

RITA ACCOGLI<sup>1</sup>, SILVANO MARCHIORI<sup>1</sup>,  
FRANCO MAZZOTTA<sup>2</sup>, LUIGINO TROISI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Orto Botanico del Di.S.Te.B.A. - Università del Salento.

Prov.le per Monteroni, 167, 73100 Lecce

<sup>2</sup> Studio Effemme Srl, Via A. Moro Squinzano (LE)

<sup>3</sup> Laboratorio di Chimica Organica del Di.S.Te.B.A. - Università del Salento.

Via Prov.le Monteroni, 165, 73100 Lecce

e-mail : rita.accogli@unisalento.it

## MONITORAGGIO DELL'ACCUMULO DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA) IN SPECIE SPONTANEE

### RIASSUNTO

La flora del Salento rappresenta una grande risorsa per le applicazioni biotecnologiche. Presso l'Orto Botanico del DiSTeBA sono state propagate e moltiplicate tre specie spontanee molto comuni come il cardo mariano *Silybum marianum* (L.) Gaertner, il grespino *Sonchus oleraceus* L. e la cicoria selvatica *Cichorium intybus* L., al fine di verificare tecniche colturali che garantiscano un'adeguata produzione da destinare al settore alimentare, all'industria farmaceutica ed agli interventi di recupero ambientale. Nel presente lavoro si riportano i risultati relativi alla propagazione delle tre specie ed al monitoraggio dell'assorbimento che tali specie hanno evidenziato nei confronti degli Idrocarburi Policiclici Aromatici. Gli esiti delle attività hanno confermato una loro possibile applicazione nelle tecnologie riguardanti la fitodepurazione.

### SUMMARY

The Salentine flora represents a very rich source for biotechnological application. At the Botanic Garden of DiSTeBA, were propagated three wild species very common: *Silybum marianum* (L.) Gaertner, *Sonchus oleraceus* L. and *Cichorium intybus* L. We tried to evaluate the possibility of a "domestication" of these wild plants, to obtain an adequate production for the food industry, pharmaceutical industry and the environmental restoration measures. In this paper we report the results for the propagation of the three species and monitoring the absorption capacity that these species have shown towards

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. The results confirmed their possible application in technologies and to perform an action of phytoremediation in respect of such pollutants ubiquitous and highly damaging.

## INTRODUZIONE

Un uso sostenibile della ricchezza floristica del territorio salentino è prontamente esprimibile anche dal numero di specie vegetali spontanee che sono ancora utilizzate ai fini alimentari, medicinali, artigianali (fibre, legname, foraggi, mangimi), o che costituiscono la materia prima dei sistemi produttivi locali (trasformazione agroalimentare, produzione di manufatti artigianali) o che, semplicemente, sono protagoniste delle leggende, delle credenze e delle tradizioni popolari che da secoli vengono tramandate (ACCOGLI *et al.*, 2004).

Grazie alla sua posizione geografica, il Salento costituisce una sorta di cerniera biogeografia tra il versante orientale e quello occidentale del Bacino Mediterraneo. In questa piccola subregione la biodiversità vegetale si esprime in tutto il suo valore, con un elevato numero di specie, 1377 taxa (MELE *et al.*, 2006), circa un quinto dell'intera flora nazionale, che ne annovera 7634 (CONTI *et al.*, 2005); impossibile valutare le innumerevoli interazioni che legano tra loro queste specie e, le stesse, con le altre forme viventi (animali, virus, batteri, funghi) o la molteplicità delle condizioni micro ambientali e degli equilibri biologici che esistono su questo territorio!

La salvaguardia della biodiversità vegetale del Salento e della Puglia è un impegno che l'Orto Botanico del Di.S.Te.B.A. dell'Università del Salento, come istituzione, è chiamato ad assolvere. Le strategie per la Conservazione della Natura raccomandate dalle Organizzazioni internazionali, essenzialmente, prevedono: individuazione e valutazioni ecologiche dei popolamenti in natura, con adozione di misure volte alla loro salvaguardia ed a quella dell'habitat (conservazione *in situ*); raccolta di materiale propagativo per la moltiplicazione delle specie negli Orti Botanici (conservazione *ex situ*). Le collezioni vive mantenute nell'Orto Botanico del Di.S.Te.B.A. rappresentano il 30% della diversità vegetale nel territorio regionale, oltre a rappresentare una fonte di materiale di moltiplicazione di specie ad alto rischio di estinzione o che trovano applicazione in diversi settori economici (ACCOGLI *et al.*, 2008).

In questi ultimi anni, ad esempio, si è scoperta e viene proposta con convinzione, la valenza estetica, paesaggistica e naturalistica di numerose specie spontanee già note ai settori della gastronomia e della farmaceutica; di queste stesse specie si sta cercando di valutare l'efficacia di un loro utilizzo negli interventi di risanamento di aree degradate (*wildflowers*) (BRETZEL and PEZZAROSSA, 2007).

L'Orto Botanico del Di.S.Te.B.A. ha collaborato a numerosi programmi di salvaguardia che prevedevano un diretto intervento nei progetti di ripristino di habitat o di ambienti seriamente minacciati o impoveriti; da qui l'elaborazione, nell'ambito del Progetto Strategico "Recupero e valorizzazione delle piante della flora salentina per produzione biotecnologica di sostanze ad interesse farmaceutico, dietetico e cosmetico" – PS029, di un sottoprogetto dal titolo "Le piante salentine di interesse alimurgico: propagazione e loro impiego nella riqualificazione di aree agricole e di ambienti naturali degradati".

Tra le numerose specie vegetali spontanee, di interesse alimentare, farmaceutico ed industriale, l'interesse è stato rivolto a: cardo mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertner), grespino (*Sonchus oleraceus* L.) e cicoria selvatica (*Cichorium intybus* L.). Tali specie sono ampiamente diffuse sul territorio salentino, affiancano comunemente quelle di interesse agrario, provvedono al ripristino degli equilibri naturali, regimano l'umidità relativa dell'ambiente circostante e sono richiamo e cibo per insetti e uccelli. Inoltre, fonti bibliografiche attestano un'elevata idoneità proprio della cicoria selvatica e del grespino nella fitodepurazione dei metalli pesanti (MP) (ABE *et al.*, 2008).

Da anni vengono riconosciuti alla fitodepurazione efficacia, economia e validità ecologica; infatti, essa viene impiegata non solo nel risanamento dei corpi idrici e dell'atmosfera, ma anche per detossificare terreni inquinati per i quali, un tempo, si doveva ricorrere a metodi assai costosi, basati su tecniche chimico-fisiche come l'elettrosmosi, l'immobilizzazione e la precipitazione *in situ*. Le attuali tecniche di fitodepurazione si applicano per l'estrazione di una vasta gamma di inquinanti: metalli pesanti, solventi organici, come ad esempio il tricloroetilene (TCE) e l'atrazina, idrocarburi del petrolio quali oli combustibili, idrocarburi alifatici, benzene, toluene e Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) (DEL RIO-CELESTINI *et al.*, 2006). Questi ultimi sono composti di natura organica, derivanti da attività antropiche, presenti ovunque nell'ambiente; l'uomo li assume attraverso l'aria, il consumo di cibo e di acqua e, durante i processi metabolici l'organismo li trasforma in derivati mutageno/cancerogeni; la decontaminazione avviene grazie alla rizodegradazione, attività svolta in sinergia tra l'apparato radicale della pianta ed i microorganismi presenti nel terreno (WILD and JONES, 1992).

La flora autoctona del Salento rappresenta una grande risorsa per le applicazioni della fitodepurazione, in quanto, numerose sono le specie che rispondono ai requisiti di adattabilità pedoclimatiche e tolleranza all'inquinamento. Nell'ambito del progetto PS029, si è cercato, innanzitutto, di valutare la possibilità di una "domesticazione" delle piante spontanee, adottando per esse le medesime tecniche di propagazione e di coltivazione note per le specie di interesse agrario a loro affini (ACCOGLI *et al.*, 2011); in un secondo momento, è stato verificato il potere estrattivo e metabolizzante, nei con-

fronti degli IPA, delle tre specie, la capacità delle quali nel decontaminare suoli è già ampiamente documentata dalla letteratura (DEL RIO *et al.*, 2002; DEL RIO-CELESTINI *et al.*, 2006; ABE *et al.*, 2008).

## MATERIALI E METODI

La coltivazione delle specie *ex situ*, comporta la messa a punto di protocolli per l'acquisizione ed il mantenimento di materiale idoneo alla moltiplicazione. Per molte specie selvatiche, non si conoscono tecniche colturali, fitopatologiche, fasi fenologiche, note, invece, per le piante coltivate. Perciò, un'attenta programmazione delle attività, è stata rivolta proprio alla messa a punto di tecniche colturali tese alla "domesticazione" delle specie selezionate.

È stato valutato il potere germinativo delle specie in condizioni non controllate e costanti, effettuando le semine in plateau alveolati (fori di 6 cm di diametro), con substrato esente da inquinanti, costituito da terriccio universale ed agriperlite nel rapporto 1:2, collocati in tunnel freddo. Per ogni lotto di semina, sono state realizzate tre ripetizioni, con 100 elementi per plateau. Le semine sono state effettuate in autunno.

Utilizzando la superficie agraria dell'Orto Botanico, sono state realizzate parcelle per la coltivazione in campo delle singole specie, al fine di valutare: caratteri morfometrici, andamento del ciclo riproduttivo, risposte alla domesticazione. L'impianto è stato effettuato secondo uno schema sperimentale a blocco randomizzato con due ripetizioni per ciascuna specie. Le dimensioni delle parcelle colturali erano di 18 x 18 m, con distanza interfilare di 40 cm e quella intercalare di 30 cm. Il numero totale di piante per parcella era di 228. Il protocollo colturale applicato è stato il seguente: fresatura del terreno; concimazione di fondo con 40 kg ha<sup>-1</sup> di N, 80 kg ha<sup>-1</sup> di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 170 kg ha<sup>-1</sup> di K<sub>2</sub>O; sarchiatura e scerbatura delle erbe infestanti (Fig. 2, Fig.5, Fig. 9).

Per la valutazione dell'assorbimento degli IPA, sono state utilizzate giovani piantine, allo stadio di 5-7 foglie e con apparato radicale ben sviluppato; esse sono state singolarmente trasferite dal plateau nei vasi da vivaio contenenti, come substrato colturale terreno agrario presente nello stesso Orto Botanico, esente da IPA. Il terreno è stato prelevato ad una profondità di 30 cm, essiccato al sole, setacciato, sottoposto a lavaggio con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro per allontanare impurità, pesato. Così preparato, il terreno rappresentava la matrice "bianca" da inquinare con quattro IPA, ognuno rappresentativo di quattro classi, differenti per numero di anelli aromatici: Naftalene, Acenaftalene, Fluorantene, Benzo(k)fluorantene. Ciascun vaso (Ø 15 cm) è stato riempito con 2 Kg di terreno debitamente inquinato con 100 ml di soluzione, avente per ogni idrocarburo una concentrazione pari a 1.0 mg/Kg ovvero, 1ppm per

ogni singolo IPA. Per ogni singola specie, è stato seguito il seguente disegno sperimentale: modulo A): 1 vaso con terreno inquinato da mantenere senza essenze vegetali e 10 vasi con terreno inquinato, ciascuno con una piantina in coltivazione; modulo B): 1 vaso con terreno non inquinato da non coltivare e 10 vasi con terreno non inquinato, ciascuno con una piantina in coltivazione. Tutti i vasi sono stati collocati in tunnel freddo per evitare contaminazioni locali, innaffiati secondo le necessità delle singole specie, in maniera contenuta, per evitare percolazione fuoriuscita degli inquinanti presenti nel terreno (Fig.3, Fig. 6).

Il laboratorio di Chimica Organica ha messo a punto un metodo estrattivo degli IPA sia dalla matrice vegetale che dal suolo. La determinazione della concentrazione degli inquinanti eventualmente assorbiti dalle piante ed accumulati nelle radici e nella parte aerea, è stata effettuata in due distinte fasi fenologiche: prefioritura, post-fioritura con maturazione dei semi.

La presenza degli IPA è stata verificata tramite la Spettrometria MS, mentre il loro dosaggio è stato effettuato tramite analisi HPLC.



Fig. 1- Semine di cardo in plateaux



Fig. 2 - Parcella culturale di cardo



Fig. 3 - Piante di cardo in terreno inquinato



Fig. 4 - Semine di cicoria in plateaux



Fig. 5 - parcella colturale di cicoria



Fig. 6 - piante di cicoria in terreno inquinato

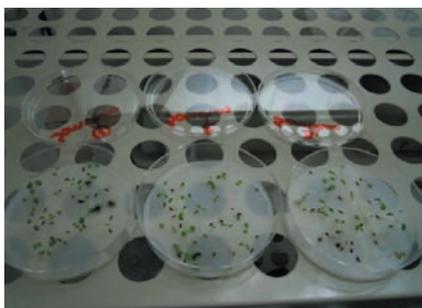


Fig. 7 - semine in capsule petri



Fig. 8 - semine di cardo in plateaux



Fig. 9 - parcella colturale di grespino

## RISULTATI

La germinazione e l'emersione delle plantule fuori dal substrato è stata monitorata ad intervalli regolari di due giorni. Cardo mariano ha raggiunto alti valori di emergenza (95%) dopo due settimane dalla semina, aumentando solo di poco (97%) nelle due settimane successive (Fig.1). Il completo sviluppo della plantula idonea al trapianto ha richiesto circa due mesi. Cicoria

selvatica ha raggiunto alti valori di emergenza (40%) in soli 10 giorni e dopo due settimane l'aumento registrato era poco significativo (41%) (Fig. 4). Il completo sviluppo della plantula idonea al trapianto ha richiesto circa tre mesi. Anche il grespino, in soli 10 giorni dalla semina, ha raggiunto elevate percentuali di germinazione (63%), aumentando, poco per volta, per altre quattro settimane, sino al valore finale del 72% (Fig. 8). Non sono state registrate fisiopatie a carico delle piantine mantenute nei plateau alveolati.

I valori di germinabilità registrati su semine effettuate nei plateau, sono molto prossimi ai valori registrati su semine effettuate in capsule petri, tenute in camera di crescita a condizioni di T= 24°C e fotoperiodo di 16 h (Fig.7) (ACCOGLI *et al.*, 2011).

Purtroppo, la prova riguardante le piantine di grespino è stata accidentalmente danneggiata, per cui comparazioni significative di assorbimento degli IPA sono state effettuate solo su radici e parti aeree di cicoria selvatica e di cardo mariano.

Dati significativi sono stati rilevati solo nelle colture inquinate, come riportato nelle seguenti tabelle (Tab. 1, Tab. 2).

Tab. 1 - Concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) degli IPA rilevate nella parte aerea e nelle radici di piante di *Cichorium intybus*.

IPA	pre-fioritura		post-fioritura	
	p. aerea	radici	p.aerea	radici
naftalene	28,10	166,18	0,43	0,42
acenaftalene	21,90	1,93	0,00	0,00
fluorantene	115,64	163,38	0,27	0,05
benzo(k)fluorantene	11,82	28,13	1,00	0,05

Tab. 2 - Concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) degli IPA rilevate nella parte aerea e nelle radici di piante di *Silybum marianum*.

IPA	pre-fioritura		post-fioritura	
	p. aerea	radici	p. aerea	radici
naftalene	35,10	10,35	15,54	0,28
acenaftalene	42,53	0,90	4,16	0,00
fluorantene	710,36	10,06	75,27	0,19
benzo(k)fluorantene	188,70	2,06	46,76	0,13

Infine, sono state determinate le concentrazioni residue nel terreno colturale, a conferma delle differenti capacità di assorbimento delle specie in esame (Tab. 3).

Tab. 3 - Concentrazioni ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) degli IPA rilevate nel terreno dei vasi dopo la coltivazione.

IPA	cicoria	cardo	substrato inquinato	bianco
naftalene	1,62	1,12	625,66	1,86
Acenaftalene	0,25	0,21	596,67	0,06
fluorantene	11,1	8,94	536,16	0,85
benzo(k)fluorantene	7,03	7,91	629,91	0,36

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati confermano che gli idrocarburi vengono veicolati nella parte aerea della pianta, in special modo Fluorantene, che viene accumulato in concentrazioni assai elevate dal cardo e meno dalla cicoria, soprattutto in fase vegetativa e di prefioritura. È evidente un'elevata capacità delle radici (sia della cicoria che del cardo) di assorbire preferenzialmente naftalene e fluorantene. In fase di post fioritura, le concentrazioni degli IPA sia nella parte aerea che nelle radici diminuiscono drasticamente, probabilmente perché utilizzati dalle piante per il loro accrescimento o per la sintesi di metaboliti secondari. Le quantità di IPA residue nel terreno di coltura confermano la maggior capacità di assorbimento del cardo mariano rispetto alla cicoria selvatica, tuttavia, entrambe le specie risultano utilmente impiegabili nella fitodepurazione di idrocarburi policiclici aromatici.

Bisogna tener conto che la fitorimediazione verificata nel nostro studio è avvenuta su terreno "non weathered", in cui gli IPA sono stati addizionati ma non hanno avuto tempo per legarsi più strettamente, rendendosi meno biodisponibili alla degradazione (AHN *et al.*, 2005). Questo ci suggerisce di continuare lo studio verificando la rizodegradazione delle specie esaminate in terreni "weathered".

## BIBLIOGRAFIA

- ABE T., FUKAMI M., OGASAWARA M., 2008 – Cadmium accumulation in the shoots and roots of 93 weed species. *Soil Science and Plant Nutrition* 54: 566-573.
- ACCOGLI R., MELE C., MINONNE F., MEDAGLI P., MARCHIORI S., 2007 – Utilizzo delle piante spontanee mangerecce nel Salento. 2° Convegno Nazionale “Piante mediterranee, Valorizzazione delle risorse e sviluppo sostenibile” Agrigento 7-8 ottobre 2004.
- ACCOGLI R., MARCHIORI S., 2008 – Conservazione in situ ed ex situ: le attività dell’Orto Botanico di Lecce. In: AA.VV., 2008 - *CERATONIA. Rapporto finale sulle attività del progetto*. Edizioni del Grifo.
- ACCOGLI R., CAFORIO F., RUSSO A., MARCHIORI S., 2011 – Caratterizzazione di materiale generativo di piante spontanee di interesse alimentare e terapeutico e di possibile impiego per interventi di risanamento ambientale. Riun. Scient. Sez. Pugliese della SBI, 28 gennaio 2011, Taranto.
- AHN S., WERNER D., LUTHY R.G., 2005. Physicochemical Characterization of Coke-plant Soil for the Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Availability and the Feasibility of Phytoremediation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 2185-2195.
- BRETZEL F., PEZZAROSSA B., 2007 – Riquilificazione ambientale a basso input energetico di suoli urbani attraverso l’utilizzo di piante erbacee spontanee (wild-flowers). Atti del 2° Convegno Nazionale Piante Mediterranee Valorizzazione delle risorse e sviluppo sostenibile. Agrigento, 7-8 ottobre 2004: 595-600.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C., 2005 – An annotated checklist of the Italian vascular flora. Palombi Editore. Roma.
- DEL RIO M., FONT R., ALMELA C., VÈLEZ D., MONTORO R., DE HARO-BAILÒN A., 2002 – Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcóllar mine. *Journ. of Biotechnology* 98 (2002): 125-137.
- DEL RIO-CELESTINO M., FONT R., MORENO-ROJAS R., DE HARO-BAILÒN A., 2006 – Uptake of lead and zinc by wild plants growing on contaminated soils. *Industrial Crops and Products* 24 (2006): 230-237.
- MELE C., MEDAGLI P., ACCOGLI R., BECCARISI L., ALBANO A., MARCHIORI S., 2006 – Flora of Salento (Apulia, Southeastern Italy): an annotated checklist. *Flora Mediterranea*, 16: 193-245.
- WILD S.R., JONES K.C., 1992 – Organic chemicals entering agricultural soils in sewages: screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *Sci. Total Environ.* 119: 85-119.

