

Protocollo operativo per le attività di *phytoscreening*

Autori

Luchetti Lucina & Diligenti Antonio

ARTA Abruzzo Distretto Provinciale di Chieti
Via Spezioli 52, 66100 Chieti, Italy

Sommario

Introduzione	3
Tecniche di campionamento dei tronchi.....	3
Metodiche analitiche.....	6
Rilevazione in vivo della contaminazione.....	6
Utilizzo dei dati	8
Riferimenti bibliografici.....	10

Introduzione

L'identificazione, il monitoraggio e l'attività di bonifica del sottosuolo contaminato attraverso l'utilizzo della vegetazione, ha acquisito negli ultimi anni una crescente attenzione. In particolare, il *phytoscreening* [1] si è dimostrato essere utile, economico e rapido per la delimitazione dell'estensione della contaminante nel sottosuolo [2-13]. Le tecniche di *phytoscreening* si basano sulla capacità dell'apparato radicale di assorbire i contaminanti, disciolti e trasportati dall'acqua di infiltrazione, di falda o dal soil-gas. Le sostanze così assorbite sono trasferite, dal moto verticale della linfa, per tutta la lunghezza del tronco fino a raggiungere la chioma (rami e foglie). Le sostanze chimiche che possono essere rintracciate hanno caratteristiche chimico-fisiche in generale caratterizzate da alta solubilità in acqua, elevata persistenza e bassa pressione di vapore (es: cVOCs). La stima dei solventi clorurati negli alberi, si esegue attraverso il campionamento di carote di legno che successivamente sono sottoposte ad analisi chimica. Il campionamento, che consente di raccogliere un campione di legno, è eseguito utilizzando un campionatore incrementale (succhiello di *Pressler*) [1, 10, 14]. Attualmente, i metodi utilizzati per la stima delle concentrazioni dei contaminanti sono molteplici. In particolare, l'analisi dello spazio di testa è uno dei più frequenti a causa della rapidità di esecuzione e dei costi contenuti [11]. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato la funzionalità di nuovi approcci nella raccolta dei campioni e delle analisi chimiche [15-17]. Questi autori hanno dimostrato l'utilità dei campionamenti passivi in vivo, quali la microestrazione in fase solida oppure utilizzando campionatori in Polidimetilsilossano. La definizione in vivo della contaminazione, usando GC-MS portatili, è stata eseguita al fine di confrontare tale metodo con quelli già standardizzati, come il campionamento dei tronchi e il campionamento passivo [18]. A differenza del solo campionamento diretto del tronco di legno, è stato testato con successo, dal Distretto ARTA di Chieti, un metodo di rilevazione in vivo della contaminazione presente negli alberi. In particolare, sono state utilizzate fiale colorimetriche, direttamente inserite nei fori realizzati nel tronco, per la determinazione dei cVOCs.

Tecniche di campionamento dei tronchi

Per il campionamento dei tronchi di albero si utilizzano campionatori incrementali quali, ad esempio, il succhiello di Pressler (Fig. 1) o il martello incrementale, comunemente utilizzati nelle misure forestali.



Figura 1 Succhiello di Pressler o campionatore incrementale (Vroblesky, 2008).

La punta del campionatore incrementale viene infissa nel tronco, a seguito della rimozione di una porzione di corteccia, e attraverso una rotazione in senso orario, viene prelevata la carota di tronco (Fig. 2).

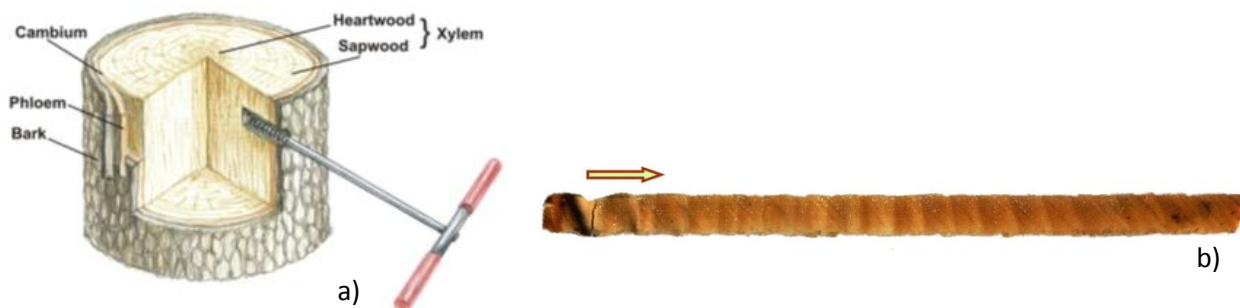


Figura 2 a) Schema di infissione per rotazione del campionatore all'interno del tronco (Trapp et al., 2012); b) campione di tronco estratto dal succhiello.

In generale sono campionabili i tronchi di molte specie di alberi, è preferibile campionare quelle che presentano una adeguata maturità, hanno un tronco con diametro non inferiore ai 10-15 cm e sono alberi singoli. Pertanto si sconsiglia, per i fini del phytoscreening, di campionare tronchi di cespugli. Sia dai dati di letteratura che dalle esperienze operative degli scriventi, gli alberi campionabili possono essere ad esempio: *Quercus pubescens*, *Populus alba*, *Platanus acerifolia*, *Tilia platyphyllos*, *Juglans regia* etc. (ved. [10]). La quota di campionamento lungo il tronco è posta, per singoli campionamenti, pari a un metro dal p.c., così come evidenziato in [10] e [19]. Ne deriva inoltre che la scelta del campionamento di tronco, piuttosto che quello dei rami e delle foglie o frutti, risiede proprio nella possibilità di rintracciare gli eventuali contaminanti più facilmente soprattutto in funzione delle concentrazioni (e dei limiti di rilevabilità analitica).

Inoltre, si preferisce il tronco alle foglie, nel caso di alberi non da frutto, poiché esse possono registrare una contaminazione incrociata derivante dall'aria atmosferica [10].

Attualmente non sono stati evidenziati effetti collaterali irreversibili sulla integrità fisica e dello stato di salute degli alberi investigati (ved. [10] e bibliografia inclusa). Tuttavia è possibile utilizzare paste antibiotiche qualora si supponga presenza di colonie batteriche aggressive. Dopo aver raggiunto la profondità necessaria, di solito non superiore ai 6 cm, viene estratta la carota e immediatamente riposta all'interno del vial con tappo in teflon. Il campione può essere ridotto in due o più frammenti e quindi riposto nel contenitore al fine di poter avere tutta la superficie del campione disponibile per l'estrazione con solvente (Fig. 3). La conservazione per il trasporto dei campioni prelevati può essere eseguita senza particolari accorgimenti, infatti, è sufficiente riporli all'interno di borse termiche refrigerate equipaggiate con piastre eutettiche o frigoriferi portatili, mantenendo una temperatura costante intorno ai 4°C. Qualora il metodo analitico selezionato sia ad esempio l'analisi dello spazio di testa, i campioni devono essere sottoposti alle determinazioni analitiche non oltre le 48h successive al campionamento, affinché si garantisca la preservazione dello stato naturale della matrice evitando possibili attacchi batterici o lo sviluppo di colonie micotiche. Inoltre, rispettando tempi brevi di conservazione si evita la possibilità di perdita dei contaminanti eventualmente presenti nel campione, consentendo così di ottenere limiti di rilevabilità analitica sufficientemente bassi.



Figura 3 Vial con setto in teflon utilizzato per la conservazione del campione.

Metodiche analitiche

Le metodiche analitiche applicabili, in accordo con quanto evidenziato in [14], sono le stesse comunemente utilizzate nell'ambito analitico per i terreni e le acque sotterranee per l'individuazione dei VOCs. In particolare i metodi analitici utilizzabili sono quelli riconducibili all'analisi dello spazio di testa. Quest'ultima può essere di tipo statico e di tipo dinamico. Nel primo caso, poiché le dimensioni delle "microcarote" non consentono di effettuare direttamente il desorbimento termico, è necessario effettuare l'estrazione in metanolo del campione affinché il concentrato possa essere poi analizzato. Successivamente un volume definito di vapore è prelevato direttamente dal campionatore e trasferito nel gas cromatografo (GC). Nel secondo caso la preparativa prevede estrazione con metanolo, adsorbimento/desorbimento (*purge & trap*) e infine analisi chimica in ambiente GC/MS. Pertanto le metodiche analitiche selezionate dai laboratori ARTA sono mutate da quelle utilizzate di norma per la matrice suolo/sottosuolo, in particolare, ci si riferisce alle metodiche EPA 5035 + EPA 8260.

Rilevazione in vivo della contaminazione

L'individuazione speditiva in vivo della contaminazione a carico della matrice biologica è effettuata utilizzando rilevatori colorimetrici. Tali rilevatori sono dei tubi in vetro che contengono sostanze ossidanti le quali decompongono la sostanza chimica volatile che entra all'interno della fiala stessa. Le sostanze, quindi, interagiscono con il reagente posto all'interno producendo un cambiamento di colore. Il viraggio del colore lungo la fiala consente di valutare la concentrazione delle sostanze presenti proporzionalmente alla scala graduata stampata sulla superficie della fiala.

Per ogni campagna di misura è necessario rilevare le condizioni meteo, come la temperatura ambiente e la pressione atmosferica, necessarie al fine di determinare i necessari fattori di correzione da applicare alle concentrazioni misurate con le fiale.

Poiché ciascuna fiala è dedicata a una particolare sostanza, tranne in alcuni specifici casi, è necessario valutare, prima di ogni misurazione, un modello concettuale che consenta di discriminare le eventuali sostanze contaminanti presenti nel suolo/sottosuolo.

Una volta definita la fiala da utilizzare, il campionamento del gas dell'albero si esegue utilizzando una pompa elettrica connessa direttamente alla fiala tramite un tubo in Teflon. Ogni fiala è inserita per almeno 2cm all'interno del foro praticato precedentemente per il prelievo di campioni di tronco (Fig. 4).



Figura 4 Fiala inserita nel foro precedentemente realizzato per il prelievo di campione di albero. Si può notare il tubo in Teflon che collega la pompa alla fiala.

I tempi del campionamento dipendono dal *detection limit* (DL) di ciascuna fiala, mentre il DL è strettamente legato al volume di gas che si campiona, pertanto è necessario determinare la portata di campionamento della pompa elettrica. Infatti, supponendo una concentrazione massima rilevabile compresa da 3 a 9 ppmv e si campionano 50 mL di gas a basso flusso (200 mL/min), il tempo di campionamento sarà pari a 15s con almeno 45s di attesa affinché termini la reazione all'interno della fiala. Inoltre poiché il quantitativo standard di volume da campionare è posto pari a 100 mL, e supponendo di utilizzare una fiala con un corrispondente range di rilevazione pari a 0.2-3 ppmv, il tempo di campionamento è di 30sec, con un tempo di reazione pari a 1.5min. Tuttavia è necessario considerare la sito specificità delle diverse condizioni in cui ci si può trovare all'interno di un sito, questa può comportare la scelta di volumi di campionamento più elevati col fine ultimo di avere concentrazioni stabilizzate nel tempo. Al termine della rilevazione, ogni fiala sarà etichettata con il corrispondente codice relativo all'albero monitorato e conservata in frigo come fine documentale.

Utilizzo dei dati

I dati ottenuti dalle campagne di analisi dei campioni di albero vengono confrontati con i dati chimici derivanti dalle attività di caratterizzazione delle matrici suolo/sottosuolo, acque sotterranee e soil-gas, ottenendo così un più ampio spettro di valutazione delle condizioni di contaminazione del sito indagato. Considerando infatti gli alberi come la sintesi di dispositivi quali piezometri, pompe sommerse e campionatori attivi sia del soil-gas che delle acque sotterranee, i dati analitici costituiscono la base per l'effettuazione di ulteriori valutazioni sia in seno ad una eventuale elaborazione del rischio ecologico nonché per l'estrapolazione dei valori effettivi nei punti di esposizione dei diversi ricettori.

I valori delle concentrazioni, rilevate con le fiale colorimetriche, hanno necessariamente bisogno di essere corrette in funzione sia della taratura eseguita dalla casa produttrice sia in funzione dei parametri meteo sito-specifici. Infatti, così come indicato nel metodo internazionale di riferimento [19], ogni concentrazione rilevata deve essere corretta utilizzando il relativo fattore di correzione (CF). In base alle specifiche indicate dai diversi produttori, il parametro CF può essere ulteriormente corretto applicando una formula relativa alla pressione atmosferica misurata in sito. La correzione dei valori di pressione atmosferica misurata avviene applicando la formula (1):

$$(1) \text{ Valore di lettura della fiala (ppm)} \times 1013 \text{ (hPA)} / \text{Pressione misurata (hPA)}.$$

E' comunque necessario fare sempre riferimento alle specifiche indicate dal produttore per ottenere i valori finali delle concentrazioni, queste ultime dipendenti dalle condizioni meteo rilevate nei siti.

Utile ai fini del confronto con le altre matrici ambientali (es.: acque di falda; terreni etc.), la formula di conversione ppmv-mg/m³ (2) consente di ottenere le concentrazioni rilevate con le fiale in termini di µg/L.

$$(2) \text{ mg/m}^3 = \text{ppm} \times M / 22.414 \times 273 / (273 + t) \times P / 1013$$

Dove M è il peso molecolare della sostanza, 22.414 (L) è il peso di 1 mol a 0°C ad una pressione atmosferica pari a 1, t è la temperatura ambientale misurata, 273°K rappresenta la temperatura assoluta, 1013 (hPa) corrisponde ad 1 atmosfera di pressione espressa in Ettopascal e P è la pressione atmosferica misurata espressa in Ettopascal.

I risultati derivanti dalle campagne di *phytoscreening* possono essere utilizzati per ottenere sintesi delle condizioni di contaminazione. Infatti, la georeferenziazione degli alberi campionati consente di ottenere cartografie tematiche sia dell'estensione della contaminazione registrata nella matrice vegetale sia, una volta sovrapposti i diversi layers, verificare una eventuale nuova estensione della contaminazione (Fig. 5). Le rappresentazioni cartografiche quindi consentono ad esempio di verificare eventuali nuove sorgenti di contaminazione all'interno di uno stesso sito o di rivalutare le estensioni di plumes della contaminazione [19].

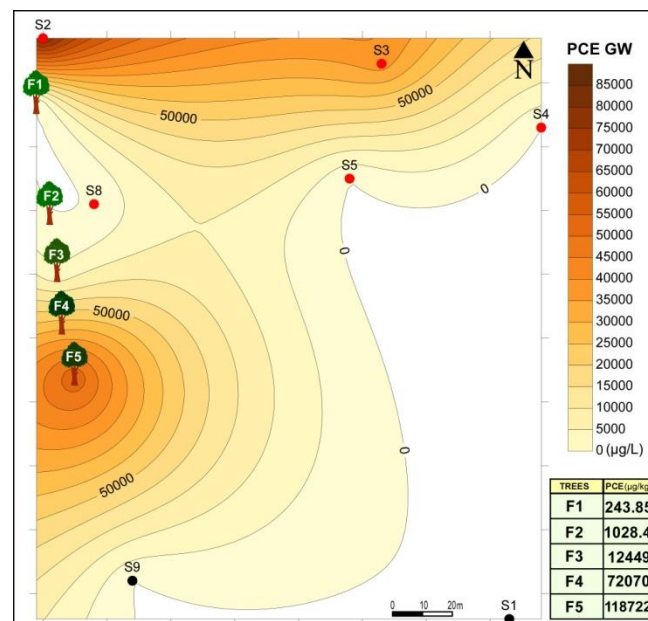


Figura 5 Esempio di cartografia di sintesi ottenuta dalla sovrapposizione delle isoconcentrazioni del PCE nelle acque di falda e di quelle rilevate negli alberi campionati.

Riferimenti bibliografici

- [1] Sorek A., Atzmon N., Dahan O., Gerstl Z., Kushisin L., Laor Y., Mingelgrin U., Nasser A., Ronen D., Tsechansky L., Weisbrod N., Graber ER., “Phytoscreening”: the use of trees for discovering subsurface contamination by VOCs. *Environ Sci Technol* 42 (2), 536-542, (2008).
- [2] Balouet J.-C., Burken J.G., Karg F., Vroblesky D.A., Smith K.T., Grudd H., Rindby A., Beaujard F., Chalot M., Dendrochemistry of Multiple Releases of Chlorinated Solvents at a Former Industrial Site. *Environ Sci Technol* 46, 9541–9547, (2008).
- [3] Burken, J.G., Vroblesky D.A., Balouet J.G., Phytoforensics, Dendrochemistry and Phytoscreening: New Green Tools for Delineating Contaminants from Past and Present. *Environ Sci Technol* 45, 6218-6226, (2011).
- [4] ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council). Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised. PHYTO-3. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Phytotechnologies Team, Tech Reg Update – 187, (2009).
- [5] Landmeyer J.E., Miller S., Campbell B.G., Vroblesky D.A., Gill A.C. & Clark A.P., Investigation of the potential source area, contamination pathway and probable release history of chlorinated-solvent-contaminated groundwater at the Capital City Plume Site, Montgomery, Alabama, 2008-2011. U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report, 2011-5148 – 53, (2011).
- [6] Larsen M, Burken J, Machackova J, Karlson UG & Trapp S.. Using Tree Core Samples to Monitor Natural Attenuation and Plume Distribution After a PCE Spill. *Environ Sci Technol* 42, 1711-1717, (2008).

- [7] Limmer M.A., Blouet J.C., Karg F., Vroblesky D.A., Burken J.G., Phytoscreening for chlorinated solvents using quick in vitro SPME sampling: application to urban plume in Verl, Germany. *Environ Sci Technol* 45 (19), 8276-8282, (2011).
- [8] Ma X., Burken J.G., VOCs fate and partitioning in vegetation: use of tree cores in groundwater analysis. *Environ Sci Technol* 36 (21), 4663-4668, (2002).
- [9] Schumacher J.G., Struckhoff G.C. & Burken J.G., Assessment of subsurface chlorinated solvent contamination using tree cores at the Front Street site and a former dry cleaning facility at the Riverfront Superfund Site, New Haven, Missouri, 1999-2003. U. S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2004-5049 – 35, (2004).
- [10] Trapp S., Algreen M., Rein A., Karlson U., Holm O., Phytoscreening with tree cores. In: Kästner M., Brackevelt M., Döberl G., Cassiani G., Petrangeli Papini M., Leven-Pfister C. & van Ree D. (eds), *Model-Driven Soil Probing, Site Assessment and Evaluation – Guidance Technologies*. Sapienza Università Editrice, 133-148, (2012).
- [11] Vroblesky D.A., Nietch C.T. & Morris J.T., Chlorinated Ethenes from Groundwater in Tree Trunks. *Environ Sci Technol*, 3, 510-515, (1999). [23] *GASTEC, Handbook*. 13th Edition, (2013).
- [12] Vroblesky D.A., User's guide to the collection and analysis of tree cores to assess the distribution of subsurface volatile organic compounds: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2008–5088, 59, (2008).
- [13] Wittlingerova Z., Machackova J., Petruzelkova A., Trapp S., Vlk K., Zima J., One-year measurements of chloroethanes in tree cores and groundwater at the SAP Mimon Site, Northern Bohemia. *Environ Sci Pollut Res*, 20 (2), 834-847, (2013).
- [14] Holm O., Rotard W., Trapp S., Dési R., *Guide to Phytoscreening – Using tree core sampling and chemical analyses to investigate contamination in the ground water and soil*. Prepared for the Terra, Aqua and Site remediation Centre of competence TASK-27, (2011).

- [15] Sheehan E.M., Time-weighted average solid-phase microextraction (TWA-SPME) for in-plant detection of chlorinated solvents. Missouri University of Science and technology. Master Thesis – 76, (2009).
- [16] Sheehan E.M., Limmer M.A., Mayer P., Karlson U.G., Burken J.G., Time-Weighted Average SPME Analysis for in Planta Determination of cVOCs. *Environ Sci Technol* 46 (6), 3319-3325, (2012).
- [17] Shetty MK, Limmer MA, Waltermire K, Morrison GC, Burken JG., In planta passive sampling devices for assessing subsurface chlorinated solvents. *Chemosphere* 104, 149-154, (2013).
- [18] Limmer M.A., Martin G.D., Watson C.J., Martinez C. and Burken J.G., Phytoscreening: a comparison of in planta portable GC-MS and in vitro analyses. *Groundwater Monitoring & Remediation* 34 (1), 49-56, (2014).
- [19] Luchetti L., Diligenti A. & Crescenzi E., Phytoscreening. Individuazione e monitoraggio della contaminazione da solventi clorurati nel sottosuolo attraverso il campionamento e l'analisi dei tronchi di albero. Atti del "Secondo Workshop Nazionale Bonifica, Recupero Ambientale e Sviluppo del Territorio: Esperienze a Confronto sul Fitorimediao". Terni, Italy, November 28-29, 2013. *Suppl. Micron* 29, 37-49 (2014)

**VERBALE CAMPIONAMENTO
MATERIALE E OGGETTI VARI (PHYTOSCREENING)**

VERBALE N° _____ DEL _____

<p>ALTRE INFORMAZIONI: <input type="checkbox"/> 02_SITI INQUINATI <input type="checkbox"/> 04_DISCARICHE <input type="checkbox"/> 06_AUT.INTEGR.AMB. <input type="checkbox"/> altro</p> <p>Ente richiedente D'UFFICIO Protocollo della richiesta n° _____ del _____</p> <p>Tecnici ARTA del Distretto di Chieti,</p> <p>LUOGO DI PRELIEVO:</p> <p>Il responsabile, data conoscenza del motivo della visita, ha invitato la persona reperita al momento dell'accesso a presenziare al controllo.</p>	<p>Attività esercitata</p> <p>Ragione sociale: Responsabile legale Cognome _____ Nome _____ Nato _____ residente a _____ Via _____ Qualifica _____</p> <p>Presente all'ispezione Cognome: _____ Nome : _____ nato a _____ residente a _____ Qualifica: _____</p>
--	---

CONDIZIONI METEO-AMBIENTALI:

Data	
Meteo	
Vento	
Pressione barometrica	
Data ultima pioggia	
Temp°C	

H2S		
NH3		
CH4%		
O2%		
CO2%		

Note _____

I sottoscritti hanno effettuato il prelievo di **N.** campioni di tronco ognuno dei quali suddivisi in **n.** aliquote.
 Note _____

I campioni prelevati sono successivamente riposti in contenitore refrigerato per il trasporto in laboratorio dove dovranno essere conservati in frigorifero a 4° -25° fino al momento dell'apertura

Parametri da ricercare

SITI INQ ALIFATICI ALOGENATI CANCEROGENI
 SITI INQ ALIFATICI CLORURATI
 SITI INQ COMPOSTI ORGANICI AROMATICI

SITI INQ IDROCARBURI C_{≤12}

SITI INQ METALLI

ALTRO _____

NOTE _____

I VERBALIZZANTI



Certificato N° 206877

Distretto Provinciale di Chieti – Via Spezioli, 62 – 88100 Chieti
 Tel.: 0871/42321 Fax: 0871/406287 E-mail: dist.chieti@artaabruzzo.it
 Cod. Fisc. 91058790882 – P. I.V.A. 01589980886

Verbale n° _____ del _____

pag. _____ di _____

Le aliquote sono state sigillate e contraddistinte con un cartellino sul quale sono riportate: sigla del punto di prelievo, data e n. verbale. Elenco dei campioni prelevati:

PUNTO DI PRELIEVO (Sigla campione)	Il campione è stato suddiviso in contenitori da:	Tipo di albero Coordinate		Note:
	n. _____ 40 ml (solventi)			Altezza campionamento da p.c (cm) - Diametro tronco (cm) Lunghezza tronchetto (cm)
	n. _____ 40 ml (solventi)			Altezza campionamento da p.c (cm) Diametro tronco (cm) Lunghezza tronchetto (cm)
	n. _____ 40 ml (solventi)			Altezza campionamento da p.c (cm) _____ Diametro tronco (cm) Lunghezza tronchetto (cm)

 Fatto, letto, confermato e sottoscritto alle ore _____
 LA DITTA _____

in data e luogo di cui sopra.

I VERBALIZZANTI _____

