



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale

in Scienze Ambientali

ordinamento ex D.M. 270/2004

Tesi di Laurea

Fitotossicità del micro-ferro in relazione alle cinetiche di dissoluzione in ambiente acquoso

Relatore

Ch.ma Prof.ssa Annamaria Volpi Ghirardini

Correlatore

Dott. Andrea Costa Devoti

Laureando

Nicola Baroni

Matricola 857663

Anno Accademico

2018/2019

Indice della tesi

Scopo.....	7
1. Introduzione	8
1.1 Speciazione del ferro negli ambienti naturali.....	9
1.2 Applicazioni del ferro nelle bonifiche	11
1.2.1 Reazione di Fenton	13
1.2.2 Aspetti positivi e negativi dell'utilizzo di nano-ferro.....	15
1.3 Cinetiche di ossidazione del ferro in ambiente acquoso	17
1.4 Fitotossicità del ferro microscopico.....	20
1.4.1 Assorbimento, trasporto e accumulo del ferro nelle piante	21
2. Materiali e metodi.....	23
2.1 Caratterizzazione micro-ferro	23
2.2 Reagenti	23
2.3 Protocollo sperimentale impiegato nelle prove di fitotossicità	24
2.3.1 Test di fitotossicità e disegno sperimentale	26
2.3.2 Analisi dei dati di effetto.....	29
2.4.1 Concentrazioni analitiche	32
3. Risultati e discussione	34
3.1 Effetti di tossicità.....	35
3.1.1 Inibizione della germinazione	35
3.1.2 Effetti sull'allungamento della plantula	37
3.1.2.1 <i>Lepidium sativum</i>	37
3.1.2.2 <i>Sinapis alba</i>	38
3.1.2.3 <i>Sorghum saccharatum</i>	39
3.1.3 Indice di Germinazione (GI)	40
3.1.3.1 <i>Lepidium sativum</i>	40
3.1.3.2 <i>Sinapis alba</i>	41
3.1.3.3 <i>Sorghum saccharatum</i>	42
3.1.4 Inibizione della produzione di biomassa	44
3.1.4.1 <i>Lepidium sativum</i>	44
3.1.4.2 <i>Sinapis alba</i>	45
3.1.5 Valutazione del bioaccumulo	47
3.1.5.1 Ferro.....	47
3.1.5.1.1 <i>Lepidium sativum</i>	47

3.1.5.1.2 <i>Sinapis alba</i>	48
3.1.5.1.3 <i>Sorghum saccharatum</i>	49
3.1.5.2 Cadmio	51
3.1.5.2.1 <i>Lepidium sativum</i>	51
3.1.5.2.2 <i>Sinapis alba</i>	52
3.1.5.2.3 <i>Sorghum saccharatum</i>	53
3.2 Dissoluzione del micro-ferro	54
3.3 Relazioni tra Endpoint valutati e dissoluzione del micro-ferro	56
4. Conclusioni	59
5. Approfondimenti	61
5.1 Guar gum: caratteristiche e applicazioni	61
5.1.1 Test di dissoluzione del mFe in presenza di Guar gum.....	62

Indice delle figure

Figura 1 Diagramma Eh-pH degli idrossidi di ferro (Dongarrà e Varrica, 2004)	10
Figura 2 Tasso di ossidazione delle specie di ferro ferroso in funzione del pH (Stumm e Morgan, 1996)	18
Figura 3 Tasso di ossidazione di Fe(II) solubile in funzione del pH (Morgan & Lahav, 2007)	19
Figura 4 Protocollo di riferimento per misurazione delle plantule (Baudo e Beltrami, 2004).	25
Figura 5 Misurazione plantule tramite software grafico ImageJ. Campione relativo alla prima replica del controllo di <i>L. sativum</i>	27
Figura 6 Misurazione plantule tramite software grafico ImageJ. Campione relativo alla seconda replica del trattamento con cadmio e mFeC per <i>L. sativum</i>	28
Figura 7 Jar test. Fase di allestimento iniziale con preparazione di Becker da 1 L con soluzioni contenenti mFe (20g/L).	30
Figura 8 Jar test: dettaglio dopo 1 h. I trattamenti con mFeB e mFeD mostrano un ingiallimento marcato della soluzione; al contrario, la soluzione risulta limpida per test con mFeA e mFeC.	31
Figura 9 Micro-provette Eppendorf da 1 mL catalogate.	31
Figura 10 Spettrometro di massa: NexION 350X Perkin Elmer.	32
Figura 11 Inibizione della germinazione in <i>S. saccharatum</i> dopo esposizione a mFe. Le barre, divise in dieci sezioni corrispondenti al numero di semi per ogni replica, indicano in bianco i semi germinati e in nero i semi non germinati.	36
Figura 12 Inibizione della germinazione in <i>S. saccharatum</i> dopo esposizione a Cd (81mg/L) e mFe. Le barre, divise in dieci sezioni corrispondenti al numero di semi per ogni replica, indicano in bianco i semi germinati e in nero i semi non germinati.	36
Figura 13 Inibizione dell'allungamento della plantula (%) in <i>L. sativum</i> normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (19mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.	38
Figura 14 Inibizione dell'allungamento della plantula (%) in <i>S. alba</i> normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (27mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.	39
Figura 15 Inibizione dell'allungamento della plantula (%) in <i>S. saccharatum</i> normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (81mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.	40
Figura 16 Indice di germinazione in <i>L. sativum</i> normalizzato al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (19mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.	41
Figura 17 Indice di germinazione in <i>S. alba</i> normalizzato al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (27mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.	42
Figura 18 Indice di germinazione in <i>S. saccharatum</i> normalizzato al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (81mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.	43
Figura 19 Produzione di biomassa in <i>L. sativum</i> normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (19mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.	45

Figura 20 Produzione di biomassa in <i>S. alba</i> normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (27mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.	46
Figura 21 Bioaccumulo di Fe in <i>L. sativum</i> . Quantità espressa in μg per grammo di biomassa prodotta.	48
Figura 22 Bioaccumulo di Fe in <i>S. alba</i> . Quantità espressa in μg per grammo di biomassa prodotta.	49
Figura 23 Bioaccumulo di Fe in <i>S. saccharatum</i> . Quantità espressa in μg per grammo di biomassa prodotta.	50
Figura 24 Bioaccumulo di Cd in <i>L. sativum</i> . Quantità espressa in μg per grammo di biomassa prodotta.	51
Figura 25 Bioaccumulo di Cd in <i>S. alba</i> . Quantità espressa in μg per grammo di biomassa prodotta.	52
Figura 26 Bioaccumulo di Cd in <i>S. saccharatum</i> . Quantità espressa in g per grammo di biomassa prodotta.	53
Figura 27 Concentrazioni di Fe in soluzione dal tempo 0 fino a 48 ore.....	54
Figura 28 Concentrazioni di Fe in soluzione da t=0 fino a 12 h.	55
Figura 29 Andamenti della concentrazione di Fe in soluzione acquosa e soluzione acquosa con aggiunta di guar gum: test con mFeC.	63
Figura 30 Andamenti della concentrazione di Fe in soluzione acquosa e soluzione acquosa con aggiunta di guar gum: test con mFeA.	62

Indice delle tabelle

Tabella 1 Tipologie di micro-ferro utilizzate nel lavoro di tesi. Dati e descrizioni forniti da Pometon spa.....	23
Tabella 2 Parametri chimico-fisici delle soluzioni con mFe (20g/L).....	24
Tabella 3 Parametri di funzionamento dello spettrometro di massa al plasma accoppiato induttivamente.	33
Tabella 4 Bioaccumulo di Fe ($\mu\text{g/g}$) per sezione in plantule di L. sativum.....	47
Tabella 5 Bioaccumulo di Fe ($\mu\text{g/g}$) per sezione in plantule di S.alba.	48
Tabella 6 Bioaccumulo di Fe ($\mu\text{g/g}$) per sezione in plantule di S. saccharatum.	49
Tabella 7 Bioaccumulo di Cd ($\mu\text{g/g}$) per sezione delle plantule di L.sativum.	51
Tabella 8 Bioaccumulo di Cd ($\mu\text{g/g}$) per sezione in plantule di S. alba.	52
Tabella 9 Bioaccumulo di Cd ($\mu\text{g/g}$) per sezione in plantule di S. saccharatum.	53
Tabella 10 Concentrazioni di Fe in soluzione a diversi tempi ($0 < t < 48\text{h}$). Concentrazioni espresse in $\mu\text{g/L}$. *valori non attendibili.....	55
Tabella 11 Valori degli endpoint relativi a trattamenti di L. sativum con mFe.....	56
Tabella 12 Valori degli endpoint relativi ai trattamenti di S. alba con mFe.	57
Tabella 13 Valori di endpoint relativi ai trattamenti di S. saccharatum con mFe.	58

Scopo

Il lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la valutazione delle capacità di mitigazione degli effetti tossici da parte del micro-ferro rispetto ad un contaminante di riferimento su tre specie vegetali: *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* e *Sorghum saccharatum*. Sono stati valutati come indicatori di tossicità l'indice di germinazione e l'allungamento delle plantule; il Cadmio è stato utilizzato come contaminante di riferimento per valutare gli effetti del trattamento con micro-ferro sull'EC₅₀ delle specie vegetali utilizzate.

Inoltre, essendo già diffusi gli utilizzi di questo elemento per trattamenti di bonifica ambientale, si è voluto approfondire l'aspetto riguardante le cinetiche di dissoluzione del micro-ferro in ambiente acquoso in funzione della granulometria del materiale al fine di poter comprendere in modo approfondito il comportamento di tale metallo in soluzione. In particolare, ci si pone l'obiettivo di ampliare le conoscenze riguardo la relazione tra concentrazioni efficaci dal punto di vista della rimozione dell'inquinante di riferimento e le concentrazioni in cui si possano riscontrare effetti tossici sull'ambiente da parte dello stesso micro-ferro.

Come già dimostrato da altri studi, l'utilizzo di tecnologie di bonifica a base di ferro è fortemente influenzato dalle condizioni ambientali in cui ci si trova e, di conseguenza, va effettuata una valutazione caso per caso per garantirne l'efficacia. A tal fine, i risultati ottenuti da questo lavoro sono volti a migliorare la comprensione sul comportamento del micro-ferro in ambiente acquoso e sugli effetti che questo può produrre sull'ecosistema contaminato.

Tenendo in debita considerazione le informazioni sullo studio del comportamento di tale elemento, potranno essere utilizzate quantità e concentrazioni adeguate al singolo caso di bonifica al fine di ridurre al minimo l'impatto sull'ambiente senza rinunciare ad un'azione efficace nel trattamento del contaminante.

1. Introduzione

La gestione di suolo e falde acquifere contaminate è uno dei maggiori problemi ambientali correnti, tenuto conto che recentemente le attività industriali e urbane hanno portato alla presenza di elevate concentrazioni di un largo gruppo di contaminanti nel terreno, nei sedimenti, nelle falde acquifere e nelle acque superficiali, affliggendo la salute di milioni di persone in tutto il mondo (Cundy et al., 2008).

Il numero di siti contaminati in Europa è stato stimato essere intorno a 342.000 rappresentando il 14% dei siti potenzialmente contaminati (Panagos et al., 2013). Panagos et al. hanno estrapolato questi dati considerando 38 paesi europei e dividendo gli inquinanti di maggior considerazione in otto classi: 1) idrocarburi clorurati; 2) oli minerali; 3) idrocarburi policiclici aromatici; 4) metalli pesanti; 5) fenoli; 6) cianuri; 7) idrocarburi aromatici (benzene, toluene, etilbenzene e xylene); 8) inquinanti minori.

Negli anni sono state sviluppate diverse tecniche di bonifica per quanto riguarda i suoli e le acque sotterranee; particolare attenzione è stata posta sulle tecnologie in-situ che posseggono caratteristiche tali da riportare l'ambiente contaminato alle sue condizioni preesistenti senza perderne la fruibilità. Tra le più diffuse e promettenti vi sono le tecnologie a base di ferro, le quali agiscono tramite un insieme di meccanismi differenti (adsorbimento, riduzione, precipitazione, ecc.) nel modificare i cicli geochimici di una grande quantità di inquinanti organici, inorganici e radioattivi. Nell'ambiente, il ferro gioca un ruolo importante nella mobilità dei contaminanti, nel loro adsorbimento e nella loro trasformazione e degradazione grazie al ruolo di donatore di elettroni (durante l'ossidazione del Fe^{2+} a Fe^{3+}), e, nelle sue varie forme minerali, come substrato adsorbente/precipitante (Cundy et al., 2008).

Il largo impiego delle tecnologie che si basano sull'utilizzo del ferro nelle sue dimensioni micrometriche o nanometriche pone l'attenzione sul pericolo che questo elemento, in alcuni casi, può rappresentare per le specie vegetali alla base di qualsiasi ecosistema. Le piante hanno sviluppato diversi sistemi per l'immagazzinamento del ferro dal suolo circostante; però, l'attivazione dell'assorbimento del ferro può rappresentare un doppio pericolo: non solo lo stesso ferro è tossico ma i sistemi di trasporto di tale elemento sono poco selettivi e permettono ad altri metalli potenzialmente tossici di entrare nei tessuti vegetali (Thomine e Vert, 2013).

Quando si tratta di procedere al risanamento di un ambiente contaminato grazie all'utilizzo di tecnologie legate al ferro è importante considerare sia i risultati di mitigazione degli effetti negativi dei contaminanti, sia il possibile impatto ambientale dovuto all'immissione di grandi quantità di

ferro nell'ecosistema preso in considerazione. L'approfondimento tramite studi in laboratorio e sul campo può fornire le nozioni adeguate sulle migliori tecnologie da impiegare, considerando la velocità di dissoluzione del ferro granulare nell'ambiente e le concentrazioni limite alle quali le specie presenti non riportino danni irreversibili in relazione all'efficacia delle procedure impiegate.

1.1 Speciazione del ferro negli ambienti naturali

Diverse fonti posizionano il ferro al quarto posto degli elementi maggiormente presenti nella crosta terrestre, ne consegue, quindi, che le reazioni che lo coinvolgono giocano un ruolo fondamentale nei cicli geochimici di diversi elementi, contaminanti o meno che siano.

Cundy et al. (2008) riportano che il ferro esiste nell'ambiente prevalentemente in due stati di valenza: quello relativamente solubile in acqua Fe^{2+} (ferro ferroso) e quello scarsamente solubile in acqua Fe^{3+} (ferro ferrico), con quest'ultimo che assume la forma stabile in ambienti ricchi di ossigeno con condizioni di pH da neutre a basiche. Il ferro zero-valente, o nativo, può anche essere trovato in specifiche condizioni ambientali e geologiche, ma raramente si trova in superficie a causa della sua elevata reattività.

Ioni di ferro ferroso e ferrico si presentano in soluzione acquosa in una larga varietà di contesti acquatici comunemente reperibili come incidenti di "acque rosse" nei sistemi di distribuzione dell'acqua, problemi di drenaggi di acque acide da miniere, diversi processi di trattamento di acque industriali e nei cicli naturali di ambienti acquatici d'acqua dolce e salata (Morgan e Lahav, 2007).

I diagrammi Eh-pH costituiscono un utile strumento per definire le condizioni di stabilità degli idrossidi di ferro nelle differenti condizioni ambientali.

Dongarrà e Varrica (2004) riportano che l'Eh è un'espressione numerica che indica la capacità di un ambiente di svolgere attività ossidante o riducente nei confronti di alcuni suoi componenti. Nelle acque naturali il principale ossidante è l'ossigeno atmosferico mentre la sostanza organica costituisce il principale agente riducente. Più precisamente l'Eh sta ad indicare il potenziale elettrico di un sistema rispetto all'elettrodo standard di idrogeno. Così come il pH indica la capacità di un sistema di fornire protoni, l'Eh indica la capacità di fornire elettroni. Più positivo è il valore del potenziale, più ossidante è il sistema considerato rispetto all'elettrodo ad idrogeno. Un valore negativo non significa necessariamente un potenziale riducente, ma soltanto che il potenziale è riducente nei confronti di un elettrodo standard ad idrogeno; potrebbe comunque risultare ossidante rispetto ad altre reazioni elettrodiche.

È possibile osservare nel diagramma Eh-pH (Dongarrà e Varrica, 2004) degli idrossidi del ferro che l'equilibrio tra Fe^{2+} e Fe^{3+} disciolti si rivela importante solo in presenza di un pH minore di 3; se il ferro è nello stato +3 a un valore di pH più elevato, allora esiste soprattutto come ferro solido $Fe(OH)_3$, mentre il ferro contenuto nelle soluzioni che si trova nello stato +2 non precipita come $Fe(OH)_2$ fintanto che l'ambiente non diventa basico (Baird e Cann, 2013). Le linee azzurre nel diagramma rappresentano il campo di stabilità dell'acqua, dimostrando che il ferro non può esistere negli ambienti naturali allo stato nativo in quanto sarebbero necessarie condizioni estremamente riducenti, come è ben osservabile mantenendo un pezzo di ferro metallico a contatto con l'atmosfera (Dongarra e Varrica, 2004).

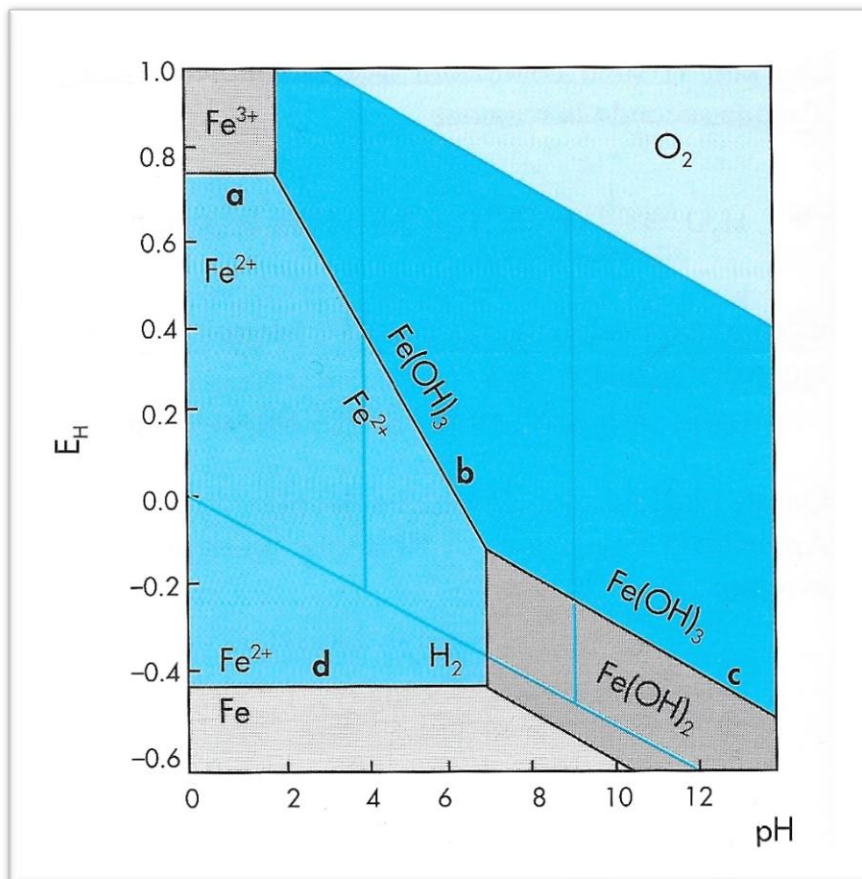


Figura 1 Diagramma Eh-pH degli idrossidi di ferro (Dongarrà e Varrica, 2004)

Gli ossidi di ferro sono, quindi, molto diffusi negli ambienti naturali. Le caratteristiche più significative di questi minerali sono: la bassa solubilità, il colore intenso, la parziale sostituzione isomorfa del ferro con altri cationi, in particolare alluminio, e la loro attività catalitica. Inoltre, sono caratterizzati da un'elevata superficie specifica, frequentemente superiore a $100 \text{ m}^2/\text{g}$, facendone degli ottimi adsorbenti per un ampio numero di ioni, molecole e gas (Del Gaudio, 2004).

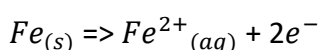
1.2 Applicazioni del ferro nelle bonifiche

Le correnti applicazioni delle tecnologie di bonifica a base di ferro per suoli o falde acquifere contaminate possono essere divise a grandi linee in due gruppi: le tecnologie che usano il ferro come assorbente, facendo precipitare o immobilizzando il contaminante; e quelle che utilizzano il ferro come un donatore di elettroni per rompere o convertire gli inquinanti in forme meno tossiche o meno mobili (Cundy et. al., 2008). Spesso i due processi coesistono nella maggior parte delle applicazioni ed il prevalere di uno rispetto all'altro dipende dalle condizioni ambientali in cui si sta effettuando il trattamento (temperatura, pH, ossigeno disciolto, ecc.) e dalle tipologie di ferro utilizzate (granulometria, reattività, ecc.).

Diversi studi hanno dimostrato che il ferro zero-valente (ZVI) ha un grande potenziale nel ridurre una vasta gamma di contaminanti organici e metalli pesanti con stati di ossidazione elevati (Costa Devoti, 2012). Kumpiene et al. (2006) affermano che la stabilizzazione di un suolo in cui siano presenti cromo, rame e arsenico tramite ferro zero-valente ha portato ad una diminuzione delle forme disciolte di arsenico e cromo nel suolo e ad una minore concentrazione di questi elementi nel percolato. In particolare, l'aggiunta di ferro granulare ha ridotto significativamente la concentrazione degli elementi nell'acqua interstiziale del suolo; il più grande abbattimento si è osservato per l'arsenico, fino al 99%.

Baird e Cann (2013) riportano che diversi scienziati hanno sviluppato una tecnica "a barriera", alquanto promettente, per il trattamento in situ delle acque di falda contaminate da composti organici clorurati volatili (soprattutto C_1 e C_2). Una barriera permeabile reattiva (PRB) è una zona ingegnerizzata con materiale reattivo che si estende sotto la tavola d'acqua, progettata per intercettare e trattare le acque sotterranee contaminate. I contaminanti, passando attraverso la barriera, sono degradati o trattenuti all'interno di essa dal materiale reattivo presente al suo interno (Cundy et al., 2008).

L'ingrediente presente nel letto di sabbia, capace di decontaminare chimicamente l'acqua è il ferro metallico, Fe^0 , in forma di piccoli granuli, un comune prodotto di rifiuto dei processi industriali. A contatto con alcuni composti organici clorurati disciolti in acqua, il ferro agisce come agente riducente, e cede elettroni per formare lo ione ferroso (Fe^{2+}) che si scioglie nell'acqua:



In genere questi elettroni vengono ceduti alle molecole cloro-organiche temporaneamente adsorbite sulla superficie del metallo; di conseguenza gli atomi di cloro delle molecole sono ridotti a ioni cloruro, Cl^{-} , che vengono rilasciati in soluzione acquosa. Il meccanismo appena descritto di

degradazione riduttiva da parte del ferro non viene messo in atto strettamente solo nei confronti di composti clorurati; ad esempio, è stata notata la capacità del ferro presente nelle barriere reattive permeabili di ridurre gli ioni cromo (Cr^{6+}) solubili ai loro rispettivi ossidi (Cr^{3+}) insolubili, così da ridurre la concentrazione di cromo presente nelle acque sotterranee.

Chen et al. (2017) hanno effettuato degli studi su ossidi di Fe^{2+} e Fe^{3+} , affermando che sono materiali ideali da utilizzare nella bonifica dell'uranio (U) e elencandone i diversi vantaggi. In primo luogo, gli ossidi di ferro(III) sono onnipresenti nell'ambiente e questo aspetto, combinato con la loro elevata area superficiale, ne fa dei riducenti efficaci della mobilità dell'uranio(VI) grazie alle loro notevoli capacità adsorbenti. Secondo, quando è presente ferro(II) avviene il trasferimento di elettroni con l'uranio(VI). La riduzione del mobile U(VI) al moderatamente solubile UO_2 può essere indotta generando ossidi di ferro(III). Terzo, incorporazione dell'uranio in fasi minerali stabili offre una via di sequestro con potenziale immobilizzazione per lungo tempo.

La co-precipitazione di diverse sostanze insieme agli ossidi di ferro avviene spontaneamente negli ambienti naturali ed è una tecnica di bonifica utilizzata per rimuovere elementi tossici dall'acqua potabile, dalle acque reflue e da acque provenienti da lavorazioni industriali.

Langmuir (1997) riporta che la co-precipitazione nei sistemi reali è una combinazione di tre processi: 1) l'adsorbimento sulla superficie degli idrossidi e ossidi colloidali; 2) l'incorporazione del contaminante nel reticolo dei solidi formati; 3) la chiusura meccanica della soluzione contenente elementi inquinanti da parte dei precipitati. Tale meccanismo, operante in un sistema Fe^0/H_2O , viene spiegato come segue: le specie di Fe(II) derivanti dall'ossidazione del Fe(0) sono rilasciate nell'ambiente acquoso e velocemente ossidate in specie di Fe(III) dall'ossigeno disciolto o altri ossidanti; la solubilità dei composti del Fe(III) a pH maggiori di 5 è molto bassa per cui precipitano in forma solida. Le specie più comuni di Fe(III) negli ambienti naturali sono i suoi ossidi e idrossidi che generalmente sono carichi positivamente e, di conseguenza, fanno co-precipitare sostanze disciolte e colloidali carichi negativamente.

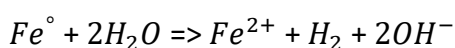
1.2.1 Reazione di Fenton

L'applicazione del ferro zero valente (ZVI) trova grande spazio nelle tecnologie di bonifica in situ di corsi d'acqua sotterranei e nel trattamento delle acque reflue. In particolare, il ZVI funge da catalizzatore per la reazione che prende il nome di reazione di Fenton, grazie alla quale si può portare un contaminante organico alla sua completa mineralizzazione. La chimica alla base della reazione di Fenton con inquinanti ambientali, in particolare solventi clorurati, è stata studiata e applicata a livello di scala micrometrica utilizzando ZVI nelle barriere permeabili reattive (PRB) (Costa Devoti, 2012).

Nei trattamenti delle acque reflue con ferro zero-valente, gli inquinanti organici sono degradati dal radicale idrossile (OH^*) generato dalla reazione di Fenton, derivante dalla dissoluzione del ZVI. È generalmente accettato che quattro meccanismi sono responsabili della rimozione di inquinanti da parte del ferro zero-valente: degradazione riduttiva, degradazione ossidativa, precipitazione ed adsorbimento. I particolati di ZVI sono composti da un cuore che fornisce il potere riducente per le reazioni e un guscio costituito da ossidi ed idrossidi di ferro, i quali offrono siti di adsorbimento e di formazione dei complessi chimici (Harada et al., 2016)

Di seguito vengono esposti i meccanismi di dissoluzione del ferro zero-valente riassunti dalle ricerche di Lee et al. (2014), Harada et al. (2016) e Ambika et al. (2018).

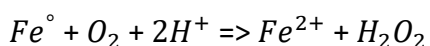
Sia in condizioni di presenza di ossigeno che anossiche, il Fe^{2+} è il prodotto primario della corrosione del ZVI. In condizioni anossiche, la corrosione del ferro viene descritta come:



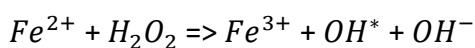
In assenza di ossigeno disciolto, il ferro zero-valente può reagire con l'acqua per formare lo ione solubile Fe^{2+} e gli ossidi/idrossidi di ferro.

La degradazione riduttiva degli inquinanti organici adsorbiti sulla superficie del ferro zero-valente è indotta dagli elettroni emessi durante la corrosione del ferro. In condizioni anossiche, questo meccanismo domina la degradazione di inquinanti da parte del ZVI.

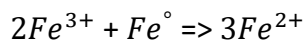
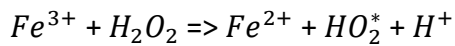
In soluzioni con presenza di ossigeno, la corrosione del ferro in condizioni acide genera perossido di idrogeno (H_2O_2), oltre a Fe^{2+} :



Il perossido di idrogeno prodotto dalla reazione precedente reagisce con Fe^{2+} producendo un radicale ossidrilico altamente reattivo (OH^*), in quella che è nota come **reazione di Fenton**:



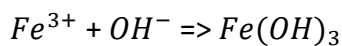
La rigenerazione di Fe^{2+} avviene grazie alle seguenti reazioni:



La degradazione ossidativa da parte dei radicali OH^* generati in presenza di ossigeno può fortemente facilitare la mineralizzazione di inquinanti organici.

La formazione dello strato di ossidi/idrossidi di ferro sulla superficie del ZVI avviene contemporaneamente all'avanzamento della dissoluzione dello stesso secondo numerose reazioni. Questi composti aumentano la capacità di adsorbimento e di precipitazione degli inquinanti da parte del ferro zero-valente. Dall'altra parte, maggiore è lo strato di ossidi o idrossidi di ferro che si formano sulla superficie del ZVI, maggiore sarà la diminuzione della reattività di quest'ultimo; i meccanismi competono tra loro e la supremazia di uno rispetto all'altro dipende fortemente dal pH della soluzione (Harada et al.,2016).

Riferendosi in particolare alla reazione:



Ambika et al. (2018) affermano che il Fe^{3+} precipita come idrossido di ferro sulla superficie del micro-ZVI riducendo l'area superficiale reattiva, diminuendo la produzione di radicali ossidrilici e causando preoccupazione per la formazione di fango secondario.

La continua corrosione del ferro, l'effettivo utilizzo degli ioni e la minor produzione di fango secondario sono i parametri chiave per la determinazione del successo di questa tecnologia (Ambika et al.,2018).

1.2.2 Aspetti positivi e negativi dell'utilizzo di nano-ferro

Il nano-ferro zero valente (nZVI) è uno dei materiali più intensamente studiati per l'utilizzo nelle bonifiche ambientali durante gli ultimi 20 anni o più (Zhao et al., 2016).

Una recente revisione bibliografica effettuata da Costa Devoti (2013) ha evidenziato che, in presenza di nZVI, una serie molto ampia di categorie di composti possono essere coinvolti in reazioni chimiche volte alla loro rimozione:

- Esplosivi (ciclotrimetiltrinitroammina presente nel C-4 e trinitrotoluene o TNT);
- Pesticidi (nitrofenoli, organo fosforici, nitroaniline, policlorobifenili, cloroacetanilidi e diclorofenoli);
- Coloranti organici
- Farmaci e mezzi di contrasto (metronidazolo, carbamazepina, diclofenac, acido clofibrico, ciprofloxacina, iopromide e ifosfamide);
- Solventi organici alogenati (tricloroetilene)
- Altri composti organici (polibromodifenietteri, nitrobenzene e trinitroglicerina).

Le capacità di rimozione di una così vasta gamma di contaminanti da parte del ferro nanoscopico zero-valente è stata ricondotta al suo forte potere riducente e alle grandi prestazioni come agente adsorbente.

Rispetto ai materiali di ferro utilizzati convenzionalmente nelle tecnologie di bonifica, il nZVI è risultato molto più reattivo grazie al notevole incremento dell'area superficiale delle particelle di ferro dovuto alle dimensioni nanoscopiche. Le dimensioni ridotte di questo materiale permettono di raggiungere zone contaminate nel sottosuolo o falde acquifere profonde non facilmente accessibili e permettendo, così, l'impiego di tecnologie in situ meno costose e meno impattanti nei confronti dell'ambiente.

I punti di forza appena descritti non devono essere valutati in modo univoco, dal momento che Zhao et al. (2016) riportano che, proprio, a causa della larga area superficiale, dell'attrazione magnetica e dell'alta reattività delle particelle di nZVI, queste possiedono la tendenza ad aggregarsi rapidamente in fiocchi di scala micrometrica o millimetrica. Considerando che le particelle di dimensioni maggiori di 3 micrometri sono facilmente intercettabili dalla matrice del suolo, questo potrebbe rendere inefficace l'uso della tecnologia nanoscopica.

In aggiunta, le nanoparticelle sono altamente reattive, di conseguenza, reagiscono con il mezzo circostante, come l'ossigeno disciolto o l'acqua, perdendo velocemente la loro reattività (Zhao et al., 2016).

Considerando gli aspetti ecotossicologici, alcuni studi hanno mostrato come le nanoparticelle di ferro zero-valente possano produrre effetti nocivi su alcune specie vegetali. In particolare, Ma et al. (2013) hanno cercato di valutare la tossicità di nZVI con due macrofite: tifa (*Typha latifolia*) e pioppo ibrido (*Populous deltoids x Populous nigra*). Le concentrazioni utilizzate sono state rispettivamente 0, 25, 50, 200, 500 e 1000 mg/L. Nei trattamenti > 200mg/L, è stata evidenziata la presenza di effetti tossici marcati in entrambe le specie registrando una diminuzione dello sviluppo della plantula.

I processi di produzione di particelle di ferro nanoscopiche sono molto più complessi e costosi rispetto a quelli utilizzati per produrre micro-ferro o ferro granulare e questo, di conseguenza, si riflette sul costo del prodotto finale. Zhao et al. (2016) riportano che il costo del nZVI commerciale è molto più alto del ferro zero-valente in polvere o granulare: negli Stati Uniti il costo del nano-ferro zero-valente è stato stimato essere tra 66 e 88 dollari per un chilogrammo di prodotto, mentre il prezzo di un chilogrammo di micro-ferro zero-valente (mZVI) si attesta nell'intervallo tra 2 e 11 dollari.

Per quanto riguarda l'utilizzo di nZVI o mZVI non si può avere una risposta univoca e generale riguardo i vantaggi di una tecnologia rispetto all'altra; ogni situazione va valutata singolarmente attraverso studi chimici ed ecotossicologici per impiegare la metodologia migliore al fine di garantire la rimozione degli inquinanti con il minor impatto possibile sull'ambiente.

1.3 Cinetiche di ossidazione del ferro in ambiente acquoso

In soluzione acquosa lo stato d'ossidazione più stabile del metallo è il (III), poiché il ferro allo stato d'ossidazione (0) e (II) viene facilmente ossidato dall'ossigeno atmosferico a tutti i pH (Marcon, 2008).

La mobilizzazione del ferro nell'ambiente avviene principalmente come Fe(II) solubile sotto condizioni riducenti e come ossiidrossidi di Fe(III) particolato in ambienti ossigenati. Nelle acque superficiali e nei sedimenti ossidati, il ferro disciolto è mobile tra un pH da circa 3 a 4 come Fe^{3+} e come complessi inorganici di Fe(III); il Fe(III) è mobile anche in molti suoli e nelle acque sotterranee come complessi ferro-organici fino da un pH 5 a 6 e come ossiidrossidi ferrici colloidali da pH 3 a 8. In presenza di condizioni riducenti il ferro è solubile e mobile come Fe(II) fino ad un pH di circa 7-8, di solito come Fe^{2+} ionico non complessato (Langmuir, 1997).

L'ossidazione delle specie di ferro(II) da parte dell'ossigeno molecolare è molto rapida e porta alla formazione di specie di ferro(III) che facilmente vengono idrolizzati, precipitano e si trasformano in ossidi diversi a seconda della disponibilità di ossigeno (Noubactep, 2010).

La spontanea ossidazione chimica da ferro ferroso a ferrico da parte dell'ossigeno è un processo complesso che coinvolge una varietà di specie intermedie parzialmente ossidate e, tali specie, sono difficili da caratterizzare e predire. Questi intermedi in fine si trasformano in diversi composti stabili di idrossidi e ossidi di ferro come l'ematite, la magnetite, la goethite o la lepidocrocite. Gli esatti prodotti finali formati dipendono dalle condizioni ambientali tra le quali principalmente dal pH, dalla temperatura, dalla composizione della soluzione e dal tasso di ossidazione (Morgan & Lahav, 2007). Lo studio delle cinetiche di dissoluzione del ferro in ambienti acquosi naturali non può prescindere, quindi, dal mettere in relazione il tasso di velocità con il pH della soluzione, considerando che le acque superficiali e sotterranee posseggono valori intorno alla neutralità.

Stumm e Morgan (1996) hanno presentato la seguente equazione cinetica per l'ossidazione del Fe^{2+} a Fe^{3+} con $O_{2(aq)}$ come accettore di elettroni: $\frac{-d[Fe^{2+}]}{dt} = k[Fe^{2+}][OH^-]^2 P_{O_2}$ Questa equazione empirica è stata derivata da dati ottenuti dall'ossidazione di soluzioni ferrose contenenti circa 28 mg Fe/l e a pH compresi tra circa 4 e 6. Secondo tale equazione il tasso di ossidazione è di primo ordine rispetto a P_{O_2} e $[Fe^{2+}]$, mentre è di secondo ordine per la $[OH^-]$; inoltre, è stato dedotto che per pH inferiori a 4 l'ossidazione diventa così lenta da essere fundamentalmente indipendente dal pH.

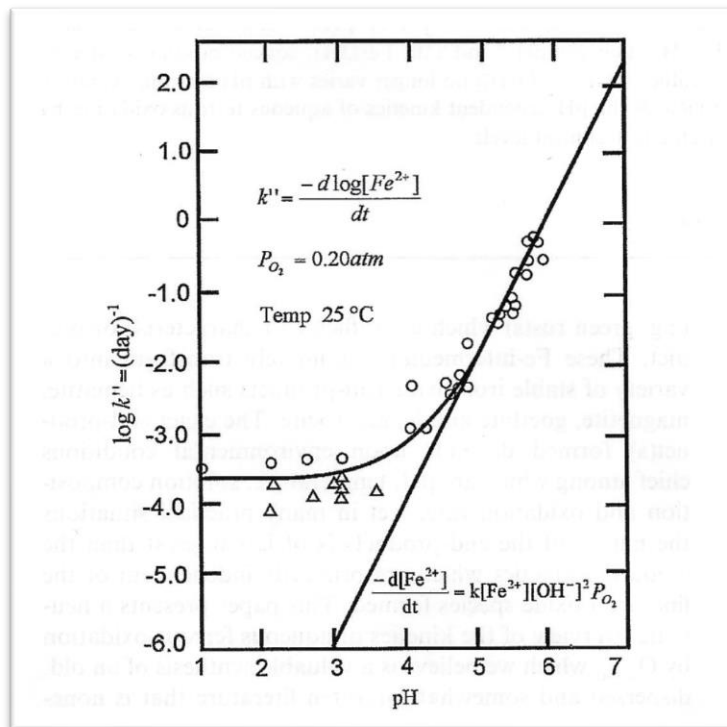


Figura 2 Tasso di ossidazione delle specie di ferro ferroso in funzione del pH (Stumm e Morgan, 1996)

Millero (1985) è giunto in parte a risultati concordanti con l'equazione precedente; d'altra parte, separando individualmente le specie presenti in soluzione acquosa con Fe(II) ha assunto un approccio in contrasto con la prima equazione, considerando che più reazioni di ossidazione avvengano simultaneamente in presenza di specie di ferro solubili:

$$\frac{-d[Fe^{2+}]}{dt} = (k_0[Fe^{2+}] + k_1[Fe(OH)^+] + k_2[Fe(OH)_2^0] + k_3[Fe(OH)_3^-])DO$$

Dove è stato utilizzato l'ossigeno disciolto (DO) e k_0 , k_1 , k_2 e k_3 sono le costanti del tasso di ossidazione ($tempo^{-1}$).

È stato dimostrato che le specie di ferro ferroso idrolizzate sono più facilmente ossidate rispetto a quelle non idrolizzate nell'ordine seguente $Fe(OH)_2^0_{(aq)} \gg Fe(OH)^+ \gg Fe^{2+}$; la spiegazione può essere ricondotta al fatto che i gruppi OH^- donano densità elettronica allo ione ridotto del metallo, incrementando il potere riducente e stabilizzando il Fe^{3+} formato durante l'ossidazione (Morgan & Lahav, 2007).

L'analisi delle cinetiche di dissoluzione in ambiente acquoso delle specie di ferro(II) in relazione al pH si concentra quasi esclusivamente sulle specie solubili sopra citate, perché, una volta precipitate in forma solida ($Fe(OH)_2(s)$), il tasso di ossidazione è risultato essere indipendente dal pH, ma dipendente solamente dal tasso di introduzione dell'ossidante (tipicamente ossigeno) nell'acqua.

Basandosi sugli studi di Lawson (1982) e Millero (1985), Morgan & Lahav (2007) hanno esplicitato l'equazione per l'ossidazione delle specie ferrose solubili:

$$\frac{-d[Fe^{2+}]}{dt} = 6 \times 10^{-5} [Fe^{2+}] + 1.7 [Fe(OH)^+] + 4.3 \times 10^5 [Fe(OH)_2^0]$$

Questa equazione produce una curva di forma sigmoide in funzione del pH: a valori di pH inferiori a 4 è dominante la concentrazione di Fe^{2+} ed il tasso di ossidazione è indipendente dal pH; tra pH 5 e pH 8 la concentrazione di $Fe(OH)_2^0$ cresce all'aumentare del pH e determina la velocità perché è molto più facilmente ossidato rispetto alle altre specie presenti; a valori di pH maggiori di 8 il tasso di ossidazione torna ad essere indipendente dal pH.

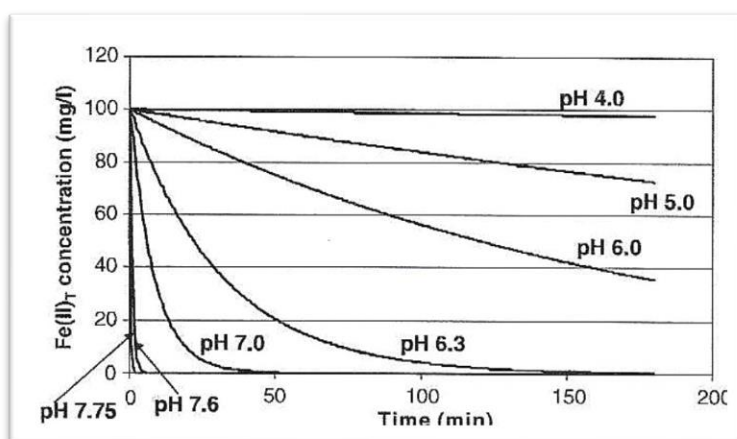


Figura 3 Tasso di ossidazione di Fe(II) solubile in funzione del pH (Morgan & Lahav, 2007)

Per quanto riguarda le costanti dell'equazione elaborata da Morgan e Lahav, i loro valori mostrano una differenza di cinque ordini di grandezza rispettivamente una dall'altra, facendo risaltare il fatto che il tasso d'ossidazione complessivo dipende dalla distribuzione delle tre specie nella fase acquosa che, a sua volta, è dipendente principalmente dal pH e dalla temperatura (Morgan & Lahav, 2007). Per riassumere quanto detto sulle cinetiche di ossidazione del ferro(II) viene riportata di seguito una figura che mostra i cambiamenti di concentrazione nel tempo in conseguenza all'ossidazione da parte dell'ossigeno a differenti valori di pH.

Questa rappresentazione conferma il fatto che a valori di pH inferiori a circa 7-8 il fattore limitante che governa il tasso di ossidazione è il pH, mentre per valori superiori di pH la concentrazione di ossigeno disciolto rappresenta il fattore limitante all'ossidazione (Morgan & Lahav, 2007).

1.4 Fitotossicità del ferro microscopico

La tossicità del ferro è correlata alla sua solubilità che, a sua volta, è dipendente dalla composizione della soluzione. La solubilità del ferro cresce al diminuire del pH e con la presenza di ioni solfato, comuni negli ambienti circostanti a miniere, a rifiuti di miniere di zolfo o altri depositi di solfuri (Bartakova et al., 2001).

Bartakova et al. (2001) affermano, quindi, che per poter valutare gli effetti tossici del ferro si dovrebbero eliminare le interferenze come ad esempio la precipitazione del metallo lavorando in soluzioni acide; tuttavia, affermano anche che la selezione del pH viene limitata dalla tolleranza all'acidità della pianta presa come indicatore, ricordando che valori di pH inferiori a 3 inibiscono fortemente lo sviluppo della maggior parte delle specie vegetali. Effettuando dei test a pH 2.6 su semi di *Lactuca sativa* hanno riportato una correlazione tra l'inibizione della germinazione e l'aumento della concentrazione del ferro ferrico ($Fe_2(SO_4)_3$).

Condizioni ambientali di tale acidità sono presenti e possibili in particolari casi, però, al fine di avere dei dati confrontabili con parametri più usuali in circostanze naturali, di seguito, vengono riportate le conclusioni tratte da Libralato et al. (2016) riguardo la fitotossicità del ferro nelle forme ionica, micro- e nanoscopica ad un pH compreso tra 5 e 6. Quattro indicatori di tossicità (germinazione dei semi, allungamento della plantula, indice di germinazione e biomassa) sono stati valutati sulle macrofite *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* e *Sorghum saccharatum*, esposte ad un intervallo tra 1.71 e 10.78 mg/l per il micro-ferro e ad un intervallo tra 4.81 e 33.56 mg/l per il nano-ferro. Secondo i parametri considerati ed i diversi scenari sperimentali le particelle di ferro microscopico e nanoscopico non hanno prodotto effetti negativi significativi su nessuna delle tre specie vegetali, mentre il ferro ionico ha mostrato lievi effetti tossici nei confronti delle specie prese in considerazione alla concentrazione di 1570 mg/l; d'altra parte, è stato rilevato un moderato effetto di biostimolazione nei campioni trattati con alte concentrazioni di micro- e nano-ferro. Tali risultati, in accordo con altri studi, suggeriscono la possibilità che gli effetti biologici causati del ferro possano essere specie-dipendenti.

Nella caratterizzazione di questo metallo deve essere tenuto in conto che, sebbene il ferro sia un elemento abbondante in natura, spesso non è disponibile per le piante, specialmente a pH neutri e alcalini a causa della formazione di idrossidi di ferro insolubili in condizioni aerobiche. La precipitazione del ferro nella rizosfera può risultare, quindi, in un'insufficienza di ferro e riduzione della crescita (Hasegawa et al., 2011).

Timothy et al. (2004) hanno condotto uno studio sulla fitotossicità di alcuni fertilizzanti a base di ferro rispetto alle specie vegetali *Pelargonium hortorum* (geraneo) e *Tagetes erecta* (calendula). I risultati ottenuti da questo studio mostrano un incremento degli effetti tossici all'aumentare della concentrazione di tutti i fertilizzanti, in particolar modo per quelli comunemente più utilizzati nei sistemi di irrigazione come il FeEDTA o FeDTPA.

I sintomi sono apparsi come necrosi marginali, punti necrotici, arricciamento delle foglie e diminuzione del peso secco. La conclusione dello studio su queste due specie vegetali trattate con molte tipologie di fertilizzanti, ha ricondotto la causa degli effetti di tossicità rilevati alla specifica tossicità dei complessi chelati e non alla tossicità intrinseca degli ioni di ferro. Riportando anzi, in accordo con altri studi, che lo ione Fe^{2+} è molto meno tossico per geranei e calendule rispetto ad altri micronutrienti come Zn, Cu, Mn, B o Mo.

1.4.1 Assorbimento, trasporto e accumulo del ferro nelle piante

Il ferro è un micronutriente essenziale per le piante e gioca un ruolo importante nella respirazione, nella fotosintesi, nella sintesi del DNA, nella fissazione dell'azoto, nella produzione di ormoni ed in altre funzioni cellulari (Hasegawa et al., 2011). In particolare, il metabolismo cellulare utilizza cofattori contenenti ferro sotto forma di gruppi eme o ferro-zolfo per trasferire elettroni, ad esempio nella respirazione mitocondriale o nella fotosintesi cloroplastica (Thomine e Vert, 2013). Nonostante sia presente in grandi quantità in natura, il ferro si trova nei suoli alcalini in forma di ossidi idratati, i quali sono scarsamente solubili e, di conseguenza, di difficile assorbimento da parte delle radici delle piante. Questo causa dei problemi di crescita nelle specie vegetali che hanno dovuto sviluppare meccanismi diversi per rendere biodisponibile il ferro presente nel sottosuolo. Sotto tali condizioni, le piante mettono in atto due strategie naturali distinte per assimilare il ferro dall'ambiente: le piante erbacee rilasciano fitosiderofori, composti con basso peso molecolare e chelanti con alta affinità il Fe(III), che solubilizzano il ferro ferrico nella rizosfera e sono riconosciuti da specifici trasportatori di membrana; nelle piante dicotiledoni e monocotiledoni non erbacee, l'assorbimento del ferro è mediato da una riduttasi di membrana che trasferisce elettroni dall'NADH intracellulare al ferro(III) chelato nella rizosfera. Gli ioni ferrosi rilasciati dai chelati durante questo processo vengono poi trasportati separatamente nel citoplasma da un'altra proteina trasportatrice (Hasegawa et al., 2011).

Tuttavia, l'attivazione dell'assorbimento del ferro rappresenta un duplice pericolo: non solo il ferro stesso può essere tossico ma i sistemi di trasporto del ferro all'interno della pianta sono

scarsamente selettivi e permettono l'entrata di altri metalli potenzialmente tossici (Thomine e Vert, 2013).

Essendo già stato ipotizzato da diversi ricercatori che metalli tossici come il cadmio (Cd) entrino nelle piante attraverso i trasportatori di cationi essenziali come il ferro o il calcio, Thomine et al. (2000) hanno effettuato uno studio sull'espressione dei geni della famiglia Nramp nella specie vegetale *Arabidopsis thaliana*. I loro risultati hanno mostrato che tale famiglia di geni, nelle piante, codifica per dei trasportatori di metalli e che tali trasportatori siano in grado di assimilare sia il ferro, micro-nutriente, sia il cadmio, un metallo tossico.

Hell & Stephan (2003) riportano che l'acquisizione del ferro e degli altri micronutrienti nelle piante inizia nell'apoplasto delle cellule epidermiche delle radici e, successivamente, diffonde nel plasmalemma; una volta entrato nel simplasto radicale, il ferro viene schermato dall'ossigeno per evitarne la precipitazione dalla nicotianamina, un amminoacido che rappresenta il principale chelante del ferro simplastico.

Quando la concentrazione del ferro nelle cellule raggiunge livelli elevati o potenzialmente tossici, il metallo viene immagazzinato all'interno dei cloroplasti, non in forma libera, ma legato ad una proteina, la fitoferritina, la cui sintesi è indotta appunto dall'eccesso di ferro (Hell & Stephan, 2003). Per quanto riguarda la distribuzione del ferro all'interno delle cellule vegetali, Thomine & Vert (2013) affermano che i siti quantitativamente più importanti per il suo utilizzo sono cloroplasti e mitocondri; il ferro cloroplastico rappresenta il 70-90 % del ferro cellulare contenuto nelle cellule del mesofillo. Tuttavia, la compartimentalizzazione del ferro varia grandemente a seconda del tipo di cellule e organi; per esempio, nell'embrione maturo di *Arabidopsis*, la frazione maggiore è localizzata nei vacuoli delle cellule endodermiche.

Gli stessi autori hanno dimostrato chiaramente il ruolo dei vacuoli nell'immagazzinamento del ferro negli embrioni maturi di *Arabidopsis*, accumulato sotto forma di globoidi nei vacuoli utilizzati nella conservazione delle proteine.

2. Materiali e metodi

2.1 Caratterizzazione micro-ferro

Il lavoro di tesi ha compreso lo studio di quattro differenti tipologie di micro-ferro provenienti da un unico produttore, Pometon Powder S.p.A., di cui si riportano le caratteristiche nella tabella che segue.

Tipologia Fe	Acronimo	Dimensione della setacciatura	Contenuto di ossigeno	Densità apparente	Contenuto di Fe	Descrizione
Ferblast RI850/3.5	mFeA	850 μm	0.25 %	3.5 g/cm ³	95-99.5 %	Polvere di Fe con basso contenuto di Ossidi.
Ferelet RI425/3.0	mFeB	425 μm	0.25 %	3 g/cm ³	95-99.5 %	Polvere di Fe con basso contenuto di Ossidi.
Ferelet MT425/3.7	mFeC	425 μm	0.9 %	3.7 g/cm ³	95-98 %	Polvere di Fe con contenuto controllato di Ossidi.
Ferchim RI63/3.2	mFeD	63 μm	0.5 %	3.2 g/cm ³	95-99.5 %	Polvere di Fe con basso contenuto di Ossidi ed alto contenuto di ferro metallico (ZVI).

Tabella 1 Tipologie di micro-ferro utilizzate nel lavoro di tesi. Dati e descrizioni forniti da Pometon spa.

Le polveri di micro-ferro A, B e D sono polveri di ferro ridotte, prodotte mediante atomizzazione ad acqua, riduzione (forno H_2) e setacciatura; il micro-ferro C proviene, invece, da polvere di ferro standard prodotta tramite la sola atomizzazione ad acqua e setacciatura. Il produttore dichiara che in caso di richieste di bassi contenuti di ossidi ed alto contenuto di ferro, la polvere viene prodotta in forni con idrogeno, dove può essere raggiunto il contenuto di 99.5 % di ferro metallico (ZVI).

2.2 Reagenti

Le indagini sperimentali sono state condotte mediante l'impiego di acqua ultrapura sia per quanto riguarda le valutazioni fisico-chimiche sia per l'allestimento dei saggi fitotossicologici. L'utilizzo di tale matrice liquida ha rappresentato, consapevolmente, una semplificazione del modello scelto rispetto alle reali condizioni ambientali, ciononostante ha permesso la visione dei possibili effetti nell'ambito del sistema sperimentale definito.

Per valutare la capacità di rimozione degli inquinanti da parte delle diverse tipologie di ferro studiate è stato utilizzato il cadmio come tossico di riferimento, alla concentrazione relativa all' EC_{50} delle specie testate. I valori di EC_{50} per il cadmio provengono da test eseguiti precedentemente rispetto

al presente lavoro di tesi e sono di seguito riportati: *Lepidium sativum* 19 mg/L, *Sinapis alba* 27 mg/L e *Sorghum saccharatum* 81 mg/L.

Prima di procedere all'esposizione dei tre modelli biologici esaminati alle quattro tipologie di micro-ferro e al micro ferro additivato al tossico di riferimento, sono stati registrati i parametri chimico-fisici delle soluzioni (Tabella 2) con le quattro polveri di ferro, tutte alla concentrazione di 20 g/L. Un'eventuale abbassamento del pH delle soluzioni avrebbe potuto compromettere i risultati dei test di fitotossicità sulle specie vegetali e, quindi, si sarebbe resa necessaria la correzione del pH della soluzione prima della messa in atto dei test. Precedenti ricerche su *L. sativum*, *S. alba* e *S. saccharatum* hanno messo in evidenza una diminuzione notevole nella germinazione in trattamenti con soluzioni a pH < 5 (Costa Devoti A., sperimentazione in corso).

Di seguito vengono riportati i valori di pH, Eh e temperatura per le quattro soluzioni con micro-ferro.

	pH	Eh (mV)	T (°C)
mFeA	7	-6,2	22,4
mFeB	7,02	-7,5	22,7
mFeC	7,3	-23,8	23,5
mFeD	7,48	-34,6	22,9

Tabella 2 Parametri chimico-fisici delle soluzioni con mFe (20g/L).

Potenziale di ossidoriduzione (Eh), pH e temperatura (°C) sono stati misurati mediante pHmeter HI 9025 Microcomputer di HANNA Instrument®.

2.3 Protocollo sperimentale impiegato nelle prove di fitotossicità

Il protocollo di riferimento seguito per l'attuazione dei test di fitotossicità è quello stabilito da Baudo et al. (1999) per la messa a punto di un test ecotossicologico basato sull'uso di semi di diverse specie vegetali.

Il seme deriva da un ovulo fertilizzato, dove i tegumenti dell'ovulo racchiudono un endosperma e l'embrione. L'embrione è formato da una corta radice, o radichetta, che si continua in un corto fusto (ipocotile) e in germoglio con uno o più cotiledoni: 1 nelle monocotiledoni e 2 nelle dicotiledoni. Il seme è infine completato da tegumenti seminali, con funzione protettiva.

Il test di germinazione ed allungamento radicale permette di valutare l'eventuale tossicità di un campione misurando l'inibizione della germinazione e/o dell'allungamento radicale di semi

germinati in condizioni controllate e confrontati con appositi controlli (in assenza dell'agente interferente).

Il protocollo metodologico messo a punto nei suddetti lavori prevede le seguenti condizioni operative:

- Semi: almeno 3 specie, preferibilmente 2 dicotiledoni e 1 monocotiledone perché le modalità di azione dei vari tossici possono essere diverse nelle due categorie;
- Pretrattamento: nessuno;
- Semina: 10 semi su carta da filtro Whatman N°1 in piastre Petri da 10 cm;
- Campione: 5 ml, sufficientemente grande da consentire la completa imbibizione dei semi;
- Incubazione: 72 ore a 25 ± 1 °C al buio;
- Endpoint: semi germinati, allungamento della plantula, indice di germinazione (%).

Alla conclusione della prova devono essere contati i semi germinati (si considerano germinati i semi con un allungamento radicale visibile di almeno 1 mm) per misurarne separatamente germoglio e radice, oppure l'intera plantula. In Figura 3 viene descritto il tratto da misurare per alcune specie di riferimento.

Per l'accettabilità dei test, la germinazione dei semi nei controlli negativi deve essere > 90%. Germinazione e allungamento radicale nel controllo negativo devono essere compresi entro limiti fiduciali definiti dalle rispettive carte di controllo che riportano le medie e i relativi intervalli (Baudo et al., 1999).

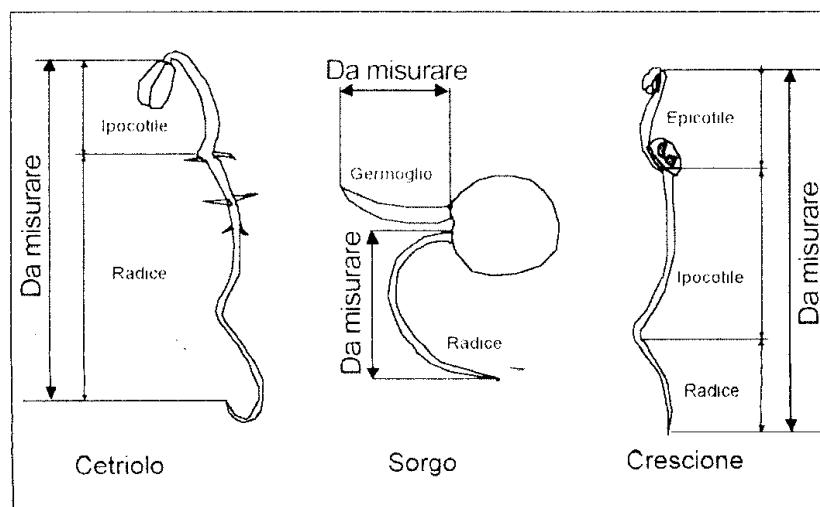


Figura 4 Protocollo di riferimento per misurazione delle plantule (Baudo e Beltrami, 2004).

2.3.1 Test di fitotossicità e disegno sperimentale

Nell'attività sperimentale, in accordo con le linee guida dell'OECD (2006) e con le attività d'intercalibrazione dei test di fitotossicità a livello europeo, sono state scelte tre specie di macrofite: due dicotiledoni (*Lepidium sativum* e *Sinapis alba*) e una monocotiledone (*Sorghum saccharatum*).

Lepidium sativum (crescione inglese) e *Sinapis alba* (senape bianca) sono piante aromatiche appartenenti alla famiglia *Brassicaceae*, appartenente alla classe delle piante dicotiledoni (*Magnoliopsida*) delle angiosperme; *Sorghum saccharatum* (sorgo) fa sempre parte delle angiosperme, però appartiene alla famiglia delle *Poaceae* (comunemente denominate graminacee) della classe delle monocotiledoni (*Liliopsida*) (Selvi F. e Signorini M.A., 2009).

I semi utilizzati sono certificati dal punto di vista della germinabilità e sono stati acquistati da Ecotox srl. Gli endpoint valutati sono stati: inibizione della germinazione, inibizione dell'allungamento delle plantule, indice di germinazione, inibizione della produzione di biomassa e bioaccumulo del ferro. Questi ultimi due endpoint sono stati integrati a quelli previsti dal test standard in accordo con le procedure riportate da Baudo et al. (1999).

Dopo essere state preparate quattro soluzioni contenenti ciascuna una delle quattro tipologie di ferro, tutte alla concentrazione di 20 g/L, aliquote pari a 5 mL sono state prelevate e inoculate in capsule Petri in polistirene (\varnothing 100 mm) dotate di filtro Whatman N. 1 (\varnothing 90 mm, porosità 11 μ m).

Il cadmio è stato utilizzato come tossico di riferimento alle concentrazioni di 19, 27 e 81 mg/L rispettivamente per *Lepidium sativum*, *Sinapis alba* e *Sorghum saccharatum*, corrispondenti alla concentrazione di EC_{50} di ciascuna specie. Questi valori di EC_{50} sono stati ricavati da ricerche sperimentali effettuate presso il laboratorio di ecotossicologia dell'Università Cà Foscari di Venezia antecedentemente al lavoro di ricerca descritto dalla tesi di laurea corrente.

L' EC_{50} è un parametro utilizzato per esprimere risultati di test ecotossicologici rappresentativo della concentrazione efficace mediana, in altre parole la concentrazione che produce effetti nel 50 % degli individui in relazione ad un determinato tempo di esposizione ed all'endpoint considerato (Bargagli, 2012).

Sono stati effettuati trattamenti per ciascuna tipologia di micro-ferro utilizzata (A, B, C e D) alla concentrazione di 20 g/L con l'aggiunta del cadmio alla concentrazione di EC_{50} per ognuna delle tre specie vegetali. In questo modo, è stato possibile ricercare eventuali cambiamenti indotti dalla presenza del mFe sugli effetti di inibizione da parte del tossico. La valutazione è stata fatta su ognuno degli endpoint presi in considerazione per i test di fitotossicità per ognuna delle tre specie vegetali studiate e relativamente alle quattro diverse tipologie di micro-ferro.

Ogni capsula ha ospitato dieci semi ed è stata preparata in tre repliche; ad ogni tipologia di ferro esaminata è stato abbinato il controllo negativo in sola acqua ultrapura. Una volta preparate, le capsule sono state incubate a 25 ± 1 °C per 72 ± 1 h al buio.

Al termine delle 72 h, tutte le capsule sono state fotografate, tramite smartphone, per poter procedere all'acquisizione delle morfometrie delle plantule: è stata effettuata prima la correzione della distorsione delle immagini mediante l'utilizzo di un apposito software (PTLens), per poi acquisire le misure della lunghezza delle plantule con il software grafico ImageJ. Le immagini sono state acquisite su carta millimetrata in modo da poter assegnare alla misura in pixel della fotografia una misura in millimetri. La parte della carta millimetrata sottostante la piastra Petri è stata oscurata per aumentare il contrasto con le plantule e migliorare l'accuratezza delle misurazioni.

La figura 5 mostra un esempio di misurazione delle plantule: il segmento evidenziato in giallo rappresenta una plantula misurata, il cui valore di lunghezza viene riportato direttamente in un foglio Excel appositamente creato.

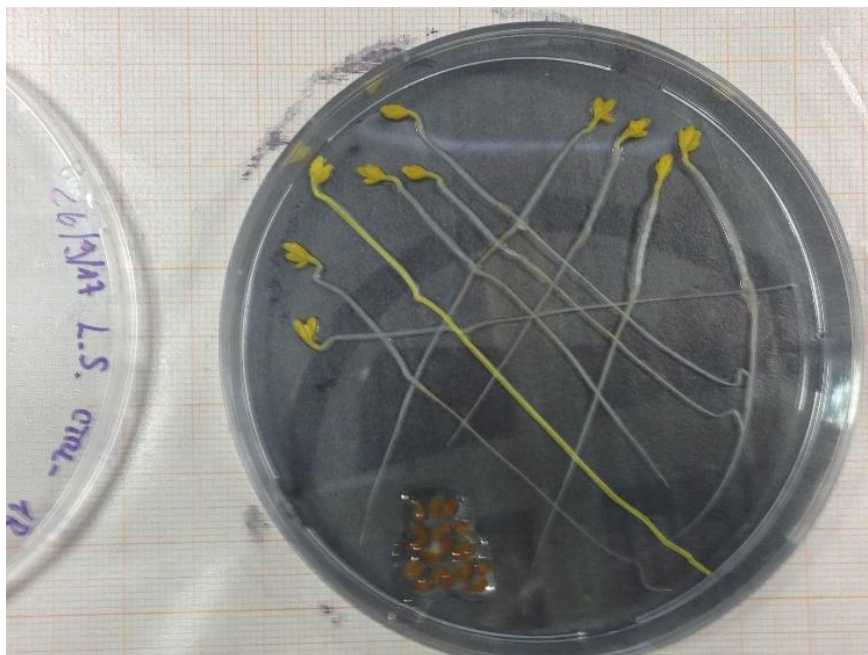


Figura 5 Misurazione plantule tramite software grafico ImageJ. Campione relativo alla prima replica del controllo di *L. sativum*.

Confrontando la figura 5 (controllo negativo) con la figura 6, riportata di seguito, relativa all'esposizione di *L. sativum* alla miscela di cadmio (19 mg/L) e mFeC (20 g/L), si può notare facilmente l'inibizione della lunghezza delle plantule misurate dai tratti evidenziati in giallo tramite il software.

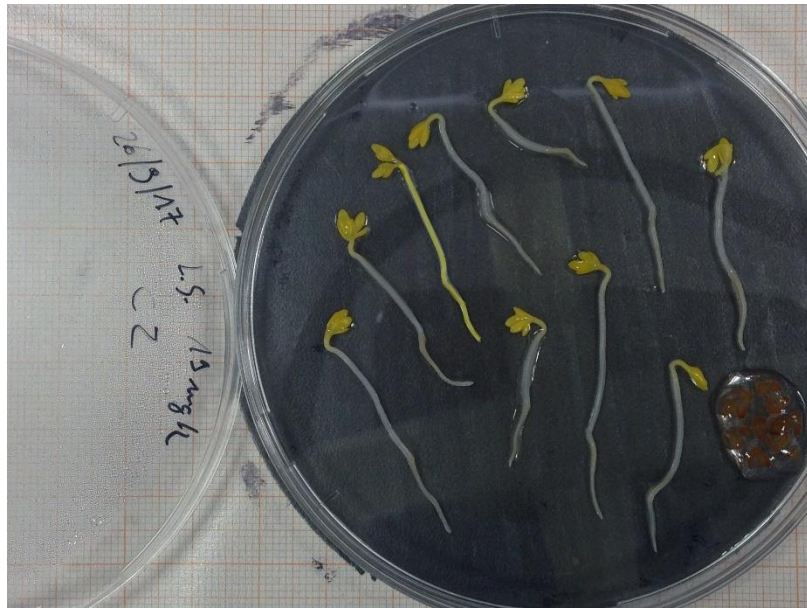


Figura 6 Misurazione plantule tramite software grafico ImageJ. Campione relativo alla seconda replica del trattamento con cadmio e mFeC per *L. sativum*.

In seguito, il materiale biologico contenuto in ogni capsula Petri è stato diviso in tre parti (parte aerea, tegumento del seme e radichetta della plantula) e trasferito in microprovette (Eppendorf) allo scopo di registrare il peso umido per ogni replica (pool dei 10 individui di ciascuna replica). I contenitori sono stati inseriti in stufa a 105 ± 1 °C per 24 h e, dopo un passaggio di 1 h in essiccatore, ne è stato determinato il peso secco. Per differenza, in seguito, è stata determinata la biomassa prodotta in ciascuna replica per ognuna delle tre parti della plantula.

Per avere una panoramica migliore sui meccanismi di tossicità da parte di mFe e cadmio sulle specie vegetali trattate, sono state effettuate le analisi di bioaccumulo dei delle due specie chimiche nei tre comparti vegetali precedentemente separati in ogni plantula (parte aerea, tegumento e radichetta).

I campioni sono stati inizialmente digeriti tramite digestione acida a microonde (Discover SP-D oven, CEM Corporation): in contenitori da 35 mL sono stati introdotti il campione secco, 2 mL di perossido di idrogeno ultrapuro e 4 mL di acido nitrico ultrapuro. La digestione è stata condotta in 7 minuti alla temperatura di 170°C, dopo di cui i campioni sono stati lasciati raffreddare fino a temperatura ambiente per 30 minuti e diluiti con 9 mL di acqua MilliQ.

Un'aliquota di ogni soluzione campione è stata diluita ed analizzata tramite spettrometria di massa al plasma accoppiata induttivamente equipaggiata con cella universale a doppio canale (ICP-MS NexION 350D, Perkin Elmer).

2.3.2 Analisi dei dati di effetto

La diversità statistica tra campioni è stata valutata mediante l'analisi della varianza (test ANOVA) con un limite di confidenza del 95%. Inoltre, sono stati utilizzati i test Dunnett's e di Tukey's per mettere in evidenza le possibili differenze tra controlli e trattamenti con il primo metodo e tra i vari trattamenti con il secondo metodo.

I dati di tossicità dei diversi endpoint (inibizione dell'allungamento della plantula, indice di germinazione e inibizione della produzione di biomassa) sono stati espressi come percentuali di effetto rispetto al controllo negativo.

Il valore di inibizione della lunghezza della plantula (IAP) è stato calcolato sulla base della seguente formula:

$$IAP = \frac{\text{lunghezza controllo} - \text{lunghezza trattato}}{\text{lunghezza controllo}} \times 100$$

Il valore dell'indice di germinazione (GI) è stato calcolato mediante la formula che segue:

$$GI = \frac{(G_t * L_t)}{(G_c * L_c)}$$

Dove G_t e L_t sono, rispettivamente, la percentuale di semi germinati e la lunghezza della plantula (mm) in presenza del trattamento; mentre G_c e L_c sono gli stessi valori ma riferiti al controllo negativo.

L'inibizione della produzione di biomassa (IB) è stata calcolata valutando, per via gravimetrica, la biomassa prodotta rispetto al peso secco normalizzato al numero di semi germinati per ciascuna replica di ciascun trattamento considerando anche la normalizzazione rispetto agli effetti riscontrati nel controllo negativo.

I dati di tossicità sono stati comparati tra loro considerando le possibili differenze nei gruppi e tra i gruppi di dati omogenei mediante il test ANOVA, previa verifica della normalità e dell'omoschedasticità della distribuzione dei dati nei relativi database. I test Tukey e Dunnett sono stati utilizzati per verificare la significatività nella variabilità delle risposte tra i controlli negativi ed i trattamenti.

2.4 Test di dissoluzione del ferro

La valutazione delle cinetiche di dissoluzione delle quattro tipologie di micro-ferro utilizzate nel lavoro di tesi sono state effettuate tramite lisciviazione mediante Jar Test (Mod. ISCO, Vittadini, Milano, Italia) e successiva analisi chimica dei campioni prelevati.

Le soluzioni iniziali utilizzate nel Jar Test sono state preparate in Becker da 1L, uno per ciascuna classe di micro-ferro, contenenti acqua ultrapura. La concentrazione adottata per l'esecuzione del test è stata di 20 g/L di ferro per tutte e quattro le tipologie di micro-ferro testate.



Figura 7 Jar test. Fase di allestimento iniziale con preparazione di Becker da 1 L con soluzioni contenenti mFe (20g/L).

Una volta preparate le soluzioni, il Jar Test è stato effettuato a 20 rpm e ad una temperatura di $20 \pm 1^\circ\text{C}$, in condizioni di buio per evitare interferenze causate dalla possibile fotosensibilità del ferro testato.

Dalle soluzioni madre sono state prelevate aliquote di 1 ml tramite siringhe da 5 ml, le quali sono state munite di un filtro (filtro per siringhe non sterili di diametro 13 mm) con porosità $0,2 \mu\text{m}$; l'applicazione del filtro è stata resa necessaria per la successiva analisi chimica dei campioni per evitare la presenza di particelle in sospensione che avrebbero potuto compromettere la lettura dei risultati dell'analisi tramite spettrometria di massa.

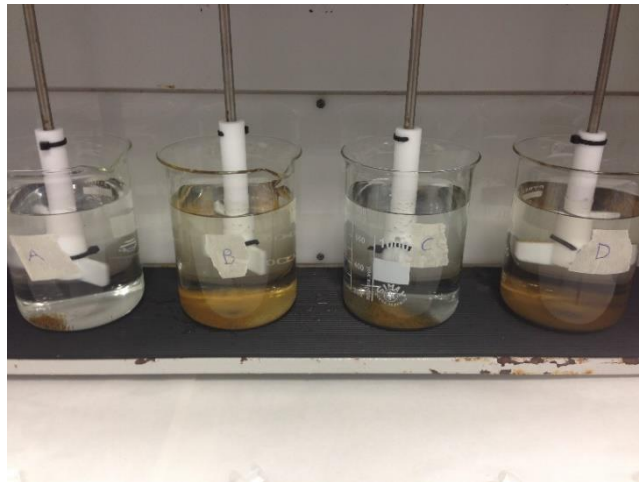


Figura 8 Jar test: dettaglio dopo 1 h. I trattamenti con mFeB e mFeD mostrano un ingiallimento marcato della soluzione; al contrario, la soluzione risulta limpida per test con mFeA e mFeC.

I prelievi per la valutazione della concentrazione di ferro in soluzione sono stati effettuati ai seguenti intervalli temporali: 0, 5 min, 15min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h. L'analisi della concentrazione di ferro in soluzione è stata effettuata fino a 48 h dall'inizio dei test di dissoluzione. Le aliquote prelevate sono state catalogate e stoccate in micro-provette Eppendorf da 1mL e congelate immediatamente per impedire l'insorgere di eventuali reazioni che avrebbero potuto modificare o interferire nella valutazione della concentrazione di ferro.



Figura 9 Micro-provette Eppendorf da 1 mL catalogate.

2.4.1 Concentrazioni analitiche

La determinazione delle concentrazioni analitiche è avvenuta mediante spettrometria di massa con sorgente al plasma accoppiata induttivamente (ICP-MS NexION 350X ICP-MS Perkin Elmer) grazie alla collaborazione del gruppo di ricerca del Prof. Marcomini.

L'ICP-MS è una tecnica analitica basata sulla separazione e sull'analisi individuale di masse di ioni e di relative abbondanze in fase gassosa. La discriminazione delle specie ioniche ha luogo in base al rapporto massa/carica (m/z). Questo fatto implica l'uso di una sorgente di ionizzazione per convertire i componenti del campione in ioni e di un analizzatore di massa per separare gli ioni secondo il loro rapporto m/z . Lo spettro di massa in uscita rappresenta l'intensità dello ione in funzione del rapporto m/z .

Per la determinazione della quantità di ferro è stato selezionato l'isotopo ^{57}Fe perché meno affetto da fenomeni di interferenza poliatomica rispetto all'isotopo più abbondante ^{56}Fe ; per la stessa ragione è stato selezionato l'isotopo del cadmio ^{111}Cd . Al fine di rimuovere l'interferenza poliatomica nella massa ^{111}Cd ($^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$) e nella massa ^{57}Fe ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^+\text{H}^+$), l'analisi è stata eseguita in modalità collisione (KED, Kinetic Energy Discrimination) utilizzando l'elio come gas di trasporto.

I campioni sono stati quantificati tramite calibrazione esterna usando una curva a più punti (6 punti nell'intervallo di concentrazione tra 0.1 $\mu\text{g/L}$ e 5000 $\mu\text{g/L}$ per il cadmio e 5 punti nell'intervallo di concentrazione tra 10 $\mu\text{g/L}$ e 5000 $\mu\text{g/L}$ per il ferro), utilizzando Ittrio e Renio come standard interni (5 $\mu\text{g/L}$).



Figura 10 Spettrometro di massa: NexION 350X Perkin Elmer.

Di seguito è presentata la tabella contenente i parametri operativi utilizzati per l'analisi con spettrometro di massa.

Component Parameter	Type/Value/Mode
Nebulizer	Meinhard quartz microconcentric
Spry Chamber	Quartz cyclonic
Triple Cone Interface Material	Nickel/Aluminum
Plasma Gas Flow	18 L/min
Auxiliary Gas Flow	1.2 L/min
Nebulizer Gas Flow	0.96-1 L/min
Sample Uptake Rate	200-250 uL/min
RF Power	1600 W
Collision Gas flow (Helium)	4.4 ml/min

Tabella 3 Parametri di funzionamento dello spettrometro di massa al plasma accoppiato induttivamente.

3. Risultati e discussione

La presentazione dei risultati è stata organizzata separando inizialmente gli effetti riguardanti i test di fitotossicità dalle prove sperimentali di dissoluzione delle tipologie di micro-ferro studiate.

In primo luogo, quindi, sono esposti singolarmente gli effetti prodotti dal mFe nei vari endpoint considerati per mettere in risalto eventuali stimolazioni o inibizioni sulle specie vegetali testate; dopo di che, a fianco dei risultati relativi ai trattamenti con solo mFe, sono stati esposti i risultati dei test effettuati con l'aggiunta del tossico di riferimento (cadmio).

Successivamente alla valutazione dell'inibizione della germinazione e dell'allungamento della plantula, è stata eseguita l'analisi dell'accumulo del ferro nelle specie vegetali trattate distinguendo tre zone di immagazzinamento differenti: la parte aerea della plantula, il tegumento del seme e la parte radicale. È necessario essere consapevoli che l'uptake può essere avvenuto in tutta la plantula per la precocità degli stadi e per il tipo di esposizione dal momento che tutta la plantula è stata immersa nella soluzione. Questa indagine sul bioaccumulo è dunque esplorativa ed ha consentito di mettere a punto la procedura.

Per semplicità, l'esposizione dei risultati è stata effettuata riportando l'effetto sull'endpoint considerato sia nei trattamenti con solo mFe (colonne azzurre), sia, di fianco, l'effetto prodotto dai trattamenti di esposizione alla miscela di mFe e Cd (colonne arancioni). Graficamente, quindi, risulta immediato il confronto tra il trattamento con micro-ferro ed il trattamento con, in aggiunta al mFe, il cadmio.

La seconda parte dell'esposizione dei risultati riguarda l'analisi dei test di dissoluzione delle quattro classi di ferro utilizzate nel lavoro di tesi. L'obiettivo di tale ricerca è stato evidenziare l'andamento della concentrazione di ferro presente in soluzione sulla base della granulometria del materiale aggiunto. Ottenute le conoscenze specifiche riguardo effetti di tossicità e velocità di dissoluzione del micro-ferro sono stati messi in relazione i risultati dei differenti test per valutare l'eventuale relazione tra i diversi fattori presi in considerazione durante lo sviluppo del lavoro di tesi.

3.1 Effetti di tossicità

3.1.1 Inibizione della germinazione

L'inibizione della germinazione è stata valutata per le tre specie vegetali esposte alle quattro tipologie di micro-ferro, con e senza l'aggiunta del cadmio alle rispettive concentrazioni di EC₅₀ di ognuna di esse. Il test è stato effettuato con gruppi di dieci semi in triplicato per singolo trattamento ed il seme è stato considerato germinato in caso della presenza di uno sviluppo radicale maggiore o uguale a 1 mm.

Nei controlli negativi è stata riscontrata una germinabilità del 100% nelle sementi delle specie *Lepidium sativum* e *Sinapis alba*, mentre la *Sorghum saccharatum* ha riportato una germinazione dell'80% dei semi.

Dei tre modelli biologici considerati, *Lepidium sativum* e *Sinapis alba* non hanno riscontrato nessuna rilevante inibizione della germinazione sia nei trattamenti con solo mFe sia in quelli con il cadmio: *L. sativum* ha riportato un numero di semi non germinati pari a 3 su 240 (10 semi x 3 repliche x 8 trattamenti), quindi l'1,25% del totale; *S. alba*, invece, ha avuto un numero di semi non germinati pari a 6 su 240, corrispondente al 2,5% del totale e quindi, anche in questo caso, non è stato riscontrato un effetto inibitorio da parte del mFe sulla germinazione delle due specie.

Al contrario, la specie vegetale *Sorghum saccharatum* è risultata più sensibile al micro-ferro considerando il numero di semi non germinati, 90 su 240 (37,5% del totale). Di conseguenza, risulta solo in quest'ultimo caso interessante riportare i dati riguardo la germinazione dei semi trattati.

La tipologia di mFe che ha portato al maggior numero di semi non germinati risulta essere il mFeC, con almeno 3 semi su 10 non germinati per ogni replica. Essendo il mFeC di dimensioni intermedie rispetto alle quattro tipologie di ferro testate, i dati non sembrano quindi mostrare una relazione proporzionale tra la dimensione delle particelle di ferro utilizzate e l'inibizione della germinazione. Lo stesso ragionamento può essere valido anche per i trattamenti con Cd, in cui i dati più negativi si registrano nelle repliche trattate con mFeB e mFeC, dimensionalmente simili e intermedi rispetto alle altre classi.

L'unico caso in cui il ferro sembra limitare l'azione di inibizione della germinazione da parte del cadmio è relativo al mFeD, in cui il numero di semi non germinati si limita a 11 su 30, quindi circa il 36% del totale rispetto ad un valore atteso pari almeno al 50%, previsto dall'esposizione della specie vegetale alla relativa concentrazione di EC₅₀ rispetto al cadmio.

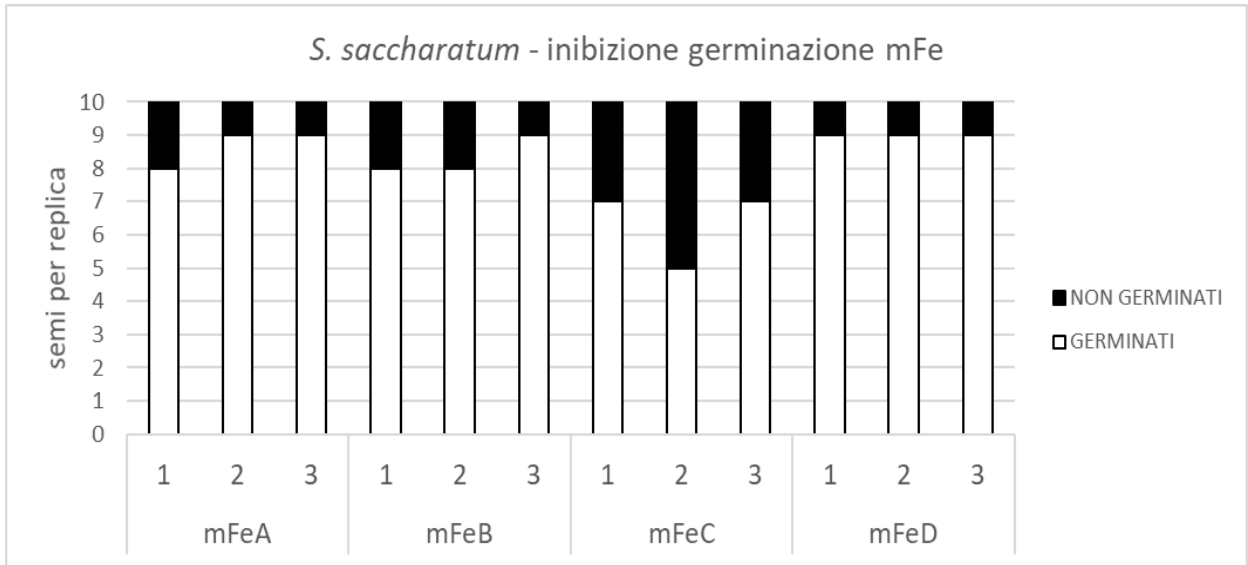


Figura 11 Inibizione della germinazione in *S. saccharatum* dopo esposizione a mFe. Le barre, divise in dieci sezioni corrispondenti al numero di semi per ogni replica, indicano in bianco i semi germinati e in nero i semi non germinati.

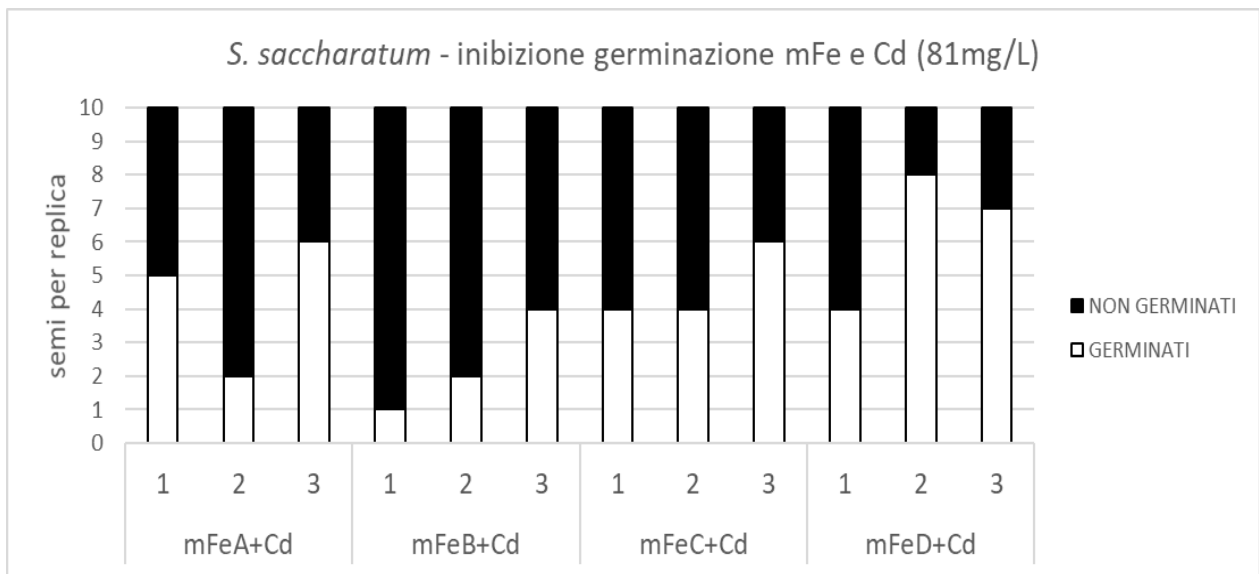


Figura 12 Inibizione della germinazione in *S. saccharatum* dopo esposizione a Cd (81mg/L) e mFe. Le barre, divise in dieci sezioni corrispondenti al numero di semi per ogni replica, indicano in bianco i semi germinati e in nero i semi non germinati.

3.1.2 Effetti sull'allungamento della plantula

I dati riportati si riferiscono agli effetti valutati sulle plantule nella loro totalità (lunghezza totale dall'apice della radichetta all'intersezione delle foglie cotiledonari). I dati sono riportati a seguire come media dei valori di inibizione dell'allungamento della plantula (IAP%) sulle tre repliche riguardanti le singole specie testate. A valori positivi di IAP corrisponde un effetto inibitorio nell'accrescimento delle plantule, viceversa valori negativi indicano una stimolazione nelle medesime sempre previa normalizzazione dei dati rispetto agli effetti nei controlli negativi.

Di seguito vengono riportati i dati relativi all'inibizione dell'allungamento della plantula (% IAP) considerando singolarmente ciascun modello biologico trattato con mFe e cadmio.

Dall'analisi della varianza è risultato che tra gli effetti nel controllo e nei trattamenti con micro-ferro e cadmio esiste una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) per tutte e tre le specie vegetali trattate; mentre, la significatività degli effetti varia da specie a specie per i trattamenti con solo mFe.

3.1.2.1 *Lepidium sativum*

I risultati dell'inibizione dell'allungamento della plantula da parte del micro-ferro su *L. sativum* mostrano un'effettiva inibizione da parte del mFeB ($\approx 26\%$) e del mFeC ($\approx 11\%$).

Le altre due tipologie di mFe testate (mFeA e mFeD) non hanno indotto né effetti inibitori né effetti di stimolazione dell'allungamento della plantula, registrando valori di IAP molto vicini allo 0%.

L'IAP ha riportato valori statisticamente significativi ($p < 0,05$) unicamente per il trattamento con mFeB (26,93%).

L'esposizione di tutte e quattro le componenti in miscela con il cadmio presentano valori di inibizione compresi tra circa il 53% ed il 59%. Nessuna tipologia di ferro ha, quindi, influito sull'abbassamento dell'inibizione dell'allungamento della plantula in maniera significativa. Inoltre, in nessun trattamento è stata riscontrata una mitigazione degli effetti tossici prodotti dal cadmio sulle tre specie vegetali; la mitigazione dell'inibizione dell'allungamento della plantula viene messa in luce per trattamenti con valori di IAP inferiori al 50%, non riscontrati in nessun caso.

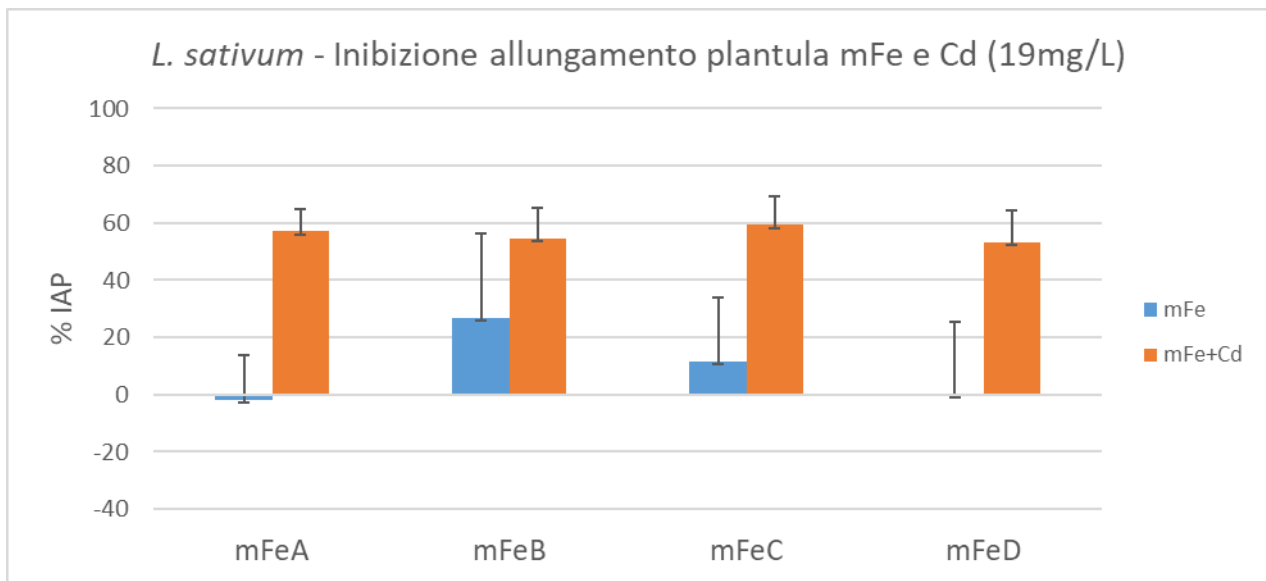


Figura 13 Inibizione dell'allungamento della plantula (%) in *L. sativum* normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (19mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.

3.1.2.2 *Sinapis alba*

In generale, i risultati ottenuti dall'esposizione di *S. alba* alle quattro tipologie di mFe hanno mostrato una sensibilità più elevata rispetto alle tre specie vegetali testate. In particolare, il mFeC ha prodotto uno spiccato effetto inibitorio riportando un valore di IAP pari circa al 40% rispetto al controllo negativo. Anche le altre tipologie di mFe hanno prodotto effetti inibitori sull'allungamento della plantula, tra i quali quello risultato meno nocivo è stato il trattamento con mFeD ($\approx 11\%$). I trattamenti con mFeA e mFeC riportano un'inibizione della lunghezza della plantula significativamente diversa ($p < 0,05$) rispetto al controllo negativo.

Anche in questo caso, come per *L. sativum*, tutti i trattamenti con cadmio hanno prodotto un'inibizione compresa tra circa il 60 e 70% rispetto al controllo negativo, mettendo in evidenza la particolare sensibilità di *S. alba* rispetto al cadmio. Il mFe utilizzato nei test non ha prodotto un effetto positivo nei trattamenti con il cadmio, ma anzi ha portato ad un aumento dell'IAP molto maggiore del 50%, valore di inibizione atteso per trattamento alla concentrazione di EC_{50} . Tenendo però in considerazione la tossicità iniziale del mFe, un'interazione tra i due contaminanti è presumibile per mFeA e mFeC con una riduzione, seppur contenuta, dell'effetto tossico del Cd da parte del mFe.

Il mFeA ha mostrato singolarmente una maggiore tossicità rispetto al mFeB e al mFeD; in miscela con il cadmio, però, il valore di IAP riportato dal trattamento con mFeA risulta minore rispetto agli

altri trattamenti. Riguardo la mitigazione degli effetti inibitori da parte del cadmio, il mFeA risulta, quindi, più efficace nel limitare l'inibizione dell'allungamento della plantula in *S. alba*.

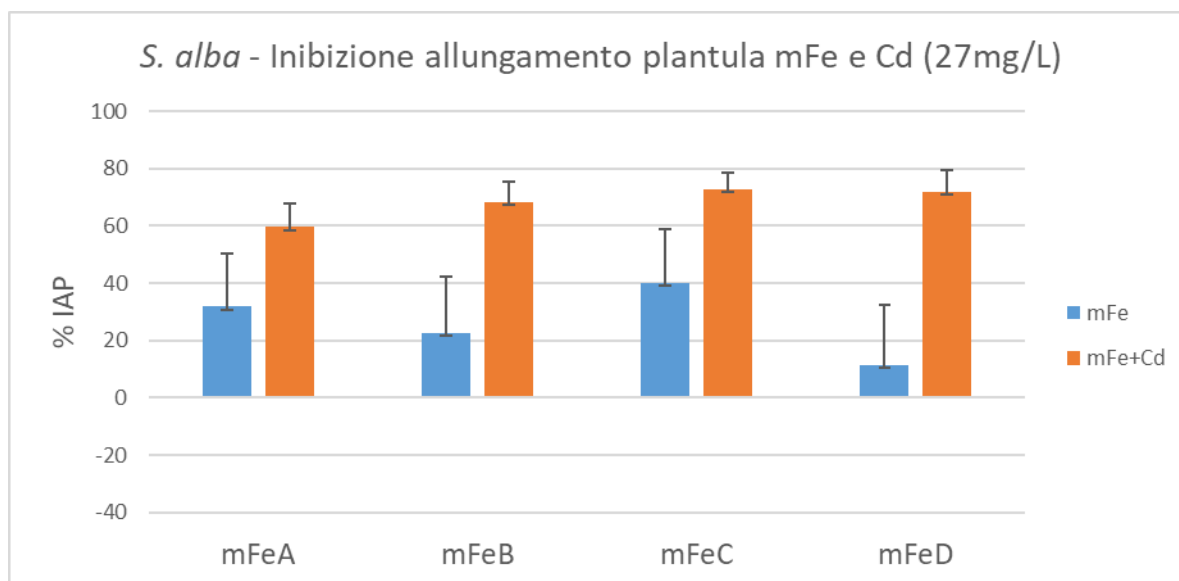


Figura 14 Inibizione dell'allungamento della plantula (%) in *S. alba* normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (27mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.

3.1.2.3 *Sorghum saccharatum*

Differentemente da quanto osservato nei precedenti modelli biologici, i trattamenti di *S. sccharatum* hanno messo in evidenza degli effetti di biostimolazione da parte del mFeA (IAP \approx -22%) e del mFeD (IAP \approx -5%). Viceversa, il trattamento con mFeC ha prodotto un'inibizione dell'allungamento della plantula pari a circa il 37% rispetto al controllo negativo, mentre il mFeB non ha prodotto alcun effetto di inibizione o stimolazione.

In presenza di cadmio, tutte e quattro le polveri di micro-ferro non hanno mostrato effetti di inibizione della tossicità. In particolare, i trattamenti con mFeA, mFeB e mFeC riportano valori elevati di IAP molto simili che si aggirano intorno all'84%.

Le tipologie di mFe che, singolarmente, hanno ottenuto un valore di IAP negativo (mFeA e mFeD), quindi rappresentativo di un effetto di stimolazione, sono le medesime che in presenza di cadmio riportano valori minori di inibizione (83% per mFeA e 71% per mFeD) nonostante non sembrano intervenire sulla diminuzione degli effetti inibitori del Cd.

Il mFeB non riporta variazioni significative dalla situazione di controllo rispetto alla sua esposizione alle plantule di *S. saccharatum* ed in presenza di cadmio riporta il valore di IAP maggiore (\approx 87%).

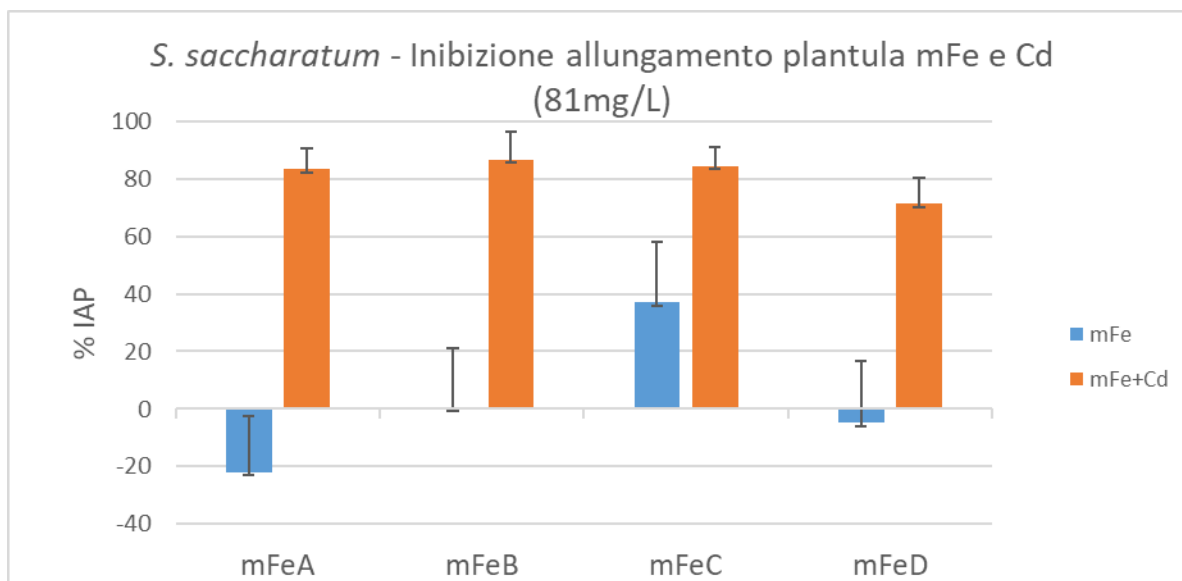


Figura 15 Inibizione dell'allungamento della plantula (%) in *S. saccharatum* normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (81mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.

3.1.3 Indice di Germinazione (GI)

I risultati del Germination Index (Indice di Germinazione) sono stati riportati, come per l'IAP, considerando le singole specie vegetali sottoposte ai diversi trattamenti con solo micro-ferro e micro-ferro e cadmio in miscela.

Un valore del GI pari al 100% corrisponde alla situazione osservabile nel controllo negativo. Ogni scostamento rispetto a questa condizione può indicare un effetto di stimolazione per valori di GI > 100% o effetti di inibizione per GI < 100%.

3.1.3.1 *Lepidium sativum*

Tutti i trattamenti effettuati con micro-ferro hanno riportato un GI (%) inferiore al controllo negativo, eccetto il mFeA (GI = 101%). Mentre mFeC e mFeD hanno prodotto un calo del Germination Index limitato (GI ≈ 90% per entrambi), il trattamento con mFeB (GI ≈ 70%) è risultato essere il più tossico per la specie vegetale presa in esame.

Tutte le tipologie di ferro testate sono risultate inefficaci nel limitare la diminuzione del GI in presenza di cadmio. Tutti i trattamenti riportano valori di GI compresi tra circa 40 e 45%, non mostrando alcuna differenza significativa nell'inibizione degli effetti negativi prodotti dall'esposizione di *L. sativum* alla concentrazione di EC₅₀ relativa al Cd.

Tenuta in considerazione la tossicità di partenza per mFe l'unico trattamento che mostra un leggero effetto positivo nei confronti del Cd è il trattamento con mFe B.

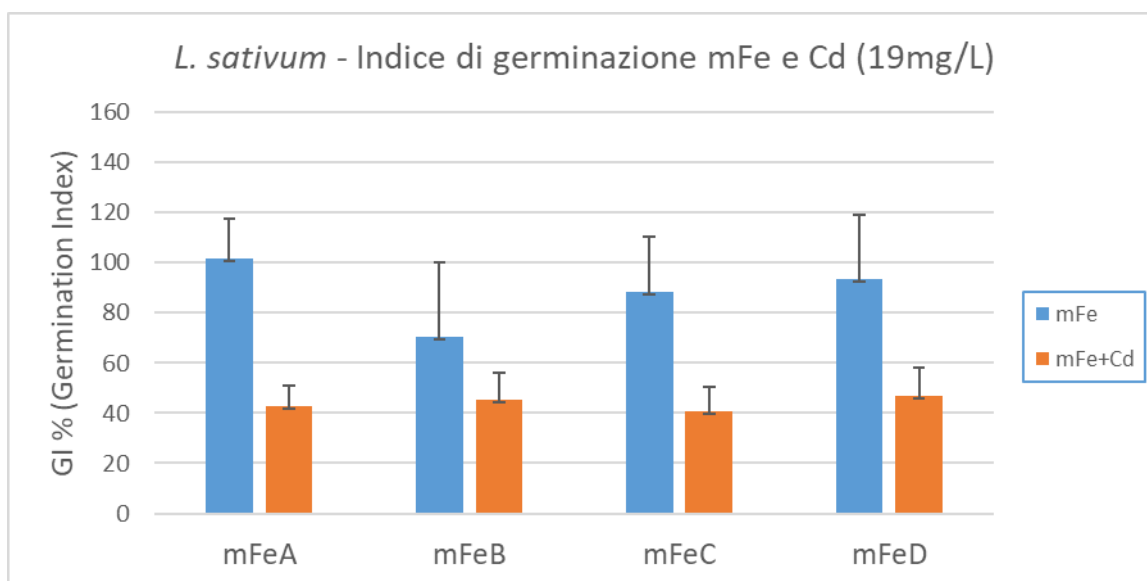


Figura 16 Indice di germinazione in *L. sativum* normalizzato al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (19mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.

3.1.3.2 *Sinapis alba*

Le quattro tipologie di mFe hanno riportato tutte un calo del GI rispetto alle condizioni del controllo negativo: il valore più basso di GI è relativo al trattamento con mFeC ($\approx 60\%$), mentre l'effetto di inibizione meno marcato riguarda il mFeD (GI $\approx 90\%$).

L'esposizione di *S. alba* alla miscela di mFe e Cd, in generale, ha registrato valori di GI intorno al 30-40%.

Il confronto dei valori di GI relativi ai trattamenti con solo micro-ferro indicano il valore maggiore per il mFeD (GI = 89%), nettamente più alto rispetto al seguente mFeB (GI = 74%) per il quale l'effetto di inibizione risulta già particolarmente marcata. Lo stesso mFeD riporta prestazioni simili al mFeB e mFeC nella mitigazione dell'inibizione prodotta nella miscela con cadmio (valori di GI tutti intorno al 30%); mentre, il valore maggiore di GI per le miscele con cadmio viene riportato dal trattamento con mFeA (GI = 40%), il quale risulta essere particolarmente inibitorio se preso singolarmente in soluzione (GI = 68%).

In generale, le tipologie di mFe B, C e D non hanno mostrato effetti di mitigazione dell'inibizione da parte del tossico di riferimento; contrariamente, considerando la tossicità iniziale del mFe, il mFeA riporta degli effetti positivi sulla mitigazione dell'inibizione da parte del Cd.

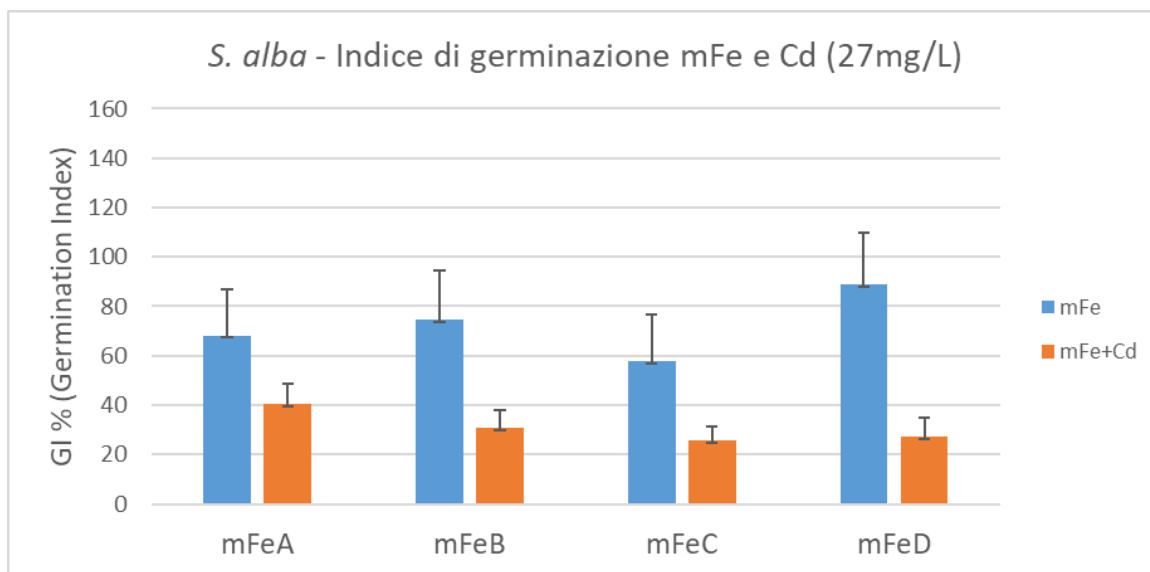


Figura 17 Indice di germinazione in *S. alba* normalizzato al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (27mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.

3.1.3.3 *Sorghum saccharatum*

Come evidenziato in figura 18, i valori dell'indice di germinazione relativo ai trattamenti con mFeA, mFeB e mFeD sono rispettivamente pari a 132, 104 e 118%, riportando la stessa biostimolazione evidenziata dall'analisi dei dati sull'IAP. Ad eccezione del test con mFeC che risulta essere l'unico trattamento con un GI molto inferiore al controllo negativo ($\approx 50\%$), quindi risultando essere il mFe effettivamente tossico per questa specie. Si ricorda dai risultati sopra riportati che *S. saccharatum* mostrava un certo effetto inibitorio da parte del mFe nei confronti della germinazione (spt. mFeC), ma un effetto di biostimolazione molto marcato nei confronti dell'allungamento radicale, tranne mFeC (Figure 11 e 15).

L'esposizione al cadmio, d'altra parte, ha portato all'annullamento della biostimolazione da parte del mFe, risultando in valori di GI molto bassi: circa 9% per il trattamento con mFeA; 4% per quello con mFeB; 9% con mFeC; circa 22% per il trattamento con mFeD, che risulta così essere la tipologia di ferro con il GI maggiore nei test con il cadmio.

Quindi per questa specie la tossicità della miscela risulta essere molto marcata e di fatto nessun effetto positivo del mFe si può evidenziare nei confronti del Cd, ma addirittura si può ipotizzare un effetto sinergico tra i due tossici.

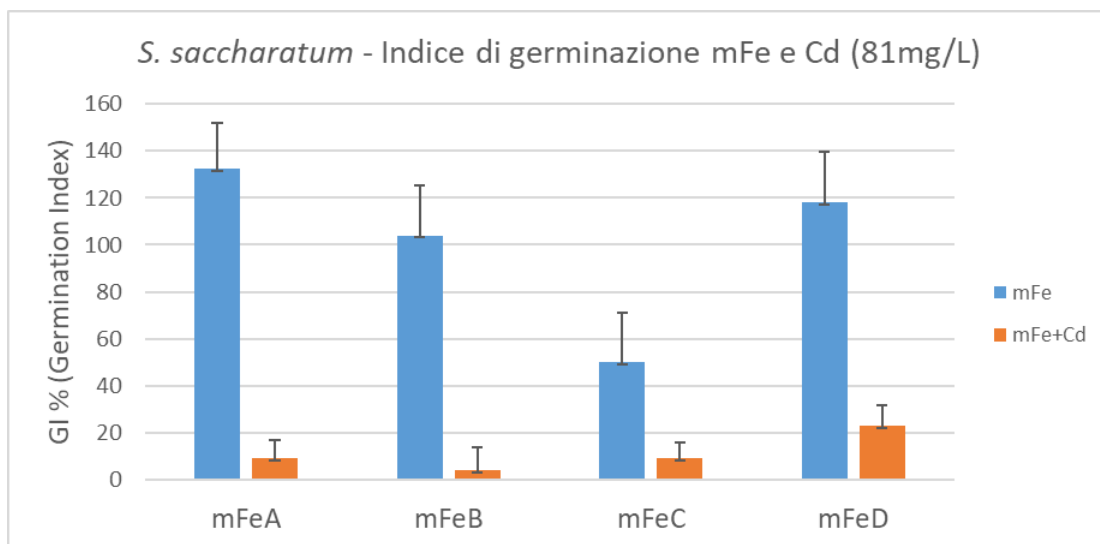


Figura 18 Indice di germinazione in *S. saccharatum* normalizzato al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (81mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.

3.1.4 Inibizione della produzione di biomassa

I dati di inibizione della produzione di biomassa (IB%) sono stati normalizzati rispetto al numero di semi germinati per singola replica di ciascun trattamento e riportati come percentuale di effetto rispetto al controllo negativo. Un valore di produzione di biomassa pari al 100% corrisponde alla situazione osservabile nel controllo negativo. Ogni scostamento rispetto a questa condizione può indicare un effetto di stimolazione per valori di biomassa maggiori del 100% o effetti di inibizione per una produzione di biomassa inferiore al 100%.

Per semplicità, nella rappresentazione grafica i valori sono stati espressi come scostamento percentuale rispetto a 0 (situazione rappresentante il controllo negativo), indicando così la percentuale di biomassa prodotta in eccesso (effetto di stimolazione) o in difetto (effetto di inibizione) rispetto al controllo negativo

La valutazione di questo endpoint è stata eseguita unicamente per le specie vegetali *L. sativum* e *S. alba*. Purtroppo, a causa di un errore durante la valutazione degli organismi post-esposizione, non è stato possibile riportare i dati di biomassa del controllo per la specie *S. saccharatum* impedendo così di valutare l'endpoint sia per l'esposizione al mFe, sia l'esposizione alla miscela con cadmio.

3.1.4.1 *Lepidium sativum*

La produzione di biomassa ha subito un effetto di stimolazione in tutti i trattamenti con micro-ferro. In particolare, il mFeA e il mFeB hanno indotto rispettivamente un aumento della biomassa pari al 56 ed al 90% rispetto al controllo negativo; diversamente, le tipologie di mFe C e D hanno indotto un aumento nella produzione di biomassa più moderato (rispettivamente 9 e 14%), avvicinandosi alle condizioni di controllo.

Nel caso dei trattamenti con mFeA, mFeB e mFeD si ha un'inibizione della produzione di biomassa rispetto al controllo ma l'entità di tale inibizione risulta essere molto inferiore all'aspettativa dovuta all'esposizione alla concentrazione di EC₅₀ del cadmio per *L. sativum*: infatti, i trattamenti con mFeA e mFeB raggiungono circa l'80% della produzione di biomassa mentre quello con mFeD arriva fino al 94% di biomassa prodotta rispetto al controllo. Per quanto riguarda il trattamento con cadmio e mFeC, come si può vedere in figura 19, è stato registrato un effetto di stimolazione, corrispondente ad un valore di produzione di biomassa pari al 115% rispetto al controllo negativo. L'analisi della varianza con test ANOVA associata al test di Tukey e Dunnett per i dati riferiti a *L. sativum* di produzione di biomassa non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra i vari trattamenti fra loro e, allo stesso tempo, con il controllo negativo.

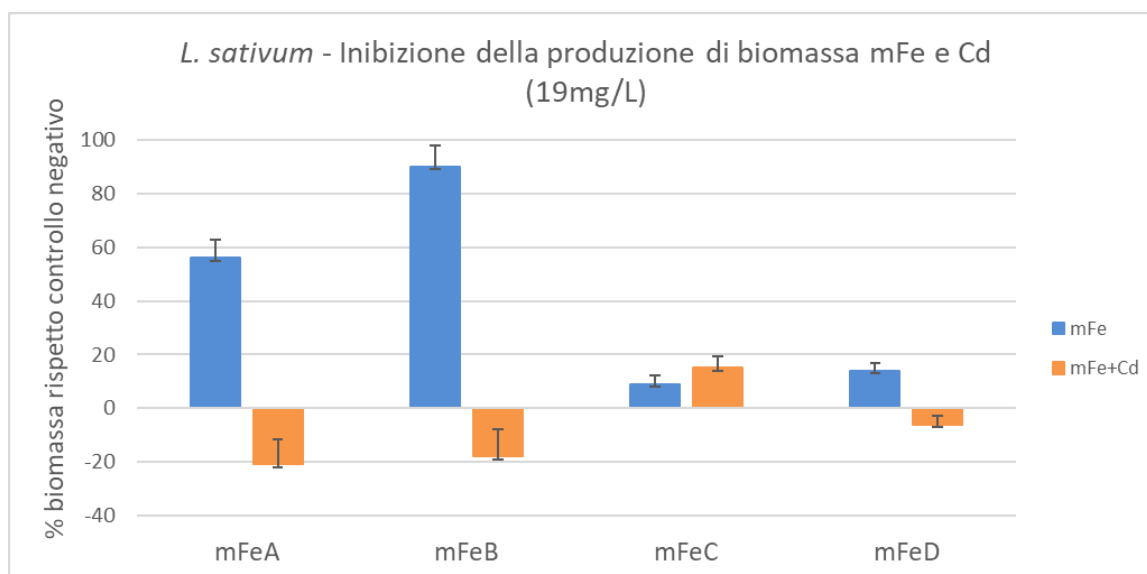


Figura 19 Produzione di biomassa in *L. sativum* normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (19mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.

3.1.4.2 *Sinapis alba*

I trattamenti con solo micro-ferro mostrano risultati simili per i test con mFeC e mFeD, i quali mostrano risultati di produzione di biomassa, rispettivamente, del 113 e 111% rispetto alla biomassa prodotta nel controllo negativo. L'esposizione al mFeA non produce alcun effetto di stimolazione o inibizione significativo, mentre il mFeB inibisce leggermente la biomassa prodotta da *S. alba* (93%). I test condotti in presenza di cadmio non hanno prodotto alcun effetto di inibizione sulla produzione di biomassa da parte della specie vegetale presa in considerazione; al contrario la biomassa prodotta è stata maggiore rispetto ai trattamenti con solo mFe. Tutte le tipologie di ferro aggiunte al trattamento con cadmio hanno portato ad una produzione di biomassa pari a circa il 110% rispetto al controllo negativo, salvo il trattamento con mFeC che ha raggiunto il valore maggiore pari a circa il 150%.

Nessun trattamento ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) rispetto alla produzione di biomassa nel controllo negativo, eccetto il trattamento con mFeC e cadmio.

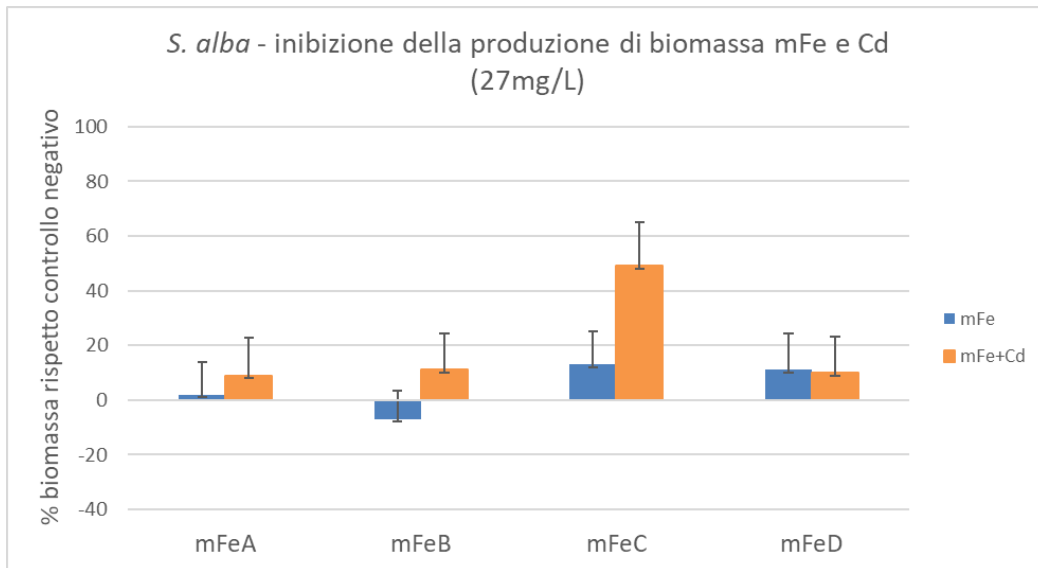


Figura 20 Produzione di biomassa in *S. alba* normalizzata al controllo negativo per trattamenti con mFe e mFe+Cd (27mg/L). Le colonne azzurre indicano i trattamenti con solo mFe e le colonne arancioni i trattamenti con mFe e Cd.

3.1.5 Valutazione del bioaccumulo

I risultati del bioaccumulo per *L. sativum*, *S. alba* e *S. saccharatum* sono esposti di seguito prendendo in considerazione separatamente il mFe e il Cd, relativamente alle tre specie vegetali trattate. I dati riportati sono stati ricavati dalle media delle tre repliche per ciascun trattamento e normalizzati rispetto ad 1 grammo di biomassa prodotto.

3.1.5.1 Ferro

I dati relativi alle quantità di ferro ($\mu\text{g/g}$ di biomassa) evidenziano una marcata differenza tra le specie trattate: *L. sativum* presenta valori massimi di circa 200.000 $\mu\text{g/g}$ nella parte radicale della plantula; *S. alba* raggiunge l'apice di accumulo nella radichetta per il trattamento con mFeC al valore di circa 40.000 $\mu\text{g/g}$; *S. saccharatum* accumula una quantità molto inferiore rispetto agli altri due modelli biologici, raggiungendo al massimo il valore di circa 3.000 $\mu\text{g/g}$ nel tegumento seminale del trattamento con mFeD (Tabelle 4, 5 e 6).

3.1.5.1.1 *Lepidium sativum*

L. sativum mostra risultati concordanti per tutte le tipologie di ferro utilizzate che indicano la radichetta come zona di maggior accumulo di mFe, seguita da valori molto inferiori per il tegumento del seme e, infine, ancora minori per la zona relativa alla parte aerea della plantula. I trattamenti con mFeA presentano una marcata differenza nell'accumulo di ferro nella biomassa, presentando un valore pari a circa 15.000 $\mu\text{g/g}$ nella parte radicale della plantula, rispetto alle altre tipologie di mFe per le quali l'accumulo si aggira intorno a valori di 200.000 $\mu\text{g/g}$ di Fe.

	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
Fusto	343	3679	1907	1646
Tegumento del seme	1409	2375	14699	34512
Radichetta	15251	184538	190309	208089
Totale	17004	190592	206915	244247

Tabella 4 Bioaccumulo di Fe ($\mu\text{g/g}$) per sezione in plantule di *L. sativum*.

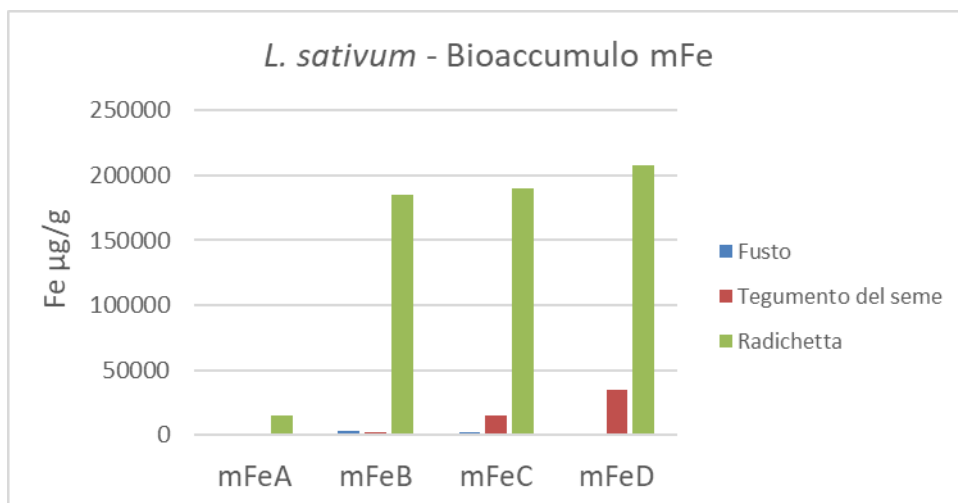


Figura 21 Bioaccumulo di Fe in *L. sativum*. Quantità espressa in µg per grammo di biomassa prodotta.

3.1.5.1.2 *Sinapis alba*

Per quanto riguarda *S. alba*, il bioaccumulo di ferro si presenta con risultati differenti a seconda della tipologia di micro-ferro presa in considerazione. Il trattamento con mFeA risulta essere quello nel quale si registrano valori di accumulo di ferro molto inferiori rispetto agli altri trattamenti (valore massimo di 540 µg/g di Fe nel tegumento del seme). Nonostante i valori di bioaccumulo nella parte radicale della plantula siano sempre tra i più elevati, è interessante notare che nei trattamenti con mFeA, mFeB e mFeD l'accumulo di ferro nel tegumento del seme eguaglia l'accumulo nella radichetta, risultando maggiore nei trattamenti con mFeA e mFeB (rispettivamente 541 µg/g e 5967 µg/g).

	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
Fusto	208	2760	11470	13799
Tegumento del seme	541	5967	751	25440
Radichetta	455	4165	45061	27148
Totale	1204	12892	57282	66387

Tabella 5 Bioaccumulo di Fe (µg/g) per sezione in plantule di *S. alba*.

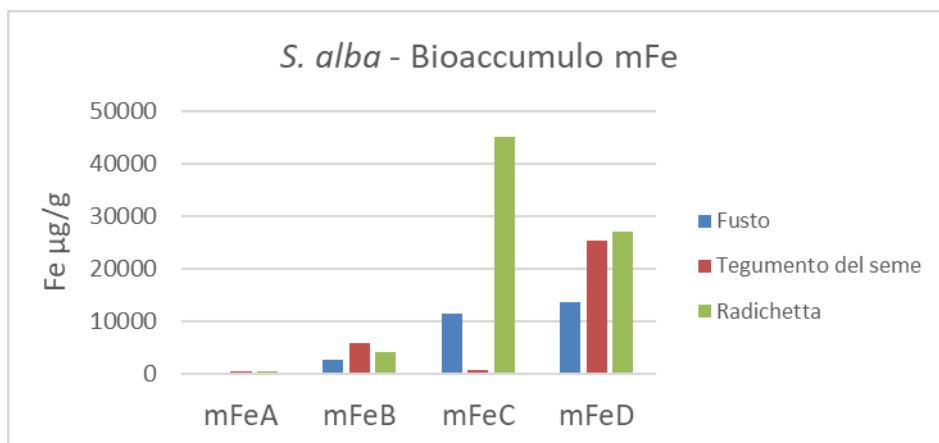


Figura 22 Bioaccumulo di Fe in *S. alba*. Quantità espressa in µg per grammo di biomassa prodotta.

3.1.5.1.3 *Sorghum saccharatum*

I trattamenti su *S. saccharatum* hanno messo in evidenza per le tipologie di ferro A, B e D che la zona di maggior accumulo è rappresentata dal tegumento del seme. Il valore massimo viene raggiunto nel trattamento con mFeD, in cui è stata trovata una quantità di Fe pari a 3.174 µg per grammo di biomassa prodotta.

Differentemente per quanto visto nelle due specie dicotiledoni, in questo caso la parte aerea della plantula risulta essere una sezione in cui viene accumulata una quantità maggiore di ferro rispetto alla parte radicale.

	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
Fusto	358	212	1321	862
Tegumento del seme	1714	1777	299	3174
Radichetta	112	73	140	163
Totale	2184	2061	1760	4199

Tabella 6 Bioaccumulo di Fe (µg/g) per sezione in plantule di *S. saccharatum*.

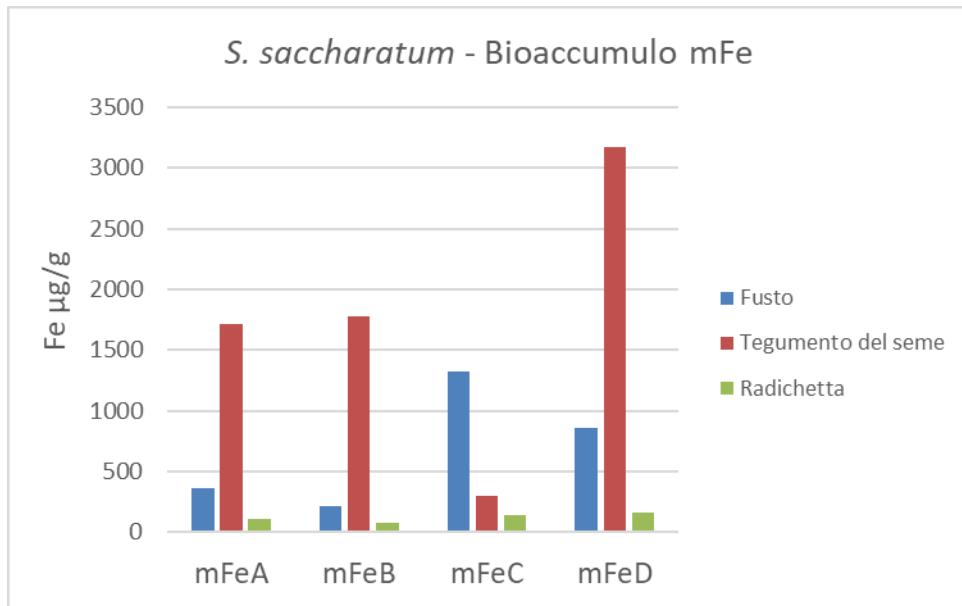


Figura 23 Bioaccumulo di Fe in *S. saccharatum*. Quantità espressa in µg per grammo di biomassa prodotta.

3.1.5.2 Cadmio

I risultati di bioaccumulo di cadmio nelle tre specie vegetali presentano valori quantitativamente paragonabili per le due specie dicotiledoni (eccetto il trattamento con mFeA in *L. sativum*) con valori che variano da circa 1.000 fino a circa 5.000 µg/g nel tegumento del seme.

Differentemente, in *S. saccharatum* il valore massimo rilevato di cadmio è pari a 4,9 µg/g, dato molto inferiore rispetto alle altre specie vegetali (Tabelle 7, 8 e 9) utilizzate in questo lavoro.

3.1.5.2.1 *Lepidium sativum*

Il cadmio viene accumulato in maggiore quantità nel tegumento del seme e secondariamente nella parte radicale della plantula per i trattamenti su *L. sativum*.

Tra i trattamenti su *L. sativum*, quello relativo al mFeA presenta un valore di bioaccumulo nel tegumento del seme molto maggior rispetto a tutti gli altri trattamenti: 31.303 µg/g di cadmio rispetto a valori inferiori a circa 5.000 µg/g per i trattamenti con mFeB, mFeC e mFeD. Tale risultato è in accordo con il valore maggiore di inibizione della produzione di biomassa riscontrato per il trattamento con mFeA e Cd in *L. sativum*.

Prendendo in considerazione il bioaccumulo totale di Cd, i risultati riportano valori simili per i trattamenti con mFeB, mFeC e mFeD.

	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
Fusto	1110	1053	572	555
Tegumento del seme	31303	2993	5324	4583
Radichetta	4261	3236	2742	2288
Totale	36675	7282	8639	7427

Tabella 7 Bioaccumulo di Cd (µg/g) per sezione delle plantule di *L. sativum*.

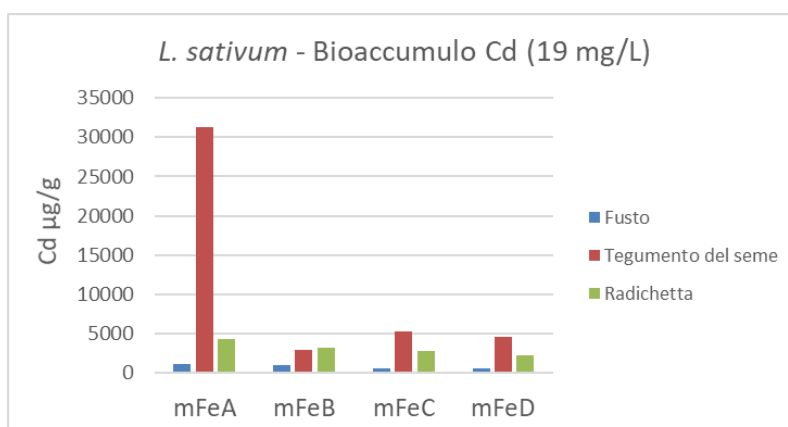


Figura 24 Bioaccumulo di Cd in *L. sativum*. Quantità espressa in µg per grammo di biomassa prodotta.

3.1.5.2.2 *Sinapis alba*

Il bioaccumulo totale di Cd in *S. alba* risulta maggiore nel trattamento con mFeA (8967 $\mu\text{g/g}$), in cui la il tegumento del seme e la parte radicale della plantula rappresentano i principali comparti di accumulo.

Come considerazione generale, può essere affermato che le zone di bioaccumulo principale del Cd, nella specie vegetale presa in considerazione, rimangono invariate per tutte e quattro le tipologie di mFe e corrispondono al tegumento del seme ed alla radichetta.

La granulometria delle particelle di ferro sembra influenzare il bioaccumulo totale di Cd se si nota come la quantità diminuisca al diminuire della dimensione del ferro aggiunto in soluzione. Il trattamento con mFeD mostra un valore inferiore di bioaccumulo totale di Cd pari a 2351 $\mu\text{g/g}$, mentre nei trattamenti con mFeB e mFeC (dimensionalmente simili) sono riportati valori di bioaccumulo molto simili.

	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
Fusto	810	1270	940	774
Tegumento del seme	4605	1853	2041	889
Radichetta	3552	2526	2790	688
Totale	8967	5649	5771	2351

Tabella 8 Bioaccumulo di Cd ($\mu\text{g/g}$) per sezione in plantule di *S. alba*.

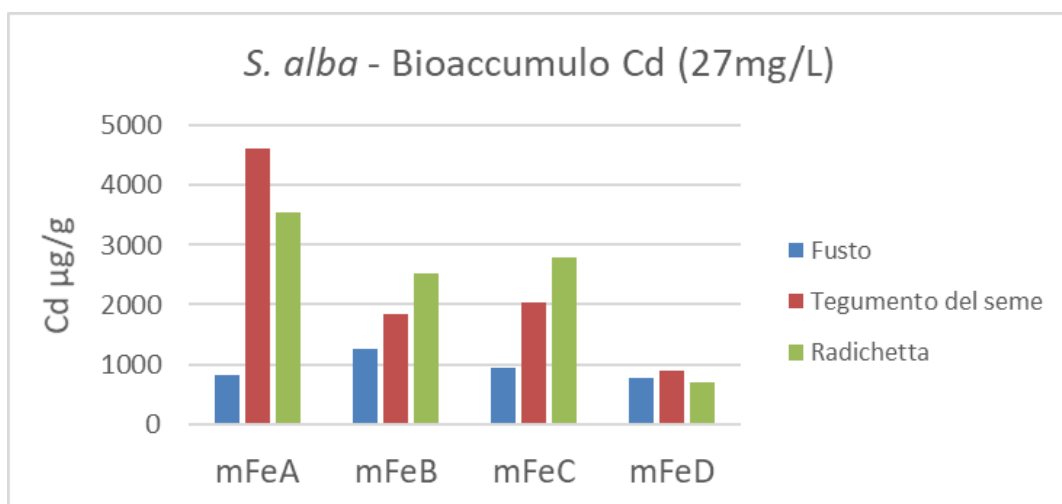


Figura 25 Bioaccumulo di Cd in *S. alba*. Quantità espressa in μg per grammo di biomassa prodotta.

3.1.5.2.3 *Sorghum saccharatum*

Differentemente per quanto visto nelle due specie dicotiledoni, *S. saccharatum* presenta un accumulo di un ordine di grandezza inferiore di Cd, mostrando una presenza significativa del contaminante nella parte aerea della plantula rispetto alle esposizioni di tutte e quattro le tipologie di micro-ferro. Le quantità di cadmio accumulate nella parte radicale presentano valori molto bassi, compresi tra 0,07 e 0,235 $\mu\text{g/g}$ di biomassa prodotta. Ulteriormente in controtendenza rispetto ai dati per le due specie dicotiledoni, il trattamento con mFeA, nel caso della specie monocotiledone, riporta risultati di accumulo quantitativamente molto inferiori rispetto ai trattamenti con mFeB, mFeC e mFeD.

	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
Fusto	0,661	2,275	3,836	1,238
Tegumento	1,285	4,907	4,293	2,573
Radichetta	0,235	0,134	0,080	0,071
Totale	2,181	7,315	8,209	3,882

Tabella 9 Bioaccumulo di Cd ($\mu\text{g/g}$) per sezione in plantule di *S. saccharatum*.

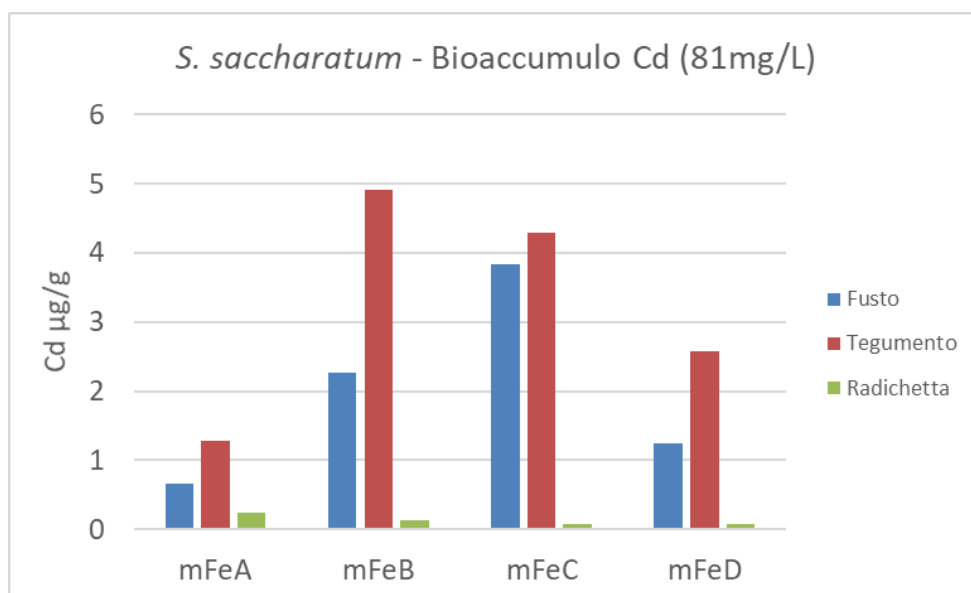


Figura 26 Bioaccumulo di Cd in *S. saccharatum*. Quantità espressa in g per grammo di biomassa prodotta.

3.2 Dissoluzione del micro-ferro

Il test di dissoluzione delle quattro tipologie di micro-ferro mette in evidenza la relazione tra velocità di dissoluzione e dimensione delle particelle di ferro. Come si evince in Figura 27 che mostra l'andamento della concentrazione di ferro in soluzione, la dissoluzione avviene per tutte le tipologie di ferro testate rapidamente dal tempo 0 fino alle 6 ore; successivamente alle 6 ore avviene una diminuzione della velocità di dissoluzione fino al raggiungimento di una condizione in cui la concentrazione di ferro cresce molto lentamente o tende a diminuire.

Le concentrazioni finali alle 48 ore di ferro in soluzione che è stata trovata per i campioni con mFeA, mFeB e mFeC raggiungono valori molto vicini nonostante la differenza delle curve di velocità con cui viene solubilizzato il mFe; differenza marcata in particolare tra mFeA, dimensionalmente maggiore, e mFeB/mFeC, dimensionalmente simili tra loro.

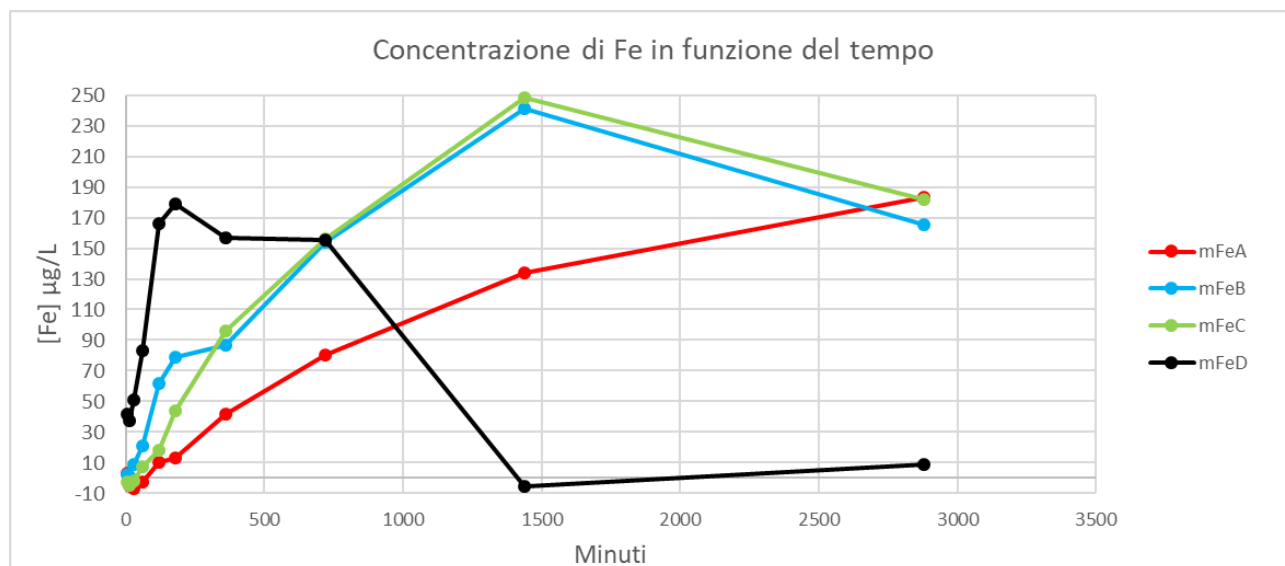


Figura 27 Concentrazioni di Fe in soluzione dal tempo 0 fino a 48 ore.

Di seguito viene riportata la tabella (Tabella 10) con i valori di concentrazione ottenuti ai diversi tempi. I valori relativi alla dissoluzione del mFeD a 24 e 48 h sono stati indicati come non attendibili, dal momento che le due concentrazioni risultano chiaramente in dissonanza rispetto alle altre misurazioni. Le spiegazioni di tale andamento sono riconducibili o ad un prelievo delle aliquote non idoneo, oppure ad un errore strumentale nell'analisi tramite ICP-MS.

Tuttavia, i dati rilevati entro le 12 ore risultano congruenti per tutte le tipologie di ferro testate e, dal momento che la maggior parte del ferro totale in soluzione viene rilasciato nei momenti iniziali,

possono essere fatte valutazioni significative per il lavoro di tesi sulla base delle curve di dissoluzione delle tipologie di micro-ferro testate fino a 12 ore.

µg/L	5'	15'	30'	60'	120'	180'	360'	720'	1440'	2880'
mFeA	3,5	-4,7	-7,0	-2,4	10,2	13,5	41,7	80,6	134,2	183,5
mFeB	2,6	1,1	8,9	20,8	61,7	79,2	86,8	153,9	241,3	165,1
mFeC	-2,6	-4,6	-1,9	7,3	18,4	43,7	96,2	155,8	248,6	181,7
mFeD	41,5	37,8	51,4	82,9	166,0	178,7	157,0	155,5	-5,4*	8,6*

Tabella 10 Concentrazioni di Fe in soluzione a diversi tempi (0<t<48h). Concentrazioni espresse in µg/L. *valori non attendibili

Nel grafico relativo alla dissoluzione fino a 12 ore viene evidenziato che il micro-ferro ad essere dissolto più velocemente è il mFeD; tale indicazione risulta in accordo con le aspettative dal momento che si tratta del mFe con dimensione minore ($\approx 63 \mu\text{m}$), quindi con una superficie specifica molto alta che ne favorisce la rapida dissoluzione in tempi brevi e per raggiungere velocemente il limite di saturazione.

Il comportamento del mFeB e mFeC seguono in generale lo stesso andamento, a dimostrazione del fatto che, essendo composti da particelle dimensionalmente simili ($\approx 425 \mu\text{m}$). Questi andamenti mostrano come la superficie specifica delle particelle ferrose sia un fattore determinante nella previsione delle cinetiche di dissoluzione in ambiente acquoso.

Il mFeA viene disciolto in acqua con una velocità inferiore a causa delle dimensioni molto maggiori rispetto alle altre tipologie ($\approx 850 \mu\text{m}$) e, di conseguenza, impiega più tempo a raggiungere il plateau del sistema, nonostante tale limite sia simile a quello raggiunto dal mFeB e dal mFeC.

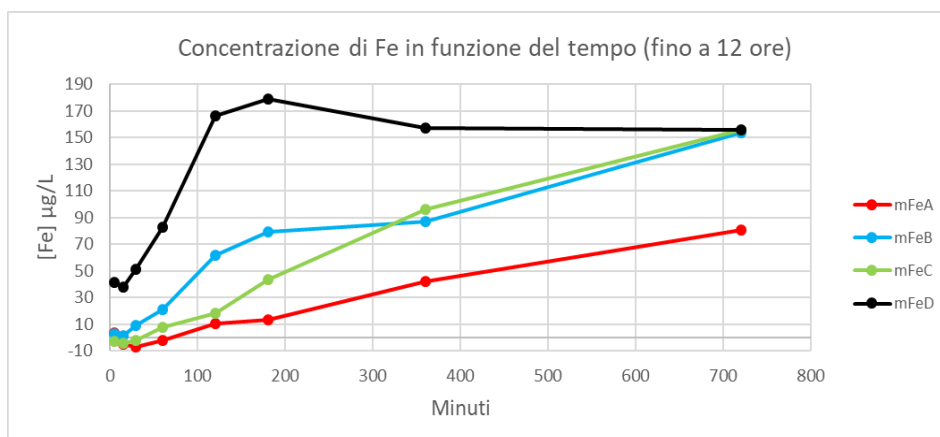


Figura 28 Concentrazioni di Fe in soluzione da t=0 fino a 12 h.

3.3 Relazioni tra Endpoint valutati e dissoluzione del micro-ferro

Le risposte ottenute dalla valutazione degli effetti di tossicità delle tipologie di mFe testate sono caratterizzate da una marcata variabilità a seconda della specie vegetale presa in considerazione.

Nel caso di *L. sativum*, confrontando i valori degli endpoint di fitotossicità (Tabella 11) con la velocità di dissoluzione delle diverse tipologie di micro-ferro, si evidenzia come nel caso di un rilascio costante di Fe in soluzione a velocità minore (caso del mFeA) si abbia una stimolazione dell'allungamento della plantula e, conseguentemente, un marcato aumento della produzione di biomassa. Differentemente, considerando la velocità di dissoluzione del mFeD, molto rapida dall'inizio dell'esposizione dei semi al trattamento con raggiungimento del livello di saturazione dopo 3 h, si giunge ad una lieve stimolazione delle plantule che riportano valori di endpoint molto vicini ai controlli negativi.

I primi due endpoint presi in considerazione riportano valori di inibizione da parte di mFeB e mFeC. Potrebbe esistere una relazione con le dimensioni delle particelle di ferro, dal momento che le due tipologie di micro-ferro citate sono dimensionalmente simili ($\approx 425\mu\text{m}$).

<i>Lepidium sativum</i>				
	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
IAP (%)	-1,78	26,93	11,62	-0,21
GI (%)	101,78	70,63	88,38	93,53
Biomassa (% rispetto controllo)	156	190	109	114
Parte con maggiore bioaccumulo	Radichetta	Radichetta	Radichetta	Radichetta

Tabella 11 Valori degli endpoint relativi a trattamenti di *L. sativum* con mFe.

I risultati dei trattamenti su *S. alba* mostrano una differenza tra le tipologie di mFe a rapida dissoluzione (mFeB e mFeD) rispetto alle tipologie per cui la concentrazione di ferro in soluzione aumenta a velocità minore (mFeA e mFeC) dalle fasi iniziali di esposizione fino a 6 ore. Nel caso di velocità alte di dissoluzione e, quindi, alte concentrazioni di ferro ionico in soluzione dalle fasi iniziali del trattamento, sono stati ottenuti effetti di inibizione dell'allungamento della plantula e dell'indice di germinazione meno elevati rispetto ai trattamenti con basse concentrazioni di ferro nelle fasi iniziali di sviluppo delle plantule. Infatti, i trattamenti con mFeA e mFeC hanno riportato valori di

inibizione dell'allungamento della plantula più elevati e, similmente, valori di indici di germinazione più bassi.

La biomassa di *S. alba* ho subito dei moderati effetti di stimolazione (10% in più rispetto al controllo negativo) nei trattamenti con mFeC e mFeD, caratterizzati dal raggiungimento di valori massimi più elevati di concentrazione di Fe in soluzione da 6 ore dopo l'inizio del trattamento.

<i>Sinapis alba</i>				
	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
IAP (%)	31,75	22,62	40,09	11,31
GI (%)	68,25	74,8	57,91	88,69
Biomassa (% rispetto controllo)	102	93	113	111
Parte con maggiore bioaccumulo	Tegumento	Tegumento	Radichetta	Radichetta

Tabella 12 Valori degli endpoint relativi ai trattamenti di *S. alba* con mFe.

Effetti di inibizione per *S. saccharatum* sono stati riscontrati solamente per i trattamenti con mFeC, per il quale la germinazione dei semi, l'allungamento della plantula e l'indice di germinazione hanno mostrato inibizione, al contrario di quanto risultato per le altre tipologie di mFe utilizzate. Anche i valori di bioaccumulo più elevati nel fusto per questa tipologia di mFe renderebbero conto di questi risultati.

I test con mFeA, mFeB e mFeD su *S. saccharatum* riportano risultati paragonabili sulla base degli endpoint considerati. Il trattamento con mFeA riporta effetti più marcati di stimolazione dell'allungamento della plantula ed un valore maggiore di indice di germinazione, conducendo alla considerazione che la velocità di dissoluzione del mFe non conduca a cambiamenti marcati negli effetti presi in esame nel lavoro di ricerca.

<i>Sorghum saccharatum</i>				
	mFeA	mFeB	mFeC	mFeD
Germinazione (%)	86,6	83,3	63,3	90
IAP (%)	-22,2	0,09	36,97	-4,91
GI (%)	132,3	104,07	49,9	118,02
Parte con maggiore bioaccumulo	Tegumento	Tegumento	Fusto	Tegumento

Tabella 13 Valori di endpoint relativi ai trattamenti di *S. saccharatum* con mFe.

4. Conclusioni

L'analisi e la valutazione dei dati di tossicità ha permesso di mettere in luce l'esistenza di una serie di risposte differenti per ciascuna delle specie vegetali considerate e, all'interno della stessa specie, di risposte differenti a seconda dell'endpoint preso in considerazione.

Il lavoro di ricerca è stato volto all'acquisizione di informazioni di base dalle quali partire per caratterizzare meglio il comportamento del micro-ferro in soluzione, focalizzando l'attenzione sulla presenza di eventuali relazioni tra concentrazione di Fe in soluzione e corrispondenti effetti di stimolazione o inibizione su tre specie vegetali diffuse. L'assenza di informazioni in letteratura e le caratteristiche preliminari dello studio, oltre alla forte variabilità di risposta dei dati di effetto, rendono i dati di non facile interpretazione.

Riguardo la fitotossicità delle tipologie di mFe valutate, sono stati riscontrati effetti prevalentemente stimolanti nei trattamenti con mFeA e mFeD per gli endpoint considerati (inibizione dell'allungamento della plantula, indice di germinazione e produzione di biomassa); mentre, al contrario, i test con mFeB e mFeC hanno mostrato risposte generalmente di inibizione per quanto riguarda l'inibizione di dell'allungamento della plantula e l'indice di germinazione.

Il cadmio è stato utilizzato come contaminante di riferimento alle concentrazioni di EC_{50} di ciascuna specie vegetale esaminata; nessuna delle tipologie di ferro utilizzate nel lavoro di ricerca ha mostrato una mitigazione degli effetti di inibizione prodotti dall'esposizione al cadmio dei tre modelli biologici studiati.

Per approfondire le conoscenze sul comportamento di materiali a base di ferro in soluzione e le loro ripercussioni sull'ecosistema, i dati prodotti dal lavoro di ricerca evidenziano la necessità di svolgere ricerche più approfondite sulle risposte di tossicità specifiche al micro-ferro e sulle sue potenzialità nel ridurre eventuali effetti nocivi prodotti da diversi contaminanti, per poterne fare un utilizzo appropriato.

Relazioni tra la concentrazione di ferro in soluzione e gli effetti di tossicità prodotti sono state evidenziate per alcuni trattamenti effettuati durante il lavoro di ricerca. Per ottenere dati più precisi sarebbe necessario ottimizzare ancora le procedure dei test di dissoluzione corroborando i dati analitici con dati di speciazione che potrebbero meglio spiegare le cinetiche ottenute e i relativi risultati di bioaccumulo ed effetto inibitorio.

Una valutazione preliminare ha focalizzato l'attenzione sul possibile impiego del guar gum come materiale per migliorare le prestazioni del ferro in ambiente acquoso (vedi Approfondimento); l'implementazione dello studio di questo materiale tramite test di ecotossicità ed analisi sulla

reologia del ferro al suo interno potrebbero fornire nuove conoscenze importanti sulla possibilità di migliorare le prestazioni di bonifica di siti contaminati con l'utilizzo di ferro.

5. Approfondimenti

5.1 Guar gum: caratteristiche e applicazioni

I polimeri naturali sono sempre più di primaria importanza e tra questi, i polisaccaridi, spiccano per la loro facile reperibilità e la natura non tossica e compatibile con l'ambiente.

Il galattomannano è uno dei polisaccaridi più frequentemente utilizzati ed il guar gum è la sorgente più economica di questo polimero, venendo ricavato dall'endosperma di piante appartenenti alla famiglia delle leguminose come *Cyamopsis tetragonolobus* o *Cyamopsis psoraloides*; nelle piante, il guar gum funge da riserva di cibo per l'embrione durante la fase di germinazione (Sharma et al., 2018).

Il guar gum è un polisaccaride con alto peso molecolare costituito da unità composte da mannosio e galattosio, unite tra loro mediante un legame 1,4- β -glicosidico. La presenza di un grande numero di gruppi idrossilici aumenta la capacità di legare ioni idrogeno quando viene disciolto in acqua accrescendo la viscosità e le proprietà gelificanti della soluzione. Grazie a queste proprietà, il guar gum viene utilizzato in diversi campi industriali come ad esempio l'industria tessile, quella del cibo, petrolchimica, mineraria, della produzione della carta e per diverse altre applicazioni: innestato su nanotubi di carbonio e particelle di ossidi di ferro, viene utilizzato come adsorbente per l'esclusione di coloranti industriali come il blu metilene dalle acque di scarico o altri sistemi acquosi (Sharma et al., 2018).

Le particelle micro- e nanoscopiche di ferro, come già spiegato approfonditamente, sono ampiamente utilizzate nei processi di bonifica per la loro capacità di ridurre o immobilizzare un largo gruppo di inquinanti presenti nelle acque sotterranee. Uno dei limiti dell'efficacia di questi materiali deriva dalla loro ridotta permanenza a contatto con i contaminanti nella fase liquida a causa di rapidi processi di aggregazione e precipitazione, rendendo, così, necessario l'impiego di stabilizzanti adeguati al fine di garantire la miglior prestazione possibile.

Gastone et al. (2014) riportano che soluzioni di guar gum hanno mostrato peculiari proprietà, assumendo un'alta viscosità in condizioni statiche ed una più bassa viscosità in condizioni dinamiche: questo è stato dimostrato essere di beneficio per la conservazione della dispersione nel caso del micro-ferro zero valente ed anche per l'iniezione della soluzione nel mezzo poroso. Il guar gum è stato selezionato grazie alla sua efficacia nell'incrementare la stabilità colloidale delle particelle microscopiche di ferro, per la sua compatibilità ambientale, per i costi limitati e per la

facile degradazione in condizioni sub-superficiali, specialmente in presenza di specifici enzimi che possono essere utilizzati per promuovere la rottura del polimero e la sua degradazione.

5.1.1 Test di dissoluzione del mFe in presenza di Guar gum

Uno dei problemi nel trattamento di acque contaminate tramite il ferro, in qualsiasi delle sue dimensioni possibili (granulare, microscopico, nanoscopico, ecc.), risulta essere il mantenimento in sospensione del materiale ferroso evitandone la precipitazione sul fondo del sito trattato.

A questo scopo può essere utilizzato nel mezzo acquoso il guar gum, in modo da rendere più densa la soluzione e dare modo al ferro di espletare completamente le sue funzioni, mantenendolo in sospensione più a lungo.

Nell'ambito del lavoro di tesi sono state effettuate indagini preliminari sull'andamento della velocità di dissoluzione del micro-ferro in presenza di guar gum: nello specifico sono state effettuati test di dissoluzione sul mFeA e mFeC.

Per entrambe le prove sperimentali effettuate è possibile notare come la concentrazione di ferro in soluzione raggiunga valori molto più elevati nelle soluzioni con guar gum. Tali indagini preliminari pongono l'attenzione sulle possibili prestazioni ottenibili mediante l'utilizzo di questo materiale in processi di bonifica tramite ferro. Al fine di comprenderne meglio il comportamento in ambienti naturali, andrebbero implementate le informazioni riguardo tossicità del guar gum nei confronti di organismi vegetali e animali.

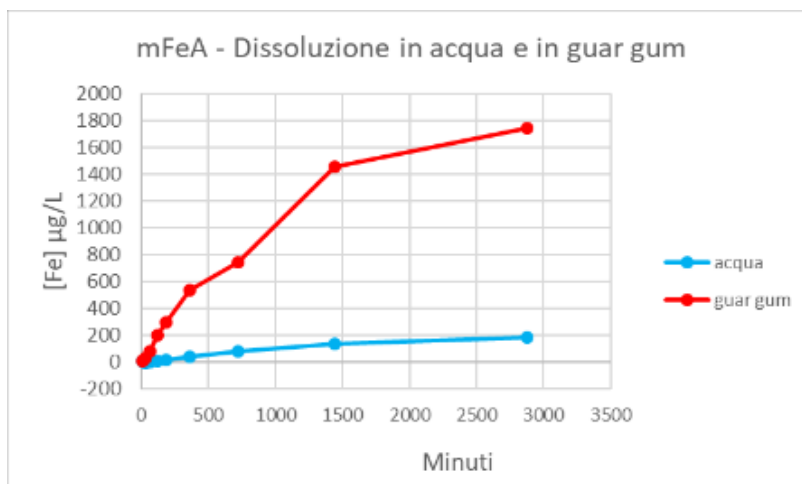


Figura 29 Andamenti della concentrazione di Fe in soluzione acquosa e soluzione acquosa con aggiunta di guar gum: test con mFeA.

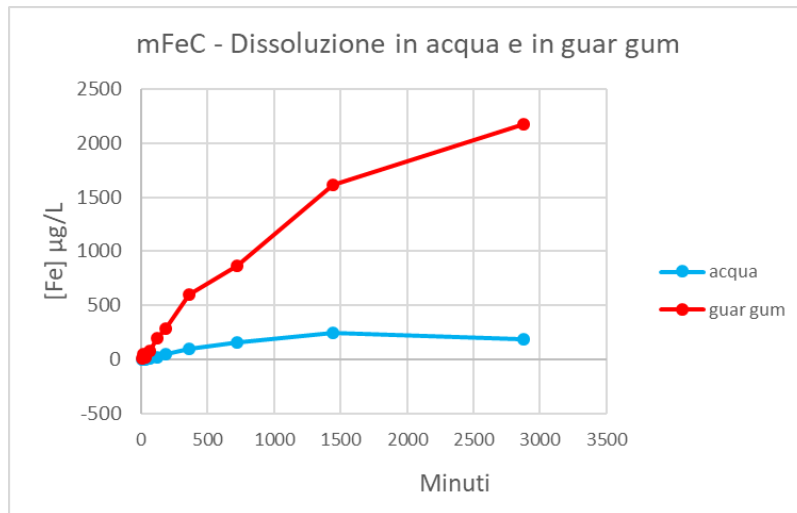


Figura 30 Andamenti della concentrazione di Fe in soluzione acquosa e soluzione acquosa con aggiunta di guar gum: test con mFeC.

6. Bibliografia

Ambika S., Devasena M., Nambi I.M. (2018) Assessment of meso scale zero valent iron catalyzed Fenton reaction in continuous-flow porous media for sustainable groundwater remediation. *Chemical Engineering Journal* 334, pp. 264-272.

Baird C. e Cann M. (2013) *Chimica ambientale*. Zanichelli, Bologna.

Bargagli R. (2012) *Ecologia applicata: per un uso consapevole dell'aria, dell'acqua e del suolo*. Amon Edizioni, Italia.

Bartakova I., Kummerova M., Mandl M., Pospisil M. (2001) Phytotoxicity of iron in relation to its solubility conditions and the effect of ionic strength. *Plant and Soil* 235, pp. 45-51.

Baudo R., Beltrami M., Barbero P. e Rossi D. (1999) *Test di germinazione e allungamento radicale*. CNR Istituto Italiano di Idrobiologia, Verbania Pallanza.

Chen A., Shang S., Shao J., Zhang J., Huang H. (2017) The application of iron-based technologies in uranium remediation: A review. *Science of the Total Environment* 575, pp. 1291-1306.

Costa Devoti A. Potenziali effetti di fitotossicità del ferro in forma ionica, microscopica e nanoscopica. Tesi di laurea in Scienze Ambientali, Università Cà Foscari di Venezia, a.a. 2012/13.

Cundy A.B., Hopkinson L., Whitby R.L.D. (2008) Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: a review. *Science of the Total Environment* 400, pp. 42-51.

Del Gaudio S. Interazioni tra Arseniato e ossidi di ferro negli ambienti naturali. Dottorato di ricerca in Agrobiologia e Agrochimica, Università degli studi di Napoli "Federico II", a.a. 2001-2004.

Dongarrà G. e Varrica D. (2004) *Geochimica e Ambiente*. EdiSES, Napoli, pp. 111-116.

Gastone F., Tosco T. e Sethi R. (2014) Guar gum solutions for improved delivery of iron particles in porous media (part 1): Porous medium rheology and guar gum-induced clogging. *Journal of Contaminant Hydrology* 166, pp. 23-33.

Harada T., Yatagai T., Kawase Y. (2016) Hydroxyl radical generation linked with iron dissolution and dissolved oxygen consumption in zero-valent iron wastewater treatment process. *Chemical Engineering Journal* 303, pp. 611-620.

Hasegawa H., Azizur Rahman M., Saitou K., Kobayashi M., Okumura C. (2011) Influence of chelating ligands on bioavailability and mobility of iron in plant growth media and their effect on radish growth. *Environmental and Experimental Botany* 71, pp. 345-351.

Hell R. e Stephan U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216, pp. 541-551.

Kumpiene J., Ore S., Renella G., Mench M., Lagerkvist A., Maurice C. (2006) Assessment of zerovalent iron for stabilization of chromium, copper and arsenic in soil. *Environmental Pollution* 144, pp. 62-69.

Langmuir D. (1997) *Aqueous Environmental Geochemistry*. Prentice-Hall, New Jersey.

- Lee H., Lee H., Kim H., Kweon J., Lee B., Lee C. (2014) Oxidant production from corrosion of nano- and microparticulate zero-valent iron in the presence of oxygen: a comparative study. *Journal of Hazardous Materials* 265, pp. 201-207.
- Libralato G., Costa Devoti A., Zanella M., Sabbioni E., Micetic I., Manodori L., Pigozzo A., Manenti S., Groppi F., Volpi Ghirardini A. (2016) Phytotoxicity of ionic, micro- and nano-sized iron in three plant species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123, pp.81-88.
- Ma X., Gurung A., Deng Y. (2013) Phytotoxicity and uptake of nanoscale zero-valent iron (nZVI) by two plant species. *Science of Total Environment* 443, pp. 844-849.
- Marcon M. Uso di tecniche elettrochimiche transienti per ottenere dati termodinamici e cinetici su complessi di Fe(III) con 1,6-dimetil-4-idrossi-piridincarbossilato e 2-dimetil-4-idrossi-3-piridincarbossilato, utilizzabili nella terapia di chelazione. Tesi di laurea in Chimica, Università degli studi di Padova, a.a. 2007/2008.
- Millero F.J. (1985) The effect of ionic interactions on the oxidation of metals in natural waters. *Geochim. Cosmochim.* 49, pp. 547-553.
- Morgan B. e Lahav O. (2007) The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O_2 in aqueous solution – basic principles and simple heuristic description. *Chemosphere* 68, pp. 2080-2084.
- Noubactep C. (2010) The fundamental mechanism of aqueous contaminant removal by metallic iron. *Water SA* vol. 36.
- Panagos P., Liedekerke M.V., Yigini Y., Montanarella L. (2013) Contaminated sites in Europe: Review of the current situation based on data collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health*.
- Selvi F. e Signorini M.A. (2009) Le angiosperme. A cura di Pasqua G., Abbate G. e Forni C., *Botanica generale e diversità vegetale*, Piccin, Padova, pp. 425-470.
- Sharma G., Sharma S., Kumar A., Al-Muhtaseb A., Naushad M., Ghfar A.A., Mola G.T. e Stadler F.J. (2018) Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A review. *Carbohydrate Polymers* 199, pp. 534-545.
- Stumm W. e Morgan J.J. (1996) *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. Wiley-Interscience, New York.
- Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M. e Schroeder J.I. (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *PNAS* 97, pp. 4991-4996.
- Thomine S. e Vert G. (2013) Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current opinion in plant biology* 2013, pp.322-327.
- Timothy K., Broschat e Kimberly K. Moore (2004) Phytotoxicity of several iron fertilizers and their effects on Fe, Mn, Zn, Cu and P content of African Marigolds and Zonal Geraniums. *HortScience* 39, pp. 595-598.

Zhao X., Liu W., Cai Z., Han B., Qjan T., Zhao D. (2016) An overview of preparation and applications of stabilized zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation. *Water Research* 100, pp. 245-266.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare la prof.ssa Annamaria Volpi Ghirardini per avermi proposto di prendere parte a questo progetto e per le esperienze estremamente formative a cui ho potuto partecipare.

Un ringraziamento sentito va al suo gruppo di ricerca, in particolare al dott. Andrea Costa Devoti per il fondamentale aiuto ed il supporto datomi durante tutto il periodo di lavoro, oltre che per l'aiuto nella revisione della tesi. Ringrazio inoltre il Dr. Marco Picone per la collaborazione e la disponibilità.

Un ringraziamento è dovuto anche alla POMETON Powder S.p.A. per la fornitura delle polveri di ferro utilizzate nel corso dei test.

Ringrazio i miei genitori senza il cui supporto non sarebbe stato possibile portare a compimento questo progetto di tesi.