



Università Politecnica delle Marche

**CENTRO ORTO BOTANICO INTERDIPARTIMENTALE DEI SERVIZI**

“Analisi fitosanitarie, ricerche ecologiche, progettazione paesaggistica e sistemazione a verde di parte della Discarica comunale della Cornacchia, sita in territorio di Maiolati Spontini”

Attività di monitoraggio territoriale e dell’impianto del verde

Relazione



Ancona, Settembre 2010

Responsabile Scientifico del Progetto  
Prof. Edoardo Biondi



## INDICE

### 1 - MONITORAGGIO DELL'IMPIANTO DEL VERDE

Responsabile Scientifico Prof. E. BIONDI.

### 2 - STUDIO DELLA CRESCITA E DEL METABOLISMO RADICALE PRESSO LA DISCARICA SOGENUS

Responsabile Scientifico Prof. D. NERI.

### 3 - BIOMONITORAGGIO AMBIENTALE TRAMITE L'UTILIZZO DELLE API MELLIFICHE (*APIS MELLIFERA* L. ) – FASE C

Responsabile Scientifico Prof. N. ISIDORO.

### 4 - INDAGINI SULLA MICORRIZZAZIONE DELLE PIANTE E VALUTAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ MICROBICA DEL SUOLO

Responsabile Scientifico Prof. G. ROMANAZZI.



## **1. ATTIVITÀ DI MONITORAGGIO DELL'IMPIANTO DEL VERDE**

### **Relazione**

Nei mesi di maggio, luglio, settembre e ottobre del corrente anno sono stati effettuati sopralluoghi presso i banchi di discarica esauriti ed interessati dall'intervento di rinaturazione, effettuato dal Centro Interdipartimentale dell'Orto Botanico "Selva di Gallignano", al fine di verificare lo stato dell'impianto realizzato, riguardante la percentuale di attecchimento delle piante poste a dimora e il loro stato di salute.

### **Risultati del monitoraggio**

Nella presente relazione vengono esposti i dati rilevati circa la presenza delle diverse piante, in base alla loro appartenenza specifica (tabella 1) mentre la loro distribuzione viene presentata nella cartografia allegata.

La percentuale di attecchimento delle piante messe a dimora è molto alta; le piante all'interno delle aiuole risultano fitte e, nella maggior parte dei casi, non è possibile notare spazi vuoti corrispondenti a fallanze. Ciononostante il numero totale delle piante rilevate (8554) è significativamente inferiore al numero delle piante poste a dimora (circa 13000). L'apparente bassa percentuale di attecchimento (66%) è da attribuire pertanto alla morte di un considerevole numero di piantine causata dagli sfalci del tappeto erboso, effettuati nei mesi successivi all'impianto dal personale della SOGENUS. Tale operazione infatti non era facile da eseguire sino a quando non sono stati inseriti segnali a livello di ogni piantina che successivamente sono stati sostituiti con tubi di plastica molto più resistenti e di difficile asportazione dagli agenti atmosferici. Ulteriori danneggiamenti alle aiuole sono stati inoltre provocati durante le operazioni di riposizionamento dei tubi collettori per la captazione del gas. A tal proposito occorre rilevare che alcune aiuole appaiono ridotte a qualche sparuto nucleo di individui separati dai tracciati lasciati dalla fresatrice mentre altre aiuole sono state completamente distrutte.

Al contrario la percentuale di individui che sono morti dopo l'avvenuto attecchimento è straordinariamente bassa e misurabile in circa 0.01 %. Lo stato di salute delle piante è complessivamente alquanto soddisfacente: ad una osservazione più attenta si è appurato che molti degli individui che apparvero



morti durante i sopralluoghi primaverili erano in realtà soltanto fortemente stressati e deperenti in quanto hanno generato nuovi vigorosi ricacci, durante il periodo estivo, avendo in questo beneficiato di un copioso apporto di acqua a seguito degli efficaci interventi di irrigazione manuale effettuati dalla SOGENUS. Il forte stress sofferto, particolarmente vistoso in alcuni individui di talune specie, è stato causato, oltre che dalle alte temperature registrate in primavera e all'inizio dell'estate, presumibilmente anche dall'attacco di molluschi. In effetti durante i sopralluoghi di monitoraggio si è avuto modo di osservare, oltre ai danni prodotti agli apparati fogliari, un'ingente quantità di chiocciole che si annida, durante le ore diurne, all'interno dei cilindri di materiale plastico posti a protezione del colletto delle piante.

La Ginestra (*Spartium junceum*), la Tamerice (*Tamarix africana*) e la Rosa canina (*Rosa canina* gr.) sono senza alcun dubbio le specie che presentano gli accrescimenti maggiori in quasi tutti i settori della discarica; un ottimo stato complessivo è inoltre presentato dalle piante di Sanguinello (*Cornus sanguinea*) le quali, pur avendo dimensioni contenute, mostrano un accrescimento armonioso del fusto ed una chioma folta e sana. In generale le piante di Olmo minore (*Ulmus minor*), tranne alcuni casi isolati, dimostrano accrescimenti modesti ed lo sviluppo della chioma piuttosto stentato. Comportamenti analoghi presentano anche le piante di Biancospino (*Crataegus monogyna*) e di Prugnolo spinoso (*Prunus spinosa*) che, a volte, assumono anche aspetto clorotico. Le piante di Biancospino presentano, un po' ovunque, massicci attacchi da parte di insetti galligeni, con conseguente danneggiamento dell'apparato fogliare.

Il pieno successo dell'impianto permette di escludere la programmazione di un intervento di risarcimento delle fallanze. Infatti, come già accennato più sopra, le aiole che non sono state distrutte successivamente all'impianto, appaiono molto fitte. Occorre in ogni caso precisare che gli impianti sono stati effettuati in soprannumero in quanto si prevedeva di attuare, qualora necessari, interventi di diradamento. Complessivamente la percentuale ottenuta corrisponde quindi a quella prevista dal progetto. Non si ritiene infatti opportuno, per il momento, ridurre ulteriormente il numero delle piante con operazioni di diradamento in previsione della possibilità che un certo numero di morti possa verificarsi nella fase di accrescimento delle piante e di approfondimento delle radici.

Da ultimo si consiglia un intervento antiparassitario mediante l'utilizzo di un lumachicida a formulazione granulata, da porre manualmente all'interno dei



cilindri plastici posti a protezione dei colletti delle piante. A tal proposito si segnala la presenza sul mercato di prodotti consentiti in agricoltura biologica perché innocui per organismi diversi da limacce e chioccioline.

### **Realizzazione di un'aiola sperimentale a Canna del Reno (*Arundo pliniana* Turra)**

Nel settore occidentale della discarica è stata effettuata la piantumazione di un quantitativo di rizomi di Canna del Reno (*Arundo pliniana*). Si tratta di una graminacea a diffusione mediterranea che in contesti naturali vegeta preferibilmente in corrispondenza di suoli argillosi più o meno umidi, sponde fluviali ed alvei. La Canna del Reno è dotata di rizomi i quali sviluppano presto un intricato, esteso e relativamente profondo groviglio di radici. Dai rizomi si innalzano numerosi culmi eretti che possono raggiungere altezze di 1 - 2 metri, a seconda delle condizioni ambientali in cui la pianta si trova a vivere. I fitti canneti che ne derivano esercitano in natura un ruolo indiscutibilmente importante nell'azione di consolidamento dei versanti e di regimazione delle acque di scorrimento.

Date le sue caratteristiche fisiologiche e morfologiche si ritiene di poter proporre l'utilizzo di questa specie, in via sperimentale, nella ricostruzione ambientale dei banchi di discarica dismessi. L'azione vantaggiosa del canneto risulterebbe infatti esercitata sia dagli apparati radicali, particolarmente efficaci nel consolidamento dei pendii soprattutto in suoli argillosi e destrutturati, sia dalle parti aeree, le quali garantiscono un veloce e completo ricoprimento del suolo proteggendolo dall'azione battente della pioggia e dai processi erosivi. Quest'ultimo, grazie al folto fogliame, è capace di un'intensa attività traspirante che contrasta il ruscellamento superficiale ed il ristagno idrico, ed infine, genera un soprassuolo ideale per l'ingresso di comunità animali. In caso di successo questa specie potrà essere pertanto aggiunta all'elenco di quelle giudicate adatte sia ai fini del completo reinserimento estetico-paesaggistico dei banchi di discarica sia nella realizzazione di ecosistemi stabili, funzionali e di buona qualità ambientale.

In questa prima fase si è ritenuto di dover limitare l'impianto sperimentale ad un'area di dimensioni piuttosto contenute e di effettuare una piantumazione su ampia scala solo dopo aver valutato il successo dell'intervento e le eventuali, seppur remote, problematiche connesse alla gestione e al controllo della proliferazione del canneto.



L'aiola è stata realizzata in un pendio del settore occidentale della discarica, in una zona in cui, a causa di un evidente cambio di pendenza, si evidenzia un ciglio, il quale potrebbe essere particolarmente soggetto all'azione erosiva dell'acqua.

L'impianto è stato effettuato alla fine di settembre utilizzando piante allevate in vaso, con culmi di altezza media di 50 cm (i culmi fioriti presentano altezze superiori). Le piante sono state messe a dimora senza rompere il pane di terra (3 – 4 piedi per vaso).

### **Azioni future**

Gli apparati radicali delle piante delle differenti specie verranno analizzati durante il prossimo autunno, fino alla primavera del 2011, mediante la posa in opera di rizotroni (una metodologia che consente l'osservazione diretta degli apparati radicali e, per un periodo di durata limitata, il loro accrescimento). A seguito di tale studio verranno raccolte informazioni riguardanti la presenza di eventuali fattori di ostacolo al regolare sviluppo delle radici. Saranno inoltre rilevati i tassi di accrescimento di alcune piante campione delle varie specie al fine di valutare, attraverso il confronto dei risultati, l'influenza esercitata dalle condizioni ambientali dei vari settori della discarica e, in generale, apprezzare indirettamente l'eventuale rallentamento dovuto alle particolari caratteristiche del suolo (carenza di nutrienti organici, possibile riscaldamento dovuto ai processi fermentativi degli strati di rifiuti, eventuale influenza di gas tossici sugli apparati radicali, criticità del regime idrico legata alla composizione del suolo e alla presenza dello strato impermeabile superficiale ecc.). In tale occasione, sulla scorta di dati quantitativi, sarà possibile trarre conclusioni riguardanti l'effettivo stato di salute delle piante delle differenti specie e stimare l'eventuale insorgenza di future criticità legate all'indispensabile sviluppo, anche in profondità, degli apparati radicali, in risposta delle accresciute esigenze idriche delle piante.



Figura 1. A sinistra: vigorosi esemplari di sanguinello; rispetto alle stagioni precedenti in cui la specie risultava stentata, nel corso di questa stagione appare in ottimo stato di salute, come la Ginestra e la Tamerice. A destra: ricaccio di ginestra da un individuo



Figura 2. Individui di Tamerice, una delle specie che hanno realizzato i maggiori accrescimenti.



Figura 3. Aiola a Canna del Reno e particolare di alcuni individui.

Hanno contribuito a questa fase della ricerca: dott. M. Bianchelli, F. Bigara,  
dott. M. Galiè, dott. M. Morbidoni, M. Paoli, S. Tiberi.

**Responsabile Scientifico**  
**Prof. Edoardo Biondi**





Tabella 1 – Censimento delle piante sopravvissute e morte presenti nell'area di ripristino ambientale della discarica SOGENUS, effettuato alla fine del mese di settembre 2010

Prog.	Specie	N°	Morti	NOTE
1	Biancospino	53		Piante sane e regolarmente sviluppate. Attacco di insetti galligeni.
3	Sanguinello Olmo minore	34 10		Piante sane e regolarmente sviluppate.
4	Olmo minore Orniello Sanguinello	106 2 1		Piante complessivamente poco sviluppate ma sane.
5	Olmo minore Orniello	13 4		Un individuo presenta accrescimento ragguardevole. Piante complessivamente poco sviluppate. Un individuo alquanto stentato. Le piante di questa aiola hanno subito lo sfalcio.
8	Olmo minore	16	1	Piante complessivamente poco sviluppate. Un individuo completamente defogliato da parassiti.
9	Sanguinello Prugnolo	8 28		Piante sane e ben sviluppate. Alcune individui presentano accrescimenti alquanto ridotti.
10	Biancospino	46	1	
11	Tamerice	8		Piante sane e ben sviluppate.
12	Sanguinello	33		Piante sane e ben sviluppate.
13	Rosa canina	34		Piante sane, ben sviluppate ed alquanto vigorose.
14	Tamerice	74	3	Piante sane e ben sviluppate.
15	Rosa canina	33		Piante sane, ben sviluppate ed alquanto vigorose.
16	Ginestra	134	3	Piante complessivamente in ottimo stato di salute. 4 individui presentano accrescimento molto ridotto (ma probabilmente hanno subito lo sfalcio) o clorosi.
17	Ginestra Biancospino	55 3		Piante complessivamente in ottimo stato di salute.
18	Rosa canina Sanguinello	16 2	1	
19	Orniello	19		Alcuni individui assai stentati. Probabilmente hanno subito lo sfalcio.
20	Sanguinello Prugnolo	64 2	1	Piante in ottimo stato di salute.
21	Orniello	142	1	Piante complessivamente poco sviluppate. 5 individui appaiono particolarmente sofferenti.
22	Orniello	171		Piante complessivamente poco sviluppate. 4 individui completamente defogliati ma con gemme.
23	Tamerice	29		Piante sane e ben sviluppate.
24	Rosa canina	33		Piante sane e alquanto vigorose.
25	Tamerice	25		Piante in ottimo stato di salute. L'aiola, originariamente più grande, appare oggi divisa in due aree distinte con 19 e 6 individui rispettivamente.
26	Olmo minore	41		Ottimi accrescimenti. Alcuni individui appaiono particolarmente vigorosi. Una pianta ha subito lo sfalcio.
27	Ginestra	744	4	Per lo più si tratta di piante sane e vigorose sebbene alcuni individui appaiono poco sviluppati, clorotici o parzialmente disseccati.
28	Olmo minore Sanguinello	186 50		Piante poco sviluppate ma complessivamente sane. Piante particolarmente sofferenti e poco sviluppate.



	Prugnolo Orniello Ginestra	128 19 6		Piante assai stentate e sofferenti.
29	Tamerice Roverella	25 18	1	Piante sane e ben sviluppate. Piante poco sviluppate ma sane.
30	Prugnolo	82	1	Piante di dimensioni alquanto ridotte ma sane. 3 individui sofferenti.
30bis	Tamerice	2		
31	Ginestra	191		3 individui poco sviluppati e clorotici. Sesto di impianto molto ridotto.
32	Sanguinello	4		Aiola danneggiata dalla fresa.
33	Olmo minore	20		Piante poco accresciute ma sane.
34	Olmo minore Orniello	21 4		Piante in ottimo stato. Piante in ottimo stato.
35	Sanguinello Olmo minore	9 6		Piante in ottimo stato. Piante stentate.
36	Olmo minore Prugnolo	81 97	2 4	Piante piuttosto stentate. Gli individui morti presentano un certo accrescimento. Piante piuttosto stentate. Alcuni individui disseccati presentano ricacci dalla base.
37	Ginestra Prugnolo Sanguinello Olmo minore	48 59 12 12	1	Piante sane. 1 individuo presenta parti disseccate. 5 individui alquanto sofferenti. Piante vigorose.
38	Prugnolo Sanguinello	17 2		Piante sane. Piante sane.
39	Prugnolo Sanguinello	9 17	5	Piante di dimensioni ridotte Piante sofferenti.
40	Sanguinello Biancospino (Salice)	8 20 1		Piante alquanto sofferenti. Buono stato di salute. Accrescimento eccezionale.
41	Biancospino	70	2	Buono stato di salute.
42	Olmo minore	60	3	Accrescimenti ridotti ma buono stato di salute complessivo.
44	Olmo minore	21		Buono stato di salute. 1 individuo presenta accrescimento eccezionale.
45	Ginestra	44		Ottimo stato di salute.
46	Sanguinello	78	2	Ottimo stato di salute.
47	Olmo minore	93	1	Accrescimenti alquanto ridotti. 25 individui completamente defogliati ma con gemme. 4 individui assai vigorosi e con ottimi accrescimenti.
48	Olmo minore	19		3 individui poco sviluppati e stentati.
49	Tamerice	17		Piante sane e ben sviluppate.
50	Rosa canina	26		Ottimo stato di salute.
51	Ginestra	41		Ottimo stato di salute complessivo. 1 individuo sfalciato.
52	Olmo minore	89	1	Per lo più si tratta di piante sane ma poco vigorose.
53	Rosa canina	33	2	Ottimo stato di salute.
54	Biancospino Tamerice Prugnolo Olmo minore Acero campestre	109 59 65 19 16		Ottimo stato di salute.  Accrescimenti ridotti. 5 individui particolarmente sofferenti. Piante sofferenti. Apparato fogliare fortemente attaccato da lumache.
55	Biancospino	123	1	



	Ginestra	15		
	Tamerice	5		
56	Tamerice	29	1	
	Ginestra	12		1 individuo clorotico.
57	Ginestra	13		Ottimo stato di salute. 1 individuo poco sviluppato.
58	Ginestra	58	2	Buono stato di salute. 2 piante clorotiche. Alcuni individui presentano parti disseccate.
59	Olmo minore	21		Piante sane e vigorose.
	Biancospino	1		Pianta sana e ben sviluppata.
	Berretta da prete			Pianta sana e ben sviluppata.
60	Sanguinello	13		Alcuni individui assai poco sviluppati.
61	Rosa canina	30		Ottimo stato di salute. 1 individuo poco sviluppato.
62	Biancospino	125	2	Sviluppi molto contenuti.
63	Olmo minore	2		Buono stato di salute.
	Berretta da prete	8		Ottimo stato di salute.
	Biancospino	6		Ottimo stato di salute.
64	Olmo minore	11		Piante sane.
	Berretta da prete	1		Pianta sana e ben sviluppata.
	Orniello	6		Buono stato di salute.
	Biancospino	7		Piante sane.
66	Biancospino	37		Buoni accrescimenti. Massiccio attacco di galligeni.
	Sanguinello	1		Ottimo stato di salute.
67	Biancospino	53		Piante sane, alcune alquanto vigorose.
	Orniello	6		
	Rosa canina	11		
	Sanguinello	5		Sviluppi modesti.
68	Biancospino	43		4 individui assai poco sviluppati.
	Prugnolo	9		
69	Biancospino	49		Buoni accrescimenti. Massiccio attacco di galligeni.
70	Ginestra	16		Ottimo stato di salute.
72	Rosa canina	299		Ottimo stato di salute.
	Ginestra	14	2	
74	Rosa canina	140	1	Piante complessivamente in buono stato. 5 individui appaiono stentati e poco accresciuti.
75	Ginestra	5		
76	Tamerice	9	2	
77	Orniello	10		Hanno subito lo sfalcio.
78	Ginestra	8		Buono stato di salute.
	Tamerice	6		1 individuo sofferente.
79	Ginestra	23		Ottimo stato di salute.
80	Tamerice	10	2	Ottimo stato di salute.
	Ginestra	5		Piante sane.
83	Prugnolo	88	1	Buono stato complessivo. Alcuni individui molto vigorosi.
	Biancospino	49		Buono stato complessivo. 5 individui attaccati pesantemente da parassiti galligeni.
	Sanguinello	35		3 individui assai stentati.
	Ginestra	5		Piante sane.
84	Ginestra	3	1	Aiola originariamente più grande e fortemente danneggiata dalla fresa.
85	Biancospino	35		Buono stato complessivo. 3 individui assai poco sviluppati.



	Ginestra Olmo minore Sanguinello	33 19 10		Ottimo stato di salute. Buono stato complessivo. Ottimo stato di salute.
86	Olmo minore Orniello	44 5		Ottimo stato di salute. Buono stato di salute.
87	Olmo minore Orniello	34 6		Buono stato complessivo. 3 individui assai poco sviluppati. Buono stato di salute.
88	Rosa canina Prugnolo Sanguinello	5 4 1		Ottimo stato di salute.
89	Ginestra	18		Ottimo stato di salute.
91	Ginestra  Sanguinello Prugnolo Rosa canina Olmo minore	79  60 30 5 2	2  2	Ottimo stato di salute. 2 individui disseccati dopo accrescimento. Ottimo stato di salute. Piante piuttosto stentate. Ottimo stato di salute. Ottimo stato di salute. Piante molto vigorose.
92	Prugnolo	120	2	Per lo più si tratta di piante sane ma poco sviluppate. Alcuni individui particolarmente minuti.
93	Olmo minore Sanguinello	66 7		Buono stato complessivo. 4 individui straordinariamente sviluppati. Buono stato di salute.
96	Olmo minore Biancospino Tamerice  Prugnolo Orniello Rosa canina	37 29 21  18 16 1		Ottimo stato di salute. Ottimo stato di salute. Ottimo stato di salute. Alcuni individui eccezionalmente sviluppati. Piante sane, sviluppo modesto. Piante sane, sviluppo modesto.
97	Ginestra Rosa canina Olmo minore Orniello  Biancospino Prugnolo	60 54 48 46  44 6	2  1	Ottimo stato di salute. Ottimo stato di salute. Ottimo stato di salute ed accrescimenti notevoli. Complessivamente sane ma con accrescimenti contenuti. Alcuni individui di taglia ridottissima. Ottimo stato di salute.
98	Ginestra Sanguinello	198 20	2	Ottimo stato di salute. Piante sane, sviluppo modesto.
99	Tamerice	23		Ottimo stato di salute.
100	Ginestra	191	17	Complessivamente piante in ottimo stato di salute. 5 individui presentano accrescimenti alquanto ridotti.
101	Ginestra	49		Ottimo stato di salute.
102	Ginestra	147	3	Ottimo stato di salute.
103	Ginestra	161		Ottimo stato di salute.
104	Sanguinello Ginestra Prugnolo  Rosa canina	108 85 36  16	1	Ottimo stato di salute. Ottimo stato di salute. Ottimo stato di salute. Alcuni individui eccezionalmente sviluppati.
105	Olmo minore	70		Ottimo stato di salute ed accrescimenti soddisfacenti.
106	Biancospino	341		Buono stato di salute.
107	Prugnolo	363	6	Complessivamente piante in ottimo stato di salute. 9 individui appaiono sofferenti.



108	Sanguinello	181	1	Ottimo stato di salute.
109	Sanguinello	54		Ottimo stato di salute.
110	Ginestra	11		Ottimo stato di salute.
111	Tamerice	25		Buono stato di salute. 2 individui danneggiati presentano ricacci dalla base.
112	Orniello	19		Piante di taglia ridottissima. 1 individuo ben sviluppato.
113	Biancospino	28		Ottimo stato di salute.
114	Rosa canina	38		Ottimo stato di salute.
116	Roverella Tamerice	5 1		Piante sane ma di dimensioni modeste.
<b>TOT.</b>		<b>8554</b>	<b>94</b>	



## **2. STUDIO DELLA CRESCITA E DEL METABOLISMO RADICALE PRESSO LA DISCARICA SOGENUS**

### **Relazione**

In questi primi mesi di attività presso la discarica Sogenus si è proceduto alla messa a punto della tecnica di studio delle radici in ambienti ricostruiti. In particolare grazie al progetto è stato acquistato uno strumento per lo studio della respirazione (Oxigraph) che consente di studiare il metabolismo delle radici. Lo studio è cominciato considerando tutte le limitazioni legate all'architettura delle radici, ovvero della loro età. Per la messa a punto delle tecniche è stata utilizzata come pianta modello l'olivo. Vengono presentati i primi risultati, che serviranno da base per le successive specifiche attività di misura sulle diverse specie presenti in discarica.

Il lavoro sul metabolismo radicale è inserito nell'attività di ricerca del programma di dottorato della d.ssa Polverigiani di cui si riportano alcuni risultati. In particolare l'attività metabolica radicale è significativamente influenzata dall'età delle strutture prese in esame. Radici fino a 14 giorni di età hanno mostrato un livello di respirazione fino a sei volte più alto rispetto a radici di età superiore. Dopo 14 giorni il livello di metabolismo continua a decrescere ma in maniera più graduale. Questo conferma la forte dinamica della crescita delle radici, che in fase assorbente presentano una ridotta longevità, limitata a pochi mesi.

Si può sottolineare che il metabolismo cambia anche in funzione delle condizioni ambientali. In questo caso sono riportati dati di respirazione di campioni di radici prelevati in presenza di pacciamature organiche morte (mulch) e in presenza di radici di altre piante erbacee vive (grass). Per ciò che riguarda l'effetto del trattamento, radici di età compresa tra i 15 ed i 28 giorni mostrano livelli significativamente più alti nel trattamento pacciamato rispetto all'inerbito. Per radici più vecchie le differenze non sono invece significative (fig.1). Questo tipo di confronto statistico non è stato possibile per radici di età inferiore ai 14 giorni delle quali il campione è risultato non sufficientemente numeroso.

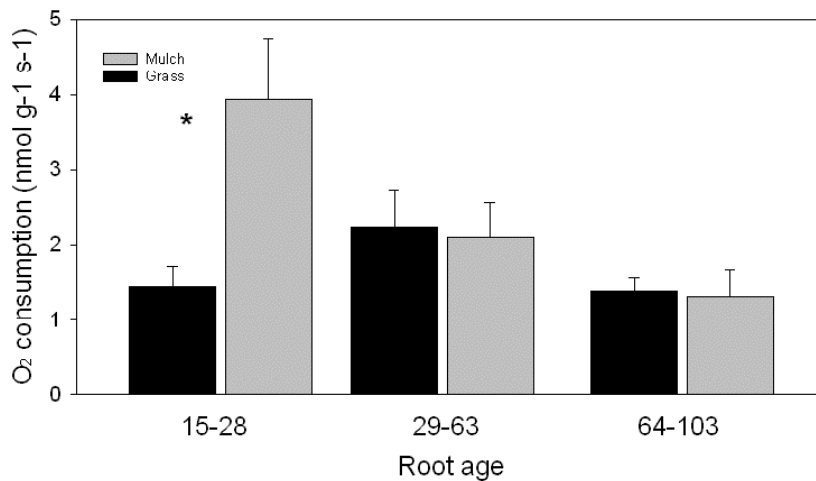


Figura 1. Attività di respirazione radicale come influenzata dal trattamento e dall'età della radice (Polverigiani 2010)

L'analisi sul livello di integrità delle strutture non ha mostrato differenze significative legate all'età delle strutture, né al trattamento (fig. 2).

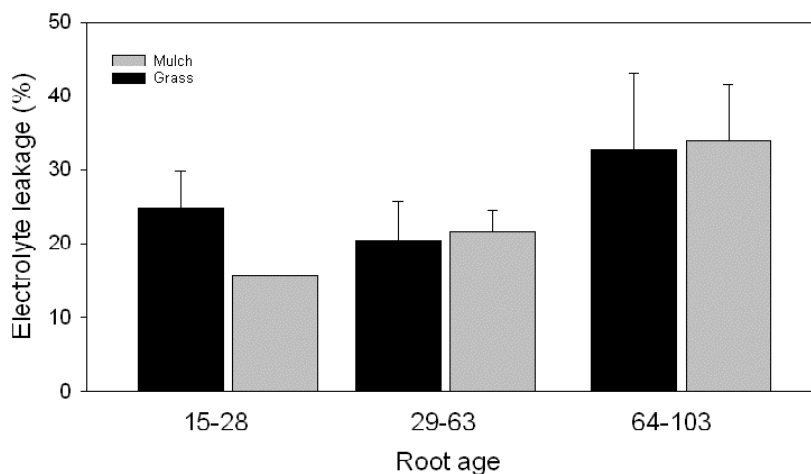


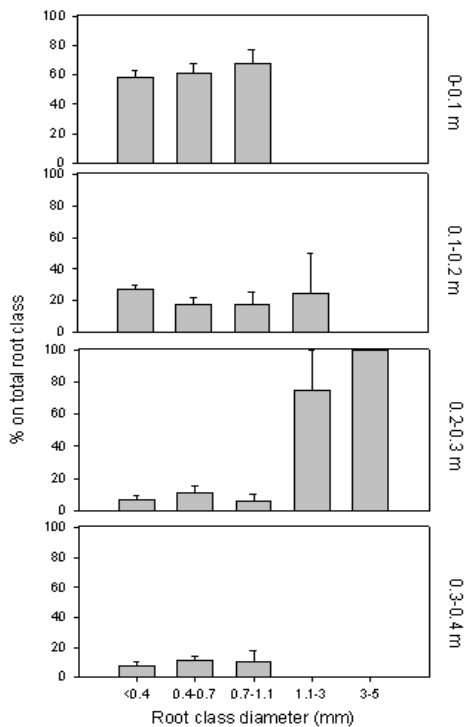
Figura 2. Livello di integrità delle strutture cellulari come influenzato dal trattamento e dall'età della radice (Polverigiani et al. 2010)

In base a queste positive premesse, lo studio dei fattori di attecchimento e crescita delle piante arboree e arbustive presenti nella discarica verranno di seguito studiate durante le stagioni a partire dall'autunno in corso, facendo riferimento in modo prioritario al metabolismo delle radici.

Lo studio prevede la descrizione dell'approfondimento delle radici e della occupazione del substrato di copertura, i ritmi di crescita e l'approfondimento di alcune specie arboree e arbustive messe a dimora negli anni precedenti.

L'obiettivo è quello di individuare le specie che più si adattano alle condizioni di crescita e studiare i fattori che hanno limitato lo sviluppo delle specie con elevate perdite in fase di trapianto. In particolare lo studio consentirà di capire i limiti del

tipo di copertura finale utilizzato e suggerire alcune tecniche agronomiche per superare le difficoltà di attecchimento e crescita della copertura vegetale basata su specie autoctone.



**Topografia ed accrescimenti stagionali**  
 Per l'olivo oltre il 59% del numero di radici assorbenti e oltre il 67% di quelle di terzo ordine si trova concentrato nei primi 0,1 m di suolo (fig 3). Mentre oltre l'87% di radici di ordine superiore al terzo, trasmigranti e di trasporto, si trovavano collocate ad una profondità di 0,2-0,3 m.

Figura 3. Distribuzione delle radici di piante di tre anni appartenenti alle 5 classi di diametro, alle varie profondità. Il dato indica la percentuale di radici localizzate ad ogni livello di profondità sul totale per ciascuna delle classi. Le barre indicano l'errore standard. (Polverigiani et al 2010)

La totalità delle radici incontrate nei successivi monitoraggi hanno avuto un diametro compreso tra 0,54 e 1,7 mm (decimo e novantesimo percentile) e si tratta evidentemente di strutture pioniere (fig 4). Dalle radici principali sono state emesse un minimo numero di laterali, ma il loro diametro fa pensare a strutture destinate anch'esse a funzioni di esplorazione e trasporto.



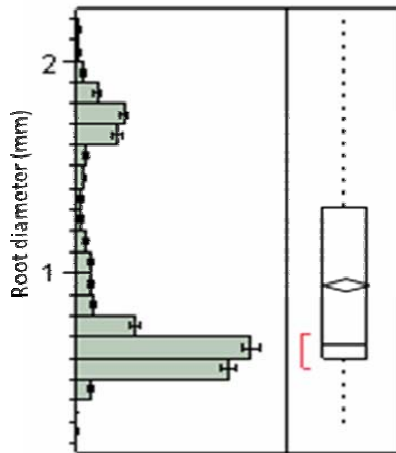


Figura 4. Distribuzione dei diametri delle radici prodotte.

Le barre indicano 75, 50 e 25esimo percentile della distribuzione. La bisettrice del rombo indica il valore medio ed i vertici la deviazione standard. Il simbolo [ ] identifica la moda. (Polverigiani et al 2010)

### **Evoluzione dello studio in discarica**

Su alcune specie presenti in discarica è in programma lo scavo dell'apparato radicale in modo da poter studiare la loro fisiologia radicale (respirazione e caratteristiche morfologiche). Gli scavi e i rizotroni a finestra posizionati in discarica consentiranno anche di evidenziare architettura e crescita radicale oltre a eventuali necrosi radicali collegabili ad eventuali molecole tossiche (metano o altro).

Verrà indagata inoltre la capacità esplorativa delle radici, in relazione alla temperatura e all'umidità lungo il profilo per evidenziare i fattori limitanti della crescita radicale nel caso specifico della discarica. Lo studio sulla fisiologia radicale evidenzierà le differenze di comportamento fra specie e la presenza di eventuali stress ambientali indotti dalla copertura della discarica.

Hanno contribuito a questa fase della ricerca: A. Fileri, , Dott. R. Gangatharan, F. Pica, dott.a S. Polverigiani, dott. S. Tadesse.

**Responsabilità scientifica: Prof. Davide Neri, Dott. Francesca Massetani**

### **3- BIOMONITORAGGIO AMBIENTALE TRAMITE L'UTILIZZO DI APIS MELLIFERA** **- FASE C**

#### **RELAZIONE ATTIVITA' ANNO 2010**

Lo scopo dello studio è stato quello di costituire una stazione per il biomonitoraggio mediante l'uso dell'*Apis mellifera* L. al fine di controllare la qualità ambientale nel sito SOGENUS, Moie – Maiolati Spontini (AN) (Foto 1, 2 e 3) per quanto riguarda i fitofarmaci ed i metalli pesanti.

L'unità fondamentale di rilevamento è stata la stazione di biomonitoraggio, composta da due alveari con famiglie d'api omogenee per quanto riguarda lo stato di salute e la "forza". Gli alveari sono stati posizionati in data 01-05-2010 all'interno del sito Sogenus nel comune di Maiolati Spontini ed i campioni prelevati fino al mese di ottobre dello stesso anno. Le arnie utilizzate sono arnie razionali del tipo Dadant-Blatt standard che sono state indicate come alveare A ed alveare B in modo da avere dati disgiunti.

Dopo aver provveduto al posizionamento delle arnie è stato eseguito un apposito controllo sia sanitario delle colonie che della "forza" delle stesse. La valutazione della forza della famiglia è stata effettuata mediante accurati controlli degli alveari, in cui venivano registrati l'attività delle bottinatrici di fronte all'alveare, l'età della regina, il numero dei telaini occupati dalle api, il numero di telaini di covata, la compattezza o discontinuità di quest'ultima, ecc.

Le arnie sono state poste sopra un apposito rialzo al fine di permettere il corretto utilizzo dell'underbasket (Foto 1).



**Foto 1.** Stazione di monitoraggio del sito SOGENUS.



E' stata redatta, inoltre, una mappa colturale del sito in relazione al raggio esplorato dalle api nella loro attività di bottinamento. Dato che le api bottinano un'area di circa 7 chilometri quadrati è stata presa in considerazione un'area di raggio 1,5 chilometri a partire dalla stazione di monitoraggio.

### **BIOMONITORAGGIO DEI PRODOTTI FITOSANITARI**

Per rilevare la mortalità delle api sono state posizionate, di fronte al predellino di volo dell'alveare, due speciali gabbie (di tipo underbasket) per la raccolta delle api morte. Queste ultime all'interno dell'alveare, o ancora moribonde, sono trasportate all'esterno da operaie specializzate nella pulizia dell'arnia (necrofore). L'uso delle underbasket, poste davanti all'alveare, permette quindi il conteggio ed il campionamento dei corpi delle api morte.

Gli alveari vengono settimanalmente controllati sia per ciò che concerne l'aspetto sanitario che per il conteggio delle api morte.

Al superamento della soglia critica di mortalità (fissata in 250 api morte/settimana/stazione), le api morte, presenti nelle gabbie underbasket, vengono prelevate, conservate in freezer per poi essere liofilizzate e inviate al laboratorio Agrochimico dell'ASSAM di Jesi (AN). I campioni verranno sottoposti ad analisi sia per individuare l'eventuale principio attivo responsabile dell'apicidio che per riconoscere i granuli pollinici presenti sul corpo delle api attraverso l'analisi melissopalinochimica, in modo da poter localizzare le aree probabilmente inquinate.

### **BIOMONITORAGGIO DEI METALLI PESANTI**

Per il monitoraggio dei metalli pesanti vengono analizzati, mensilmente, dal 30/04 al 30/10, alcuni campioni di miele (circa 70 grammi) ed un campione di 200 api bottinatrici (campionate nel momento di ritorno all'alveare) (Foto 2). Il miele viene prelevato, conservato in frigo fino al momento dell'invio al laboratorio analisi dell'ASSAM mentre le api vengono conservate in freezer e poi liofilizzate.



**Foto 2.** Prelievo delle bottinatrici per le analisi metalli pesanti .

### **Protocollo utilizzato per l'analisi dei metalli pesanti, matrice api vive.**

Per migliorare la ripetitività delle analisi è stato liofilizzato il campione, in questo modo è stato possibile poi sminuzzarlo e omogeneizzarlo mediante un mortaio. Una volta omogeneizzato il campione è stato mineralizzato mediante sistema a microonde utilizzando liner dedicati (Tab. 1):

- Pesare 0,5 g di campione;
- Aggiungere+ 1,5 mL HNO<sub>3</sub> suprapur + 0,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suprapur;

Quindi si è proceduto alla mineralizzazione con il seguente programma: dopo raffreddamento si porta a volume di 25 ml senza filtrare in quanto il campione si scioglie completamente. I liner sono lavati dopo ogni ciclo, inoltre ogni ciclo ha un suo testimone (bianco). E' importante che il campione da mineralizzare sia completamente bagnato prima di procedere alla mineralizzazione, a questo scopo si può aggiungere acqua Milli-Q direttamente nel liner.

<b>Tabella 1. Mineralizzazione campioni</b>		
<b>Step</b>	<b>Tempo (min.)</b>	<b>Potenza (watt)</b>
1	5	500
2	5	350

<b>Tabella 2. Analisi strumentale api</b>		
<b>Elemento</b>	<b>Tecnica analitica</b>	<b>Tenori puramente indicativi</b>
Cadmio	GTA-AAS-Zeeman	0,1 ÷ 0,3 mg/kg
Cromo	GTA-AAS-Zeeman	0,1 ÷ 0,2 mg/kg
Nichel	ICP-AES	0,2 ÷ 2 mg/kg
Piombo	GTA-AAS-Zeeman	0,2 ÷ 4 mg/kg
Zinco	ICP-AES	50-200 mg/kg
Rame	ICP-AES	10-50 mg/kg

### Protocollo utilizzato per l'analisi dei metalli pesanti, matrice miele.

Il campione viene diluito con acqua Milli-Q e successivamente mineralizzato in microonde se devono essere ricercati metalli da quantificare in ICP-AES e/o ICPMS. La diluizione con acqua è fatta con un rapporto 1:2, in questo modo il campione è omogeneizzato ed è anche pronto per la determinazione in fornello di grafite AAS-GTA-Zeeman. Il prelievo del miele deve essere fatto sempre con bacchette di vetro o plastica, non si possono usare spatole metalliche, inoltre tutti i contenitori e la vetreria deve essere preconditionata in HNO<sub>3</sub> suprapur e acqua Milli-Q.

Diluizione in boccettine da 100 mL preconditionati:

- Pesare esattamente circa 25 g di campione;
- Aggiungere 15 ml di acqua Milli-Q (agitare e tappare con sottotappo e tappo);
- Mettere in bagno maria a 30-40 °C per 15 minuti quindi in bagno ad ultrasuoni per 15 minuti;
- Portare a volume di 50 mL esatti in matracci tarati di classe A con acqua Milli-Q;
- Conservare il campione diluito in frigorifero oppure in congelatore.

La mineralizzazione è eseguita mediante sistema a microonde utilizzando liner dedicati. Si trasferisce 1 ml di campione diluito 1:2 con acqua, si aggiungono 5 ml di HNO<sub>3</sub> suprapur e 1 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suprapur quindi si procede con la mineralizzazione con il seguente programma: Dopo raffreddamento si porta a volume finale di 25 ml senza filtrare.

Step	Tempo (minuti)	Potenza (watt)
1	1	200
2	2	0
3	5	200
4	5	300
5	5	400
6	5	500

Elemento	Tecnica analitica	Tenori puramente indicativi
Cadmio	GTA-AAS-Zeeman su diluizione	Raramente rilevato 0,005
Cromo	GTA-AAS-Zeeman su diluizione	0,005 ÷ 0,05 mg/Kg
Nichel	GTA-AAS-Zeeman su diluizione	0,020 ÷ 0,5 mg/Kg
Piombo	GTA-AAS-Zeeman su diluizione	0,01 ÷ 0,05 mg/Kg
Rame	ICP-AES su mineralizzato	0,5 ÷ 2 mg/Kg
Zinco	ICP-AES su mineralizzato	1 ÷ 3 mg/Kg



## Protocollo utilizzato per l'analisi dei granuli pollinici

Analisi melissopalinoologica qualitativa. Si pesano 10 g di miele in 1 provetta a fondo conico da 50 ml e si sciolgono con circa 45 ml di acqua (può essere usata anche acqua calda ma con temperatura non superiore a 40 °C). Si centrifuga la soluzione per 10 min. (2500/3000 ppm) e si decanta (elimina) il surnatante. Al sedimento viene aggiunta acqua (si riporta a volume: 45 ml), e si centrifuga nelle stesse condizioni per 10 min. Dopo aver decantato il surnatante l'intero sedimento viene disperso accuratamente con una pipetta Pasteur e trasferito su un vetrino portaoggetti cercando di distribuirlo uniformemente su una superficie di circa 1 cm<sup>2</sup> o comunque pari alla superficie del vetrino coprioggetto. Si lascia asciugare (eventualmente su piastra a T < 40 °C). Quando il sedimento è asciutto viene incluso in una goccia di gelatina glicerinata (liquefatta a bagnomaria) e coperto con un vetrino coprioggetto. Osservazione microscopica: si procede all'osservazione al microscopio del sedimento, identificando e contando i tipi pollinici. L'identificazione viene fatta riferendosi alla bibliografia e ai preparati di riferimento.

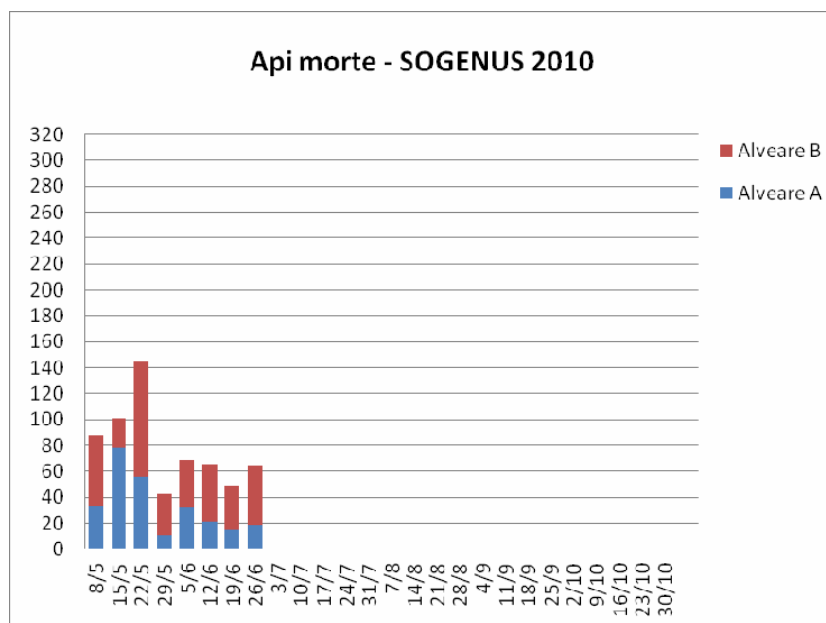
Nomenclatura adottata. I tipi pollinici sono indicati con il nome scientifico del gruppo botanico di appartenenza (specie, genere o famiglia) solo nel caso in cui l'identificazione possa essere fatta con un sufficiente grado di sicurezza. In tutti gli altri casi si aggiunge al nome scientifico un termine per indicare un raggruppamento tassonomico più ampio:

- **gruppo:** quando il polline è identico o molto simile al *taxon* indicato, ma potrebbe appartenere ad altre specie affini (es. *Trifolium repens* gr. indica *T. repens* ma anche *T. hybridum*, *T. arvense*);
- **forma:** quando il polline ha le stesse caratteristiche del *taxon* indicato, ma potrebbe appartenere a un altro genere (es. Composita forma S indica più generi, quali *Carduus*, *Cirsium*, *Galactites*, *Serratula*, ecc.);
- **tipo:** quando il polline mostra una somiglianza con il *taxon* indicato, ma potrebbe appartenere a un altro gruppo botanico.

## RISULTATI ANALISI FITOFARMACI, ANNO 2010

### Risultati campionamento api morte.

Il numero soglia di 200 api/settimana/postazione fino alla data del 26 giugno non è stato mai superato (Graf. 1).



**Grafico 1.** Andamento mortalità api prelevate negli underbasket, divisi per alveari (A e B), effettuate nella stazione SOGENUS a Moie – Maiolati Spontini (AN), anno 10

### **Risultati analisi metalli pesanti matrice api vive.**

Le api vive liofilizzate sono state consegnate al Laboratorio Agrochimico dell'ASSAM di Jesi ma i valori dei metalli pesanti rilevati analiticamente non sono ancora disponibili.

### **Risultati analisi palinologiche matrice api vive.**

Le api vive liofilizzate sono state consegnate al Laboratorio Agrochimico dell'ASSAM di Jesi ma i valori delle analisi palinologiche non sono ancora disponibili.

### **Risultati analisi metalli pesanti, matrice miele**

I campioni di miele sono stati consegnati al Laboratorio Agrochimico dell'ASSAM di Jesi ma i valori dei metalli pesanti rilevati analiticamente non sono ancora disponibili.

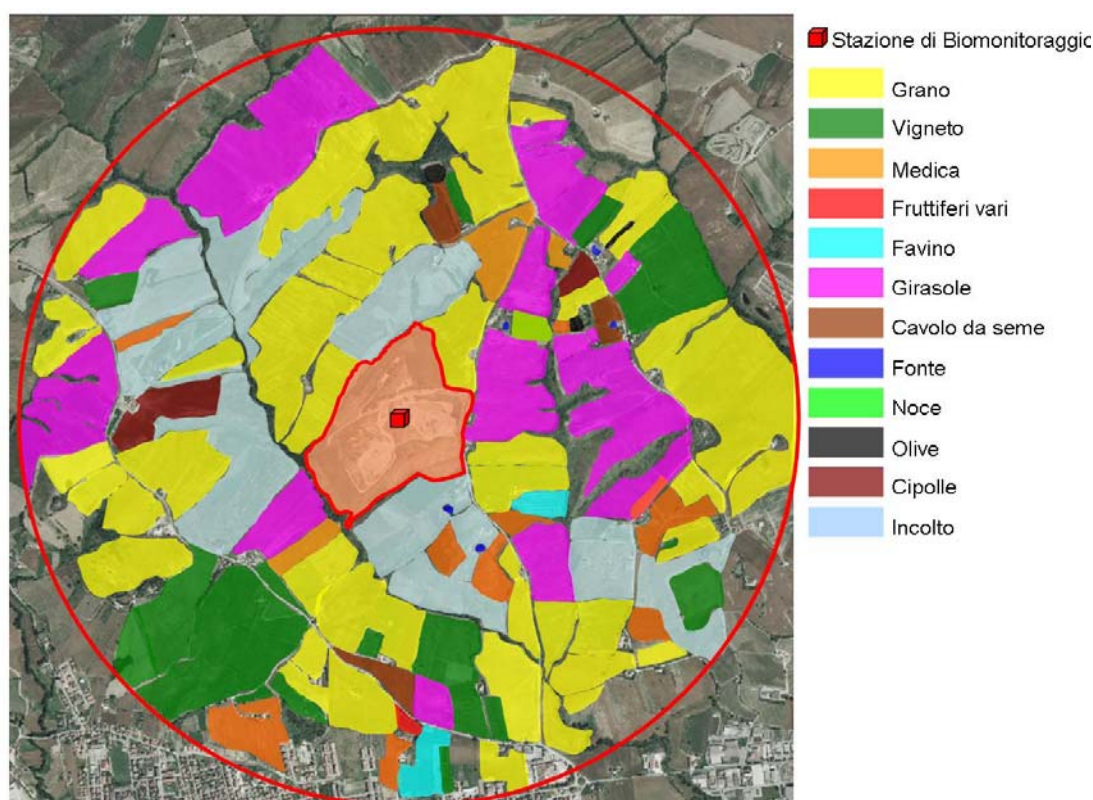
### **Risultati analisi palinologiche, matrice miele**

I campioni di miele sono stati consegnati al Laboratorio Agrochimico dell'ASSAM di Jesi ma i valori delle analisi palinologiche non sono ancora disponibili.

### **Realizzazione mappa colturale**

E' stata realizzata la mappa colturale dell'area oggetto di studio (Foto 3). I pollini maggiormente presenti nei campioni analizzati sono stati quelli della flora che meglio rappresenta la zona bottinata dalle api che si estende per 7 km<sup>2</sup>, cioè un cerchio avente il raggio di 1,5 km. Nell'area è presente una zona di calanchi in cui sono presenti estese

macchie di sulla (*Hedysarum coronarium*) che cresce su zone calanchifere argillose. Lungo i fossi troviamo *Sambucus nigra*, *Quercus robur* e Robinia. Anche per le colture agrarie abbiamo riscontri con le analisi palinologiche infatti sono presenti pollini di Graminacee (frumento), Brassicacea (cavolo da seme), *Heliantus* (girasole), *Allium* (cipolla da seme) e *Vitis* (vite). I pollini delle piante erbacee spontanee/infestanti trovati nei campioni analizzati appartengono a quelle specie tipiche dei seminativi, negli incolti e nei prati pascolo. Infine ritroviamo anche specie polliniche presenti all'interno del sito SOGENUS quali *Pyracantha*, Pinaceae, *Quercus robur* e Robinia.



**Foto 3.** Mappa culturale del sito SOGENUS, Moie – Maiolati Spontini (AN), anno 2010.

I risultati riportati in questa relazione in itinere sono parziali poiché mancano alcune importanti analisi che sono in corso presso i laboratori del Centro Agrochimico dell'ASSAM di Jesi. Una volta pervenuti tali risultati verrà prodotta una relazione finale relativa all'attività svolta nel 2010.

### Riferimenti bibliografici

ROMAN A., 2005. The influence of environment on accumulation of toxic element in honey bees'body. ISAH, vol. 2: 423-426.





KUMP P., NECEMER M., SNAJDER J., 1996. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta*, part B, 51: 499-507.

STANCHER B. e CALABRESE M., 2003. Studio sulla presenza di alcuni metalli pesanti nel miele prodotto nella provincia di Trieste. *Industrie alimentari*, XLIV. 1121-1126.

SZYMANOWSKA-BIELAWSKA K., 1981. Zawartosc zwiaskow mineralnych w cieie pszczoly miodnej (*Apis mellifica* L.). *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*: 25.

ZANOLLI P., BARBATTINI R., FRILLI F., GAZZIOLA F., 2007. Analisi del miele della città di Udine: sorgenti mellifere e inquinamento ambientale. *APOidea*, Vol. 4: 82-94.

Hanno contribuito a questa fase della ricerca: E. Carlucci, Prof.a P. Riolo,  
dott.a S. Ruschioni.

**Responsabile scientifico**  
**Prof. Nunzio Isidoro**



#### **4 - INDAGINI SULLA MICORRIZZAZIONE DELLE PIANTE E VALUTAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ MICROBICA DEL SUOLO**

L'uso di microrganismi bioindicatori è sempre più diffuso nella valutazione della contaminazione del terreno in siti a rischio di inquinamento. Infatti, la qualità del suolo, può essere monitorata attraverso lo studio delle dinamiche delle popolazioni microbiche. Esiste un lungo elenco di microrganismi bioindicatori, ai quali appartengono le micorrize, gli attinomiceti, i funghi del genere *Trichoderma* e numerose specie di batteri antagonisti di patogeni, che abbondano in terreni non contaminati, mentre vengono drasticamente ridotti in suoli esposti ad inquinanti. Obiettivo della ricerca è la valutazione della composizione qualitativa e quantitativa di questi bioindicatori nel terreno e nella rizosfera delle piante presenti nel fosso a monte e a valle dell'Azienda SO.GE.NU.S. SpA, al fine di escludere la contaminazione da percolati e l'infiltrazione di contaminanti nel fosso posto a valle della stessa.

##### **Indagini sulla micorizzazione delle piante**

E' stata condotta una indagine istochimica dell'apparato radicale di piante cresciute in ambienti attigui la discarica e molecolare delle spore micorriziche isolate dal suolo, allo scopo di evidenziare il livello della simbiosi micorrizia naturale di tipo arbuscolare (AMF) presente nelle piante e la diversità genetica dei funghi AMF presenti nel terreno. Con tale finalità è stata scelta una specie appartenente al gruppo delle monocotiledoni, graminacea, del genere *Lolium* e una specie appartenente al gruppo delle dicotiledoni, rosacea, del genere *Rubus*, entrambe presenti nelle due aree selezionate per lo studio: una a valle ed una a monte della discarica. L'indagine è stata svolta nel mese di maggio e per ciascuna specie, in ognuno dei siti prescelti, sono state campionate 9 piante e porzioni di suolo circondanti le stesse. Dall'apparato radicale di ogni pianta sono stati isolati frammenti radicali da 30 radici tra quelle secondarie più affini alla micorizzazione. Per ogni specie è stato messo a punto un protocollo idoneo alla corretta visualizzazione della simbiosi micorrizia mediante colorazione non vitale con Trypan Blue (Phillips e Hayman, 1970). La radici sono state sottoposte a chiarificazione in una soluzione KOH al 10% per 10 min a 50°C, per la specie appartenente al genere *Lolium* e 10 min a 70°C per



quella di rovo. Di seguito, i frammenti radicali sono stati incubati in una soluzione allo 0,05% di Trypan Blue in lacto-glicerolo (acido lattico:glicerolo:acqua, 1:1:1) per 15 minuti a 50 °C per la monocotiledone e per 20 min a 70°C per la dicotiledone. I frammenti radicali sono stati posti su vetrino, montati su glicerolo e osservati al microscopio ottico (Nikon Eclipse E600, Tokyo, Giappone). Per ogni tesi di ciascuna specie, sono stati analizzati un totale di 270 frammenti radicali. Il livello di micorrizzazione è stato determinato calcolando la percentuale delle radici micorrizzate, l'indice di micorrizzazione delle radici osservate e la frequenza degli arbuscoli micorrizici (strutture di scambio tra pianta e fungo micorrizico) presenti nelle radici (Trouvelot et al., 1986). Inoltre è stata osservata la presenza nella radice di strutture arbuscolo-vescicolari, organi di riserva e/o durata del fungo. I risultati del livello di micorrizzazione osservato in ogni pianta per ogni tesi sono stati espressi come valore medio. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e le medie di ciascuna tesi paragonate mediante il test di Duncan. Parallelamente, da almeno 500 g di suolo, campionato a 30 cm dalle piante analizzate, sono state isolate le spore micorriziche secondo il protocollo descritto da Landi et al. (2009). In breve, la terra disciolta in H<sub>2</sub>O è stata setacciata utilizzando vagli a maglie di diametro decrescente (800, 640, 420, 310, 150, 64 e 32  $\mu$ m). Il materiale presente nei due setacci con maglie più piccole è stato posto in tubi da centrifuga. Le spore micorriziche sono state isolate centrifugando per 10 min a 2300  $\times$  g su gradiente di densità ottenuto aggiungendo a 10 ml del suolo selezionato 40 ml di saccarosio al 60%. Le spore affiorate in superficie sono state isolate, contate allo steromicroscopio e poste in quantità di 100-200 entro tubi da centrifuga di 1,5 ml per l'estrazione degli acidi nucleici.

Per l'isolamento degli acidi nucleici le spore contenute in ciascun tubo sono state frantumate in azoto liquido, sono stati aggiunti 500  $\mu$ l di un tampone di estrazione contenente (CTAB 1%, Tris-HCl 100 mM, NaCl 3,5 mM, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanololo 1%), quindi di seguito, i campioni sono stati sottoposti a sonicazione (60W) per 10 min prima di essere incubati a 65°C per 30 min. L'estrazione degli acidi nucleici è stata effettuata aggiungendo ad ogni campione 500  $\mu$ l di cloroformio/ottanolo (24:1) centrifugando a 8500  $\times$  g per 10 min. Dal sovrantante recuperato, gli acidi nucleici sono stati isolati per precipitazione in 80% di isopropanolo, centrifugando per 20 min a 12500  $\times$  g. Il



pellet ottenuto, dopo lavaggio in etanolo al 70%, è stato risospeso in 100 l di TE (Tris-HCl 0,1%; EDTA 0,01%) pH 8.0. Una ulteriore purificazione degli acidi nucleici da inibitori presenti nel suolo è stata ottenuta filtrando la sospensione in TE su resina Sephadex A-50. Il DNA estratto è stato sottoposto ad una prima indagine molecolare mediante PCR utilizzando i primers universali ITS1-F/ITS4-B (Gardes e Bruns, 1993) utili all'identificazione dei funghi micorrizici. Indagini specie-specifiche sono in corso allo scopo di identificare le singole specie micorriziche presenti nel suolo oggetto di studio.

Il grado di micorrizzazione è risultato elevato per le radici prelevate dalla specie di *Rubus*, mentre molto più basso è stato il livello di micorrizzazione osservato nella specie di *Lolium* indipendentemente dal sito di prelievo. In particolare, il 100% delle radici della dicotiledone analizzate a monte della discarica e il 97,7% di quelle analizzate a valle presentavano la simbiosi micorrizica, mentre alcune differenze tra i siti si sono osservate per la specie di *Lolium* dove sono risultate micorrizzate l'88,5% delle radici analizzate a monte e il 64,3% di quelle cresciute a valle della discarica. Non si sono osservate differenze significative relative all'indice di micorrizzazione e alla presenza degli arbuscoli micorrizici tra piante della stessa specie raccolte a valle e a monte della discarica. La specie di *Rubus* presenta un indice di micorrizzazione elevato pari rispettivamente al 45,6% a valle e al 43,6% a monte della discarica mentre la quantità degli arbuscoli, anch'essa elevata, è di 16,6% a valle e di 16,1% a monte. L'indice medio di micorrizzazione osservato nella specie di *Lolium* è molto bassa pari a 3,17% a valle e 6,8% a monte con presenza degli arbuscoli nello 0,32% delle radici a valle e 1,9% a monte. Le differenze sul grado di micorrizzazione tra specie è quindi legato alla differente affinità per il fungo AMF delle due specie prese in esame. Le maggiori differenze tra le piante analizzate a valle e a monte della discarica riguardano la cospicua presenza di vescicole micorriziche, organi di riserva e/o durata del fungo, nelle piante analizzate a valle di entrambe le specie. Ciò è probabilmente dovuto alla struttura paludosa del suolo nella zona a valle della discarica. Le spore micorriziche sono presenti nel suolo di entrambi i siti analizzati ad una densità simile di circa 500 spore per 100 g suolo. L'indagine molecolare attualmente in corso ha identificato la presenza in entrambe le aree oggetto di studio di specie appartenenti al genere *Glomus*.



### Valutazione della biodiversità microbica del suolo

Per la valutazione della diversità microbica, intesa come valutazione delle diverse specie fungine e batteriche, sono stati prelevati complessivamente 20 campioni, dieci a monte e dieci a valle della discarica SOGENUS. Ciascun campione era costituito da circa 1 Kg di terreno raccolto, dopo aver asportato lo strato superficiale di circa 10 cm. I campioni imbustati ed etichettati sono stati portati in laboratorio, dove sono stati lasciati a temperatura ambiente per circa 7 giorni. Successivamente ciascun campione di terreno è stato setacciato attraverso un setaccio in acciaio inox (mesh 2 mm) e 10 g sono stati risospesi in una beuta contenente 100 ml di acqua distillata sterile. Dalla sospensione così ottenuta è stato prelevato 1 ml, sottoposto a una serie di diluizioni decimali ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ). Per ciascuna delle diluizioni decimali 100  $\mu$ l di sospensione sono stati inseminati su 2 piastre Petri contenenti diverse tipologie di substrato. In particolare, per la valutazione di specie fungine è stato utilizzato il substrato PDA con aggiunta di rosa bengala (0,03g/l), cloramfenicolo (0,3 g/l) e streptomina (0,03 g/l) (Vargas et al., 2009). Le piastre sono state poste ad incubare a 25°C per 7 giorni al buio, successivamente si è proceduto alla conta delle colonie fungine totali e alla loro identificazione. Per la valutazione invece dei batteri sono stati utilizzati: il substrato TSA con aggiunta di cicloeximide (0,1 g/l) e il KMB con aggiunta di cicloeximide (0,1 g/l), ampicillina (0,04 g/l) e cloranfenicolo (0,013 g/l) (Raaijmakers et al., 1999). Le piastre inoculate sono state poste ad incubare in un termostato a 27°C per 48 h. Successivamente si è provveduto alla stima delle colonie batteriche cresciute sui diversi substrati e alle diverse diluizioni.

Sul substrato semiselettivo per *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp., è stato possibile verificare in prevalenza la presenza dei suddetti miceti, ma anche funghi appartenenti ai generi *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Una serie di altre colonie fungine, anch'esse ricorrenti nei campioni prelevati in entrambi i siti, isolate in purezza, sono attualmente in corso di identificazione e, saranno sottoposte ad ulteriore caratterizzazione molecolare.

Il substrato TSA selettivo per batteri ha permesso di evidenziare le diverse comunità batteriche presenti nei diversi campioni. In particolare, è stato possibile verificare un numero equivalente di ufc di batteri per grammo di terreno nei campioni prelevati a monte ( $1,2 \times 10^7$ ) e a valle ( $1,0 \times 10^7$ ) dell'impianto. Tra queste comunità batteriche, coltivabili *in vitro*, una bassa



percentuale è rappresentata da batteri termofili, capaci di sopravvivere a temperature relativamente alte (circa 70°C per 24 h). Differenze significative tra i due siti campionati sono emerse nella valutazione di batteri *Pseudomonas fluorescens*, che sono risultati maggiormente rappresentati nei campioni raccolti a monte ( $1,4 \times 10^{-6}$ /g terreno) rispetto a quelli a valle dell'impianto ( $1,2 \times 10^{-5}$ /g terreno).

Le colonie fungine (50) e batteriche (400) rappresentative dei campioni prelevati a monte e a valle dell'impianto SOGENUS, sono stati conservati in purezza in attesa di essere sottoposti ad indagini molecolari, che potrebbero facilitarne l'identificazione e consentire una più dettagliata caratterizzazione.

### Considerazioni

Dalle indagini condotte finora nei due siti a monte e a valle della discarica, considerando la fisiologica variabilità fra i punti di campionamento in esame, non sono emerse sostanziali variazioni nella composizione della microflora microbica terricola. Questo elemento porterebbe ad escludere eventuali effetti ascrivibili a sostanze nocive emesse dalla discarica e presenti nel terreno a valle della stessa. Ad ogni modo, ulteriori indagini sono necessarie per confermare l'ipotesi.

### Bibliografia

Gardes M., Bruns T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.

Landi L., Capocasa F., Costantini E., Mezzetti B., 2009. ROLC strawberry plant adaptability, productivity, and tolerance to soil-borne disease and mycorrhizal interactions. *Transgenic Research* 18, 933-942.

Phillips J.M., Hayman D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 157-160.

Raaijmakers JM, Bonsall RF & Weller DM (1999) Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 89, 470-475.



Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V., 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherches et méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Dans: Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes 21, 7-221.

Vargas Gil S., Pastor S., March G.J., 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research* 164, 196-205.

Hanno contribuito a questa fase della ricerca: dott.a E. Feliziani, dott. L. Landi,  
dott. S. Murolo.

**Responsabile scientifico**  
**Prof. Gianfranco Romanazzi**