



SA.T.I.V.A

*Save a Territory Increasing
the Value of Agriculture*

ATTI del CONVEGNO

Villadossola, 16 settembre 2016

*All'interno il Testo della L.n. 242/2016: Disposizioni per la promozione
della coltivazione e della filiera agroindustriale della canapa*



a cura di

Stefania Cerutti e Andrea Cottini

ARS.UNI.VCO

Associazione per lo Sviluppo della Cultura, degli Studi Universitari e della Ricerca nel Verbano Cusio Ossola

ISBN 978-88-98357-07-9

LA CANAPA NELLA RIQUALIFICAZIONE DI SUOLI CONTENENTI METALLI PESANTI A VILLADOSSOLA: VANTAGGI E PROSPETTIVE.

Eliana Tassi¹, Nicoletta Guerrieri², Maria Cavaletto³

INTRODUZIONE

Le piante rivestono un ruolo fondamentale nella produzione di ossigeno e nel sequestro di anidride carbonica, sono parte integrante dell'ecosistema e mettono in relazione l'atmosfera e tutto ciò che è disperso in essa con il suolo e l'acqua. La canapa (*Cannabis sativa* L.), una specie erbacea di coltivazione annuale appartenente alla famiglia delle Cannabaceae, suscita particolare interesse per le sue numerose funzioni, la più nota consiste nella produzione di materie prime alimentari per uso umano e zootecnico (foglie, fiori, frutti, semi, germogli, fibra), nella produzione di fibre tessili e bioplastiche, pannelli isolanti, biodiesel e/o bioetanolo, legna, pellet etc. (Bouloc et al., 2013). Inoltre, l'utilizzo delle piante per la riqualificazione di ambienti degradati e/o inquinati (phytoremediation) suscita grande attenzione per il basso impatto ambientale e costi di intervento relativamente ridotti. La phytoremediation, termine anglosassone ormai utilizzato anche nella lingua italiana, consiste nell'utilizzo di piante con particolari capacità di contenere, rimuovere o degradare i contaminanti presenti nei suoli, nei sedimenti e nelle acque. Le tecnologie che utilizzano piante, chiamate anche "fitotecnologie", possono essere impiegate per rimuovere o contenere inquinanti inorganici (metalli pesanti: piombo (Pb), nichel (Ni), zinco (Zn) etc., elementi radioattivi: cesio (Cs), uranio (U) etc.); per rimuovere o degradare inquinanti organici (idrocarburi policiclici aromatici (IPA), composti clorurati, etc.); possono essere utilizzate per riqualificare substrati solidi (suoli e sedimenti) e substrati liquidi (acque superficiali e falde sotterranee) (Cundy et al. 2013; Henry et al. 2013; Kid et al. 2015).

Le piante utilizzano l'anidride carbonica e la fotosintesi per produrre le molecole necessarie al loro sviluppo. Diverse molecole di interesse per il metabolismo delle piante possono essere trasportate, dalle radici, alle diverse strutture della parte aerea, in un flusso continuo dal basso verso l'alto e viceversa. L'apparato radicale è un prezioso laboratorio di reazioni chimiche/biochimiche tra le radici, la rizosfera (volume di suolo che circonda la radice dove piante e microrganismi interagiscono) e le componenti

¹ Ricercatrice - CNR ISE Istituto per lo Studio degli Ecosistemi - via G. Moruzzi n.1, 56124 - Pisa

² Ricercatrice CNR ISE Istituto per lo Studio degli Ecosistemi -Largo Tonolli n.50, 28922 – Verbania

³ Professore Associato di Biochimica dell'Università del Piemonte Orientale - DiSIT Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica – Università Piemonte Orientale, viale T. Michel 11, 15121 - Alessandria

biotiche (batteri, lieviti, funghi, micorrize, protisti, insetti, nematodi, anellidi, etc.) e abiotiche (sabbia, limo, argilla, metalli, materiale organico, potassio, azoto, fosforo, etc.) del suolo. I batteri e le micorrize che vivono a stretto contatto con le radici producono sostanze utili per la pianta e facilitano l'assorbimento di elementi essenziali, la pianta, a sua volta, secerne cellule vitali che modificano la chimica del suolo, essudati, secrezioni e lisati che rappresentano una componente energetica per i microrganismi. Alcuni batteri hanno attività-ormono simile (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Ullah et al. 2015) che, stimolando la crescita delle piante, aumentano la loro capacità di rifornirsi di nutrienti e acqua (Fig.1).

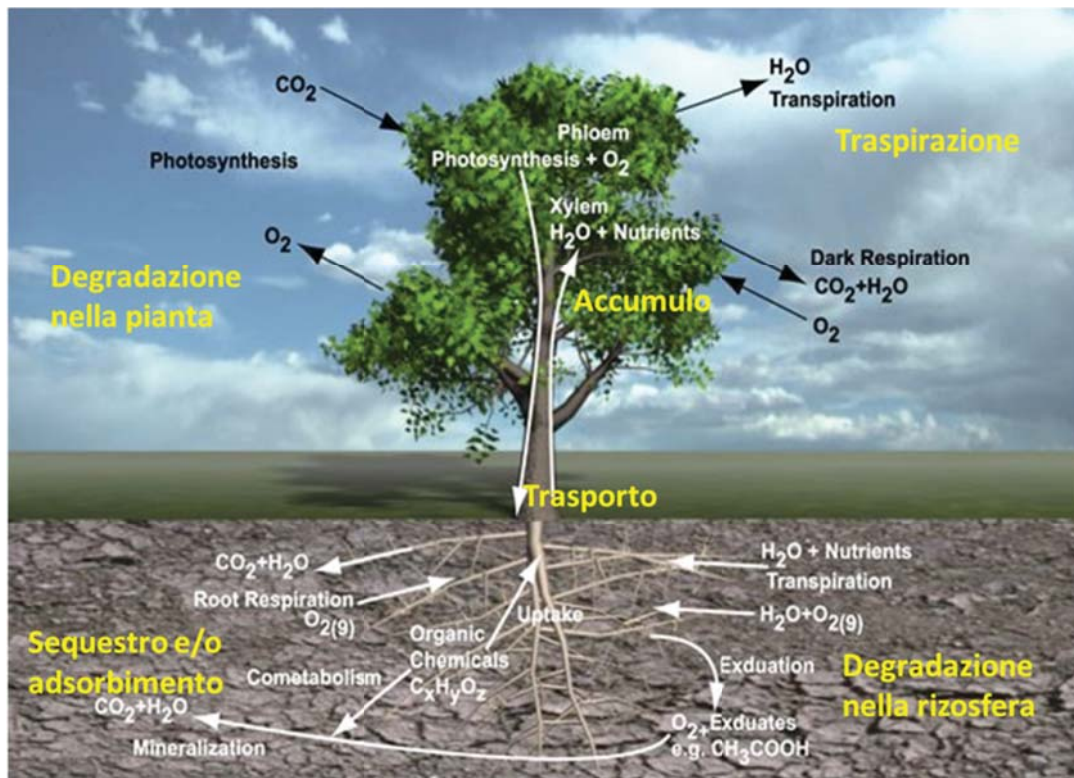


Fig.1 Ruolo della pianta nella Riqualificazione Ambientale

Una variabile fondamentale nelle "Fitotecnologie" per suoli contaminati è la variabile *tempo*. È una tecnologia condizionata dal tempo di crescita della pianta, dal numero di cicli di crescita, dalla capacità di produrre biomassa e di accumulare o degradare i contaminanti. Inoltre, è molto importante la natura chimica del contaminante, la sua quantità nel suolo e le caratteristiche pedologiche del suolo stesso. L'equilibrio biochimico che si instaura tra i microrganismi del suolo e la pianta è fondamentale per un'efficiente riqualificazione. Le piante possono *fitostabilizzare* i contaminanti nelle radici, *rizodegradare* i contaminanti modificandoli chimicamente nella rizosfera, *fitodegradare* i contaminanti all'interno della pianta, a cui frequentemente fa seguito la *fitovolatilizzazione* attraverso le foglie, oppure, possono effettuare una *fitoestrazione*

traslocando e accumulando i contaminanti inorganici dal suolo alle radici e poi alle foglie, frutti o semi.

Utilizzando la tecnica della *fitoestrazione* di metalli mediante piante selezionate, è possibile diminuire la concentrazione di metalli presenti nel terreno con una serie di estrazioni successive: poiché i metalli si concentrano principalmente all'interno delle radici e delle foglie, la loro rimozione ad ogni ciclo vegetativo riduce anche la quantità di metalli dal suolo (**Fig.2**). La capacità di fitoestrarre (accumulo di metalli nella pianta) o fitostabilizzare (riduzione della mobilità nel suolo) è un meccanismo di difesa delle piante. Anche le piante alimentari possono accumulare metalli nelle foglie, nei semi o nei frutti, per questo motivo è fondamentale conoscere la qualità e le proprietà del suolo che si utilizza, prestando attenzione anche alle pratiche culturali per non creare ulteriore inquinamento (Kid et al. 2015).

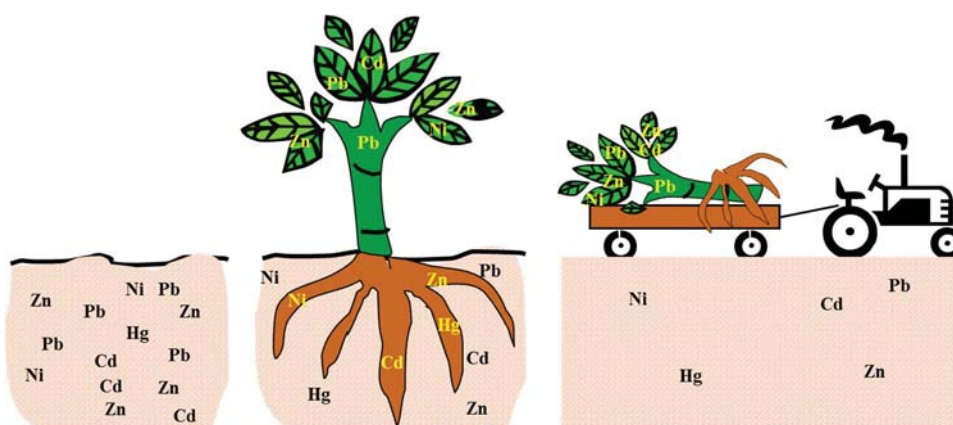


Fig.2 Fitoestrazione di metalli di un suolo inquinato

Il CNR-ISE nella sede di Pisa ha una lunga esperienza in progetti di “Phytoremediation” sia a livello nazionale, con il coinvolgimento di imprese private, sia internazionale con la partecipazione a progetti europei (Petruzzelli et al., 2014; Cassina et al., 2012; Tassi et al., 2011; Barbafieri and Tassi 2010).

Dalle tecniche di “Phytoremediation”, si possono ottenere:

Risultati diretti

- riduzione progressiva della contaminazione del suolo tramite i diversi cicli di crescita e l’asportazione della biomassa vegetativa;
- produzione di biomassa vegetale utile per la generazione di energia (biodiesel o bioetanolo, calore dalla combustione delle piante);
- ottenere reddito da suoli non produttivi.

Risultati indiretti

-miglioramento della qualità del suolo e quindi miglioramento progressivo della produzione e della biomassa prodotta.

-diminuzione dell'inquinamento diffuso nel suolo, nelle acque superficiale e profonde, e anche nell'aria dovuto alla riduzione del trasporto di particelle di suolo inquinato (frequentemente la frazione più fine è quella con livelli più alti di inquinamento, il suolo non coltivato diventa arido e polveroso)

-paesaggistico: un campo coltivato con una cultivar ha una ricaduta estetica positiva sul territorio ben diverso da un'area incolta e abbandonata. In particolare, la canapa si inserisce bene nel paesaggio montano.

-ecologico, ultimo ma non meno importante, racchiude in sé tutto l'ecosistema, gli equilibri tra gli organismi e l'ambiente in cui vivono, rendendolo più sostenibile.

Tutti questi risultati possono fornire sufficienti motivazioni economiche, sociali, culturali e ambientali per utilizzare le tecniche di fitorimediazione per una riqualificazione di aree inquinate.

La canapa è coltivata da tempi remoti in molte regioni del mondo e le recenti ricerche testimoniano la sua larga diffusione ancora oggi. I possibili impieghi innovativi, le selezioni di varietà per usi specifici, come la produzione di biomassa per ottenere fibra per fini alimentari, e per l'utilizzo nella phytoremediation sono solo alcuni esempi.

Tra gli utilizzi tradizionali della canapa, l'impiego alimentare, rivalutato dal punto di vista salutistico, sia per l'olio che per le proteine dei semi, viene studiato anche dal punto di vista della contaminazione, per la possibilità di trovare metalli anche nei semi (Mihoc et al. 2012). La canapa è una pianta a crescita rapida, con elevata biomassa, in recenti studi ricercatori cinesi hanno analizzato la sua capacità di phytoremediation e il suo successivo utilizzo come fonte di energia. Diciotto varietà di *Cannabis sativa* di origine cinesi e russa sono state coltivate su terreni con elevate quantità di cadmio, per simulare le condizioni presenti in aree industriali contaminate. Sette di queste varietà hanno mostrato un'elevata tolleranza a alte concentrazioni di cadmio, con elevata produzione di biomassa (Shi et al. 2012). Inoltre, in aree inquinate da acque di scarico industriali, in Pakistan, sono state analizzate diverse piante locali spontanee tra cui la *Cannabis sativa* per identificare le migliori accumulatrici di metalli nelle radici e nelle foglie (Irshad et al., 2015). La canapa ha dimostrato capacità di accumulare Cu nelle radici (Bona et al., 2007) e studi sull'espressione genica di enzimi coinvolti nella resistenza ad elevate concentrazioni di metalli possono fornire un valido aiuto alla selezione di nuove varietà e chiarire i meccanismi di difesa e di resistenza delle piante ai metalli (Ahmad et al., 2016). Anche in Italia recenti studi si orientano verso l'impiego della canapa per il recupero di aree industriali seriamente compromesse quali Taranto

nel progetto C.A.N.A.P.A - Coltiviamo Azioni per Nutrire, Abitare, Pulire l'Aria (Colao et al. 2015).

PROGETTO DI FATTIBILITÀ COMUNE DI VILLADOSSOLA

In questo contesto, presentiamo uno studio di fattibilità per l'utilizzo della canapa nella riqualificazione di suolo contenente metalli pesanti in un'area ex industriale del Comune di Villadossola, una collaborazione tra CNR - Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, l'Università del Piemonte Orientale, ARS.UNI.VCO e il comune di Villadossola.

La proposta consiste inizialmente nell'acquisizione dei dati pregressi e dello storico dell'area su cui bisognerà effettuare l'intervento. Quindi, nell'identificazione dell'area oggetto di studio e nella definizione delle parcelle sperimentali. In seguito ai primi contatti con l'amministrazione di Villadossola potrebbe essere interessante effettuare le prove su due aree che presentano due diverse tipologie di contaminazione. La prima in un'area ex industriale in cui è presente nel suolo contaminazione da idrocarburi, Cd, Cu, Pb e la seconda in un'area comunale in cui si riscontra presenza di diversi metalli tra cui Hg e As, Zn, Pb, Cu, Cr.

Il progetto prevede tre fasi sperimentali distinte: In una prima fase verranno testate e ricercate le migliori condizioni di crescita della canapa sul suolo campionato nell'area da riqualificare. A questo scopo, le piante, cresciute in microcosmi ed in ambiente controllato per intensità luminosa, umidità e temperatura (camere di crescita), verranno valutate per l'accumulo dei metalli nelle radici, la loro traslocazione alla parte aerea e la riduzione della biodisponibilità dei metalli nel terreno. Nella seconda fase di sperimentazione, su parcelle sperimentali in campo, verranno applicate le condizioni del microcosmo e gli eventuali trattamenti testati nella prima fase per valutare l'aumento dell'efficacia della fitoestrazione (incremento della biomassa e/o del bioaccumulo). Il passaggio dal microcosmo alle parcelle in campo richiede un insieme di studi e miglioramenti sperimentali per l'elevato numero di variabili che si presentano in campo, non da ultime le variabili meteorologiche. Le valutazioni da effettuare possono essere raggruppate in due macro-approcci:

1) La quantificazione dei metalli mediante Spettrometria Ottica di Emissione al Plasma (ICP-OES) sia nel suolo sia nella pianta, in cui si prevedono prove di crescita con l'utilizzo di agenti chelanti e/o ammendanti che favoriscono il rilascio dei metalli e li rendono biodisponibili alla pianta. Occorre comunque, valutare sia la loro dispersione nel suolo prima e dopo trattamento (misure di biodisponibilità), sia quantificare i metalli nella radice e nella parte aerea.

2) Biochimica e chimica del suolo e della pianta: analisi dello sviluppo delle piante, con valutazione dei parametri biochimici per evidenziare l'attivazione di vie biosintetiche che promuovono l'assorbimento dei metalli; quantificazione dell'attività enzimatica del suolo che, grazie all'attività delle piante, dovrebbe aumentare e migliorare.

Nella terza fase, dopo il primo anno, si prevede di proseguire per almeno altri due anni con la semina, crescita ed asportazione delle piante di canapa, ogni volta valutando sia l'assorbimento di metalli e la biochimica della canapa, sia le capacità agronomiche del suolo, che a seconda dei risultati ottenuti, permetterà un'indicazione del loro utilizzo.

I risultati previsti in questo progetto sono i seguenti:

1) Previsione delle condizioni e del tempo necessario per la riqualificazione dell'area. Pur studiando delle piccole parcelle si possono evidenziare le principali criticità del sito mediante l'accurato monitoraggio delle variabili scelte.

2) Avvio della valorizzazione economica di un'area che in questo momento è critica, in quanto contaminata e non produttiva. Dal punto di vista ambientale rappresenta anche l'inizio di una inversione di tendenza dell'inquinamento diffuso nell'aria, acqua e suolo tramite la copertura vegetale del terreno contaminato, la riduzione della migrazione del metallo lungo il profilo del suolo e della frazione biodisponibile. In questo modo, si indirizzerebbe una capacità naturale del sistema suolo-pianta verso un obiettivo definito. Inoltre, la coltivazione della canapa nel territorio montano ha profonde radici culturali che potrebbero essere valorizzate.

3) Diffusione sul territorio dell'importanza delle tecnologie di basso impatto ambientale con divulgazione delle tecniche disponibili anche nelle scuole, in particolar modo, quelle legate al florovivaismo, agli istituti tecnici ed agrari e agli istituti alberghieri, focalizzando l'attenzione sulla riqualificazione del suolo e delle acque.

BASI BIOCHIMICHE DELLA TOLLERANZA AI METALLI NELLA CANAPA

I laboratori dell'Università del Piemonte Orientale hanno studiato la capacità della canapa, in particolare la varietà *Cannabis sativa* var. Felina 34, nel tollerare il rame (Bona et al., 2007). Sono state impiegate tecniche proteomiche, accanto alle classiche metodologie biologiche, in modo tale da evidenziare quali meccanismi molecolari siano alla base della tolleranza della canapa verso i metalli. I risultati delle prove in vaso sono stati applicati direttamente in campo nella riqualificazione di un'area inquinata dall'Europa Metalli (ora KME) a Serravalle Scrivia (AL).

Le analisi biochimico-proteomiche hanno valutato l'effetto del rame sulle radici. Le piante di canapa sono state trattate in vaso con una soluzione contenente 150 ppm di rame, un valore ben al di sopra dei 20 ppm dei terreni normali, ma non tale da determinare la morte della pianta. Anzi le ricerche hanno dimostrato come la canapa nel momento in cui viene a contatto con il metallo inquinante metta in moto una serie di risposte molecolari che inducono TOLLERANZA, la pianta tollera il rame e così cresce sul terreno inquinato e produce biomassa. Il rame viene accumulato a livello delle radici, il cui volume al termine del periodo di sperimentazione risulta significativamente ridotto (**Fig.3**).

Le analisi del proteoma della radice, ovvero dell'insieme di tutte le proteine contenute nella radice, hanno evidenziato come la concentrazione di alcune specifiche proteine aumenti in risposta allo stress indotto dal metallo pesante. Tra queste proteine è risultato particolarmente espresso un enzima, l'aldo-cheto reduttasi che potrebbe funzionare da prima barriera detossificante per il rame. Inoltre collaborano al processo di tolleranza al metallo una rete di proteine da stress accanto a proteine che mantengono elevato il tasso di crescita cellulare.

Questi dati molecolari supportano l'idea progettuale di riqualificazione del terreno contaminato di Villadossola attraverso l'impiego della canapa, e avvalorano i suoi possibili impieghi successivi dalla produzione di biocarburanti e molecole ad alto valore aggiunto alla riqualificazione del paesaggio.

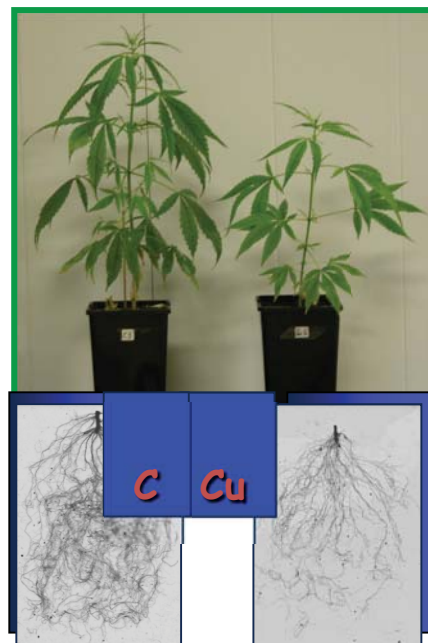


Fig 3. Confronto fra parte aerea e radici di canapa controllo (C) e trattate con rame (Cu) dopo 6 settimane di crescita

BIBLIOGRAFIA

- Abid Ullah, Sun Heng, Muhammad Farooq Hussain Munis, Shah Fahad, Xiyan Yang, Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. **Environmental and Experimental Botany**, 117:28-40, 2015.
- Barbafieri M. and Tassi E. Brassinosteroids for phytoremediation application, In: **Brassinosteroids-A Class of Plant Hormone**. Editors Shamsul Hayat and Aqil Ahmad by Springer, The Netherlands, 2010 pp.439-449 (ISBN: 978-94-007-0188-5).
- Bona, E., Marsano, F., Cavaletto, M., Berta, G., Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. **Proteomics**, 7: 1121-1130, 2007.
- Cassina L., Tassi E., Pedron F., Petruzzelli G., Ambrosini P., Barbafieri M. Using a plant hormone and a thioligand to improve phytoremediation of Hg-contaminated soil from a petrochemical plant. **Journal of Hazardous Materials**, 231-232: 36-42, 2012
- Colao M., Mastroilli M., Fornaro V., Natile C. and Tarsitano E., C.A.N.A.P.A. - Coltiviamo Azioni per Nutrire, Abitare, Pulire l’Aria (Cropping up Actions for Feeding, for Living and for Cleaning Air). In: **Proceedings of the 4th International Conference on Smart Cities and Green ICT Systems (SMARTGREENS-2015)**, SCITEPRESS, Science and Technology Publications, Lda., 364-369, 2015.
- Cundy, A.B., Bardos, R.P., Church, A., Puschenreiter, M., Friesl-Hanl, W., Mueller, I., et al., Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for “gentle” remediation approaches: The European context. **Journal of Environmental Management**, 129: 283–291, 2013.
- Gangrong Shi, Caifeng Liu , Meicheng Cui, Yuhua Ma, Qingsheng Cai, Cadmium Tolerance and Bioaccumulation of 18 Hemp Accessions. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 168:163–173, 2012.
- Henry F., Burken J.G., Maier R.M., Newman L.A., Rock S., Schnoor J.L., Suk W.A., Phytotechnologies –Preventing Exposures, Improving Public Health Heather. **International Journal of Phytoremediation**, 15:889-899, 2013.
- Kidd P., Mench M., Álvarez-López V., Bert V., Dimitriou I., Friesl-Hanl W., Herzig R., Janssen J.O., Kolbas A., Müller I., Neu S., Renella G., Ruttens A., Vangronsveld J., Puschenreiter M., Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. **International Journal of Phytoremediation**, 17: 1005–1037, 2015.
- Marcela Mihoc, Georgeta Pop, Ersilia Alexa and Isidora Radulov, Nutritive quality of romanian hemp varieties (*Cannabis sativa* L.) with special focus on oil and metal contents of seeds. **Chemistry Central Journal**, 6:122-134, 2012.
- Muhammad Irshad, Sajjad Ahmad, Arshid Pervez, Mitsuhiro Inoue, Phytoaccumulation of Heavy Metals in Natural Plants Thriving on Wastewater Effluent at Hattar Industrial Estate, Pakistan. **International Journal of Phytoremediation**, 17: 154–158, 2015.
- [Pierre Bouloc](#), [Serge Allegret](#), [David P West](#), [Glen Cousquer](#), **Hemp: Industrial Production and Uses**, Ed. David P. West, Wallingford, Oxfordshire, UK , CABI, 2013.
- Petruzzelli G. , Pedron F. , Tassi E., Franchi E., Bagatin R., Agazzi G., Barbafieri M., Rosellini I. The Effect of Thiosulphate on Arsenic Bioavailability in a Multi Contaminated

Soil. A Novel Contribution to Phytoextraction. **Research Journal of Environmental and Earth Sciences**, 6(1): 38-43, 2014.

- Rafiq Ahmad, Zara Tehsin, Samina Tanvir Malik, Saeed Ahmad Asad, Muhammad Shahzad, Muhammad Bilal, Mohammad Maroof Shah, Sabaz Ali Khan, Phytoremediation Potential of Hemp (*Cannabis sativa* L.): Identification and Characterization of Heavy Metals Responsive Genes. **Clean Soil, Air, Water**, 44: 195–201,2016.
- Tassi E., Pedron F., Barbafieri M. Evaluating the Absorption of Boron by Plants - a Potential Tool to Remediate Contaminated Sediments from Cecina River Basin in Italy. **Water, Air and Soil Pollution**, 216:275-287, 2011.