

– Master stage di Salvatore Tirrito –
“Interfaccia foglia-aria e radici-suolo in *Quercus pubescens* WILLD. sottoposte ad irrigazione acida e a contaminazione del suolo da metalli pesanti”
– Progetto di Ricerca del Framework “From Cell-to-Tree” –

Questo breve scritto vuole riassumere la mia personale esperienza di stage riguardante la collaborazione al progetto di ricerca condotto dalla [Dr. Elena Paoletti](#) presso l’[Istituto protezione delle Piante](#) del [Consiglio Nazionale delle Ricerche](#) di Firenze e denominato “Micromorfologia della superficie fogliare di *Quercus pubescens* WILLD. correlato all’irrigazione acida e alla contaminazione di metalli pesanti nel suolo”, recentemente ampliato per investigare gli effetti di tali inquinanti anche sulle radici fini e sulle micorrize.

Organizzazione: Il progetto fa parte di un framework imperniato su esperimenti condotti presso il [Swiss Federal Research Institute WSL](#) di Birmensdorf, vicino Zurigo, sotto la supervisione della [Dr. Madeleine Goerg-Günthardt](#) del gruppo di ricerca [Bioindications](#). Diversi teams afferenti al WSL e ad altri istituti svizzeri ed europei, portano avanti progetti di ricerca indipendenti ma con il fine unico di studiare gli effetti della tossicità del suolo a livello della cellula, tessuti, organi, organismi ed ecosistema in vista di una auspicabile *Fitorimediazione*, attraverso specie legnose, di suoli inquinati. Attualmente, sono attivi 16 istituti di ricerca che lavorano a 30 differenti progetti.

Problema: I depositi di rifiuti in discariche (+ o – legali!), le immissioni attraverso le industrie, e le pratiche agricole (come l’uso di acque da scolo) hanno condotto molti suoli ad essere inquinati da metalli pesanti. Le problematiche vanno ben oltre la situazione dei rifiuti in discariche abusive o improprie che, peraltro, necessitano al più presto una regolamentazione. Si pensi che, soltanto nei terreni agricoli, l’area che eccede i livelli tollerabili di presenza di metalli pesanti e inquinanti organici, è stimata intorno al 37-65%. Le soluzioni che in tutta Europa devono trovarsi, devono essere indirizzate verso l’assessment, la decontaminazione e il riutilizzo dei suoli contaminati. Inoltre, urge la necessità di reperire dati sui flussi, sull’allocazione e sul metabolismo degli inquinanti in relazione al tipo di piante, al tipo di suolo e al tipo di acidità della pioggia. Fino ad ora c’è stata carenza di sperimentazione nell’adottare un approccio ecosistemico, trascurando spesso le modificazioni indotte dalla competizione per luce, acqua e nutrienti fra le diverse specie vegetali, la biogeodinamica degli inquinanti e gli effetti incrociati sugli altri organismi (parassiti, patogeni, micorrize, batteri).

Scopo: Questo ampio progetto ha, appunto, lo scopo di investigare i flussi biogeodinamici degli inquinanti all’interno di camere aventi la funzione di modelli ecosistemici e di tracciare e definire meglio le reazioni delle piante e degli organismi associati esposti all’influenza cronica di importanti inquinanti del suolo quali *Zn, Cu, Cd, Pb* e *piogge acide*.

Esperimenti: Le camere-modello ecosistemiche consistono di 16 “Open-Top-chambers” (area 6 m², altezza 2 m, profondità 1.5 m costruite a mò di lisimetri) con tetti mobili che automaticamente escludono la pioggia (vedi fotografia sotto) e di 20 “Field Plots”. Nella pagina successiva sono sommariamente descritti gli impianti sperimentali.





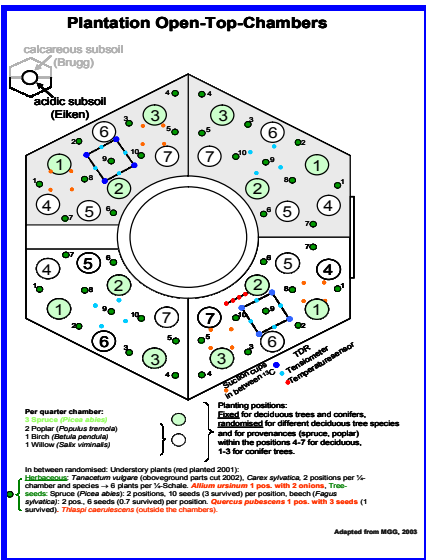
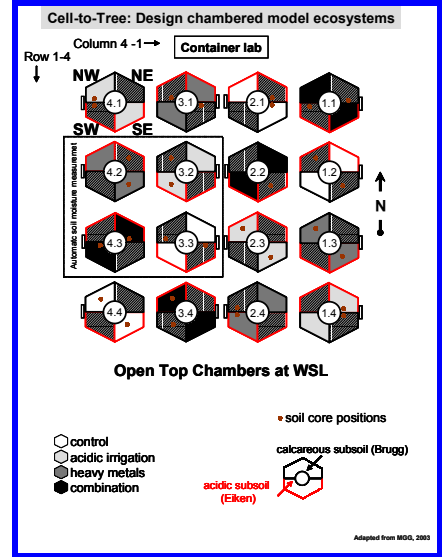
I trattamenti all'interno degli Open-Top-chambers (OTCs) sono 4 con 4 repliche:

1. (C) controllo,
2. (AR) irrigazione acida,
3. (HM) metalli pesanti nel suolo superficiale-15 cm
4. (HMAR) combinazione di AR & HM.

Ogni camera è divisa in 2 sottocamere, rispettivamente riempite con un sottosuolo acido (pH 4.5) o calcareo (pH 7.5).

← Interno di un OTC dopo il taglio delle latifoglie

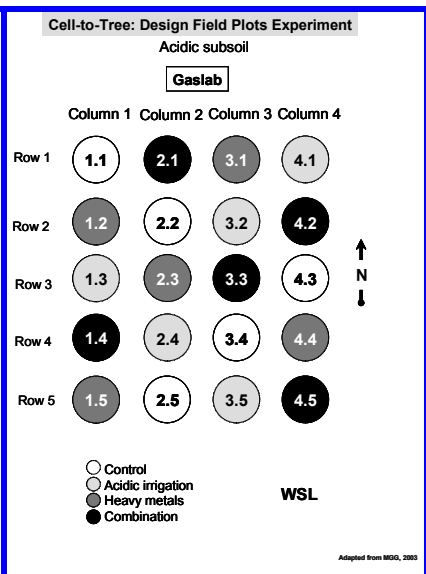
Pianta generale degli OTCs →



In ogni OTC è impiantata la stessa selezione arborea che include Abete rosso (*Picea abies*), Betulla pendula (*Betula pendula*), Salice da vimini (*Salix viminalis*), Pioppo tremulo (*Populus tremula*), semenzali di tre diverse specie arboree (tra i quali figura la "nostra" roverella - *Quercus pubescens*) e disparate specie di piante erbacee che differiscono tra loro per le diverse strategie di crescita.

← Schema d'impianto delle specie utilizzate all'interno di ogni OTC (vedi lista)

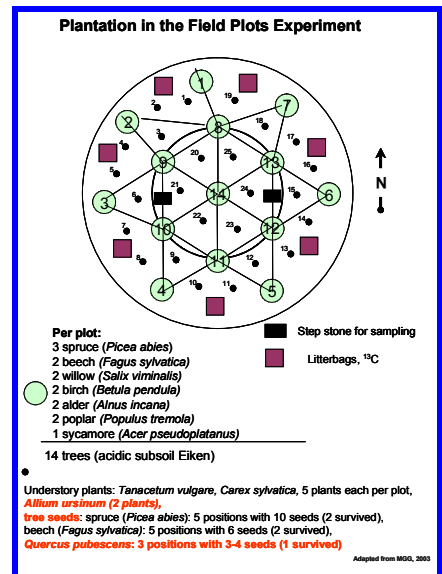
Visione di alcuni FPs →



Gli esperimenti sono ripetuti in 20 Field Plots (FPs) vicini fra loro al fine di studiare le reazioni in campo aperto nei confronti dei parassiti animali "spontanei e controllati" ed in particolare degli insetti. Al loro interno, le piantagioni sono completate da faggio, ontano (utilizzato per la misurazione della fissazione dell' N_2), e acero. I risultati di tutti i lotti sperimentali sono avvalorati da studi comparativi effettuati presso altri siti aventi suoli analogamente inquinati.

← Pianta generale dei FPs

Schema d'impianto delle specie utilizzate all'interno di ogni FP →



Esperienze di Stage: La prima esperienza interessante del mio tirocinio formativo è stata la “trasferta” presso il WSL di Birmensdorf finalizzata al campionamento di suolo in corrispondenza della base del fusto dei semenzali di roverella, oggetto della ricerca. Mediante un carotatore in acciaio, sono stati prelevati 31 cilindri di suolo e radici (1 campione/pianta/tipo di suolo) del volume di 445 cm³, subito sigillati in buste di plastica e conservati alla temperatura di 4 °C fino al momento dell’analisi. Il lavoro è proseguito presso i laboratori dell’IPP di Firenze: ogni campione è stato “delicatamente lavato” in una soluzione all’1% di esametafosfato (un’agente deflocculante) per agevolare la dispersione delle particelle di argilla e di sostanza organica al fine di non danneggiare le radici fini e le micorrize. Un passo fondamentale per il riconoscimento dei vari tipi di radice presenti nei campioni, è stato quello di effettuare delle sezioni radiali sulle radici del primo campione (dello spessore di 30 µm) mediante l’ausilio di un microtomo congelatore. Tali sezioni, sono state osservate al microscopio ottico e, tramite esami comparativi della struttura secondaria, si sono determinate anche le differenze macroscopiche. Quindi, per ogni campione, le radici sono state suddivise in 3 gruppi: quelle appartenenti ad “altre specie” (poste tutte insieme per la sola determinazione dei pesi secchi), le radici grossolane ($\varnothing > 2$ mm) e le radici fini di roverella ($\varnothing < 2$ mm). Una parte di queste ultime è stata disposta su una capsula Petri ($\varnothing = 12$ cm) con fondo grigliato (a maglie di 1 cm²) e, mediante uno stereomicroscopio (18 X) e un contatore meccanico, si è effettuata la conta dei parametri utili alla ricerca, ovvero degli apici micorrizati e non micorrizati, degli apici morti, degli assi vivi e degli assi morti. Successivamente, tutto il materiale è stato disidratato ponendolo in stufa ad 80 °C fino al raggiungimento di un peso costante.

Altrettanto formativo e stimolante è stato l’approccio al mondo della microscopia elettronica ed in particolare la pratica, sui campioni fogliari di roverella, con due innovativi strumenti in dotazione al Ce.M.E. (Centro di Microscopia Elettronica): l’ESEM QUANTA FEI – ENVIRONMENTAL-SEM – (completo di microanalisi e camera calda) e il SEM XL20 FEI – CRYO-SEM – (completo di microanalisi e tecnologia CRYO-GATAN ALTO 2100).

Ai fini della ricerca, il lavoro sui campioni fogliari di roverella è stato effettuato utilizzando il SEM PHILIPS 515 collegato alla sonda EDAX pv 9900 per la microanalisi in dispersione di energia. Nell’ottobre 2002 (ad opera della Dott. Paoletti) è stato effettuato 1 campionamento/semenzale/tipo di suolo negli OTCs e, data l’uniformità del subsuolo, 1 campionamento/semenzale nei FPs. Dall’apice del 2° getto, sono state prelevate 3 foglie mature per semenzale. I campioni sono stati riposti in delle buste di carta e, dopo essere stati trasportati nei laboratori di Firenze, sono stati fatti seccare all’aria per prevenire l’alterazione delle cere epicutcolari. A questo punto ha avuto inizio il mio lavoro. Dalla parte centro-mediana di destra di ogni foglia, per mezzo di un bisturi, è stato asportato un rettangolino. Queste porzioni di foglia, rivolte con la pagina inferiore verso l’alto, sono state poste su dei supporti speciali di alluminio o “stabs” (3 striscioline/stab, ognuna relativa ad ogni foglia) e metallizzate con una patina d’oro tramite un apposito strumento. Naturalmente, è stata riservata una grande attenzione nel maneggiare i campioni per prevenire ogni sorta di danno meccanico in ogni fase dello studio, dalla raccolta delle foglie alla preparazione e infine durante le osservazioni al SEM. Queste ultime sono state condotte seguendo un “transect”, decorrente lungo l’asse maggiore di ogni rettangolino, all’interno del quale sono stati osservati 50 stomi scelti a caso, per un totale di 150 stomi per semenzale (corrispondente ad 1 stab). Per quantificare le diverse tipologie di danno presenti sulla foglia, ad ogni stoma è stata attribuita una classe di danno corrispondente (*Classe 0 = stoma sano; Classe 1 = stoma leggermente danneggiato; Classe 2 = stoma danneggiato; Classe 3 = stoma gravemente danneggiato che ha perso le sue funzionalità fisiologiche*) in modo da potere procedere al calcolo dell’indice di danno stomatico (SDI). Un altro parametro importante quale la densità stomatica è stato, invece, calcolato contando gli stomi all’interno del monitor principale del SEM (all’ingrandimento costante di 745 X) in 10 areole internervali anch’esse scelte a caso. Così come per le radici, tutti i dati grezzi, sono stati rielaborati al PC per ottenere ulteriori parametri, sottoponendo il tutto all’analisi della varianza.

Infine, con l’obiettivo di ritrovare tracce di metalli pesanti sulla superficie fogliare, è stata utilizzata la microanalisi a raggi X (sonda EDAX): tra i già citati metalli pesanti, l’unico elemento rilevato su campioni trattati è stato il rame.