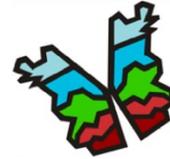




UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia



Comune di Pesaro



ARPAM
AGENZIA
REGIONALE
PER LA PROTEZIONE
AMBIENTALE
DELLE MARCHE



RISULTATI DEI MONITORAGGI OPERATIVI - 2022
a cura di DIBAF – Università degli Studi della Tuscia

Coordinamento Scientifico: Prof. Paolo De Angelis

Resp. sezione Microbiologia: Prof.ssa Silvia Crognale

Resp. sezione Vegetazione: Dr. Dario Liberati

Hanno collaborato:

- Dott. Davide Lelli
- Dott.ssa Cristina Russo

INDICE

Il monitoraggio operativo dei sistemi di bonifica	3
Premessa	3
1. Monitoraggio della comunità microbica del suolo	3
a) Vitalità microbica	3
Analisi del prodotto fornito per l'inoculo dei terreni	3
Analisi dei terreni inoculati	4
b) Attività microbica	6
c) Struttura della comunità batterica	8
2. Monitoraggio dei sistemi vegetali	9
a) Attecchimento e stato di vitalità	9
Sezioni irrigua A (Frassino minore)	11
Sezioni irrigua B (ex rampa)	12
Sezioni irrigua C (parte alta del sito – sub. A)	13
Sezioni irrigua D (parte alta del sito – area di scavo B)	14
Sezioni irrigua F (piante sporadiche e perimetrali - sez. B del sito)	15
Sezioni irrigua G (bambù - perimetro sud del sito)	16
Sezioni irrigua H (muro verde e filari pioppo - ovest del sito)	17
Fitolago – specie palustri (canale centrale e piante di bordo)	18
b) sviluppo e funzionalità degli organi epigei	19
Altezza delle piante	19
Morfologia fogliare	20
Capacità fotosintetica	22
Efficienza fotosintetica	23
Conduttanza stomatica	24
Contenuto di azoto fogliare	24
c) sviluppo e funzionalità radicale	25
Area piantata con Frassino minore	26
Area ex-rampa piantata con Vetiver e Mix di arbusti	27
Area alta (via Morosini) piantata con Pioppo nero, Tamerici, Frassino maggiore	28
d) monitoraggio chimico fogliare	30

IL MONITORAGGIO OPERATIVO DEI SISTEMI DI BONIFICA

PREMESSA

Al fine di monitorare l'evolversi dei sistemi messi in opera per la bio- e fito-bonifica dei suoli, della falda e per il trattamento delle acque, nel corso del tempo sono stati effettuati dei controlli sullo stato della comunità microbica e della vegetazione in accordo al piano approvato, in esecuzione.

1. MONITORAGGIO DELLA COMUNITÀ MICROBICA DEL SUOLO

Finalità di questa attività è quella di valutare nel tempo lo sviluppo della comunità microbica e la sua capacità degradativa per i composti target, in risposta all'intervento di *bioaugmentation* e di *phytoremediation*. Le determinazioni condotte e i risultati ottenuti sono riportati nelle sezioni seguenti.

A) VITALITÀ MICROBICA

La vitalità microbica è stata determinata mediante conte colturali su terreni agarizzati non selettivi. A tal fine sono stati quindi prodotti degli elutriati dal suolo campionato (5 g) di cui è stato successivamente determinato il carico microbico mediante coltivazione. Attività propedeutica alla valutazione sul suolo è stata quella effettuata sul prodotto utilizzato per l'inoculo.

Analisi del prodotto fornito per l'inoculo dei terreni

L'azienda ha prodotto l'inoculo coltivando separatamente i tre ceppi batterici di cui è composto; le tre sospensioni batteriche così ottenute sono state mescolate prima della distribuzione in campo, aggiungendo un volume di acqua di falda tale da ottenere la carica finale desiderata.

Il campionamento è stato effettuato sia prima della miscelazione delle 3 sospensioni (INS_A_B1, INS_M_B3 e SAT_M_B5) sia dopo la miscelazione e la diluizione (CB3), prelevando anche campioni di acqua di falda utilizzata in fase di miscelazione, per determinare la carica microbica aggiuntiva. Aliquote di ciascun campione così ottenuto sono state diluite e successivamente seminate superficialmente su piastre Petri contenenti *Plate Count Agar* (PCA, Difco). Le colonie sono state contate dopo 24 h di incubazione a 28 °C e i risultati sono stati espressi in CFU per ml (Tab. 1.1). Le operazioni appena descritte sono state ripetute per tre volte, poiché il suolo è stato inoculato in tre momenti differenti e di conseguenza l'azienda ha provveduto alla produzione di tre *batch*.

Tabella 1.1 - Titolazione delle sospensioni batteriche e dell'acqua di falda

CAMPIONI	Batch 1 CFU/ml	Batch 2 CFU/ml	Batch 3 CFU/ml
INS_A_B1	$4.25 \pm 0.63 \times 10^9$	$4.20 \pm 0.99 \times 10^9$	$3.10 \pm 0.42 \times 10^9$
INS_M_B3	$7.30 \pm 1.27 \times 10^9$	$6.75 \pm 1.20 \times 10^9$	$5.65 \pm 0.07 \times 10^9$
SAT_M_B5	$4.15 \pm 0.21 \times 10^9$	$1.83 \pm 0.38 \times 10^{10}$	$1.16 \pm 0.20 \times 10^{10}$
CB3	$3.10 \pm 0.31 \times 10^7$	$4.69 \pm 1.00 \times 10^8$	$5.55 \pm 0.63 \times 10^8$
H ₂ O DI FALDA	$2.55 \pm 0.07 \times 10^2$		

I risultati mostrano come il carico delle sospensioni batteriche utilizzate per la formulazione dell'inoculo avessero il carico prefissato e opportuno per essere inoculato nel terreno e che non ci fossero differenze significative fra i diversi batch di produzione.

Al fine di validare la vitalità dell'inoculo sono state eseguite delle prove nel tempo sia su acqua sterile che su acqua di falda.

Aliquote di ciascuna delle tre sospensioni batteriche sono state diluite in un volume noto di acqua di falda (HF) e incubate a temperatura ambiente per tempi diversi. Una procedura simile è stata eseguita con acqua deionizzata sterile (HS) come controllo. Dopo l'incubazione, diluizioni seriali sono state piastrate su *Plate Count Agar* (PCA, Difco) e incubate a 28 °C; le colonie sono state contate dopo 24 h e i risultati sono stati espressi come CFU/ml (Tab. 1.2).

Tabella 1.2 - Carico microbico a diversi tempi di incubazione in acqua di falda o in acqua sterile

CAMPIONI	CFU/ml GIORNO 1	CFU/ml GIORNO 6	CFU/ml GIORNO 11	CFU/ml GIORNO 30
INS_A_B1+HS	3.94±0.39x10 ⁹	3.38±0.33x10 ⁹	1.67±0.16x10 ⁹	2.85±0.21x10 ⁸
INS_A_B1+HF	3.01±0.30x10 ⁹	2.17±0.21x10 ⁹	3.36±0.36x10 ⁹	9.60±0.96x10 ⁷
INS_M_B3+HS	3.78±0.37x10 ⁹	3.52±0.35x10 ⁹	4.66±0.46x10 ⁹	9.80±0.98x10 ⁸
INS_M_B3+HF	4.51±0.45x10 ⁹	2.99±0.29x10 ⁹	2.68±0.26x10 ⁹	6.00±0.60x10 ⁸
SAT_M_B5+HS	1.55±0.15x10 ⁹	2.60±0.70x10 ¹⁰	1.95±0.07x10 ⁸	8.70±0.87x10 ⁸
SAT_M_B5+HF	2.93±0.29x10 ⁹	3.50±0.42x10 ⁹	2.85±1.06x10 ⁹	1.22±0.12x10 ¹⁰

Analisi dei terreni inoculati

Nei giorni 29/03/2022 (T0) e 15/09/2022 (T6) sono stati prelevati i campioni di suolo inoculati attraverso il carotaggio delle trincee dell'area A (A4-A10 senza piante e A5-A9 con piante) ad una profondità tale che vedesse campionata la zona compresa fra i due strati di cocco (Figura 1) Come riferimento lungo le trincee sono state utilizzate le posizioni delle piante di frassino: due punti tra le piante in posizione 2^a e 3^a e due punti tra le piante in posizione 5^a e 6^a. Gli stessi riferimenti sono stati traslati anche per il campionamento nelle trincee adiacenti senza piante.



Figura 1.1 - Attività di campionamento post inoculo

Nella figura 2 (a, b) vengono riportati i risultati del carico microbico, batterico e fungino nelle diverse trincee subito dopo l'inoculo (T0) e dopo 6 mesi (T6).

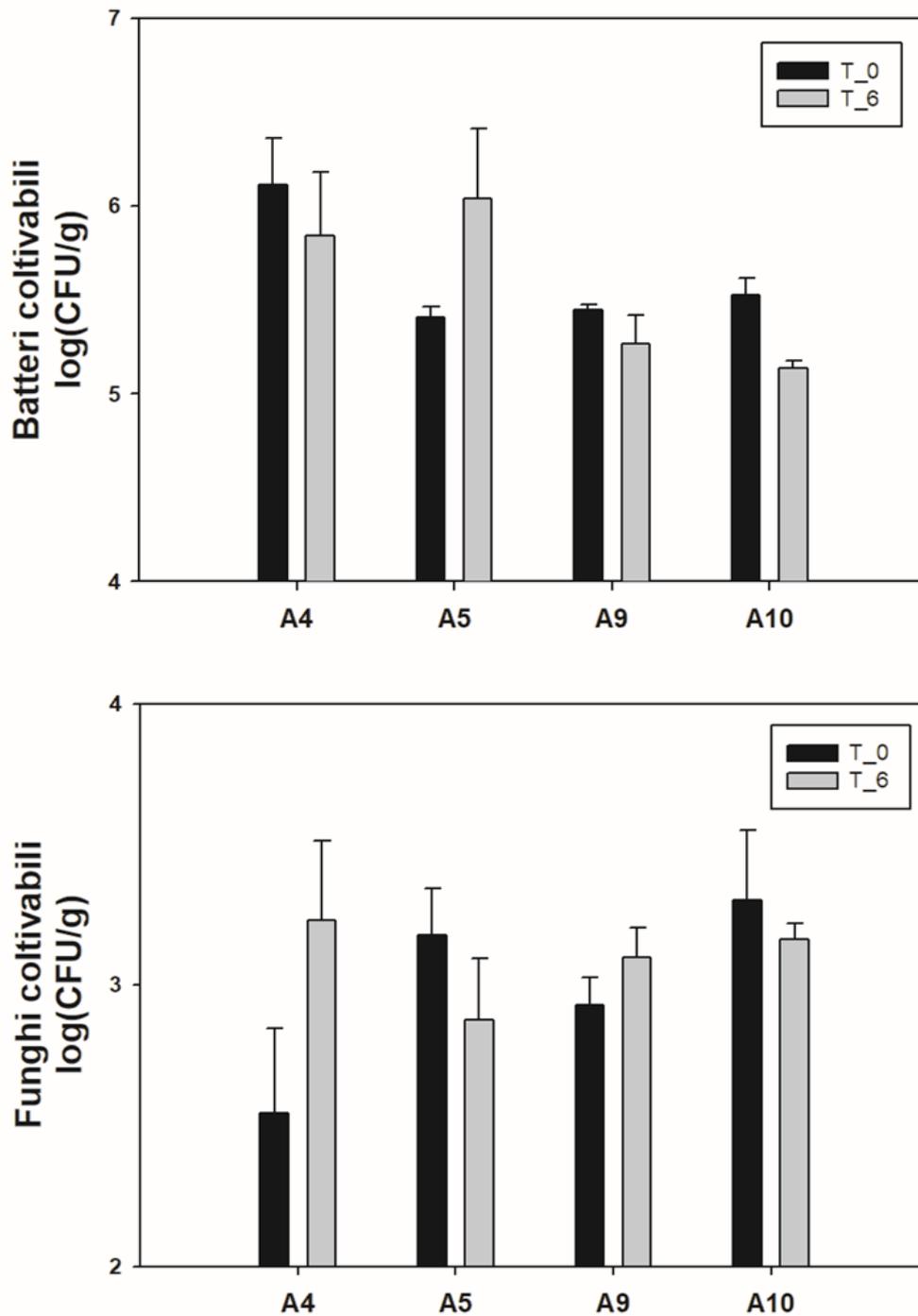


Figura 1.2 - Carico microbico di batteri coltivabili (alto) e funghi coltivabili (basso)

Poiché l'inoculo veniva fornito per avere una carica delle specie selezionate di 10^6 , ma anche la carica batterica iniziale (vedi relazione caratterizzazione) era nell'ordine di 10^6 non era attesa una variazione di ordine di grandezza della densità microbica a seguito delle procedure di inoculo.

Mediamente non si osserva un incremento/decremento significativo del carico microbico nel corso dei primi 6 mesi di monitoraggio. Questa stabilità dimostra il permanere di una condizione

adeguata per la vitalità della comunità microbica, probabilmente anche grazie al mantenimento di condizioni idriche favorevoli durante il periodo estivo. Considerazioni sulle interazioni con le piante, potranno essere fatti nel corso dei successivi monitoraggi: come atteso non ci sono differenze significative fra le due tipologie di trincee (A4-A10 vs A5-A9).

B) ATTIVITÀ MICROBICA

L'attività degradativa è stata determinata mediante un saggio di enumerazione "Most probable number - MPN" di batteri degradatori di idrocarburi alifatici in grado di crescere su dodecano e/ o su una miscela di aromatici (IPA). Diversamente, la capacità metabolica e biodiversità funzionale è stata determinata con la metodologia CLPP (*Community Level Physiological Profile*) utilizzando piastre multipozzetto BIOLOG® (Figura 1.3). Le analisi sono state condotte sugli stessi elutriati prodotti per determinare la vitalità microbica (vedi paragrafo precedente). Entrambi prevedono l'incubazione dell'intera comunità' microbica e non dei singoli isolati su substrati carboniosi in presenza di un agente redox e sono pertanto metodi che prescindono dalla coltivazione.

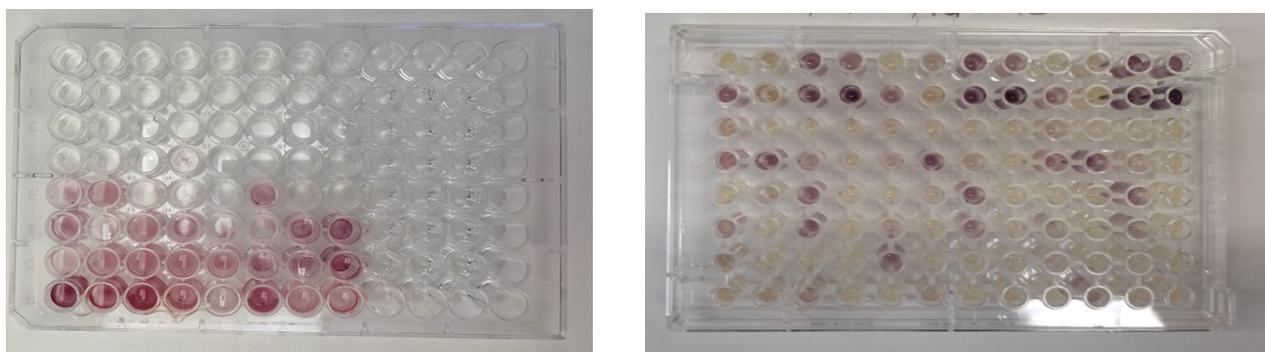


Figura 1.3 - a sinistra piastra tipo per la rivelazione del MPN su dodecano; a destra piastra tipo Biolog per determinazione del CLPP.

I risultati sono riportati nella tabella seguente (Tab 1.3), confrontando i valori medi per la coppia di trincee adiacenti, al T0 pre-inoculo, al T0 post-inoculo e dopo sei mesi (T6).

Tabella 1.3 - Batteri specializzati determinati come "Most Probable Number"

		CFU/g		
Trincee A4-A5	CAMPIONI	DODECANO	IPA	
	T0 (non inoculato)	370	400	
	T0 (inoculato)	880	2'136	
	T6	28'725	21'364	
<hr/>				
Trincee A9-A10	CAMPIONI	DODECANO	IPA	
	T0 (non inoculato)	370	400	
	T0 (inoculato)	3'108	2'136	
	T6	5'208	7'086	

I risultati ottenuti mostrano che la frazione di microrganismi attivi nella degradazione del dodecano e degli IPA (idrocarburi policiclici aromatici) è significativamente aumentata subito dopo l'inoculo e ancora di più dopo 6 mesi. È però presente una significativa variabilità spaziale di tali incrementi, se si confrontano le trincee A4 e A5 e quelle A9 A10. In generale, l'inoculo sembra aver favorito (come atteso) lo sviluppo di microrganismi attivi nella degradazione degli idrocarburi, in particolare nelle aree potenzialmente più contaminate (vedi caratterizzazione).

In linea con i risultati precedenti, gli indici di diversità della popolazione microbica, ottenuti con BIOLOG ® EcoPlate (Tabella 1.4), evidenziano una maggiore specializzazione (riduzione degli indici di *Richness* e *Evenness*) della comunità, sia rispetto a quanto già osservato nella caratterizzazione del sito prima dell'inoculo ($R = 19$, $H = 2.8$, $AWCD = 1.44$) sia confrontando i risultati a T0 e a T6.

Tabella 1.4 Indici di diversità funzionale determinati mediante analisi BIOLOG

Indici	Trincee A4/A5	Trincee A9/A10
Richness T0	18	16
Richness T6	17	13
Shannon T0	2.4	2.2
Shannon T6	1.9	1.3
Evenness T0	0.8	0.8
Evenness T6	0.7	0.5
AWCD T0	1.48	2.02
AWCD T6	1.87	1.50

Per valutare ulteriormente la vitalità microbica della comunità presente nei terreni inoculati, è stata analizzata l'attività deidrogenasica (DH) e della fluoresceina diacetato idrolasi (FDH), rispettivamente indicative della capacità ossidativa e di quella idrolasica.

I risultati sono presentati nella figura 1.4, in cui è evidente un significativo incremento di entrambe le attività fra T0 e T6. Si deve inoltre osservare che tali attività erano risultate pressoché nulle prima dell'immissione del consorzio batterico.

L'incremento fra T0 e T6 è spiegabile con il contemporaneo incremento stagionale delle temperature e con il contestuale mantenimento di condizioni idriche adeguate, grazie all'irrigazione. Diversamente, i valori a T0 significativamente superiori alle condizioni pre-intervento sono da collegarsi all'inoculo e almeno in parte alla movimentazione dei terreni, che ne ha favorito l'areazione.

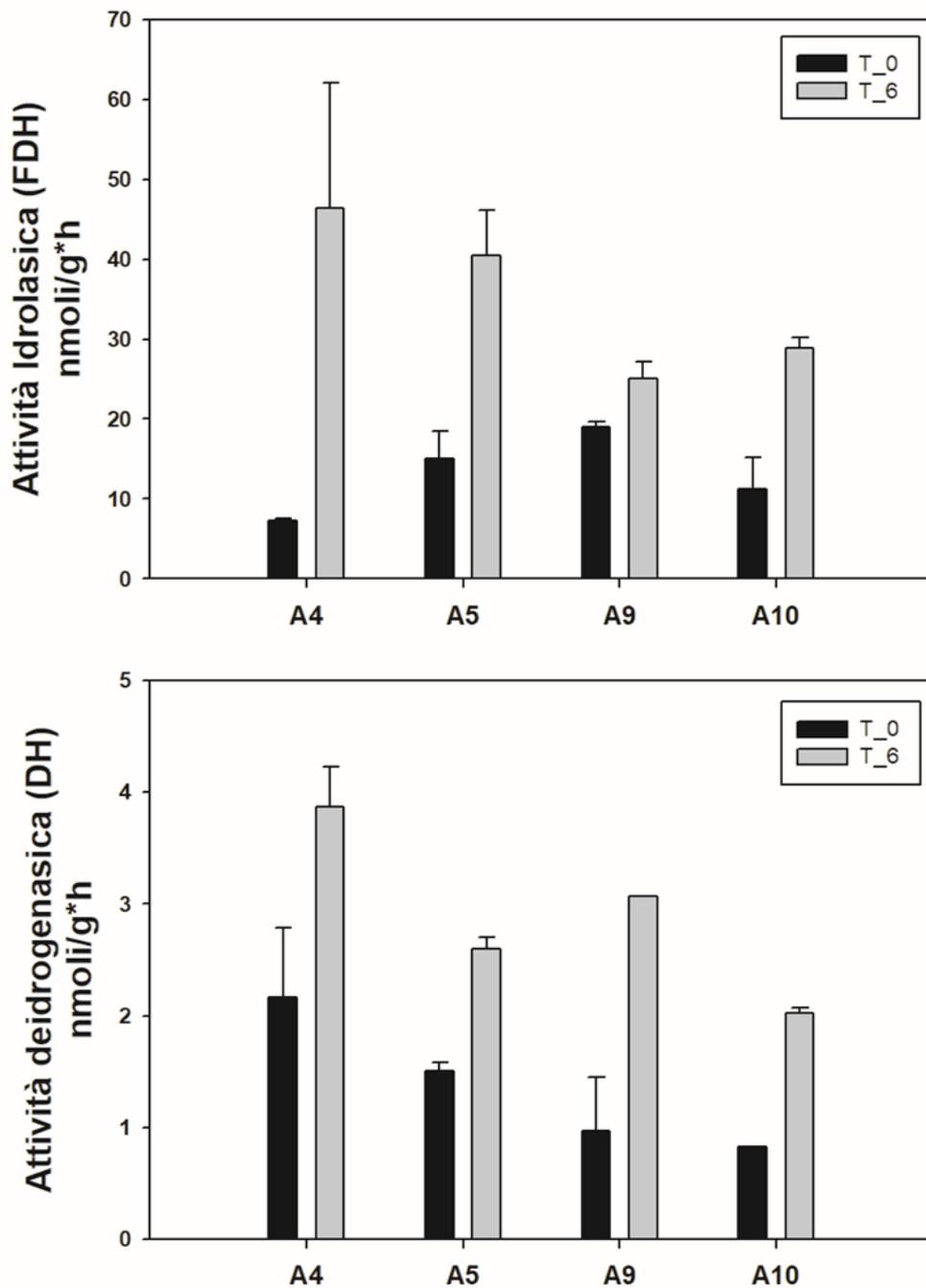


Figura 1.4 - attività enzimatiche nei terreni inoculati, al tempo zero e dopo 6 mesi

c) STRUTTURA DELLA COMUNITÀ BATTERICA

Al fine di minimizzare la variabilità analitica, le indagini molecolari di quantificazione microbica per qPCR e metagenomiche mediante NGS verranno effettuate dopo aver processato anche il campione dopo 12 mesi (T12). Al momento i campioni raccolti, T0 e T6, sono stati processati e il DNA estratto e quantificato per le successive analisi.

2. MONITORAGGIO DEI SISTEMI VEGETALI

Finalità di questa attività è quella di controllare nel tempo lo sviluppo dei diversi sistemi vegetali posti in opera e di valutarne il ruolo ambientale. Gli esiti delle determinazioni che sono state condotte nel corso del 2022 sono riportati nelle sezioni seguenti.

A) ATTECCIMENTO E STATO DI VITALITÀ

Nel corso della stagione di crescita e al termine della stessa, sono stati effettuati tre censimenti dello stato di vitalità delle piante messe in opera, secondo una classificazione a tre scale: Vigorese, Stentate, Morte. Nella classe "Stentate" sono state considerate piante con fogliame clorotico (ingiallimenti) e/o con parziali disseccamenti e/o parzialmente danneggiate. Quando presenti, sono stati annotati danni causati da insetti e altri organismi patogeni. Nella tabella di seguito sono riportati gli esiti dei censimenti, con la classificazione dei soggetti nelle tre categorie.

Tabella riassuntiva dei tre censimenti 2022

sez. irrigua	Descrizione	Spp	ID Trincee	censimento impianti				monitoraggio stato vegetazione - 2022								
				N. piante da progetto esecutivo	N. piante in opera 13/07/2022	N. piante in opera 19/09/2022	N. piante in opera 08/11/2022	13/07/2022			19/09/2022			08/11/2022		
								V	S	M	V	S	M	V	S	M
A	Area Frassino minore	Frassino	A1	4	4	8	8	4			6	2		6	2	
		Frassino	A3	9	8	8	8	6	2		6	2		5	2	1
		Frassino	A5	10	9	9	9	8	1		7	2		7	1	1
		Frassino	A7	13	11	11	11	10	1		10	1		10		1
		Frassino	A9*	13	13	13	13	12	1		12	1		12		1
		Frassino	A11	13	13	13	13	13			12	1		12		1
		Totale		62	58	62	62	53	5	0	53	9	0	52	5	5
B	Area ex-rampa	Vetiver	B1	30	30	29	29	29			29			29		
		Vetiver	B2*	27	27	28	28	28			28			28		
		Vetiver	B3	27	29	29	29	29			29			29		
		Eleagno	B4*	8	8	8	8	n.a.			8			8		
		Fillirea	B4*	8	8	8	8	n.a.			8			8		
		Eleagno	B5*	8	8	8	8	n.a.			8			8		
		Fotinia	B5*	8	8	8	8	n.a.			7	1		7		1
		Totale		128	118	118	118	86	0	0	117	1	0	117	0	1
C	Area alta (Via Morosini): Tamerici + Frassino maggiore + Pioppo nero	Pioppo nero	C3	5	5	5	5	5			5			5		
		Tamerici	C5	18	18	18	18	18			18			18		
		Frassino maggiore	C7	1	1	1	1	1			1			1		1
		Pioppo bianco	-	1	1	1	1	1			1			1		
		Totale		25	25	25	25	25	0	0	25	0	0	24	1	0
D	Area Salici	Salice ripaiolo (<i>S. eleagnos</i>)		22	16	22	22	5	4	7	3	4	15	3	4	15
		Salice rosso (<i>S. purpurea</i>)		20	20	20	20	12	8		13	4	3	18	1	1
		Maonia		21	21	21	21	5	8	8	5	3	13	6		15
		Pioppo bianco		1	1	1	1					1		1		
		Totale		64	58	64	64	22	21	15	21	12	31	28	5	31
F	Perimetri e Area B: Arbusti + Alloro + Piante isolate	Maonia		8	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Forsizia		7	12	13	13		12		12		1		9	4
		Pioppo bianco		1	1	1	1	1				1		1		1
		Frassino maggiore		1	1	1	1	1				1				1
		Farnia fastigiata		3	3	3	3	3				3		2	1	
		Salice piangente		1	1	1	1	1				1		1		
		Erba della pampa		6	no	6	6	n.a.			6			6		
		Buddleja		6	no	6	6	n.a.			4	1	1	3	2	1
		Alloro		23	19	19	22	19			22			22		
		Totale		56	37	50	53	25	12	0	48	3	2	35	12	6
G	Bambù	Phyllostachys bambusoides		13	13	13	13				13			13		
		Phyllostachys aureosulcata		13	13	13	13	26			13			13		
		Totale		26	26	26	26	26	0	0	26	0	0	26	0	0
H	Muro verde	Mirto		36	27	26	26	26			25	1		26		
		Rosmarino		24	15	16	16	16			16			15	1	
		Cotonastro		12	12	12	12	12			11		1	11	1	
		Lavanda		48	46	46	46	46			46			46		
		Elicriso		36	33	33	34	34			33		1	33		1
		Totale		156	133	133	134	134	0	0	131	1	2	131	0	3
	Filari di Pioppo nero	Fila est		15	25	25	25	25			24	1		25		
		Fila ovest		21	20	20	20	20			20			20		
		Totale		36	45	45	45	45	0	0	44	1	0	45	0	0
	Gabbionata Morosini	Vite del Canada				20	20				20			16	1	3
Totale piante in opera nei terreni (incluse rampicanti gabbionate)				553	500	543	547	416	38	15	485	27	35	474	24	49

Al censimento di luglio il numero totale di piante messe in opera non era ancora quello definitivo, raggiunto nei successivi censimenti di settembre e novembre.

Inoltre, in alcuni casi la numerosità delle piante messe in opera in via definitiva (novembre) si discosta leggermente da quanto previsto dal progetto, come conseguenza di alcune variazioni effettuate in fase esecutiva (es. muro verde, trincea B6) o di errori di fornitura (es. Maonia sez. F). Con la fornitura di rimpiazzo delle fallanze tali discordanze potranno essere risolte, ove possibile.

Le specie palustri del fitolago sono state censite solo a fine stagione, a causa della messa in opera tardiva. Quelle acquatiche saranno poste in opera nella primavera 2023.

Mentre per le specie censite come “stentate” è possibile un recupero, magari parziale, alla ripresa primaverile, per quelle censite come “morte” si dovrà provvedere con certezza con il reimpianto.

Di seguito i rimpiazzati delle fallanze risultanti dal censimento autunnale (49 unità). Al primo censimento primaverile sarà possibile aggiornare la tabella.

Tabella riassuntiva delle piante “morte” a novembre 2022

Frassino minore	5	Fotinia	1
Salice ripaiolo	15	Forsizia	4
Maonia	15	Buddleja	1
Salice rosso	1	Rosmarino	1
Frassino maggiore	1	Elicriso	1
Vite del Canada	3	Cotonastro	1

Di seguito una descrizione dettagliata dei tassi di attecchimento e di vitalità delle piante in opera, determinati al termine della prima stagione di crescita (novembre 2022).

Sezioni irrigua A (Frassino minore)

In questa sezione ricadono le trincee poste a valle dell'area dove erano collocate le vasche rimosse. Il sistema vegetale è quello a Frassino minore.

Il tasso di piante pienamente attecchite e "vigorose" è sempre superiore al 60%, con valori del 90% nelle trincee A7-A11 più prossime alla sezione B del sito, dove non erano emerse contaminazioni significative. La mortalità è limitata ad un totale di 5 piante sulle 62 poste in opera (4 sono state aggiunte fuori trincea). Analogamente ci sono 5 piante che presentano un minore sviluppo e una parziale clorosi fogliare, che dovranno essere valutate alla ripresa primaverile.

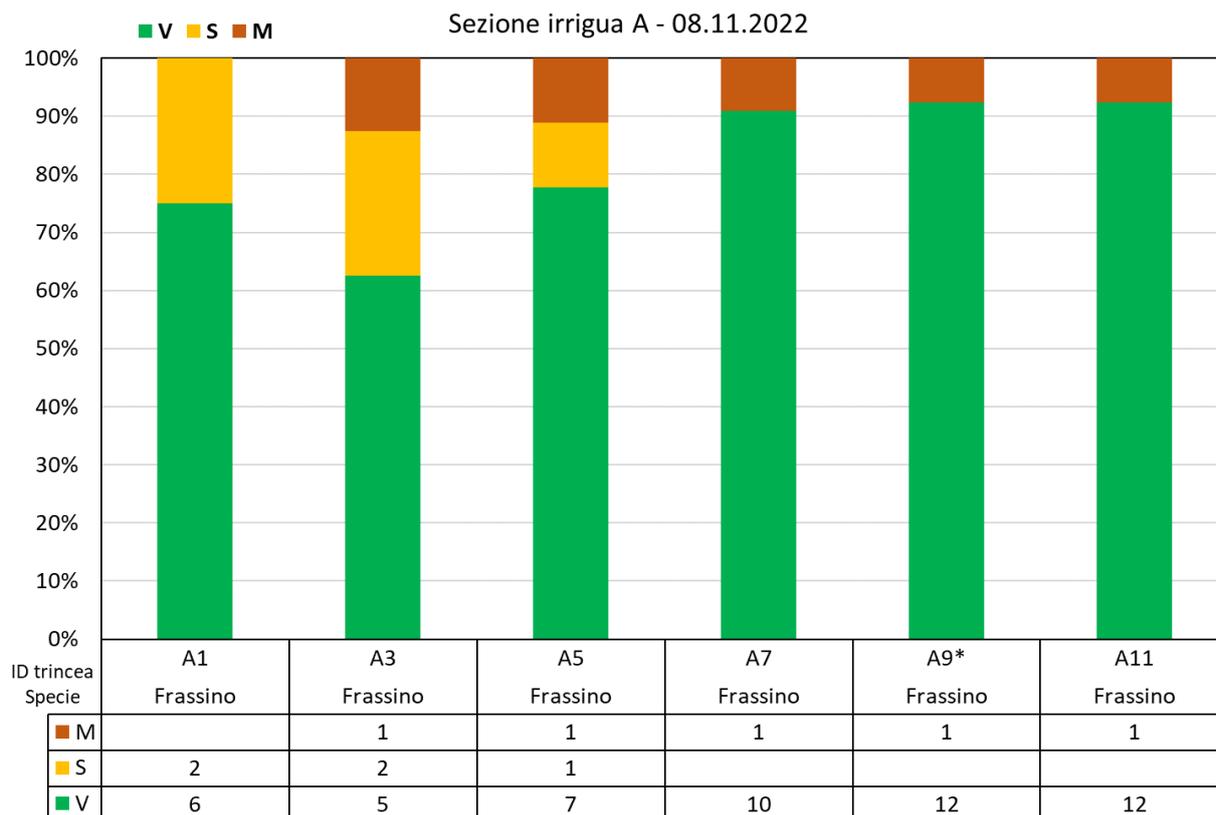


Foto dell'area A: apertura delle gemme ad aprile (sin), pieno sviluppo fogliare a maggio (centrale), vista dell'area ad ottobre (des).

Sezioni irrigua B (ex rampa)

In questa sezione ricadono le trincee nell'area ex rampa, con i sistemi vegetali di specie erbacee perenni (Vetiver) e arbusti sempreverdi (Eleagno, Fillirea, Fotinia).

Ad esclusione di una pianta morta di Fotinia, tutte le altre sono risultate pienamente attecchite e "vigorose".

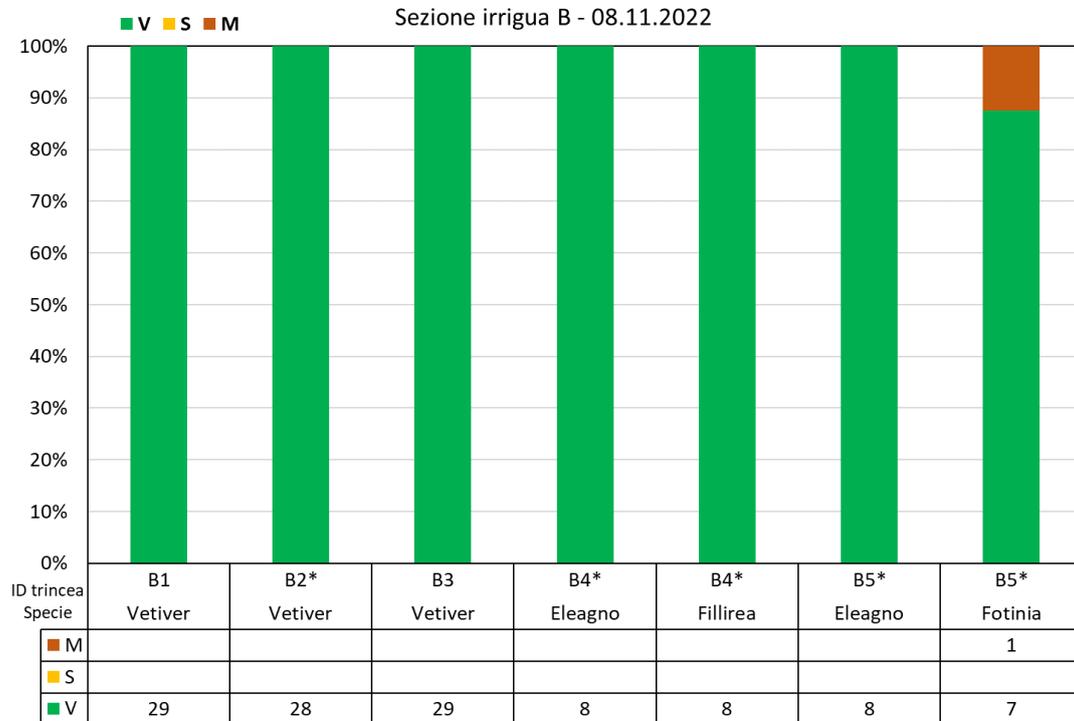


Foto dell'area B: Vetiver, Eleagno, Fillirea, Fotinia ad agosto 2022 (immagini superiori), vista panoramica dell'area B a ottobre 2022 (immagine inferiore).

Sezioni irrigua C (parte alta del sito - sub. A)

In questa sezione sono ricomprese le trincee della parte alta del sito, lato ovest e parallele alla via Morosini, in cui è presente un sistema lineare con Pioppo nero (parallelo alla rampa di acceso) e uno con Tamerici (parallelo alla via Morosini), una pianta isolata di Frassino maggiore e una di Pioppo bianco.

Ad esclusione di una pianta stentata di Frassino maggiore, il cui stato dovrà essere verificato alla ripresa vegetativa primaverile, tutte le altre sono risultate pienamente attecchite e "vigorose".

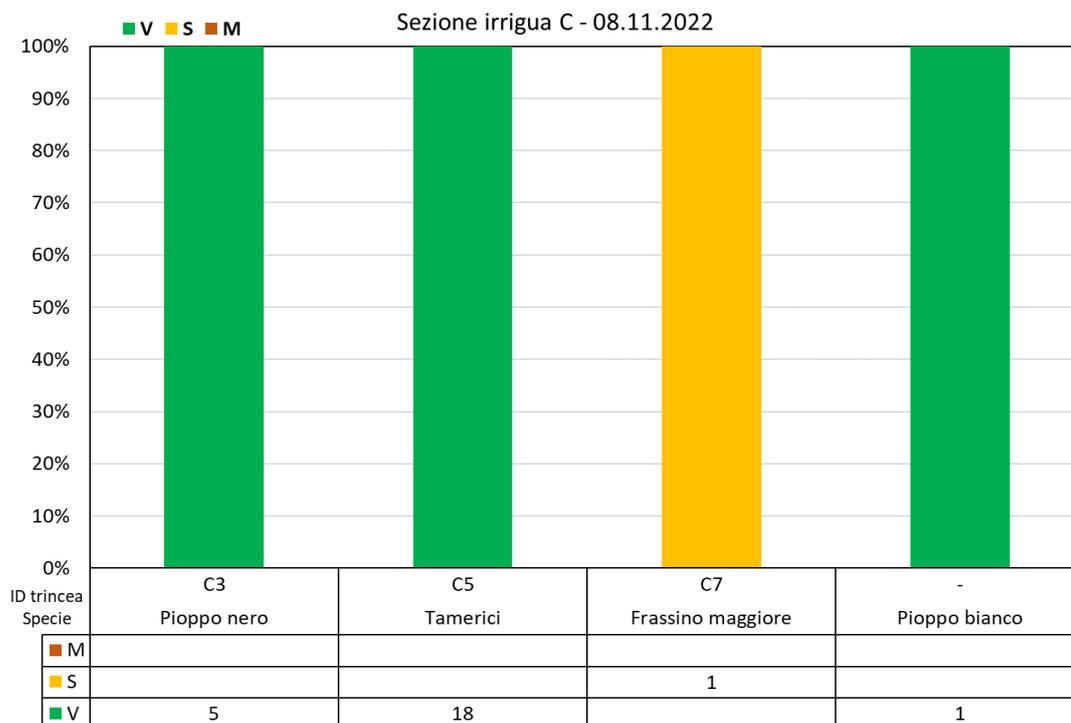


Foto dell'area C: filare di Pioppo nero (sin) e di Tamerici (des) a novembre 2022. Sono visibili le piante isolate di Pioppo bianco (sin) e di Frassino maggiore (des).

Sezioni irrigua D (parte alta del sito - area di scavo B)

In questa sezione è ricompresa l'area di ricircolo dell'acqua di falda (filtrata) con Salici, la piccola area di raccordo con Maonie e una pianta isolata di Pioppo bianco.

Ad esclusione del Salice rosso, che ha mostrato un buon attecchimento (90% vigorose), sia il Salice ripaiolo che la Maonia hanno mostrato valori elevati di mortalità (70% per entrambe le specie). Nel Salice ripaiolo un ulteriore 20% di piante si presentavano stentate. Per queste specie la ridotta dimensione delle piante poste in opera e il substrato difficile (ghiaia grossolana), hanno sicuramente giocato un ruolo sfavorevole. Diversamente la pianta di Pioppo bianco, di più grandi dimensioni (altezza superiore ai 2 metri) e posta in opera sul materiale di riporto originale, ha mostrato un pieno attecchimento.

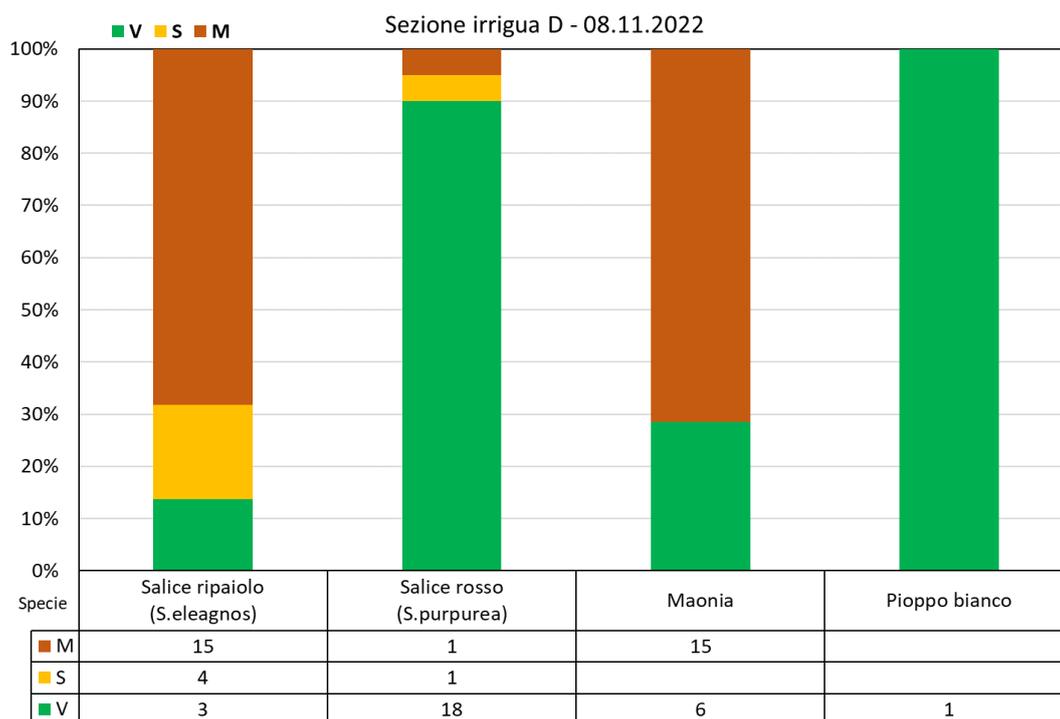


Foto dell'area D: vista panoramica dell'area D (1° da sin), S. ripaiolo, S. purpurea, Maonia (in ordine 2°, 3° e 4° da sin), a novembre 2022 (Maonia - maggio 2022).

Sezioni irrigua F (piante sporadiche e perimetrali - sez. B del sito)

In questa sezione sono presenti due sistemi lineari perimetrali (Forsizia e Alloro) e piante arboree ed erbacee disposte a gruppi o isolate nella parte bassa del sito (B). L'impianto tardivo della Forsizia ne ha sicuramente condizionato l'attecchimento, risultato molto scarso e con un 30% di mortalità (possibile parziale recupero con la ripresa primaverile). Da notare la mancata messa in opera della Maonia, sostituita dalla Forsizia. All'opposto le piante di Alloro hanno mostrato un pieno attecchimento, grazie anche alla rusticità della specie. Fra i due gruppi di erbacee si evidenzia un pieno attecchimento per l'Erba della pampa e un modesto successo per la Buddleja. Anche in questo caso la posizione in un'area di servizio al cantiere, ne ha ritardato la messa in opera con effetti sull'attecchimento. Fra le arboree isolate, si registra la morte di un Frassino maggiore e una pianta stentata di Farnia, mentre sono pienamente attecchiti il Pioppo bianco e il Salice piangente. Nel caso del Frassino maggiore e delle Farnia, ci sono stati interferenze del cantiere con l'irrigazione ad anello superficiale, che hanno provocato alcune interruzioni dell'irrigazione nel periodo caldo e secco, estivo.

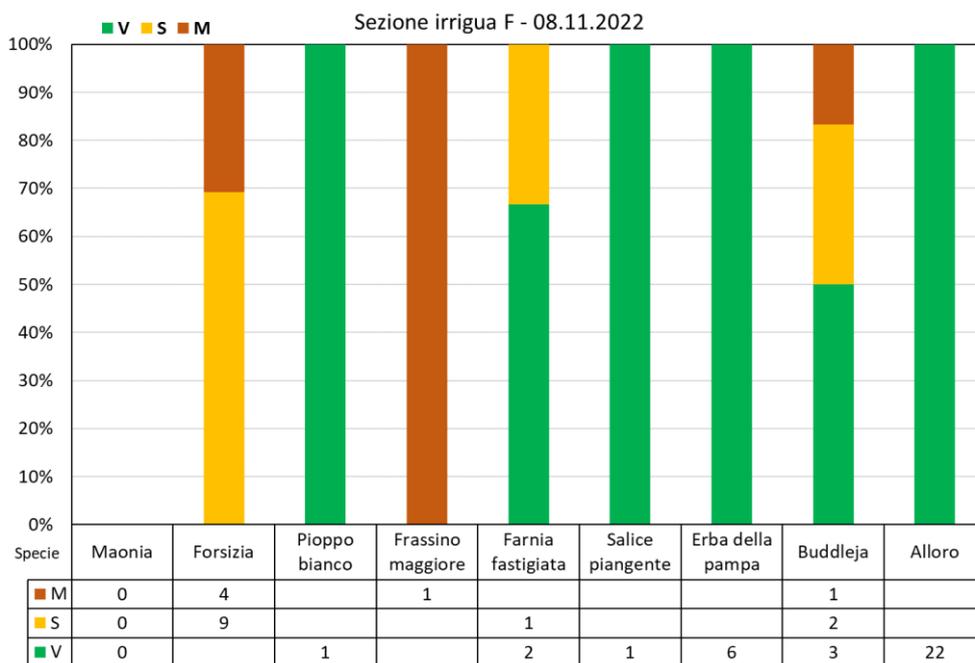


Foto della sezione F: Erba della pampa (1° da sin - alto), Buddleja (1° da sin - basso), Alloro e Pioppo bianco isolato (2° da sin - alto), Farnie (2° da sin - basso), Frassino (3° da sin) e Salice (4° da sin), a novembre 2022.

Sezioni irrigua G (bambù - perimetro sud del sito)

In questa sezione sono presenti due sistemi lineari di bambù. L'attecchimento è risultato pieno, con il 100% delle piante risultate vigorose all'ultima data del censimento (inizio novembre 2022).

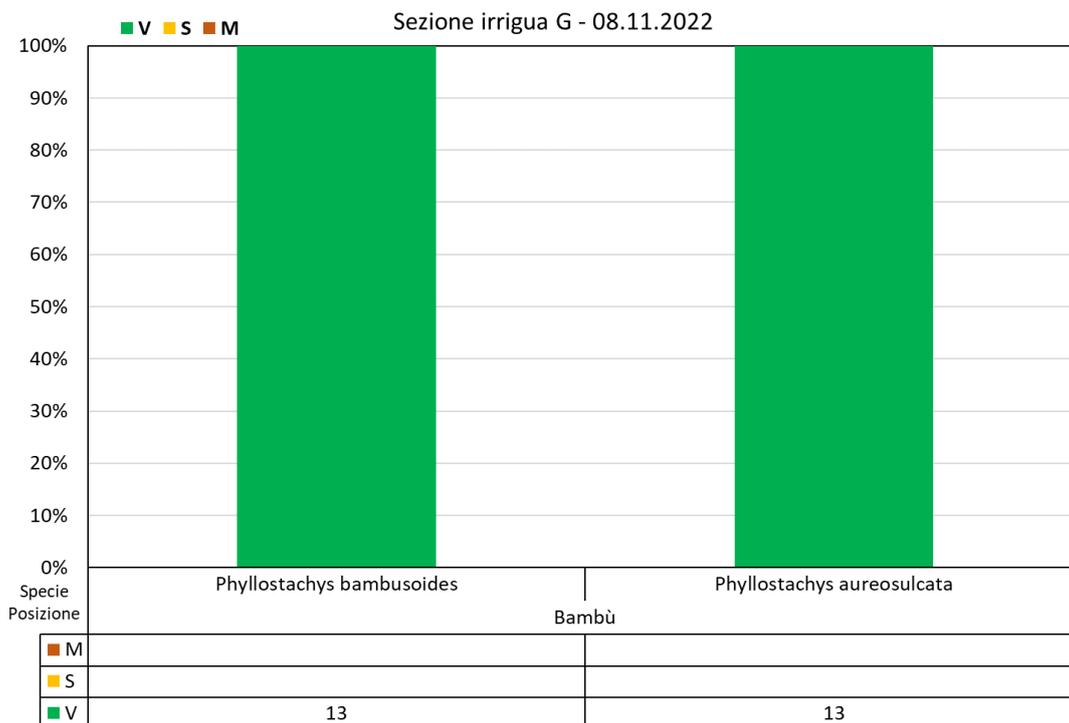


Foto della sezione G: piantina di bambù a luglio, al momento della posa in opera (1° da sin), l'area di impianto a luglio (2° da sin) e a novembre 2022 (3° da sin).

Sezioni irrigua H (muro verde e filari pioppo - ovest del sito)

In questa sezione sono ricomprese le diverse specie arbustive messe in opera nel muro verde e il doppio filare di pioppo nero che collega, sul lato ovest, la parte alta (A) e bassa del sito (B).

L'attecchimento delle piante nel muro verde è sempre elevato, con una mortalità limitata ad una unità per: Rosmarino, Cotonastro, Elicriso. L'attecchimento dei Pioppi nei due filari è al 100%, con piante tutte vigorose al termine della prima stagione di crescita.

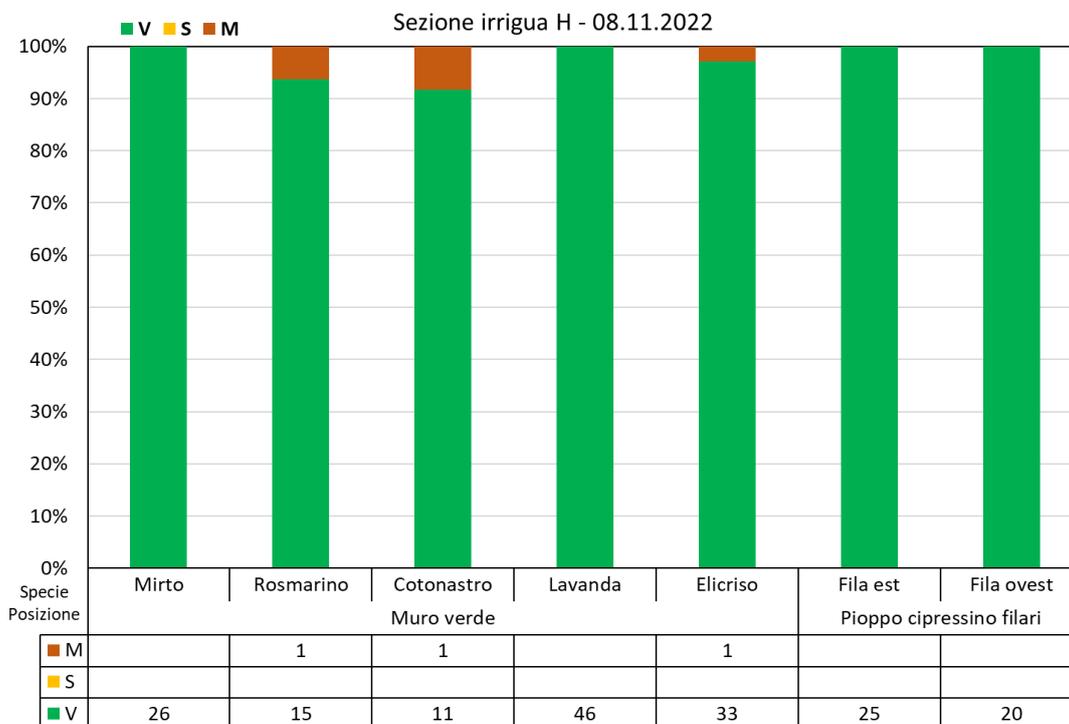


Foto della sezione H: foto delle diverse specie impiantate nel muro verde (in alto), e del doppio filare di Pioppi (in basso), a novembre 2022.

Fitolago – specie palustri (canale centrale e piante di bordo)

In questo gruppo sono ricomprese le diverse specie “palustri” messe in opera nel canale di fitodepurazione posto al centro del fitolago, e negli elementi di bordo posti lungo il perimetro.

Mentre per le piante del canale si osserva un attecchimento praticamente del 100%, per quelle di bordo una delle due specie si presentava a fine stagione con piante prevalentemente (65%) stentate. In considerazione della caratteristica formazione di rizomi, è possibile un parziale recupero con la nuova stagione primaverile. D'altra parte, si deve considerare che il forte ritardo nella messa in opera, il ridotto sviluppo delle piante fornite e i problemi riscontrati nella fase di messa a punto del livello del fitolago (che deve garantire la bagnatura degli elementi di bordo), ne hanno fortemente condizionato le possibilità di attecchimento e sviluppo.

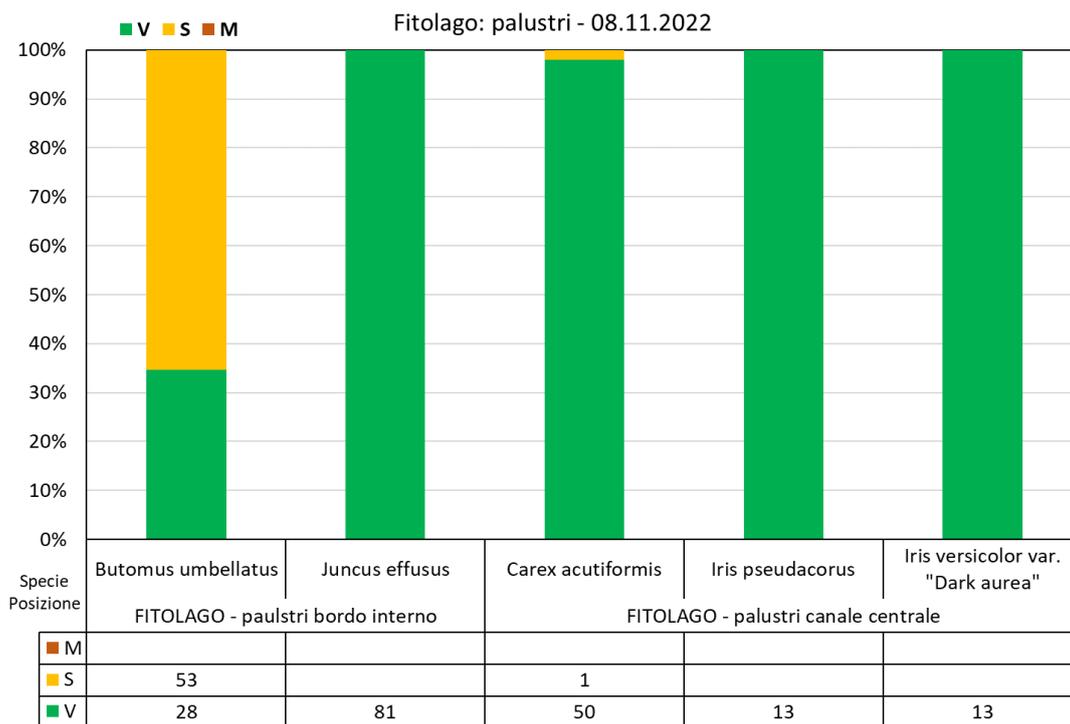


Foto del gruppo “palustri”: il canale centrale e gli elementi di bordo a ottobre 2022.

B) SVILUPPO E FUNZIONALITÀ DEGLI ORGANI EPIGEI

Al fine di ottenere un primo data-set delle condizioni delle piante messe in opera, diversi accertamenti previsti a partire dal II anno sono stati condotti anche nel corso e al termine della prima stagione di crescita (parzialmente) in-situ. I dati ottenuti con le misure dirette sono fortemente influenzati dalle condizioni delle piante fornite, ma sono in parte anche l'esito dell'interazione post-impianto con le condizioni ambientali del sito (in particolare per le specie erbacee) e rappresentano un valore di riferimento per i monitoraggi successivi. Di seguito sono riportati i risultati della stagione di crescita (estate) 2022.

Altezza delle piante

sez. irrigua	Descrizione	Spp	ID Trincee	H (m)
A	Area Frassino minore	Frassino	A1	1.5
		Frassino	A3	
		Frassino	A5	
		Frassino	A7	
		Frassino	A9*	
		Frassino	A11	
B	Area ex-rampa	Vetiver	B1	1.2
		Vetiver	B2*	
		Vetiver	B3	
		Eleagno	B4*	0.5
		Fillirea	B4*	0.7
		Eleagno	B5*	0.5
		Fotinia	B5*	0.6
C	Area alta (Via Morosini): Tamerici + Frassino maggiore + Pioppo nero	Pioppo nero	C3	5.0
		Tamerici	C5	2.5
		Frassino maggiore	C7	3.0
		Pioppo bianco	-	4.5
D	Area Salici	Salice ripaiolo (<i>S.eleagnos</i>)		0.2
		Salice rosso (<i>S.purpurea</i>)		0.7
		Maonia		0.2
		Pioppo bianco		4.0
F	Perimetri e Area B: Arbusti + Alloro + Piante isolate	Maonia		-
		Forsizia		0.5
		Pioppo bianco		4.5
		Frassino maggiore		-
		Farnia fastigiata		3.5
		Salice piangente		3.9
		Erba della pampa		1.0
		Buddleja		0.4
Alloro		1.0		
G	Bambù	Phyllostachys bambusoides		0.8
		Phyllostachys aureosulcata		
H	Filari di Pioppo nero	Fila est		5.0
		Fila ovest		

Tenuto conto dell'impianto tardivo, l'altezza delle piante rappresenta prevalentemente la condizione della fornitura (ad esclusione di Vetiver). Per tale motivo i valori sono stati mediati per specie senza un'analisi di dettaglio per singola trincea e/o gruppo monospecifico.

Per la determinazione della crescita in altezza del 2023, si farà riferimento ad una campagna di misure di dettaglio ad inizio stagione che sarà ripetuta al termine della stessa.

Morfologia fogliare

Le specie poste in opera in coincidenza con le trincee inoculate e oggetto di monitoraggio, presentano foglie con forme diverse: lineare (Vetiver), ellittica (Eleagno-Frassino minore), lanceolata (Fillirea), ovata (Fotinia), triangolare-romboidale (Pioppo nero), squamosa (tamerice), semplici e composte. Questa diversità nella forma della lamina determina chiome con differenti capacità di interagire con la radiazione solare (es. indice di area fogliare - LAI) e con l'atmosfera (es. interazione con inquinanti), con effetti sulla funzionalità di fitobonifica dei diversi sistemi vegetali.

Nella figura di seguito le immagini delle foglie raccolte per la determinazione dell'area fogliare (LA) e del rapporto massa/superficie (LMA).



Immagini delle foglie raccolte nel sito ad agosto 2022 - partendo da sinistra: Vetiver, Eleagno, Frassino minore, Fillirea, Fotinia, Pioppo nero, Tamerice (le dimensioni delle immagini sono uniformate in verticale, quindi non in scala con gli originali).

I valori medi di area fogliare (LA) variano dai circa 3 cm² della Tamerice (rametto), ai 48 cm² del Pioppo nero, fino ai 74 cm² del frassino minore (composta). Valori molto bassi di LA caratterizzano la Fillirea, diversamente per Vetiver la ridotta dimensione in larghezza è compensata dalla elevata lunghezza, determinando un valore di LA superiore a Eleagno e Fotinia (figura 1).

Il rapporto fra la superficie fogliare e la sua massa (LMA) è un tratto specifico determinate per l'efficienza di uso della radiazione, dei nutrienti e delle risorse idriche. È un carattere "plastico", capace cioè di modificarsi per ottimizzare la funzionalità fogliare all'interno della chioma (es. foglie esposte in piena luce della parte superiore e foglie in ombra della parte inferiore). È anche indicatore di una risposta alla limitazione idrica, determinante della normale espansione della lamina fogliare. Le specie monitorate si attestano mediamente intorno ai 100 g/m², ad eccezione di Fillirea, sclerofilla caratteristica di ambienti semi-aridi a macchia mediterranea, con circa 300 g/m² e Vetiver, erbacea sub-tropicale tollerante l'aridità grazie ad un elevato sviluppo radicale,

con circa 54 g/m². Nella figura di seguito (fig. 1) i valori di LA e LMA per le diverse specie, determinati sui campioni raccolti ad agosto 2022.

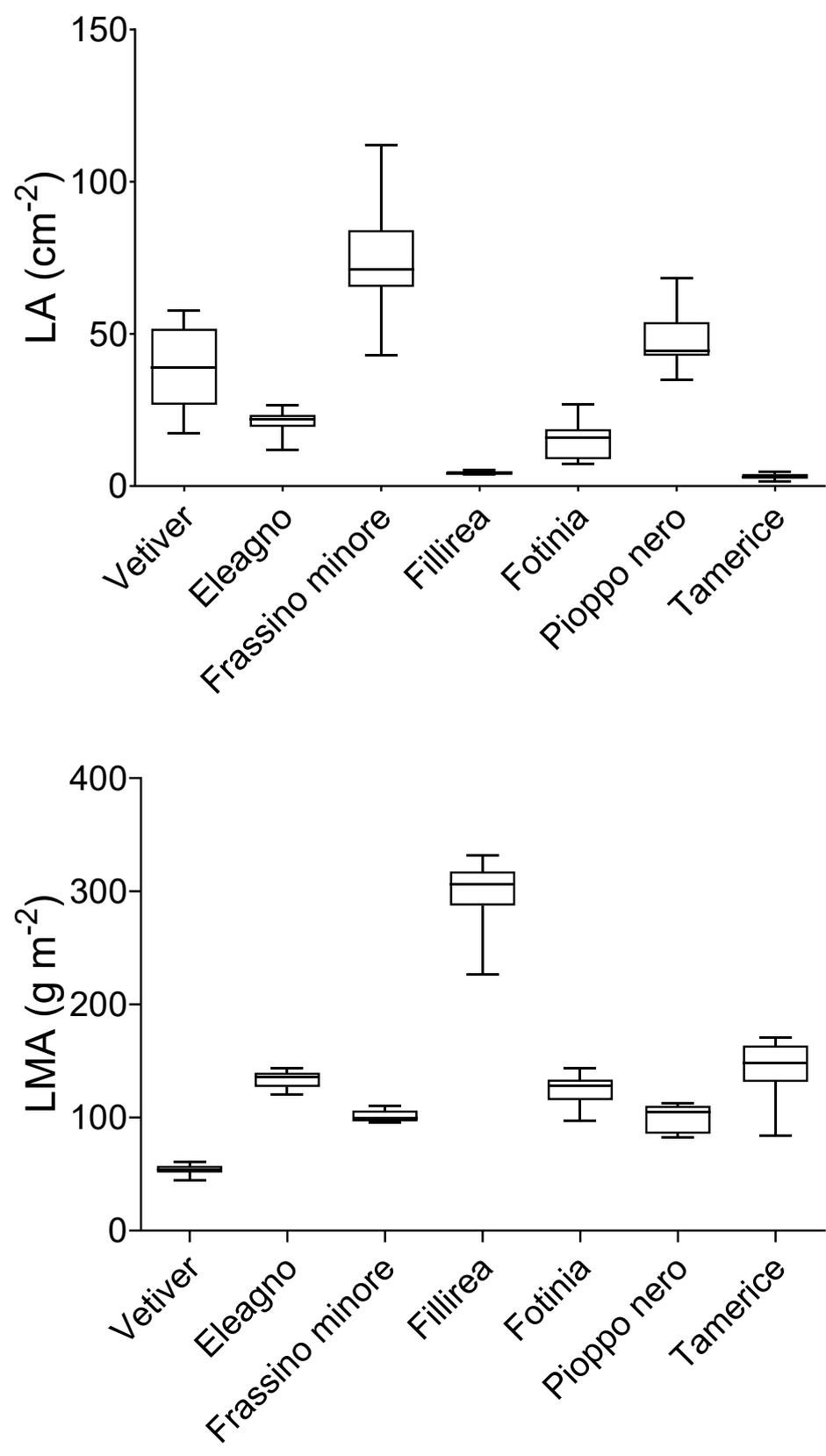


Figura 1 - Istogrammi di dispersione dei valori LA (sup) e LMA (inf), con barre che si estendono dal minimo al massimo osservato, misurati su materiale raccolto in-situ nell'agosto 2022.

Capacità fotosintetica

L'attività fotosintetica a saturazione di luce (Asat), misurata come flusso di CO₂ assorbita dalla foglia in condizioni di illuminazione non limitanti, è indicatrice dello stato di funzionalità metabolica complessiva fogliare e, in combinazione con la quantità di fogliame della pianta, è il determinante della produttività primaria netta. Le piante monitorate ad agosto, con temperature elevate, mostravano valori di Asat, leggermente inferiori a quanto riscontrabile in condizioni ottimali, evidenziando comunque una condizione funzionale "buona" (figura 2). I valori Asat in Vetiver sono risultati significativamente superiori (16 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) rispetto a quelli delle altre specie (mediamente 8.6 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a dimostrazione dell'ottimo adattamento di questa specie alle temperature elevate estive, come anche evidenziato dal vigoroso accrescimento post-impianto. Nel confronto, si deve anche considerare che solo le specie decidue (Vetiver, Frassino, Pioppo) hanno formato tutto il fogliame nel sito, mentre per le altre vi è un mix di foglie preformate in vivaio e parte nel sito. Ove possibile, il confronto è stato effettuato su foglie mature, formatosi dopo la messa in opera. Per tutte le piante (fornite in vaso) è comunque possibile ipotizzare una certa influenza della disponibilità di nutrienti della matrice di coltivazione.

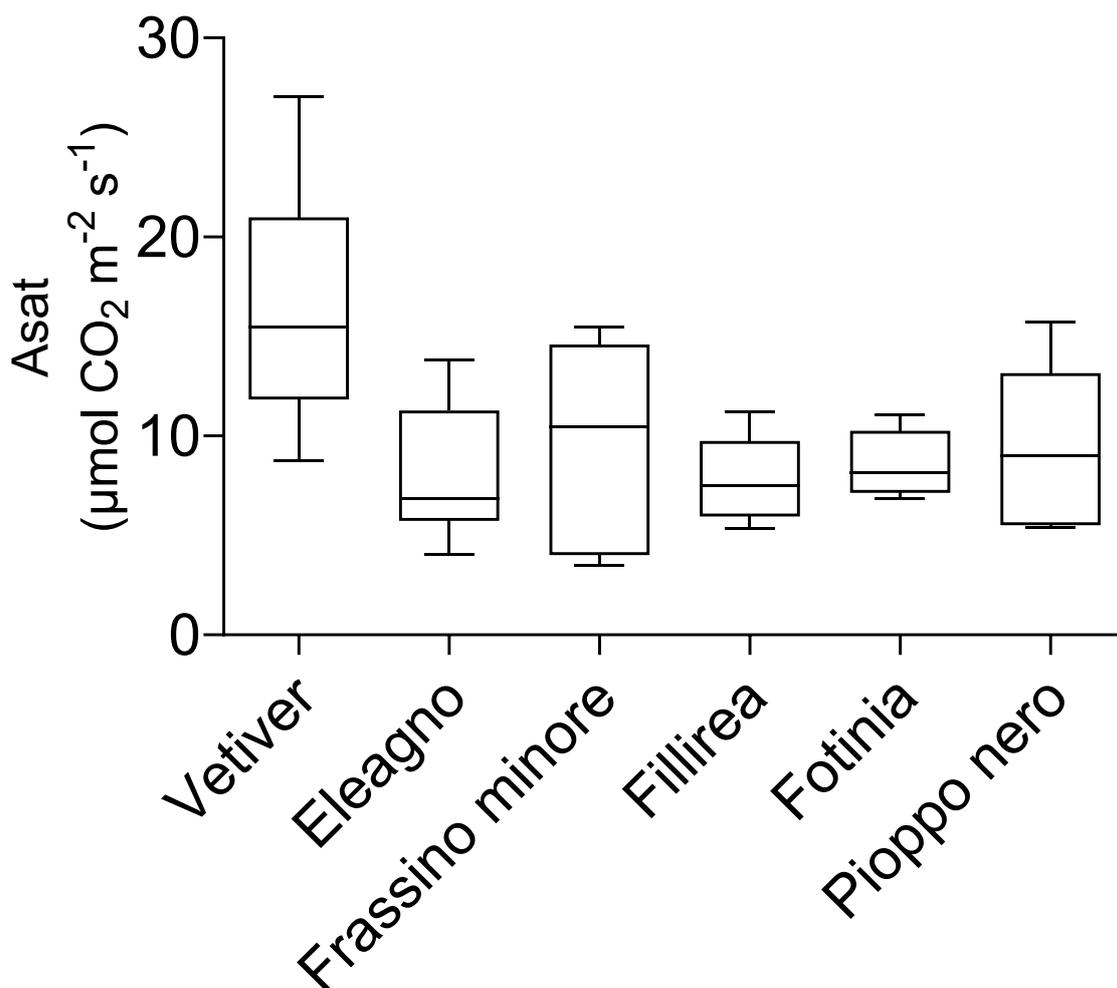


Figura 2 - Istogrammi di dispersione dei valori di Asat, con barre che si estendono dal minimo al massimo osservato, misurati in-situ nell'agosto 2022.

Efficienza fotosintetica

Per la determinazione di questo parametro, è stata utilizzata la misura dell'efficienza di conversione della luce del fotosistema II. Infatti, questo parametro risulta indipendente da effetti diretti di un eventuale deficit idrico sull'apertura stomatica, ma al contempo sensibile ad eventuali danni da "stress" foto-ossidativi determinati da tossicità e/o altri fattori disfunzionali. In assenza di danni, il valore di riferimento al buio è pari a 0.8, mentre in condizioni di illuminazione si riduce in relazione all'acclimatazioni al regime luminoso di crescita e alla specie. La misura condotta in-situ, si basa sul confronto del valore di efficienza ($\Delta F/F_m$) misurato in condizioni di illuminazione standard. I valori misurati ad agosto 2022, mostravano una certa omogeneità fra le specie (media circa 0.15), con una variabilità più spiccata all'interno del gruppo di campioni in alcune specie (figura 3). In particolare, per il Frassino minore si osserva una distribuzione bimodale con un gruppo di campioni mediamente intorno a 0.2 e un secondo gruppo intorno a 0.1, segno di un certo livello di stress in alcune foglie (alcune piante presentavano ingiallimenti fogliari nel corso della stagione). Per le altre specie la variabilità è contenuta e dispersa intorno al valore medio.

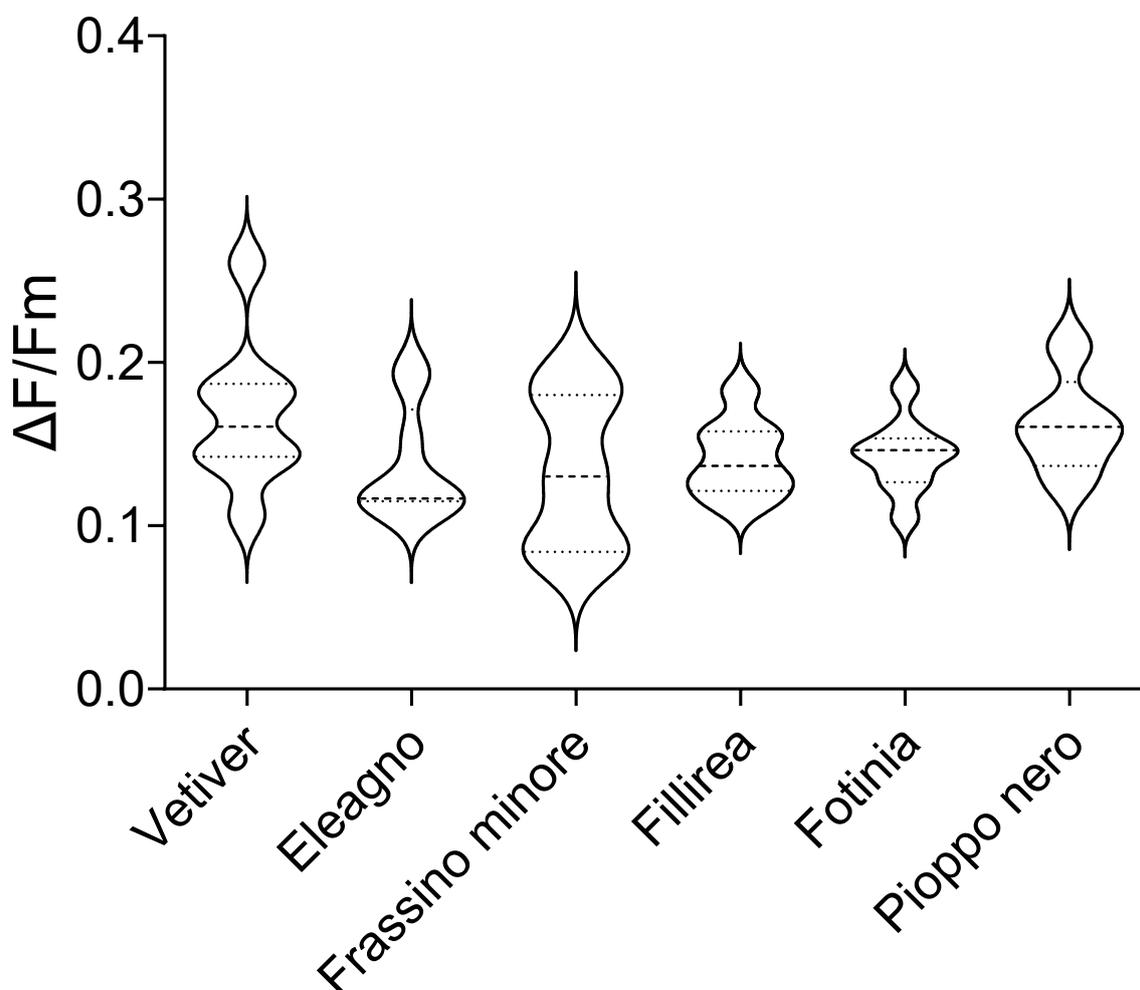


Figura 3 - Istogrammi di dispersione dei valori di $\Delta F/F_m$, con espansione orizzontale proporzionale alla frequenza dei valori, misurati in-situ nell'agosto 2022.

Conduttanza stomatica

Il grado di apertura stomatica è un parametro estremamente variabile in risposta alle condizioni istantanee di luce e umidità atmosferica, ma anche dal tasso di attività fotosintetica; è espresso dalla conduttanza stomatica (g_s). Condizioni ambientali e/o biologiche limitanti il trasferimento di acqua agli organi fogliari (scarsità nel suolo, embolismo, parassiti xilematici, ferite) si traducono in una riduzione di g_s con effetti sull'attività fotosintetica e sugli stress foto-ossidativi.

I valori sono mediamente livellati verso il basso (circa $0.1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), anche se una parziale frequenza di valori più elevati si osserva (come atteso) in pioppo e frassino (figura 4). Le elevate temperature diurne hanno sicuramente influenzato la misura, in particolare per la specie più sensibile all'umidità atmosferica (pioppo).

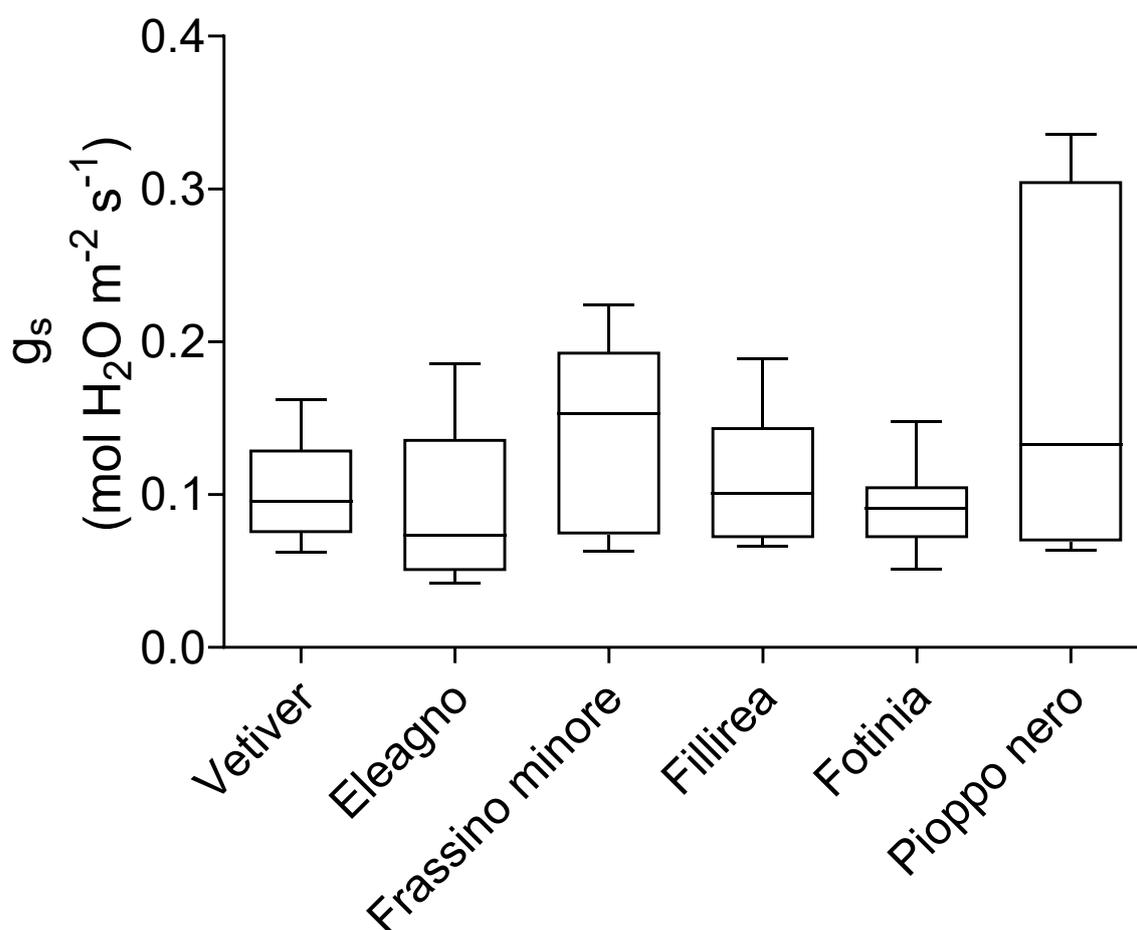


Figura 4 - Istogrammi di dispersione dei valori di g_s , con barre che si estendono dal minimo al massimo osservato, misurati in-situ nell'agosto 2022.

Contenuto di azoto fogliare

L'azoto è uno dei principali macronutrienti per le piante, in particolare negli organi fogliari dove normalmente rappresenta il 2-3% della massa. È un elemento chiave per il processo fotosintetico, ma anche per l'accrescimento del comparto epigeo e delle radici. Le analisi saranno condotte sui campioni raccolti nell'agosto 2022 e i risultati integrati in una versione aggiornata del presente report.

C) SVILUPPO E FUNZIONALITÀ RADICALE

Al fine di determinare la produttività radicale nella seconda stagione di crescita, sono stati installati 28 punti di monitoraggio (*in-growth cores*), di cui: 8 per Frassino minore, 4 per Vetiver, 3 per Eleagno-Fillirea e 3 per Eleagno-Fotinia, 4 per Pioppo nero, 4 per Tamerice, 2 per Frassino maggiore. La produttività radicale sarà analizzata al termine della stagione 2023, tramite l'estrazione e l'analisi delle *in-growth cores* installate.

Al fine di monitorare il metabolismo complessivo del sistema pianta-suolo e il ruolo della componente radicale, sono state effettuate misure di flusso di CO₂ (SCE) sia su trincee impiantate che su trincee non impiantate. Nel caso dell'area ex-rampa, non essendo disponibile la trincea senza piante a seguito della modifica occorsa in fase di cantiere, sono stati utilizzati dei punti fra le trincee (non scavati – non inoculati). Complessivamente sono stati resi permanenti, con l'installazione di collari in acciaio, 60 punti di monitoraggio ripartiti secondo il seguente schema.

	Sez. irrigua	ID Trincea	Specie	N. punti con piante	N. punti senza piante
Area bassa: Frassini minori	A	A2	-		2
		A3	Frassino	2	
		A4	-		2
		A5	Frassino	2	
		A6	-		2
		A7	Frassino	2	
		A8	-		
		A9	Frassino	2	
		A10	-		2
				sub-totali	
Area ex-rampa: Vetiver + Mix arbusti	B	B1	Vetiver		
		B2	Vetiver	2	
		Fuori trincea	-		4
		B3	Vetiver	2	
		B4	Ele-Fill	4	
		Fuori trincea	-		4
		B5	Ele-Fot	4	
				sub-totali	12
Area alta (via Morosini): Tamerici + Frassino maggiore + Pioppi neri	C	C2	-		4
		C3	P. nero	4	
		C4	-		4
		C5	Tamerici	4	
		C6	-		
		C7	F. maggiore	4	
		C8	-		4
				sub-totali	12
		Totali		32	28
				60	

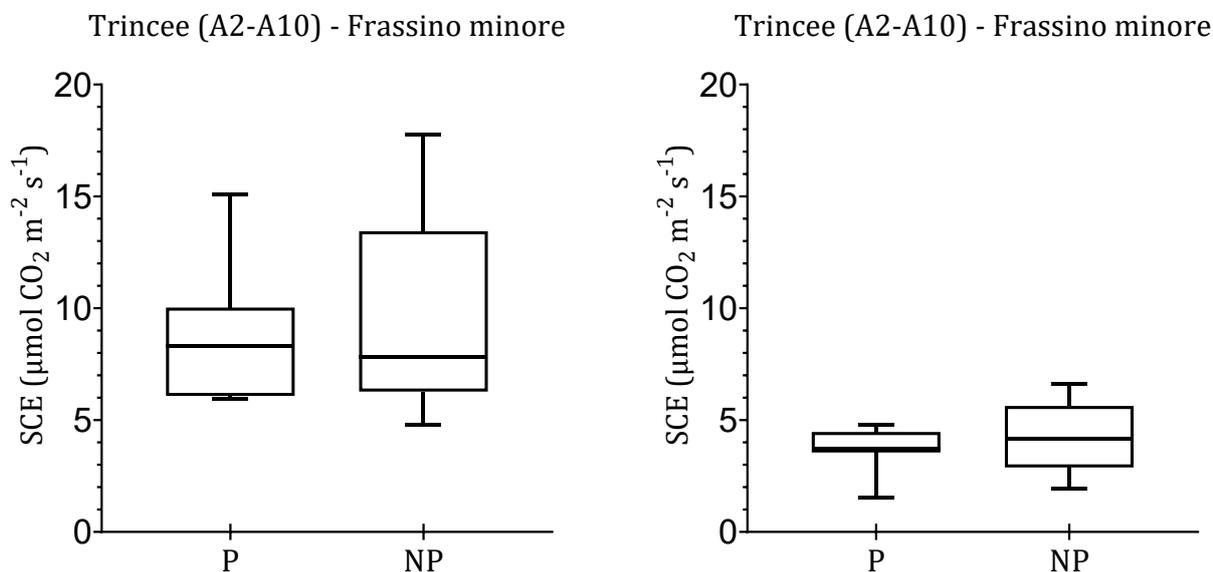
Una primo data-set completo è stato raccolto ad agosto (estate) ed un secondo a novembre (autunno), 2022.

Le emissioni di CO₂ dal suolo sono il risultato dell'attività metabolica dei microrganismi e delle radici; i flussi variano con la temperatura (incremento esponenziale), con lo stato idrico del suolo (curva a campana con riduzione in condizioni asciutte e in eccesso di acqua), con la struttura del suolo (porosità, frazione argillosa), con la disponibilità di substrati accessibili per l'attività degradativa dei microrganismi (sostanza organica in pool labili e recalcitranti). La complessità delle interazioni fra i diversi determinanti rende estremamente variabili i flussi anche nella dimensione spaziale, ancor più in matrici disturbate, o come nel caso specifico, su mix di materiali di riporto e di demolizione. Con lo scavo delle trincee, il successivo inoculo e la piantagione, sono state chiaramente modificate tutte le condizioni determinanti il flusso, richiamate sopra. In aggiunta, l'irrigazione consente di mitigare gli effetti sfavorevoli del periodo asciutto estivo mantenendo elevata l'attività metabolica del sistema pianta-suolo.

In considerazione della diversa fenologia delle specie messe in opera e della loro diversa architettura radicale, l'analisi comparativa è effettuata per specie. Nelle figure di seguito i risultati della campagna di misura estiva (agosto) e di quella autunnale (novembre).

Area piantata con Frassino minore

La temperatura del suolo superficiale (a circa -30 cm di profondità) durante le misure estive era mediamente di 30.2 °C, diversamente in autunno era di 16.9 °C. Il contenuto idrico era mediamente di 0.14 (mc/mc) in agosto e 0.18 (mc/mc) a novembre, pari rispettivamente, al 36% e al 41% del massimo misurato nel corso del 2022 (maggio-dicembre).

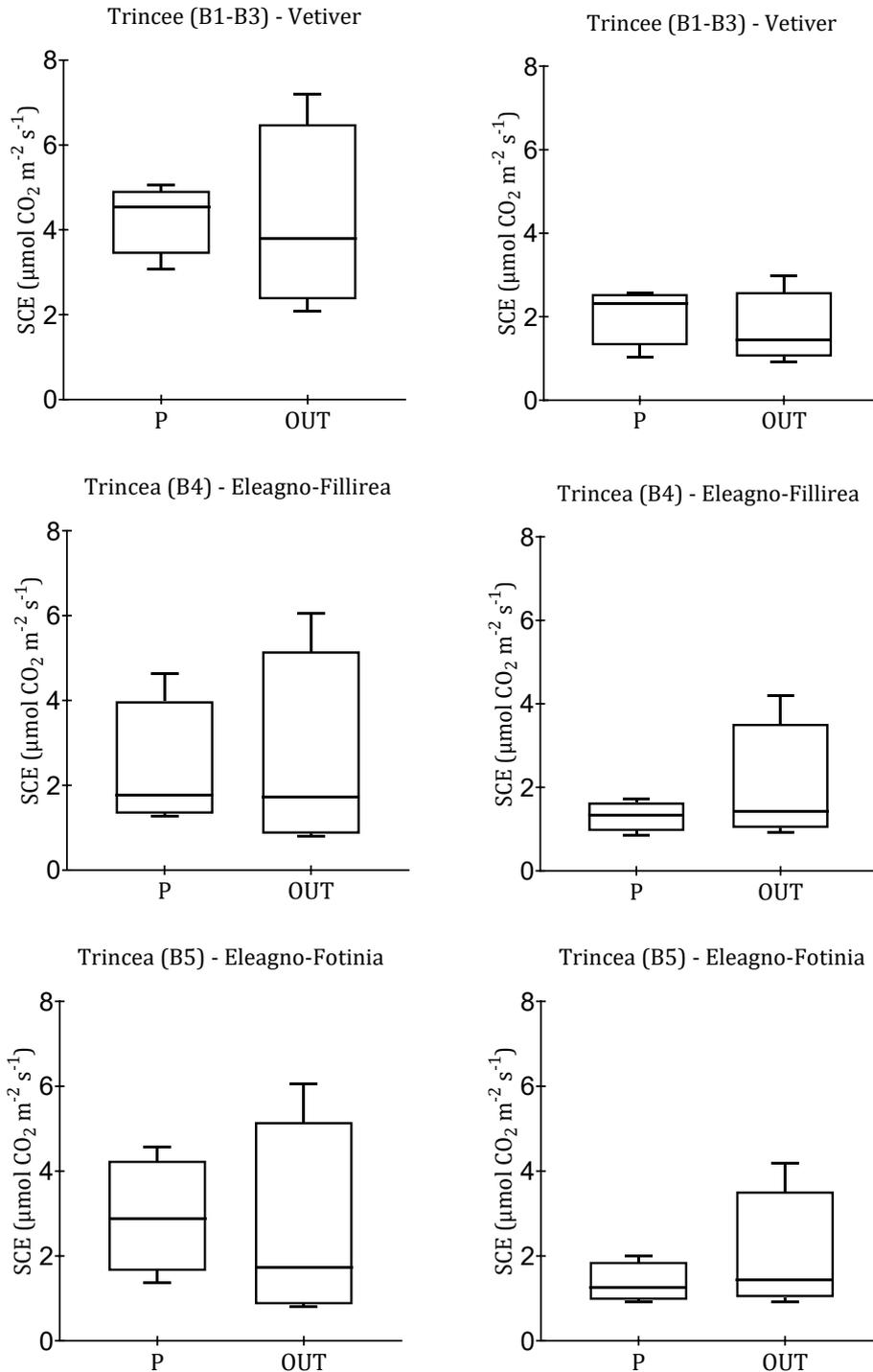


Istogrammi di dispersione dei valori di SCE, con barre che si estendono dal minimo al massimo osservato, misurati in-situ nell'agosto 2022 (sin) e a novembre 2022 (des).

I risultati mostrano valori elevati in estate per l'effetto combinato della temperatura e del contenuto idrico non limitante, ed un significativo abbassamento autunnale conseguenza della contestuale riduzione della temperatura. Non sono evidenti variazioni significative fra le due tipologie di trincee.

Area ex-rampa piantata con Vetiver e Mix di arbusti

La temperatura del suolo superficiale (a circa -30 cm di profondità) durante le misure estive era mediamente di 27.0 °C, diversamente in autunno era di 16.3 °C. Il contenuto idrico era mediamente di 0.18 (mc/mc) in agosto e 0.19 (mc/mc) a novembre, pari rispettivamente, all'81% e all'82% del massimo misurato nel corso del 2022 (luglio-dicembre).



Istogrammi di dispersione dei valori di SCE, con barre che si estendono dal minimo al massimo osservato, misurati in-situ nell'agosto 2022 (sin) e a novembre 2022 (des).

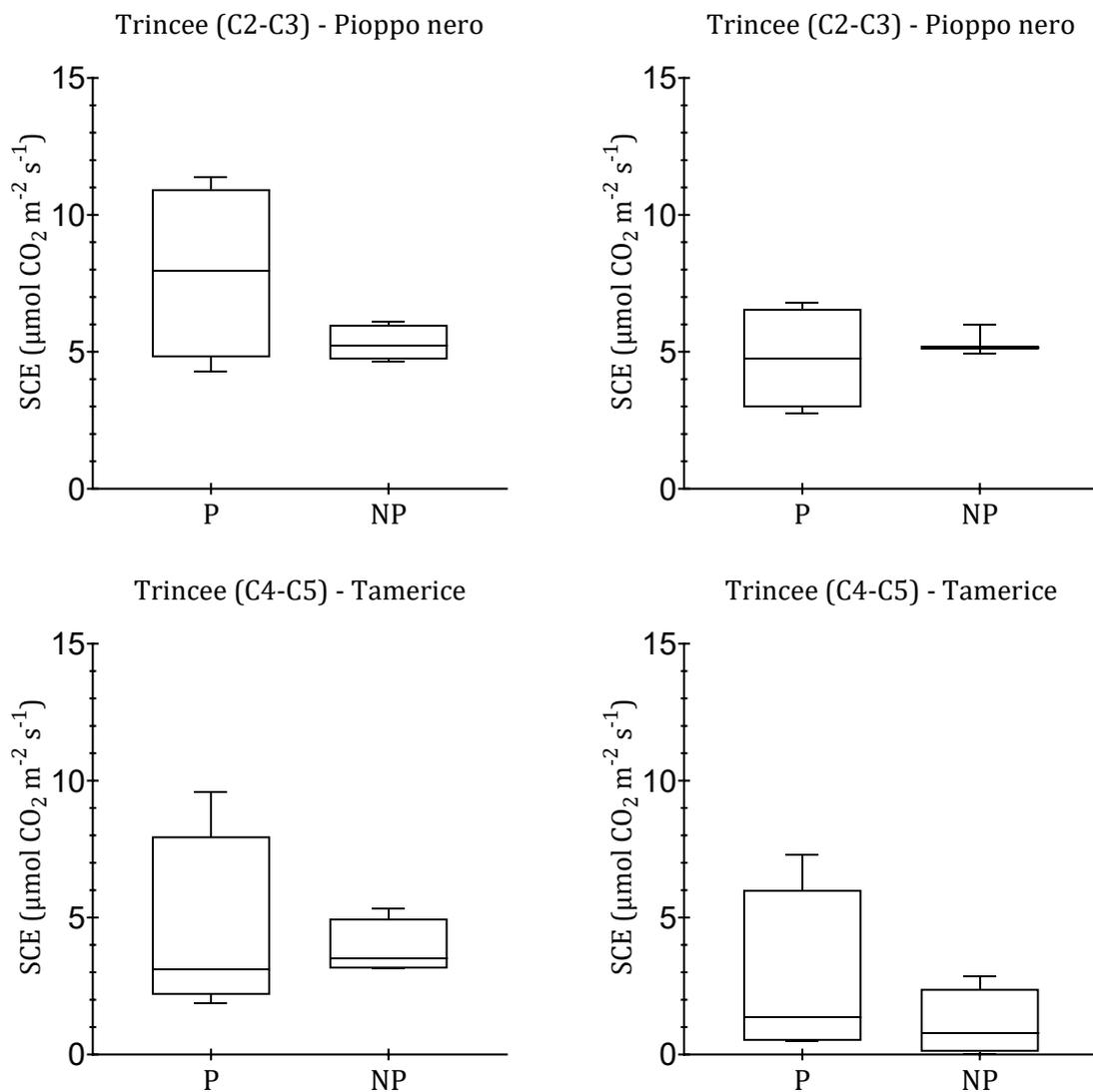
Complessivamente i flussi di CO₂ misurati nell'area ex-rampa, sono inferiori a quanto osservato nell'area con frassini. Le due aree sono caratterizzate da substrati diversi, con maggiore scheletro

e scarsità di sostanza organica nell'area ex-rampa come conseguenza del consolidamento effettuato per le finalità del precedente cantiere.

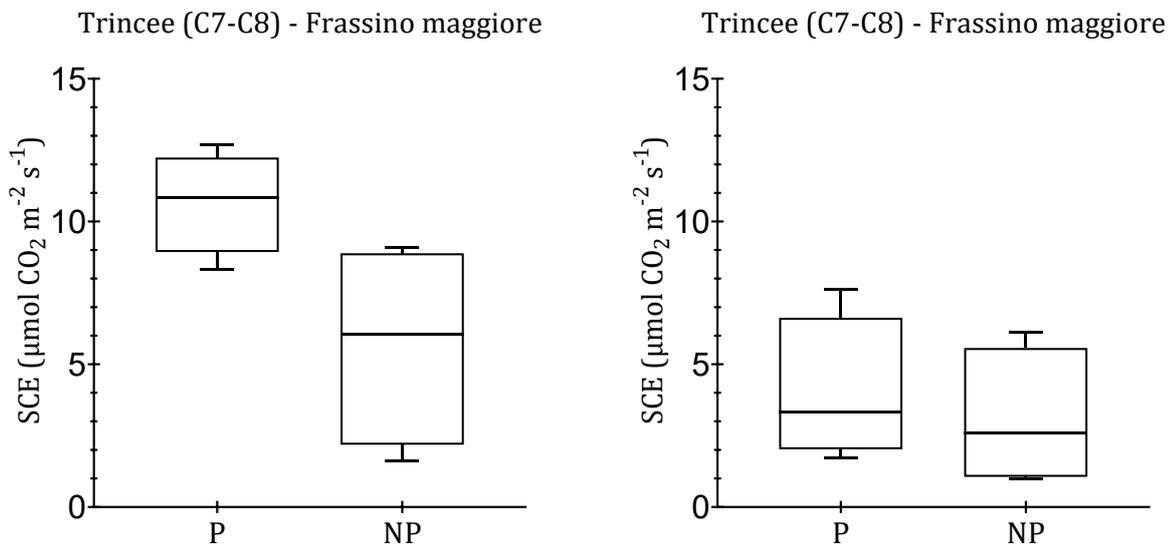
La differenza stagionale è evidente nelle trincee piantate, mentre è meno marcata nei punti fuori trincea. Una differenza importante fra le due tipologie (oltre a quella strutturale) è la maggiore omogeneità dell'irrigazione nelle trincee, rispetto al fuori trincea, fattore che può aver giocato un ruolo nel periodo estivo. I valori riscontrati in Vetiver sono mediamente più alti di quelli delle trincee con arbusti, con uno scarto maggiore nel periodo estivo. La velocità dello sviluppo radicale di Vetiver è sicuramente superiore a quello delle altre due specie legnose, così come la sua stagionalità.

Area alta (via Morosini) piantata con Pioppo nero, Tamerici, Frassino maggiore

La temperatura del suolo superficiale (a circa -30 cm di profondità) durante le misure estive era mediamente di 28.1 °C, diversamente in autunno era di 16.2 °C. Il contenuto idrico era mediamente di 0.13 (mc/mc) in agosto e 0.16 (mc/mc) a novembre, pari rispettivamente, al 48% e al 57% del massimo misurato nel corso del 2022 (maggio-dicembre).



Istogrammi di dispersione dei valori di SCE, con barre che si estendono dal minimo al massimo osservato, misurati in-situ nell'agosto 2022 (sin) e a novembre 2022 (des).



Istogrammi di dispersione dei valori di SCE, con barre che si estendono dal minimo al massimo osservato, misurati in-situ nell'agosto 2022 (sin) e a novembre 2022 (des).

Complessivamente i valori misurati nelle trincee con Pioppo e con Frassino maggiore, sono di entità simile a quelli dell'area con Frassino minore. Valori inferiori sono quelli delle trincee con Tamerice, comunque superiori a quelle con Vetiver e con il mix di arbusti.

La stagionalità è spiccata nelle trincee con Frassino maggiore, evidente nelle trincee con Pioppo e modesta nelle trincee con Tamerice. In estate i valori delle trincee con piante sono mediamente superiori a quelle senza piante, ma non per Tamerice. Quest'ultima specie è caratteristica per formare apparati radicali profondi (freatofita) e scarse radici superficiali, diversamente dal Pioppo che tende a colonizzare con le radici gli strati più superficiali del terreno.

D) MONITORAGGIO CHIMICO FOGLIARE

Al fine di monitorare l'attività di fitodegradazione dei contaminati presenti nei terreni e in falda, nel caso in cui parte di questi siano trasferiti nelle foglie, ovvero assorbiti per via aeree, e quindi degradati a livello fogliare, si procederà a monitorarne il *pool* annualmente nel periodo di maggiore attività vegetativa. Al picco della stagione vegetativa (giugno) le foglie mature dell'anno saranno campionate ed analizzate in laboratorio, in accordo allo schema riportato nella tabella seguente. Tali analisi sono previste a partire dalla seconda stagione di crescita (2023). Un primo campionamento è stato comunque effettuato a fine estate 2022, per un eventuale messa a punto della metodologia analitica.

Schema per il monitoraggio chimico fogliare

Specie	N. piante	Numero di analisi			
		BTEX	IPA	Tetracloro-etilene (PCE)	Cloruro di vinile
Impianti su trincea					
<i>Frassino maggiore</i>	1	1	1		
<i>Vetiver</i>	3	3	3		
<i>Fotinia</i>	3	3	3		
<i>Eleagno</i>	3	3	3		
<i>Fillirea</i>	3	3	3		
<i>Tamerice</i>	3	3	3		
<i>Frassino minore</i>	6	6	6		
<i>Pioppo cipressino</i>	3	3	3		
<i>Sub-totali</i>	22	22	22		
Impianti su area scavo A					
<i>Pioppo cipressino</i>	3	3	3	3	3
<i>Salice ripaiolo</i>	3	3	3	3	3
<i>Salice rosso</i>	3	3	3	3	3
<i>Maonia</i>	3	3	3	3	3
<i>Sub-totali</i>	12	12	12	12	12
Impianti su area scavo B					
<i>Pioppo bianco</i>	1	1	1	1	1
Totali	35	35	35	13	13

Nota: per ogni pianta campionata l'analisi sarà su un unico pool fogliare