incorporare nei loro tessuti una grande quantità di ioni metallici. La capacità delle piante iper-accumulatrici di sequestrare una consistente quantità di metalli potrebbe essere dovuta ad una serie di fattori, primo fra tutti il fatto che le piante iper-accumulatrici assorbono ioni ad una velocità superiore rispetto alle piante non-accumulatrici. Tali ioni non rimangono nei vacuoli delle radici ma vengono caricati velocemente nei vasi per essere trasportati verso la parte epigea della pianta, in particolare nelle foglie, qui vengono trasportati verso i vacuoli della foglia e rimangono fino

a rimozione da parte antropica (Milner and Kochain, 2008). Quando si parla di fitoestrazione di metalli pesanti bisogna ricordare che per avere dei risultati soddisfacenti ed economicamente convenienti devono essere utilizzate specie di piante metallo-tolleranti, che producano una biomassa elevata e che riescano ad accumulare i contaminanti in porzioni della pianta che possono essere rimosse. Le specie più prestanti dal punto di vista della fitoestrazione appartengono alla famiglia delle *brassicacee* (il 25%), ma sono presenti numerosi rappresentanti anche nella famiglia delle *Asteracee*, *Fabacee*, *Myrtaceae*, *Caryophyllaceae* etc. etc. e appartengono ai generi *Brassica*, *Thlaspi* e *Apocynum*. Giusto per citare qualche esempio, *Nocca caerulescens* (precedentemente *Thlaspi*) ha mostrato elevate potenzialità di estrazione di cadmio e zinco da suoli urbani (Jacobs et al. 2017). *B.juncea* rimuove efficacemente cadmio, cromo, rame, nichel, piombo, e zinco da mezzi idroponici (Dushenkov et al.1995). Queste specie vegetali, tuttavia, non producono un'elevata biomassa vegetale e crescono lentamente, e questo è il maggior fattore limitante alla bonifica mediante specie iper-accumulatrici. Per questo motivo è stata sperimentata anche la capacità di fitoestrazione di specie vegetali tolleranti, ma non iper-accumulatrici, che producono un'elevata biomassa. Usare specie che crescono velocemente, con un apparato radicale ben sviluppato e che producono legno può essere una scelta vincente nella decontaminazione da metalli pesanti. Inoltre, il legno o altra biomassa vegetale prodotta, possono essere sfruttati economicamente. La tabella 10 richiama alcuni studi condotti con specie vegetali non iper-accumulatrici e i risultati ottenuti.

Tabella 10: Vengono citati tre esperimenti condotti utilizzando specie tolleranti non iper accumulatrici.

Specie coinvolta	Ricerca	Referenze
<i>Gossypium (cotone)</i>	Il cotone cresciuto in aree contaminate viene bollito, e viene ridotta la quantità di metalli pesanti presenti, rendendo il cotone utilizzabile per scopi economici.	(Yankov et al. 2000)
<i>Mentha piperita e Lavandula angustifolia</i>	Accumulano livelli moderati di metalli pesanti quando a contatto con biomassa contaminata.	(Zheljazkov e Nielsen 1996)
<i>Zea mays</i>	Studio condotto in una zona agricola cinese contaminata da cadmio, <i>Zea mays</i>	(Xu et al 2013)

accumula cadmio e
mantiene basso il livello di
contaminazione nel
raccolto.

Un altro studio, condotto da Macci et al nel 2016, ha voluto investigare le potenzialità di fitorimedia di una comunità di organismi vegetali (alberi, cespugli e erbe) installati in un'area contaminata da metalli pesanti, idrocarburi e bifenili policlorinati dove si trovava un impianto industriale. I risultati ottenuti, utilizzando le specie *Pauwlonia tomentosa* e *Cytisus scoparius* in combinazione con la vegetazione naturale lì presente e arricchimenti in nutrienti hanno mostrato un'effettiva riduzione del 35% di metalli pesanti, 40% di idrocarburi e 70% di PCB (Macci et al. 2016.)

Effettivamente numerosi studi hanno dimostrato come il fitorimedia possa essere sfruttato ottenendo validi risultati anche per la bonifica di siti contaminati da inquinanti organici, come i derivati del petrolio, i solventi a base di cloro e gli esplosivi.

I meccanismi alla base della degradazione di tali inquinanti sono di diversi tipi. Le piante rilasciano dei secreti prodotti dalla fotosintesi nella rizosfera; questi essudati supportano la crescita e le attività metaboliche di funghi e batteri, permettendo loro di compiere al meglio il lavoro di biodegradazione degli inquinanti (Anderson et al. 1994) Inoltre le piante sono in grado di produrre e rilasciare nel suolo o in acqua degli enzimi, come l'enzima *laccasi*, *dealogenasi*, *nitroreduccasi*, *nitrilasi* e *perossidasi*, che hanno la capacità di degradare i contaminanti presenti (Salt et al., 1998). Il sequestro dei contaminanti organici da parte delle radici, come vale per i metalli, è regolato da alcuni fattori, come la quantità del contaminante studiato e le proprietà del contaminante (coefficiente di partizione acqua-ottanolo, costante di acidità, pKa.) Un fattore limitante per la fitoestrazione di contaminanti organici è la presenza di nutrienti disponibili per la pianta. La maggior parte dei contaminanti organici subiscono qualche trasformazione prima di essere sequestrati dai vacuoli od essere legati a strutture cellulare insolubili come la lignina (Salt et al. 1998). Solo pochi composti chimici vengono completamente mineralizzati e trasformati in acqua e anidride carbonica, e questo fa sì che le piante siano strumenti meno efficaci per le strategie di biorimedia di funghi e batteri.

Le ricerche che hanno tentato di investigare le diverse capacità di biodegradazione di specie appartenenti ai microrganismi e non, sono numerosissime e sarebbe impossibile citarle tutte e dare merito a tutti i progressi che sono stati fatti in campo biotecnologico e di

botanica applicata. Nella presente sezione sono state analizzate le proprietà che permettono agli organismi del suolo, ivi compresi batteri, funghi e piante, di degradare composti chimici inquinanti. È doveroso sottolineare che, sebbene i composti trattati dagli studi citati nella presente relazione appartengano principalmente alle classi di idrocarburi, policlorobifenili e pesticidi come il DDT, la ricerca biotecnologica si è occupata della biodegradazione di un ampio ventaglio di composti appartenenti a numerose classi chimiche anche diverse da quelle citate. Lo studio di Harms et al. (2011) evidenzia ad esempio la capacità dei funghi di attaccare composti recalcitranti come le policloro-dibenzo-p-diossine, i dibenzofurani policlorurati (PCDD, PCDF) ed esplosivi come il trinitrotoluene (TNT), nonché di immobilizzare contaminanti pericolosi come metalli pesanti, metalloidi e talvolta radionuclidi, o di renderli bio-disponibili per la fitoestrazione da parte delle piante. Anche i batteri, come già detto, sono capaci di rendere meno pericolosi numerosi composti chimici; non solo i comunissimi idrocarburi policiclici aromatici, o i già citati policlorobifenili (PCB), ma anche i coloranti azoici industriali (*azo-dyes*), il DDT e altri pesticidi aggressivi e pericolosi per la salute del suolo e dell'uomo (Joutey et al. 2012). Anche se abbiamo analizzato gli organismi in grado di degradare i composti singolarmente, è necessario sottolineare che la biodegradazione, un processo naturale che si è però dovuto adattare alla presenza di inquinanti di natura antropica, non può essere compresa al meglio se si prende in considerazione solo un gruppo di microrganismi. Questi ultimi lavorano in sinergia e l'attività simultanea di batteri, funghi e piante crea le condizioni migliori per la degradazione dei composti inquinanti di natura antropica. Per questo, anche nelle fasi iniziali dei progetti di biorisanamento, si pone una particolare attenzione alla variabilità specifica presente nel suolo e alle capacità che i rappresentanti di tale variabilità posseggono.

La seguente tabella (tabella 11) riassume i vantaggi e gli svantaggi dell'impiego dei vari tipi di organismi nelle tecnologie di biorimediazione.

Tabella 11: I principali vantaggi e svantaggi legati all'utilizzo di batteri, funghi o piante per il biorimediazione.

	Batteri	Funghi	Piante
Vantaggi	-Producono enzimi litici e biosurfattanti; -Elevate capacità di biodegradazione; -Elevata biomassa; -Economici; -Relativamente	-Producono enzimi litici e biosurfattanti -Capacità di biodegradazione buone -Possono crescere in condizioni	-Utili strumenti per la rimozione di metalli pesanti, difficilmente attaccabili; -I metalli raccolti possono essere sfruttati

<i>Svantaggi</i>	veloci.	ambientali sfavorevoli -Possono sequestrare i metalli pesanti.	economicamente; -Pubblicamente accettate ed economiche -Servizi utili per il paesaggio e per il benessere umano.
	-La presenza di nutrienti è un fattore limitante; -Necessario lungo monitoraggio -Necessario aggiungere al sistema nutrienti o ossigeno.	-Tempi elevati; -Possibile produzione di metaboliti secondari tossici o genotossici; -La mineralizzazione completa avviene in sinergia con altri batteri.	-Mineralizzazione completa rara; -I processi di fitoestrazione sono spesso lenti; -Sistemi complessi bisognosi di monitoraggio e nutrienti.

CAPITOLO III: RIQUALIFICAZIONE DEI SUOLI IN EUROPA E IL PROGETTO BIOREST

3.1) L'inquinamento in Europa e strumenti politici adottati per la riqualificazione dei suoli

La contaminazione dei suoli in Europa è un problema importante, che compromette la salute degli ecosistemi e delle persone. I suoli ad oggi sono minacciati, non solo a livello europeo, ma a livello mondiale: tale minaccia è tanto più ingente quanto più si pensa alle numerose e vitali funzioni del suolo. Nel mondo della politica internazionale ed europea sono stati redatti programmi e agende con l'intento di ripristinare le condizioni di salute dei suoli compromessi o deteriorati. Nel 2006 la Comunità Europea presenta ai paesi comunitari la *Soil Thematic Strategy*, con cui vuole incoraggiare un uso sostenibile del suolo. La strategia che la Commissione propone si articola attorno a quattro punti

fondamentali: [Strategia tematica per la protezione del suolo
[SEC(2006)620][SEC(2006)1165]:

- i) Adottare una legislazione quadro finalizzata alla protezione dell'uso sostenibile del suolo;
- ii) Integrare la protezione del suolo nella formulazione e nell'attuazione di politiche nazionali;
- iii) Ridurre il divario oggi esistente in termini di conoscenze in alcuni settori della protezione del suolo, sostenendo la ricerca attraverso programmi di ricerca comunitari e nazionali;
- iv) Maggiore sensibilizzazione in merito alla necessità di difendere il suolo.

La *Soil Thematic Strategy* viene inserita nel contesto del settimo e dell'ottavo programma ambientale europeo. Seppure non vi siano altri strumenti legislativi che hanno come obiettivo principale la tutela del suolo, numerose direttive direttamente o indirettamente contribuiscono a proteggere la salute del suolo o a ridurre l'entità della sua degradazione. Gli strumenti economici utilizzati dall'Unione Europea per concedere fondi ai progetti ambientali previsti dalla STS e dal programma ambientale europeo sono di diverso tipo. Nel contesto della protezione del suolo assume una particolare importanza il *LIFE+ programme*, che è uno strumento per l'assegnazione di fondi europei a progetti ambientali e di lotta al cambiamento climatico creato nel 1992 e che nel solo periodo che va dal 2014 al 2020 ha finanziato progetti con un budget di 3.4 miliardi di euro. Il caso studio di questo testo, il progetto Biorest coordinato dal Consorzio Italbiotech, è inserito proprio nel contesto del programma LIFE, come vedremo meglio nelle sezioni successive. Per stimare i livelli di contaminazione dei suoli in Europa il *Joint Research Centre* (JCR) dell'unione europea ha redatto negli anni numerosi rapporti riguardo all'entità dell'inquinamento nei vari paesi appartenenti alla comunità o ai confini geografici del continente europeo. Uno dei report più recenti è quello redatto da Ana Payá Perez e Natalia Rodriguez Eugenio nel 2018, intitolato "*Status of local soil contamination in Europe*". In base ai dati raccolti in 33 paesi membri della comunità (EU-28 e Islanda, Liechtenstein, Norvegia, Svizzera e Turchia) si ottengono delle importanti stime circa le minacce a cui sono esposti i suoli nella comunità e alle strategie sinora adottate. È stato stimato che nei 28 paesi appartenenti all'unione europea potrebbero esserci circa 2.8 milioni di siti inquinati. 694.000 siti sono stati già identificati e registrati negli inventari

nazionali; il 19% di questi necessita azioni di bonifica o misure di riduzione del rischio legato all'inquinamento. In base ai dati che vengono forniti dalle nazioni ai centri di ricerca europei come il *Joint Research Centre* è possibile costruire una carta tematica, come quella presentata in figura 9, che ci permette di avere una panoramica riguardo alla presenza e alla quantità di siti contaminati nei vari paesi europei. È opportuno sottolineare che i dati con cui sono costruite queste carte tematiche devono essere forniti dai vari paesi: non essendo le legislazioni di ogni paese omogenee –nel senso che la stessa attività inquinante (come di industria od altro) in un paese può essere considerata da un punto di vista legislativo più o meno pericolosa che in un altro- e non essendoci uguali sforzi di investigazione e identificazione dei siti nei diversi paesi europei, la quantità di siti identificati in una nazione potrebbe essere largamente sotto-stimata.

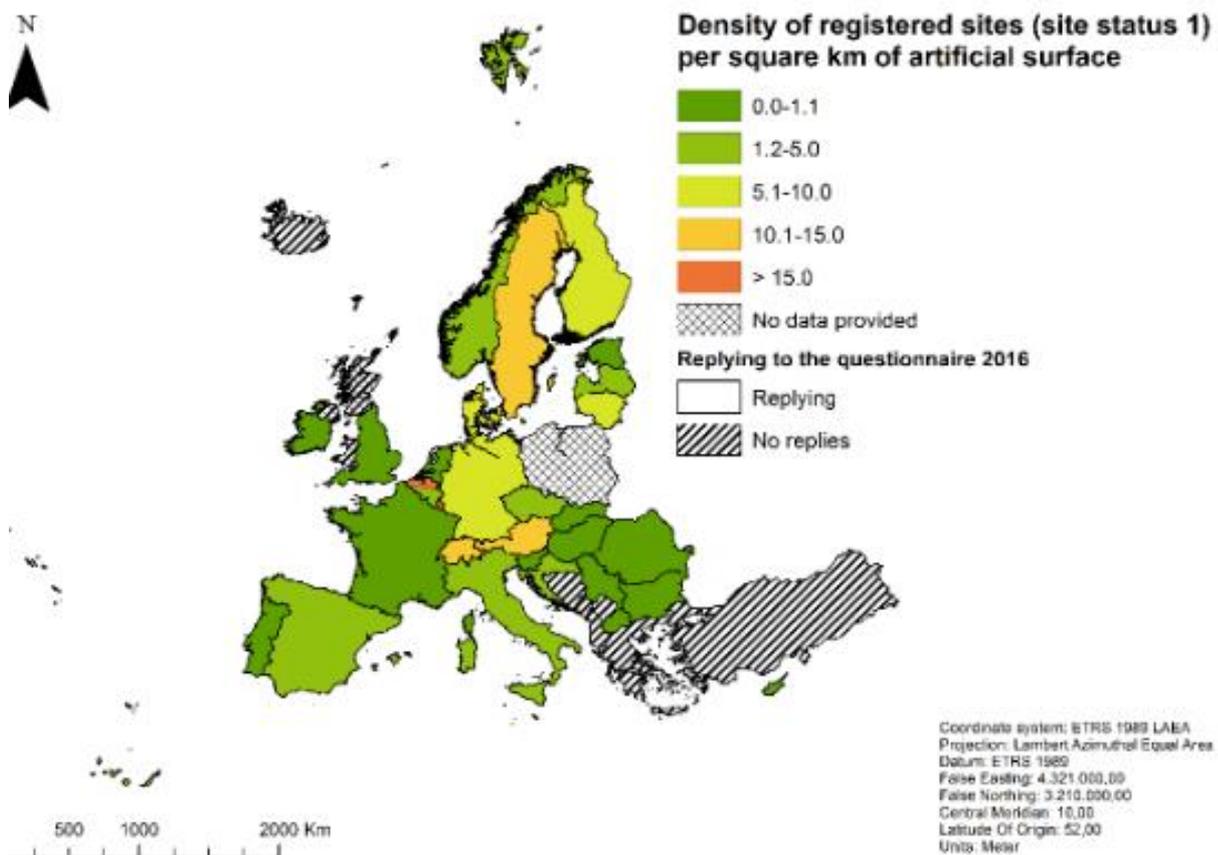


Figura 9: Densità di siti presenti per km quadrato di superficie artificiale in Europa (Perez, Rodriguez 2018 Joint Research Centre)

In Italia le attività potenzialmente inquinanti non sono stabilite da una legislazione e non vi sono obblighi legali che prevedano di identificare e registrare i siti in cui sono presenti industrie o altre fonti di inquinamento. Il programma di bonifica nazionale dei siti contaminati in Italia è cominciato nel 1998 con l'identificazione di zone interessate da

fenomeni di inquinamento chiamate siti contaminati di interesse nazionale (SIN), classificati in base al grado di contaminazione ambientale, rischio per la salute e allarme sociale. L'inquinamento in tali siti è stato associato alle attività di vicini impianti chimici, di produzione di acciaio, e siti di estrazione di materie prime o asbesto. La legislazione corrente in Italia non ha stilato una lista di attività potenzialmente inquinanti che possano fare da guida nell'identificazione dei siti inquinati. L'identificazione solitamente avviene quando un particolare evento –un'incidente che libera in aria o acqua emissioni ad esempio- rischia di inquinare il suolo o le acque sotterranee e “obbliga” le istituzioni ad investigare i livelli di contaminanti presenti.

La valutazione dei siti contaminati in Italia prevede che vi sia in prima istanza un'analisi dei valori chimici e fisici relativi al sito inquinato e che poi venga fatta una valutazione del rischio per quantificare la necessità di intervento in quello stesso sito. In Europa i costi dei progetti di analisi e bonifica del sito implicano tipicamente un costo che oscilla tra i 50.000 e i 500.000 euro (nel 40% dei casi). Attualmente parte dei costi economici che devono essere affrontati per la bonifica di un sito possono essere sostenuti dalla comunità europea, che attraverso i suoi *funding instruments* co-finanzia progetti di monitoraggio o restauro ambientale pubblici o privati. L'obiettivo generale di LIFE è di contribuire ad attuare e a sviluppare la politica e la legislazione ambientale e in materia di clima dell'UE. Gli obiettivi generali del programma sono:

- Contribuire al passaggio a un'economia efficiente in termini di risorse, a basse emissioni di carbonio e resiliente ai cambiamenti climatici; migliorare la qualità dell'ambiente; interrompere e invertire il processo di perdita di biodiversità;
- migliorare lo sviluppo, l'attuazione e l'applicazione della politica e della legislazione ambientale e in materia di clima dell'Unione, catalizzare e promuovere l'integrazione e la diffusione degli obiettivi ambientali e climatici nelle altre politiche e pratiche dell'Unione;
- sostenere una migliore governance ambientale e in materia di clima a tutti i livelli, compresa una maggiore partecipazione della società civile, delle ONG e degli attori locali;
- sostenere l'attuazione del Settimo programma d'azione per l'ambiente.

Il programma LIFE è gestito dalla commissione europea e coordinato in taluni casi dall'Agenzia esecutiva per le piccole e medie imprese (EASME). Il sotto programma per l'ambiente copre le aree prioritarie “Ambiente ed efficienza delle risorse”, “Natura e

biodiversità” e “Governance ambientale e Informazione”. Uno dei progetti italiani finanziato dal programma LIFE è il progetto LIFE Biorest.



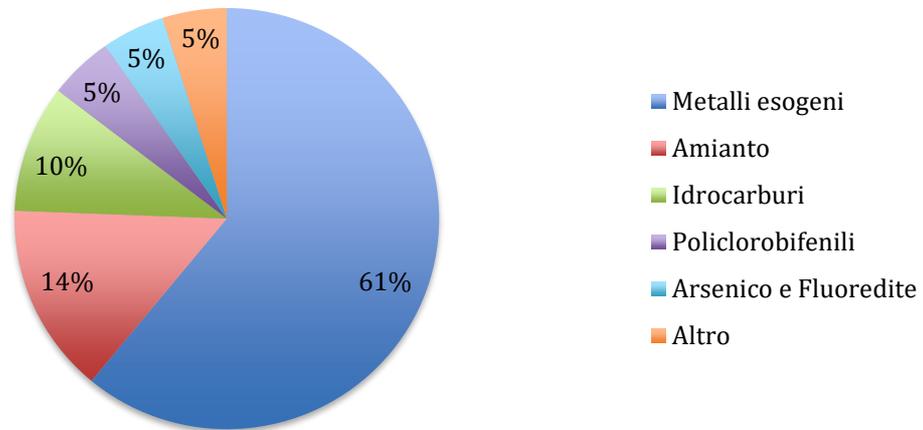
3.2) Il progetto LIFE Biorest

L'obiettivo del progetto LIFE BIOREST è di dimostrare l'efficacia e la sostenibilità economica di un approccio di biorisanamento di suoli inquinati da idrocarburi basato sull'uso di ceppi batterici e fungini ad alto potere degradante, anche valorizzando l'utilizzo di sotto-prodotti dell'industria agro-alimentare. LIFE BIOREST nasce dalla partnership tra il Consorzio Italbiotec (coordinatore) e i partner Actygea Srl, l'Agenzia regionale per la Prevenzione, l'Ambiente e l'Energia - ARPAE, l'Università degli Studi di Torino, l'Università Cattolica del Sacro Cuore, l'Agenzia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (Spagna) e SAAT GRAND EST (Francia).

Nel 2018 sono stati identificati 41 SINs: tra questi compare anche il sito di Fidenza, che assume un ruolo centrale nel progetto Life Biorest, come vedremo a breve. Secondo i dati ricavati da uno studio preliminare del progetto Biorest, il suolo contaminato in Italia occupa un'area complessiva di 51.403 ettari; di questi, solo il 12,6% è stato interessato da progetti di bonifica. Inoltre, sempre basandoci sulle osservazioni fatte dagli addetti al progetto e ricavate dagli archivi regionali siamo in grado di dire quali siano gli inquinanti più presenti e quali siano le fonti di inquinanti più importanti in Italia (Tabella 12).

Tabella 12: I principali inquinanti presenti nei SIN's (Dati estratti dal report del progetto Biorest https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/giulia-storage/websites/lifebiorest.com/blog/Guida-Ambientale-Biorisanamento-28-08-20-ITA-Web_BR.pdf).

Risultati dell'analisi chimica dei SINs



In Italia la contaminazione dei siti riguarda prevalentemente luoghi in cui sono svolte o sono state svolte attività industriali. Guardando alla storia del nostro paese, assumono un'importanza anche le ex aree di estrazione di amianto o di altri prodotti minerali, le aree portuali e le discariche.

Il progetto Biorest ha scelto come area da bonificare il Sito di Interesse Nazionale di Fidenza, una ex area carbochimica interessata da intensa contaminazione. L'area è stata occupata per più di 50 anni da compagnie petrolchimiche e il suolo è ora contaminato da solventi clorurati, fenoli, idrocarburi a catena lunga e leggeri, idrocarburi policiclici aromatici, BTEX e solventi clorurati alifatici. Il valore totale degli idrocarburi presenti raggiunge i 1800 mg/kg. L'obiettivo del progetto non è soltanto quello di dimostrare l'efficacia e la convenienza da un punto di vista economico nell'adozione delle strategie di biorisanamento che siano efficienti per i suoli altamente contaminati, ma anche di restituire alla città nuovi spazi verdi. Infatti, i suoli biorisanati possono essere rivegetati e destinati all'uso pubblico, aggiungendo un nuovo valore economico e paesaggistico all'ex area contaminata.

L'attuazione del progetto Biorest si articola in tre fasi:

- ❖ Ottimizzazione del biorisanamento del suolo;
- ❖ Produzione di biomassa su scala industriale;
- ❖ Biorisanamento in situ e rivegetazione.

Ottimizzazione del biorisanamento del suolo;

Il primo passo che viene fatto quando si considera un progetto di bonifica del suolo attraverso biorisanamento è un'indagine preliminare mirata ad identificare gli organismi naturalmente presenti nel suolo – o autoctoni. I microrganismi alloctoni, almeno nel caso del progetto Biorest, non vengono inclusi nella biobonifica perché si vuole limitare la presenza di effetti imprevisti legati all'introduzione di organismi non naturalmente presenti nel sito analizzato. Lo sviluppo di una strategia di biorimediazione vincente richiede una comprensione esaustiva degli organismi residenti negli habitat contaminati (Spini et al. 2018). Nel suolo di Fidenza sono stati rilevati 10^7 e 10^4 cfu/100g di batteri e funghi, una quantità importante ma senz'altro inferiore rispetto alla densità che si riscontra nei suoli non interessati da attività antropiche. I contaminanti presenti hanno creato un ambiente ostico per la sopravvivenza dei microrganismi, quelli che sono stati selezionati naturalmente e che sono sopravvissuti in queste condizioni chimiche e fisiche, sono stati valutati a lungo per capire se potessero essere sfruttati nel progetto di bonifica. Come già spiegato nel capitolo precedente, le proprietà degradanti dei microrganismi sono da attribuire alla produzione da parte di questi ultimi di specifici enzimi che sono in grado di degradare il contaminante, e all'utilizzo dell'inquinante come fonte di carbonio. Alcuni studi hanno notato che la comunità batterica è principalmente coinvolta nella degradazione di composti aromatici (Liu et al. 2011) mentre la comunità fungina mostra più affinità per la decomposizione delle frazioni polari degli idrocarburi e nella degradazione di contaminanti recalcitranti (Wick et al., 2007; Fernandez-Luqueno et al., 2010; Deshmukh et al., 2016). Non di rado funghi e batteri collaborano insieme, gli uni riducendo i contaminanti a intermedi metabolici biodisponibili, gli altri utilizzandoli come substrato di crescita per la biodegradazione (Smits. et al., 2005). In generale, un consorzio microbico composto da microrganismi che hanno abilità metaboliche differenti e che possono interagire tra di loro lavorano meglio che nel caso in cui sono presi singolarmente. Nel suolo esaminato vengono isolati 565 ceppi di microrganismi, (309 funghi e 256 batteri). Per capire quali siano i funghi e i batteri più capaci di degradare i composti vengono preparate delle culture in cui è presente come unica fonte di carbonio un contaminante tra Benzene, Pirene, Fenantrene e Naftalene e successivamente viene aggiunto un inoculo di suolo al mezzo culturale. La caratterizzazione molecolare dei ceppi microbici presenti nei diversi mezzi culturali evidenzia che: i batteri isolati appartengono principalmente a 12 generi, sia Gram-negativi che Gram-positivi: il genere più abbondante è *Pseudomonas* (56.8%) seguito da *Sphingobacterium* (12%), *Bacillus* (6%), *Stenothrophomonas* (6%), *Achromobacter* (6%),

e *Serratia* (3%) (Spini et al. 2018)

I funghi isolati invece appartengono principalmente al phylum Ascomycota. Il genere più presente è *Fusarium* (43.8%), *Trichoderma* (13.8 %) e *Aspergillus* (11%). Nelle figura 10 viene raffigurata una specie largamente utilizzata nel progetto e dalle buone capacità biodegradative.



Figura 10: *Aspergillus Terreus* (Layman's report 2018- https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/giulia-storage/websites/lifebioest.com/blog/Layman-s-Report_final-FS_compressed.pdf)

Successivamente bisogna valutare anche la quantità e la natura chimica dei residui della degradazione o dei metaboliti secondari prodotti dalla singola specie batterica o fungina o eventualmente da un consorzio. È necessario testare le specie identificate per valutare la loro capacità di produrre biosurfattanti. I biosurfattanti, già citati nel capitolo precedente, hanno un ruolo ecologico fondamentale, perché rendono biodisponibili i contaminanti, che si trovano in forme chimiche “difficili da attaccare” da parte dei microorganismi. A seguito di questi processi di analisi dei microorganismi presenti nel suolo inquinato, vengono scelti più di 30 batteri e funghi con le capacità degradative migliori tra quelli autoctoni identificati nel terreno. I migliori 5 consorzi microbici sono stati inoltre utilizzati per trattare le porzioni di terreno maggiori. In generale si può dire che i microorganismi scelti nella fase preliminare siano stati sottoposti a due “test” in scale di grandezza diverse: le prime osservazioni sono condotte in laboratorio, su 500g di suolo, mentre il secondo set di prove prevede di inoculare i microorganismi in 10kg di suolo per valutare gli effetti a livello di “meso-cosmo”. I batteri e i funghi sono dapprima testati separatamente in microcosmi costituiti da ceppi singoli o misti. I microorganismi vengono combinati per capire come lavorino in sinergia. Dai risultati emersi nelle prove di laboratorio è stato notato che l'azione combinata di funghi e batteri è più veloce e più efficiente nella degradazione del contaminante rispetto alle abilità dei microorganismi presi singolarmente (figura 11).

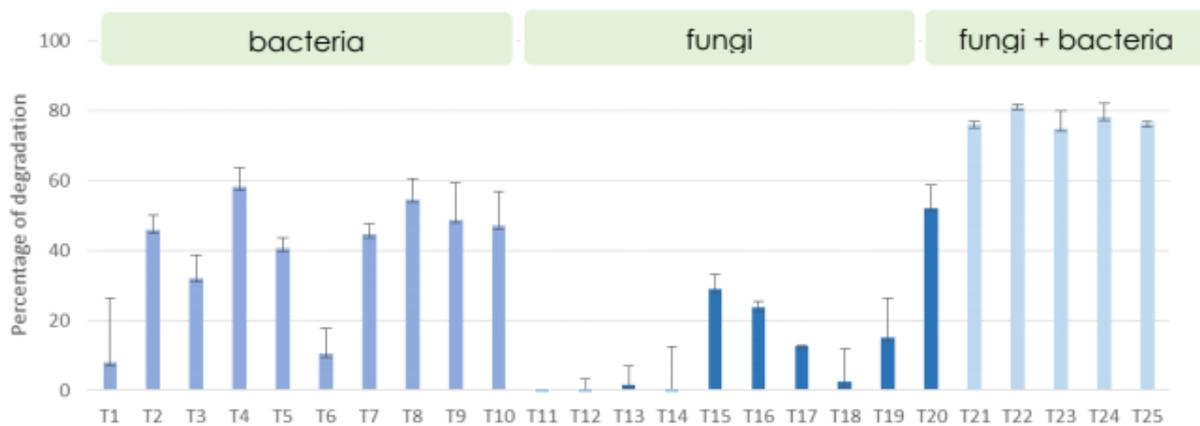


Figura 11: Vengono testate le diverse abilità di degradazione di batteri, funghi, o batteri e funghi in sinergia. (Layman's Report, 2018 - https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/giulia-storage/websites/lifebioest.com/blog/Layman-s-Report_final-FS_compressed.pdf).

Negli esperimenti in condizioni di meso-cosmo, sono state valutate le capacità degradative di sei comunità microbiche a composizione diversa, ed è stato osservato che il contenuto totale di idrocarburi è diminuito del 70% rispetto al controllo. Nel consorzio microbico più performante i contaminanti più presenti sono stati trasformati quasi del tutto. (figura 12). Il monitoraggio chimico, eco-tossicologico e biologico ha mostrato che il consorzio costituito da *Fusarium solani*, *Talaromyces sayulitensis*, *Aspergillus jensenii*, *Aspergillus terreus*, *Trametes gibbosa*, *Bjerkandera adusta* tra i funghi e *Pseudomonas spp*, *Pseudomonas putida* e *Acinetobacter calcoaceticus* tra i batteri riesce a degradare elevate quantità di contaminante.

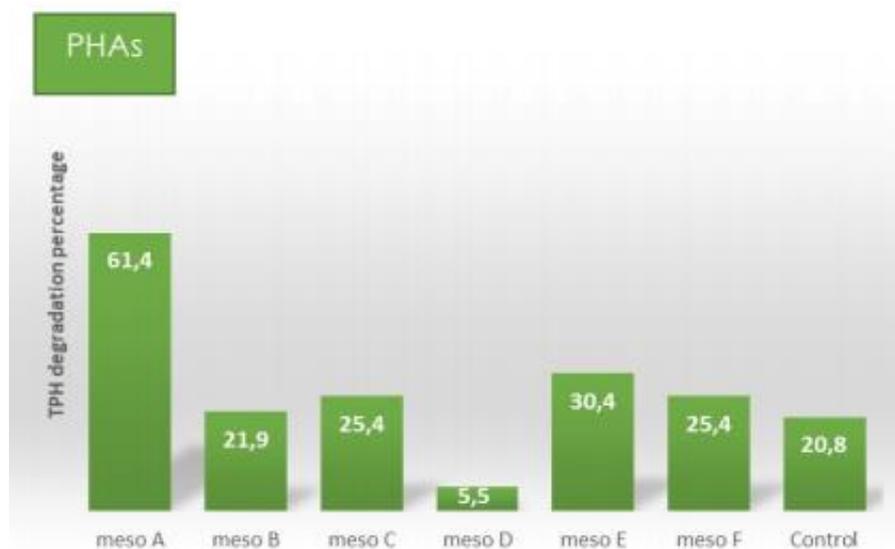


Figura 12: Sull'asse delle ascisse i consorzi microbici scelti vengono comparati in base alla loro abilità di degradazione dell'inquinante (Asse delle ordinate). Il consorzio A è il più performante tra quelli osservati. (Layman's Report, 2018 https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/giulia/storage/websites/lifebiorest.com/blog/Layman-s-Report_final-FS_compressed.pdf)

Produzione di biomassa su scala industriale:

Dopo aver identificato gli organismi più abili nella degradazione dei contaminanti presenti nei suoli del sito di Fidenza, bisogna ottimizzare le condizioni di crescita per ottenere una biomassa tale da poter trattare numerose tonnellate di suolo. Il termine tecnico utilizzato per riferirsi alla crescita in laboratorio di microrganismi ai fini di reinserirli nel suolo e accelerare la biodegradazione è *bioaugmentation*. Come è stato già detto nel capitolo precedente, quando sappiamo che vi sono degli organismi in grado di trattare i contaminanti nei suoli inquinati possiamo sfruttarli in tre modi diversi: attraverso il processo di attenuazione naturale lasciamo che non ci siano interventi sul processo di biodegradazione. Nel processo di biostimolazione aggiungiamo al suolo o ad un mezzo culturale opportuni nutrienti per migliorare le prestazioni degradative dei microrganismi oppure, come nel nostro caso, stimoliamo la crescita di biomassa microbica in maniera artificiale, utilizzando le opportune tecniche biotecnologiche e gli opportuni nutrienti. Actygea Srl, partner del progetto europeo LIFE Biorest si occupa da anni della coltivazione in laboratorio di microrganismi o metaboliti di interesse che vengono poi utilizzati per svariati scopi: per lo sfruttamento farmaceutico, alimentare, industriale, o, come in questo caso, per il biorisanamento del suolo. Capire come ridurre i costi dei processi di fermentazione necessari per la formazione di grandi quantità di batteri e dei mezzi utili alla produzione dei funghi è stata la maggiore sfida della seconda fase. In generale, il costo dei prodotti di fermentazione è stato ridotto a meno di EUR 10 per trattare una tonnellata di terreno. Durante la fermentazione sono stati usati come *carrier* materiali di scarto vegetali come la cellulosa, la lolla di riso e l'olio vegetale esausto. I processi di laboratorio di *bioaugmentation* hanno permesso il raggiungimento di una biomassa ragguardevole di microrganismi che sono stati poi portati sul campo per essere impiegati nella fase finale della preparazione alla bonifica.

Biorisanamento in situ e rivegetazione

Una volta pronta la quantità di microrganismi necessari per trattare le 530 tonnellate di suolo contaminato, si procede al biorisanamento in situ vero e proprio. Allo scavo del suolo segue la fase di inoculo degli organismi: il suolo viene trattato con la lolla di riso che

funziona come carrier dei batteri e dei funghi (D'imporzano et al. 2018). Il suolo è arricchito di nutrienti come il fosforo e l'azoto e viene mescolato per favorire l'areazione. Per la bonifica biologica viene usato uno dei metodi di cui abbiamo discusso nel capitolo precedente, ossia il *biopiling*. La biopila altro non è che un cumulo di terreno di dimensioni diverse a seconda dei casi disposto su una struttura di contenimento che previene il *leaching* e in generale permette di avere un maggiore controllo del suolo trattato. A seconda delle tecniche utilizzate, al sistema della biopila possono essere anche introdotte reti di drenaggio, tubazioni, sistemi di aspersione, e possono essere installate delle sonde, per poter monitorare l'andamento della biodegradazione e modificare artificialmente alcuni parametri. È dunque possibile controllare l'areazione o la quantità di nutrienti. La biopila presente nel sito di Fidenza, la cui costruzione è cominciata nel febbraio del 2018 e ha previsto l'impilamento di 530 tonnellate di suolo contaminato, presenta un volume di 400 m³ e un'altezza di 3 metri. Dopo la fase di escavazione del suolo, esso viene arricchito con i nutrienti e vengono aggiunti gli organismi bioaugmentati con la lolla di riso. (figure 13, 14,15,16,). Il suolo è poi disposto in una struttura contenitiva su una piattaforma fatta da polietilene ad alta densità. Attraverso delle tubazioni costituite anch'esse da polietilene, si forza un flusso d'aria nella biopila che serve a favorire la biodegradazione e si controllano continuamente parametri come l'areazione e l'umidità del suolo, ma anche la temperatura della biomassa e la concentrazione di ossigeno nel flusso in uscita. I risultati ottenuti mostrano che la rimozione dei contaminanti nella biopila trattata con microrganismi bioaugmentati è di gran lunga superiore alla porzione di suolo non trattata usata come controllo. Già dopo 60 giorni, i microrganismi sono stati in grado di rimuovere 300mg/kg di idrocarburi dal suolo, dimostrando che nel terreno trattato la frazione di idrocarburi era ridotta già del 40%, mentre nel terreno di controllo la quantità di contaminanti presenti era rimasta pressoché inalterata. Alla fine del trattamento, durato 150 giorni, la quantità di idrocarburi presenti nel suolo trattato con microrganismi selezionati era di gran lunga inferiore agli idrocarburi residuali nel terreno di controllo. In ultima istanza, vengono scelte delle specie vegetali che abbiano capacità fitodepurative da far crescere sul terreno trattato per favorire la rivegetazione del sito. Il progetto Bioest ha scelto tre specie che sono state riconosciute come le più indicate per la fitodepurazione nel suolo contaminato da IPA e BTEX, e queste sono: *Sorghum bicolor*, *Trifolium pratense* e *Festuca arundinacea*. La rivegetazione dell'area contaminata ha un'importanza sociale e culturale, ma anche un'importanza biologica. L'inserimento di specie vegetali in un'area che ne è stata a lungo priva o che ne ha registrato una ridottissima presenza favorisce la creazione

di una rizosfera, che altro non è che quella porzione di suolo in cui i microrganismi indigeni e le radici interagiscono e collaborano. Questa collaborazione si potrebbe tradurre anche in una migliore resa a livello di biodegradazione.



Figura 13, 14: Applicazione dei microrganismi nella biopila da parte di un operatore (Si ringrazia per le immagini la Dott.ssa Ilaria Re, del consorzio Italbiotec)



Figura 15,16: Le immagini illustrano la preparazione sul campo della biopila. (Si ringrazia per le immagini la Dott.ssa Ilaria Re, del consorzio Italbiotec)

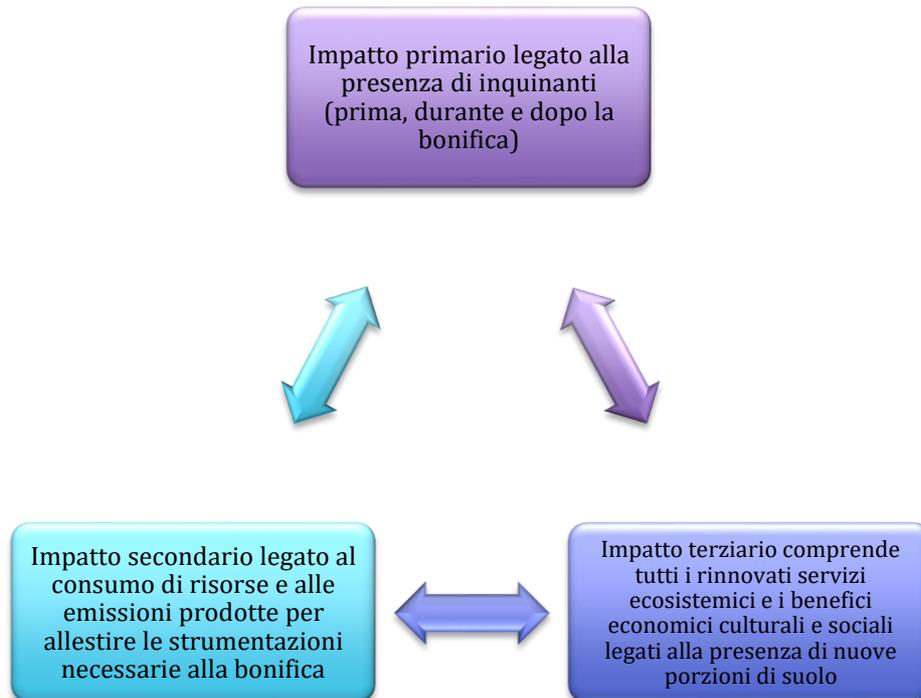
3.3) Il Life Cycle Assessment

Il *Life Cycle Assessment*, o analisi del ciclo di vita, è un metodo che permette di valutare gli impatti sull'ambiente e sulla salute umana di un bene o di un servizio, una sorta di analisi costi-benefici in cui vengono valutate le risorse utilizzate per la costruzione di un bene o l'attuazione di un servizio e le emissioni legate alle fasi di produzione, consumo e "smaltimento".

Lo studio condotto da D'Imporzano et al. nel 2018 "*Optimizing Bioremediation of Hydrocarbon Polluted Soil By Life Cycle Assessment (LCA) Approach*" ha l'obiettivo di

valutare i potenziali impatti ambientali della tecnologia di biorimediazione proposta dal progetto Biorest. Nel caso della valutazione di un sito contaminato, fare un *Life Cycle Assessment* vuol dire considerare l'impatto ambientale su tre diversi livelli definiti nella figura 17:

Figura 17: I tre livelli da considerare quando si redige un'analisi del ciclo di vita. Non c'è un livello più importante dell'altro, ma non è sempre facile stimare gli impatti su ogni livello.



Facendo un LCA occorre stilare un inventario in cui vengono identificati e quantificati gli *inputs* e gli *outputs* di energia e materiale impiegati nelle fasi della messa in pratica del servizio che stiamo analizzando. Nel caso del biorimediazione con biopila mediata da batteri e funghi messo a punto dal progetto Biorest, gli input considerati (acqua, occupazione del suolo, materiale grezzo, elettricità, benzina, materiali da costruzione) sono utilizzati per la realizzazione e la gestione della biopila nonché per la biosintesi dei microrganismi impiegati. Tra gli output troviamo i possibili "prodotti" o scarti derivanti dai trattamenti di bonifica: tra questi va considerato ovviamente il suolo totalmente o parzialmente decontaminato, ma anche le emissioni che vengono liberate in atmosfera, in acqua o i residui di inquinanti che rimangono nel suolo. Insomma, fare un inventario vuol dire analizzare nei minimi dettagli ogni singolo passaggio del progetto di bonifica e quantificare i materiali e l'energia utilizzata per attuarlo. Ad esempio, vengono annoverati nell'inventario i materiali usati per la costruzione della biopila, ossia 16.500 kg di

polietilene ad alta densità, i 100 kg di acciaio impiegato nella costruzione delle pompe e di altre attrezzature, ma viene anche valutata la distanza in termini di km (e quindi di benzina) dai fornitori dei materiali di costruzione. Per la gestione della biopila durante tutta la durata del progetto vengono considerate e inserite nell'inventario risorse come il diesel utilizzato come combustibile dalle macchine operatrici degli scavi, l'elettricità consumata per l'alimentazione dei vari strumenti impiegati nella bonifica (come le pompe ad aria), la quantità di acqua aggiunta al sistema, la quantità di fertilizzante, lolla di riso, e la distanza media, anche in questo caso, dai fornitori che approvvigionano il progetto dei materiali di vario tipo. Una parte dell'inventario riguarda anche la considerazione delle risorse utilizzate per i processi di laboratorio e di bioaugmentazione, come elettricità, gas, calore sfruttati nelle parti del progetto che riguardano la selezione dei microorganismi e la loro aumentazione. Tra gli output, come già detto, dobbiamo annoverare tutte quelle "risorse" che lasciano il sistema: serve qui una doppia interpretazione, perché se da una parte tra queste risorse rimosse compaiono parte dei contaminanti del suolo dall'altra il biorimedio mediato da consorzi mico-batterici comporta la produzione di emissioni e rifiuti. Anche in questo caso, le emissioni e i rifiuti sono prodotti in ogni fase del progetto, a partire dalle analisi di laboratorio fino alle applicazioni sul campo. Per avere una visione d'insieme degli impatti legati all'attuazione della bonifica ha senso fare un paragone tra le emissioni, gli scarti (o le conseguenze) legati al biorimedio tramite bioaugmentazione e gli effetti in termini di emissioni e scarti legati al mancato trattamento di quello stesso sito. In altre parole, inquina di più agire o non agire? Quali emissioni sono prodotte effettuando la bonifica attraverso questo metodo? E perché? Quali conseguenze sono prodotte invece dalla non attuazione di alcuna bonifica? Le tabelle sottostanti tentano di rispondere a queste domande, elencando le categorie impattanti e stimando dei valori di emissioni legati ad ogni categoria nel caso dell'attuazione del biorimedio e nel caso in cui non venga fatto alcun intervento. Esse sono state compilate nell'ambito della valutazione d'impatto effettuata per il progetto Life Biorest da D'imporzano et al. (2018).

Tabella 13: *Categorie di impatto e valori correlati nel caso in cui non si effettui alcuna bonifica e nel caso in cui si effettui una bonifica con bioaugmentazione. (D'imporzano et al. 2018).*

<i>Impact category</i>	<i>Unit</i>	<i>No- action scenario</i>	<i>Remediation by bioaugmentation</i>
Climate change	kg CO ₂ eq	0	9.69
Ozone depletion	kg CFC-11 eq	0	7.72E-07
Terrestrial acidification	kg SO ₂ eq	0	4.49E-02
Freshwater eutrophication	kg P eq	0	1.64E-03
Marine eutrophication	kg N eq	0	3.74E-03

Le prime cinque categorie della tabella 13, si riferiscono all'emissione di anidride carbonica e di altri composti chimici come i gas fluoro-cloro-carburi, l'anidride solforosa e nutrienti come il fosforo e l'azoto durante le varie fasi della bonifica. Come possiamo notare dai valori sotto la dicitura "No-action scenario" nel caso in cui si decida di non intervenire in alcun modo su un sito contaminato non ci sono emissioni notabili dei composti citati. Le emissioni di anidride carbonica e degli altri gas/nutrienti citati nel caso della bonifica attraverso bioaugmentazione (*remediation by bioaugmentation*) sono legati ad una serie di fattori e passaggi.

L'emissione di anidride carbonica (9.69 kg per tonnellata di materiale trattato) è correlata all'utilizzo dell'elettricità che alimenta i sistemi di areazione della biopila, alla combustione della benzina e alle emissioni del motore che aziona i macchinari impiegati nei processi di estrazione e posizionamento del terreno ed è in parte legata alla produzione di fertilizzanti chimici. La deposizione di composti acidificanti al suolo (come l'anidride solforica o gli ossidi di azoto) dipende in piccola parte dalle combustioni già citate e in più grande misura dall'utilizzo di fertilizzanti azotati e dalla produzione agricola della lolla di riso che serve come carrier per l'inoculo. Le voci *Freshwater eutrophication* e *Marine eutrophication* si riferiscono alle quantità di fosforo e azoto che possono raggiungere le acque correnti o i mari e lì causare eutrofizzazione, alterando gli equilibri naturali degli ecosistemi. Il fosforo è prodotto ancora una volta dalla combustione della benzina, mentre il rilascio di azoto negli ecosistemi marini è legato alle attività agricole.

Tabella 14: Categorie di impatto e valori correlati nel caso in cui non si effettui alcuna bonifica e nel caso in cui si effettui una bonifica con bioaugmentazione. (D'imporzano et al. 2018)

<i>Impact category</i>	<i>Unit</i>	<i>No-action scenario</i>	<i>Remediation by bioaugmentation</i>
Human toxicity	kg 1,4-DB eq	1.27	1.69
Photochemical oxidant formation	kg NMVOC	0.04	0.03
Particulate matter formation	kg PM10 eq	0	0.02
Terrestrial ecotoxicity	kg 1,4-DB eq	0.30	4.87E-03
Freshwater ecotoxicity	kg 1,4-DB eq	0.16	0.12
Marine ecotoxicity	kg 1,4-DB eq	0.01	0.07

Per quanto riguarda la tossicità dei composti presenti, (tabella 14) entrambi i tipi di azione espongono l'essere umano a dei pericoli: la differenza sta però nel fatto che senza alcun intervento i contaminanti sono concentrati in un unico sito, mentre intervenendo con il biorimedio i contaminanti emessi dalla combustione della benzina o dall'utilizzo di fertilizzanti sarebbero dispersi in atmosfera e avrebbero effetti tossici più lievi, ma su un'area più estesa. Le altre categorie di impatto presentano parametri più o meno simili per entrambi gli scenari. Le voci "Photochemical oxidant formation" e "Particulate matter

formation” si riferiscono l’una alle reazioni di ossidazione mediate dalla luce che trasformano i composti chimici in *non-methane-volatile-organic-compounds* (NMVOC), l’altra alla formazione di particolato atmosferico dovuto ai processi di combustione già ampiamente citati (tabella 15).

Tabella 15: Categorie di impatto e valori correlati nel caso in cui non si effettui alcuna bonifica e nel caso in cui si effettui una bonifica con bioaumentazione. (D’Imporzano et al. 2018)

<i>Impact category</i>	<i>Unit</i>	<i>No-action scenario</i>	<i>Remediation by bioaugmentation</i>
Agricultural land occupation	m ² a	0	0.49
Urban land occupation	m ² a	17.9	0.07
Natural land transformation	m ²	0	1.15E-03
Water depletion	m ³	0	0.24
Metal depletion	kg Fe eq	0	0.38
Fossil depletion	kg oil eq	0	4.60

Infine, un’ulteriore valutazione viene fatta sull’impatto terziario: da una parte si quantifica la perdita di superficie e dunque la perdita dei servizi ecosistemici ad essa associati e dall’altra invece si quantifica lo sfruttamento di materie prime come l’acqua, i metalli, o il combustibile fossile. Il valore che salta all’occhio immediatamente dando uno sguardo a questa tabella riguarda l’occupazione di territorio urbano *urban land occupation*: non intervenire vorrebbe dire sacrificare vari metri quadrati di terreno che fornisce servizi ecosistemici e la cui buona salute ha un valore economico, sociale e culturale per le persone che vivono nell’area di Fidenza. Intervenire d’altro canto vuol dire trasformare un’area inutilizzabile e dalla scarsa qualità ambientale in un’area rivegetata dalla qualità superiore e che è possibile sfruttare per fini urbani (figura 18). Il documento redatto da D’Imporzano sottolinea come praticare alcuni accorgimenti possa ridurre, e non di poco, l’impatto ambientale della tecnica utilizzata per la bonifica del sito di Fidenza. Questi accorgimenti prevedono che venga fatta un’accurata analisi sulla quantità di O₂ effettivamente necessaria alla biopila: ridurre l’approvvigionamento di O₂ vorrebbe dire risparmiare anche elettricità e quindi rendere la bonifica meno impattante. Un discorso simile può essere fatto per i fertilizzanti, utilizzare liquami e letame nelle fasi di fertilizzazione della biopila può evitare parte delle emissioni di gas serra e tamponare il fenomeno dell’acidificazione dovuta a fertilizzanti. In conclusione, agire su un suolo contaminato ha degli impatti in termini di cambiamento climatico, inquinamento e sfruttamento di alcune risorse importanti come l’acqua e i combustibili fossili. Ma l’entità di tali conseguenze appare irrisoria dinanzi alla necessità scientifica ed “emotiva” di poter godere di suoli sani e vitali. Per fare un esempio, il biorimedia di 1100 tonnellate di suolo

provoca la stessa quantità di CO₂ emessa da un cittadino in un anno (ReCiPe normalizing factor). Tentiamo di rendere l'idea: un boeing 747-400 ha una massa a vuoto di circa 180.000 kg, che corrispondono a 180 tonnellate. Per decontaminare una quantità di terreno equivalente a 6.16 Boeing si produce la stessa quantità di anidride carbonica che emette un essere umano in un anno!



Figura 18: Il terreno biorimediato viene rimesso in loco e rivegetato con specie che hanno abilità fitodepurative. Questa immagine ritrae una parte del sito di Fidenza ripristinato. (Si ringrazia per le immagini la Dott.ssa Ilaria Re, del consorzio Italbiotec)

Conclusioni

L'analisi appena condotta sulle potenzialità del biorisanamento e la valutazione dei risultati positivi ottenuti da un caso studio ci consiglia di riconsiderare questa tecnologia e renderla centrale, protagonista, rispetto alle altre tecnologie considerate. Usare la natura per aiutare la natura ha una serie di vantaggi considerevoli. D'altronde stiamo parlando di un approccio innovativo, ecologico e relativamente poco costoso, che con il tempo e con il perfezionamento scientifico potrebbe diventare ancora più sfruttato. È necessario, oggi più che mai, considerare seriamente la minaccia che grava sul futuro di milioni, se non miliardi, di persone. Alla luce di ciò che sappiamo sul suolo, delle funzioni che svolge e dei

prodotti che ci fornisce ha un'importanza centrale il perfezionamento di tecniche di bonifica che siano poco invasive e intelligenti. Il progetto Bioest ha dimostrato come il biorisanamento attraverso bioaumento di microrganismi scelti in biopila sia un grande alleato nella decontaminazione e il recupero dei suoli inquinati. Non ci si può aspettare che i risultati ottenuti nel sito di Fidenza siano replicabili ovunque, perché essi dipendono, come abbiamo visto, da una serie di circostanze che sono state attentamente valutate dagli addetti al progetto. Ma sicuramente si può, e ci si deve aspettare, che gli investimenti futuri, a livello europeo e non, siano rivolti alla comprensione e al perfezionamento delle pratiche di bonifica biologiche, per assicurare ai cittadini e all'ecosistema sicurezza e salute. La valutazione e l'attuazione di questi progetti si inserisce bene nella cornice didattica proposta dal corso di Laurea di Scienze Ambientali. Al giorno d'oggi studiare l'Ambiente vuol dire anche domandarsi quali strumenti siano e saranno in grado di risolvere parte delle grandi sfide che siamo chiamati ad affrontare.

Bibliografia consultata

Arthur, E. L., Rice, P. J., Rice, P. J., Anderson, A., Baladi, S. M., Henderson, K.L. D. and Coats, Joel R. (2005) 'Phytoremediation - An Overview', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:2, 109 – 122 DOI:10.1080/07352680590952496

Azubuikwe, C.C., Chikere, C.B. & Okpokwasili, G.C (2016). . Bioremediation techniques– classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol* **32**, 180 <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137->

G. D'Imporzano, I. Re , F. Spina, C. Varese, E. Puglisi, G. Spini, C. Gramellini, G. Zaccanti, F. Beltrametti, A. Bava, F. Adani (2018) OPTIMIZING BIOREMEDIATION OF

HYDROCARBON POLLUTED SOIL BY LIFE CYCLE ASSESSMENT (LCA) APPROACH
Environmental Engineering and Management Journal October 2018, Vol. 18, No. 10,
2155-2162

Fritsche, W. and Hofrichter, M. (2000). Aerobic Degradation by Microorganisms. In: Klein, J., Ed, Environmental Processes-Soil Decontamination, Wiley-VCH, Weinheim, 146-155.

Harms H, Schlosser D, Wick LY. 2011 Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol.* Mar;9(3):177-92. doi: 10.1038/nrmicro2519.

N. T Joutey, W. Bahafid, H. Sayel, N. El Ghachtouli 2013- Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms, Biodegradation (Life of Science, Rolando Chamy and Francisca Rosenkranz, IntechOpen, DOI: 10.5772/56194.

Kulshreshtha S, Mathur N, Bhatnagar P.(2014) Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express.* 2014;4:29. doi:10.1186/s13568-014-0029-8

A.P. Pérez, N. Rodríguez Eugenio (2018) Status of local soil contamination in Europe: Revision of the indicator "Progress in the management Contaminated Sites in Europe EUR 29124 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-79-80072-6, doi:10.2760/093804, JRC107508

Rodríguez-Eugenio, N.; McLaughlin, M.; Pennock, D [2018].; Soil pollution: a hidden reality FAO, Rome (Italy). Land and Water Development Div

F. Spina, G. Spini, A. Polia, A. Romagnolo , A. Zanellati , N. G. Bentivegna, N. El-Azharic , T. Regnier, A. Bliex , A. Echairi, V. Prigione , E. Puglisi , G. C. Varese (2018). Screening of Anionic Biosurfactants Production among Fungi and Bacteria. *Chemical Engineering Transactions.* vol.64. 10.3303/CET1864083.

G. Spini, F. Spina , A. Poli , A. Bliex , T. Regnier , C. Gramellini , G. C. Varese E. Puglisi (2018) Molecular and Microbiological Insights on the Enrichment Procedures for the Isolation of Petroleum Degrading Bacteria and Fungi *Frontiers in Microbiology* Vol.9 2018 pp.2543 doi: 10.3389/fmicb.2018.02543

Thomé A., Reginatto C., Vanzetto G., Braun A.B. (2019) Remediation Technologies Applied in Polluted Soils: New Perspectives in This Field. In: Zhan L., Chen Y., Bouazza A. (eds) Proceedings of the 8th International Congress on Environmental Geotechnics Volume 1. ICEG 2018. Environmental Science and Engineering. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2221-1_11

Roland Treu & Jerzy Falandysz (2017) Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes—a review, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52:3, 148-155, DOI: [10.1080/03601234.2017.1261536](https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1261536)

Ernest Marco-Urrea, Inmaculada García-Romera, Elisabet Aranda,(2015) Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons, *New Biotechnology*, Volume 32, Issue 6, 2015, Pages 620-628, ISSN 1871-6784,<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.005>.

Bibliografia citata

Abruscia C., Marquinaa D., Del Amob A., Catalina F. (2007) Biodegradation of cinematographic gelatin emulsion by bacteria and filamentous fungi using indirect impedance technique. *International Biodeterioration and Biodegradation*; 60 137-14.

Acevedo, F.; Pizzul, L.; Castillo, M.d.P.; Cuevas, Diez, M.C. (2011) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoophyllum discolor*. *J. Hazard. Mat.* 2011, 185, 212–219.

Nahid Akhtar, M. Amin-ul Mannan, (2020) Mycoremediation: Expunging environmental pollutants, *Biotechnology Reports*, Volume 26, 2020, e00452, ISSN 2215-017X, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>.

Itziar Alkorta, Carlos Garbisu (2001) Phytoremediation of organic contaminants in soils, *Bioresource Technology*, Volume 79, Issue 3, 2001, Pages 273-276, ISSN 0960-8524, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00016-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00016-5).

T.A. Anderson, E.L. Kruger, J.R. (1994) Coats Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant *Chemosphere*, 28 (1994), pp. 1551-1557

Biermann M, Lange F, Piorr R, Ploog U, Rutzen H, Schindler J, Schmidt R (1987) In: Falbe, J. (Ed.), Surfactants in Consumer Products, Theory, Technology and Application. . in Aqueous Solution, Springer-Verlag, Heidelberg, 1980.42.

Brooks, Robert. (2008). Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals. *Plants and the Chemical Elements: Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity* (pp.87 - 105) [10.1002/9783527615919.ch4](https://doi.org/10.1002/9783527615919.ch4).

Bumpus JA. (2004) Biodegradation of azo dyes by fungi. In: Arora, D.K. (Ed.), *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. Marcel Dekker, New York, pp.457-480.)

Bumpus, J.A.; Tien, M.; Wright, D.; Aust, S.D.(1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 1985,. Vol. 228, Issue 4706, pp. 1434-1436
DOI: [10.1126/science.3925550](https://doi.org/10.1126/science.3925550)

Carmichael, L.M., Pfaender, F.K.(1997) The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. *Biodegradation* 8, 1–13 (1997). <https://doi.org/10.1023/A:1008258720649>

Cerniglia CE, Kelly DW, Freeman JP, Miller DW.(1986) Microbial metabolism of pyrene. *Chem Biol Interact* 1986;57:203–16. DOI: [10.1016/0009-2797\(86\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0009-2797(86)90038-4)

Chaplain V, Mamy L, Vieubl e-Gonod L, Mougine C, Benoit P, Barriuso E and N elieu S.(2011): Fate of Pesticides in Soils: Toward an Integrated Approach of Influential Factors, *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*, Margarita Stoytcheva (Ed.) 2011
DOI: [10.5772/17035](https://doi.org/10.5772/17035)

- Chaube P, Indurkar H, Moghe S.(2010) Biodegradation and decolorisation of dye by mix consortia of bacteria and study of toxicity on Phaseolus mungo and Triticum aestivum. Asiatic Journal of Biotechnology Resources 2010; 01 45-56. DOI: [10.12691/ijebb-2-1-6](https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-6)
- Chulalaksananukul S, Gadd GM, Sangvanich P, Sihanonth P, Piapukiew J, Vangnai AS.(2006) Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated Fusarium sp. FEMS Microbiol Lett 2006;262:99–106. DOI: [10.1111/j.1574-6968.2006.00375.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00375.x)
- Cooney JJ.(1984) The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems. In: Atlas RM, editor. *Petroleum Microbiology*. New York, NY, USA: Macmillan; 1984. pp. 399–434.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A., and Purohit, H. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. Indian J. Microbiol. 56, 247–264. doi: 10.1007/s12088-016-0584-6
- Dias RL, Ruberto L, Calabró A, Balbo AL, Del Panno MT, Mac Cormack WP. Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site biostimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated Antarctic soil. Polar Biol. 2015;38:677–687. DOI: [10.1007/s00300-014-1630-7](https://doi.org/10.1007/s00300-014-1630-7)
- Dmochewitz S, Ballschmiter K. (1988) Microbial transformation of technical mixtures of polychlorinated biphenyls (PCB) by the fungus *Aspergillus niger*. Chemo-sphere 1988;17:111–21 [doi.org/10.1016/0045-6535\(88\)90049-5](https://doi.org/10.1016/0045-6535(88)90049-5)
- Donnelly, P.K.; Fletcher, J.S. (1994) Potential use of mycorrhizal fungi as ^[SEP]bioremediation agents. In *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*; Anderson, T.A., Coats, J.D., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 1994; 93–99. DOI: 10.1021/bk-1994-0563.ch008
- Dushenkov, V., Kumar, P., Motto, H., and Raskin, I. (1995). Rhizofiltration—the use of plants to remove heavy-metals from aqueous streams. Environ. Sci. Technol. 29, 1239–1245. doi: 10.1021/es00005a015
- Eggen, T. (1999) Application of fungal substrate from commercial mushroom production—*Pleurotus ostreatus*—for bioremediation of creosote contaminated soil. Int. Biodeterioration Biodegrad 1999, 44, 117–126.
- Erkurt, E.A.; Unyayar, A.; Kumbur (2007) H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. Process Biochem. 2007, 42, 1429–1435 doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.011
- Fernandez-Luqueno, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martinez-Suarez, C., Vazquez-Nunez, E., and Dendooven, L. (2010). Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenge: a review. Environ. Sci. Pollut. R. 18, 12–30. doi: 10.1007/s11356-010-0371-6
- Fritsche W, Hofrichter M, Aerobic degradation by microorganisms, in: *Biotechnology*. Vol. 11b, Environmental Processes, (-Rehm, H.-J., Reed, G., Eds.), Wiley-VCH, Weinheim 2000, pp. 145–167.

Garbisu C, Alkorta I. (2001) Phytoextraction: A cost-effective plant based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 2001; 77(3) 229-236. DOI: [10.1016/S0960-8524\(00\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00108-5)

Gidakos E, Aivalioti M. Large scale and long term application of bioslurping: the case of a Greek petroleum refinery site. *J Hazard Mater.* 2007;149:574–581. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.06.110

Giraud F, Guiraud P, Kadri M, Blake G, Steiman R. (2001) Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water Res* 2001;35:4126–36. DOI: [10.1016/s0043-1354\(01\)00137-3](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00137-3)

M.G. Healy, C.M. Devine, R. Murphy, (1996) Microbial production of biosurfactants, *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 18, Issues 1–4, 1996, Pages 41-57, [doi.org/10.1016/S0921-3449\(96\)01167-6](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(96)01167-6)

Hirano, T.; Honda, Y.; Watanabe, T.; Kuwahara (2000) M. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64(9), 1958–1962. DOI: [10.1271/bbb.64.1958](https://doi.org/10.1271/bbb.64.1958)

Huang, Y.; Zhao, X.; Luan, S (2007). Uptake and biodegradation of DDT by 4 ectomycorrhizal fungi. *Sci. Total Environ.* 2007, 385, 235–241. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2007.04.023](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.023)

Ishii K, Furuichi T. (2007) Development of bioreactor system for treatment of dioxin-contaminated soil using *Pseudallescheria boydii*. *J Hazard Mater.* 2007 Sep 30;148(3):693-700. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.03.032

Jacobs, A., Drouet, T., Sterckeman, T., and Noret, N. (2017). Phytoremediation of urban soils contaminated with trace metals using *Noccaea caerulea*: comparing non-metallicolous populations to the metallicolous 'Ganges' in field trials. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 8176–8188. doi: 10.1007/s11356-017-8504-9

Kanade SN, Khilare VC. (2012) Malathion Degradation by *Azospirillum lipoferum* Beijerinck. *Science Research Reporter* 2012; 2(1) 94-103.

Kao CM, Chen CY, Chen SC, Chien HY, Chen YL (2008) Application of in situ biosparging to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: field and microbial evaluation. *Chemosphere.* 2008 Feb; 70(8):1492-9. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2007.08.029](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.08.029)

Khan, Ibrar & Aftab, Maryam & Shakir, Sajid & Ali, Madiha & Qayyum, Sadia & Rehman, Mujadda & Haleem, Kashif & Tauseef, Isfahan. (2019). Mycoremediation of heavy metal (Cd and Cr)–polluted soil through indigenous metallotolerant fungal isolates. *Environmental Monitoring and Assessment.* 191. 10.1007/s10661-019-7769-5.

Liu, G. P.-W., Chang, T. C., Whang, L.-M., Kao, C.-H., Pan, P.-T., and Cheng, S.-S. (2011). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: effects of strategies

and microbial community shift. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65, 1119–1127. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.09.002

Liu L, Li W, Song W, Guo M (2018) Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: principles and applicability. *Sci Total Environ* 633:206–219 DOI: [10.1016/j.scitotenv.2018.03.161](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161)

Macci, C., Peruzzi, E., Doni, S., Poggio, G., and Masciandaro, G. (2016). The phytoremediation of an organic and inorganic polluted soil: a real scale experience. *Int. J. Phytoremediation* 18, 378–386. doi: 10.1080/15226514.2015.1109595

Machin-Ramirez C, Morales D, Martinez-Morales F, Okoh AI, Trejo-Hernandez MR. (2010) Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. *Int Biodeterior Biodegrad* 2010;64:538–44. doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.05.006

Martín MC, González BA, Blanco SMJ. (2004) Biological treatments for contaminated soils: hydrocarbon contamination. Fungal applications in bioremediation treatment. *Rev Iberoam Micol.* 2004;4:103–120.

Milner, M. J., and Kochian, L. V. (2008). Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Ann. Bot.* 102, 3–13. doi: 10.1093/aob/mcn063

Mollea, C.; Bosco, F.; Ruggeri, B (2005). Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. *Chemosphere* 2005, 60, 636–643. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2005.01.034](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.034)

C. N. Mulligan, (2005) Environmental applications for biosurfactants, *Environmental Pollution*, Volume 133, Issue 2, 2005, Pages 183-198, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>.

Nakamiya K, Furuichi T, Ishii K. (2002) Isolation of a fungus from denitrifying activated sludge that degrades highly chlorinated dioxins. *J Mater Cycles Waste Manage* 2002;4:127–34. □ DOI <https://doi.org/10.1007/s10163-002-0062-6>

Nam IH, Kim YM, Murugesan K, Jeon JR, Chang YY, Chang YS. (2007) Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst. *J Hazard Mater* 2008;157:114–21. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2007.12.086](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.086)

Ojuederie OB, Babalola OO. (2017) Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 Dec 4;14(12):1504. doi: 10.3390/ijerph14121504.

Passarini MRZ, Rodrigues MVN, da Silva M, Sette LD. (2011) Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Mar Pollut Bull* 2011;62:364–70. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2010.10.003](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.003)

Petric I, Hrak D, Fingler S, Vonina E, Cetkovic H, Begonja A Kolar and UdikoviKoli N. (2007) Enrichment and characterization of PCB-Degrading bacteria as potential seed cultures for bioremediation of contaminated soil. *Food Technology and Biotechnology* 2007; 45(1)11-20.

Pinedo, Cristina & Aleu, Josefina & Collado, Isidro. (2009). Pollutants Biodegradation by Fungi. *Current Organic Chemistry*. 13. 1194-1214. DOI: 10.2174/138527209788921774.

C A. Reddy,(1995) The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 6, Issue 3, 1995, Pages 320-328, [/doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80054-9](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80054-9)

Paul E. Rosenfeld, Lydia G.H. Feng 16 - Emerging Contaminants, Editor(s): Paul E. Rosenfeld, Lydia G.H. Feng, *Risks of Hazardous Wastes*, William Andrew Publishing, 2011, Pages 215-222, ISBN: 9781437778427

Sagar V, Singh DP. (2011) Biodegradation of lindane pesticide by non white-rots soil fungus *Fusarium* sp. *World J Microbiol Biotechnol* 2011;27:1747–54. DOI: [10.1007/s11274-010-0628-8](https://doi.org/10.1007/s11274-010-0628-8)

D.E. Salt, R.D. Smith, I. Raskin (1998) Phytoremediation *Annu Rev. Plant Physiol Plant Molec. Biol.*, 49 (1998), pp. 643-668 <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>

P. Singh, V. K. Singh, R. Singh, A. Borthakur, S. Madhav, A. Ahamad, A. Kumar, D.B Pal, D. Tiwary, P.K. Mishra, (2020) Chapter 1 - Bioremediation: a sustainable approach for management of environmental contaminants, Elsevier, 2020, Pages 1-23

M. Singh, P.K. Srivastava, P.C. Verma, R.N. Kharwar, N. Singh, R.D. Tripathi (2015) Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils *J. Appl. Microbiol.*, 119 (2015), pp. 1278-1290 <https://doi.org/10.1111/jam.12948>

Smits, T. H. M., Ford, R. M., Keel, C., Harms, H., Wick, L. Y., and Kohlmeier, S. (2005). Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environ. Sci. Tech.* 39, 4640–4646. doi: 10.1021/es047979z

Song B, Zeng G, Gong J, Liang J, Xu P, Liu Z, Zhang Y, Zhang C, Cheng M, Liu Y, Ye S, Yi H, Ren X (2017) Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. *Environ Int* 105:43–55 DOI: [10.1016/j.envint.2017.05.001](https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.001)

R.D. Stapleton, D.C. Savage, G.S. Saylor, G. Stacey (1998) Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11) (1998), pp. 4180-4184

Suman J, Uhlak O, Viktorova J and Macek T (2018) Phytoextraction of Heavy Metals: A Promising Tool for Clean-Up of Polluted Environment? *Front. Plant Sci.* 9:1476. doi: 10.3389/fpls.2018.01476

Tigini V, Prigione V, Di Toro S, Fava F, Varese GC. Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil.

Microb Cell Fact 2009;8:5. DOI: [10.1186/1475-2859-8-5](https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-5)

Tóth, G., Montanarella, L. and Rusco, E. (Eds.) Threats to Soil Quality in Europe
Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities 2008 – 151
ppEUR – Scientific and Technical Research series – ISSN 1018-5593 ISBN 978-92-79-
09529-0 DOI 10.2788/8647

Upendra, R S. (2013). Screening and Molecular Characterization of Natural Fungal
Isolates Producing Lovastatin. Journal of Microbial & Biochemical Technology. 05. DOI:
10.4172/1948-5948.1000094.

H. Vaseem, V.K. Singh, M.P. Singh (2017) Heavy metal pollution due to coal washery
effluent and its decontamination using a macrofungus, *Pleurotus ostreatus*
Ecotoxicol. Environ. Saf., 145 (2017), pp. 42-49, DOI: [10.1016/j.ecoenv.2017.07.001](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.001)

Vyas, B.R.M.; Bakowski, S.; Sasek, V.; Matucha, M.(1994) Degradation of anthracene by
selected white rot fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 1994, 14, 65–70. [DOI:10.1111/j.1574-
6941.1994.tb00091.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1994.tb00091.x)

Xu, W., Lu, G., Dang, Z., Liao, C., Chen, Q., and Yi, X. (2013). Uptake and distribution of
Cd in sweet maize grown on contaminated soils: a field-scale study. Bioinorgan. Chem.
Appl. 2013:959764. doi: 10.1155/2013/959764

Yankov, B., Delibaltova, V., and Bojinov, M. (2000). Contents of Cu, Zn, Cd and Pb in the
vegetative organs of cotton cultivars from industrially polluted region. Rasteniiev”dni
Nauki 37, 525–531.

Wick, L. Y., Remer, R., Würz, B., Reichenbach, J., Braun, S., Schäfer, F., and Harms, H.
(2007). Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. Environ.
Sci. Technol. 41, 500–505. doi: 10.1021/es061407s

M. Wu, Y. Xu, W. Ding, Y. Li, H. Xu Mycoremediation of manganese and phenanthrene
by *Pleurotus eryngii* mycelium enhanced by Tween 80 and saponin
Appl. Microbiol. Biotechnol., 100(2016), pp. 7249-57 DOI: [10.1007/s00253-016-7551-3](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7551-3)

Zheljazkov, V. D., and Nielsen, N. E. (1996a). Effect of heavy metals on peppermint and
cornmint. Plant Soil 178, 59–66. doi: 10.1007/BF00011163

SITOGRAFIA

European Environmental Agency- Progress in management of contaminated sites -2014
([https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-
contaminated-sites-3/assessment](https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment)) Ultima consultazione: Dicembre 2020.

Layman’s Report, 2018: Bioremediation and Revegetation to restore the public use of
contaminated land
(<https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/giulia->

[storage/websites/lifebioest.com/blog/Layman-s-Report_final-FS_compressed.pdf](https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/giulia-storage/websites/lifebioest.com/blog/Layman-s-Report_final-FS_compressed.pdf))

Life BIOREST: Linee guida ambientali per il biorisanamento del suolo contaminato 2018 (https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/giulia-storage/websites/lifebioest.com/blog/Guida-Ambientale-Biorisanamento-28-08-20-ITA-Web_BR.pdf) Ultima consultazione: Dicembre 2020

Federal remediation technologies roundtable <https://frtr.gov/matrix/Composting/>

Ultima consultazione: Dicembre 2020

Federal remediation technologies roundtable <https://frtr.gov/matrix/Landfarming/>

Ultima consultazione: Dicembre 2020

